

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08140

研究課題名（和文）エクソソームを介した細胞間コミュニケーションと新たな放射線治療標的の探索

研究課題名（英文）Analysis of cell-to-cell communication to identify novel targets of radiotherapy

研究代表者

Nam JinMin (Nam, Jin-Min)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：60414132

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）：放射線療法はがん治療に広く用いられているが、治療効果のさらなる向上には、放射線による細胞への影響の生命科学的な理解が不可欠である。本研究では、放射線照射後に、がん細胞から分泌される細胞外小胞等の因子を特異的に制御する小胞輸送経路を特定し、それらを介した放射線治療耐性の分子メカニズムを解明することを目的とした。本研究により、細胞内小胞輸送を制御するRab27bを介して細胞外に分泌されるエピレギュリンが、神経膠芽腫細胞の放射線治療抵抗性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療に広く用いられている放射線療法において、治療効果の向上のため、放射線に対するがん細胞の治療抵抗性の理解が必要不可欠である。本研究では、放射線照射後に分泌が促進される因子とその過程を制御する分子が放射線治療抵抗性に関与していることを見出した。本研究結果に基づき、新たに見つかった経路と分泌因子が放射線治療後の腫瘍の増殖を抑え、がん治療効果を向上させるための新規治療標的薬開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Radiation therapy is widely used in cancer treatment, but understanding of the radiation effect on cancer cells is essential to improve therapeutic efficacy. To elucidate the molecular mechanisms of radiotherapy resistance mediated by these pathways, we analyzed vesicular trafficking pathways that specifically regulate factors such as extracellular vesicles secreted from cancer cells after irradiation. In this study, our data suggested that the secreted epiregulin into the extracellular space via Rab27b pathway is involved in radiotherapy resistance of glioblastoma cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線 小胞輸送 パラクライン 細胞間コミュニケーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、放射線技術はがん治療に広く用いられており、切らずに治療できる放射線療法は患者への負担や全身への副作用も少ない。これまでの物理技術の進歩によって、腫瘍部位に放射線を集中させることが可能となり、放射線治療の精度は向上してきた。医理工の連携は放射線治療の発展に寄与してきたものの、放射線の生物学的影響はわかっていない部分も多い。

がん細胞への放射線照射後に分泌される種々の因子が治療標的や診断マーカーとして注目を集めている。たとえば、がん細胞によるエクソソームの分泌によって、腫瘍の増殖と転移を促進することが示唆されている (Hoshino A et al., Cell., 2020)。また、がん細胞が、PD-L1 を表面に提示したエクソソームを分泌し、免疫経路を抑制することも報告されている (Chen G et al., Nature, 2018)。しかしながら、エクソソームや様々な因子を介した細胞外微小環境のリモデリングや細胞間コミュニケーションへの影響、その作用機序はほとんどわかってない。したがって、放射線照射後の生じる分泌因子を介した様々なイベントの分子・細胞レベルでの理解と組織・個体レベルでの放射線影響の全容解明は、放射線生物学と放射線治療の発展において重要な課題として残されている。すなわち、最新の生命科学の知識と技術を放射線科学に取り入れることで、放射線治療のさらなる発展が期待できる。

(2) 神経膠芽腫は悪性度が非常に高く、標準治療として放射線療法が用いられているが、未だに患者の予後がよくない。放射線と抗がん剤の標準治療後、数年以内に再発する 경우가多いが、治療の経過がよくない原因の一つとして、膠芽腫の放射線に対する抵抗性が高いことが考えられている。現在の標準治療における放射線は、脳の耐容可能な限度に近い線量が用いられているため、使用総線量を増やさずに放射線治療の効率を上げるための基礎生物学的理解とアプローチが必要とされている。上述のように、最近の研究により、がん細胞から分泌されるエクソソーム等の様々な分泌因子は、がん細胞自身または周辺細胞に影響を与えることによって、放射線抵抗性において重要な役割を果たしていることがわかってきているが、詳細な分子メカニズムに関しては明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 放射線照射後のがん細胞において細胞内小胞輸送を制御する分子と小胞輸送により分泌されるエクソソーム等の分泌物の変化に着目し、がん細胞の放射線抵抗性に関わる分子の同定を試みた。

