

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18419

研究課題名（和文）エクソソームを介した神経膠腫における環境整備機構の解明と新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapies based on exosome-mediated mechanisms of environmental maintenance in glioma.

研究代表者

筒井 泰史 (Tsutsui, Taishi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00722042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：現在の治療では治療し得ない神経膠腫の進展や浸潤に関する機序を解明し、それを応用した新規治療の開発を目指した研究をおこなった。先行研究で解明した神経膠腫が分泌するエクソソームを含む細胞外小胞を利用した、腫瘍周囲微小環境の整備機構のさらなる解明をおこなった。細胞外小胞に含まれるタンパクやRNAを解析するとともに、細胞外小胞の分泌を抑えることで腫瘍の増殖や浸潤が抑制され、その効果が生体内でも再現されることを示し、今後の新規治療につながる結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫の周囲微小環境における重要な細胞としてマイクログリアが挙げられる。マイクログリアに対して神経膠腫が分泌する細胞外小胞が与える影響を検証した。神経膠腫の細胞外小胞に含まれるタンパクについて、先行研究で示したWT1タンパクに加えて、その他の候補分子（ATF1、cJun、YY1）が腫瘍周囲細胞に与える影響について検討した。また、WT1タンパクがマイクログリア内のThbs1遺伝子発現を抑制するだけでなく、そのメディエーターである複数の分枝が細胞外小胞に含まれることも示した。神経膠腫の微小環境整備機構を解明することで、画期的な新規の治療開発につながる成果を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We conducted research to elucidate the mechanisms of glioma progression and invasion that cannot be treated with current therapies. We previously reported the mechanism of maintenance of the tumor microenvironment using extracellular vesicles including exosomes secreted by gliomas. In this study, we analyzed the proteins and RNA contained in the extracellular vesicles and showed that suppressing the secretion of extracellular vesicles inhibits tumor growth and invasion. In addition, we demonstrated this tumor suppression effect can be reproduced in vivo, leading to new treatments in the future.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：神経膠腫 エクソソーム 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は現行の集学的治療では根治不能で、革新的な治療開発のためにはその悪性形質維持に関わる分子メカニズムの解明が課題である。そこで腫瘍幹細胞や腫瘍微小環境に着目した研究が世界中で報告されており、神経膠腫の浸潤・血管新生には周囲微小環境に存在するマイクログリアが積極的かつ促進的に機能しているとする知見が集積している。

近年、生体内の種々の細胞が分泌する細胞外膜小胞であるエクソソームを介した細胞間情報伝達が様々ながん種で研究されている。エクソソームはその膜上や内部に細胞特異的な蛋白質・脂質・核酸を含有しており、腫瘍周囲のみならず遠隔の標的細胞に取り込まれることで、腫瘍の悪性形質維持に寄与する微小環境を整備する。しかし、脳腫瘍領域でのエクソソーム研究の報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、悪性神経膠腫がエクソソームを介して周囲のマイクログリアや血管内皮細胞の性質・機能を変化させ、腫瘍増大・浸潤・血管新生を促す微小環境整備のメカニズムの解明を目的とする。さらに、その悪性形質維持機序の阻害による抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* で詳細に検証し、実臨床へ応用するための基盤を構築する。エクソソームを標的とする治療は既存治療とは全く異なる斬新なアプローチ法であり、また他臓器の悪性腫瘍治療にも応用拡大することが可能な今後の抗腫瘍治療のブレークスルーとなりうる革新的な方法である。

3. 研究の方法

(1)

先行研究において解析した *Thbs1* 遺伝子に関連する候補分子について、申請者が保有する質量分析結果から、論文報告や web 検索から各分子の生理学的機能を調べ、同様に有望な *WT1* タンパク以外の他の分子を候補として抽出し選択する。

同定された関連分子によるマイクログリア内の *Thbs1* 遺伝子への影響、それに続くマイクログリアの形質変化と微小環境の整備による悪性形質への効果を検証する。マイクログリアへの効果は、qRT-PCR 法による遺伝子レベルでの検索や Western blot 法や ELISA 法による蛋白質レベルでの解析を行う。

(2)

脳腫瘍マウスモデルの脳切片の免疫組織染色を用いて、腫瘍由来の細胞外小胞が周囲細胞へ取り込まれていることを生体モデルでしめす。

4. 研究成果

(1)

