

学位論文要約
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏名： 市川 広直
Full Name

学位論文題目： Exosome Transfer Between Pancreatic-cancer Cells Is Associated With
Thesis Title Metastasis in a Nude-mouse Model

学位論文要約：
Summary of Thesis

【背景】

転移を抑制することは、がん患者の生命予後の改善に繋がる。がん細胞は転移巣において、腫瘍細胞のみならず血管内皮細胞、線維芽細胞、炎症細胞、免疫細胞などが集合することで、がん微小環境（TME：tumor microenvironment）を構成している。近年、TMEを構成する各種細胞の相互作用が、腫瘍の進展および悪性化に影響を与えることが明らかになってきているが、その細胞間コミュニケーションツールの1つとしてエクソソームが注目されている。

エクソソームは、内部にDNA、mRNA、microRNAなどの遺伝情報を有する直径40-100nm程度の脂質二重膜で構成される細胞外小胞であり、細胞間の情報伝達を直接的に行っている。がん細胞由来のエクソソームが、別のがん細胞やTMEを構成する細胞へ受け渡されることによって、各細胞の形質を変化させることが報告されているが、その詳細な機序・動態に関しては不明な点も多い。本研究では、新規マウス膵がん転移モデルを樹立し、TMEにおけるがん細胞由来のエクソソームを可視化・追跡することでその体内動態を解析した。

【対象と方法】

ヒト膵臓腺がん株（AsPC-1）に、レトロウイルスベクターを用いて赤色蛍光タンパク質（RFP：red fluorescent protein）を導入し、AsPC-1-RFP細胞を樹立した。また、がん細胞由来のエクソソームを可視化・追跡するために、AsPC-1細胞にCD63（エクソソームマーカー）と緑色蛍光タンパク質（GFP：green fluorescent protein）の融合タンパク質を発現する遺伝子を導入し、AsPC-1-exo-GFP細胞を樹立した。次に、5-8週齢のBALB/c-nu/nuマウスの脾臓に 1.0×10^6 個のAsPC-1-RFP細胞と 1.0×10^6 個のAsPC-1-exo-GFP細胞を移植し、マウス膵がん転移モデルを作成した。移植してから8週経過後にマウスを解剖して、脾臓、肝臓、腹膜播種結節および肺を採取し、蛍光実体顕微鏡（SZX7）で腫瘍を観察した。さらに、腫瘍組織から採取した細胞を培養し、共焦点顕微鏡（FV1000）を使用して観察した。

【結果】

AsPC-1-exo-GFP細胞において、細胞内のエクソソームがGFPによって蛍光標識されていることを共焦点顕微鏡で確認した。また、AsPC-1-RFP細胞とAsPC-1-exo-GFP細胞を*in vitro*で共培養しても、GFPで標識されたエクソソームは細胞間を移動しないことが確認された。AsPC-1-RFP細胞とAsPC-1-exo-GFP細胞をBALB/c-nu/nuマウスの脾臓に移植したところ、脾臓の腫瘍形成（原発巣）と肝臓、腹膜、肺への転移を認めた。原発巣および転移性腫瘍から採取した細胞を培養したところ、各臓器の腫瘍細胞間においてエクソソームの取り込みが確認された。また、AsPC-1-exo-GFP細胞からAsPC-1-RFP細胞へエクソソームが移動している割合について比較すると、原発巣（脾臓）と比較して転移巣（肝、腹膜、肺）においてその割合は有意に高かった。さらに、各組織から採取した細胞を1度継代したのち、再度AsPC-1-exo-GFP細胞からAsPC-1-RFP細胞へエクソソームが移動している割合について培養細胞で比較を行うと、いずれの臓器由来の細胞においても継代前と比較してその割合は有意に上昇していた。

【考察】

エクソソームはmRNAやDNAなど様々な遺伝情報を有し、細胞間において直接的に情報伝達を行っている。

今回の研究では、RFP で標識した膵がん細胞株とエクソソームを GFP で標識した膵がん細胞株を混合して移植することで新規マウス膵がん転移モデルを作製し、がん細胞間同士におけるエクソソームの移動を可視化することに成功した。がん細胞由来のエクソソームは、原発巣と転移巣（遠隔臓器）に作用することで腫瘍の浸潤および転移を促進することが報告されているが、本研究において、原発巣と比較し転移巣の方が、がん細胞間同士のエクソソームの移動が多いことが明らかになった。また、移植前に共培養された AsPC-1-RFP 細胞と AsPC-1-exo-GFP 細胞間においてはエクソソームの移動が観察されなかったこと、さらには脾臓の原発巣と比較し転移巣由来の細胞培養において、GFP エクソソームを取り込んだ AsPC-1-RFP 細胞が有意に増加したことより、エクソソームの移動は転移巣における TME やニッチの形成において、より重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【結論】

RFP/GFPを導入した膵がん細胞株を用いて新規マウス膵がん転移モデルを作製し、がん細胞間同士におけるエクソソームの移動を可視化することに成功した。また、腫瘍の転移先においてがん細胞間のエクソソームの移動が活発化していることを明らかにし、エクソソームががん細胞間コミュニケーションツールとして働くことで、がん細胞の転移・浸潤能を増大させる可能性について示した。がん細胞由来のエクソソームの動態・機能に関する研究を推進することは、がんの転移・浸潤機序の解明、さらには新規診断法や治療法の開発に繋がる可能性がある。