(2) 放射線の照射後、がん細胞から特異的に分泌される因子を特定したのち、その因子を介した細胞間コミュニケーションに関わる分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膠芽腫の細胞株を用いて、放射線照射による Rab ファミリー 低分子量 G タンパク質の遺伝子発現変動を解析した。遺伝子発現の解析は、RNA を抽出後、マイクロアレイを行った。タンパク質レベルの発現解析、細胞の免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による細胞内分子の観察、膠芽腫患者の遺伝子発現プロファイルの解析、細胞共培養などの実験系による解析を行った。タンパク質発現は、ウェスタンブロットにより確認した。

(2) Rab27b の発現を抑制した細胞株 (shRab27b) を作成し、Rab27b の放射線抵抗性への関与を検証した。細胞の生存は、細胞数の計測、フローサイトメトリー、コロニーフォーメーションアッセイを用いて測定した。

(3) マウスモデルを用いて、Rab27b の発現を抑制した膠芽腫細胞株もしくはコントロール細胞を脳に移植し、放射線治療の効果に与える影響を検証した。各条件におけるマウスの生存期間を確認した。さらに、IVIS を用いた in vivo イメージング実験による解析を行うことで、Rab27b が膠芽腫の放射線抵抗性に関与するかを精査した。

(4) 膠芽腫への放射線照射後、特異的に発現亢進および分泌が促進される因子のスクリーニングを行った。Rab27b の発現を抑制した細胞株を用いて、特定された分泌因子 (エピレグリン) の発現への影響を検討した。

(5) 脳腫瘍細胞株を用いて、放射線照射後のエピレギュリンの分泌が周辺細胞に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 神経膠芽腫の細胞株 U87MG を用いて、放射線照射による Rab ファミリー低分子量 G タンパク質の遺伝子発現変動をマイクロアレイによって解析したところ、小胞輸送の分泌経路であるエキソサイトーシスの制御に関与する Rab27b の遺伝子が顕著に発現亢進していた。また、タンパク質レベルにおいても、非照射細胞に比べて、放射線 (X 線; 4Gy×4 回) を照射された細胞において、Rab27b の発現亢進が確認された。Rab27b は、エクソソームの分泌調節に関わる分子としても注目されている (Ostrowski M et al., Nat Cell Biol., 2010)。Rab27b の発現を抑制することによって、放射線照射後の細胞死が増加し、細胞増殖が抑制されたことから、放射線による治療の効果を高めることが in vitro 実験によって確認された。

(2) マウス脳への膠芽腫細胞の移植イメージング実験において、Rab27b の抑制と放射線照射を組み合わせることにより、脳腫瘍の成長が抑制され (図 1A)、マウスの生存期間が延長した (図 1B)。

(3) 性質が異なる複数の脳腫瘍細胞株を用いた解析では、悪性度が比較的低い脳腫瘍細胞株に比べて、悪性度の高い膠芽腫細胞株において、Rab27b のタンパク質発現が高いことがわかった。悪性度の高い膠芽腫細胞株では細胞増殖因子であるエピレギュリンの発現も共に亢進し、これらのタンパク質の発現量が放射線抵抗性と相関することが示唆された。さらに、膠芽腫患者の遺伝子発現プロファイルを解析した結果、Rab27 分子とエピレギュリンの遺伝子発現の亢進は、膠芽腫患者の予後不良との相関が認められた。

