

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15803

研究課題名(和文)大腸癌幹細胞はエクソソームを介した「自律性ニッチ」を形成しているのか？

研究課題名(英文)Exosomes derived from colorectal cancer are associated with niche formations.

研究代表者

黒羽 正剛(Kuroha, Masatake)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70709469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸癌由来3次元オルガノイド培養から超遠心方によるエクソソームの抽出に成功した。大腸癌オルガノイド由来エクソソームと、大腸腺腫オルガノイド由来エクソソームは内包されるmicro RNAが異なること、癌オルガノイド由来エクソソームでは、特にmir-1246の発現が亢進していることを明らかとした。さらには、mir-1246は大腸癌細胞株のTGF β の発現を制御しており、エクソソームによる細胞内微小環境の形成に関与していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3次元オルガノイド培養システムからエクソソームを抽出した。オルガノイド培養上清から抽出可能という知見は新規である。また、腫瘍の進行度によりエクソソームの性質が異なることを明らかとした。さらにはニッチ形成に関与していることも明らかとした。大腸癌が発育にともない、癌は周囲の細胞、もしくは自身のheterogeneityに適応するために分泌している可能性が推定され、大腸癌の発育進展の機序解明に重要な知見がえられた。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are membrane-enclosed nanovesicles and have been increasingly recognized as important cell communications by transmitting microRNA (miRNA). Development of a three-dimensional organoid culture system allows us to perform long-term expansion of epithelial organoids of human CRA and CRC. We established six CRC patient-derived organoids and eight CRA patient-derived organoids. We analyzed the exosomal and cellular microRNA expression profiles by miRNA microarray. We found different miRNA expression profiles between CRC- and CRA-derived organoids, and that both exosomal and cellular miR-1246 expression was upregulated in CRC-derived organoids compared to CRA-derived organoids. Alteration of miR-1246 expression by miR-1246 mimic or inhibitor accordingly increased or decreased cell proliferation in HT-29 CRC cell line, respectively. In conclusion, we here reported upregulation of miR-1246 might play a role in increased cell proliferation in colorectal adenoma-carcinoma transition.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

エクソソームとは

エクソソームは 100nm の小胞顆粒で多くの種類の細胞から分泌される。脂質二重膜を有し顆粒の内部には蛋白質、核酸(mRNA、miRNA、DNA)、脂質を含む。細胞外に分泌され別の細胞に移動する事が可能で、受容体や酵素と全く異なった細胞間伝達機構、細胞の恒常性維持機構として注目されている。癌細胞からもエクソソームが分泌される事が報告され、癌細胞の浸潤、転移に関与する事が明らかとされつつあるが、エクソソーム研究には様々な問題点も存在している。エクソソーム抽出時に用いられる試料は大きく 2 種類で、cell line や初代培養の培養上清を用いるか、ヒトやマウスの体液(血液など)を用いる方法である。cell line は特殊な環境下で培養可能な細胞が選択されており、初代培養では細胞数が少ない事や、長期培養が不可能であり再現性をもった安定的なエクソソームの抽出は困難である。体液などの試料では細胞からの直接的なエクソソーム分泌の証明が不可能である。このように、様々な条件下でエクソソームを安定して質的に解析する事は難しく、癌の増殖、浸潤、転移におけるエクソソーム機能については不明な点が多く残されている。

大腸癌幹細胞の長期培養システム

長らく大腸癌細胞の in vitro での長期培養は一部の cell line でのみしか成功していなかった。これは、癌細胞の長期培養に必須である癌幹細胞を維持する手法が未確立だった為である。2007 年以降、腸管上皮幹細胞の微小環境因子(ニッチ)として Wnt とその受容体である Frizzled/Lrp、R-spondin/Lgr、Notch 経路、BMP 経路が相次いで報告された。2016 年、様々な進行度のヒト大腸癌組織から抽出した癌細胞に、上記のニッチ形成因子を補充する事で自己複製能や多分化能を保持した大腸癌幹細胞を含んだ大腸癌細胞群(オルガノイド)を in vitro でほぼ 100%培養する事が可能となった(Cell Stem Cell 2016, Jun 2;18(6))。これらの研究より、大腸癌幹細胞は正常上皮幹細胞と同じくニッチが存在する事や、遺伝子変異の蓄積によりニッチの要求性が低下しニッチ非依存的な増殖が可能となる事、ニッチ非依存的な増殖が、癌の浸潤、EMT や転移をきたす原因となる事が明らかとされた。

