

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08684

研究課題名(和文)膵臓癌幹細胞由来エクソソームが遠隔転移を亢進する分子機構に関する研究

研究課題名(英文)The mechanism of promoting remote metastasis by exosome derived from pancreatic cancer

研究代表者

堀 裕一 (Hori, Yuichi)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80248004

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)：研究の全体構想は膵臓癌細胞の遠隔転移機構を明らかにして新規治療法を創出することである。膵臓がんは5年生存率が10%以下と固形がんで最も予後不良であり、遠隔転移や局所浸潤が予後を左右する。本研究では膵臓癌細胞が分泌するエクソソームに着目して初期の遠隔転移の分子機構を明らかにすることを目的とする。我々はすでに抗がん剤Gemcitabine(GEM)に耐性の膵臓癌患者から10種類の膵臓癌幹細胞株を樹立した。また、CD133陽性マウス膵臓組織幹細胞にがん遺伝子を導入してマウス人工膵臓癌幹細胞株を作成した。我々が樹立したヒトやマウス膵臓癌幹細胞株由来のエクソソームを使って転移の初期段階の分子機構を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは臓器別死亡数の第4位にあり、早期診断が困難で予後不良の疾患であり、発見時には多くの症例ですでに遠隔転移や癌性腹膜炎を伴っている。予後を左右する遠隔転移の病態解明や新しい治療法の開発が急務である。最近、がん細胞が細胞間コミュニケーションをはかるツールとして細胞が分泌するエクソソームが注目されている。本研究では、我々が樹立したヒトやマウスの膵臓がん細胞由来のエクソソームが初期の転移にどのように関与するのかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The overall concept of the research is to clarify the mechanism of distant metastasis of pancreatic cancer cells and to create novel therapeutic strategies. Pancreatic cancer has the poorest prognosis among solid tumors, with a 5-year survival rate of less than 10%, and distant metastasis and local invasion determine the prognosis. In this study, we aim to elucidate the molecular mechanism of early distant metastasis by focusing on exosomes secreted by pancreatic cancer cells. We have already established 10 different pancreatic cancer stem cell lines from pancreatic cancer patients resistant to the anticancer drug gemcitabine (GEM). We have also generated mouse engineered pancreatic cancer stem cell lines by transferring oncogenes into CD133-positive mouse pancreatic tissue stem cells. We will elucidate the molecular mechanisms of the early stages of metastasis using exosomes derived from the human and mouse pancreatic cancer stem cell lines we established.

研究分野：がんの細胞生物学

キーワード：膵臓がん エクソソーム 遠隔転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは癌死亡率の第4位にあり、早期診断が困難で最も予後不良の疾患であり、発見時には多くの症例ですでに遠隔転移や癌性腹膜炎を伴っている。外科的治療、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩にも関わらず依然として死亡率や死亡数は増加傾向にあり、予後を左右する遠隔転移の病態解明や新しい治療法の開発が急務である。

遠隔転移成立に関しては多くのプロセスがあり、解明されたとは言えない。最近、癌細胞が分泌するエクソソーム(細胞外小胞)が転移をはじめ、様々な細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。本研究では膵癌細胞が分泌するエクソソームが肝臓や肺で pre-metastatic niche を構築し、転移を促進するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

我々は既存の抗がん剤耐性の膵癌患者からヒト膵癌幹細胞株を樹立し(*PLoS One*, 2013)、CD133 陽性マウス膵組織幹細胞に K-Ras<sup>G12D</sup>、変異型 p53、CDK4、GFP を恒常的に発現させたマウス人工膵癌幹細胞の作成にも成功している(投稿中)。本研究では、我々が独自に樹立作成したヒト膵癌幹細胞株やマウス人工膵癌幹細胞株由来のエクソソームを分離精製して in vivo や in vitro で投与して pre-metastatic niche を再構築できるかどうか、さらに転移機構を分子レベルで解明し、新規治療薬の開発を目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 1) ヒト膵臓がん細胞株由来エクソソームによる超初期転移機構の解析

当研究室で樹立したヒト膵癌幹細胞株(KMC)や他の膵臓がん細胞株(Panc-1 や AsPC-1)の培養上清からエクソソームを分離し、これらの細胞には GFP 遺伝子を導入しているので lineage-tracing 可能である。さらに、また、転移の初期には上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)の関与が指摘されているのでエクソソームにおける EMT の誘導についても解析した。

