

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09838

研究課題名(和文) 臨床腫瘍組織直接移植モデルを利用した細胞外小胞による増殖・転移機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of extracellular vesicles using patient derived xenograft

研究代表者

田中 智人 (Tomohito, Tanaka)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：90411363

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)：大腸癌および卵巣癌からの細胞外小胞の抽出に成功し、卵巣明細胞癌では同一患者の正常卵巣と腫瘍組織から放出された細胞外小胞内に含まれるmiRNAについてマイクロアレイ解析を行い、正常卵巣組織と比較し癌組織で高発現を認めたmiRNAを同定した。さらに、発現率が高いものを選択し、術前、術後の採血によりEV内miRNAを比較し、6種類の癌特異的miRNAを同定した。また、大腸癌、卵巣癌ともに小胞径200nm程度のものが単球に有意に取り込まれていることを確認した。また、これらの小胞を取り込んだ単球からは種々のサイトカインが有意に放出されており、転移や浸潤に影響を与えてい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

本研究では癌が放出する細胞外小胞内の癌特異的マイクロRNAを同定した。さらに、細胞外小胞自体が転移や浸潤に影響を与えていることを確認した。これらの癌組織から放出された細胞外小胞をターゲットにして、癌の早期発見や、新薬の開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： This study aimed to identify cancer-specific miRNAs as novel ovarian clear cell carcinoma (OCC) biomarkers using tissue-exudative extracellular vesicles (Te-EVs). Te-EVs were collected from four patients with OCC on one side and a normal ovary on the other side. Microarray analysis was performed to identify cancer-specific miRNAs in Te-EVs. Serum samples obtained before and after surgery from patients with OCC and atypical endometrial hyperplasia (AEH) (controls) were compared. Thirty-seven miRNAs were > 2-fold upregulated on the OCC side compared with the normal ovarian side. The levels of six EV miRNAs were significantly decreased in postoperative OCC serum compared to those in preoperative OCC serum. In contrast, no significant change was observed between the pre and post-operative values in the control group. We identified OCC tissue-specific miRNAs in the EVs secreted by OCC tissues. These EV miRNAs have potential for use as biomarkers for the early diagnosis.

研究分野：Molecular oncology

キーワード：細胞外小胞 PDX マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞は免疫反応を抑えるために EV を抗原提示小胞として活用して、T 細胞やナチュラルキラー細胞の不活性化や制御性 T 細胞の分化の更新を行っていると考えられている。近年、EV 内に mRNA や miRNA などの核酸の存在が発見されたことにより、mRNA・miRNA は選択的に EV 内に取り込まれ、放出された EV は元の細胞の RNA 情報を他の細胞に伝達できることがわかってきた。EV は血液や尿などさまざまな体液に含まれ、体内を循環しており、放出細胞由来の情報が含まれていることから、バイオマーカーとしての使用に期待が寄せられている。

2. 研究の目的

我々は「EV 内の蛋白もしくは RNA が免疫細胞のみならず正常細胞に作用し、受け入れ細胞へと変化を促し、腫瘍細胞が増殖や浸潤・転移を起こしやすい環境を作る。」と仮説を立て検証する。現在のところ、血液や体腔液、尿などから EV を回収し解析している研究が多くみられるが、我々は、子宮頸癌、子宮内膜癌および卵巣癌において、正常組織、原発巣、転移巣のみならず、免疫系の異なる PDX から分泌された EV を直接回収し、EV 内の蛋白、mRNA、miRNA を解析し、腫瘍の増殖および浸潤・転移にかかわる特異的な物質を同定し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

検討課題 1 PDX の樹立

手術検体より採取した腫瘍組織を FCS free 培養液中で 2 時間放置し培養液を回収する(培養液は EV の回収に用いる)。その後、氷上の組織保存液(ミルチー)に移し、ダブルカッター方により 21G 針を通る程度に粉碎する。同量のマトリゲルを加えて調整したのち SCID マウスの皮下に 21G 針にて 0.5ml 注射し皮下移植する。同時に経腔的に子宮にも 21G 針を用いて 0.5ml 注射し移植する。約 60 日後に sacrifice し腫瘍検体を回収する。採取した腫瘍検体を FCS free 培養液中で 2 時間放置し培養液を回収する。検体の一部は保存液に移し、再度同様の方法で、別のマウスへ移植する。原発臓器や転移巣の部位、組織型や進行期、原発巣および転移巣の部位、移植部位および継体回数などによる生着率の違いを検討し PDX に最適なモデルを検討する。