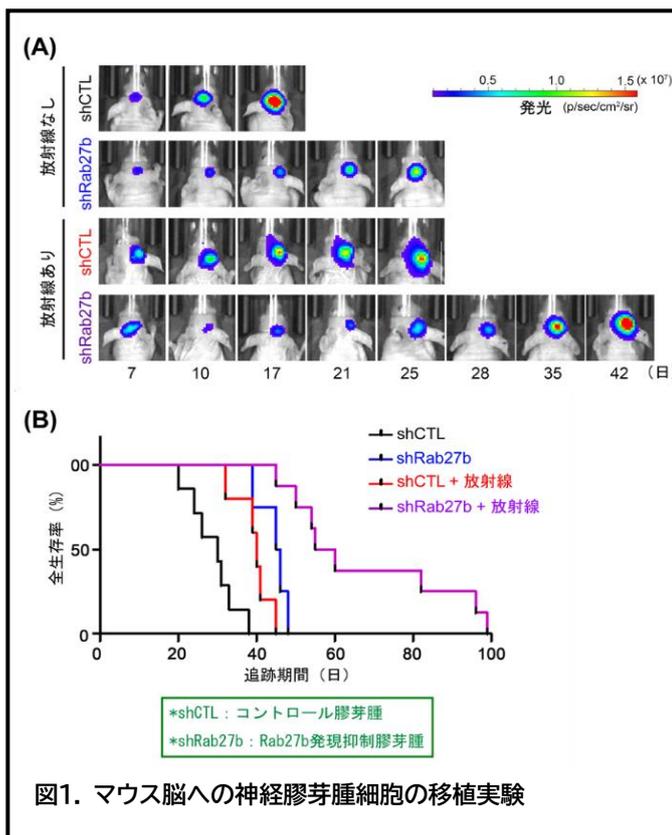
(4) 2 種類の異なる脳腫瘍細胞株を用いた共培養実験系により、放射線照射後に膠芽腫から分泌されるエピレギュリンが、周辺細胞の増殖に与える影響を解析した。その結果、Rab27b を介して膠芽腫細胞から分泌されるエピレギュリンは、上皮増殖因子の活性化を促進し、悪性度が低い脳腫瘍細胞株の増殖を促進することが確認された。

これらのことから、膠芽腫への放射線照射後、Rab27b がエピレギュリンの発現、及び、分泌を制御することで、パラクライン効果をもたらし、放射線に対する抵抗性を強化することが明らかとなった。

以上から、放射線照射後の膠芽腫において、細胞内小胞の分泌経路に関与する Rab27b の発現亢進は、エピレギュリンのパラクライン効果を介して、放射線治療に対する抵抗性と周辺細胞の増殖を促すことが示唆された。今後、Rab27b-エピレギュリン経路は、膠芽腫の放射線治療後の腫瘍の増殖を抑え、治療効果を向上させるための新たな標的となる可能性が期待できる。

<引用文献>

- ① Hoshino A, Kim HS, Bojmar L et al., Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. (2020) Cell, 182(4):1044-1061.
- ② Chen G, Huang AC, Zhang W et al., Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. (2018) Nature, 560(7718):382-386.
- ③ Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S et al., Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. (2010) Nat Cell Biol, 12, 19-30.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wu PH, Onodera Y, Giaccia AJ, Le QT, Shimizu S, Shirato H, Nam JM.	4. 巻 27
2. 論文標題 Lysosomal trafficking mediated by Arl8b and B0RC promotes invasion of cancer cells that survive radiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01339-9.	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 該当する

1. 著者名 Nishioka S, Wu PH, Yakabe T, Giaccia AJ, Le QT, Aoyama H, Shimizu S, Shirato H, Onodera Y, Nam JM.	4. 巻 8
2. 論文標題 Rab27b contributes to radioresistance and exerts a paracrine effect via epieregulin in glioblastoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdaa091	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西岡倉一郎、呉秉修、矢ヶ部俊彰、Giaccia Amato, Le Qy unh-Thu、小野寺康仁、清水伸一、白土博樹、南ジンミン
2. 発表標題 Rab27bは神経膠芽腫の放射線抵抗性やパラクライン効果を促進する
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西岡倉一郎、呉秉修、矢ヶ部俊彰、Giaccia Amato, Le Qy unh-Thu、小野寺康仁、清水伸一、白土博樹、南ジンミン
2. 発表標題 Rab27bは神経膠芽腫の放射線抵抗性や、Epieregulinを介したパラクライン効果を促進する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nam Jin-Min
2. 発表標題 がん細胞の放射線治療耐性に関わる細胞内小胞輸送のメカニズム
3. 学会等名 第49回放射線による制癌シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nam Jin-Min
2. 発表標題 神経膠芽腫の放射線治療効果向上を目指した小胞輸送のメカニズム解析
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
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	小野寺 康仁 (Onodera Yasuhito) (90435561)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

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		
米国	Stanford University		