

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08799

研究課題名(和文) 肺癌遠隔転移における播種性腫瘍細胞由来エクソソームの役割と休眠化維持機構の解明

研究課題名(英文) The role of disseminated tumor cells-derived exosomes in lung cancer metastasis and the molecular mechanism of lung cancer dormancy

研究代表者

嶋田 善久 (Shimada, Yoshihisa)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00459497

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)：肺癌細胞株を用いて細胞増殖能解析、腫瘍休眠関連マーカー、上皮間葉系転換マーカー発現解析を行った。細胞株H1299で間葉系マーカー発現と腫瘍休眠関連miRNA(miR23b/miR190a)発現において最も有意な負の相関を認めた。早期肺腺癌切除後の患者群を脈管浸潤の有無、再発の有無、再発時期(早期再発・晩期再発)で分類し、各群より血清由来エクソソームを抽出した。これらエクソソームを用いたsmall RNAシークエンス解析を行い、腫瘍細胞休眠後再発を示唆する晩期再発群に特徴的な遺伝子を同定した。晩期再発群由来エクソソーム中の遺伝子発現解析において、病理学的脈管浸潤の有無と相関性が高いことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究におけるin vitro解析において、既知の腫瘍細胞休眠関連遺伝子と上皮間葉系転換マーカー発現との間に相関性を認めた。また腫瘍休眠関連指数高値の細胞株由来のエクソソームと受容細胞との共培養によって、受容細胞の形質転換が生じ、間葉系及び腫瘍細胞休眠関連マーカー発現値が増加することがわかり、播種性腫瘍細胞由来エクソソームの役割について一部証明することができた。また患者血清由来エクソソームを用いた解析では晩期再発例の術前血清由来エクソソーム中に特異的な遺伝子を同定した。本研究で初めて早期肺癌患者血清由来エクソソーム中に腫瘍細胞休眠関連遺伝子が存在することを証明できた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the role of disseminated tumor cells and their exosomes in terms of metastasis and invasion process. Cell proliferation and tumor dormancy-related and epithelial-mesenchymal transition marker expressions were assessed. A non-small cell lung cancer cell line of H1299 cells showed the positive relationship between the expression of mesenchymal markers and the decreased expression of tumor dormancy markers, including miR23b/miR190a. Patient-derived serum samples were collected. We classified patients into several groups according to pathological intravascular invasion status, the presence of recurrence, and time of recurrences (early recurrence and late recurrence) and extracted exosomes from their serum samples. A small RNA sequence was performed, and several novel miRNAs associated with late recurrence and tumor cell dormancy were identified. Those miRNAs, including miR23b/190a, were relevant to the presence of intravascular invasion.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：転移 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

早期発見と薬物療法の進歩により肺癌の治療成績は飛躍的に向上したが、未だ予後不良である。その直接死因の大多数は遠隔転移であり、その機構を解明し転移を予防することができれば肺癌克服につながる。肺癌術後、一定の潜伏期間を経ての遠隔転移は少ない。その発端となる癌細胞集団は播種性腫瘍細胞と呼ばれ、微小残存病変、骨髄、あるいは転移巣近傍血管周囲ニッチに存在するとされる。播種性腫瘍細胞は将来の転移巣における癌微小環境(前転移ニッチ)が構築されるまでの間、自身を休眠状態(Tumor Dormancy)下におき、免疫回避機構と治療抵抗性を維持するとされる。

癌転移機構において、癌細胞由来エクソソームが持つ細胞間相互作用の媒体としての重要な役割が明らかとなってきた。エクソソームはあらゆる細胞から分泌される、細胞外分泌小胞であり、由来する細胞と類似の機能を備えた核酸物質、蛋白などを内包している。すなわちエクソソームは細胞が自身の役割を遂行するうえでのとび道具とみなせる。癌転移機構に関連したエクソソームの主な役割として、前転移ニッチの形成、骨髄由来免疫細胞の転移先への動員、エクソソーム受容細胞における上皮間葉系転換の促進、癌細胞免疫逃避機構の促進、転移臓器親和性への関与などがあげられる。我々はこれまで肺癌細胞株及び NOD-SCID マウスを用いた実験を行い、からまでの癌細胞由来エクソソームの機能を実証してきた。