検討課題 2 正常組織、原発巣、転移巣および PDX における EV の抽出と蛋白、RNA の解析

子宮頸癌、子宮内膜癌および卵巣癌の手術検体より採取した正常組織および腫瘍組織または PDX 検体を FCS free 培養液中で 2 時間放置し培養液を回収する。検体の一部は、そのままタンパク分析および次世代シーケンサーによる DNA、mRNA、miRNA の検索にまわす。残りの腫瘍組織は組織保存液(ミルチー)に入れ PDX 検体として扱う。回収した培養液を超速心分離(2000xg, 30min→16000xg, 30min→100000xg, 90min x2)し EV を抽出する。EV が抽出されていることを Western blotting による CD(Cluster of differentiation) 63・CD81・CD9 の発現、電子顕微鏡によるエクソソームの描出、ナノサイトによる粒子の測定により確認する。検体および EV 内のタンパクはトリプシン処理ののち液体クロマトグラフィ(LC/MS)にて質量分析を行う。これらのタンパクデータは Maxquant にて解析し特異的タンパクを同定する。同様に検体および EV 内の DNA・mRNA・miRNA は次世代シーケンサーを用いて exome-seq、RNA-seq、small RNA-seq にて網羅的に解析する。以上より正常組織、原発巣、転移巣および PDX における発現量の違いから腫瘍増殖および浸潤・転移に関わる因子を同定する。

検討課題 3 特定されたタンパク、DNA、mRNA および miRNA による制御機能の検討

腫瘍の増殖および浸潤・転移に関わるタンパク、DNA、mRNA および miRNA が同定できれば、*in vitro* で同様の機構で制御されているのかを検討する。子宮頸癌、子宮体癌および卵巣癌細胞株を用いて制御物質の導入や抑制ののち標的とするタンパクおよび RNA の発現量を RT-PCR、Western blotting で確認し MTS、invasion などの各種 assay を用いて実際に腫瘍の増殖・転移能が制御されているのかを検討する。実験例として、子宮内膜間質細胞株 CRL4003 と子宮頸癌細胞株 CaSki を用いた invasion migration assay による子宮頸癌浸潤モデルなどを考えている。本実験では、matrigel により隔てられた上層に CaSki 細胞を播き、下層には、同定した物質 X を導入した CRL4003 細胞および手を加えていない CR4003 細胞を培養し、上層の CaSki 細胞の浸潤能および遊走能の変化を比較する。

4. 研究成果

子宮頸癌 PDX

子宮頸癌 22 例中 11 例のモデルマウス作成に成功した。成功率は 50% で、腫瘍移植に失敗した症例に再発例は認めなかったことから、腫瘍移植の成功率に、腫瘍の悪性度が関与していると考えられた。さらに、原発巣およびマウス腫瘍について比較検討した。病理組織学的には、マウス

腫瘍は、扁平上皮癌および腺癌の特徴を維持しており、免疫染色でも、腫瘍細胞は p16 に濃染し、腫瘍継体による ki67 index の変化もみられなかった。次世代シーケンサーによる DNA 解析では、原発巣およびマウス腫瘍のあいだで、共通した遺伝子変異が認められ、体細胞系列遺伝子変異に高い相関率を示した。また、腫瘍細胞の RNA 検索でも、マウス腫瘍は原発巣と同様のがん関連遺伝子の発現を示し、遺伝子発現率にも強い相関を認めた。さらに、癌細胞から放出される細胞外小胞内の RNA 検索を行ったところ、原発巣とマウス腫瘍では遺伝子発現は類似しているものの、継体を繰り返すと、類似率は減少した。

