

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16414

研究課題名（和文）胃癌腹膜播種に対する癌由来エクソソームを用いた革新的個別化治療の開発

研究課題名（英文）Development of innovative personalized treatment using cancer-derived exosomes for disseminated gastric cancer

研究代表者

松本 泰典（Matsumoto, Yasunori）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80738831

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞株を用いて、癌由来エクソソームに既存の抗癌剤を封入し胃癌治療効果の増強を示すことを試みたが期待された結果は得られなかった。研究を軌道修正し、胃癌による悪液質（体重減少や慢性炎症）の血中分子として免疫に関わるsPD-L1の定量と有用性を報告した。癌特異的な低酸素環境における癌由来エクソソーム内包物の変化、特にマイクロRNAの変化に着目し、腫瘍抑制的に働くマイクロRNA185に関する機能解析を行い報告した。また、手術で採取された患者癌組織を用いたモデルマウスを複数樹立し、小腸癌の1モデルからは、長期培養可能である細胞株を樹立することができ論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌治療効果改善のために、癌悪液質の克服に向けた分子機構についての知見を得た。また患者由来モデルを樹立し、今後の個別化治療研究に資する研究基盤を樹立した。エクソソーム自体の特定の環境下（低酸素）での変化を解析し得たことで、他の腫瘍微小環境にも応用可能な解析系を確立した。当初の研究目的の直接的な解明は行えなかったが、これらの結果は胃癌に対する患者由来の腫瘍由来エクソソーム解析と治療応用を今後進めていく基盤となり、社会的学術的意義を有するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Using a cancer cell line, we attempted to show enhancement of gastric cancer therapeutic effect by encapsulating existing anti-cancer drugs into cancer-derived exosomes, but did not achieve the expected results. We have revised our research course and reported the quantification and utility of immune-related sPD-L1 as a blood molecule in gastric cancer-induced cachexia (weight loss and chronic inflammation). Focusing on changes in cancer-derived exosome inclusions, especially microRNAs, in a cancer-specific hypoxic environment, we performed and reported functional analysis on microRNA 185, which acts in a tumor suppressive manner. In addition, we established several mouse models using surgically harvested cancer tissues from patients, and in one model of small intestine cancer, we were able to establish a cell line that can be cultured for a long period of time, which we reported in the paper.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：エクソソーム 胃癌 腹膜播種 悪液質 患者由来モデル PDX

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は胃癌の進展形式の中でも極めて予後不良な病態である。治療は化学療法が第一選択となるが、生存期間の中央値は12ヶ月に満たず、近年適応となった免疫チェックポイント阻害薬治療の効果も限定的と考えられている。新規治療として腹腔内化学療法の臨床試験などが行われてきているが、既存治療への優越性を認めるには至らず、革新的かつ低侵襲な治療開発が課題である。癌細胞などから放出される小胞のひとつであるエクソソームは、癌の進展に関わるとされる一方で薬物送達システムとしての利用可能性を有し、知見の集積が望まれる。

2. 研究の目的

細胞から放出される小胞の一つであるエクソソームを用いた消化管癌の新規治療開発、特に癌細胞由来エクソソームを改変し薬剤送達キャリアとして用いた新規治療法の開発に資する知見を得ることを目的とする。本研究では癌細胞株による解析とともに、患者由来の癌に対する個別化治療(precision medicine)の研究基盤として患者組織由来がんモデルマウス(patient derived xenograft; 以下 PDX)の作成・解析も平行して行う。

3. 研究の方法

(1) 癌由来エクソソームによる薬剤効果増強の評価

エクソソームへの薬剤封入として、CDDP と DTX の NUGC-4 における IC50 を測定し、DTX をエクソソームに電ポレーション法を用いて封入し NUGC-4 に添加することで、薬剤単体よりも薬剤感受性に変化が起こるかを評価した(図1)。

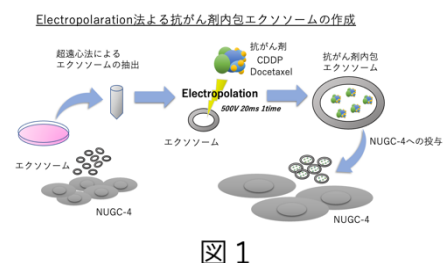


図1

(2) 癌由来エクソソームの腫瘍進展への影響(細胞株)

ヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN45、MKN45-GFP を使い、癌由来エクソソーム添加有無でのコロニー形成アッセイで細胞接着能を評価した。細胞は6well plate を使い1000cells/well となるよう播種し100 μ g/well のエクソソームを添加した。

(3) 腫瘍進展への影響(マウスモデル)

ヒト胃癌細胞株 NUGC-4 を用いた胃癌腹膜播種マウスモデルに対して2日毎に5回エクソソーム(0, 5, 50 μ g)を注入し、播種後21日後に腫瘍進展への影響を評価した。

(4) エクソソームの癌微小環境における変化の検討

ヒト食道癌細胞株 KYSE-960, T. Tn を使い低酸素環境(1%)と正常酸素環境(20%)で培養した後にそれぞれが放出するエクソソームを超遠心法を用いて抽出し内法するマイクロ RNA を GeneChip miRNA array を用いて網羅的に解析し、共通して変動するマイクロ RNA を検出した。低酸素で低下する miR-185 を解析対象として、in vitro における機能解析や臨床検体やデータを用いたマーカーとしての有用性を検討した。

(5) 血中 sPD-L1 と胃癌悪液質の解析

胃癌患者の臨床病理学的因子と、血中に存在する sPD-L1 量の統合解析から、胃癌悪液質の病態(低栄養、貧血、慢性)に関する検討を加えた。

(6) 患者組織由来癌モデル(PDX)の作成

胃癌、食道胃接合部癌、十二指腸癌を含めた小腸癌の患者において、ある程度の腫瘍量が採取できかつ同意のとれた症例よりサンプルを採取しマウス背部に移植した。正着した PDX から細胞株の樹立を試みた。

4. 研究成果

(1) 癌由来エクソソームによる薬剤効果増強の評価

NUGC-4 細胞株のみでの検討であるが、エクソソーム封入 DTX において抗腫瘍効果の増強は認められず (図2)、当初の計画から修正し腫瘍由来エクソソーム自体の腫瘍進展への影響を評価することとした。

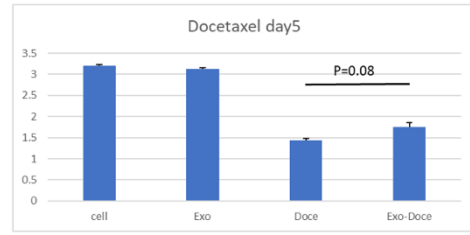


図2

(2) (3) 癌由来エクソソームの腫瘍進展への影響 (細胞株, マウスモデル)

コロニー形成能、マウスモデルにおける腫瘍進展を評価したが、本細胞株および今回設定した濃度 (投与量) においては有意差を認めなかった。

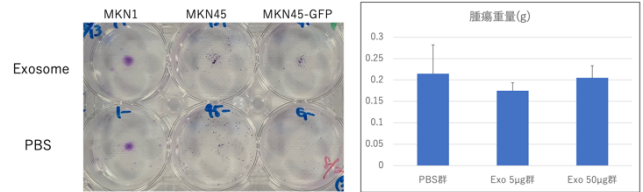


図3

図4

(図3 : colony formation assay, 図4 : 腫瘍重量)

(4) エクソソームの癌微小環境における変化の検討

低酸素環境下におけるエクソソーム中マイクロ RNA の変化 (図5) および miR-185 の機能解析と予後予測マーカーとしての有用性 (図6) に関しては Oncology Letters 誌に掲載された (Maiyulan A, Matsumoto Y et al. Oncol Lett. 2024)。この結果は、腫瘍微小環境により変化するエクソソーム内包物がマーカーとなるとともに腫瘍進展への機能を有することを示すものである。

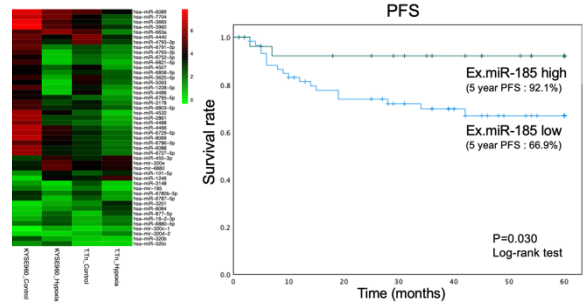


図5

図6

(5) 血中 sPD-L1 と胃癌悪液質の解析

胃癌悪液質と血中 sPD-L1 の関連については、血中高値が低栄養、慢性炎症、貧血、低体重の度合いを反映し (図7)、胃癌の根治切除後の生存にも関わることを示し (図8)、この結果は論文発表した (Matsumoto Y et al. Mol Clin Oncol. 2023)

