

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893037

研究課題名(和文) 胃癌腹水中エクソソームに対するゲノム解析に基づく胃癌腹膜播種治療の開発

研究課題名(英文) The therapeutic development for peritoneal metastasis of gastric cancer based on the genomic analysis of the exosome in ascites

研究代表者

加野 将之 (KANO, Masayuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20456023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌は、我が国の癌死亡原因の男女ともに2位を占める重要な癌腫である。本研究は胃癌、食道癌(上部消化管の癌)におけるエクソソームの意義を特に進行がんにおける転移の分子機構を明らかにすべく遂行する研究である。世界的にも詳細が明らかとなっていないがんエクソソームについて、患者血液、癌培養細胞を材料として、エクソソーム粒子数の進行に伴う変化および表面マーカーの機能解析を行い、その一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：The gastric cancer is the second leading cause of the death of male and female in our country. The purpose of this study is to clarify the significance of cancer exosome in the upper gastrointestinal tract cancer (esophageal cancer and gastric cancer) in the point of the molecular mechanism of the metastasis of the advanced cancer in particular. About cancer exosome of which details did not become clear worldwide either, We experimented the functional analysis of a change with the progress of the number of exosome particles and the surface marker (CD63) to use the patient's blood (serum) and cultured cancer cells as materials. We accomplish to elucidate some knowledges of the exosome of upper gastrointestinal tract cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌腹膜播種

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、我が国の癌死亡原因の男女ともに2位を占める重要な癌腫である。特に進行胃癌における腹膜播種は治療が困難で予後ならびに終末期の患者QOLは極めて不良である。症状の緩和さえ得られず短期間に死亡するケースも多い。また、初発時腹水中癌細胞(術中洗浄細胞診)陰性にも関わらず腹膜播種再発をきたす症例は予測困難であり、腹膜播種再発診断時にはほぼ必ず術なく不幸な転帰をとる。

2. 研究の目的

本研究は手術患者より採取された術中腹水の遊離癌細胞・エクソソーム画分の mRNA・マイクロRNA の網羅的解析を行うことによりエクソソームの腹膜播種形成への関与を明らかにし、これらを利用した早期腹膜播種再発予測法、エクソソームを標的とした胃癌腹膜播種分子治療モデルの開発および臨床応用を行うための基盤研究とする。具体的な目的を 予測困難な胃癌腹膜播種再発の手術時診断法の開発。腹水中エクソソームに高発現する癌遺伝子、癌関連 microRNA、タンパクをターゲットとした新規治療法の開発。とした。

3. 研究の方法

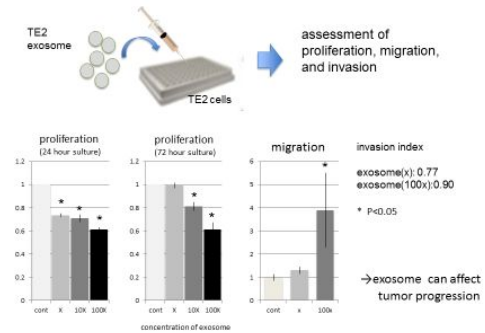
本研究は胃癌手術時の腹水中遊離癌細胞およびエクソソーム画分の抽出、mRNA・マイクロRNA の網羅的解析と機能分析を行う。まず、胃癌患者における腹水中エクソソーム画分の抽出、網羅的解析によるプロファイリングを行う予定とし、次に胃癌培養細胞を用いた in vitro 機能解析による標的遺伝子の決定、臨床検体中標的遺伝子の発現解析、各臨床病理学的因子、予後、化学療法感受性との相関解析、さらには胃癌腹膜播種モデルマウスを用いた治療モデルの樹立、解析を行う予定とした。

4. 研究成果

機能解析を行い、エクソソームが細胞増殖に与える影響を cell proliferation assay(Cell Conting Kit-8, Dojindo)を用いて評価した。濃度依存的に細胞増殖を抑制することが判明した(図1)。現在、胃癌細胞株を用いた検討を継続中であり、良好な結果を得つつある。また、ヒト食道癌細胞株を培養液にて培養し、その上清より超遠心法を用いてエクソソームを抽出した。抽出したエクソソームを緑色色素(PKH67, Sigma-Aldrich)で染色した後に細胞株へ添加した。24時間

(図1)