子宮体癌 PDX

子宮体癌では 92 例中 52 例のモデルマウス作成に成功した。成功率は 57% で、腫瘍生着には腫瘍の悪性度が関与していると考えられた。病理組織学的に生着腫瘍は原発腫瘍の特徴を反映しており、免疫染色の特徴も一致した。さらに、DNA 変異および RNA 発現も類似していた。また、EVs 内の RNA 発現も類似していることから、子宮体癌 PDX は原発腫瘍の特性を維持していることが確認された。

EVs 内の癌特異的 miRNA 解析

大腸癌および卵巣癌からの細胞外小胞の抽出に成功しており、卵巣明細胞癌では同一患者の正常卵巣と腫瘍組織から放出された細胞外小胞内に含まれる miRNA についてマイクロアレイ解析を行い、正常卵巣組織と比較し癌組織で高発現を認めた miRNA37 種類を同定した。さらに、発現率が高く、特異的 primer をもつ miRNA12 種類を選択した。術前、術後の採血により EV 内 miRNA を比較し、6 種類(miR-30a-5p, miR-200a-5p, miR-200a-3p, miR-200b-5p, miR-200b-3p, miR-200c-3p)の癌特異的 miRNA を同定した。また、大腸癌、卵巣癌ともに小胞径 200nm 程度のものが単球に有意に取り込まれていることを確認した。また、これらの小胞を取り込んだ単球からは種々のサイトカインが有意に放出されており、転移や浸潤に影響を与えていることが示唆された。In vivo では Te-EVs を投与した個体は明らかに癌の発育が早いことを確認しており、これらの癌組織から放出された細胞外小胞を特異抗体で制御することにより、免疫機構を利用した新薬の開発が可能であることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Tanaka Tomohito, Nishie Ruri, Ueda Shoko, Miyamoto Shunsuke, Hashida Sousuke, Konishi Hiromi, Terada Shinichi, Kogata Yuhei, Sasaki Hiroshi, Tsunetoh Satoshi, Taniguchi Kohei, Komura Kazumasa, Ohmichi Masahide	4. 巻 22
2. 論文標題 Patient-Derived Xenograft Models in Cervical Cancer: A Systematic Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9369 ~ 9369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179369	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 Tomohito, Nishie Ruri, Ueda Shoko, Miyamoto Shunsuke, Hashida Sousuke, Konishi Hiromi, Terada Shinichi, Kogata Yuhei, Sasaki Hiroshi, Tsunetoh Satoshi, Taniguchi Kohei, Komura Kazumasa, Ohmichi Masahide	4. 巻 11
2. 論文標題 Endometrial Cancer Patient-Derived Xenograft Models: A Systematic Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2606 ~ 2606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11092606	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 Ashihara K, Terai Y, Tanaka T, Tanaka Y, Fujiwara S, Maeda K, Tunetoh S, Sasaki H, Hayashi M, Ohmichi M.	4. 巻 19(3)
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/ol.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 -

1. 著者名 Yoo M, Tanaka T, Konishi H, Tanabe A, Taniguchi K, Komura K, Hayashi M, Ohmichi M.	4. 巻 13
2. 論文標題 The Protective Effect of Testosterone on the Ovarian Reserve During Cyclophosphamide Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Onco Targets Ther	6. 最初と最後の頁 2987-2995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OTT.S242703	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 Maeda K, Sasaki H, Ueda S, Miyamoto S, Terada S, Konishi H, Kogata Y, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka Y, Tanaka T, Hayashi M, Ito Y, Kondo Y, Ochiya T, Ohmichi M.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Ovarian Res	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13048-020-00648-1	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 Kawashima S, Kawaguchi N, Taniguchi K, Tashiro K, Komura K, Tanaka T, Inomata Y, Imai Y, Tanaka R, Yamamoto M, Inoue Y, Lee SW, Kawai M, Tanaka K, Okuda J, Uchiyama K.	4. 巻 20(3)
2. 論文標題 -H2AX as a potential indicator of radiosensitivity in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 2331-2337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11788	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 T, Miyamoto S, Terada S, Kogata Y, Fujiwara S, Tanaka Y, Taniguchi K, Komura K, Yamamoto K, Yamada T, Ohmichi M.	4. 巻 -
2. 論文標題 The Diagnostic Accuracy of an Intraoperative Frozen Section Analysis and Imprint Cytology of Sentinel Node Biopsy Specimens from Patients with Uterine Cervical and Endometrial Cancer: aRetrospective Observational Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Oncol Res.	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/s12253-020-00822-2	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 Ashihara K, Terai Y, Tanaka T, Tanaka Y, Fujiwara S, Maeda K, Tunetoh S, Sasaki H, Hayashi M, 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/ol.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 -

