

氏名（本籍）	市川 広直	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1186 号	
学位授与日付	令和 4 年 3 月 25 日	
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Exosome transfer between pancreatic-cancer cells is associated with metastasis in a nude-mouse model	
審査委員	（主査）教授	大沢 匡毅
	（副査）教授	森田 浩之 教授 原 明

## 論文内容の要旨

### 【背景】

がん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。がん転移巣では、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によって、がん微小環境（TME：tumor microenvironment）が形成されている。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示されており、そのような細胞間相互作用を担う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、内部にタンパク質やDNA、mRNA、microRNAなどを含有する直径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行う上で重要な役割を果たしている。近年、がん細胞が産生するエクソソームが、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、エクソソームを受容した細胞の形質を変化させることが報告されているが、その詳細な機序に関しては不明な点が多い。本研究では、膵がん転移マウスモデルを作製し、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レンチウイルスベクターによって導入し、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 $1.0 \times 10^6$ 個のAsPC-1-RFP細胞と $1.0 \times 10^6$ 個のAsPC-1-exo-GFP細胞を移植し、膵がん転移マウスモデルを作製した。移植から8週間経過した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）を使用してエクソソームの移送の有無を観察した。

### 【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による観察によって確認した。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、腹膜および肺への転移が認められた。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、各臓器由来の腫瘍細胞がエクソソームを取り込んでいることが観察された。また、AsPC-1-RFP 細胞においてエクソソームを取り込んだ細胞の割合を比較したところ、原発巣(脾臓)と比較して転移巣(肝、腹膜、肺)由来の細胞においてその割合が有意に上昇していることが明らかになった。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、エクソソームを取り込んだ細胞の割合について比較を行ったところ、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】

エクソソームは含有するタンパク質や mRNA, DNA を介し、細胞間情報伝達を行う上で重要な役割を果たしている。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、膵がん転移マウスモデルを作製し、がん細胞同士の間で起こったエクソソームの移送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、本研究によって、原発巣と比べ、転移巣に存在する腫瘍細胞の方がより活発に細胞間のエクソソーム移送を起こすことが明らかになった。また、AsPC-1-RFP 細胞と AsPC-1-exo-GFP 細胞を単に共培養した際にはエクソソームの移送が起こらず、転移マウスモデルの原発巣および転移巣から採取したがん細胞においてのみエクソソームの取り込みが観察されたことから、エクソソームの移送はがん細胞の浸潤や転移によって形成される TME やニッチからのシグナルによって誘導され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膵がん転移マウスモデルを作製し、がん細胞同士の間で引き起こされるエクソソームの移送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送が活発化していることを明らかにし、エクソソームの移送能の増進と、がん細胞の転移・浸潤能との間に相関性があることが明らかになった。がん細胞由来のエクソソームの動態や機能を解明することによって、がんの転移や浸潤機序の一端が明らかになり、新たな診断法や治療法の開発の途が拓かれることが期待される。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 市川広直は、膵がん細胞に CD63-GFP 融合タンパク質を発現するための遺伝子を導入し、エクソソームを GFP によって特異的に標識することができる細胞株を樹立した。本細胞株と RFP で標識した膵がん細胞を混合してマウスの脾臓に移植することによって、生体内において、がん細胞同士の間で起こるエクソソームの移送を可視化するための新たな手法を構築した。本研究成果は、がん細胞の浸潤や転移に対するエクソソームの役割を解明するための基盤的技術を提供するものであり、今後のがん研究の発展に少なからず寄与すると認められる。

---

#### [主論文公表誌]

HIRONAO ICHIKAWA, ATSUSHI SUETSUGU, TOMOYUKI SATAKE, HITOMI AOKI, TAKAHIRO KUNISADA, MASAHITO SHIMIZU and ROBERT M. HOFFMAN: Exosome Transfer Between Pancreatic-cancer Cells Is Associated With Metastasis in a Nude-mouse Model  
ANTICANCER RESEARCH 41: 2829-2834 (2021) doi:10.21873/anticancer.15063