

分子プロファイリングに基づく大腸癌転移指向性の解明

名古屋市立大学大学院
分子腫瘍学 助教 磯村久徳

名古屋市立大学大学院
分子腫瘍学 教授 田口歩

1、研究の背景・目的

我が国における大腸癌の罹患者数と死亡者数は、いずれも年々増加している。遠隔転移を伴わない Stage I～III の 5 年生存率は約 70% と比較的予後良好である。その一方で、遠隔転移を有する Stage IV 大腸癌の 5 年生存率は約 20% と非常に予後が悪く、大腸癌の生存率向上のためには、再発・転移巣の制御が極めて重要であると考えられる。また、転移臓器によっても治療や予後が異なる¹⁾ことから、大腸癌の転移指向性に関わる分子機構を詳細に解明することで、革新的な大腸癌の分子標的治療の開発につながることを期待できる。近年、腫瘍細胞由来の Exosome が転移先臓器の微小環境をリモデリングすることでその転移指向性を決定していることが示唆されたが^{2,3)}、その分子機構はいまだ十分に解明されていない。当分野では、in vivo selection 法を用いて、異なる転移指向性を示すマウス大腸癌細胞株 CT26 の亜株を樹立した。また、これらの亜株からトランスクリプトーム、プロテオーム、リン酸化プロテオームなど多層オミクスデータを取得している。そこで、本研究では、各亜株が産生する Exosome のプロテオーム解析を行い、転移臓器の微小環境変化や臓器指向性をもたらさる Exosome 関連タンパク質を同定し、さらに上記分子プロファイルと統合することで、その制御機構を解明し、転移臓器の予測に資するバイオマーカーの探索同定や、臓器別の転移をターゲットにした分子標的治療の開発を行う。

2、研究の対象ならびに方法

本研究では、すでに当研究室で樹立済みである高肝転移性亜株 (CT26-CRLM6)、高リンパ節転移亜株 (CT26-PL6)、高腹膜転移亜株 (CT26-P6)、低転移性亜株 (CT26-N5) から Exosome を単離し、解析を行う。また、これらの細胞株を用いて、Exosome を含む培養上清中に分泌されるタンパク質の網羅的解析を行う。Exosome の単離に際しては、超遠心にて Exosome を除去したウシ胎児血清を培養液に添加して細胞を培養し、上清を回収した。培養上清か

らの Exosome 単離は PS アフィニティー法を用いて行った。Exosome 単離の確認は Exosome マーカーである TSG101 のウェスタンブロット及びナノ粒子トラッキング解析にて行った。また、分泌タンパク質の網羅的な解析には SILAC ラベルを行い、マスマススペクトメトリーによるタンパク質の同定・定量を行った。

3、研究結果

PS アフィニティー法を用いて Exosome を単離したところ、TSG101 の発現が確認された (図 1)。また、ナノ粒子トラッキング解析を行った所、どの細胞株においても 1.2×10^9 particles 以上の Exosome が単離できていた (図 2)。また、単離された Exosome のサイズ平均は CT26-N5 が 135.7 nm なのに対し、CT26-CRLM6 が 146.7 nm、CT26-PL6 が 145.6 nm、CT26-P6 が 145.4 nm であった。

分泌タンパク質の網羅的解析では、3205 タンパク質が同定された。このデータを用いてクラスター解析を行うと 2 つのクラスターに分類され、CT26-CRLM6 と CT26-P6 は CT26-N5 とは異なるクラスターに分類された (図 3)。CT26-N5 と比較して 2 倍以上培養上清中に分泌されたタンパク質について、Gene Ontology 解析を行った所、CT26-CRLM6 では血管新生に関与するタンパク質が亢進しており、CT26-P6 ではタンパク質分解酵素群が亢進していた (図 4)。

4、考察

CT26-N5 にくらべて、高転移亜株では Exosome のサイズが大きくなっていたことから、Exosome の内容物は変化しており、機能も異なると考えられる。また、マスマススペクトメトリーによる網羅的なタンパク質同定を行うにあたり、十分な量の Exosome を単離することが出来た為、今後解析予定である。また、Exosome の機能評価の為、CT26-N5 を同種性同所性に移植後、各高転移性亜株より精製された Exosome を既報に準じてマウスに投与し、転移頻度や転移指向性の変化を検討する予定である。

