

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16785

研究課題名（和文）難治性卵巣癌におけるEMT制御因子であるmiRNAの網羅的解析と新規DDSの開発

研究課題名（英文）Analysis of miRNA that control EMT phenomenon and development of DDS for ovarian cancer with treatment resistance

研究代表者

芦原 敬允 (Ashihara, Keisuke)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：00817190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：CD24-LIPOは未修飾LIPOに比べ、組織移行性が高いことが判明した。生存曲線でもCD24-LIPOは延長効果を示し、腹膜播種病巣のEMT現象の抑制効果を得られた。しかし、腹水および腹膜播種の消失に至らず、高濃度のCDDPを投与する方法では、治療効果の限界と考えた。続いてCD24陽性細胞と細胞培養液を採取し、miRNAの網羅的解析を行った。エクソソームの抽出には純度の高い超遠心法を選択したが、抽出量は微量であった。強発現しているmiRNAは一致しているものが乏しく、EMT現象を制御するmiRNAの特定が困難であった。エクソソームに注目し、miRNAの特定を進めていく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発したCD24に指向性のあるCD24-LIPOを用いて検証を行い、難治性卵巣癌腹膜播種モデルマウスに対し、EMT現象の抑制効果を得て、生存曲線の延長につながった。この結果は論文報告に至った(Ashihara K, Terai Y, Tanaka T, Ohmichi M. Oncol Lett. 2020; 19: 1872-1880)。一方、治療により寛解となった個体は見られず、治療効果の限界も感じられた。別のアプローチとしてCSCLが発現するEMTを制御するmiRNAに注目するも、特定は困難であった。今後はエクソソームに注目し、miRNAの特定を進めていく必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：CD24-LIPO was found to have higher concentration of cisplatin in tissues than unmodified LIPO. CD24-LIPO also showed a prolonging effect on the survival curve, and an effect of suppressing the EMT phenomenon of peritoneal dissemination. However, ascites and peritoneal dissemination did not disappear, and this method of administering high concentration of cisplatin was considered to be the limit of the therapeutic effect. Subsequently, CD24-positive cells and cell culture medium were collected and comprehensively analyzed for miRNA. Ultracentrifugation method was selected for the extraction of exosomes, but the amount of extraction was very small. Strongly expressed miRNA have few matches, it was difficult to identify the miRNA that control EMT phenomenon. It is necessary to pay attention to exosomes and proceed with the identification of the miRNA.

研究分野：婦人科

キーワード：CD24 DDS EMT miRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

1) 難治性卵巣癌における CD24 と EMT 現象の関わりについて

癌再発や転移の原因の腫瘍細胞と考えられている癌幹細胞(CSC: Cancer Stem Cells)は、自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有し、様々な抗癌剤や放射線療法に抵抗を示し、かつ自己の増殖能が低いことが知られている(Nature 2007; 106: 445)。癌細胞の浸潤・転移過程において EMT 現象が注目され、Mani らは CSC が EMT 現象を起こしていることを示し(Cell 2008; 133: 704)、婦人科癌と EMT 現象との関連性を見出してきた。近年では、CSC と同様の性質をもつ癌幹細胞類似細胞(CSCL: Cancer Stem Cells-Like)の存在も明らかになった。CSCL は CSC の性質を持ちつつも、特徴をすべて満たしているものではないと定義されており、CSC と同様に EMT 現象との関連が示唆されている(Carcinogenesis 2015; 36: 177-185)。ここで、種々の癌種で CSC の表現マーカーとして報告されているものの一つに CD24 があり、卵巣癌患者の予後不良因子であることを見出し、以前より着目してきた。CD24 とは細胞表面マーカーの一つであり、GPI 結合型の膜性タンパクである。難治性卵巣癌細胞株である Caov-3 を用いた研究では、CD24 陽性分画の浸潤能、CDDP 耐性能、細胞塊形成能の促進を確認した。さらに、CD24 を過剰発現させた場合は EMT 現象が亢進し、CD24 を過少発現させると EMT 現象が抑制する結果が得られた。これはマウスを用いた研究においても、CD24 陽性細胞は EMT 現象を引き起こすという同様の結果が得られた。Caov-3 を CD24 陽性細胞と陰性細胞に分配し、それぞれを腹腔内に投与し、腹膜播種モデルマウスを作製した。CD24 陽性細胞を移植したマウスの方が、CD24 陰性細胞を移植したマウスに比べて、明らかに腹水の貯留、腹囲の増加、そして腹膜播種の進展を認めた。CD24 陽性細胞こそが EMT 現象を引き起こし、さらには CSCL の性質をもつことを報告した(Nakamura K, Terai Y, Ashihara K, Ohmichi M. Oncol Rep 2017; 37: 3189-3200)。