## 2. 研究の目的

癌細胞の免疫回避機構と治療抵抗性に密接に関連する“播種性腫瘍細胞と Tumor Dormancy”という、転移初期相における重要なメカニズムを包括的に解明することである。播種性腫瘍細胞由来エクソソームを媒体とした細胞間相互作用が転移促進因子になる“という仮説を検証すべく研究を進め、臓器横断的な転移機構の解明と新規治療法開発へと臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) 肺癌細胞株を用いた腫瘍休眠関連因子発現、腫瘍増殖能、上皮間葉系転換マーカー発現に関する in vitro 解析と新規腫瘍休眠関連因子候補の同定  
非小細胞肺癌細胞株 (A549/H1299/HCC827/PC9/H1581)、小細胞肺癌細胞株 (H82/H69/H526)、ヒト気管支上皮細胞株 (HBEC3-KT) を用いて細胞増殖能、腫瘍休眠関連因子発現 (ERK/pERK/p38/uPAR/miR23b/miR190a)、上皮間葉系転換マーカー (E-cadherin/N-cadherin/EpCAM/Vimentin/UCHL1) 発現を調べ、各種細胞における発現・増殖能の相関性について検討した。また選定した細胞株を用いてマイクロアレイ解析及び GO 解析を行い新規腫瘍休眠関連因子候補の同定を行った。
- (2) 腫瘍休眠関連因子高発現細胞株由来エクソソームと受容細胞との共培養実験  
播種性腫瘍細胞の特徴を最も多く有する細胞株を同定し、エクソソームの抽出を行った。同エクソソームと各種受容細胞との共培養を行い、一定時間後の形質転換、上皮間葉系転換発現及び腫瘍休眠マーカー発現の違いについて解析した。
- (3) 肺癌術後患者血清エクソソームを用いた網羅的遺伝子発現解析と晩期再発例の特徴  
肺腺癌完全切除後の患者血清由来エクソソームを用いた解析を行い、播種性腫瘍細胞由来エクソソームを同定可能かどうか、また腫瘍休眠関連因子高発現はどのような患者群で多くみられるかについて検討した。
- (4) 腫瘍休眠関連マイクロ RNA 発現解析と脈管浸潤との関連  
腫瘍休眠関連 miRNA である miR23b/miR190a 発現を抽出し、PCR で検証解析を行った。また病理学的脈管浸潤、血管内浸潤細胞、血管内皮細胞における遺伝子発現の比較検討を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 各種肺癌細胞株及びヒト気管支上皮細胞株を用いて MTS アッセイで細胞増殖能解析を行った。非小細胞肺癌細胞株では H1299、A549、H1581 の順に細胞増殖能が高かった。さらに既知の各種腫瘍休眠関連マーカー及び上皮間葉系転換マーカー発現について蛋白及び遺伝子発現解析を行ったところ、間葉系マーカー発現と miR23b 及び miR190a 発現に有意な負の相関を認め、H1299 で最も間葉系マーカー高値、腫瘍休眠関連 miRNA 低値であった。一方 HBEC3-KT に加え PC9、HCC827 で上皮系マーカー発現が高値であり、また腫瘍休眠関連マーカー指数低値(腫瘍休眠関連 miRNA 発現高値)であったため、H1299、H1581、PC9、HCC827 を用いてマイクロアレイ解析を行った。腫瘍休眠関連マーカー指数高値の肺癌細胞株で有意に高発現であった 30 の遺伝子のうち早期肺癌における有意な予後因子である MAGEA10 に着目した。検証目的の蛋白発現解析においても H1299 で有意に高発現であった。

