

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18099

研究課題名(和文) 血球分泌型細胞外小胞体の消化器癌悪性形質獲得メカニズムの解明と新たな治療戦略

研究課題名(英文) The effect of Erythrocyte-derived microvesicles on the malignant potential of gastric cancer cells

研究代表者

有田 智洋(Arita, Tomohiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00756794

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)：胃癌の進行に関し赤血球の分泌する細胞外小胞体(Erythrocyte-derived microvesicles;EDM)の影響を検討した。末梢血から得られた赤血球を培養し、超遠心分離によってEDMを培地から抽出した。胃癌患者の赤血球由来のEDM(GC EDM)は、健康人のEDM(HV EDM)と比較して、胃癌細胞の遊走能と胃癌細胞の中皮細胞への接着能を促進させることを確認した。EDMに内包されるmicroRNAに着目し、miR-3621がGCEDMに豊富に存在することが判明した。miR-3621 mimicを用いた胃癌細胞は、自身の遊走能や中皮細胞に対する接着能を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

『血球から放出・分泌されたEVが、癌組織ならびに周囲組織に取り込まれ、癌に有利な微小環境を整備し、更なる癌の悪性度獲得に関与している』との仮説を立て、血球成分由来EVの他細胞への取り込みならびに情報伝達の可能性について検討し、悪性腫瘍の進展に関わることを見出した。これら血球由来のmicroRNA含有EVの機能解析は、これまで全く行われていない新たな挑戦的研究であったが、長きに亘り不明であった癌の悪性化ならびに癌患者の悪液質に関する機序の解明や、外科臨床における術中出血の癌細胞に対する影響の解明等にも繋がる可能性を有す。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of erythrocyte-derived microvesicles (EDM) on the progression of gastric cancer. Erythrocytes obtained from peripheral blood were cultured and EDM was extracted from the medium by ultracentrifugation. Erythrocyte-derived EDM (GC EDM) in gastric cancer patients promoted the migration ability of gastric cancer cells and the adhesion ability of gastric cancer cells to mesothelial cells as compared with EDM (HV EDM) of healthy subjects. Focusing on the microRNAs contained in EDM, it was found that miR-3621 was abundant in GCEDM. Gastric cancer cells using miR-3621 mimic promoted migration ability and ability to adhere to mesothelial cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：消化器癌 細胞外小胞体 赤血球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外 microRNA が、細胞崩壊のみならず能動的分泌によって体液中に放出され、exosome 等への封入や蛋白分子との結合体形成によって、極めて安定した状態で存在することが証明された(Valadi-H et al. Nature Cell Biol:2007, Mitchell-PS et al. Proc Natl Acad Sci USA:2008)。これら exosome には microRNA のみならず mRNA、DNA 等の核酸や様々な蛋白なども封入されているとされており、細胞内では endosome 由来で、endosome が細胞膜に癒合することで細胞外に能動的に分泌される。一方で、これら細胞外 microRNA が、他のサイトカイン同様、細胞間の情報交換のメディエーターとして機能していることが証明されつつあり、癌の進展における新たな機序として一躍注目を浴びている(Valadi-H et al. Nature Cell Biol:2007, Kosaka-N et al. Flont Genet:2013)。これまで我々は、exosome に封入された microRNA を含む circulating RNA に注目し、消化器癌のバイオマーカーとしての可能性や、化学療法感受性ならびに治療効果判定への臨床応用について研究・報告を行ってきた(Arita T et al. Anticancer Res:2013, Hirajima S et al. Br J Cancer:2013, Kawaguchi T et al. Br J Cancer:2013, Komatsu S et al. Anticancer Res:2013, etc.)。また、細胞から放出された exosome の機能的役割にも着目し、胃癌細胞の分泌する腹水中 exosome が癌細胞や腹膜中皮細胞に取り込まれ、fibronectin 1 や laminin gamma 1 等の接着因子の発現を亢進させ、播種進展に有利な転移環境の構築を行う可能性を報告し(Arita T et al. Oncotarget:2016)、現在腹水中の exosome をターゲットとした治療戦略について臨床応用を検討している。

一方、胃癌手術における出血量が、術後播種再発と有意に相関することも報告し(Arita T et al. Ann Surg Oncol:2015)、その理由として胃癌の進行度と相関すると考えていたが、血球成分の分泌する EV が播種進展を促進している可能性について注目するに至った。無核の赤血球にも多数の microRNA が内包されており(Pritchard CC et al. Cancer Prev Res:2012)、赤血球も細胞同様に EV を分泌して細胞間情報伝達を行うことが明らかとなっているためである(Regev-Rudzki N et al. Cell:2013)。

