

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462541

研究課題名(和文) 卵巣癌分泌エキソソームによる癌微小環境制御機構の解明と次世代がん治療法の開発

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism in cancer microenvironment by ovarian cancer secretion exosome and the development of a next-generation cancer therapy by the exosome.

研究代表者

佐々木 浩 (SASAKI, HIROSHI)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：80432491

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)：卵巣癌より分泌される脂質二重膜で覆われた細胞外顆粒・エキソソーム内には、癌自身の進展に好都合な情報伝達ツールとしてのmicro RNAや小分子タンパクが含まれていることから、ニッチ制御関連小分子の同定と機能解析を行った。卵巣癌患者の腹水および卵巣静脈血清からエキソソームを単離し、エキソソームからmicroRNAを抽出しmir-34aが上皮間葉転換(EMT)に関連している可能性が示唆された。また卵巣がん患者におけるEMT関連蛋白であるCD24が卵巣がんの予後予測マーカーになることがわかり、同時にその分子メカニズムにおいてAktおよびMAP kinaseを介することを解明し結果を報告した。

研究成果の概要(英文)：There are micro RNA and the small molecule protein as a convenient communication of information tool in the extracellular vesicles and exosome covered by the lipid bilayer membrane secreted from an ovarian cancer. We isolated exosome from the ovarian cancer patient's ascites and ovarian-veins serum, and extracted microRNA from exosome. Mir-34a related to the EpithelialMesenchymal Transition(EMT). Moreover, the expression of CD24 which is the EMT related protein in ovarian cancer is prognosis prediction marker for ovarian cancer patients.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：エキソソーム 卵巣癌 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中でも浸潤・転移を伴うことが多く生存率の最も低い婦人科癌であり進行期症例では完治が難しい。その一つの問題として白金耐性卵巣癌の存在である。我々は従来より卵巣癌において白金耐性のメカニズムに注目し、Akt kinase、その下流にあるNFκBおよびMAP kinase が薬剤耐性や癌の浸潤・転移に関与することを解明した。さらに、それらを抑制すると耐性が解除され白金感受性が増強することにより治療効果が上がることを *in vitro* および *in vivo* において明らかにしてきた。また、卵巣癌における独立した予後因子としてAktのリン酸化が重要であることを臨床病理学的に明らかにした。次に我々は、癌の浸潤・転移に必要な上皮・間葉形態転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) 現象に着目し、卵巣癌、子宮体癌における転移・浸潤の抑制について検討したところ、膀胱癌や肺癌で予後不良因子として知られている表面マーカーCD24 が卵巣癌においても独立した予後因子となることがわかった。さらに卵巣癌細胞株にCD24 を強制発現させることにより EMT 関連蛋白である snail、Twist が発現し、癌の浸潤・転移が促進された。そのメカニズムを明らかにし、論文投稿中である。現在、CD24 抗体を外郭に結合させ、抗癌剤を内包した高分子ミセルによる drug delivery system (DDS) の開発を行っている。浸潤・転移をまさに起こしている EMT 化癌細胞の制御が今までの主たる治療ターゲットとされてきたが、一方で転移先の足場となる環境、癌微小環境 (ニッチ) をいかにして制御するかが注目されており、近年癌治療ターゲットとしてこのニッチの制御が癌浸潤・転移抑制に重要とされている。ニッチの制御は細胞から分泌された小胞エクソソームが関与していることが明らかになった。エクソソームとは脂質二重膜で形成される細胞外顆粒であり、様々なシグナル伝達物質、mRNA や microRNA といった遺伝子発現調節因子が含まれており、細胞間のコミュニケーションツールとして以前より知られていた。つまり、癌微小環境をエクソソームにより制御できれば、浸潤・転移を防ぐことが可能となり、次世代の治療薬の開発につながる考えた。さらに、従来より正常組織では幹細胞の増殖・分化はニッチという微小環境によって維持されていると考えられている。癌組織においても幹細胞的亜集団が同定されており、この細胞の増殖・分化におけるニッチの役割が重要視されている (Nature 2006 444:827-828)。また、癌細胞から産生される TNF-α、TGFβ、matrix metalloproteinase 9 (MMP9) などのサイトカインは、骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal stem cell) や造

血前駆細胞 (HPC: Hematopoietic progenitor cells) そして血管内皮前駆細胞 (EPC: Endothelial progenitor cell) を骨髄から転移先臓器に誘導し、繊維芽細胞などの間質細胞を活性化させ、フィブロネクチンなどの基質形成を促し、原発巣から誘導された癌細胞が転移先で生着しやすい環境を作っていることが明らかになった (Nat.Rev.Cancer 2009 9:285-93)。近年、悪性黒色腫においてその癌微小環境のコントロールを骨髄細胞が担っていることが報告され、その細胞間・臓器間ネットワークに腫瘍由来のエクソソームが関与していることがわかってきた (Nature medicine 2012 18:853-4)。すなわち、原発巣から分泌されたエクソソームを通じて、骨髄前駆細胞を絶えず教育することによって血管新生、転移先での生着、増殖といった癌微小環境を制御している。しかしながら、卵巣癌におけるエクソソームの動態については未知であり、またエクソソーム内にあるニッチ関連制御因子の発現についてもいまだ解明されていない。そこで我々は卵巣癌細胞から分泌されたエクソソームに含まれる microRNA などのニッチ関連制御因子を同定し、そのメカニズムを解明することにより、卵巣癌の浸潤・転移を予測する新たなバイオマーカーになる可能性があると考えた。また我々のこれまでの検討から明らかとなった悪性度の強い表現型を呈している CD24 陽性細胞を用い、エクソソームおよびエクソソーム内の microRNA がどのように癌微小環境に影響を与え浸潤・転移に関与するのか、そのメカニズムを解明する。さらにエクソソームは血中などでも分解されにくく安定な膜粒子であることから DDS に適している。そこで癌浸潤・転移を抑制する microRNA を内包した人工エクソソームを作製し、さらにエクソソーム表面に予後不良因子マーカーCD24 に特異的に結合する抗体を発現させ、それを投与することにより難治性卵巣癌の浸潤・転移を防ぐことができれば、新たな治療戦略の一つとなりうると考えた。

2. 研究の目的

癌の増殖・浸潤・転移に必要な情報伝達場である癌微小環境 (ニッチ) の制御が、近年新しい癌治療戦略のターゲットとなっている。卵巣癌より分泌される脂質二重膜で覆われた細胞外顆粒・エクソソーム内には、癌自身の進展に好都合な情報伝達ツールとしての micro RNA や小分子タンパクが含まれていることから、ニッチ制御関連小分子の同定と機能解析を行ない、次世代治療薬の開発につながるのが本研究の目的である。これまで癌そのものの制御が、抗癌戦略の主流であった。殺細胞効果の強化を主目的とした治療戦略ではなく、癌微小環境の制御による癌自滅誘導という本研究の概念が独創的である。既存の殺細胞治療

と、本研究の成果として完成されるであろう癌微小環境制御戦略とのコンビネーションにより、抗癌治療効果の強化が期待できる。

3. 研究の方法

卵巣癌分泌エキソソームの単離と特異的 microRNA の同定と in vitro における microRNA の機能解析

(1) 承諾を得た卵巣癌患者および良性腫瘍（子宮筋腫、卵巣嚢腫）患者の血清および腹水を回収し、遠心後の上清に Exoquick(SBI) を加え、エキソソームを抽出する。CD63 ExoELISA Kit® (SBI) を用いてエキソソーム数を測定し、エキソソーム量と進行期、組織型、予後との関連について検討する。さらに単離したエキソソームを SeraMir™ Exosome RNA Amplification(SBI)を用いて microRNA を抽出し、良性腫瘍群を control 群とし TaqMan Array® microRNA Card を用いて microRNA array 解析を行う。解析結果をもとにエキソソーム形成調節因子や、癌微小環境調節因子、増殖因子、浸潤・転移因子に關与する特異的 microRNA を miRNA database を用いて同定し、発現増加群と発現低下群の 2 群に分類する。

(2) 卵巣癌白金製剤感受性細胞株 (A2780) および白金製剤耐性株 (Caov-3, A2780-CP) の培養液上清を回収しエキソソームを Exoquick(SBI)にて単離する。単離したエキソソームから microRNA を同様に抽出し、患者検体から得られた特異的 microRNA との共通因子を絞り込む。

(3) 同定した特異的 microRNA を卵巣癌細胞株にリポフェクション法を用いて細胞内へ導入し、増殖能への影響は MTS assay にて、浸潤・転移能への影響は matrigel 内への invasion assay、scratch assay、および gelatin zymography にて検討する。

(4) さらに、発現増加を認めた microRNA に対する相補的阻害配列を Tough Decoy microRNA-Blocking Expression Vector に組み込み、特異的 microRNA 発現抑制ベクターを作成する。発現低下を認めた microRNA に対しては microRNA Archive Human vector に組み込み、特異的 microRNA 発現増加ベクターを作成する。それらを卵巣癌細胞株へ遺伝子導入し、in vitro における特異的 microRNA の作用を再確認する。

4. 研究成果

卵巣癌より分泌される脂質二重膜で覆われた細胞外顆粒・エキソソーム内には、癌自身の進展に好都合な情報伝達ツールとしての micro RNA や小分子タンパクが含まれていることから、ニッチ制御関連小分子の同定と機能解析を行った。卵巣癌患者の腹水および卵巣静脈血清からエキソソームを単離し、エキソソームから microRNA を抽出し mir-34a が上皮間葉転換 (EMT) に關連している可能性が示唆された。また卵巣がん患者における EMT 関連蛋白である CD24 が卵巣がんの予後予測

マーカーになることがわかり、同時にその分子メカニズムにおいて Akt および MAP kinase を介することを解明し結果を報告した。

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)

Nakamura K, Terai Y, Tanabe A, Ono YJ, Hayashi M, Maeda K, Fujiwara S, Ashihara K, Nakamura M, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Ohmichi M. CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. Oncol Rep. 査読あり、37, 2017 [学会発表](計 3件)

芦原啓允、**佐々木浩**
卵巣がん 新規治療法の探索 シスプラチン内包 CD24 高分子ミセルの開発とマウス難治性卵巣癌モデルへの治療検討
第 67 回日本産科婦人科学術集会
2015 年 4 月 12 日、「パシフィコ横浜神奈川県・横浜」

橋田宗祐、**佐々木浩**
進行卵巣癌での腹腔内生検における細胞表面マーカー CD24 の発現の意義
第 68 回日本産科婦人科学術集会
2016 年 4 月 24 日、「東京国際フォーラム(東京都・東京)」

芦原啓允、**佐々木浩**
難治性卵巣癌モデルマウスに対する CD24 を標的とした高分子ミセルを用いた新規治療
第 69 回日本産科婦人科学術集会
「2017 年 4 月 14 日、広島県立総合体育館(広島県・広島)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 浩 (SASAKI Hiroshi)
大阪医科大学・産婦人科・講師
研究者番号：80432491

(2) 研究分担者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：10283764

寺井 義人 (Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90278531

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40298782

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：70454543

恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：70388255

田中 良道 (Tanaka Yoshimichi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：10625502

藤原 聡枝 (Fujiwara Satoe)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90707960