2) CD24 を標的とした DDS の成果と課題

卵巣癌は婦人科癌の中で最も予後不良な疾患であり、特に進行例では難治性であることが知られている。転移病巣や再発病巣は多くの場合 key drug である白金製剤に対する薬剤耐性能を獲得するため、卵巣癌の全身化学療法においては白金製剤の耐性化を凌駕し、EMT 現象を制御することができれば、難治性卵巣癌の新たな治療戦略と成り得ると考えた。そこで、難治性卵巣癌における CD24 陽性細胞を標的とした DDS の開発である。CD24 陽性細胞を選択的に治療標的とする方法とし、CDDP 内包した高分子ミセルを開発した。高分子ミセルは正常血管では血管外へ漏出しにくく、癌組織のようにリンパ系排泄機構が発達していない部分では集積しやすいという利点がある。さらに浸潤細胞への選択性を高めるため、抗 CD24 抗体を修飾させたミセル(CD24-LIPO)を作成した。この CD24-LIPO を用いて CSCL を標的とすることで、選択的に CDDP を投与することができれば、高い治療効果が得ることができると考える。しかし、一方で、CDDP 耐性のある難治性卵巣癌に対して、高濃度の CDDP を投与するという方法では、得られる治療効果に限界があるという課題を認め、別の方向からのアプローチが必要と考えられた。

2. 研究の目的

今回の研究でまず注目したのは、新規 DDS の構築に向けて基盤となる高分子ミセルである。高分子ミセルに CD24 に対する指向性を持たせることで、*in vitro*, *in vivo* の両方で難治性卵巣癌の EMT 現象をブロックし、治療の有用性が得られるかの検証を行う。

次に注目したのは CSCL に対する miRNA の制御である。Huang らは miR-373 と miR-520c が乳癌の CSC マーカーである CD44 の発現抑制を介して *in vitro*, *in vivo* の両方で乳癌細胞の浸潤・転移に関わることを証明し、CSC マーカーと miRNA の関連性を唱えた(Nature cell boil 2008; 10: 202-210)。この論理から、卵巣癌の EMT 現象においても関与する miRNA の存在が推察された。EMT 現象を引き起こす際に、CSCL 内に発現する miRNA と、CSCL から細胞外に放出される miRNA の運搬役であるエクソソームに着眼点を置いた。エクソソームとは遺伝子発現などの細胞機能を調節する細胞外小胞であり、細胞間コミュニケーションの新たな担い手として関心がもたれている。CSCL 内およびエクソソーム内に含まれる、EMT 現象をさらに制御する miRNA の解析を行うことが、今回の研究目的であり、難治性卵巣癌の新しいバイオマーカーになると考えられた。さらに、CSCL で異常発現している miRNA を制御する薬剤を作成することができれば、難治性卵巣癌の新しい DDS の構築となると考えられた。

3. 研究の方法

1) CD24-LIPO を用いることでの治療効果の有用性と限界についての検討

開発した CD24-LIPO は CD24 に指向性をもつ高分子ミセルであり、CD24 を強発現している細胞に選択的に取り込まれる。*in vitro* において難治性卵巣癌細胞株である Caov-3 を用いて、細胞への移行性を確認する。CD24-LIPO との比較対象となる薬剤として、CDDP と未修飾の高分子ミセル (LIPO) を選択する。*in vitro* における薬剤有用性を確認した後に、*in vivo* の実験に移り、Caov-3 を 1.0×10^6 を週齢 5 週のスードマウスの腹腔内に投与し、難治性卵巣癌腹膜播種モデルマウスを作製する。マウスの尾静脈より、薬剤を注射した後に、サクリフェイスを行い腹膜播種組織における EMT 現象をブロック出来ているか確認を行う。同様の難治性卵巣癌腹膜播種モデルマウスに薬剤を注射し、CT 画像による腹囲の増加率および生存曲線を測定し、治療効果を測定する。

