

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670597

研究課題名(和文) 進行上部消化管癌における血中遊離核酸、エクソソームの解析

研究課題名(英文) Usefulness of exosome quantification as a biomarker for human upper GI cancer

研究代表者

松原 久裕 (Matsubara, Hisahiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20282486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 癌細胞エクソソームの可視化のためCD63とGFPのbinding proteinを発現するウイルスベクターをヒト食道癌株(TE2, T.Tn)に導入し、エクソソームの挙動をイメージングにより解析、細胞間エクソソーム伝達を確認した。この細胞株によりマウスモデルにおけるin vivoでの挙動評価が可能となった。

食道癌切除標本のCD63免疫組織染色により臨床病期・予後との関連につき評価した。CD63は癌部において非癌部に比し濃染し、CD63陽性群では陰性群に比して有意に予後不良であった。血漿中エクソソーム量は健常群ではほぼ一定であるのに対し食道癌患者血漿では健常の2倍以上となる例を認めた。

研究成果の概要(英文)： We assessed the exosome dynamics with mouse model and quantify plasma exosome by cholesteryl ester transfer protein activity, which is known to be enriched within exosomes. We analyzed the relationship between exosome quantification and clinical characters in ESCC patients.

In order to image and analyze the movement of cancer cell-derived exosomes, green fluorescent protein (GFP)-tagged CD63, which is a general marker of exosomes, was expressed in human esophageal squamous cancer cell line TE2. Mouse model of human ESCC were then established by s.c. injection of TE2-CD63-GFP or TE2 cell lines. Our data indicates tumor derived exosome can emitted from the tumor and circulate in the blood flow. Our data indicates the exosome number was higher in ESCC patients than no malignant patients. Although there were no difference in tumor depth, lymph node status, distant metastasis, the exosome number can be a prognostic marker for ESCC (P=0.04).

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 胃癌 エクソソーム CD63

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の予後は手術を中心とした集学的治療の発展に伴い予後の改善を認めてきた。しかし、高度進行症例・再発例の治療にはまだ難渋しており新たな治療法の開発が重要である。今回、がんの浸潤転移に関し、癌がどのような分子機序で獲得しているのか、さらにこの機序解明が新たな分子治療モデルの開発に重要な貢献をすることを期待したことがこの研究計画の発端である。上皮性細胞、線維芽細胞の増殖は通常、細胞外基質に接着して増殖する。この細胞外基質が足場と呼ばれるものであり、この足場に接着せず増殖可能となることが足場非依存性増殖の獲得と呼ばれている。癌細胞はこの能力を有し、当科ではFra-1分子が増殖様式、浸潤、転移に深く関わり EMT に関与することを明らかにしてきた。一方で癌患者における血中遊離核酸、血中エクソソームの研究が進んできており、血中遊離核酸は診断における有用性が報告され、また血中エクソソームに含まれる miRNA が細胞間の分子伝達に重要な役割を担うことが明らかになってきた。癌細胞同志、さらに周囲の間質細胞との細胞間分子輸送が癌の浸潤転移にはきわめて重要であると考えられる。進行癌患者における転移巣において Fra-1 をはじめとした EMT に関連する細胞内での分子のシグナル伝達にこれら血中遊離核酸やエクソソームがどのような役割を果たしているかはきわめて重要な課題である。また、血中遊離核酸と血中のエクソソーム内核酸との関連性も未だ明らかではなく、これらの関係についても明らかにしたい。

この2年間で進行食道癌、胃癌における血中ならびに腹水中の遊離核酸、エクソソーム分子群の同定、次世代シーケンサーによる遺伝子変異の解析、転移診断あるいは治療効果判定のバイオマーカーとしての有用性の検討、これらの分子の制御による治療法の実現を目指す。具体的には実際の食道癌・胃癌患者の血液中の遊離核酸、エクソソームの DNA, miRNA などの解析を行い、これらの候補分子がエクソソームとして培養細胞において分子輸送が行われ、形質転換等実際に生ずるかを検討し、in vitro での効果を明らかにする。血中遊離核酸と血中のエクソソーム内核酸との関係について明らかにする。また、当科で明らかにしてきた Fra-1 関連分子の血中エクソソームでの役割を明らかにする。候補分子に関し、臨床病期、転移部位、治療効果との関連を検討し、バイオマーカーとしての有用性を検討する。