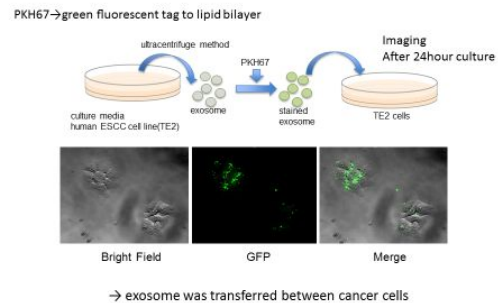
Efficacy of cancer derived exosome on tumor progression



後の蛍光顕微鏡下での観察では、細胞内へのエクソソーム取り込みがイメージングが可能であった(図2)。

(図2)

Imaging of exosome transfer between cancer cells (in vitro)

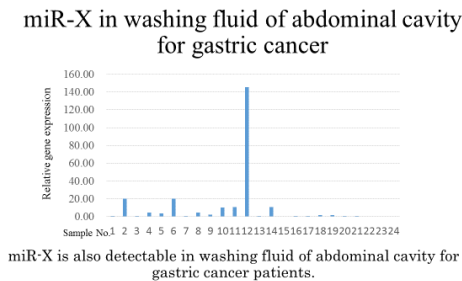


また、胃癌細胞株(MKN-1、MKN-28、MKN-45、MKN-74、KATO-III、SH10-Tc)がヌードマウスへの腹腔内接種により腹膜播種モデルが成立することを確認した。食道癌細胞株(T.Tn、TE-2)のヌードマウス皮下腫瘍モデルの作成を確認した。In vivo modelの成立は確認されたので、エクソソームの体内挙動のイメージング、in vivoにおける、増殖、浸潤能に与える影響を今後解析予定である。

次に、当科にて-80 ディープフリーザーで保存した食道癌、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に関してエクソソーム抽出を試みた。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は、胃癌腹膜播種転移の機構をさぐる重要な一歩になると仮定し、同検体の手術時における採取を行い、症例数の増加に努めた。約30例の収集を行い、-80 に分注、保存し使用可能となっている。上記臨床検体よりmiRNAの検出が可能となっている(図3)。

培養細胞を用いた検討を開始し、エクソソーム抽出が可能であることを確認した。一部機能解析も行いえた。エクソソームが持つ癌

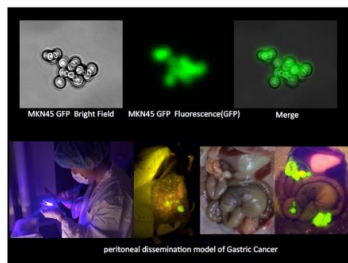
図3



における機能、細胞間相互作用、腹膜播種腹腔ない環境を反映するもっとも簡便なモデルとしての培養細胞実験が進行しつつあり、さらなる知見が得られるものと考えている。よって、培養細胞系の実験は順調な進行状況といえる。

ヌードマウスでの食道癌ならびに胃癌、腹膜播種のモデルの成立が確認された(図4)。蛍光物質を導入した癌培養細胞が製作され、生体内でのエクソソームのイメージング、臓器間での相互作用が捉えられ、さらにそれらを可視化することが期待される。そういった研究の報告はまだ少数であり、上部消化管(胃癌、食道癌)では皆無に等しい。上部消化管の癌においてこの分野で世界の先陣をきる研究となる可能性があり、順調に実験系の開始が行われたと自己評価できる。

図4



臨床検体液体中のエクソソームであるが、腹腔洗浄細胞診施行時の検体(腹腔洗浄液中)エクソソームに腹膜播種転移の重要な因子があるとの仮説のもとに、同検体よりエクソソームの抽出に時間を費やした。しかしながら、大変濃度が薄いことが予想され、検討に耐える程のエクソソームの収集は现阶段では不可能である。今後さらに大量の検体よりエクソソームを収集・濃縮する方法を確立することによって、さらに進めていきたい。

##### 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6件)

Gao T, Lau BE, Yamaguchi T, Hanari N, Gunji H, Kano M, Matsubara H,

Hayashi H. Experimental analyses of the cavitation generated by ultrasonically activated surgical devices. *Surg Today*. (査読あり)2016 May 6. [Epub ahead of print] Otsuka R, Kano M, Hayashi H, Hanari N, Gunji H, Hayano K, Matsubara H. Probable IgG4-related sclerosing disease presenting as a gastric Submucosal tumor with an intense tracer uptake on PET/CT: a case report.

*Surg Case Rep.* (査読あり) 2016 Dec;2(1):33. doi:

10.1186/s40792-016-0161-6. Epub 2016 Apr 8.

