

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16720

研究課題名（和文）エキソソーム表面のヒアルロニダーゼに着目した膀胱癌浸潤・転移機序の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of bladder cancer invasion and metastasis focusing on invadopodia, exosome, and hyaluronidase

研究代表者

得居 範子 (Tokui, Noriko)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00792342

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）：本研究では膀胱癌細胞株の浸潤突起が分泌するエキソソーム内の新規ヒアルロン酸分解酵素（TMEM2）と浸潤突起に重要な分子Cortactinに着目し膀胱癌浸潤・転移機序を検証した。細胞実験によりエキソソームの分泌には、Cortactinによって形成される浸潤突起の形成が必須であることが示唆された。マウス実験ではエキソソームの前処理により肺転移の上昇は見られなかった。また、臨床検体でのインテグリンの発現は、健常者と膀胱癌患者で差は見られず、エキソソーム中のTMEM2発現も健常者と膀胱癌患者で差は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、エキソソームの分泌にはCortactinによって形成される浸潤突起の形成が必須であることが示された。浸潤突起とエキソソームには共通の機序があるため、エキソソームが関与する転移抑制のターゲットになりうる分子として可能性が示唆さ、学術的意義や社会的意義は大きいと思われる。また、エキソソームが転移の前段階を調整する機序や臨床サンプルでのインテグリン、TMEM2の差は見られなかったが、これら分子をエキソソームで検討した初の研究であり、本研究成果の意義は大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on a novel hyaluronan-degrading enzyme (TMEM2) in exosomes secreted by invasive processes of bladder cancer cell lines and Cortactin, a molecule important for invasive processes, to examine the mechanism of invasion and metastasis of bladder cancer. Cellular experiments suggested that the formation of invasive processes by Cortactin is essential for exosome secretion. In mouse experiments, exosome pretreatment did not increase lung metastasis. There was no difference in integrin expression in clinical specimens between healthy subjects and bladder cancer patients, and no difference in TMEM2 expression in exosomes between healthy subjects and bladder cancer patients.

研究分野：エキソソーム

キーワード：膀胱癌 エキソソーム Cortactin

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

局所進行性もしくは転移性の膀胱癌は予後不良の疾患である。膀胱癌には有効な血液由来のバイオマーカーがないため、その診断は侵襲的な検査法（膀胱鏡）や画像が必要になる。そのような状況下、患者の全身状況のモニタリングが可能となる **Liquid biopsy** が普及してきており、いくつかの癌種でエクソソームを用いた診断や治療効果予測などの研究が進んでいる。最近の研究結果からエクソソームがあらかじめ生存しやすい環境（前転移ニッチ）を整えて癌の浸潤・転移を補助している可能性が示唆された。我々は細胞表面で機能する新規ヒアルロン酸分解酵素（ヒアルロニダーゼ：TMEM2）を同定し、これがエクソソーム内に含まれていることを確認した。TMEM2は細胞のヒアルロン酸のバリアーを壊すことから、エクソソーム内容の伝達に重要である可能性が高い。また浸潤突起形成に重要な分子であるコータクチン（Cortactin）はエクソソーム分泌に重要な分子であるとされている。エクソソームは癌細胞の浸潤・転移におけるメッセンジャーとして注目されているが、Cortactin とエクソソーム分泌の機序については未解明な部分が多い。しかし癌の浸潤・転移におけるエクソソームの役割を Cortactin とヒアルロニダーゼの点から検討している研究はない。以上よりエクソソームを用いたバイオマーカーの開発は治療効果向上および医療費軽減につながる可能性があり、その開発は急務である。

## 2. 研究の目的

本研究では、本研究では膀胱癌細胞株の浸潤突起が分泌するエクソソーム内のヒアルロニダーゼと Cortactin に着目し膀胱癌浸潤・転移機序を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