2) CSCL で発現異常を来している miRNA の検索

miRNA の検索として、採取を行う検体として細胞自身の miRNA と、細胞から運搬されるエクソソーム内の miRNA が挙げられる。CD24 陽性細胞は CSCL の特徴を持つ細胞であり、混在している細胞からの分離が必要であり、Caov-3 に磁気細胞分離法を用いて、 1.0×10^6 の CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞に分離させ、それぞれ 10%DMEM で培養を行いインキュベートする。24 時間後に細胞培養液を採取し、CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞を抽出し細胞自身の miRNA の回収を行う。並行して培養液を回収し、エクソソームの抽出を行い、不純物が混じっていないかエクソソームのタンパク量を確認する。それぞれの検体の miRNA アレイによる網羅的解析を行い、CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞の比較を行う。それにより CSCL が細胞外に分泌しているエクソソーム内で EMT 現象を制御している miRNA を特定する。特定することができれば、CD24 と miRNA を組み合わせた新しい DDS の構築に向けて研究を進める。CD24-LIPO の高分子ミセル内に EMT 現象の制御を行う miRNA を内包し、今回の研究の新しい DDS の核となる新規薬剤を開発する。

4. 研究成果

開発した CD24 に指向性のある CD24-LIPO を用いて、難治性卵巣癌に対して *in vitro*, *in vivo* の両方で治療の有用性の検証を行った。*in vitro* において、CD24-LIPO は CD24 陽性細胞に未修飾の高分子ミセル (LIPO) に比べ選択的に取り込まれるのを確認した。*in vivo* においても、難治性卵巣癌腹膜播種モデルマウスの腹膜播種病巣に高濃度で取り込まれており、CD24-LIPO は LIPO と比べて、組織移行性が高いことが判明した。その結果、CT での腹囲増加率、生存曲線でも CD24-LIPO は延長効果を示しており、他の薬剤と比べて腹膜播種病巣組織の EMT 現象の抑制効果を最も得ることができた(Ashihara K, Terai Y, Tanaka T, Ohmichi M. *Oncol Lett.* 2020; 19: 1872-1880)。しかし、CD24-LIPO を用いても難治性卵巣癌腹膜播種モデルマウスの腹囲増加率の抑制は可能であったが、腹水および腹膜播種の消失には至る個体は見られず、CD24 陽性細胞に高濃度の CDDP を投与する方法では、治療効果の限界と考えられた。

続いて miRNA の検索として、Caov-3 に磁気細胞分離法を用いて、CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞に分離させた。それぞれの細胞を採取し、miRNA を抽出し、miRNA アレイによる網羅的解析を行った。次に CD24 陽性細胞と CD24 陰性細胞の細胞培養液を採取し、エクソソームの抽出を行った。不純物が混じることが多く、純度の高い超遠心法のペレットダウン法を選択したが、抽出量は微量であった。繰り返し抽出を行い、同様に miRNA アレイによる網羅的解析を行った。EMT 現象を生じた CSCL 自身と、EMT 現象を引き起こす際に CSCL が放出するエクソソームに、強発現している miRNA は一致しているものが乏しかった。key となる EMT 現象を制御する miRNA を特定することが困難であった。CSCL が放出するエクソソームに注目し、EMT 現象を制御する miRNA の特定を進めていく必要があると考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Ashihara K, Terai Y, Tanaka T , Ohmichi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Pharmacokinetic evaluation and antitumor potency of liposomal nanoparticle encapsulated cisplatin targeted to CD24-positive cells in ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 1872-1880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/o1.2020.11279.	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 —

〔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
---------	---------