大腸癌の浸潤と「自律性ニッチ」にはエクソソームが関与しているのか？

遺伝子変異の蓄積が癌細胞のニッチ要求性低下に関与しているのか、我々はこのメカニズムに癌細胞からのエクソソームの分泌が関与していると推定している。本研究では大腸癌は遺伝子変異の蓄積により(進行癌になるにつれ)分泌するエクソソームに質的变化を来す。エクソソームには癌幹細胞を維持するニッチ形成因子が含まれる、もしくは周囲の細胞へニッチ形成因子の分泌を誘導する何らかの因子が含まれる。それにより、周囲の細胞や線維芽組織などから制御されていたニッチに依存しない、癌幹細胞の自律した増殖、維持が可能となる。上記メカニズムを「自律性ニッチ」と名付け、前述した新しい大腸癌長期培養システムを用いて癌の進行度に応じたエクソソームの質的变化が明確となれば、癌の浸潤におけるエクソソームのメカニズムや、癌細胞特異的なエクソソームの存在、癌転移時の新たなマーカー等を創出する事が可能となる。

2. 研究の目的

大腸癌長期培養システムを用いて癌の進行度に応じたエクソソームの質的变化が明確とし、癌の浸潤におけるエクソソームのメカニズムや、癌細胞特異的なエクソソームの存在、癌転移時の新たなマーカー等を創出することが目的である。

3. 研究の方法

(1)大腸癌幹細胞の長期培養株(オルガノイド)を作製

ニッチの要求性の異なる大腸癌細胞を選別する為、正常大腸上皮、腺腫、早期癌、進行癌、転移癌までを対象とする。手術、及び内視鏡で切除された大腸腺腫幹細胞、大腸癌幹細胞、正常上皮幹細胞を用いる。癌の場合 TMN 分類で:T1,N0,M0 までの早期癌群、T4,N1M0 までの進行癌群、M1 の転移癌群と分けて各々2 検体以上を対象とする。また、同一病変の中に腺腫成分と癌成分が領域性に区別できる検体であれば正常上皮、腺腫、癌部分を区別し分離し培養する。標本から単離した細胞をマトリゲル内に包埋し培養する。マトリゲルを用いる事と、疑似的にニッチを形成する事で癌細胞はオルガノイドを形成する。基本培地以外に Wnt3a、EGF、Noggin、R-spondin1、B-27、ガストリン、ニコチンアミド、A83-01、p38 阻害剤を添加し疑似的なニッチを保つ。この状態で培養を継続する事で様々なニッチ要求性を示す大腸癌細胞でも培養可能である。

得られた癌細胞集団は、その進行度によりニッチ要求性が異なる。Wnt3a、EGF、Noggin、R-spondin1、B-27、ガストリン、ニコチンアミド、A83-01、p38 阻害剤を一つずつ癌幹細胞培地から除去する、ニッチ要求性が高い細胞は因子を除去する事で stemness を失い細胞生存率の低下、アポトーシスが引き起こされる。各条件下で FACS、ウエスタンブロット法でアポトーシスの増加を検証する。各癌幹細胞群におけるニッチ要求性を確認後、実際の進行度との相関関係を調べ

る。

(2) エクソソームの抽出と、ニッチ要求性に特異的な RNA 分子、蛋白を絞り込む

エクソソームの回収、RNA、蛋白の抽出

得られた培養細胞株の上清を回収。遠心(2000 × g, 30min)し細胞をペレットとする。Total Exosome Isolation(invitrogen)を用いて抽出する。抽出したエクソソームの個数・形態をナノ粒子アナライザー(qNano)・電子顕微鏡で解析する。得られたエクソソームサンプルから Total Exosome RNA and Protein Kit(invitrogen)を用いて totalRNA を精製する。また、調整したペレットから蛋白も抽出する。

網羅的遺伝子発現プロファイル

1. で明らかとしたニッチ要求性が異なる癌幹細胞群をマイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現プロファイルを比較する。GreenChip miRNA Assay(affymetrics)を用いて 2 群間で発現が異なる mi RNA を絞り込む。