**3-1 細胞株での検討：**尿路上皮癌細胞株のエクソソームを蛍光標識しエクソソームを可視化した細胞株を作成し、エクソソームが浸潤・転移に果たす役割について検討した。

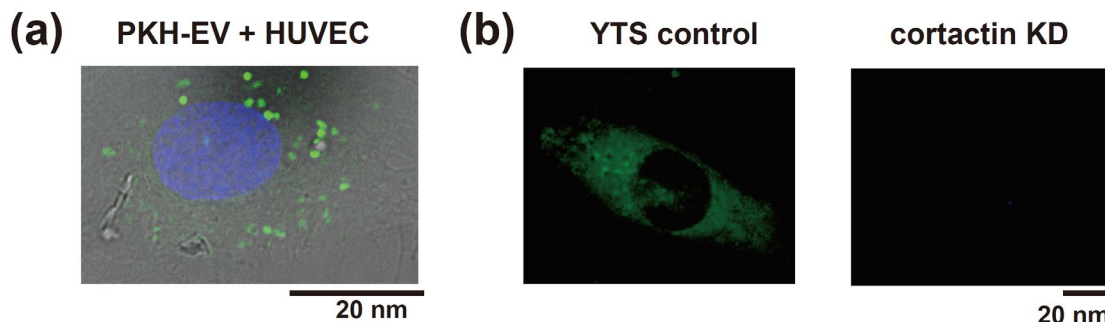
**3-2 マウス実験：**エクソソームの TMEM2 が浸潤・転移に果たす役割についてマウスモデルを用いて検討した。

**3-3 臨床サンプルを用いた検討：**臨床検体におけるエクソソームの検出、TMEM2 の発現と予後の関係について検証した。

## 4. 研究成果

**4-1 細胞株での検討：**尿路上皮癌細胞株のエクソソームを蛍光標識しエクソソームを可視化した細胞株を作成し、Cortactin 低発現細胞株との比較により、コータクチンがエクソソーム分泌に関わる機序について検討した。3種の尿路上皮癌細胞株、KK47、RT-4、YTS-1 から、超遠心により比較的大量にエクソソームを調製する方法を確立した。調製されたエクソソームの粒度・粒径を、ナノ粒子マルチアナライザー qNano を使用して測定した。また、ウェスタン・ブロッティングによって、エクソソーム・マーカーである CD9、TSG10 の発現を検出した。上記2つのデータから確かにエクソソームの調製ができたことを確認した。さらに、蛍光色素 PKH67 を用いてエクソソームを蛍光標識し、細胞内とインキュベートした際に細胞内に取り込まれる過程を追跡する方法を確立した。また、癌細胞が浸潤・転移するためには、浸潤突起と呼ばれる膜突起の形成が必須である。尿路上皮癌細胞株 YTS-1 を用いて、この浸潤突起形成に必須のタンパク質である Cortactin の発現を、shRNA により抑制した Cortactin KD YTS-1 株を樹立した。Cortactin KD YTS-1 からのエクソソームの回収は、対照の細胞に比べて著しく低かった。このことは、エクソソームの分泌には、Cortactin によって形成される浸潤突起の形成が必須であることが示唆された。

図 1



(図 1a) 尿路上皮癌細胞株 YTS 細胞からエクソソームを回収した。回収したエクソソームを

PKH26 で蛍光標識 (PKH-EV) し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とインキュベートすると、PKH-EV は HUVEC に取り込まれた。緑の点が PKH-EV。青色は DAPI 染色。(図 1b) 尿路上皮癌細胞株 YTS 細胞を用い、cortactin の発現を shRNA によりノックダウンした細胞株 (Cortactin KD YTS-1) を樹立した。YTS control 細胞は抗 Cortactin 抗体による免疫染色で陽性を示すが、Cortactin KD YTS 細胞ではほとんど染色されない。

**4-2 マウス実験：** エキソソームの TMEM2 が浸潤・転移に果たす役割について検討を行った。YTS-1 から、超遠心によりエキソソームを調製した。エキソソームを6週令の Balb/c ノードマウスに尾静脈経由で注入した (10 µg protein / mouse)。エキソソームによる前処理の1週間後、Cortactin KD YTS-1 を同マウスに尾静脈経由で注入した (2 x 10<sup>6</sup> cells / mouse)。癌細胞注入の3週間後に、肺を摘出し、切片を作製して肺転移を評価した。以前の研究より、Cortactin KD YTS-1 は動物モデルにおける肺転移能が極めて低いことが明らかにされていた (Tokui, N. et al. *Molecular Medicine Reports* 9:1142, 2014)。エキソソームの前処理により前転移ニッチが整えられて Cortactin KD YTS-1 の肺転移が上昇することが期待されたが、本研究では肺転移の上昇は見られなかった。