Gene Ontology 解析の結果から、CT26-CRLM6 は血管新生を亢進し、血行性に肝臓へ転移すると考えられる。CT26-P6 はタンパク質分解酵素により、細胞外基質を分解し、腹膜内へと転移していると考えられる。実際に、各細胞亜株を用いてのトランスウェルインベージョンアッセイでは、CT26-P6 の浸潤能が最も亢進していた。今後は、CT26-CRLM6 及び CT26-P6 を同種性同所性に移植後、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の免疫染色による血管新生や H. E. 染色などの病理組織像による細胞浸潤の評価を行う。

5、文献

1) Franko J, Shi Q, Meyers JP, et al. Prognosis of patients with peritoneal metastatic colorectal cancer given systemic therapy: an analysis of individual

patient data from prospective randomised trials from the Analysis and Research in Cancers of the Digestive System (ARCAD) database. *Lancet Oncol.* 17(12):1709–1719. 2016.

2) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 19;527(7578):329–35. 2015.

3) Wang G, Li J, Bojmar L, Chen H, et al. Tumour extracellular vesicles and particles induce liver metabolic dysfunction. *Nature.* 618(7964):374–382. 2023.

6、論文発表

Isomura H, et al. Avil promotes peritoneal metastasis in colorectal cancer. 第83回日本癌学会学術総会、pp.175 2024年 福岡

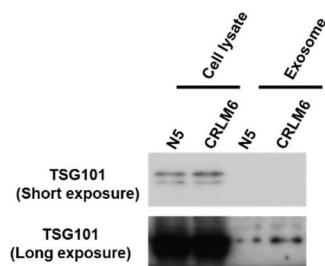


図1 Exosomeマーカーのウェスタンブロット

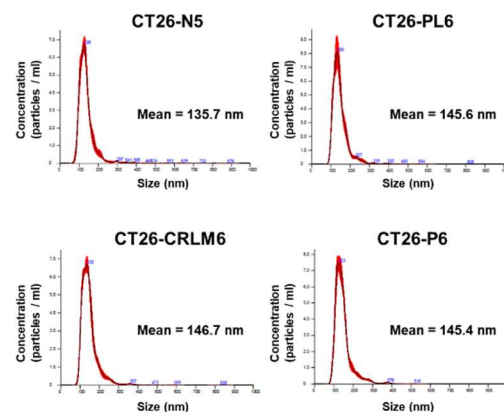


図2 各亜株由来Exosomeの粒子径

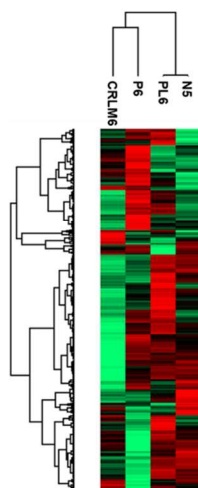


図3 各亜株由来分泌タンパク質のクラスター

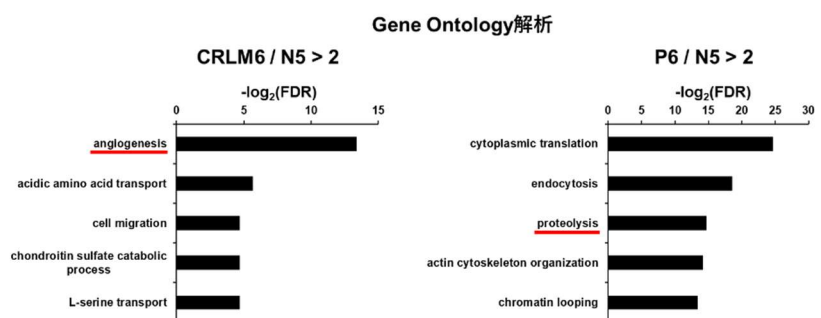


図4 高転移亜株で分泌が亢進しているタンパク質