2. 研究の目的

本研究課題はこれまでの研究課程で生じた全く新たな発想に基づいて計画されたものである。高度に進行した担癌患者における血球成分の異常は以前から知られており、中でも癌の進展に伴う溶血ならびに貧血の進行や血小板の減少等は、実地臨床では頻繁に経験される事象であり、担癌患者の治療に当たって妨げとなることもしばしば経験する。原因として、異常血管による溶血や凝固異常、化学療法による影響等が考えられてきたが、一方で、血球成分に極めて多くの microRNA が含有されており、EV が能動的に分泌され、細胞間情報伝達の一助を担っていることも報告されている。我々は実際に、溶血した血漿における多数の microRNA の発現亢進を確認しており(Shoda K et al. Biochemistry and Pharmacology:2016)、これらの microRNA が赤血球由来である可能性を強く示唆する結果と思われる。そこで今回、無核の血球成分(赤血球や血小板)の分泌する EV に着目し、『血球から放出・分泌された EV が、癌組織ならびに周囲組織に取り込まれ、癌に有利な微小環境を整備し、更なる癌の悪性度獲得に関与している』との仮説を立て、血球成分由来 EV の他細胞への取り込みならびに情報伝達の可能性について検討する。

これら血球由来の microRNA 含有 EV の機能解析は、これまで全く行われていない新たな挑戦的研究であるが、長きに亘り不明であった癌の悪性化ならびに癌患者の悪液質に関する機序の解明や、外科臨床における術中出血の癌細胞に対する影響の解明等にも繋がる可能性を有し、一方で、今回検索対象とする EV は新たな drug delivery system にも繋がる可能性も有する。本研究

課題である担癌患者の血球由来 microRNA 含有 EV の癌悪液質病態への関連性の機序解明は、「がん対策推進基本計画」において全体目標として掲げられた「がん患者とその家族の苦痛の軽減と療養生活の質の維持向上」にも繋がる可能性を有すると思われ、「日本再興戦略」において推進が求められている個別化医療を齎す画期的な手法を提供できる蓋然性が高いと思われ、これまで難治であった高度進行癌患者に対して極めて大きな福音となると考えられる。

3. 研究の方法

1) 担癌患者各血球成分中の EV 由来の癌悪性度関連 microRNA 候補の選定

担癌患者(食道癌 3 例、胃癌 3 例、大腸癌 3 例)ならびに健常対象者 3 名の末梢血液サンプルより抽出した血球由来 EV から total RNA を抽出し、(mirVana PARIS kit, Life Technologies 社) microRNA microarray 解析 (3D-Gene, Toray 社) で microRNA の網羅的解析を行い、癌患者特異的な microRNA の候補を選定する。これらの候補 miR と、既に得られた細胞機能解析の結果を比較検討し、癌細胞の悪性度獲得に關与する可能性のある microRNA を文献的に選定する。各細胞への血球由来 EV の取り込み前後の細胞株からも同様の手順で total RNA を抽出し、細胞内での microRNA の変化についても microarray を用いて比較検討した。

2) 血球成分由来 EV 中の癌悪性度関連 microRNA の同定

前述 1) で選定した microRNA について、細胞株への mimic 導入実験を実施し、細胞機能アッセイにおける観察された接着、浸潤、遊走能の変化を評価し、各血球成分由来 EV 中の癌悪性度関連 microRNA のさらなる選定を行った。

3) 担癌患者各血球成分由来 EV による癌悪性化に関する分子機序の解明

同様に、各血球成分由来 EV の取り込み前後の細胞株の total RNA を用いて、microarray assay(SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8 x 60K Ver3.0, Agilent 社)を行い、messenger RNA レベルでの分子発現変化を比較検討する。変化した分子については Western Blotting assay 法で蛋白レベルでの変化も観察評価する。

4. 研究成果

胃癌患者または健常人の術前末梢血から得られた赤血球を培地中で 24 時間培養し、超遠心分離によって EDM を培地から抽出した。PKH67 で蛍光標識した EDM を胃癌細胞株や中皮細胞株に添加したところ、細胞質内に取り込まれることを蛍光顕微鏡によって確認した。胃癌患者の赤血球由来の EDM(GC EDM)は、健常人の EDM(HV EDM)と比較して、胃癌細胞の遊走能と胃癌細胞の中皮細胞への接着能を促進させることをそれぞれスクラッチ assay および接着 assay にて確認した。

EDM には豊富な microRNA が含まれていることがわかっており、多くの遺伝子に対し発現を抑制的に調整するため、EDM に内包される microRNA に着目した。microRNA の microarray による網羅的解析によって、miR-3621 が HVEDM よりも GCEDM に豊富に存在することが判明した。miR-3621 mimic を用いて過剰発現させた胃癌細胞は、自身の遊走能や中皮細胞に対する接着能を促進することが確認された。

結論として、胃癌患者の赤血球から分泌される細胞外小胞体は、胃癌細胞の悪性度を亢進する可能性が示され、そのメカニズムとして、EDM に豊富に存在する miR-3663 が関連している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有田智洋
2. 発表標題 大学病院に所属する外科医の立場から考えるトランスレーショナルリサーチのあり方
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
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
---------	---------