

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08365

研究課題名（和文）エクソソーム内包タンパク活性化機構に着目した胆道がん併用療法の確立

研究課題名（英文）Molecular analysis of the drug resistance mediated by exosomes in biliary tract cancer

研究代表者

松田 康伸（MATSUDA, YASUNOBU）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40334669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：【研究目的】胆道がんは、化学療法による延命治療が困難な悪性疾患である。本研究の目的は、胆道がんのエクソソーム（細胞外小胞）における抗がん剤耐性の可能性を探り、胆道がん治療に役立つ細胞情報シグナルがないかを解析し、見いだすことである。

【研究成果】化学物質による阻害剤や遺伝子サイレンシング技術による実験の結果、胆道がんは、細胞外小胞内部に存在するストレスキナーゼp38MAPKを介して、腫瘍の再増殖あるいは薬剤耐性に、極めて重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管がんは、極めて予後不良の悪性疾患であり、がん根治は困難である。本疾患は、抗がん剤治療後において、残存する生細胞が急速に増大する現象（腫瘍再増殖）も伴うため、さらに治療が難しいことが指摘されている。本研究は、培養実験による腫瘍再増殖現象モデルを考案して、がん細胞が分泌する細胞外小胞（エクソソーム）に着目し検討した。その結果、薬剤耐性・腫瘍再増殖における細胞外小胞の役割が予想外に重要であることを見いだした。本研究は、がん根治を目指した治療アプローチの一助になるとと思われる。

研究成果の概要（英文）：[Aim of research] Biliary tract cancer is a malignant disease for which life-prolonging treatment by chemotherapy is difficult. The purpose of this study is to explore the possibility of anticancer drug resistance in exosomes released by biliary tract cancer cells.

[Results & Conclusion] Results of experiments using chemical inhibitors and gene silencing techniques showed that exosomes released from biliary tract cancer play a vital role in tumor regrowth or drug resistance via the stress kinase p38MAPK.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆管がん エクソソーム シスプラチン ゲムシタピン

1. 研究開始当初の背景

化学放射線療法後の腫瘍の再発は、進行がん患者の主な死因のひとつである。癌治療における主要な重大な問題は、治療後の残存腫瘍細胞の急速かつ過剰な増殖であり、これは「腫瘍再増殖 (tumor recurrence)」と呼称される。医学臨床の現場においては、化学療法と放射線療法は、残存生細胞を根絶させる目的で、しばしば数サイクルにわたって投与される。このようなプロトコルは、皮肉な事に、治療中止中の腫瘍細胞の増殖を加速させる可能性があることが報告されている。しかしながら、腫瘍再増殖の根本的なメカニズムは不明である。

胆管がん (BDC) は比較的まれな悪性腫瘍であり、肝内または肝外の胆管から発生する予後不良な固形腫瘍である。外科的切除が BDC の唯一の治療法であるが、切除後の再発は非常に頻度が高く、また早期発見が困難なことから、症例の 3 分の 2 以上は、発見時点で切除不能である。進行性 BDC における標準的な一次化学療法は、ヌクレオチド類似体ゲムシタピン単独療法あるいはシスプラチンとの併用療法であるとされる。しかし残念ながら、ゲムシタピンの治療効果はわずかであり、ゲムシタピン治療後の腫瘍再発の原因メカニズムは不明である。

ところで最近、死にかけている細胞が、隣接する生細胞に対して生存サバイバルを分泌し、代償性増殖を誘発することが明らかになった。この原因は様々あるが、近年では、エクソソームを含む細胞外小胞が本現象に関与している可能性が示唆されている。そこで本研究では、細胞外小胞が BDC の薬剤耐性・腫瘍再増殖に関与する可能性を検討することにした。

2. 研究の目的

この研究では、ゲムシタピンを含む抗がん剤治療が、TP53 遺伝子変異を伴う BDC 細胞に対して、腫瘍再増殖を引き起こすかどうかを調べた。この目的で、培養実験を用いて、馴化培地の移植実験を行い、化学療法で誘発された腫瘍細胞増殖の生物学的プロセスを解析することにした。この研究の目的は、TP53 変異 BDC 細胞における腫瘍再増殖の分子標的を解明し、BDC における化学療法耐性を克服するための効果的な方法を特定することである。

