

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10011

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞のエクソソームが悪性黒色腫の増殖進展におよぼす影響と阻害剤の開発

研究課題名(英文) Influence of Exosomes of Cancer-Associated Fibroblasts on Proliferation and Progression of Malignant Melanoma and Development of Inhibitors

研究代表者

元村 尚嗣 (Motomura, Hisashi)

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30382188

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)：本研究はCAFからの悪性黒色腫(以下MM)の増殖進展に關与するエクソソームを同定し、その機序に立脚したMMの新規治療薬開発を目的とした。MMのCAFからのエクソソームはCD9+、CD63+のものがメインであり、またMM患者90症例について癌細胞およびCAFについてCD9、CD63、CD81を免疫染色し、それぞれの5年無病率を比較したところ、CAF由来のCD9+の症例は予後良好であるという結果が得られ(ログランク検定 $p<0.05$)、MMのCAF由来エクソソームは癌の悪性度を抑制している可能性があることを、Anticancer researchに投稿、採択された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小さい悪性黒色腫は手術で切除することができますが、進行した悪性黒色腫は未だ治療法が確立したものがない。今回は、悪性黒色腫の周囲の細胞(線維芽細胞)が産生するエクソソームという細胞間の情報伝達を行っている小胞に注目した。エクソソームは他の癌細胞の増殖などに関連しているという報告がある。今回、悪性黒色腫の線維芽細胞由来のエクソソームの中でもCD9というマーカーが発現しているエクソソームが悪性黒色腫細胞の増殖を抑制している可能性があることがわかった。今後、この研究をすすめていくことで、この機序に基づいた新規治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify the effects of exosomes derived from cancer-associated fibroblasts (CAFs) on the proliferation of malignant melanoma (MM) and to develop new therapeutic agents for MM based on the mechanism. The results showed that the exosomes from CAFs in MM are mainly CD9+, CD63+, and the CAFs-derived CD9+ cells had a better prognosis (log-rank test $p<0.05$), suggesting that CAFs-derived exosomes in MM may suppress the malignant potential of the cancer. and was accepted for publication in Anticancer research.

研究分野：形成外科学

キーワード：悪性黒色腫 エクソソーム 癌関連線維芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラノサイトが悪性化した悪性黒色腫（以下、MM）は、比較的予後の悪い皮膚悪性腫瘍のひとつであり、その発生率は世界中で増大している。早期のMMの多くは外科的切除により治癒可能であるが、比較的小さいものでも遠隔転移をするものも経験する。MMの予後因子としては、腫瘍の厚さ、分裂率、潰瘍の有無などが知られている。しかし、同じような病理学的因子を有する患者が必ずしも同様の臨床経過をたどるとは限らず、MMの悪性度をより正確に評価するための有用なマーカーを発見することが必要とされている。

間質細胞と癌細胞の間のクロストークは、様々なメカニズムを通じて癌の進行を指揮する上で重要な役割を果たすことが示されている。特に、腫瘍微小環境（TME）における主要な間質細胞である癌関連線維芽細胞（CAF）は、MMを含む癌細胞の進行に関与していると言われている。エクソソームは様々な細胞から分泌される直径30-150nmの細胞外小胞（EV）であり、細胞間コミュニケーションで重要な役割を果たすことが知られている。特に、CAFが分泌するエクソソームは、胃がんや膵臓がんなどで、がん進行に重要な役割を果たすことが報告されている。しかし悪性黒色腫においては癌関連線維芽細胞由来のエクソソームに基づいた研究報告は未だなされておらず、その機序を解明することでこれまでにない治療アプローチが達成される可能性があると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

皮膚悪性黒色腫は、他の皮膚悪性腫瘍と比べて増殖や浸潤が急速であり様々な臓器に転移を生じる、極めて予後不良な癌腫である。しかし、悪性黒色腫の増殖進展機序は十分に明らかにされておらず、効果的な治療法がないのが実情である。近年、癌の増殖進展に癌周囲微小環境を形成する間質細胞が関与することが報告され、この癌細胞-間質細胞相互作用の機序に基づいた新規治療法開発が期待されている。その中でも前述のエクソソームが、細胞間の情報伝達機構として注目されている。我々はこの観点から、悪性黒色腫細胞と癌周囲微小環境、とりわけ癌関連線維芽細胞との相互作用機序解明とその機序に基づいた新規治療法の開発を目的として本研究を着想した。すなわち、本研究は皮膚悪性黒色腫の癌周囲微小環境に着目し、癌関連線維芽細胞のエクソソームから悪性黒色腫の増殖進展に関与する因子を同定し、その機序に立脚した悪性黒色腫の新規治療薬開発を目的とする。