(2) 上記より播種性腫瘍細胞の特徴を最も強く有する細胞株として H1299 を同定し、膜蛋白ビーズ法でエクソソームの抽出を行った。同エクソソームと各種受容細胞との共培養を行った。72 時間共培養後の PC9 細胞は親株細胞と比較し、上皮系マーカー発現低下、間葉系マーカー発現上昇、腫瘍休眠関連マーカー指数上昇を認めた。また細胞周期上 G0/1 相増加、癌幹細胞マーカー発現 (CD133/CD44) 上昇を認めた。このことにより播種性腫瘍細胞由来エクソソームは受容細胞に対し、腫瘍休眠化を促進させる方向への形質転換を引き起こすことが示唆された。

(3) 早期肺腺癌完全切除後の患者群を脈管浸潤の有無、再発の有無、再発時期(早期再発・晚期再発)で分類し、各群より血清由来エクソソームを抽出した。これらエクソソームを用いた small RNA シーケンス解析を行い、腫瘍細胞休眠後再発を示唆する晚期再発群に特徴的な遺伝子群を同定した(図 1)。晚期再発群由来エクソソーム中の遺伝子発現解析において、病理学的脈管浸潤の有無と相関性が高いことがわかった。

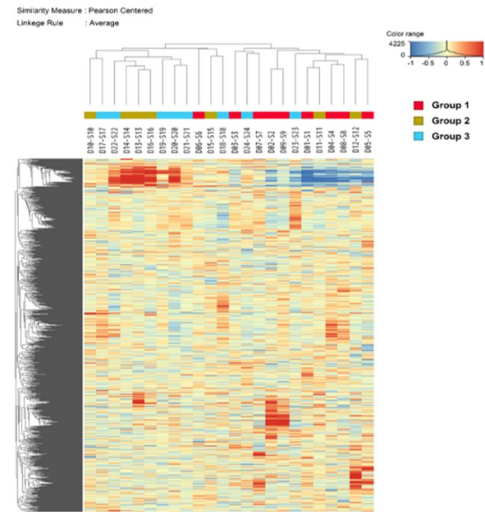


図1 早期肺腺癌術後症例を対象としたsmall RN-seq解析

(4) 上記早期肺腺癌患者血清を用いて既知の腫瘍細胞休眠関連遺伝子 miR23b/miR190a 発現及び本検討で同定された遺伝子発現の検証解析を行ったところ、脈管浸潤陽性/晚期再発群 (G1)はそれ以外と比較し有意に miR23b/miR190a 発現低値であった(図 2)。また病理学的脈管浸潤陽性例のサンプルを用いて、LCM 法にて血管内浸潤細胞、血管内皮細胞を採取し、原発巣の細胞と腫瘍休眠関連 miRNA 発現に関して比較解析を行ったが有意な差は認めなかった。

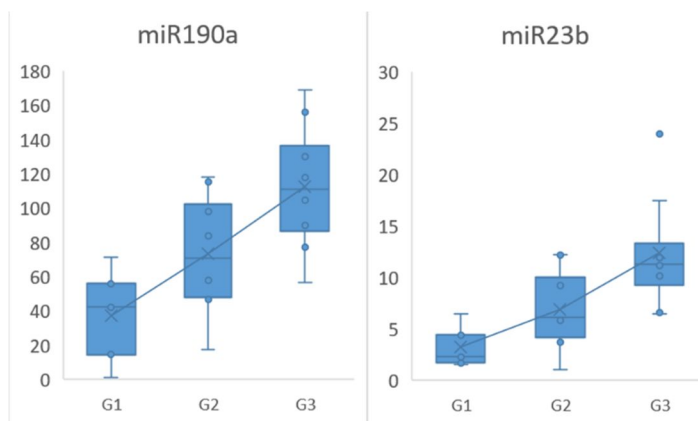


図2 腫瘍休眠関連miRNA発現の検証解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 重福俊祐、嶋田善久
2. 発表標題 Mesenchymal lung cancer-derived exosomes alter E-cadherin expression in epithelial cancer cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田善久
2. 発表標題 早期肺癌患者由来細胞外小胞中癌細胞休眠化関連microRNA発現と脈管浸潤との関係
3. 学会等名 第62回肺癌学会
4. 発表年 2021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	池田 徳彦  (Ikeda Norihiko)  (70246205)	東京医科大学・医学部・主任教授    (32645)	

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
---------	---------