3. 研究の方法

(細胞培養)

P53 変異ゲムシタピン感受性 HuCCT1 [Arg175 to His [R175H]; 変異型 TP53 機能獲得表現型]、ゲムシタピン耐性 HuH28 [Glu271 to Lys [E271K]; TP53 不活性変異]、およびヒト BDC 細胞 (IARCTP53 データベース; <https://p53.iarc.fr/CellLines.aspx>) を、Japan Collection of Research Bioresources Cell Bank (大阪、日本) から入手した。細胞は、ピルビン酸ナトリウムと 10% 熱不活化ウシ胎児血清を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 培地を用いた。細胞は、37 °C・5% CO₂ の加湿インキュベーターで培養した。細胞形態・増殖度を分析する場合は、培養細胞を固定した後にギムザ染色した。

(エクソソーム単離)

培養細胞の馴化培地を回収し、10,000×g で 30 分間遠心分離した。エクソソームサンプルは、Vivaspin 20 限外ろ過ユニット (ザルトリウス、エッジウッド、ニュージャージー州、米国) を使用して濃縮し、MagCapture エクソソーム分離キット PS (富士フイルム和光純薬株式会社) で精製した。精製されたエクソソームのタンパク質含有量は、BCA アッセイ (Pierce Biochemical、ロックフォード、イリノイ州、米国) によって分析した。エクソソームの形態は、電界放出透過型電子顕微鏡 (JSM-7500F; JEOL Ltd., Japan) を使用して観察し、細胞外小胞のサイズ分布は NanoSight テクノロジー (NanoSight LM10; Malvern Instrument, Amesbury, UK) を用いて分析した。エクソソームの機能を観察する場合は、0.22 μm カプセルフィルターで滅菌した後に、40 μg/ml の濃度で細胞に添加して、5 分から 48 時間までの間の細胞増殖度・シグナル経路の変動を観察した。

(培地・エクソソーム移植実験)

ドナー細胞 (1×10⁶ 細胞/ml) を、化学阻害剤存在下で抗癌剤による 24 時間処理を行った。その後、細胞を新鮮な培地で 3 回洗浄して、ディッシュに付着していない死細胞を除去した。培養の 2 時間後、細胞を再び新鮮な培地で 3 回洗浄して、細胞環境における残存薬物を除去し、増殖培地でさらに 24 時間維持した。次に、馴化培地のサンプルを収集し、300×g で 10 分間遠心分離して細胞片を除去し、別々に増殖させたナイーブレシピエント細胞 (0.5×10⁵ または 2.5×10⁵ 細胞/ml) に移した。レシピエント細胞は、ドナー由来の馴化培地あるいはエクソソーム添加後に、2 時間または 48 時間培養した。最終的には、ウエスタン・ブロット解析 (シグナル経路の解析) WST アッセイ (細胞増殖度の解析) により、エクソソームの機能・内部蛋白の活性

化を解析した。

4. 研究成果

【 . DNA 傷害性抗がん剤による処理細胞の馴化培地は、細胞増殖を誘発する】

本研究では、最初に、レシピエント HuCCT1 および HuH28 細胞を、いくつかの抗がん剤で前処理されたドナー細胞からの馴化培地を添加した後に、一定時間培養した。なお、トリパンプルー陽性の死細胞を計測した結果では、ドナー細胞は 20~30%、レシピエント細胞は 3% 未満である。WST アッセイの結果、ゲムシタピンまたはシスプラチンで処理されたドナー細胞の培地は、無処置コントロール細胞の培地を添加した場合と比較して、レシピエント細胞の増殖を 1.7-2.1 倍と有意に増加させた ($p < 0.05$)。一方、ソラフェニブまたはレゴラフェニブなどの非 DNA 傷害性の薬剤で処理した細胞の馴化培地は、レシピエント細胞の増殖を殆ど誘導しなかった (図 1)。

