

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16351

研究課題名（和文）腹膜播種における癌細胞由来エクソソームの役割の解析

研究課題名（英文）Analysis of the role of cancer cell-derived exosomes in peritoneal dissemination

研究代表者

生田 大二（Ikuta, Daiji）

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：00581935

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）：本研究ではマウス大腸癌細胞株であるCT26細胞を用いて腹膜播種に癌由来エクソソームが及ぼす影響について検討を行った。CT26細胞株からエクソソームを超速心法にて回収した。エクソソームが血行性転移に関する既報の論文を参考にエクソソームの投与を3週間で行うと、エクソソームの投与により腹膜播種の形成が阻害された。ヌードマウスでも同様であったことから、癌細胞由来エクソソームは腹腔内投与を行うことにより、腹膜播種の形成に抑制的な影響が考えられた。エクソソームのみの腹腔内投与後の組織学的検討で腹膜の線維化、血管新生の増加などは認めず、腹腔内における線維化などに対し強い影響を及ぼさない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞由来のエクソソームは、癌の血行性転移に関与していることが最近報告されている。一方で、血行性転移とは異なる転移形態である腹膜播種に関しても、卵巣癌においてエクソソームの関連を示唆する報告はあるが、消化器癌においてその関与は不明である。本研究では癌由来エクソソームが大腸癌においても腹膜播種に影響を及ぼす可能性を示唆しており、今後の腹膜播種メカニズムの解明に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of cancer-derived exosomes on peritoneal dissemination using CT26 cells, a murine colon cancer cell line. Exosomes were collected from the CT26 cell line by ultracentrifugation. When exosomes were administered for 3 weeks, referring to a previous paper on hematogenous metastasis, exosomes inhibited the formation of peritoneal dissemination. The same was observed in nude mice, suggesting that the intraperitoneal administration of cancer cell-derived exosomes inhibits the formation of peritoneal dissemination. Histological examination after intraperitoneal administration of exosomes alone showed no increase in peritoneal fibrosis or angiogenesis, suggesting that exosomes may not increase fibrosis in the peritoneal cavity.

研究分野：腹膜播種

キーワード：腹膜播種 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は年々増加しており、その対応が必要な疾患のひとつである。大腸癌は粘膜から発生し、筋層、漿膜側へと浸潤し、その後、腸管外へと到達する。原発巣の増大だけでなく、リンパ管、血管などへの脈管侵襲にとまない、血行性やリンパ行性の遠隔転移をきたす。また、漿膜浸潤の後、腹腔内へと播種を形成することがある。遠隔転移をきたした大腸癌は根治切除が困難であることも多く、化学療法を含めた治療が必要となる。一方で、分子標的薬などの化学療法の進歩にも関わらず、切除不能大腸癌は生存期間が約3年であり、さらなる治療法の開発が望まれる。

細胞外小胞体はマイクロベジクルやエクソソームに分類されており、エクソソームは細胞から分泌される直径約100nmの小胞で、脂質二重膜を有している。エクソソーム内にはmicroRNAなどが封入されており、様々な機能を有していることが示唆されている。このことから、癌細胞由来のエクソソームを解析・検出することで、バイオマーカーとしてエクソソームの利用が試みられ、今後の臨床応用が期待されている。

一方で、癌細胞由来エクソソームが癌微小環境に作用することで、癌の転移の形成に関与する可能性が報告され、癌細胞由来のエクソソームは、癌の血行性転移に関与していることが最近報告されている。一方で、血行性転移とは異なる転移形態である腹膜播種に関しても、卵巣癌においてエクソソームの関連を示唆する報告はあるものの、消化器癌においてその関与は不明である。その多くは血行性転移に関する報告であり、腹膜播種におけるエクソソームの役割については十分には明らかではない。腹膜播種も血行性転移と同様に、癌由来のエクソソームが癌微小環境の変化に関わっていることが推測される。

2. 研究の目的

本研究は、癌から放出された癌由来エクソソームが遠隔転移、特に腹膜播種に及ぼす影響に着目し、マウスを用いた *In Vivo* モデルで解析を行った。癌細胞株から超遠心法を用いたエクソソームの抽出を行い、マウス大腸癌 CT26 細胞株を用いた癌腹膜転移モデルを作成した。マウス大腸癌 CT26 細胞株と同種の Balb/c マウスを用いた *In Vivo* の癌腹膜転移モデルを用いて、腹膜播種におけるエクソソームの役割について解析を行う。また *In Vivo* で得られた結果をもとに、腹膜播種患者における播種の機序解明やその制御によって、癌の治療効果を高めることを目標とする。

3. 研究の方法

Balb/c マウス大腸癌細胞株 CT26 を用いて癌由来エクソソームを精製し、*in vivo* 腹膜播種モデルを用いて検討を行った。癌由来エクソソーム投与による腹膜播種の増悪について客観的評価を腸間膜結節数などで行い、また標本から切片を作成し間質や中皮の変化について検討を行った。

