

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590944

研究課題名(和文)末梢血エクソゾーム内マイクロRNAを用いた消化器癌バイオマーカーの確立と機能解析

研究課題名(英文)Analysis of plasma exosome containing micro RNA in gastrointestinal cancer

研究代表者

馬場 英司 (Baba, Eishi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00315475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト消化器がんの細胞の一部には、自己複製能が高いがん幹細胞が存在する。本研究では、大腸がんの中のEpCAM-high、CD44陽性がん細胞ががん幹細胞性を有しており、これがin vitro培養系で効率よく細胞集塊を形成することを示した。がん細胞とその微小環境を作る細胞との相互作用には、エクソゾームなどを含む可溶性因子が役割を果たしており、この作用により非がん幹細胞ががん幹細胞性を獲得する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human gastrointestinal tumor has cancer stem cell (CSC) population, which possess self-renewing potential. The present study revealed the stemness in the EpCAM-high and CD44-positive human colorectal cancer cells. Only these cells efficiently form sphere in vitro. Soluble factors including exosomes may play an important role in the interaction between colorectal CSCs and the cells forming microenvironment. The present study suggested that these interactions might possibly induce of stemness in non-CSCs.

研究分野：消化器がん、腫瘍内科

キーワード：消化器がん がん幹細胞 エクソゾーム 微小環境 可溶性因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト消化管粘膜上皮細胞を含む多くの細胞から、エクソゾームと呼ばれる小胞がエネルギー依存的に細胞外へ放出される。エクソゾームにはエンドサイトーシス経路にある蛋白が選別されて積み込まれており、これらの蛋白は他の細胞との相互作用が可能である。またエクソゾームは mRNA やマイクロ RNA も含有することが示され、核酸を受け渡しする細胞間相互作用の機能に注目された (Lotvall, Nat Cell Biol 2007)。しかしヒト生体内でエクソゾームの担う機能は未知の部分が多かった。消化器がん細胞が産生するエクソゾームの生体内機能の解明は意義深いものと考えられ本研究計画が開始された。

(2) 細胞から産生される小胞はエクソゾーム以外にも複数存在しており、それぞれ異なった構造と産生機序を有する。近年、これらを総じて「microvesicle (小胞)」と呼ばれるようになり、その生体内機能の解析が進められてきた (D'Souza-Schorey, Genes Dev 2012)。そして消化器がん細胞が産生する小胞の生体内機能として、がんの微小環境との相互作用に働いていることが強く示唆された。特に近年、消化器がん幹細胞と、ニッチと呼ばれる微小環境を形成する細胞との相互作用が、がん幹細胞としての特性を維持する上で必須と考えられるようになった。

一般にがん幹細胞は、腫瘍塊を形成する不均一な腫瘍細胞集団の中で、自己複製能と免疫不全マウスへの移植による造腫瘍形成能を持つごく一部の細胞集団と定義されている。大腸癌など消化器がん幹細胞の存在は以前より示唆され、世界中で研究が精力的に進められている。しかし本研究計画期間中においても、消化器がん幹細胞の分子生物学的な定義、細胞の特性、そしてニッチ細胞との相互作用の詳細は未だ明らかでなかった。そのため、本研究計画を遂行するにあたり、消化器がん幹細胞における細胞間相互作用を解明するための実験系の樹立も必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

消化器がん細胞が産生するエクソゾームなどの小胞は多彩な分子を含有しており、その生物活性が観察されている。しかしこれらのヒト生体内で果たす機能は不明である。本研究では、消化器がん細胞由来の小胞が、消化器がん幹細胞と、その微小環境を形成するニッチ細胞との相互作用における働きを解析し、がん細胞由来小胞の生体内機能を明らかにすることを目的とする。そしてこの知見を基に、消化器癌の病態のより深い理解を得て、診断、治療に役立てることを目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) エクソゾームの精製、解析

ヒト消化器がん細胞は、超遠心にて牛由来エ

クソゾームを除去した牛胎児血清を含む RPMI 培地や無血清培地を用い、適宜サイトカイン等を添加して培養した。細胞培養上清およびヒト血清より、シヨ糖密度勾配遠心法、エクソゾーム表面上膜蛋白に対する特異的抗体をコートしたカラム・ビーズ、フィルター、などの方法でエクソゾームの精製を行った。精製エクソゾームの品質評価は、既報通りウエスタンブロット、フローサイトメトリー (FACS) を用いて確認した。血清中エクソゾームの定量には、エクソゾーム表面に存在する膜蛋白を標的としたサンドイッチ ELISA 法を用いた。患者末梢血および手術検体の取得については、全て担当医により十分な説明の上、文書による同意を得た上で採取し、研究計画は九州大学病院の臨床試験倫理審査委員会にて承認された。

