

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591942

研究課題名(和文)食道癌化学療法耐性におけるエクソソームの機能解明

研究課題名(英文)The role of cancer-related exosome on chemoresistance in esophageal cancer

研究代表者

宮田 博志(Miyata, Hiroshi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：80362713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床サンプルを用いた実験より、血中miR-27レベル高値のレベルが、食道癌に対する化学療法耐性に関連していることを見出した。さらに細胞実験より、食道癌が分泌するmiR-27が癌微小環境においてfibroblastをcancer-associated fibroblast(CAF)に形質転換させること、そしてCAFがTGF- $\beta$ を分泌し化学療法耐性が誘導されるメカニズムを解明した。この食道癌から分泌されるmiR-27はエクソソーム内に含有されていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our results suggested that miR-27 is involved in resistance to chemotherapy in esophageal cancer, through miR-27-induced transformation of normal fibroblast into cancer-associated fibroblasts(CAFs), and that TGF- $\beta$  secreted from these CAF-like fibroblasts induces chemoresistance to cisplatin in esophageal cancer. Based on these results, we believe that miR-27, which can be secreted from esophageal cancer with being contained in exosome, is a potential therapeutic target for esophageal cancer treated with anticancer drugs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：エクソソーム マイクロRNA 食道癌 化学療法

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は消化器癌の中でも最も悪性度の高い癌の一つであり、手術単独での成績は十分とはいえ手術に加えて化学療法や化学放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われている。しかし、化学療法を施行しても約半数では治療効果が見られず (Miyata H, Cancer 2009)、食道癌治療成績向上のためには化学療法耐性の克服が不可欠である。

近年、癌細胞を取り巻く微小環境が化学療法耐性に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。つまり治療耐性には癌細胞自身の異常だけでなく癌細胞と宿主側の間質細胞 (tumor-stromal cells; 内皮細胞、筋線維芽細胞、炎症細胞など) との相互作用が重要であることがわかってきた。このような癌と間質の細胞間相互作用を担う物質として、近年注目されているのがエクソソームである。エクソソームは、エンドソームとよばれる一連の膜輸送機構において後期エンドソームが多胞体 (multivesicular body: MVB)へと成熟する際に形成される直径 50 ~ 100nm の腔内脂質小胞であり、MVB が細胞膜と融合することによって細胞外へ放出される。エクソソームは癌細胞や免疫細胞などのさまざまな細胞から分泌され、血液、尿、羊水、唾液などの体液に含まれていることが示されている。最近、このエクソソーム内に microRNA が存在し、それが細胞間で伝播する可能性が示唆された (Valadi H; Nature Cell Biol 2007)。つまりエクソソーム内に含まれる microRNA が細胞間のコミュニケーションツールとして機能する可能性が示された。

### 2. 研究の目的

本研究では、『エクソソーム内の miRNA が癌と間質の相互作用のコミュニケーションツールとして機能することで化学療法耐性に関与することを明らかにし、それを標的とした治療につなげる』ことを目的とした。具体的には、以下のことを明らかにする。

(1) エクソソーム内の miRNA が食道癌化学

### 療法耐性に関与すること

われわれはすでに食道癌における mir200c 発現が化学療法耐性に関与すること、治療前生検サンプル内の let-7c 発現により食道癌化学療法感受性を予測できること (in submission) を見出している。今回は、食道癌患者の血中エクソソーム内の miRNA 発現が化学療法感受性・耐性に関与することを証明する。

(2) 化学療法においてエクソソームを介して miRNA が直接、腫瘍間質に作用すること(エクソソームの間質への直接的作用)

化学療法耐性において癌と間質の相互作用が重要であることが明らかにされつつある。癌細胞から放出されたエクソソーム内の miRNA と間質との direct interaction によって間質から soluble factor (IL-6 や SDF-1 など) が放出され、治療耐性が誘導されることを証明する。

### 3. 研究の方法

(1) 食道癌患者における血中 miRNA と化学療法耐性の関連の検討

食道癌化学療法施行患者の血液サンプルより miRNA を抽出し、miRNA 発現レベルと化学療法の効果との関連を検討する。調べる miRNA は、化学療法非奏効例の血中サンプルより miRNA アレイを行い、候補の抽出を行う。

(2) miRNA が腫瘍間質に作用して化学療法耐性に関与するメカニズムの解明

食道癌細胞株と fibroblast を共培養して、シスプラチン暴露を行いシスプラチン感受性を調べる。食道癌細胞株で標的 miRNA をノックダウンして感受性の変化を調べる。

### 4. 研究成果

(1) 食道癌化学療法患者における血中マイクロRNAの網羅的発現解析

食道癌術前化学療法10例(奏効例5例、非奏効例5例)の治療前の血液サンプルを用いて血中

マイクロRNAの網羅的発現解析を施行した。化学療法の奏効例・非奏効例で共通して発現変化を認めるマイクロRNAを22個抽出し、化学療法感受性に関与する血中マイクロRNAの候補として同定した(up: 13個、down: 9個)。(2) 食道癌における化学療法感受性マーカーとしての血中マイクロRNAの同定  
上記(1)で同定した血中マイクロRNAが食道癌化学療法感受性に関係するかどうかを調べるために、食道癌術前化学療法症例68例の治療前血液サンプルを用いて、上記マイクロRNAの発現をreal-time RT-PCRにより定量し、化学療法効果との相関を調べた。22のマイクロRNAのうち血中miR-27a, miR-27bの高発現症例では化学療法の効果が有意に低く、血中miR-27a, miR-27b発現と化学療法効果に有意な相関を認めた。また、血中miR-27a, miR-27b高発現症例は有意に予後不良であり、血中miR-27a, miR-27bは食道癌術前化学療法患者における予後マーカーとして有用であることが示唆された。また食道癌患者70例および健康者27例の血中miR-27a, miR-27bの発現を検討したところ、食道癌患者で血中miR-27a, miR-27bは有意に高値を示した。

### (3)miR-27 を介した食道癌化学療法耐性メカニズムの解明

miR-27の食道癌細胞に対する直接的作用  
食道癌細胞株においてmiR-27をsiRNAにてノックダウンして、シスプラチンに対する感受性をMTTアッセイとアポトーシスアッセイを用いて検討したが、いずれにおいてもコントロール群と比べてシスプラチン感受性に差を認めなかった。この結果より、miR-27の化学療法耐性に寄与するメカニズムは癌細胞への直接的作用ではないことが示唆された。

miR-27の食道癌細胞に対する間接的作用  
fibroblastにmiR-27を導入するとα-SMAを発現するようになり、fibroblastが

cancer-associated fibroblast (CAF) 様に変化することが確認された。またmiR-27を導入したfibroblastの培養上清を食道癌細胞にふりかけると、コントロール群に比べて食道癌細胞のシスプラチン感受性が低下した。またmiR-27をノックダウンした食道癌細胞をfibroblastと共培養すると、コントロールに比べてシスプラチン感受性が低下した。これらの結果より食道癌細胞から分泌されたmiR-27が腫瘍間質のfibroblastに作用してCAF様に変化させることで、食道癌化学療法耐性に関与することが示唆された。

次にmiR-27を介してfibroblastがCAF様に変化することで、分泌される因子(サイトカイン)を検討した。miR-27を導入したfibroblastではCAFと同様に培養上清中のHGFとTGF-βが上昇した。一方、培養上清中のIL-6は変化しなかった。次にHGFとTGF-βのどちらがmiR-27を介した化療耐性に関与する因子であるか検討を行った。miR-27を導入したfibroblastと食道癌細胞株TE10の共培養下に、シスプラチン暴露させ、HGFとTGF-βの中和抗体を投与してアポトーシス細胞数の変化を調べた。その結果、TGF-βの中和抗体投与によりアポトーシス細胞が増加した。以上より、食道癌細胞から分泌されたmiR-27がfibroblastをCAF様に変化させることで、TGF-βが分泌され、化療耐性を引き起こすメカニズムが示された。

## 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 1件)

Tanaka K, Miyata H, et al. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis* 2015 in press.

[学会発表](計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 博志 (MIYATA Hiroshi)  
大阪府立成人病センター 消化器外科  
副部長  
研究者番号：80362713

### (2) 研究分担者

杉村 啓二郎 (SUGIMURA Keijiro)  
大阪府立成人病センター 消化器外科  
医長  
研究者番号：00571374

山崎 誠 (YAMASAKI Makoto)  
大阪大学大学院 消化器外科 助教  
研究者番号：50444518

高橋 剛 (TAKAHASHI Tsuyoshi)  
大阪大学大学院 消化器外科 助教  
研究者番号：50452389

田中 晃司 (TANAKA Koji)  
大阪大学医学部附属病院 大学院生  
研究者番号：70621019

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：