

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09146

研究課題名(和文) エクソソームを介した肝細胞癌肝内転移機序解明による再発バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of biomarker in intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma through extracellular vesicles

研究代表者

野田 剛広 (Noda, Takehiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50528594

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)：本研究の目的は、肝細胞癌において、腫瘍細胞由来エクソソームを介した前転移ニッチ形成機構の解明と、中心的役割を果たすmiRNAの同定・機能解析により肝細胞癌患者の予後を改善することである。エクソソームの機能・網羅的発現解析により、HuH-7M由来エクソソームにおいてmiR-638、miR-663a、miR-3648、miR-4258の4つのmiRが肝細胞癌の肝内転移に関与していることが解明され、臨床検体を用いた解析により、肝細胞癌患者の手術前血清中miR-638高発現群は、根治切除後の再発率が有意に高かったことを示し、予後予測マーカーとなりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リキッドバイオプシーのリソースとしてエクソソームが着目され、様々な研究が行われている。エクソソームの膜タンパクやmiRNAに着目したバイオマーカーの報告があり、いずれにおいても早期診断や術後フォローに応用できる可能性が報告されている。本研究で同定したmiR-638については、肝細胞癌術前の高発現が再発予測マーカーとして応用できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of cancer-related death. Recently, exosomal microRNAs(miRNAs) have been reported to have a role in the formation of the pre-metastatic niche and as promising biomarkers in patients with malignancy. Here we aimed to clarify the molecular mechanisms of intrahepatic metastasis and to identify a novel biomarker miRNA in patients with HCC. The miRNAs (miR-638, miR-663a, miR-3648, and miR-4258) could attenuate endothelial junction integrity by inhibiting VE-cadherin and ZO-1 expression. In patients with HCC, higher serum exosomal miR-638 expression was associated with tumor recurrence. In conclusion, the miRNAs secreted from a highly metastatic cancer cell can promote vascular permeability via downregulation of endothelial expression of VE-cadherin and ZO-1. Serum exosomal miR-638 expression holds potential for serving as a significant and independent prognostic marker in HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 microRNA 予後 手術 リキッドバイオプシー 前転移ニッチ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の主たる治療法は外科的切除であるが術後再発率は高く、その再発転移部位の最たる臓器は肝臓(肝内転移)である。この肝内転移巣の成立には、門脈血中の癌細胞が血管内皮細胞の間隙をすりぬけ肝組織に生着する必要があるが、その転移成立の分子メカニズムは不明である。近年注目を浴びているエクソソームは、すべての細胞より分泌される膜小胞であり、脂質二重膜内に蛋白や microRNA(miRNA)、mRNA などを内包し、細胞間コミュニケーションツールとしての役割があるとされている。体液中を循環することにより、離れた細胞に情報を伝えると考えられている。癌の転移機構においては、癌細胞より分泌されるエクソソームが転移臓器先の前転移ニッチを形成し、癌細胞の転移を促進すると考えられている。すなわち、癌細胞由来エクソソームは、線維芽細胞を活性化し、細胞外マトリックスの消化やサイトカインの分泌を促し、血管内皮細胞を活性化させて血管新生を促進する。また免疫細胞には局所の炎症を惹起させ、他の癌細胞に薬剤耐性因子の運搬を介して薬剤耐性を引き起こす。これらの働きを有するエクソソームにおいて、その主たる機能を担うのは miRNA と考えられ、これまで他の固形癌において転移機序に関する miRNA の同定が進んでいる。

本研究ではこのような背景から、肝細胞癌転移の分子メカニズムにおいて、腫瘍細胞より分泌されるエクソソームを介した前転移ニッチ形成機構が存在し、転移機序を担う miRNA を同定・機能解析することにより、肝細胞癌の転移の抑制が可能となり、肝細胞癌患者の予後の改善につながるものと思われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌において、腫瘍細胞由来エクソソームを介した前転移ニッチ形成機構の解明と、中心的役割を果たす miRNA の同定・機能解析により肝細胞癌患者の予後を改善することとする。

3. 研究の方法

① 肝細胞癌高転移能株の樹立

親株はヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7 を用いた。上記の細胞株を免疫不全マウスである SCID/Beige マウスの脾臓内に投与し、経門脈的に肝内に腫瘍を形成させた。その後腫瘍を摘出し、シャーレ内で培養した後に新たなマウスに再投与した。このサイクルを4回繰り返すことで高頻度に肝内転移を来たす高転移能株(HuH-7M)を樹立した(図 1a)。樹立した高転移能株(HuH-7M)と親株(HuH-7P)における腫瘍形成能を、免疫不全マウスに対する脾臓内投与を行い、その後に脾臓を摘出するモデルにおいて比較検討した。また2つの細胞株における増殖能および、肝内高転移能株の細胞機能評価のため、細胞増殖能を proliferation assay にて、アポトーシスを annexin V assay、アノイキスを anoikis assay、蛋白発現を western blot で評価した。

