

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17649

研究課題名（和文）老化細胞由来エクソソームによる肺がん微小環境制御機構の解明

研究課題名（英文）The roles of senescence-related exosomes in the lung cancer microenvironment

研究代表者

藤田 雄 (Fujita, Yu)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10737133

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）：特発性肺線維症（IPF）は加齢が発症危険因子である老化関連肺疾患であり、高率に肺がんを合併する難治性疾患である。近年、100nm前後の細胞外小胞であるエクソソームは、新たな細胞間情報伝達物質として注目されており、老化細胞から分泌されるエクソソームはSASPとしての特徴を有して、IPFの病態、さらには合併するがんの微小環境制御や悪性化に深く関わっている可能性が考えられる。本研究は、老化細胞由来エクソソームの肺がんに対する役割を解明し、エクソソームに注目した病態評価及びこれら難治性肺疾患合併肺がんの治療戦略を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPFは、進行性の難治性疾患であり肺がんを効率に合併する。現状これらの病態の理解は不足しており、肺線維化とがん悪性化の関連性がエクソソームで解明されることで、新しい治療法に繋がることを期待される。IPFは、世界的に見ても死亡率の高い疾患であり、新規治療法が開発されれば、その社会的意義は十分大きいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) was reported to be associated with increased risk of lung cancer as a result of the occurrence of atypical or dysplastic epithelial changes in fibrosis which progressed to invasive malignancy. Although exosomes, a type of extracellular vesicles (EVs), have emerged as new players in intercellular communication, their role in the function of senescent cell secretome in the IPF pathogenesis has been largely unexplored. Here, we found the roles of senescence-related exosomes in the lung cancer microenvironment. To elucidate the mechanisms of lung cancer development through senescent-related exosome transfer will lead to a new therapy against IPF and lung cancer.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：エクソソーム 特発性肺線維症 肺がん SASP

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

COPD と IPF はいずれも加齢が発症危険因子である老化関連肺疾患であり、高率に肺がんを合併する難治性疾患である。近年、100nm 前後の細胞外小胞であるエクソソームは、新たな細胞間情報伝達物質として注目されており、老化細胞から分泌されるエクソソームは SASP としての特徴を有して、COPD や IPF の病態、さらには合併するがんの微小環境制御や悪性化に深く関わっている可能性が考えられる。本研究は、老化細胞由来エクソソームの肺がんに対する役割を解明し、エクソソームに注目した新規バイオマーカーによる病態評価及びこれら難治性肺疾患合併肺がんの治療戦略の確立を目的とする。

### 2. 研究の目的

エクソソームは、新たな細胞間情報伝達物質として注目されており、老化細胞由来エクソソームが内包する細胞間情報伝達物質を介して、細胞老化亢進に伴う COPD、IPF 病態に深く関わっている可能性がある。また COPD や IPF における慢性炎症が引き起こす発がんやがん微小環境制御においても、老化細胞由来エクソソームが関与しているのではないかと考えた。本研究では、難治性肺疾患である特に IPF に高率に合併する肺がん発症率増加や悪性化の病態が老化細胞由来エクソソームを介して解明できるか明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ① IPF 患者肺サンプルを用いた解析

倫理審査にて承認されている肺組織サンプルを用いて、エクソソームマーカーを染色し、正常肺と IPF にて相違点があるかどうか、病理学的な検討を行う。

#### ② 細胞由来エクソソームにおける肺癌への作用

様々な細胞を用いて老化誘導した老化細胞由来エクソソームによる肺癌への効果を検証する。細胞種としては上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、免疫細胞に着目する。肺癌細胞への効果は、主として細胞増殖、細胞死の観点から検討を行う。エクソソームは、超遠心法を用いて単離する。

#### ③ エクソソーム内包物の網羅解析

肺癌への影響が確認された老化細胞由来エクソソームに関する網羅解析を行い、エクソソームの内包物の何か現象に関与するか検討する。特に、エクソソーム内の microRNA、蛋白を網羅的遺伝子発現、蛋白発現の解析を行う。

#### ④ 同定したエクソソーム microRNA やタンパク質が制御する肺癌における遺伝子の検索

肺癌細胞株を用いて microRNA やタンパク質の強制発現を行い、発現変動のある肺癌における遺伝子を検索する。エクソソームと肺癌におけるシグナルネットワークを解析することにより IPF 合併肺癌における病態を明らかにし、新規治療法に繋げる。