1. 著者名 Yoo M, Tanaka T, Konishi H, Tanabe A, Taniguchi K, Komura K, Hayashi M, Ohmichi M.	4. 巻 13
2. 論文標題 The Protective Effect of Testosterone on the Ovarian Reserve During Cyclophosphamide Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Onco Targets Ther.	6. 最初と最後の頁 2987-2995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OTT.S242703.	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 Maeda K, Sasaki H, Ueda S, Miyamoto S, Terada S, Konishi H, Kogata Y, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka Y, Tanaka T, Hayashi M, Ito Y, Kondo Y, Ochiya T, Ohmichi M	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Ovarian Res.	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13048-020-00648-1.	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 T, Miyamoto S, Terada S, Kogata Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Yamada T, Ohmichi M	4. 巻 11
2. 論文標題 Intraperitoneal cytology after laparoscopic radical hysterectomy with vaginal closure without the use of a manipulator for cervical cancer: a retrospective observational study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Manag Res.	6. 最初と最後の頁 7015-7020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CMAR.S210277.	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宮本瞬輔、直聖一郎、西江瑠璃、上田尚子、寺田信一、古形祐平、藤原聡枝、田中智人、田中良道、大道正英
2. 発表標題 子宮頸癌におけるPDOX(Patient-Derived Orthotopic Xenograft)モデル
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本瞬輔、上田尚子、橋田宗助、寺田信一、古形祐平、藤原聡枝、田中良道、田中智人、恒遠啓示、神宮司健太郎、辻川和丈、大道正英
2. 発表標題 卵巣癌組織から抽出したTe-EVs(tissue-exudative extracellular vesicles)の解析
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本瞬輔、安田奈央、飯藤宰士、大瀧瑠璃、上田尚子、寺田信一、小西博巳、丸岡 寛、古形祐平、田中智人、大道正英
2. 発表標題 卵巣癌におけるPDOX (Patient Derived Orthotopic Xenograft) モデル
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸岡 寛、田中智人、小西莉奈、飯藤宰士、石川 渚、大瀧瑠璃、上田尚子、宮本瞬輔、寺田信一、小西博巳、林 正美、大道正英
2. 発表標題 卵巣明細胞癌に対する切除組織培養分泌エクソソームを用いた特異的腫瘍マーカーの開発
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本瞬輔 田中智人 大道正英
2. 発表標題 卵巣癌におけるPDOX (Patient Derived Orthotopic Xenograft) モデル
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸岡寛 田中智人 大道正英
2. 発表標題 卵巣明細胞癌に対する切除組織培養分泌エクソソームを用いた特異的腫瘍マーカーの開発
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyamoto S., Tanaka T., Ohmichi M.
2. 発表標題 A Patient-Derived Orthotopic Xenograft model of Cervical Cancer
3. 学会等名 Global Academic Program 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>バイオバンク検体を用いたがんの再発・予後に関する血中、尿中新規バイオマーカーの探索と新規治療法の開発 https://www.osaka-med.ac.jp/deps/gyn/img/images/cmn/information/cresearch_15.pdf#view=Fit 臨床腫瘍組織の直接移植モデルに関する研究 https://www.osaka-med.ac.jp/deps/gyn/img/images/cmn/information/cresearch_15.pdf#view=Fit</p>

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	林 正美 (Masami Hayashi) (00551748)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大道 正英 (Masahide Ohmichi) (10283764)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	田中 良道 (Yoshimichi Tanaka) (10625502)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	恒遠 啓示 (Satoshi Tsunetoh) (70388255)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	佐々木 浩 (Hiroshi Sasaki) (80432491)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	古形 祐平 (Yuhei Kogata) (80829953)	大阪医科薬科大学・医学部・助教 (34401)	
研究分担者	寺井 義人 (Yoshito Terai) (90278531)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	

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