

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08707

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞分泌エクソソームを用いた肝癌の革新的治療法の確立

研究課題名(英文) New strategy of hepatocellular carcinoma treatment using exosomes exocrimned by cancer associated fibroblast

研究代表者

原田 昇 (HARADA, Noboru)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80419580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblasts: CAFs)は、様々な細胞間情報伝達を介して癌細胞の進展に影響を及ぼしている。Exosomeは様々な癌種で癌進展へ影響を及ぼしている。肝細胞癌微小環境における線維芽細胞由来exosomeの役割について検討した。肝細胞癌患者の癌部、非癌部よりCAFsおよび正常線維芽細胞を単離培養しexosomeを抽出したところ、肝癌微小環境においてCAF-exosomeでは抗腫瘍効果のあるmiR-150-3p発現が低下しており、取り込まれた癌細胞内でCDH2の発現が抑制解除されることで癌進展が促進していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblasts: CAFs)は、細胞間情報伝達を介して癌細胞の進展に影響し、Exosomeは様々な癌種で癌進展へ影響を及ぼしていることがわかっていた。今回初めて肝細胞癌微小環境における線維芽細胞由来exosomeの役割について検討したところ、肝癌微小環境においてCAF-exosomeでは抗腫瘍効果のあるmiR-150-3p発現が低下し、癌細胞内でCDH2の発現が抑制解除されることで癌進展が促進している機序が判明した。今後予後の不良な肝細胞癌においてmiR-150-3pやCDH2を用いた革新的治療法へと繋がる可能性があった。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common and deadly cancer. The prognosis of HCC is poor and is related to tumor progression. The malignant potential of HCC is regulated by the tumor microenvironment (TME). As cancer-associated fibroblasts (CAFs) help regulate tumor progression, understanding how they function in HCC could improve patient outcomes. The aim of this study was to determine whether specific microRNAs (miRNAs) in exosomes derived from CAFs might be involved in HCC progression.

Overall, our findings suggest that the loss of antitumoral miR-150-3p in CAFs-derived exosomes greatly promotes HCC progression. Exosomal miR-150-3p is a potential prognostic biomarker, and transferring miR-150-3p-loaded exosomes to HCC cells might become a novel therapeutic option.

研究分野：肝細胞癌の治療

キーワード：エクソソーム 癌関連線維芽細胞 肝細胞癌 miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の肝癌死亡者数は2000年代前半を最多として、その後は緩徐に減少しつつある。しかし、未だに年間総死亡者数は3万人を超えており、肝癌は疾患対策上極めて重要な疾患と考えられる。成因としてC型肝炎は減少傾向にあり、脂肪肝を含む非B非C型が増加傾向にある。肝癌の治療は、肝機能良好な場合には、標準治療として肝切除術、焼灼術、血管塞栓術(1-4)さらに多発肝癌には分子標的薬であるRafキナーゼ活性やチロシンキナーゼ活性を阻害するソラフェニブが治療法とされているが、高度副作用の報告があり、顕著な予後改善は得られていないのが現状で、有効な分子標的薬は未だに開発できていない。最近報告された国立がんセンターによる肝癌の10年生存率では15.3%と5大がん中最低に位置し、非常に予後不良であり、その腫瘍学的悪性度(進展、浸潤)の解明と治療法の確率が急務であると考えられる(国立研究開発法人国立がん研究センター2016年1月発表データより)。当科では2004年に肝癌に対するIL-12を用いた遺伝子治療(5)、2006年IGFBP-3(Insulin-like growth factor binding protein-3)と肝癌予後解明(6)、2007年PAF(Platelet associated factor)と肝癌予後解明を報告してきた。現在、慢性炎症に起因する肝線維化進展は、肝星細胞と肝線維芽細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。肝星細胞や線維芽細胞を活性化する分子として、肝細胞障害により分泌されるApoptotic body、DAMPs (Damage-associated molecular patterns)、PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns)や、炎症細胞から分泌される炎症性サイトカインなどの関与が報告されており、その結果肝線維化の進展や発癌につながると考えられる。2013年にはTAM (Tumor associated macrophage) 及びCAF (Cancer associated factor) と肝癌の関係解明(8)を行い、癌間質の解析によって肝癌の解明を積極的に行ってきた。臨床医学では我々はこれまで、肝癌を含めた肝切除において2700例を超える症例を経験し、肝細胞癌に対する肝移植術を含め700例以上肝移植術を施行してきた国内外で有数の施設となっており、肝癌の研究は非常に重要な課題ととらえている。現在すでにすべての肝癌に対する切除臨床検体が系統的に保存されており、免疫組織学的解析、蛋白解析、DNA/RNA解析が可能な環境となっている。その中で近年、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞に様々なタンパクやmRNAやmiRNAなどが内包され、他の細胞に作用していることが明らかになってきた(9)。癌関連線維芽細胞(CAF)は通常の線維芽細胞(NF; normal fibroblast)とは異なり、形態が異なることがわかっている(図1)。また、一方で様々な癌において、CAFが、癌の進展に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(10)。乳癌においては、癌関連線維芽細胞(CAF)がエクソソームを介して、癌細胞のEMT(上皮間葉転換)などを起こして、癌の進展を促進していることが最近報告されている(11)。EMTは、1. がん幹細胞の発生機構、2. がん細胞の低分化(未分化)型への分化調節機構、3. がん関連線維芽細胞(CAF, EDAF細胞)の発生機構として、がんの悪化に非常に深く関与している。これらのことから、EMTを指標としたがんの診断法の開発は極めて有用であると考えられる。制御が非常に困難である肝癌において、CAFとエクソソームの関係を解明し、癌の進展浸潤の制御を行うことは非常に重要であり、エクソソームとCAFの関連性を解明し、EMTを指標とし、エクソソームを制御した新規の治療法を着想した。

## 2. 研究の目的

肝癌微小環境における線維芽細胞(CAF)由来のエクソソームの役割を解明し、上皮間葉移行(EMT)と増殖浸潤性を指標とした癌進展浸潤能力を制御した新規癌治療法開発を目的とする。

### 3 . 研究の方法

肝細胞癌患者 6 名の癌部、非癌部より CAFs および正常線維芽細胞 (Normal fibroblasts: NFs) を単離培養し exosome を抽出する。Exosome を癌細胞株に添加し癌細胞への影響について比較した。また、網羅的 microRNA(miRNA)解析を行い、exosome 内で発現比が異なる miRNA を検索した。特定した miRNA を CAFs および癌細胞株に強制発現させ、癌進展能を比較した。特定した miRNA により転写抑制されている遺伝子を同定し、癌進展メカニズムを解明した。肝細胞癌患者血清より exosome を抽出し、特定した miRNA 発現を比較した。

### 4 . 研究成果

CAFs 由来 exosome では NFs と比較して癌遊走や浸潤能が有意に亢進した。Exosome-miRNA を網羅的に比較解析すると、CAFs で miR-150-3p が有意に低下していた。CAFs に miR-150-3p を強制発現させ、抽出した exosome を癌細胞株に添加すると癌進展能が抑制された。データベースを用いて miR-150-3p のターゲットとなる遺伝子を検索すると、cadherin 2 (CDH2) が特定された。Luciferase reporter assay より、miR-150-3p が CDH2 の mRNA における 3' UTR を直接的に抑制していることが明らかとなった。また、miR-150-3p 強制発現により癌細胞株で CDH2 タンパク質発現は低下し、CDH2 ノックダウン癌細胞株では癌進展が抑制された。肝細胞癌患者血清における exosome-miR-150-3p 低発現群は、全生存期間において有意な予後不良であった。

これらの結果については

2020 年の第 120 回日本外科学会定期学術集会にて報告した。又 2021 年に

Yugawa K, Harada N, et al. Eur J Surg Oncol. 2021 Feb;47(2):384-393.

Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma progression through downregulation of exosomal miR-150-3p.

として論文発表を施行した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yugawa Kyohei, Yoshizumi Tomoharu, Mano Yohei, Itoh Shinji, Harada Noboru, Ikegami Toru, Kohashi Kenichi, Oda Yoshinao, Mori Masaki	4. 巻 47
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma progression through downregulation of exosomal miR-150-3p	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 384 ~ 393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2020.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯川恭平、原田昇ら
2. 発表標題 肝癌微小環境における癌関連線維芽細胞由来exosomeの意義
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯川恭平、原田昇ら
2. 発表標題 肝癌微小環境における癌関連線維芽細胞由来exosomeの意義
3. 学会等名 第120回日本外科学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	間野 洋平  (MANO Yohei)  (10792244)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・肝胆膵外科医師    (87102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	副島 雄二  (SOEJIMA Yuji)  (30325526)	信州大学・学術研究院医学系・教授    (13601)	
研究分担者	戸島 剛男  (TOSHIMA Takeshi)  (40608965)	九州大学・大学病院・助教    (17102)	
研究分担者	本村 貴志  (MOTOMURA Takashi)  (50719507)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	
研究分担者	吉住 朋晴  (YOSHIZUMI Tomoharu)  (80363373)	九州大学・医学研究院・准教授    (17102)	
研究分担者	池上 徹  (IKEGAMI Toru)  (80432938)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (32651)	
研究分担者	伊藤 心二  (ITOH Shinji)  (90382423)	九州大学・大学病院・助教    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------