(3) ニッチ要求性を制御している RNA 分子、蛋白を同定する(強制発現・ノックダウン)。

大腸癌培養細胞(SW480, HT29)を用いた検討

絞り込んだ micro RNA を大腸癌培養細胞(SW480, HT29)に強制発現、ノックダウンする事でニッチ要求性の変化を検討する。腸管上皮培養細胞はすでにニッチ要求性が低下した状態で生存可能である。そのため、培養細胞株での microRNA 強制発現系ではニッチの評価は困難と考える。一方で、ノックダウンにより自律性ニッチが低下し細胞生存率の低下、細胞死率の増加が見込まれるため、それぞれ MTT、FACS を用いた assay、annexin/PI assay で検討する。

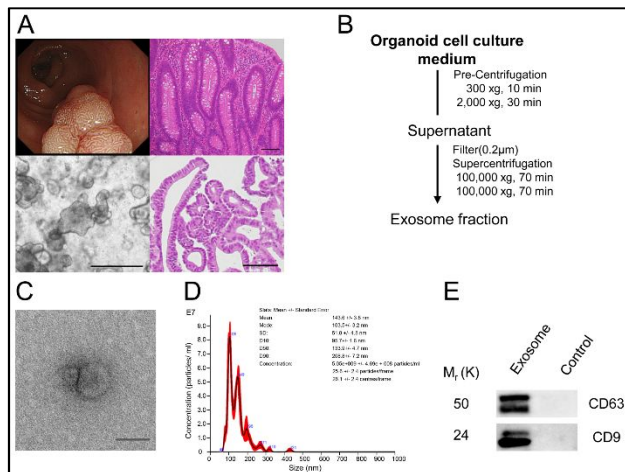
オルガノイドを用いた検討

ニッチ要求性が高いオルガノイドに同定した microRNA を Xfect™ MicroRNA Transfection Reagent kit を用いて遺伝子導入する。導入後、1. と同様の手法を用いてニッチ要求性の変化を検出する。また、既存報告のされている Wnt、R-spondin、EGF、BMP シグナル経路発現レベルを qRT-PCR 法により定量化する。ウエスタンブロット法により上記の蛋白発現量を定量化し比較する。次にノックダウンを行い、上記方法と同様の検討をする。ニッチ要求性が高い癌腫では、強制発現によりニッチ要求性が低下する事が予想される。ニッチ要求性が低い癌細胞株にも同様の手法を用いる。

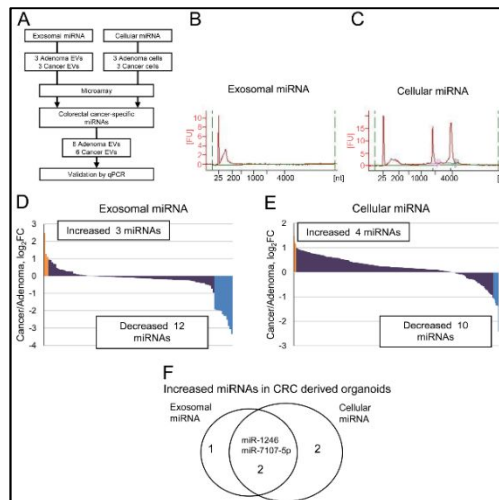
4. 研究成果

(1) オルガノイドの作製とエクソソーム miRNA の抽出

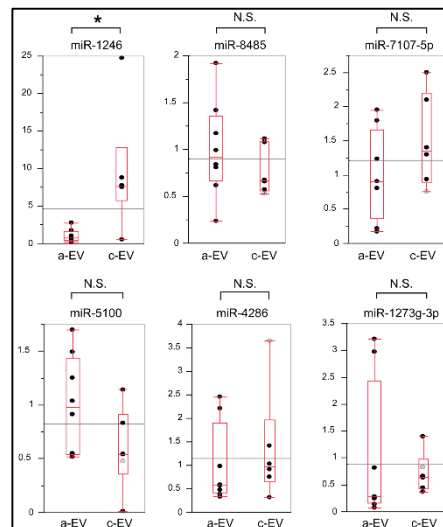
はじめに、内視鏡的切除や外科切除を施行された標本より組織片を採取し、腺腫由来オルガノイド 8 例、癌由来オルガノイドを 6 例作製した。作製したオルガノイドから観察用切片を作成し、H-E 染色を行い抽出された同一患者の標本と比較した。オルガノイドは腸管上皮様の構造物を有し、元来の臓器を模倣することが確認された。次に、オルガノイド培養上清から超遠心法によるエクソソーム分画の抽出を行った。抽出されたエクソソーム分画では透過型電子顕微鏡で 100nm 前後の小胞が観察された。ナノ粒子解析システムでエクソソーム分画中の微粒子は 100nm 前後に最頻値を認めた。ウエスタンブロットではエクソソーム膜蛋白質である CD9、CD63 が陽性であった一方、培養液のみの場合は CD9、CD63 共に陰性だった。