② エクソソームを介した前転移ニッチ形成

親株と高転移能株由来エクソソームを用いて比較検討を行なった。免疫不全マウスに親株を脾臓内投与を行い、その後 Day3 から Day13 まで1日おきに、親株由来エクソソームあるいは高転移能株由来エクソソームを腹腔内投与を行い、肝内転移形成の有無を検証した(図 2a)。また転移先臓器である肝臓における血管内皮細胞における VE-cadherin と ZO-1 の発現を、蛍光2重免疫染色にて評価した。In vitro にて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、エクソソーム添加による蛋白発現を、Western blot および蛍光免疫細胞染色にて評価し、血管内皮細胞透過性を FITC 標識 dextran を用いた Permeability assay で検討を行った。

③ エクソソームにおける網羅的発現解析

エクソソーム中に内包される miRNA の網羅的発現解析を 3D-Gene Human miRNA Oligo chips を用いて行い、エクソソームを介した転移に関する miRNA の同定をおこなった。高転移能株由来エクソソームで発現上昇している miRNA を HUVEC に遺伝子導入を行い、蛋白発現を Western blot と蛍光免疫細胞染色により評価した。血管内皮細胞透過性の評価を FITC 標識 dextran を用いた Permeability assay で検討を行った。

④ 臨床検体による解析

同定された転移に関与する miRNA に関して、2012年から2015年に当科にて根治切除術を受けた肝細胞癌患者 54 例の保存血清を用いて定量解析した。さらには再発や生存などに関する臨床情報・予後情報との関連について統計解析を行い、同定された miRNA が新規予後マーカーとなりうるかを解析した。

4. 研究成果

① 肝細胞癌高転移能株の樹立

4 サイクル後に樹立した高転移能株(HuH-7M)は、8 匹中 7 匹にて腫瘍形成を認め、腫瘍形成率は、33%から 88%まで増加し、腫瘍の結節数や腫瘍径が増加していた。親株と高転移能株の腫瘍形成試験では、親株では腫瘍形成を認めなかったのに対して、高転移能株では9 匹中 6 匹に腫瘍形成を認めた(図 1b)。細胞機能では、HuH-7M は腫瘍増殖能の増加を認めた(図 1c)。Western blot では、E-cadherin、ZEB1、N-cadherin、Snail といった EMT マーカーや CD13、CD133、EpCAM といった癌幹細胞マーカーについては差を認めなかった。アポトーシスでは、HuH-7M では、アポトーシス陽性細胞の低下を認め、足場非依存性の生存率が増加していた(図 1d)。

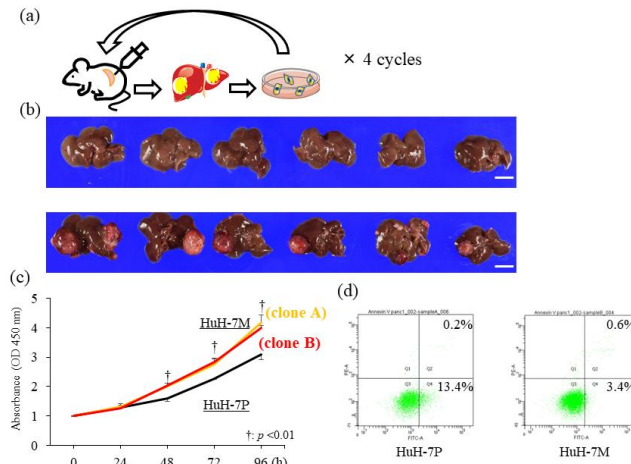


図1 肝細胞癌株高転移能株の樹立 (a) 高転移能株樹立シエマ (b) 腫瘍形成試験 (上段: 親株, 下段: 高転移能株) (c) 細胞増殖能 (c) アポトーシス

② エクソソームを介した前転移ニッチ形成

親株由来のエクソソーム投与群では、腫瘍形成を認めなかったのに対して、高転移能株由来のエクソソーム投与群では、33%に腫瘍形成を認めた(図 2b)。2 重蛍光免疫染色では、高転移能株由来エクソソーム投与群において、CD31 陽性細胞における VE-cadherin と ZO-1 の発現の低下を認めた(図 2c)。In vitro においても、高転移能株由来エクソソームを添加することでHUVEC における ZO-1 および VE-cadherin の蛋白発現が低下し、蛍光免疫細胞染色において細胞膜での発現レベルの低下も認めた。血管内皮細胞透過性においては、HuH-7M 由来エクソソームの添加により、細胞透過性が約 2 倍に増加を認めた。

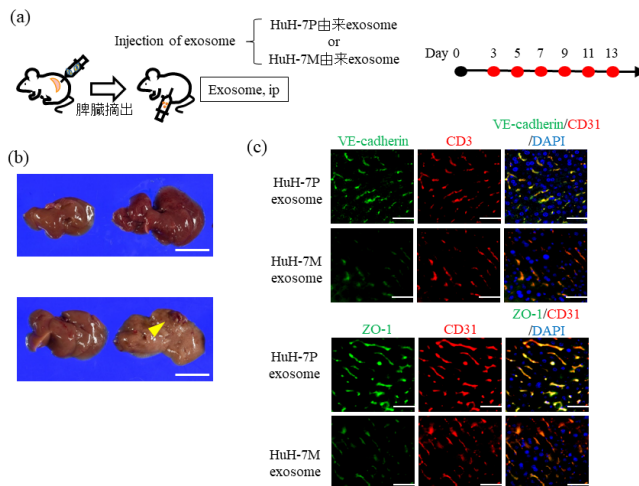


図2 エクソソームを介した前転移ニッチ形成 (a) 腫瘍形成試験シエマ (b) 形成された腫瘍 (c) 蛍光免疫組織染色

③ エクソソームにおける網羅的発現解析

網羅的発現解析により、高転移能株においてシグナルが 2 倍以上増加している miRNA を 22 個同定した(図 3a)。そのうち、miR-638, miR-663a, miR-3648, miR-4258 の 4 種の miRNA についてさらなる検討をおこなった。qRT-PCR において、発現の再現性の確認を行った。HUVEC に 4 種の miRNA を遺伝子導入することにより、ZO-1 および VE-cadherin の蛋白発現が低下し、蛍光免疫細胞染色において細胞膜での発現レベルの低下も認めた(図 3b)。また、血管内皮細胞透過性におい

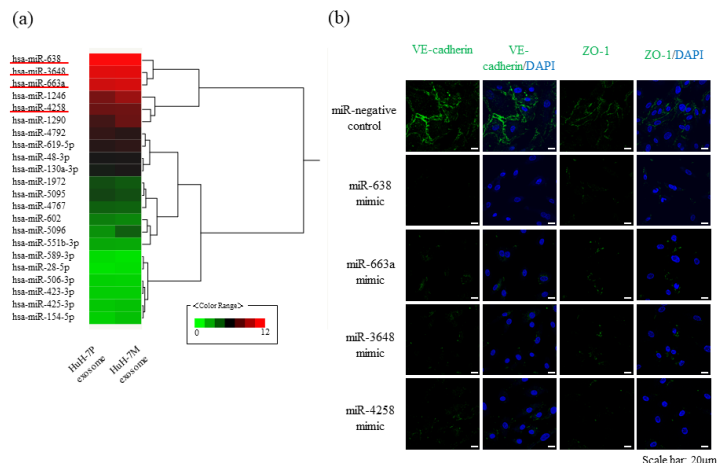


図3 エクソソームにおける網羅的発現解析 (a) クラスター解析 (b) HUVEC における蛍光免疫細胞染色

ては、4種のmiRNAの遺伝子導入により、細胞透過性が1.2倍から6.4倍に増加を認めた。

④ 臨床検体による解析

54例の内訳は、年齢の中央値は72歳、男性35例、女性19例であった。HBs-Ag陽性が8例、HCV-Ab陽性が23例であった。Child-Pugh分類は50例にてAであった。平均腫瘍径は3.3cm、腫瘍個数は単発47例、多発7例であった。低分化型肝細胞癌33例、高分化型と中分化型肝細胞癌が7例であった。組織学的門脈侵襲は15例で陽性であり、非癌部肝は21例に肝硬変を認めた。4種のmiRNAのうち、miR-638による検討のみで無病生存率に有意差を認めた。2年後の再発率はmiR-638低発現群で77.4%、miR-638高発現群で47.1%であった(図4a-d)。miR-638の高発現群と低発現群の2群間における臨床病理学的背景の解析では、2群間に有意差を認めなかった。無病生存率に関する単変量・多変量解析では、男性、PIVKA-II高値、多発腫瘍、miR-638高発現が、独立した予後規定因子であった。