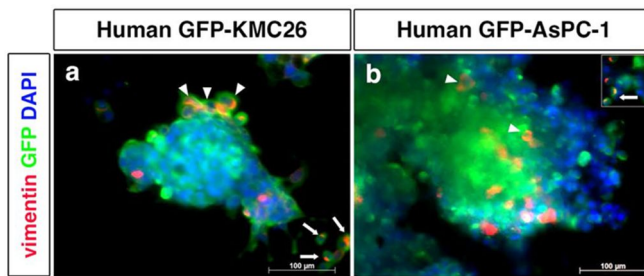
#### 2) ヒト膵癌幹細胞株由来エクソソームによる pre-metastatic niche の解析

転移過程のうち膵癌細胞の extravasation に絞って解析する。ヒト膵臓がん患者の腹水からエクソソームを分離し、免疫不全マウス(ヌードマウス)に経門脈的あるいは経尾静脈的に注入し、数日後に同じ経路から GFP ラベル膵癌細胞を注入し、2週間後に、臓器を摘出して組織染色で転移巣を確認する。ヒト膵癌幹細胞株には GFP 遺伝子を導入しているので lineage-tracing 可能である。対照群としては良性の胆汁性肝硬変患者腹水由来のエクソソームを用いた。

### 4. 研究成果

#### 1) ヒト膵臓がん細胞株由来エクソソームによる超初期転移機構の解析

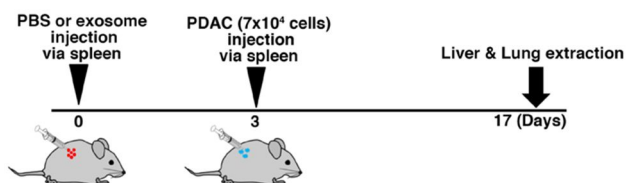
ヒト膵癌細胞株である AsPC-1 と我々が樹立した KMC を in vitro で培養すると、コロニーから budding してくる細胞があり、免疫染色の結果、これらの細胞は vimentin 陽性の細胞であることが判明し(左図)、分泌するエクソソームが EMT を誘導する可能性を明らかにした。実際に、



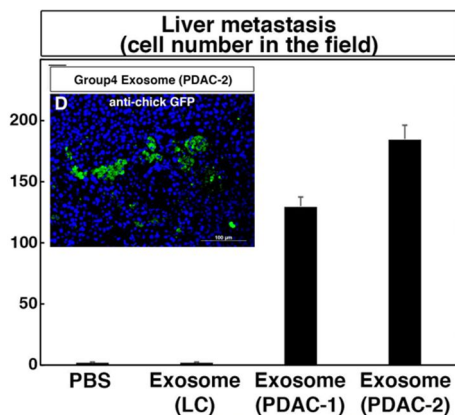
AsPC-1 や PANC-1 細胞にエクソソームを添加すると、Snail1 や Zeb1 の発現が遺伝子やタンパクレベルで亢進したことから、エクソソームによる EMT 誘導が明らかになった。EMT を誘導する分子として Transforming growth factor- 1(TGF- 1)が知られている。

EMT 誘導における TGF- 1 の関与を明らかにするために、膵臓がん細胞内の TGF- 1 を siRNA より knockdown すると、分泌されるエクソソーム内の TGF- 1 量も減少した。さらに、このエクソソームを膵臓がん細胞に添加すると EMT 誘導は有意に抑制されたことから、エクソソームによる EMT の誘導には TGF- 1 が部分的に関与することが証明された。以上の実験結果から、膵臓がん細胞転移の超初期には自身が分泌するエクソソームが膵臓がん細胞に EMT を誘導して、がん細胞のコロニーから離脱することが明らかになった。この研究成果は *Med Mol Morphol*, 55: 227-235, 2022 として論文発表した。

## 2) ヒト膵癌幹細胞株由来エクソソームによる pre-metastatic niche の解析



左図のようなプロトコルで in vivo の実験をおこなった。その結果、ヒト膵臓がん細胞 (PDAC-1, PDAC-2) 患者の腹水由来のエクソソームを前投与した群では明らかに肝臓転移が亢進した。一方で、



対照群の胆汁性肝硬変患者腹水 (LC) 由来のエクソソームでは全く肝臓転移を認めなかった。さらに、尾静脈経路でエクソソームを投与したのちに尾静脈から膵臓がん細胞を注入する実験では肺転移の有意な亢進を認めた。さらに、膵臓がん細胞の代わりに FITC-dextran を注入すると、ヒト膵臓がん細胞 (PDAC-1, PDAC-2) 患者の腹水由来のエクソソームを前投与した群では有意に sinusoid の血管内皮細胞の透過性が亢進した。この結果を in vitro で検証するため、two-chamber 法で実験すると、膵臓