Kano M, Hanari N, Gunji H, Hayano K, Hayashi H, Matsubara H. Is "functional end-to-end anastomosis" really functional? A review of the literature on stapled anastomosis using linear staplers. *Surg Today*. (査読あり)2016 Mar 17. [Epub ahead of print]

Kano M, Matsushita K, Rahmutulla B, Yamada S, Shimada H, Kubo S, Hiwasa T, Matsubara H, Nomura F. Adenovirus-mediated FIR demonstrated TP53-independent cell-killing effect and enhanced antitumor activity of carbon-ion beams. *Gene Ther.* (査読あり) 2016 Jan;23(1):50-6. doi:

10.1038/gt.2015.84. Epub 2015 Aug 4.

〔学会発表〕(計12件)

Masayuki Kano, Naoyuki Hanari, Hisashi Gunji, Koichi Hayano, Hideki Hayashi, Hisahiro Matsubara. Does gastric cancer with peritoneal metastasis have the significance surgeon's intervention? 第88回日本胃癌学会総会. 2016年03月17日~2016年03月19日. 別府国際コンベンションセンター(大分県・別府市)  
加野将之, 羽成直行, 郡司ひさし, 早野康一, 川平洋, 林秀樹, 松原久裕. 後期高齢者に対する胃がん腹腔鏡手術. 第28回日本内視鏡外科学会総会. 2015年12月10日~2015年12月12日. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)  
加野将之, 羽成直行, 郡司久, 早野康一, 川平洋, 林秀樹, 松原久裕. 期高齢者における胃癌治療の現状. 第77回日本臨床外科学会総会. 2015年11月26日~2015年11月28日. 福岡サンパレス(福岡県・福岡市)

Masayuki Kano, Yasunori Matsumoto, Hisahiro Matsubara.

Cancer invadopodia controlled down-regulated miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (国際学会) .

2015年11月05日~2015年11月09日. Hynes Convention Center (米国・マサチューセッツ州・ボストン市)

加野将之、松本泰典、高橋理彦、水藤広、碓井彰大、村上健太郎、星野敢、阿久津泰典、林秀樹、松原久裕. 胃癌臨床検体を用いた腹膜播種解明の試み. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年

10月08日~2015年10月10日. 名古屋国際会議場. (愛知県・名古屋市)

阿久津泰典、羽成直行、村上健太郎、松本泰典、加野将之、高橋理彦、水藤広、大塚亮太、碓井彰大、松原久裕. 食道扁平上皮癌における血中PD-1、PD-L1およびPD-L2のバイオマーカーとしての可能性. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月08日~2015年10月10日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

松本泰典、加野将之、阿久津泰典、羽成直行、星野敢、村上健太郎、碓井彰大、水藤広、高橋理彦、大塚亮太、小松亜紀、宮沢幸正、松原久裕. 食道扁平上皮癌由来エクソソームによる腫瘍進展への影響の解析. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月08日~2015年10月10日. 2015年10月08日~2015年10月10日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

星野敢、竹下修由、加野将之、阿久津泰典、村上健太郎、碓井彰大、水藤広、高橋理彦、松本泰典、大塚亮太、松原久裕. 食道がん患者における m iR-106b の発現の診断的意義. 第74回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

Masayuki Kano, Hisahiro Matsubara. The consideration of optimal surgical procedures and multidisciplinary treatment for Junctional adenocarcinoma. 第7回日本モンゴル国際消化器がんシンポジウム (国際学会) 2015年9月26日~2015年9月27日. National Cancer Center of Mongolia (モンゴル国・ウランバートル市)

加野将之、羽成直行、郡司久、林秀樹、阿久津泰典、星野敢、村上健太郎、松本泰典、豊住武司、松原久裕. 胃癌 Stage IV conversion 症例の検討. 第70回日本消化器外科学会総会. 2015年07月15日~2015年07月17日. アクティ

イ浜松 (静岡県・浜松市)

加野将之、羽成直行、郡司久、川平洋、横山幸太郎、徳山宏丈、北原綾、林秀樹、

松原久裕. 当科における腹腔鏡下袖状胃切除の成績. 第33回日本肥満症治療学会学術集会. 2015年06月26日~2015年06月27日. 幕張国際研修センター. (千葉県・千葉市)

加野将之、羽成直行、郡司久、川平洋、林秀樹、松原久裕. 超高齢者に対する胃癌術後合併症について. 第40回日本外科系連合学会学術集会. 2015年06月18日~2015年06月19日. 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

〔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

千葉大学クリニカルバイオバンクホームページ <http://www.academic-surgery.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加野 将之 (KANO, Masayuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 20456023

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :