

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09121

研究課題名（和文）神経膠腫におけるエクソソームを介した新規治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel exosome-based therapy in glioma

研究代表者

筒井 泰史（Tsutsui, Taishi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医師

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）：現在の集学的治療でも治療し得ない神経膠腫の進展や浸潤に関する機序を、エクソソームを代表とする細胞外小胞に注目して解明し、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細胞外小胞を介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。悪性神経膠腫が分泌する細胞外小胞が、先行研究で明らかとなったマイクログリアに対してのみならず、周囲細胞であるアストロサイトや血管内皮細胞に直接作用することを示し、多面的に効果を発揮する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

近年、悪性神経膠腫に対して様々な研究がなされているが、いまだにこの疾患を治癒させる治療の開発には至っていない。腫瘍自体に対する手術や化学療法、放射線治療では十分な結果が得られないため、腫瘍の進展や浸潤のメカニズムを解明し、その機序に着目した治療が効果的であると考え研究をおこなった。神経膠腫の周囲細胞への影響を与える方法として、エクソソームを代表とする細胞外小胞が重要であることを示し、複数の腫瘍周囲細胞を活性化することで腫瘍自身に有利な環境を整えていることを解明した。このことを利用して、現行治療とは全く違うアプローチによる新規治療を開発できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Glioma cannot be cured by current multidisciplinary therapies. We focused on extracellular vesicles such as exosomes to elucidate the mechanisms of glioma progression and invasion with the aim of developing novel therapies based on these mechanisms. We further investigated the mechanism of maintenance of the peritumoral microenvironment through extracellular vesicles secreted by gliomas, which was reported in our previous study. We showed that extracellular vesicles secreted by malignant gliomas act not only on microglia, as revealed in previous studies, but also directly on peritumoral cells such as astrocytes and vascular endothelial cells. These results suggest findings that will lead to future novel exosome-based treatments with multiple effects.

Translated with DeepL.com (free version)

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。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。

申請者は世界に先駆けて、神経膠腫の微小環境整備へのエクソソームの関与に着目し、先行研究をおこなった。エクソソーム低産生神経膠腫細胞株を作成し、マウス脳に移植した結果、明らかな腫瘍形成能および腫瘍浸潤能抑制効果を見出した。またその周囲のマイクログリア活性化と血管新生の変化を示し、エクソソーム産生抑制が細胞外微小環境の整備に大きく影響を及ぼすことを解明した。

さらに *in vitro*・*in vivo* 両方で腫瘍内の WT1 タンパクがエクソソームを介してマイクログリアへ運搬され、マイクログリア内の Thbs1 遺伝子の発現を抑制することで血管新生を促進させ、腫瘍形成に影響していることを先行研究で示している。

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) エクソソーム内 WT1 タンパクのマイクログリア内遺伝子発現への作用の検証

先行研究で腫瘍エクソソームに含有される WT1 タンパクによる腫瘍周囲のマイクログリア内の Thbs1 遺伝子の抑制機序が PCR 法を用いて示されている。本研究では、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、エクソソーム内 WT1 による Thbs1 遺伝子の発現調整を解析し、WT1 タンパクの発現の増減による Thbs1 遺伝子への影響を詳細に検証する。

(2) 腫瘍由来エクソソームの標的細胞のさらなる探索

先行研究で得られたマイクログリアへの作用以外に、他の標的細胞への作用を検索する。候補の腫瘍周囲細胞(正常アストロサイト、血管内皮細胞など)への腫瘍由来エクソソームの添加による形状・活性化の変化を観察する。またその生体内での変化を検証するために、先行研究でも使用した腫瘍モデルマウスを用いて、マイクログリア以外の細胞への影響を検証する。

4. 研究成果

(1)

ルシフェラーゼレポーターアッセイを目的とし、遺伝子導入腫瘍細胞を作成してエクソソーム内への含有を確認した。エクソソームの表面膜への発現はあるが、内部タンパク質への発現を得ることができなかった。そのため、この後に予定していた WT1 遺伝子発現調整による、マイクログリア内遺伝子発現量の変化の検証をおこなうことができなかった。

そのほかの作用遺伝子の検索をおこなった。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。

(2)

腫瘍細胞由来エクソソームを精製し、培養した正常アストロサイト（NHA 細胞）と血管内皮細胞（HUNEC 細胞）に添加した。細胞内へのエクソソームの取り込みの可視化については、先行実験で示したマイクログリアへのエクソソームの取り込みほどの結果は得られなかった。ただ、添加することにより細胞数は増加し形状が変化する傾向にあることを示した。各細胞の活性化タンパク発現量に関して Western blot 法で確認を試みたが、有意な差を見出すことはできなかった。続いて、モデルマウスでの検証もおこなった。腫瘍細胞株とエクソソーム低産生神経膠腫細胞株を使用して腫瘍モデルマウスを作成し、その腫瘍周囲での標的細胞のリクルートの程度やその細胞の形状を免疫染色で観察した。腫瘍細胞株モデルマウスではアストロサイトでは腫瘍周囲の活性化アストロサイトの増加がみられ、血管内皮細胞への影響として腫瘍周囲での微小血管の造成を多数認めたが、エクソソーム産生を抑制した細胞株を使用すると腫瘍周囲でのそれらの影響が減弱することがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------