【 . 馴化培地による細胞増殖は、酸化ストレス-p38MAPK 経路に引き起こされる】

上記実験結果 1 で認められた現象の原因を探るため、ドナー細胞を様々な阻害剤存在下で前処理した後に、抗がん剤処理を行った。その結果、カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK で前処理した場合は、レシピエント細胞の細胞増殖度については、有意な変化を認めなかった。対照的に、ドナー細胞を酸化ストレス阻害剤 (N-アセチルシステイン: NAC) で前処理した場合は、ゲムシタピンまたはシスプラチンで処理した細胞からの馴化培地の効果は大幅に減少した。

さらに、ドナー細胞をゲムシタピン処置前に MAP キナーゼ (MAPK) ・ストレスキナーゼ阻害剤で前処理した場合は、特に p38 MAPK 阻害剤 SB203580 が細胞増殖を最も強く抑制した。P38MAPK 阻害による細胞増殖の抑制は、抗酸化剤 NAC でドナー細胞を処理した場合とほぼ同等であった。ウエスタン・プロット解析の結果では、ゲムシタピン処理した後 p38 MAPK のリン酸化は、HuCCT1 細胞と HuH28 細胞でそれぞれ対象コントロール細胞の 6-9 倍と 12-16 倍に増加した。このゲムシタピンによって誘発される p38MAPK のリン酸化は、NAC 前処理によって抑制されたことから、ドナー細胞における p38MAPK 活性化の原因が、酸化ストレスであることが示唆された。

【 . p38 MAPK は、エクソソームを介した細胞増殖に関与する】

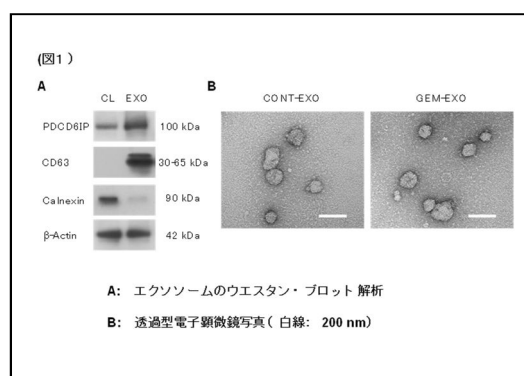
次に本研究課題では、p38 MAPK とエクソソームの機能的関係を調べるために、ゲムシタピン処理の前にドナー細胞を p38 MAPK 阻害剤 (SB203580 および BMS-582949) で前処理してみた。この細胞からエクソソームを精製し、レシピエント細胞に加えた。すると、HuCCT1 細胞と HuH28 細胞の両者において、細胞増殖に対するエクソソームの効果は、p38 MAPK 阻害剤で有意に阻害された (全て $p < 0.05$)。p38 MAPK の機能をさらに確認する目的で、p38MAPK siRNA 導入下の HuCCT1 細胞からエクソソームを精製した。ウエスタン・プロット分析の結果では、p38 MAPK siRNA による干渉が、p38MAPK タンパク質発現の有意な減少をもたらしたことを示した。WST アッセイを行ったところ、ゲムシタピン処理細胞のエクソソームが細胞増殖に及ぼす影響は、p38 MAPK 遺伝子サイレンシングによって有意に阻害されることが示された。