### 4. 研究成果

#### ① IPF 患者肺サンプルを用いた解析

老化細胞由来エクソソームの肺癌への影響を検討するために、臨床サンプルの解析と細胞株を用いた *in vitro* の解析を行った。エクソソームの共通マーカーを IPF 患者の肺組織および正常組織との発現評価を行った(各 6 例ずつ)。その結果、エクソソームマーカーは正常気道上皮に

において高発現しており、さらに IPF の fibrotic foci においても高発現していることが分かった。これら IPF の線維病変からエクソソームが多く分泌されている可能性を示唆していた。

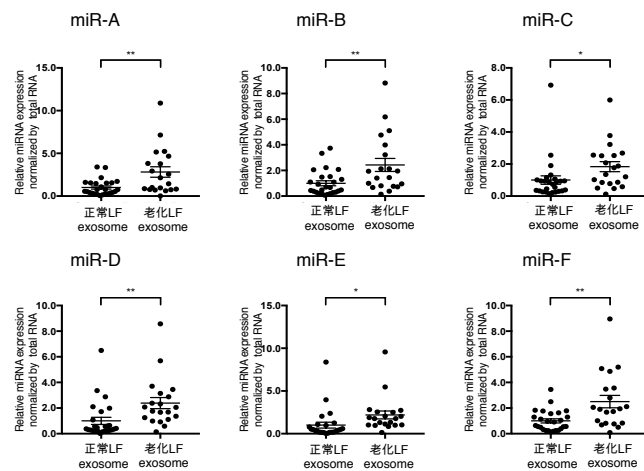
## ②老化線維芽細胞由来エクソソームにおける肺癌への作用

次に、老化した線維芽細胞(lung fibroblast:LF)に着目した。老化線維芽細胞はその機能評価にて正常の線維芽細胞と比較して各老化マーカーの発現亢進が誘導されていた。この老化線維芽細胞分泌エクソソームの機能評価を行った。複数の肺癌細胞株(A549、H460 など)にこれらのエクソソームを添加してみたところ、MTT アッセイにて肺癌細胞株の細胞増殖を3倍程度亢進させることが分かった。さらに PBS コントロールと比較して正常線維芽細胞由来エクソソームは肺癌の影響は確認されなかった。

## ③老化線維芽細胞由来エクソソームにおける網羅解析

正常線維芽細胞由来エクソソームと老化線維芽細胞分泌エクソソームの機能の相違を検討するために、これらのエクソソームの microRNA アレイ解析および LC-MS/MS による網羅的解析を行った。それらの結果から、明らかなエクソソームタンパク質は同定に至らなかった。一方で、microRNA アレイ解析に関して有意に変化を認める複数の microRNA を同定し、最終的に6つの microRNA-A、-B、-C、-D、-E、-F に着目した(図1)。

図1

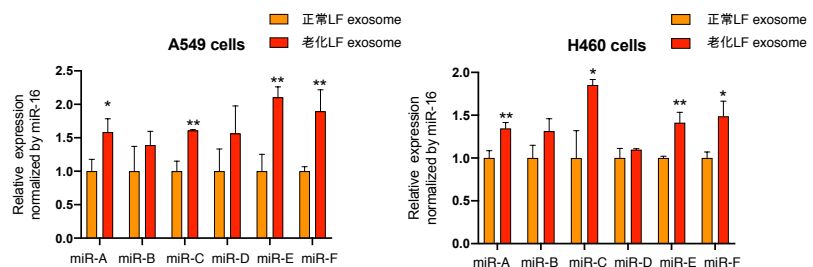


## ④老化線維芽細胞由来エクソソーム microRNA の解析

これら6つの microRNA の検証のため、それぞれのエクソソームを添加した肺癌において microRNA の定量評価をおこなったところ、

microRNA-A、-C、-E、-F に関して肺癌細胞内における発現の上昇を認めた(図2)。これらの microRNA は、GSE における IPF 合併肺癌において、その組織において高発現していることも確認された。

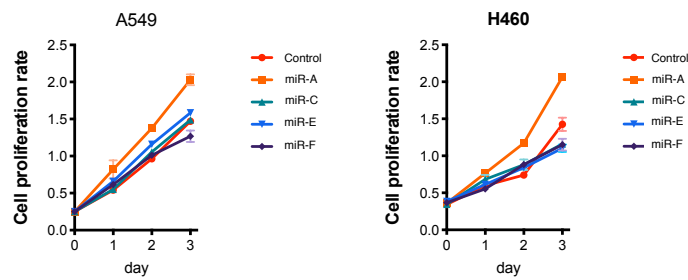
図2



## ⑤老化線維芽細胞由来エクソソーム microRNA による肺癌への影響

これらの4つのmicroRNAに関して、肺癌細胞株を用いて強制発現にて細胞増殖能への影響を検討した。A549 と H460 に microRNA-A、-C、-E、-F をトランスフェクションを行ったところ、MTT アッセイで特にmicroRNA-A で有意な肺癌細胞株の細胞増殖亢進を認めた(図3)。以上の結果から老化線維芽細胞分泌エクソソーム microRNA-A が肺癌の細胞増殖亢進に関与していることが判明した。

図3

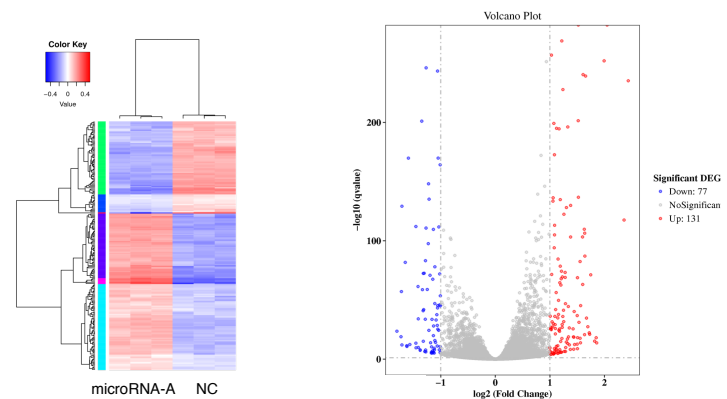


### ⑥肺癌において microRNA-A が制御する遺伝子の検索

肺癌細胞株を用いて microRNA-A の強制発現を行い、発現変動のある肺癌における遺伝子を検索した。図4にマイクロアレイの heat map および volcano plot を示す。Volcano plot において発現の低下していた遺伝子が 77 種類あった。この 77 種類の遺伝子と TargetScan による in sillico データを融合し、候補遺伝子として 35 種類の遺伝子を抽出し、その中からがん抑制遺伝子である7遺伝子に着

図4

目し、現在免疫染色および in vitro による 3' UTR binding assay を行い、microRNA-A と標的遺伝子の直接制御関係を明らかにする予定である。



このように IPF における線維芽細胞分泌エクソソームは microRNA の移送を介して合併する肺癌の病勢悪化に関与する可能性が示唆された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ichikawa Akihiro, Fujita Yu, Hosaka Yusuke, Kadota Tsukasa, Ito Akihiko, Yagishita Shigehiro, Watanabe Naoaki, Fujimoto Shota, Kawamoto Hironori, Saito Nayuta, Yoshida Masahiro, Hashimoto Mitsuo, Minagawa Shunsuke, Hara Hiromichi, Motoi Noriko, Yamamoto Yusuke, Ochiya Takahiro, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 111
2. 論文標題 Chaperone mediated autophagy receptor modulates tumor growth and chemoresistance in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4154 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14629	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 Kadota Tsukasa, Yoshioka Yusuke, Fujita Yu, Araya Jun, Minagawa Shunsuke, Hara Hiromichi, Miyamoto Atsushi, Suzuki Souichiro, Fujimori Sakashi, Kohno Tadasu, Fujii Takeshi, Kishi Kazuma, Kuwano Kazuyoshi, Ochiya Takahiro	4. 巻 63
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Fibroblasts Induce Epithelial-Cell Senescence in Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 623 ~ 636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2020-00020C	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 Fujimoto Shota, Fujita Yu, Kadota Tsukasa, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Intercellular Communication by Vascular Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their MicroRNAs in Respiratory Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 619697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2020.619697	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2件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田雄	
2. 発表標題 Small RNAおよびエクソソームを用いた 難治性呼吸器疾患における病態解明と治療法開発	
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術集会（招待講演）	
4. 発表年 2021年	

1. 発表者名 藤田雄
2. 発表標題 肺線維化に対する気道上皮細胞由来エクソソームを用いた新規治療戦略
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術集会（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

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