がん細胞由来のエクソソーム投与群で血管内皮細胞の細胞間隙が破壊されて透過性が亢進することが明らかになった。さらなる研究成果より、膵臓がん細胞から分泌されたエクソソームが血管内皮細胞に内皮間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal Transition; EndMT) を惹起して、血管透過性を亢進し、膵臓がん細胞の extravasation が起こって初期の転移が完成することが明らかになった。この研究成果は *Pancreatology* 23: 377-388, 2023 として論文発表した。

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 0件）

1. 著者名 Kimoto A, Kadoi Y, Tsuruda T, Kim YS, Miyoshi M, Nomoto Y, Nakata Y, Miyake M, Miyashita K, Shimizu K, Ajiki T, Hori Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Exosomes in ascites from patients with human pancreatic cancer enhance remote metastasis partially through endothelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2023.04.002.	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 -

1. 著者名 Nakayama F, Miyoshi M, Kimoto A, Kawano A, Miyashita K, Kamoshida S, Shimizu K, Hori Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells themselves partially via transforming growth factor 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-022-00321-0.	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 -

1. 著者名 Miyoshi M, Kadoguchi H, Usami M, Hori Y	4. 巻 61
2. 論文標題 Synbiotics improved stool form via changes in the microbiota and short-chain fatty acids in hemodialysis patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kobe J Med Sci	6. 最初と最後の頁 E112-E118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Monoamine oxidase B inhibitor has anti-tumor effect on gemcitabine-resistant human pancreatic cancer
3. 学会等名 International Association of Pancreatology（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Miyashita K, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce epithelial mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells themselves
3. 学会等名 International Association of Pancreatology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本愛、三好真琴、宮下久美子、大永智貴、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌細胞由来エクソソームは膵癌細胞自身の上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本愛、三好真琴、大永智貴、宮下久美子、後藤百香、三宅睦、中田裕菜、野元優奈、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来のエクソソームはヒト膵臓がん細胞自身の上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大永智貴、三好真琴、木本愛、宮下久美子、三宅睦、中田裕菜、野元優奈、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌患者由来腫瘍片の同所性異種移植モデルは遠隔転移とがん関連凝固異常を再現できる
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀裕一
2. 発表標題 膵臓がんの現況と私の膵臓がん研究
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 MIYOSHI M, KADOGUCHI H, USAMI M, HORI Y
2. 発表標題 PREBIOTICS, PARTIALLY HYDROLYZED GUAR GUM, IMPROVED THE DEFECATION STATUS VIA CHANGES IN THE FECAL MICROBIOTA AND SHORT-CHAIN FATTY ACIDS IN HEMODIALYSIS PATIENTS
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International congress of nutrition in Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大永智貴、渡邊ありさ、三好真琴、宮下久美子、後藤百香、中山郁也、河野朱莉、前谷織江、木本愛、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 ヒト膵癌患者由来腫瘍片の同所性異種移植は遠隔転移とがん関連凝固異常を再現できる
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木本愛、中山郁也、三好真琴、宮下久美子、後藤百香、河野朱莉、前谷織江、渡邊ありさ、大永智貴、清水一也、堀裕一
2. 発表標題 膵臓がん細胞由来のエクソソームは自身の上皮間葉転換を誘発する
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Shimizu K, Kawano A, Hori Y
2. 発表標題 Patient-derived orthotopic pancreatic cancer tissue xenografts recapitulate remote metastasis and cancer-associated hypercoagulation
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyashita K, Miyoshi M, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Patient-derived orthotopic pancreatic cancer tissue xenografts recapitulate remote metastasis and cancer-associated hypercoagulation
3. 学会等名 American pancreatic Association 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyoshi M, Miyashita K, Kimoto A, Ohnaga T, Shimizu K, Hori Y
2. 発表標題 Pancreatic cancer cell-derived exosomes induce their own epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 American pancreatic Association 2021 (国際学会)
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
研究分担者	清水 一也  (Shimizu Kazuya)  (50335353)	神戸大学・保健学研究科・保健学研究員    (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三好 真琴  (Miyoshi Makoto)  (50433389)	神戸大学・保健学研究科・講師    (14501)	

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