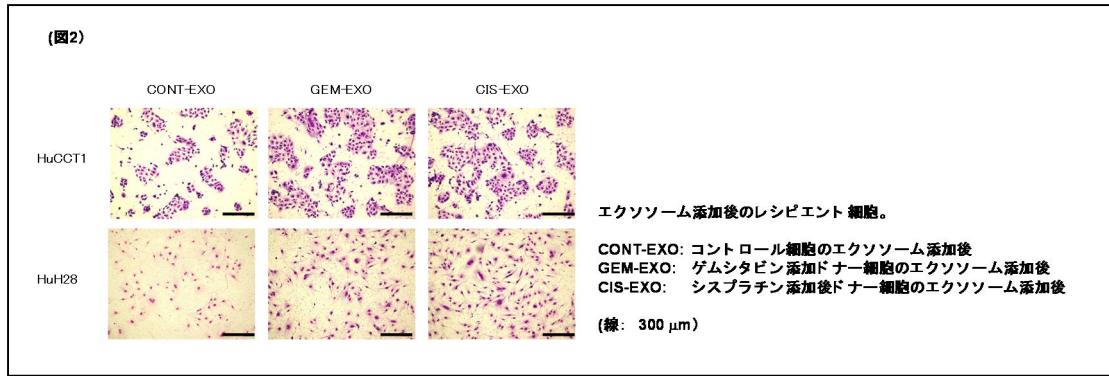
【 . エクソソームは、細胞増殖を促進する】

本研究課題では、DNA 傷害性抗がん剤が腫瘍細胞増殖を引き起こす現象において、細胞外小胞が関与していないかを検討した。

ドナー細胞からエクソソームを精製して、ウエスタン・プロット解析を行った結果では、エクソソーム表面マーカー (ALIX および CD63) 陽性で、細胞質マーカー (カルネキシン) は陰性であることが確認できた (図 1)。精製したエクソソームを透過型電子顕微鏡で観察したところ、対照細胞とゲムシタピン処理細胞からのエクソソームの間に有意な形態学的差異を明らかではなかった (図 1)。同様に、NanoSight ナノ粒子分析は、これらのエクソソームが均一なサイズ分布であることを示した (平均 ± 標準偏差: コントロール vs. ゲムシタピン処理後: 118 ± 1.4 vs. 129 ± 2.4 nm)。

ゲムシタピン処理細胞の馴化培地による細胞増殖は、エクソソーム分泌阻害剤 (GW4869 またはスピロエポキシド) 前処理で有意に阻害された ($p < 0.05$)。





一方、HuCCT1 細胞と HuH28 細胞の両者において、ゲムシタピンまたはシスプラチン処理した細胞のエクソソームをレシピエント細胞に添加すると、細胞増殖が 1.6-2.2 倍に増加した(図 2)。

【 . ゲムシタピンは、酸化ストレス-ATM-ATR-p38MAPK 経路を活性化する】

エクソソームによる p38MAPK を介した細胞増殖のシグナル経路をさらに詳細に解析する目的で、TP53 変異細胞における p38MAPK 活性化および DNA 損傷応答修復分子の関与を調査した。HuCCT1 細胞と HuH28 細胞の両者において、ゲムシタピン処理した後は、リン酸化 ATM とリン酸化 ATR の発現が有意に増加し (6-13 倍) 各々のリン酸化は NAC 存在下で有意に阻害された。細胞を KU55933(ATM 阻害剤)またはシサンドリン B(ATR 阻害剤)存在下でゲムシタピン処理すると、p38 MAPK およびその下流シグナル因子 MAPKAPK2 のリン酸化は、有意に阻害された。

以上、本実験結果から、ゲムシタピン処理後の BDC 細胞は、多量のリン酸化 p38 MAPK を含有するエクソソームを分泌しており、これらのエクソソームを介して細胞増殖を有意に誘導することが明らかになった。今のところ、p38MAPK が細胞増殖を刺激するメカニズムは不明である。現在、BDV の薬剤耐性や治療後の腫瘍再増殖を防ぐ効率的な治療法はない。本研究によって、エクソソーム p38MAPK の制御が腫瘍の再増殖に対する有用な戦略である可能性があることが初めて明らかになった。今後の課題としては、実験動物モデルなどで治療戦略の有用性を確認する必要があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 大澤まみ、松田康伸、坂田純、若井俊文	4. 巻 42
2. 論文標題 Exosomal p38 Mitogen-activated Protein Kinase Promotes Tumour Repopulation in TP53-mutated Bile Duct Cancer Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 745-757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15533.	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 松田康伸、寺井崇二	4. 巻 34
2. 論文標題 肝癌薬剤耐性におけるエクソソームの有用性および課題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 737-740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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
研究分担者	高村 昌昭 (TAKAMURA MASAOKI) (20422602)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	小林 隆 (KOBAYASHI TAKASHI) (40464010)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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