

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462043

研究課題名(和文) 癌細胞由来エクソソームによる腫瘍血管新生および浸潤転移機構の解明

研究課題名(英文) Function analysis of exosome derived from hepatocellular carcinoma cells under hypoxia for tumor angiogenesis, invasion and metastasis

研究代表者

和田 浩志 (Wada, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00572554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝癌細胞株(HuH7、PLC/PRF/5)を通常酸素下および低酸素下で培養し、抽出したエクソソームをヒト血管内皮細胞(HUVECs)に添加すると、低酸素下エクソソーム添加により脈管形成が促進された。低酸素培養下の肝癌細胞由来エクソソーム内ではmiR-155の発現が有意に上昇しており、anti-miR155を導入することで脈管形成能が抑制された。

低酸素環境下での肝癌細胞由来のエクソソームは血管新生促進作用を有しており、特にエクソソーム内のmiR-155が血管新生能に関与しており、治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aim to clarify function of exosomes secreted from hepatocellular carcinoma (HCC) cells under hypoxia to angiogenesis. Two human HCC cell lines (PLC/PRF/5 and HuH7) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used. Exosomes derived from HCC cells were added to HUVECs and we evaluate their angiogenic activity. We also evaluated the expression of miR-155 in the exosomes from 40 patients with HCC. Exosomes under hypoxia remarkably enhanced tube formation of HUVECs, compared with exosomes under normoxia or control. Both cellular and exosomal miR-155 was significantly up-regulated under hypoxic conditions. Knockdown of miR-155 in HCC cells attenuated the promotion of tube formation by exosomes under hypoxia. High expression of exosomal miR-155 was significantly correlated with early recurrence. These results suggest that exosomes derived from HCC cells under hypoxia promotes angiogenesis, and that exosomal miR-155 may be target of molecular therapy for HCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝細胞癌 血管新生 エクソソーム マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎に対するスクリーニング検査による早期発見や、局所焼灼療法や手術手技の向上により、肝細胞癌の治療成績は向上されつつある。しかし、依然として本邦における癌死の第4位である。肝細胞癌は、非常にhypervascularな腫瘍であり、その進展に血管新生が深く関与しており、治療成績向上のためには、肝癌に特異的な血管新生及び浸潤・転移機構を解明する必要がある。

癌の浸潤・転移には、癌細胞の原発巣からの離脱、間質内への浸潤、脈管・基底膜の破壊、脈管内皮への定着、脈管外への浸潤、標的臓器での増殖といった多くのステップが存在し、各過程においてさまざまな分子が関与している。その中で、がん細胞から分泌される因子が肺や肝臓などの転移臓器に、転移しやすい環境（前転移ニッチ：pre-metastatic niche）をつくり、そこに生着することで転移巣を形成することが報告された。この前転移ニッチ形成には、がん細胞由来のVEGF、TNF- α 、TGF- β などの刺激による骨髄由来細胞の転移臓器への誘導と、転移臓器における線維芽細胞や血管内皮細胞でのフィブロネクチンなどの接着因子発現が必要である。

近年、細胞間のシグナル伝達方式としてサイトカインや血管新生因子に加えて、エクソソーム(exosome)と呼ばれる長径30-100nmの小型膜小胞を放出することで、遠く離れた細胞まで情報を伝達していることが報告された。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、分泌細胞由来の膜タンパク質と細胞質成分で構成され、エクソソーム内には、蛋白質、mRNAやmicroRNAなどが含まれており、乳癌においてエクソソーム内のmiR-126が血管内皮細胞の誘導と転移に関わることが報告されている。

そこで、本研究では、肝癌細胞より分泌されるエクソソームが直接的に血管内皮細胞を刺激することで、腫瘍の増大に不可欠な血管新生を促進し、さらに血中に放出されたエクソソームが肝内の血管内皮細胞に作用することで、肝内転移を促進させるといふ仮説をたて、この肝癌特異的なエクソソームの働きを解明し、エクソソーム内に内包される標的分子を同定することを目的とした。

2. 研究の目的

癌の浸潤・転移には、がん細胞から分泌される因子による転移しやすい環境（の形成と血管新生因子が深く関与しているため、新たな細胞間の情報伝達物質であるエクソソームに着目し、肝細胞癌より分泌されるエクソソームが、直接的に腫瘍血管新生を促進するだけでなく、肝内の血管内皮細胞に作用することで、血管新生や前転移ニッチの形成を促進すること検証し、エクソソーム内に含まれるmicroRNAを解析することで、治療標的となりうる分子を同定し、肝癌の新たな治療法の可能性を探求することを目的とした。

ーム内に含まれるmicroRNAを解析することで、治療標的となりうる分子を同定し、肝癌の新たな治療法の可能性を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

1) ヒト肝癌細胞株(HuH7, PLC/PRF/5)を通常酸素下、低酸素下で培養し、各環境下での細胞増殖および、その培養上清からExoQuick-TC[®]を用いて抽出したエクソソームの濃度を測定した。

2) 抽出したエクソソームの濃度を調整し、それぞれの肝癌細胞株に添加した。添加後72時間におけるエクソソーム無添加・通常酸素下エクソソーム添加・低酸素下エクソソーム添加の各群における肝癌細胞の増殖能をMTT法にて比較検討した。

3) 通常酸素下、低酸素下の肝癌細胞から抽出したエクソソームを、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に添加した。エクソソーム無添加(対照群)・通常酸素下エクソソーム添加(Nx群)・低酸素下エクソソーム添加(Hx群)の各群における増殖能と血管新生能をMTT法、Tube formation assayを用いて検討した。

4) PCRにて転移・血管新生に関連するmicroRNAs(miR-21, miR-26a, miR-122, miR-146a, miR-155, miR-182)の発現を、通常酸素下と低酸素下の細胞内およびエクソソーム内で比較検討した。

5) HuH7, PLC/PRF/5にanti-miR155をTransfectionし、エクソソームを抽出し、HUVECに添加してTube formation assayにて血管新生能の変化を評価した。

6) 術前未治療の肝細胞癌切除例40症例の術前血清を用いて、ExoQuick-TCでエクソソームを抽出しPCRにてmiR-155の発現量を定量し、中央値でmiR-155低発現群と高発現群の2群に分類し、臨床病理学的因子および再発率、生存率を比較検討した。

4. 研究成果

1) 低酸素下における肝癌細胞株の増殖能は、通常酸素下と比較して45.9~64.7%減少した。細胞あたりのエクソソーム分泌量は、通常酸素下と比較して低酸素下で有意に増加した。

2) 肝癌細胞株から抽出したエクソソームを、それぞれの細胞に添加したところ、何も添加しない対照群と比較し、いずれの細胞株においても増殖能が54.7~85.9%に抑制された。通常酸素下・低酸素下間で比較すると、細胞増殖は2群間で有意な差を認めなかった。

3) 通常酸素下と比較して、低酸素下エクソ

ソームを添加しても HuVEC の増殖能に有意差を認めなかった。PLC/PRF/5 のエクソソームを用いて Tube formation assay を行い、1 視野あたりの branch point (分枝細胞数) を算出すると、対照群 ($13 \pm 2.3/\text{view-fields}$) と比較し、エクソソーム添加により血管新生が促進され、通常酸素下エクソソーム添加 ($23.5 \pm 5.9/\text{view-fields}$) より、低酸素下エクソソーム ($39.5 \pm 6.0/\text{view-fields}$) の方がより血管新生を促進した ($p < 0.05$)。HuH7 でも同様に低酸素下エクソソーム添加により、tube formation が促進された。

4) 細胞内の miRNA を PCR で測定すると、肝癌細胞株 2 種とも、低酸素培養下で miR-155 の発現が高くなり (HuH7:3.5 倍, PLC:3.1 倍)、またエクソソーム内 miRNA も同様であった (HuH7:1.5 倍, PLC:3.3 倍)。

5) anti-miR155 を導入した低酸素下の肝癌細胞株からエクソソームを抽出し HUVEC に添加すると、mock のエクソソーム添加 (PLC:74.3 \pm 6.8, HuH7:130.6 \pm 11.6) と比較し、anti-miR155 を導入したエクソソーム添加 (PLC:40.6 \pm 10.4, HuH7:98.6 \pm 17.4) では血管新生が抑制された ($p < 0.05$)。

6) miR-155 低発現群、高発現群の 2 群間で、年齢、性別、背景肝疾患、Child-pugh 分類、腫瘍径、腫瘍個数、肉眼的脈管侵襲の有無に有意差を認めなかった。低発現群の 1 年、3 年、5 年無再発生存率は、85.0%、75.0%、69.6% と、高発現群の 65.0%、37.9%、37.9% と比較して有意に良好であった ($p=0.04$)。低発現群の 1 年、3 年、5 年全生存率は、100%、95.0%、95.0% と、高発現群の 100%、78.8%、78.8% と比較して良好であったが、有意差はなかった ($p=0.28$)。

以上の成果により、肝細胞癌から分泌されるエクソソームは低酸素下においてその分泌量が増加し、低酸素下由来エクソソーム内には、miR-155 が多く含有されており、この miR-155 を介して血管内皮細胞の脈管形成能を促進することが証明された。さらに、臨床検体を用いた検討では、術前血清中の miR-155 高発現群は低発現群と比較して有意に再発率が高く、miR-155 高発現が肝細胞癌の転移・再発に関連していることが示唆された。この miR-155 を標的とした治療ないしは、miR-155 の標的となる分子の同定により、肝細胞癌に対する新たな分子標的治療の可能性が示された。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

松浦雄祐, 和田浩志ほか. 低酸素培養下での肝癌細胞由来エクソソームが血管新生に与える影響の検討. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 (平成 28 年 4 月 16 日, 大阪)

松浦雄祐, 和田浩志ほか. 低酸素下肝癌細胞由来エクソソームの血管新生能と内包する microRNA に関する検討. 第 52 回日本肝臓学会総会 (平成 28 年 5 月 19 日, 千葉)

松浦雄祐, 和田浩志ほか. 低酸素下肝癌細胞由来エクソソームが血管新生に与える影響. 第 71 回日本消化器外科学会総会 (平成 28 年 7 月 14 日, 徳島)

松浦雄祐, 和田浩志ほか. 低酸素下肝癌細胞由来エクソソーム内 miRNA の検討. 第 29 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (平成 28 年 12 月 1 日, 久留米)

松浦雄祐, 和田浩志ほか. 肝癌細胞由来エクソソームの腫瘍細胞増殖に与える影響の検討. 第 51 回日本肝臓学会総会 (平成 27 年 5 月 22 日, 熊本)

松浦雄祐, 和田浩志ほか. 低酸素肝癌細胞由来エクソソームが腫瘍細胞に与える影響の検討. 第 70 回日本消化器外科学会総会 (平成 27 年 7 月 16 日, 浜松)

[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:
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

和田 浩志 (WADA, Hiroshi)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 00572554

(2) 研究分担者

永野 浩昭 (NAGANO, Hiroaki)
山口大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10294050

小林 省吾 (KOBAYASHI, Shogo)
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消化器外科・副部長
研究者番号：30452436

富丸 慶人 (TOMIMARU, Yoshito)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70528570

江口 英利 (EGUCHI, Hidetoshi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90542118

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()