

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18466

研究課題名（和文）腫瘍分泌エクソソームを標的とした骨軟部肉腫における新規診断システムの開発

研究課題名（英文）Development of Diagnostic System in Bone and Soft Tissue Sarcoma Targeting Tumor Derived Exosome

研究代表者

横尾 賢（YOKOO, Suguru）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00781204

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）：本研究では、予後不良の骨軟部肉腫の一つである滑膜肉腫（SS）由来細胞外小胞の膜表面に存在するタンパクであるMonocarboxylate transporter 1(MCT1)の同定および機能検証を行った。SS患者、SS細胞株、SS移植マウスの細胞外小胞にMCT1が高発現していることを確認した。SS患者のMCT1は治療前と比較し治療後に発現が減少していた。さらにSS細胞株のMCT1を抑制することで、腫瘍の増殖能、移動能、浸潤能を低下させた。MCT1がSS細胞質や細胞膜に発現していると予後不良であることを確認した。MCT1はSSにおける有用な診断および治療ターゲットとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良の骨軟部肉腫の一つである滑膜肉腫におけるMCT1標識により早期診断や再発のマーカーとなり得る。またMCT1を抑制することで、滑膜肉腫の治療に役立つ可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified monocarboxylate transporter 1 (MCT1), a protein present on the membrane surface of extracellular vesicles derived from synovial sarcoma (SS). MCT1 was highly expressed in extracellular vesicles from SS patients, SS cell lines, and SS xenograft mouse. The expression of MCT1 in SS patients was decreased after treatment compared to before treatment. Furthermore, suppression of MCT1 in SS cell lines reduced tumor proliferation, migration, and invasion. MCT1 expression in cytoplasm and/or membrane of SS was associated with poor prognosis. MCT1 labeling in SS can be a marker for early diagnosis and recurrence. It was also suggested that suppressing MCT1 has a potential in the treatment of SS.

研究分野：整形外科

キーワード：リキッドバイオプシー 液体生検 滑膜肉腫 MCT1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨軟部肉腫は再発・転移を起こすと予後が悪化することが知られており、早期発見および治療が予後改善の鍵となる。しかし、骨軟部肉腫は血中バイオマーカーが極めて乏しく、予後改善を妨げる問題点の一つである。骨軟部肉腫の一部は融合遺伝子が発見され、組織における発現解析が組織診断の精度を向上させたが、治療モニタリングを行う術は確立されていない。骨軟部肉腫における予後不良因子である再発・転移のモニタリングを可能とする技術開発が必須であるが、現状では画像検査によるスクリーニングがひろく行われている。

悪性腫瘍における新しい診断法として、分子遺伝学的な解析技術を用いて腫瘍由来の微量な発現変異を特定するリキッドバイオプシー技術の開発が世界的な注目を集めている。このリキッドバイオプシーは患者から血液や尿、涙などの体液を採取し、その体液に含まれる腫瘍特異的な分子を発見する方法である。リキッドバイオプシーは病勢のモニタリングや腫瘍遺伝子変異の確認(分子標的薬治療の効果および耐性モニタリングなどに使用できる)術後残余病変の検出などにも応用が可能であり、多科にわたる診療医から大きな期待が寄せられている。

リキッドバイオプシーは体液を循環する circulating tumor cell、circulating tumor DNA などの循環核酸、およびエクソソームをターゲットとする。これらの候補となる標的分子のうち、エクソソームは循環核酸などの他の候補と比べてその発現が安定しており、極めて有望な分子である。エクソソームは、細胞内の小胞輸送を介して細胞外に放出される直径 30-200 nm ほどの脂質二重層の膜を有する細胞外小胞の一種である。膜内には宿主細胞由来の核酸やタンパク質が含まれ、正常細胞とのいわゆる「cell-cell communication」を介して腫瘍の進展を促していることも示唆されている。このエクソソーム自体の標識を可能とする技術が本邦で確立され、大腸癌においては既存の腫瘍マーカーよりも感度・特異度が優れていることが明らかにされている。

### 2. 研究の目的

未だ予後不良とされる骨軟部肉腫における腫瘍由来エクソソームを特定し、その膜表面タンパクの網羅的解析および検出技術を開発することにより新規リキッドバイオプシー法を開発することを目的とする。本方法が確立されることで、臨床において判断に苦慮する骨軟部肉腫の再発・転移の有無を検出することができるだけでなく、治療にも応用ができる可能性も秘めている。

### 3. 研究の方法

骨軟部肉腫細胞株と患者検体からエクソソームを抽出し特定を行った。抽出の確認後、エクソソームに対し、液体クロマトグラフィー質量分析法にてプロテオーム解析および候補分子の特定を行った。

骨軟部肉腫細胞株をヌードマウスに移植し、腫瘍増殖および外科的切除に伴い候補タンパクを標的としたエクソソーム検出の発現比較を行った。また、患者血清由来エクソソームを用いて、候補分子の発現量の変化を検証した。候補タンパクの発現抑制株を作成し、正常細胞株との比較検討を行った。患者病理検体を用いて、候補分子の発現や予後との関連性についても検証した。

### 4. 研究成果

骨軟部肉腫細胞株および患者由来エクソソームは、電子顕微鏡と粒子径を用いサイズおよび形態、形状について確認した。また、western blot、ELISA でエクソソームに特徴的なテトラスパニン(CD9、CD63、CD81)の発現が確認できた。網羅的タンパク解析では、健常者と比較し滑膜肉腫(SS)で発現が多く、また術前と比較し術後に発現低下がみられた候補タンパク(Monocarboxylate transporter 1; MCT1)の選定を行った。

SS細胞株をヌードマウスに移植し、腫瘍サイズとマウス血清由来エクソソームに発現するMCT1が相関することを確認し、また腫瘍切除を行ったマウスにおいては、切除後に採取したマウス血清由来エクソソーム中のMCT1の発現が減少していることも確認した。

SSの術前術後ペア血清を用いた検討においては、エクソソーム中のMCT1発現が術前に比べ術後に有意に減少していたことを確認した(図1)。また、治療経過に沿った抽出分子の検証を行い、SS患者由来エクソソームの術前・術後・再発時・化学療法の前後など、経時的なMCT1発現量が変化していたことを確認した(図2)。白血球やヘモグロビンなどの血球由来エクソソームに左右されない特異的なバイオマーカーとなる可能性も示唆された。

MCT1の細胞株における機能解析では、MCT1の発現抑制株を作成し、増殖能・遊走能・浸潤能を正常株と比較した。MCT1の抑制により、SS細胞の移動・浸潤能が阻害され、腫瘍の成長が抑制された。病理学的検討においては、SSにおけるMCT1の発現率や予後などについての検証を行った。MCT1の細胞膜、細胞質での発現は予後の悪化と関連し、核での発現は良好な予後と関連することが明らかとなった(図3)。

Figure 1

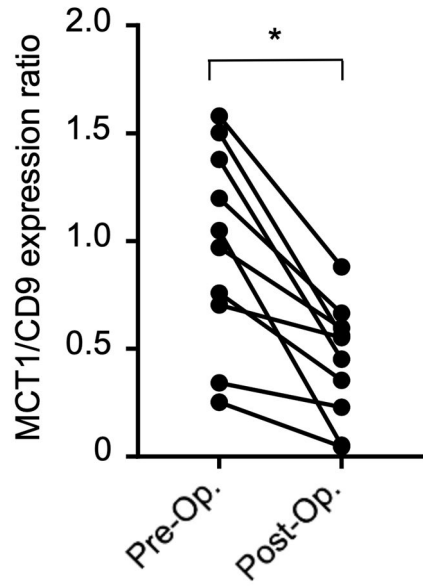


Figure 2

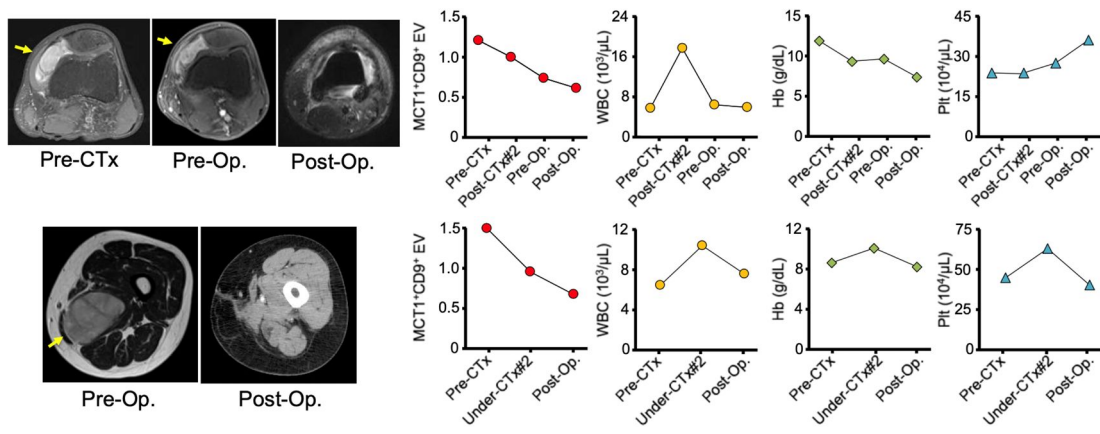
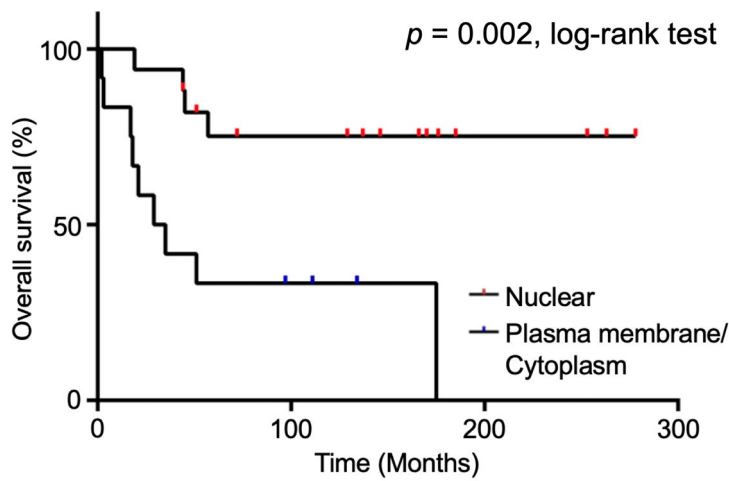


Figure 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokoo Suguru, Fujiwara Tomohiro, Yoshida Aki, Uotani Koji, Morita Takuya, Kiyono Masahiro, Hasei Joe, Nakata Eiji, Kunisada Toshiyuki, Iwata Shintaro, Yonemoto Tsukasa, Ueda Koji, Ozaki Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Liquid Biopsy Targeting Monocarboxylate Transporter 1 on the Surface Membrane of Tumor-Derived Extracellular Vesicles from Synovial Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1823 ~ 1823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13081823	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 Morita Takuya, Fujiwara Tomohiro, Yoshida Aki, Uotani Koji, Kiyono Masahiro, Yokoo Suguru, Hasei Joe, Kunisada Toshiyuki, Ozaki Toshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical relevance and functional significance of cell-free microRNA-1260b?expression profiles in infiltrative myxofibrosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66120-8	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 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横尾賢、藤原 智洋、吉田 晶、清野 正普、望月 雄介、出宮 光二、上甲 良二、久禮 美穂、尾崎 敏文
2. 発表標題 腫瘍由来エクソソームを標的とした滑膜肉腫におけるリキッドバイオプシーの開発
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokoo Suguru, Tomohiro Fujiwara, Koji Uotani, Aki Yoshida, Takuya Morita, Masahiro Kiyono, Joe Hasei, Eiji Nakata, Toshiyuki Kunisada, Toshifumi Ozaki
2. 発表標題 Establishment of Liquid Biopsy Targeting Exosomes Derived from Synovial Sarcoma
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
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
---------	---------