4. 研究成果

本研究ではマウス大腸癌細胞株である CT26 細胞を用いて腹膜播種に癌由来エクソソームが及ぼす影響について検討を行った。CT26 細胞株から癌由来エクソソームを超遠心法にて回収した。これまでの予備実験では CT26 大腸癌細胞株から収集した癌由来エクソソームを Balb/c マウスに対し腹腔内投与を行ったところ、CT26 癌細胞を同じ遺伝子背景をもつ Balb/c マウスの腹腔内に投与することで腹膜播種の形成が増加する傾向が認められた。その後、既報の論文などを参考に癌由来エクソソームの投与を3週間に延長すると、癌由来エクソソームの投与により腹膜播

種の形成が阻害された。この結果から、条件により腹膜播種への影響は癌由来エクソソームの投与条件で異なる可能性が考えられた。癌由来エクソソームのこれらの結果から、長期間投与における獲得免疫の影響を考慮するため、ヌードマウスを用いて検討を行った。

Balb/c 由来ヌードマウスでは CT26 癌由来エクソソームの腹腔内投与により、CT26 細胞腹膜播種の形成が減少した。このため、CT26 癌

細胞由来エクソソームは腹腔内投与を行うことにより、腹膜播種の形成に影響を及ぼし、獲得免疫のない状態においても播種の抑制に働くと考えられた。また、今回のモデルにおいて腹膜結節を肉眼で確認していたことから、播種結節が炎症などの結節ではなく、癌であることを確認するため、播種結節を採取し HE 染色を行った。その結果今回のマウスモデルで認められる腹膜播種の結節内に癌細胞を認め、播種結節は炎症性など反応性の結節ではなく、癌細胞によるものであることを確認した。(図 1)

次の検討として、癌由来エクソソームがマウスの腹腔内において腹膜に何らかの影響を及ぼしている可能性を考えた。そこで、マウスモデルにおいて癌細胞を投与せず、癌由来エクソソームのみの腹腔内投与をおこない、腹膜を含めた腹壁を回収することで、組織学的検討をおこなった。aSMA で線維化を検討し、CD31 で血管新生、ポドプラニンで腹膜の変化、エラスチカ・ワンギーソン染色 (EVG 染色) を評価した。PBS 投与群と比較して腹膜の線維化、血管新生の増加などは癌由来エクソソーム投与群で認めなかった(図 2)。また、腹膜の肥厚も認めなかった。これにより癌由来エクソソームの投与により腹腔内の線維化などは増加しないことが示唆された。

また、癌由来エクソソームの投与が腹膜へ及ぼす影響を検討するため、マウスの腹膜を採取し、細胞の増殖を CCK8 で検討した。癌由来エクソソームの投与により腹膜細胞の増殖の増加は認められなかった。今回の研究では癌由来エクソソームが腹膜へ及ぼす影響については解明することは困難であったが、腹膜以外の癌周囲環境に影響を及ぼしている可能性が考えられた。今後は癌由来エクソソームの *In vivo* における機能をさら

に検討するためには、胃癌細胞など異なった臓器や原発巣からの播種モデルなど異なるモデルで検討をおこなうことで、さらなる解析が可能となると考えられた。

また、内包する mirRNA などの網羅的解析や生体内での免疫の関与について検討を行うことが必要であると考えられた。

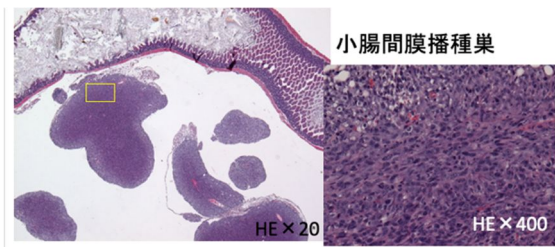


図 1 :小腸腹膜播種結節
HE 染色で播種結節に癌細胞を認めた

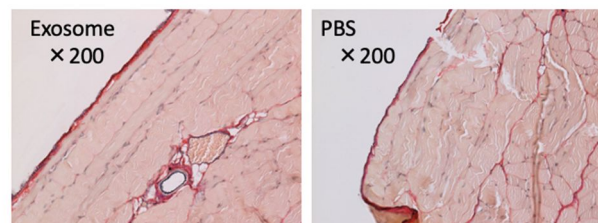


図 2 :マウス腹膜における EVG 染色
エクソソーム投与で腹膜線維化に差を認めなかった。

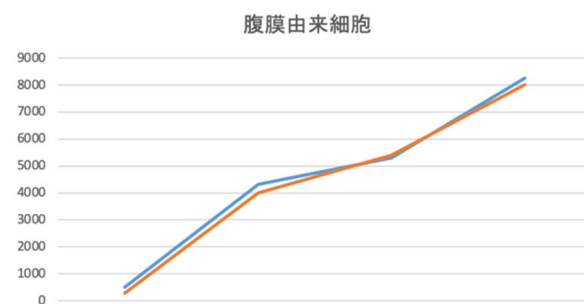


図 2 :腹膜の Proliferation assay。
エクソソームで腹膜細胞の増殖に変化を認め
なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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