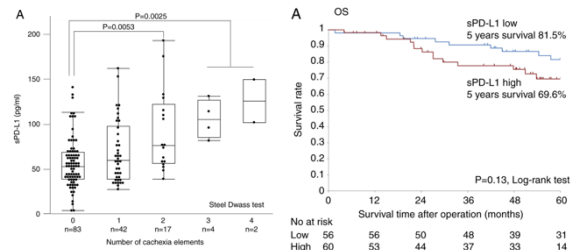


図7

図8

(6) 患者組織由来癌モデル (PDX) の作成

切除した患者組織マウスモデルの作成は継続し、胃癌・食道胃接合部癌・小腸癌を含めて7例のPDX樹立を行った。PDXから細胞株を樹立しin vitro解析に繋げる予定であったが胃癌に関しては樹立困難であった。小腸癌においては1例でPDX由来細胞株SiCry-15Xを樹立し (図9)、胃癌大腸癌細胞株を含めた薬剤感受性 (IC50) の測定結果 (図10) とともに論文発表を行った (Nishioka Y, Matsumoto Y et al. Oncol Lett. 2024 in press)。

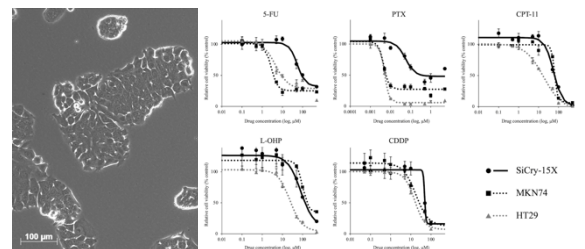


図9

図10

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 Matsumoto Yasunori, Sasaki Takuma, Kano Masayuki, Shiraishi Tadashi, Suito Hiroshi, Murakami Kentaro, Toyozumi Takeshi, Otsuka Ryota, Kinoshita Kazuya, Iida Shinichiro, Morishita Hiroki, Nishioka Yuri, Hayano Koichi, Kurata Yoshihiro, Hayashi Hideki, Matsubara Hisahiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Soluble PD-L1 reflects cachexia status in patients with gastric cancer and is an independent prognostic marker for relapse-free survival after radical surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2023.2635	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 Abula Maiyulan, Yasunori Matsumoto, Huan Wang, Kentaro Murakami, Takeshi Toyozumi, Ryota Otsuka, Tadashi Shiraishi, Kazuya Kinoshita, Jie Hu, Shinichiro Iida, Hiroki Morishita, Tenshi Makiyama, Yuri Nishioka, Masayuki Kano, Hisahiro Matsubara	4. 巻 28
2. 論文標題 Hypoxia regulated exosomal miR-185 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression and predicts prognosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2024.14467	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本泰典、早野康一、蔵田能裕、大塚亮太、丸山哲郎、栃木透、大平学、林秀樹、松原久裕
2. 発表標題 当科におけるアナモレリン使用症例の検討
3. 学会等名 第95回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 松本泰典、早野康一、蔵田能裕、大塚亮太、上里昌也、村上健太郎、豊住武司、中野明、林秀樹、松原久裕
2. 発表標題 胃癌・食道胃接合部腺癌に対する1次治療としてのNivolumab+化学療法の経験
3. 学会等名 第55回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 松本泰典、加野将之、早野康一、水藤広、蔵田能裕、上里昌也、村上健太郎、豊住武司、中野明、大塚亮太、高橋理彦、鎌田敏希、龍崎貴寛、平澤壮一郎、間宮悠、貝沼俊介、林秀樹、松原久裕
2. 発表標題 上部消化管悪性腫瘍に対する遺伝子パネル検査の経験と課題
3. 学会等名 第20回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 松本泰典、豊住武司、木下和也、村上健太郎、大塚亮太、佐々木拓馬、飯田真一郎、森下弘基、松原久裕
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における低酸素環境とエクソソーム
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 松本泰典、豊住武司、木下和也、村上健太郎、加野将之、水藤広、大塚亮太、関野伸史、平澤壮一郎、佐々木拓馬、松原久裕
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における低酸素環境とエクソソーム
3. 学会等名 第31回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2022年～2023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
---------	---------