(2) 消化器がん手術検体から腫瘍細胞を単離し、特に大腸がんでは EpCAM-high、CD44 陽性およびその他の分子マーカーを指標として FACS (BD FACSAria; BD Bioscienc 社) を用いてソーティングを行い、消化器がん幹細胞の候補細胞集団を調整した。あるいはヒト消化器がん細胞株を対象に同様の手法でソーティングを行い、がん幹細胞性のより強い細胞集団を調整した。これら消化器がん幹細胞の *in vitro* での培養はマトリゲル固相の上に複数の増殖因子を添加した培養液による独自の系の樹立を目指した。これによりがん幹細胞由来のスフェア (球型の細胞塊) 形成を確認した。またがん幹細胞 1000-5000 個/マウス 1 匹程度を用いて、免疫不全マウス (NOD/SCID, BRGS マウス) に皮下移植し造腫瘍能を確認した。免疫不全マウス移植により形成された腫瘍 (異種移植腫瘍) を細切し、細胞単離し、再度マウスに継代移植を行い、造腫瘍能を再確認した。

(3) 消化器がん幹細胞の *in vitro* 培養系により作成されたスフェアは、経時的に顕微鏡下に個数、大きさを測定した。スフェア構成細胞の解析には、細胞を単離して FACS による測定、蛍光プローブによる免疫組織学的検査を行った。さらに単離された細胞の遺伝子発現プロファイルを解析する目的で、単一細胞 RT-PCR 測定を行った。消化器がん幹細胞と、ニッチ細胞の相互作用を再構築する実験として、エクソゾームなどの小胞を含有する癌性腹水や消化器がん細胞培養上清、あるいは可溶性蛋白などをがん幹細胞の *in vitro* 培養系に添加して、形成されたスフェアへの影響を、上記の方法や cDNA アレイ実験により解析した。

## 4. 研究成果

(1) 消化器がん細胞由来エクソゾームの調整と解析

本研究により、患者血清中エクソゾームを効

率良く検出、調整する手法を確立し、その中のがん細胞由来エクソゾームが特異的に含んでいるマイクロ RNA (あるいは他の核酸) の同定を試みた。健常人に比べ大腸がん患者群において血清エクソゾーム中の含有量の多いマイクロ RNA を選別するために、マイクロ RNA アレイを用いて測定し、これまで miR-182 などを同定した (論文投稿準備中)。この手法では血清エクソゾーム全体を解析するため、がん細胞が特異的に産生したエクソゾームを直接評価することは困難と考えられた。また複数の RNA が候補となるため多数の検体を用いた確認が今後も必要である。そのため血清中のがん細胞由来エクソゾームのみ測定する方法として、HLA class I と EpCAM に対する単クローン抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を確立し、上皮系がん細胞株が培養液中に放出したエクソゾームの定量性を確認した (未発表データ)。患者と健常人血清を用いた比較検討は今後行う予定である。がん細胞由来エクソゾームの表面マーカー分子が同定されれば、特異的 RNA の同定が可能となると考えられる。

## (2) 大腸がん幹細胞と微小環境細胞の相互作用

がん幹細胞と微小環境を形成するニッチ細胞との相互作用の場、がん細胞由来エクソゾームなどの小胞が機能すると考えられる。大腸がんにおいても未だがん幹細胞を明確に選別できる表面マーカーは確立されていない。本研究ではまず研究対象としての大腸がん幹細胞を臨床検体より調整し、その生物学的特性の解明に取り組んだ。

これまで大腸がんにおいて報告されてきた CD44 陽性、EpCAM-high のがん幹細胞指標を用いて、大腸がん手術検体より FACS ソーティングを用いてがん幹細胞を回収した。これを免疫不全マウス (NOD/SCID, BRGS) に移植して連続的な造腫瘍能を確認した。その結果、CD44 陽性がん幹細胞を移植すると腫瘍形成が見られ、その腫瘍組織には CD44 陽性のがん幹細胞集団と、CD44 陰性の非がん幹細胞集団が見いだされた。また CD44 陰性のがん細胞を移植してもマウスには生着しなかった。以上から CD44 陽性 EpCAM-high がん細胞集団はがん幹細胞を含むと考えられた。