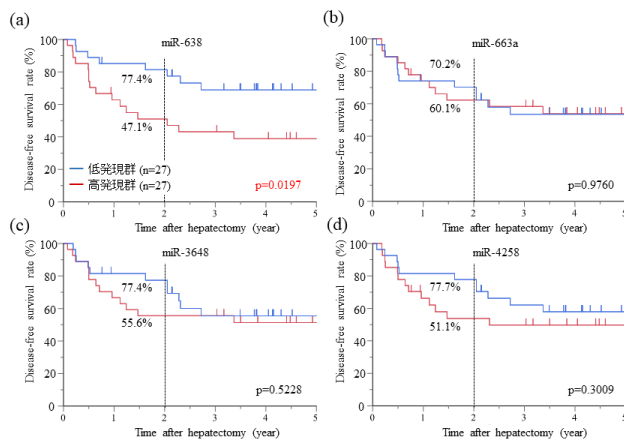


図4 肝癌根治切除例における術前血清中のmiRNAによる予後解析 (a) miR-638 (b) miR-663a (c) miR-3648 (d) miR-4258

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokota Yuki, Noda Takehiro, Okumura Yuichiro, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Gotoh Kunihito, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Murakami Takashi, Umeshita Koji, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 112
2. 論文標題 Serum exosomal miR 638 is a prognostic marker of HCC via downregulation of VE cadherin and ZO 1 of endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14807	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 Nagaoka Satoshi, Yamada Daisaku, Eguchi Hidetoshi, Yokota Yuki, Iwagami Yoshifumi, Asaoka Tadafumi, Noda Takehiro, Kawamoto Koichi, Gotoh Kunihito, Kobayashi Shogo, Miyoshi Eiji, Doki Yuichiro, Mori Masaki	4. 巻 112
2. 論文標題 The blockade of interleukin 33 released by hepatectomy would be a promising treatment option for cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 347 ~ 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14709	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 Matsumoto Kenichi, Noda Takehiro, Kobayashi Shogo, Sakano Yoshihiro, Yokota Yuki, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Gotoh Kunihito, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Umeshita Koji, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 500
2. 論文標題 Inhibition of glycolytic activator PFKFB3 suppresses tumor growth and induces tumor vessel normalization in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.12.011	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 Sakano Yoshihiro, Noda Takehiro, Kobayashi Shogo, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Gotoh Kunihito, Umeshita Koji, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 A case report of hepatocellular carcinoma derived from Rastelli procedure-related congestive liver disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1525 ~ 1529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-021-01488-2	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 Yokota Yuki, Noda Takehiro, Kobayashi Shogo, Matsumoto Kenichi, Sakano Yoshihiro, Iwagami Yoshifumi, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Gotoh Kunihito, Umeshita Koji, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 A case report of Fontan procedure-related hepatocellular carcinoma: pure laparoscopic approach by low and stable pneumoperitoneum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Surgery	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12893-020-00741-8	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 Matsumoto Kenichi, Noda Takehiro, Eguchi Hidetoshi, Iwagami Yoshifumi, Akita Hirofumi, Asaoka Tadafumi, Gotoh Kunihito, Kobayashi Shogo, Marubashi Shigeru, Umeshita Koji, Mori Masaki, Doki Yuichiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Atrophy of the Rectus Abdominis After Left-Side Donor Hepatectomy: Comparison of Upper Abdominal Midline vs Mercedes Incision	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1496 ~ 1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2019.01.116	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 横田祐貴、野田剛広、江口英利、奥村雄一郎、岩上佳史、富丸慶人、秋田裕史、後藤邦仁、小林省吾、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 肝細胞癌転移モデルにおける肝内転移機序の解明
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田祐貴、野田剛広、江口英利、奥村雄一郎、岩上佳史、富丸慶人、秋田裕史、後藤邦仁、小林省吾、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 Extracellular vesicles from HCC, implication for metastatic mechanism and prognostic indicator
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本謙一、野田剛広、江口英利、岩上佳史、秋田裕史、富丸慶人、後藤邦仁、小林省吾、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 肝細胞癌における解糖系酵素PFKFB3阻害は腫瘍増殖抑制および腫瘍血管正常化を誘導する
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田 剛広、後藤邦仁、小林省吾、岩上佳史、富丸慶人、秋田裕史、梅下浩司、土岐祐一郎、江口英利
2. 発表標題 下大静脈腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌に対する肝切除術とその治療成績
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪野佳弘、野田剛広、小林省吾、岩上佳史、富丸慶人、秋田裕史、後藤邦仁、梅下浩司、土岐祐一郎、江口英利
2. 発表標題 Clinical Significance of ACYP1 Gene Expression and its Association with Tumor Progression in Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田 剛広、江口英利、岩上佳史、富丸慶人、秋田裕史、後藤 邦仁、小林省吾、梅下浩司、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 肝細胞癌に対する腹腔鏡下系統的肝切除術の長期成績
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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