

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：23903
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2017
課題番号：26460476
研究課題名(和文)エクソソームの膵癌間質形成における役割

研究課題名(英文)Role of exosome on pancreatic desmoplasia

研究代表者

深町 勝巳 (Fukamachi, Katsumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90381798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は間質の豊富な予後不良な難治癌である。細胞から放出されるエクソソームは、細胞間相互作用において役割をもっていることが明らかにされてきている。膵管がんを発生させたラットにおいてコントロールラットと比較して膵管がん組織と血清中では異なるmiRNAの発現様式を示したことから、がん組織がある種のmiRNAを選別してエクソソームへと誘導し、能動的に細胞外へ分泌していると考えられた。これらmiRNAを含むエクソソームが癌間質相互作用に関与していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma is an extremely stroma-rich and highly aggressive solid tumor. The finding that exosomes contain proteins, nucleic acids suggests a role as mediators in cell-to-cell communication. The some of sorted miRNAs were packaged into exosomes, since the miRNA profiles in serum differ from those of the cancer tissues in rat pancreas cancer. It is suggested that exosomes and sorted miRNAs manipulate the cells in their microenvironment.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は固形癌の中でも突出して間質の多い予後不良な難治がんである。腫瘍形成には、腫瘍を形成する上皮細胞の存在と同時に癌細胞の微小環境を規定する間質細胞が極めて重要である。正常間質と癌間質ではその性格が変化していることが知られてきており、癌間質は癌細胞から何らかの影響を受け、癌の生育し易い環境を作りだしていると考えられる。癌間質は線維芽細胞、炎症細胞、腫瘍血管、さらに細胞外マトリックスによって構成される。癌間質の構造は癌細胞によって積極的に構築され、様々な側面からの癌の進展(増殖・生存・浸潤・転移)を促進させる。多くの分泌タンパク質が腫瘍間質相互作用に関与していることが知られているが、腫瘍細胞と間質細胞間での相互作用は複雑であり、その発現制御機構を含め癌間質形成の詳細は不明な点が多い。膵癌と間質の相互作用を規定する機構解明が膵癌の発生機序の解明ならびに診断や治療の発展に寄与すると期待される。

我々は Cre/loxP システムを用いたヒト活性型 KRAS コンディショナルトランスジェニックラットの膵臓に Cre recombinase を発現させることにより膵管癌を発生させる方法を開発した。発生する膵病変はいずれも膵管の形質をもち、腺房の形質は全く示さない。また、腺房細胞特異的に活性型 RAS を発現させても腫瘍性病変は発生しない。したがって、このモデルでは膵管由来の膵管癌が発生することが示されている。さらに、発生する膵管癌はヒトと同様に間質が豊富でありヒトに極めて類似した組織像を示す。本膵癌モデルラットはヒト膵癌に類似した発生、病理学的形質を示すため膵癌の発生機序解明に有用である。

2. 研究の目的

エクソソームは、エンドサイトーシスの膜輸送機構において、後期エンドソームが多胞体へと成熟する際に腔内小胞として形成され、細胞膜と融合することによって細胞外へと放出される膜小胞体である。エクソソームは体中のあらゆる細胞から分泌される。エクソソームは脂質二重膜小胞であり、その内部にタンパク質や miRNA、mRNA などの核酸を内包している。膜にもタンパク質が存在しており、エクソソームには多種多様なタンパク質や核酸が存在する。また、細胞の種類や置かれている状況や環境によって、分泌されるエクソソームの内包物は異なることが報告されている。

細胞から放出されるエクソソームは細胞間相互作用の役割をもっていることが明らかにされてきている。ある細胞から放出されたエクソソームは、他の細胞に取り込ませることにより、エクソソームの内包する情報を伝達できる能力を有している。エクソソーム

に内包される小分子 RNA である miRNA は標的となる複数の遺伝子を制御している。エクソソームに含まれる miRNA は、エクソソームを分泌した細胞により異なり、癌細胞から分泌されたエクソソームは癌細胞に特異的な miRNA を内包していると考えられている。この癌細胞から分泌されたエクソソームが癌細胞の成育しやすい環境を作り出している可能性が考えられる。

以上のことから、エクソソームを介した膵癌間質相互作用への可能性を探り、膵癌の診断や治療へと応用できるか検討を行った。

3. 研究の方法

ラット膵癌の発生

Cre リコンビナーゼ発現アデノウイルスを HEK293 細胞に感染させて、アデノウイルスを増幅し精製した。精製したアデノウイルス (4×10^9 ifu/ml) を KRAS トランスジェニックラットの膵管内に注入することによって膵管癌を発生させた。

病理解析

採取した組織は、ホルマリンまたはパラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋した。薄切した組織切片は HE 染色を行った。

RNA 抽出

ISOGEN (日本ジーン) を用いて膵組織より total RNA を抽出した。miRvana PARIS キット (Applied Biosystems) を用いて血清より total RNA を抽出した。

マイクロアレイ解析

膵組織および血清から抽出した total RNA を用いて、ラット miRNA マイクロアレイキット (Agilent Technologies) を使用して解析を行った。

4. 研究成果

活性型 KRAS トランスジェニックラットの膵臓に Cre recombinase 発現アデノウイルスを注入し、膵癌を発生させた。発生させた膵癌は間質の豊富な病理学的にヒトに類似した組織像を示した。導入遺伝子の発現は免疫染色により確認した。病理解析の結果、発生した間質の豊富な膵腫瘍において活性型 KRAS の発現は、腫瘍性病変のみにみられ、間質にはみられなかった。したがって、活性型 KRAS を発現する膵管細胞が何らかの因子を放出し間質細胞を誘導することにより周囲の間質環境を作りだしていることが推測された。

エクソソームに内包される小分子 RNA である miRNA は標的となる複数の遺伝子を制御しており、組織内の miRNA 発現レベルと関係しないのが特徴だといわれている。ラット膵管癌モデルにおいて膵管癌により発現変

化する miRNA を同定した。膵癌ラットおよびコントロールラットの膵組織より RNA を抽出し miRNA マイクロアレイ解析を行った。miR-541, miR-369-5p, miR-376a, miR-203 等を含む多くの miRNA が膵組織で発現変化していた。ヒトでも発現がみられる miRNA について、血清中 miRNA 量を定量的 RT-PCR にて定量した。発現が増加していた miRNA の内血清中でも増加していたのは 3 個の miRNA のみで、発現が低下していた miRNA については血清中では変化がみられなかった。以上から、組織中で発現変化していた miRNA の多くは血清中ではその量は変化していないことが明らかとなった。膵管癌組織と血清中では異なる miRNA の発現様式を示したことから、活性型 KRAS を発現した細胞がある種の miRNA を選別してエクソソームへと誘導し、積極的に細胞外へ分泌していると考えられた。したがって、細胞外へ放出されたエクソソームが間質細胞に取り込まれ、癌間質相互作用に関与していると推測した。

エクソソームの外膜には通常の細胞膜とは異なり、セラミドなどの特徴的な脂質成分が含まれていることが報告されている。セラミド合成阻害酵素である中性スフィンゴミエリナーゼ 2 (neutral sphingomyelinase 2, nSMase2) の活性がエクソソームの分泌に重要である。実際に nSMase2 の発現を抑制するとエクソソームの分泌が阻害される。膵癌での nSMase2 の発現を数種類のヒト膵癌細胞株を用いて調べてみたが、発現は確認できなかった。エクソソームの分泌には small GTP 結合タンパクである小胞輸送に重要な Rab ファミリーも関与している。Rab27a と Rab27b については、その発現を抑制するとエクソソームの分泌が抑制されることが報告されている。そこで、ヒト膵癌細胞株における発現を検討すると今回用いた複数の細胞株において Rab27a, Rab27b の発現が確認できた。今回用いた細胞株においては、膵癌では nSMase2 ではなく Rab27 が分泌に関与していると考えられた。

膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) であるグリピカン 1 が、癌細胞由来のエクソソームに豊富に存在することが報告された (Nature, 523:177-182, 2015)。膵癌患者の血清中においてもグリピカン 1 陽性のエクソソームが検出され、健常者や慢性膵炎の良性膵疾患患者との比較により、早期の膵癌患者も識別可能であることが示されている。さらに、グリピカン 1 陽性エクソソームには膵臓癌に特徴的な KRAS 遺伝子変異をもつ mRNA が検出されている。これらのことから、グリピカン 1 陽性エクソソームが膵臓癌の感度、特異度の高い血清診断マーカーとなることが期待されている。この報告を確認するため、活性型 KRAS コンディショナルトランスジェニックラットに発生させた膵癌において、RT-PCR によりグリピカン 1 の遺伝子発現量を検討した。その結果、我々のラット

膵管癌モデルにおいてもグリピカン 1 が高発現していることが確認できた。したがって、グリピカン 1 陽性のエクソソームは有力な膵癌の早期診断マーカーとなることが期待される。

以上より、膵癌組織と血清中では異なった miRNA 発現様式を示したことから、これら miRNA が膵癌で産生され選別を受けエクソソームに誘導し積極的に細胞外に放出されていると考えられた。これら細胞外に放出されたエクソソームの間質形成への関与が示唆された。また、細胞外に放出されたエクソソームは血液中にも移行すると考えられることから、新たな診断マーカーとなることが期待される。

腫瘍間質は癌細胞の増殖に極めて重要な働きをもっている。SHH の阻害やビタミン D 受容体の活性化などの種々の方法で間質反応を抑制すると抗癌剤の効果が高まることが報告されている。一方、SHH の欠損により間質反応を抑制したり間質の線維芽細胞を除去すると癌細胞の増殖が亢進することも報告されている。臨床的にも間質反応の強い膵癌患者の方が予後が良いという報告もある。近年まで、癌間質を正常化することができれば、間接的に癌の進展を抑制することが可能と考えられてきた。一方で、腫瘍組織の線維化を減少させることで癌細胞が進展しやすくなることも予想される。いずれにしても癌間質が膵癌の性質に大きく関与しており、癌間質の役割についてはさらなる研究が必要と考えられる。

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 1 件)

Fukamachi K, Iigo M, Hagiwara Y, Shibata K, Futakuchi M, Alexander DB, Hino O, Suzui M, Tsuda H. Rat N-ERC/mesothelin as a marker for *in vivo* screening of drugs against pancreas cancer. PLOS ONE. 9: e111481, 2014. 査読有
doi:10.1371/journal.pone.0111481

[学会発表](計 3 件)

深町 勝巳, 二口 充, 津田 洋幸, 酒々井 眞澄、膵がん血清診断マーカーの探索、第 34 回日本毒性病理学会、2018

Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda, Masumi Suzui、Establishment of serum tumor marker for preclinical trials of rat pancreas cancer model、第 75 回日本癌学会、2016

Katsumi Fukamachi, Setsuko Yabushita,

Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda,
Masumi Suzui, Identification of serum
tumor marker of pancreas cancer by
omics analysis、第 29 回発がん病理研
究会、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深町 勝巳 (FUKAMACHI, Katsumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90381798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

津田 洋幸 (TSUDA, Hiroyuki)

名古屋市立大学・その他部局・教授

研究者番号：30094387