種々のがん細胞における浸潤、転移に関与する遺伝子、分子について種々の分子が報告されているが、足場非依存性増殖能の獲得についての研究は限られており、これらの分子機構が実際の消化器癌においてどのように関与するのかを解析することは極めて意義

のある研究である。現在、注目されている EMT と足場非依存性増殖は密接に関連している。Fra-1 を中心としたヒト食道癌での足場非依存性増殖能の研究は独自性のある研究であり、さらにこの足場非依存性増殖のエピジェネティックな制御に細胞間分子輸送に重要な役割をはたすと考えられるエクソソームの関与を検討する当課題は斬新な提案である。当科ではエピジェネティックな制御をヒストンのアセチル化、miRNA に関し、食道癌で明らかにしてきた。これらの制御とエクソソームとの関係を明らかにすることで卓越した成果が得られると期待できる。

また、食道癌、胃癌での血中遊離核酸による診断、治療効果判定予測はその成果が実際の臨床にきわめて有用性を期待できる。これらの分子が新たなトランスレーショナルリサーチ開発のシーズとなり、極めて意義のある研究となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

予後不良の進行食道癌ならびに胃癌の腹膜播種症例における血中遊離核酸ならびに血中エクソソーム、腹水中のエクソソームを同定し、次世代シーケンサーにより遺伝子変異の解析を行う。遠隔転移の原因を探索し、進行度あるいは抗がん剤、放射線に対する感受性に関するバイオマーカーとしての有用性を検討する。検出した分子から新たな浸潤・転移に関連する分子、がん幹細胞や薬剤への耐性に関連する分子群を同定する。エクソソーム中の miRNA が細胞間の伝達物質となることがすでに報告されており、遠隔転移、薬剤感受性に関与する miRNA の同定、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異の検索により、新たなバイオマーカーの確立、新たな浸潤・転移に関連する分子、がん幹細胞などを標的とした創薬を可能とし、将来的に有望なシーズとなりうる。

足場非依存性増殖関連分子とエクソソームによる細胞間分子輸送との組み合わせによるエピジェネティックな細胞制御は新たな浸潤・転移、EMT に関連する分子、がん幹細胞、薬剤耐性などを標的とした創薬を可能とし、癌克服へ極めて独創的かつ魅力的な研究である。当科では ICG を基本骨格とする「薬剤封入型近赤外蛍光標識リポソーム」を開発しており、分子治療の重要な課題であるドラッグデリバリーシステム(DDS)にも優位性を示す。また、血中遊離核酸、エクソソームのバイオマーカーとしての利用は診断治療上即時にきわめて有用である。

がんの発生過程で重要である足場非依存性増殖の分子機構の解明はいかに癌細胞の増殖・浸潤・転移を制御してその治療をおこなうかという面からも極めて重要な研究である。しかしながら、その詳細なメカニズムについてはまだ不明な点が多く、さらなる解明はがん研究において極めて重要な地位を

占めると考えられる。実際のヒト食道癌細胞での足場非依存性増殖能の獲得に関与する分子機構の解明に関し、Fra-1分子を中心に研究を進めてきた。最近、明らかになってきた血中エクソソームの検討では細胞間の分子輸送の大きな役割を果たしていることが報告されており、このエクソソームが足場非依存性増殖に重要な役割を果たしていることが予想される。当科で研究を進めてきている癌のエピジェネティックな制御に関し、エクソソームの関与を明らかにすることはきわめて意義のある研究である。本研究は新たに血中エクソソームと足場非依存性増殖が癌の浸潤転移にどのように関連しているかを食道癌、胃癌で解明を試みるまさに萌芽的であり、斬新な研究である。がん治療という面からもこのメカニズムの解明は極めて重要な意義のある研究で浸潤・転移に関連する分子のみならず、現在がん幹細胞が注目を浴びているがそのメカニズムに関与する EMTにも重要な役割果たすと考えられる。

また最近、診断に有用であると報告される血中遊離核酸の食道癌、胃癌での病期・転移診断における有用性を明らかにすることも新規性が高い。さらに血中遊離核酸と血中エクソソームの関連性を明らかにした報告はなく、きわめて斬新であり有意義な研究であると考えられる。さらに胃癌腹水中のエクソソームの検討は斬新であり、チャレンジ性を有している。

3. 研究の方法

(1) 食道癌・胃癌患者における血中エクソソームの分子解析。

各患者より採取した血液よりエクソソームを分離し、DNA, miRNA, ncRNA, 小分子などの解析を行う。

(2) 血中エクソソームの miRNA の同定、解析。

分離したエクソソームから miRNA を回収し、これまで当科でエピジェネティック制御に関連すると報告してきたヒストンのアセチル化や miRNA 各分子との関連を解析。