図 2

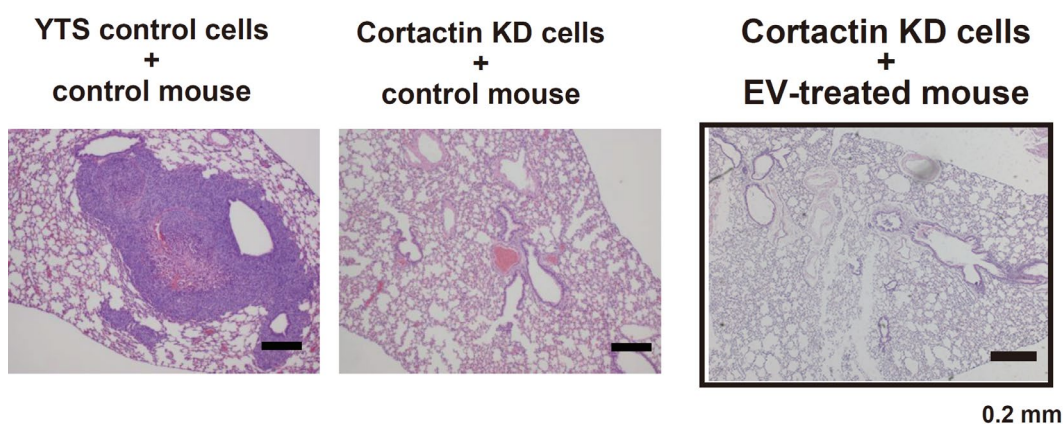
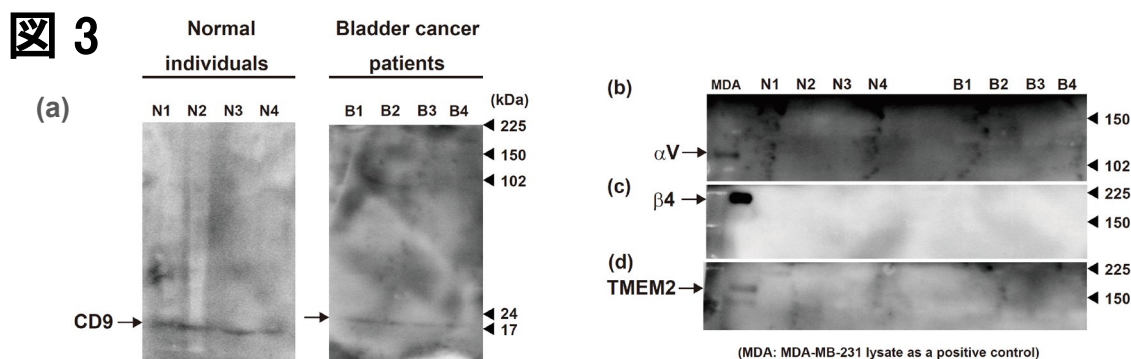


図 2 尿路上皮癌細胞株 YTS 細胞はノードマウスで高頻度に肺転移を起こすが(左図)、Cortactin KD YTS-1 はほとんど肺転移を起こさない(中央図) (Tokui et al. (2015) *Mol. Med. Rep.*より引用)。YTS 細胞からエキソソームを回収してノードマウス尾静脈から注入した。このエキソソームによる前処理を施した EV-treated mouse に対し、転移能の極めて低い Cortactin KD YTS-1 を移植したのち肺を摘出して肺転移を調べた。その結果、エキソソームによる前処理を行っても Cortactin KD YTS-1 はほとんど肺転移を起こさなかった(右図)。

**4-3 臨床サンプルを用いた検討：** 臨床検体におけるエキソソームの検出、TMEM2 の発現と予後の関係について検証を行った。健常者 (4 例)、および、膀胱癌患者 (有転移症例 4 例) 由来サンプルにおける CD9 (エキソソーム・マーカー) の発現を調べ、十分量のエキソソームが調製されていることを確認した(図 3a)。インテグリン ( $\alpha$ V インテグリン、 $\beta$  4 インテグリン) はエキソソームに含まれ、転移に関与すると報告されている。これらのインテグリンの発現を調べた結果、健常者と膀胱癌患者で差は見られなかった(図 3b,c)。エキソソームに含まれ、転移に関与する可能性が示唆されている TMEM2 の発現を調べたが、健常者と膀胱癌患者で差は見られなかった(図 3d)。



**【考察】**

Hoshino らは、癌細胞が転移前にエキソソームを分泌し、このエキソソームが転移先臓器で前転

移ニッチを整え、転移を成立させること、および、このメカニズムにはインテグリンが関与することを示した (Hoshino, A. et al. Nature 527, 2015)。我々は、高分子ヒアルロン酸を分解する活性を持つ TMEM2 が、転移先臓器のヒアルロン酸を分解し、この前転移ニッチ形成に関与すると考えた。しかしながら、エクソソームにおける TMEM2 発現は健常者と膀胱癌患者で差が見られなかった。現時点では、TMEM2 が膀胱癌転移のための前転移ニッチ形成に関わっている可能性は低い可能性が示唆された。癌には転移臓器趣向性があり、今回検討したエクソソームの他の成分が前転移ニッチを整え、転移能に影響していることも考えられ、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Konishi Sakae, Hatakeyama Shingo, Numakura Kazuyuki, Narita Shintaro, Inoue Takamitsu, Saito Mitsuru, Tokui Noriko, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Yoshikawa Kazuaki, Narita Satoshi, Kawaguchi Toshiaki, Habuchi Tomonori, Ohyama Chikara	4. 巻 17
2. 論文標題 Validation of the IMDC Prognostic Model in Patients With Metastatic Renal-Cell Carcinoma Treated With First-Line Axitinib: A Multicenter Retrospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Genitourinary Cancer	6. 最初と最後の頁 1080 ~ 1089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clgc.2019.07.006	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 -

1. 著者名 Momota Masaki, Hatakeyama Shingo, Tokui Noriko, Sato Tendo, Yamamoto Hayato, Tobisawa Yuki, Yoneyama Tohru, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Koie Takuya, Narita Satoshi, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 S2405
2. 論文標題 The Impact of Preoperative Severe Renal Insufficiency on Poor Postsurgical Oncological Prognosis in Patients with Urothelial Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Urology Focus	6. 最初と最後の頁 30081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.euf.2018.03.003	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 該当する

1. 著者名 Horiguchi Hirotaka, Yoneyama Takahiro, Hatakeyama Shingo, Tokui Noriko, Sato Tendo, Fujita Naoki, Yamamoto Hayato, Tobisawa Yuki, Yoneyama Tohru, Hashimoto Yasuhiro, Koie Takuya, Yoshikawa Kazuaki, Narita Satoshi, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 35
2. 論文標題 Impact of bacillus Calmette-Guérin therapy of upper urinary tract carcinoma in situ: comparison of oncological outcomes with radical nephroureterectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-018-1102-y	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 該当する

1. 著者名 Okita Kazutaka, Hatakeyama Shingo, Hagiwara Kazuhisa, Suzuki Yuichiro, Tanaka Toshikazu, Noro Daisuke, Tokui Noriko, Fujita Naoki, Konishi Sakae, Okamoto Teppei, Yoneyama Tohru, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 -
2. 論文標題 The effect of number of treatment cycles of platinum-based first-line chemotherapy on maximum radiological response in patients with advanced urothelial carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2021.03.011	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 -

1. 著者名 Hamaya Tomoko, Hatakeyama Shingo, Tanaka Toshikazu, Kubota Yuka, Togashi Kyo, Hosogoe Shogo, Fujita Naoki, Kusaka Ayumu, Tokui Noriko, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Tohru, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 -
2. 論文標題 Trends in the use of neoadjuvant chemotherapy and oncological outcomes for high risk upper tract urothelial carcinoma: a multicentre retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BJU International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bju.15346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Toshikazu, Hatakeyama Shingo, Numakura Kazuyuki, Kido Koichi, Noro Daisuke, Oikawa Masaaki, Hosogoe Shogo, Tokui Noriko, Yamamoto Hayato, Narita Shintaro, Ito Hiroyuki, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Kawaguchi Toshiaki, Habuchi Tomonori, Ohyama Chikara	4. 巻 27
2. 論文標題 Efficacy and safety of first line nivolumab plus ipilimumab in patients with metastatic renal cell carcinoma: A multicenter retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 1095 ~ 1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14363	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 -

1. 著者名 Horiguchi Hirotaka, Yoneyama Takahiro, Hatakeyama Shingo, Tokui Noriko, Sato Tendo, Fujita Naoki, Yamamoto Hayato, Tobisawa Yuki, Yoneyama Tohru, Hashimoto Yasuhiro, Koie Takuya, Yoshikawa Kazuaki, Narita Satoshi, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 35
2. 論文標題 Impact of bacillus Calmette?Gu?rin therapy of upper urinary tract carcinoma in situ: comparison of oncological outcomes with radical nephroureterectomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-018-1102-y	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
---------	---------