3. 研究の方法

細胞培養と細胞株

MM細胞株として、A375、COLO679、MMAc、およびMM組織由来のCAF細胞株として、CAF-MM1、CAF-MM2およびCAF-MM3の3種類を使用した。これらのCAFは、大阪府立大学のMM組織から樹立されたものである。CAF-MM1、CAF-MM2、CAF-MM3は、それぞれステージ1a、2b、3bのMMから、樹立した。線維芽細胞は、培養3~7継代まで、主に5継代で使用した。

エクソソームの単離と特性評価

エクソソームは、3種類の線維芽細胞の上清から超遠心法で抽出した。エクソソームの形態的

特徴は、透過型電子顕微鏡 (HT7700 ; HITACHI、東京、日本) で観察した。エクソソームの量と数は、Micro BCATM Protein Assay Kit を用いて定量した。

増殖能の評価

A375、MMAc、および COL0679 細胞の増殖率は、MTT アッセイおよび細胞数カウントにより評価した。MTT assay では A375 および MMAc 細胞は 1well あたり 6×10^3 個、COL0679 は 1well あたり 8×10^3 個細胞を 96 ウェルプレートに培養液とともに播種して 72 時間培養し、CAF 由来エクソソーム ($2 \mu\text{g/mL}$) を添加し、1.5%FBS 添加 DMEM で培養、コントロールの PBS 添加群と比較した。細胞数カウントは、A375 および MMAc 細胞は 1well あたり 3.6×10^4 個、COL0679 細胞は 1well あたり 4.8×10^4 個で 24 ウェルプレートの培養液に播種し、48 時間培養した。CAF 由来エクソソーム ($2 \mu\text{g/mL}$) を添加、1.5%FBS 添加 DMEM で培養し、コールターカウンターを用いて算出、コントロールの PBS 添加群と比較した。

ウェスタンブロッティング

エクソソームを一次抗体 (抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体、抗 CD81 抗体 (1 : 200))、二次抗体 (抗マウス HRP 標識二次抗体 (1:300)) を用いてウェスタンブロッティングを行った。

患者

大阪公立大学附属病院で原発性 MM の切除を受けた患者 90 名の病理標本を用いた。病理診断および分類は、AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition (2017) に従って行った。本研究プロトコルはヘルシンキ宣言の倫理指針に準拠し、大阪医科大学倫理委員会の承認を得た (承認番号 : 3422)。

CD9、CD63、および CD81 の免疫組織化学的判定

免疫組織化学染色は、90 個の MM 標本に対して行った。標本を CD9、CD63、CD81 抗体で免疫染色を行った。対比染色はギムザ染色で行った。CD9 と CD63 の発現は、それぞれ染色強度と染色された癌細胞と間質細胞の割合で評価した。強度は 0~3 (0=なし、1=弱い、2=中程度、3=強い) のスコアで、染色された癌細胞と間質細胞の割合は 0~3 (0=0%、1=10%、2=20~30%、3=40~100%) のスコアで評価した。2つのスコアを掛け合わせ、最終的に 0~9 のスコアとした。スコアが 3 以上の場合、腫瘍細胞での発現は陽性とし、スコアが 0~2 の場合、陰性とした。CD81 の発現は、CD81 を発現している症例が少なかったため、スコアが 1~9 の場合に陽性と評価した。スコアリングは、臨床データや転帰を知らない二重盲検の独立したオブザーバー 2 名によって行われた。

統計解析

CD9、CD63、CD81 の発現と臨床病理学的所見との関連は、カイ二乗検定を用いて解析した。サンプル数が少ない場合は、Fisher's exact test を使用した。無病生存率 (DFS) は、手術から再発までの期間と定義した。DFS 曲線は Kaplan-Meier 法を用いて推定し、log-rank 検定を用いて比較した。多変量解析は、Cox 比例ハザードモデルを用いて実施した。増殖アッセイについては、群間差の有意性を判断するために t 検定を用いた。すべての統計解析は、R (バージョン 4.2.1) を用いて実施した。両側確率 (p) 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。

4. 研究成果

結果

CAF 由来エクソソームにおける CD9、CD63、CD81 の発現

電子顕微鏡の結果、CAF-MM1、CAF-MM2、CAF-MM3 の3つのCAF由来のエクソソームの直径は20～100 nmであった。ウェスタンブロッティングの結果、CD9とCD63はすべてのCAF由来エクソソームで発現していたが、CD81はどのCAF由来エクソソームでも発現していなかった。

メラノーマ細胞の増殖に対するCAF由来エクソソームの影響

MTTアッセイにより、MMAc細胞の増殖能は、3種類のCAF由来エクソソームの添加により、コントロール群の増殖能と比較して有意に阻害された ($p < 0.05$)。A375細胞の増殖は、CAF-MM2およびCAF-MM3エクソソームの添加により有意に抑制された ($p < 0.05$)。一方、COL0679細胞の増殖は、いずれのCAF由来エクソソームによっても阻害されなかった。MMAc細胞の増殖は、コントロール群と比較して、CAF-MM2エクソソームの添加で阻害された。A375細胞の増殖は3つのCAF由来エクソソーム添加ではすべて阻害された ($p < 0.05$)。一方、CAF由来のエクソソームはいずれもCOL0679細胞の増殖に影響を与えなかった。

悪性黒色腫患者標本90例におけるCD9、CD63、CD81の発現と臨床病理学的要因との関連性

MM組織の免疫組織学的検討により、3つのエクソソームマーカーであるCD9、CD63、CD81が、がん細胞と間質細胞の両方で発現していることが示された。次に、これらのマーカーとMMとの臨床病理学的関連性を調べるために、MM患者90名の間質細胞およびがん細胞におけるこれらのマーカーの発現を評価した。CAFにおけるCD9、CD63、CD81の発現と臨床病理学的要因との解析の結果、CAFにおけるCD9の発現は、T分類 ($p = 0.00189$)、N分類 ($p = 0.00978$)、ステージ ($p = 0.000536$)、皮膚潰瘍の有無 ($p = 0.00104$)と有意に相関していた。一方、CAFにおけるCD63およびCD81の発現は、いずれの臨床病理学的因子とも相関がなかった。さらに、メラノーマ細胞におけるCD9の発現は、T分類 ($p = 0.00273$) およびステージ ($p = 0.0355$)と有意に相関していたが、CD63およびCD81のそれは、臨床病理学的要因のいずれとも相関していなかった。

悪性黒色腫患者90人の無病生存率

CAFsにCD9が発現している患者は、CD9が発現していない患者に比べ、有意に予後が良好であった ($p = 0.0222$)。一方、CAFにおけるCD63とCD81の発現に関しては、5年間の無病生存率(DFS)に有意差は認められなかった。さらに、がん細胞におけるCD9、CD63、CD81の発現は、MM患者の5年DFS率とは相関がなかった。単変量解析では、患者のDFSはT分類、N分類、潰瘍の有無、CAFのCD9発現と有意な相関があり、多変量解析では、T分類とN分類のみが独立した予測因子であった。

以上より悪性黒色腫のCAFから産生されるエクソソームはCD9とCD63が主で、それらは悪性黒色腫細胞の増殖を抑制し、癌の悪性度を抑制していると考えられた。上記内容は論文化し、Anticancer researchに投稿し、採択された。(Naho Fujii, Masakazu Yashiro, Takaharu Hatano, Heishiro Fujikawa, Hisashi Motomura. CD9-positive Exosomes Derived from Cancer-

associated Fibroblasts Might Inhibit the Proliferation of Malignant Melanoma.
Anticancer Research 43:25-33(2023)

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 0件）

1. 著者名 FUJII NAHO, YASHIRO MASAKAZU, HATANO TAKAHARU, FUJIKAWA HEISHIRO, MOTOMURA HISASHI	4. 巻 43
2. 論文標題 CD9-positive Exosomes Derived from Cancer-associated Fibroblasts Might Inhibit the Proliferation of Malignant Melanoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 25 ~ 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.16130	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	藤川 平四朗 (Fujikawa Heishiro) (80740373)	大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	
研究分担者	前田 周作 (Maeda Shusaku) (30817789)	大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	
研究分担者	羽多野 隆治 (Hatano Takaharu) (10382144)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	八代 正和 (Yashiro Masakazu) (60305638)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	

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