(3) 同定された miRNA の食道癌培養細胞株における細胞内エピジェネティック制御の検討。

同定された miRNA の細胞内におけるシグナル伝達に関し、EMT に関連する Fra-1 を中心に解析する。

(4) 同定されたエクソソームの食道癌培養細胞株における分子輸送への関与 (in vitro) の検討。

各患者より採取した血液より分離したエクソソームによる食道癌培養細胞への分子輸送に関する事象を解析する。

(5) 同定された分子と病期・転移との関連性における臨床病理学敵検討。

臨床における病期ならびに抗がん剤、放射線などの治療感受性の検討。これまで当科にて治療された食道癌、胃癌患者で採取、保存された検体における予後に関する後ろ向き解析をおこなう。

4. 研究成果

・ 食道扁平上皮癌細胞株からのエクソソーム放出の評価 (in vitro)

食道扁平上皮癌細胞株からのエクソソーム抽出、EXOCET Exosome Quantification Kit によりエクソソーム量を定量した。

食道扁平上皮癌細胞株において、エクソソーム放出能が細胞株毎に異なることが明らかとなった。各種細胞株中のエクソソームマーカーとして知られる CD63, CD9, CD81 発現とエクソソーム放出量の関連を評価した。3種の分子すべてにおいてエクソソームマーカーの細胞内での発現はエクソソーム放出能と正の相関を認めなかった。

・ 癌細胞エクソソームの可視化のため、エクソソームマーカーである CD63 と GFP の binding protein を発現するウイルスベクターをヒト食道癌株 (TE2, T.Tn) に導入した。同細胞株を用いてエクソソームの挙動を in vivo, in vitro でイメージングし解析した。CD63-GFP の導入されたヒト食道癌細胞株の樹立に成功し、蛍光標識されたエクソソームを抽出し、癌細胞間においてエクソソームが伝達されることを確認した。

また、伝達した癌由来エクソソームは伝搬された食道癌細胞の増殖能を低下させ、遊走能を上昇させた。

・ ノードマウス (BALB/c Slc-nu/nu, 6 週齢, メス) 皮下に TE2 (n=4) or TE2 CD63-GFP (n=4) 1×10^7 cells/100 μ IPBS を注入 8 週後に腫瘍、血漿、肝臓、脾臓、肺、腫瘍を摘出し、血漿はエクソソーム抽出の後蛍光イメージングを行い、摘出臓器は凍結切片を作成、蛍光イメージング、固定標本の免疫染色 (anti-humanCD63, anti-GFP) を行った。CD63-GFP 発現腫瘍モデル中の血漿に、GFP 陽性の小粒子を確認し、腫瘍由来のエクソソームは血中に遊離されることを明らかにした。また in vivo でのエクソソームの各臓器における挙動評価が可能となった。

・ 胃癌および食道癌の手術標本の免疫染色を行い、特に CD63 に関しては胃癌・食道癌双方における癌部での発現を確認した。食道扁平上皮癌切除標本における CD63 発現の解析では切除標本における CD63 免疫組織染色では癌部が非癌部に比して濃染した。CD63 発現と臨床病期・予後との関連については各臨床病理学的諸因子との関連は認めなかったが、CD63 陽性群では陰性群に比して有意差をもって予後不良であることが明らかになった。

・当科にて凍結保存した食道癌、胃癌患者血清、血漿および胃癌患者腹水、胃癌手術時腹腔内洗浄液からのエクソソーム抽出を試み、清および血漿においては検体により十分な量のエクソソームの抽出が可能であることを明らかにした。さらにマイクロRNAの検出もRT-PCR法にて確認した。胃癌手術時腹腔内洗浄液に対するエクソソーム抽出ならびに解析のため同検体の手術時における採取を行い、約30例の収集を実施し-80に保存した。同検体に関して超遠心法にてエクソソーム抽出を試みその確認を行ったが、その後の解析に耐える量のエクソソームは抽出しえなかった。

・患者血漿からのエクソソーム抽出・定量では年齢・性別・血液検査結果(WBC, CRP, TP, Alb, CEA, CYFRA, SCC)とエクソソーム量に相関は認めなかった。また、血漿中のエクソソーム量は健常群ではほぼ一定である事を明らかにした。一方、食道扁平上皮癌患者では、非癌患者に比してエクソソーム量は有意に高値であった。癌の進行度に関してはエクソソーム量に相関はなく、一方で患者血漿においてもエクソソーム低値は独立した予後不良因子であった。