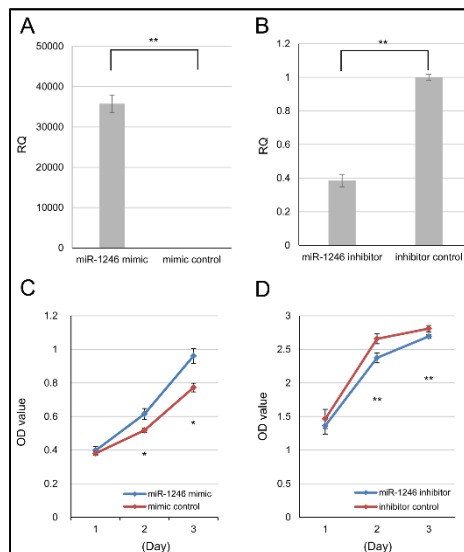
(2) 癌-腺腫群間における miRNA の網羅的発現解析
 オルガノイドおよび培養上清中のエクソソーム分画からそれぞれ total RNA を抽出した。得られた RNA は電気泳動を行い、リボソーム RNA の混入がないことを確認した。腺腫 3 検体及び癌 3 検体から抽出した細胞内 miRNA およびエクソソーム miRNA に関して、網羅的発現解析を行った。まず、細胞内に関しては、癌群で 348 個、腺腫群で 344 個の miRNA が確認された。共通して発現がみられる 319 個の miRNA に関して発現差を比較したところ、腺腫を基準として癌群で 4 個の miRNA の発現が亢進しており、10 個が減少していた。次に、エクソソームに関しては、癌群で 193 個、腺腫群で 129 個の miRNA が確認された。共通して発現を認められた 122 個の miRNA に関して発現差を比較したところ、癌群で 3 個の miRNA の発現が亢進しており、12 個が減少していた。癌群において細胞内及びエクソソームで共通して発現が亢進した miRNA は miR-1246、miR-7107-5p の 2 つであった。一方共通して発現が減少した miRNA は認めなかった。



(3) エクソソーム miR-1246 は癌において有意に発現が亢進する
 エクソソーム内における miRNA の発現変動を確認するために、癌で特に発現が亢進していた miR-1246、miR-8485、miR-7107-5p、及び腺腫で発現が亢進していた miR-5100、miR-4286、miR-1273g-3p に関して検体数を追加し癌 6、腺腫 8 の計 14 サンプルでリアルタイム PCR による validation を行った。miR-1246 が癌群において有意に発現が亢進していることを確認した ($p=0.0496$)。miR-8485 は有意差がないが癌で発現が亢進する傾向にあった ($p=0.189$)。また、miR-5100 は癌で減少する傾向があったが有意差は得られなかった ($p=0.091$)。miR-7107-5p、miR-4286、miR-1273g-3p に関しては分散し一定の傾向を示さなかった。以上の結果から、エクソソーム miRNA において miR-1246 は癌群で発現が亢進していることを確認した。



(4) 培養細胞への mir 強制発現
 オルガノイドへのトランスフェクションが困難であったため、Mir-1246 を HT29cell にトランスフェクションしたところ、MTS 圧政で細胞発育の亢進が確認された。マイクロアレイでは mir-1246 の強制発現により TGF の発現が亢進することが分かり、分泌された mir-1246 による周囲細胞へのニッチ形成の可能性を示唆する結果がえられた。時間・予算的にここまでの研究となったため、今後はさらに、発現亢進する mir がどのようにニッチに関与するかを明らかとしていく。



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 1件）

1. 発表者名 黒羽正剛
2. 発表標題 大腸癌三次元オルガノイド培養を用いたエクソソーム研究
3. 学会等名 第27回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井博, 黒羽正剛, 正宗淳
2. 発表標題 Exosome released from patients-derived organoids contain different microRNA profiles between colorectal cancer and adenoma
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2019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