Thbs1 遺伝子の発現制御因子として *WT1* 以外の候補分子である *YY1*, *cJun*, *ATF1* を抽出した。複数の神経膠芽腫細胞株でその発現を Western blot 法で確認した。続いて、それぞれの神経膠腫株から抽出した細胞外小胞に候補分子であるタンパクが含有されるかどうかを、超遠心分離法と精製キットの 2 種類で精製した細胞外小胞検体で検証した。先行実験で示された *WT1* タンパクについては同様に細胞外小胞内への含有が確認されたが、その他の分子については検出することができなかった。分子量が少なく Western blot 法での検出が困難であったと考え、細胞外小胞の検体量を増やして再度検討したが、同様にどの候補分子も検出できなかった。そのため細胞外小胞への含有が全くないと判断した。

当初はそこで検出された分子によるマイクログリア内の遺伝子発現変化を検証する予定であったが、検出自体ができなかったため、実験計画を変更することとした。

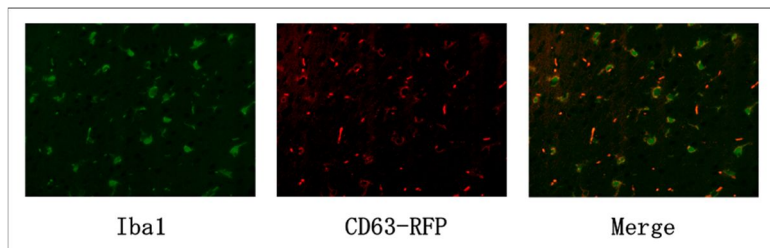
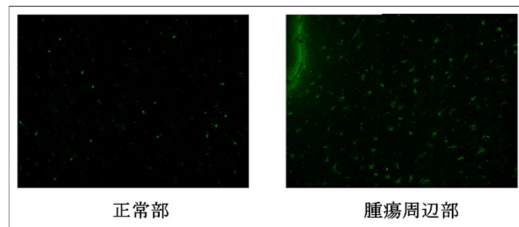
(2)

先行実験では、神経膠腫が分泌した細胞外小胞の脂質二重膜を PKH26 で染色し、その染色された細胞外小胞をマイクログリアに添加することで、*in vitro* で細胞外小胞がマイクログリアに取り込まれることを可視化することに成功した。本研究では、生体内での細胞外小胞の取り込みを可視化するため、細胞外小胞が蛍光顕微鏡にて観察できる細胞株の作成をおこなった。細胞外小胞への標的分子の取り込みについては、マーカー分子である *CD63* に RFP タンパクを発現させ

た。CD63-RFP 過剰発現 U87 株を作成し、その細胞株から精製される細胞外小胞が蛍光顕微鏡で観察できることを確認した。続いてその CD63-RFP 過剰発現 U87 株をマウス脳内に移植し脳腫瘍モデルを作成し、形成された腫瘍を脳切片を作成することで観察・評価した。

まず、マイクログリアはマーカーである Iba1 で染色し、正常部位と比較して腫瘍周囲では多くリクルートされており、さらに活性化されることにより形状も変化することが示された。

続いて、RFP と Iba1 の二重蛍光での観察をおこなった。すると、Iba1 で染色されたマイクログリア内に蛍光された細胞外小胞が観察され、腫瘍から分泌された細胞外小胞が周囲細胞であるマイクログリアに取り込まれたことが、生体モデルでも示すことに成功した。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tsutsui Taishi, Kawahara Hironori, Kimura Ryouken, Dong Yu, Jiapaer Shabierjiang, Sabit Hemragul, Zhang Jiakang, Yoshida Takeshi, Nakada Mitsutoshi, Hanayama Rikinari | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Glioma-derived extracellular vesicles promote tumor progression by conveying WT1 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Carcinogenesis | 6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1245 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa052 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 筒井泰史 |
| 2. 発表標題 膠芽腫における細胞外小胞の機能解明 |
| 3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 筒井泰史 |
| 2. 発表標題 膠芽腫由来細胞外小胞による腫瘍微小環境整備機構の解明 |
| 3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 筒井泰史 |
| 2. 発表標題 神経膠芽腫由来エクソソームによるマイクログリアを介した腫瘍微小環境整備機構の解明 |
| 3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍病理学会総会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|
|---------|---------|