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 4 件)

Hoshino I, Maruyama T, Fujito H, Tamura Y, Suganami A, Hayashi H, Toyota T, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Akanuma N, Takeshita N, Toyozumi T, Komatsu A, Matsubara H. Detection of Peritoneal Dissemination with Near-infrared Fluorescence Laparoscopic Imaging Using a Liposomal Formulation of a Synthesized Indocyanine Green Liposomal Derivative. *Anticancer Res.* 2015, 35(3):1353-9. (査読有り)

Isozaki Y, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Mori M, Nishimori T, Murakami K, Akanuma N, Takeshita N, Maruyama T, Toyozumi T, Takahashi M, Suito H, Matsubara H. Usefulness of microRNA-375 as a prognostic and therapeutic tool in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2015, 46(3):1059-66. doi:10.3892/ijo.2014.2789 (査読有り)

Maruyama T, Akutsu Y, Suganami A, Tamura Y, Fujito H, Ouchi T, Akanuma N, Isozaki Y, Takeshita N, Hoshino I, Uesato M, Toyota T, Hayashi H, Matsubara H. Treatment of Near-Infrared Photodynamic Therapy Using a Liposomally Formulated Indocyanine Green Derivative for Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2015 Apr 7;10(4):e0122849. doi: 10.1371(査読有り)

Matsumoto Y, Miwa S, Zhang Y, Zhao M, Yano S, Uehara F, Yamamoto M, Hiroshima Y, Toneri M, Bouvet M, Matsubara H, Tsuchiya H, Hoffman RM. Intraperitoneal administration of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R inhibits disseminated human ovarian cancer and extends survival in nude mice. *Oncotarget.* 2015 May 10;6(13):11369-77. (査読有り)

[学会発表](計 9 件)

Yasunori Matsumoto, Masayuki Kano, Yasunori Akutsu, Naoyuki Hanari, Isamu Hoshino, Kentaro Murakami, Akihiro Usui, Hiroshi Suito, Masahiko Takahashi, Ryota Otsuka, Hisahiro Matsubara. Usefulness of exosome quantification by cholesteryl ester transfer protein activity as a biomarker for human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月17日 New Orleans, USA

Kano Masayuki, Yasunori Matsumoto, Isamu Hoshino, Kentaro Murakami, Yasunori Akutsu, Hisahiro Matsubara. A paradoxical observation for its upregulation and the prognostic significance about miR-7 in esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月18日 New Orleans, USA

松原 久裕 食道がんの集学的治療とその個別化を目指して 第53回日本癌治療学会学術集会 臓器別シンポジウム2 2015年10月29日-31日 京都国際会議場(京都市)

松原 久裕 食道癌に対する集学的治療の展開 第3回北海道周術期管理フォーラム(招待講演)2015年10月23日 京王プラザホテル札幌(札幌市)

Hisahiro Matsubara Current topics of junctional cancer.

The JAPAN-CHINA Gastro-enterological Surgical Forum 2015, 2015年5月30日 Shanghai, China

Yasunori Matsumoto, Hisahiro Matsubara Functional analysis of exosomes derived from human esophageal squamous cell carcinoma. AACR Annual Meeting 2015, 2015年4月18日-22日 Philadelphia, USA

加野 将之、松原 久裕 Stage IV胃癌の検討 - Conversion surgery 確立と腹膜播種標の新規局所治療の開発- 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年4月16日-18日 名古屋国際会議場(名古屋市)

松原 久裕 食道癌に対する新規治療開

発 第 25 回広島食道疾患懇話会（招待講演）2015 年 2 月 17 日 広島大学（広島市）

Hisahiro Matsubara Topics of surgical treatment for esophago-gastric junctional cancer. The Japan-China Gastroenterological Surgery Forum 2014（招待講演）2014 年 9 月 27 日 Dalian, China

〔その他〕

ホームページ等

www.academic-surgery.jp/

6．研究組織

(1)研究代表者

松原 久裕 (MATSUBARA, Hisahiro)

千葉大学・大学院医学研究院・先端応用外科・教授

研究者番号：20282486

(2)研究協力者

加野 将之 (KANO, Masayuki)

松本 泰典 (MATSUMOTO, Yasunori)