がん幹細胞をより精密に同定するマーカーを見出すため、CD44 陽性、EpCAM-high の大腸がん幹細胞をさらに E-cadherin 発現量で分類して幹細胞性を比較したところ、E-cadherin 陽性、陰性の大腸がん幹細胞はいずれも免疫不全マウスにおいて造腫瘍能を示し、両群間に有意な差は認めなかった。一方、E-cadherin 陽性群のがん細胞増殖能は高い傾向にあった。

微小環境との相互作用の解析のために in vitro 培養系を確立し、大腸がん幹細胞由来のスフェア形成を観察した。手術検体から調整した CD44 陰性の大腸がん細胞では、スフ

ェア形成は認めないが、CD44 陽性がん幹細胞からは約 1 週間の培養で明らかなスフェア形成を認めた。スフェアを構成する細胞を FACS および蛍光免疫組織学的検査で観察すると、CD44 陽性 EpCAM-high がん幹細胞と、CD44 陰性の非がん幹細胞の存在が認められた。同じく、がん性腹水から分離した CD44 陽性がん幹細胞を用いた測定でも同様の結果が観察された。以上から今回樹立した in vitro 培養系におけるスフェア形成は、がん幹細胞性の測定に資するものと考えられた。この培養系を用いて非がん幹細胞に、がん細胞およびニッチ細胞由来小胞を含むがん性腹水を添加、あるいは様々な可溶性因子 (TGF-beta 等) を添加してその形質の変化を測定した。その結果、CD44 陰性がん細胞の一部は CD44 陽性となり、スフェア形成能の獲得が観察された。従ってエクソゾームなどの小胞を含む微小環境からの可溶性因子は、非がん幹細胞に幹細胞性を付与する可能性が示唆された。スフェア構成細胞を単一化し、単一細胞 PCR を行い、それぞれの細胞における特定の遺伝子発現パターン (上皮間葉転換関連遺伝子、ES 細胞関連遺伝子など) を現在も解析を継続している。

## (3) 今後の展望

本研究により、ヒト臨床検体より大腸がん幹細胞を調整し、免疫不全マウスへの移植による幹細胞性の確認、および in vitro 培養系におけるスフェア形成が可能となった。これにより、大腸がん幹細胞とニッチ細胞の相互作用、特に可溶性因子によるがん幹細胞の可塑性の制御についての解析が in vitro の系で可能となった。この可溶性因子にはサイトカインなどと共に、本研究対象であるエクソゾームなどの小胞も含まれており、特異的な役割を果たすことが示唆される。本研究の成果は、大腸がんの成り立ちを解明する基盤を提供し、将来の有効な診断、治療法開発に貢献するものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Nihiro H (1 番目), Baba E (12 番目), Akashi K (16 番目), et al (全 16 名). CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2263-73. doi:10.1182/blood-2011-04-351965. (査読有)

2. Baba E, Kusaba H, Nakano S (全 3 名). Development trends for therapeutic antibody. *Nihon Rinsho*. 2012 Dec;70(12):2098-103. (査読無)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2325>

9380

3. Baba E (7 番目), Akashi K (9 番目), et al (全 9 名). Human Nanog pseudogene8 promotes the proliferation of gastrointestinal cancer cells. Exp Cell Res.2012 Sep 10;318(15):1799-807. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.04.011. (査読有)

4. 中野倫孝, 馬場英司, 赤司浩一 (全 3 名) がん幹細胞における治療抵抗性克服 日本臨床 2014. 71:51-55. (査読無)

5. Baba E, Akashi K (全 2 名). The fundamental concept of cancer stem cell and the progress in cancer stem cell research. Nihon Rinsho.2015 May;73(5):721-5. (査読無)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985621>

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Tamura S, Baba E, Akashi K, et al. Both E-Cadherin-positive and negative cells of colorectal cancer stem cell population possess tumor initiating potential. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2012/9/19-9/21. Sapporo, Japan.

2. Nakano M, Baba E, Akashi K, et al. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition: evidences from an ex vivo culture. American Association for Cancer Research (AACR) 2014. 2014/4/7. San Diego, USA.

3. Nakano M, Baba E, Akashi K, et al. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition: evidences from an ex vivo culture. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2014/9/25-9/27. Yokohama, Japan

4. Nakano M, Baba E, Akashi K, et al. Plasticity of CD44+ colorectal cancer stem cells depend on TGF-beta-induced epithelial mesenchymal transition: evidences from an ex vivo culture. American Association for Cancer Research (AACR) 2015. 2014/4/20. Philadelphia, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

馬場 英司 (BABA, Eishi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 00315475

(2)研究分担者

新納 宏昭 (NIIRO, Hiroaki)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号: 20380636

赤司浩一 (AKASHI, Koichi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 80380385

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし