

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16635

研究課題名(和文) 神経膠腫におけるエクソソーム解析とNegr1による新規治療の開発

研究課題名(英文) An analysis of glioma-derived exosomes and development of a new treatment for glioma with exosomes.

研究代表者

筒井 泰史 (Tsutsui, Taishi)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：00722042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在、標準的な治療をおこなっても完治できない神経膠腫の新規治療の開発を目指して研究を実施した。腫瘍の周囲の微小環境を整備する機構と深く関連するマイクログリアについて注目し、また細胞間の情報伝達を担うとされるエクソソームという膜小胞を介したメカニズムに着眼した。エクソソームの産生を抑えた細胞を作製したところ、腫瘍の形成が弱まることがわかった。また、腫瘍から分泌されたエクソソームをマイクログリアに加えると、細胞内部で様々な重要な分子の発現が変化することを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で神経膠腫の微小環境整備のメカニズムとして、エクソソームを介したマイクログリアの活性化の機序が示された。これまでも神経膠腫とマイクログリアの関係についての報告は多いが、エクソソームとの関連を示した研究は少ない。そのため本研究は、今後の神経膠腫研究の先駆けとなる重要な結果であり、ひいては難治な神経膠腫に対する新規の治療法を開発することにつながる斬新な研究である。

研究成果の概要(英文)：Glioma is the most common primary brain tumor. Exosomes are one of the extracellular vesicles and they can transfer many molecules from cells to cells. We studied a relationship between glioma and exosomes to develop a new treatment for glioma. We established glioma cells that cannot produce enough exosomes and showed that these cells can only make small tumors. And, we identified that exosomes from glioma cells can activate microglia.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経膠腫 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、神経膠腫は集学的治療でも難治であり、その新規治療の開発が望まれている。われわれは神経膠腫の微小環境整備機構に着目し、その中でもエクソソームを介したメカニズムに注目して研究をおこなった。先行研究により Negr1 が細胞のエクソソーム取り込みの阻害効果があることを見出していたため、これを神経膠腫に応用することを考え、計画をたてた。

### 2. 研究の目的

神経膠腫の腫瘍原性とエクソソームとの関連について解明する。また、そのメカニズムについて、微小環境整備に着目してマイクログリアとの関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

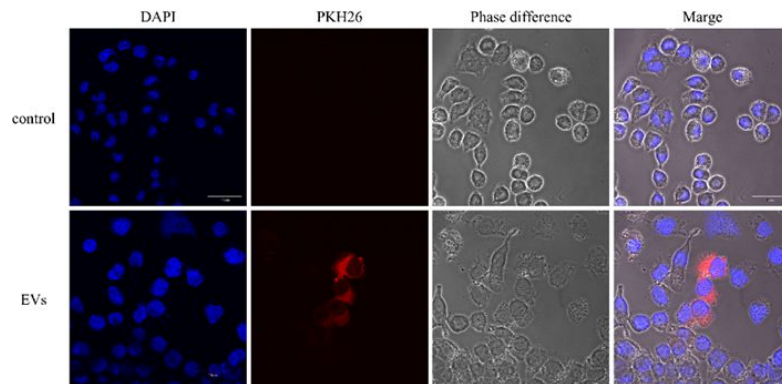
(1) 神経膠芽腫細胞株から精製したエクソソームを PKH26 で染色し、マイクログリア株への取り込みを可視化する。さらに、エクソソーム上の Negr1 の発現を変化させ、そのマイクログリアへの取り込みの増減をみる。

(2) エクソソーム産生関連分子である TSG101 の低発現膠芽腫細胞株を樹立し、モデルマウスを作成することで、その腫瘍原性への影響を解明する。

(3) 複数の膠芽腫細胞株から精製したエクソソームをそれぞれマイクログリア株に添加し、マイクログリア細胞内の mRNA の変化を網羅的に解析する。

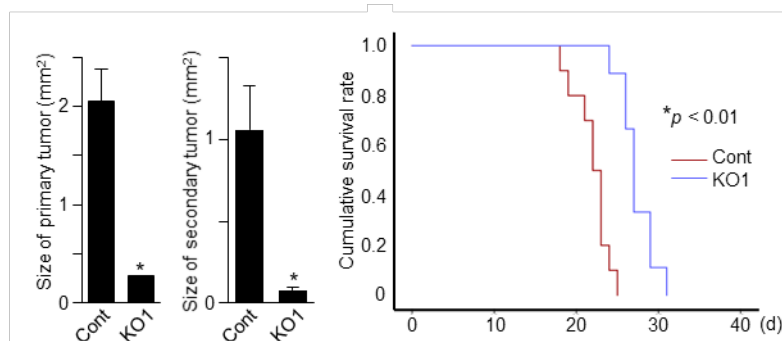
### 4. 研究成果

(1) 神経膠芽腫細胞株 U87MG からエクソソームを精製し、その脂質二重膜を PKH26 を用いて染色する。洗浄後に再度精製したエクソソームをマイクログリア株 MG6 に添加し、一定時間培養後に観察すると、マイクログリア細胞内に染色されたエクソソームが取り込まれ、集積していることが観察された。これにより、エクソソームの細胞内への取り込みという事象を可視化することに成功した。さらに FACS にてその数値化をおこなった。

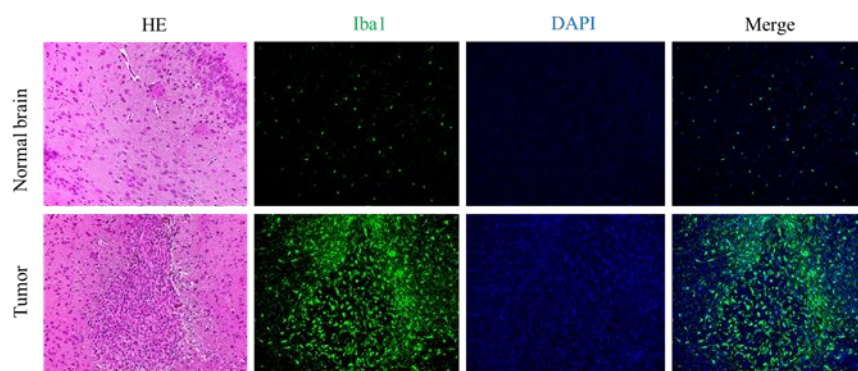


次に、先行研究にて示された Negr1 のエクソソーム取り込み阻害効果を検証した。先行研究においては神経細胞由来エクソソームに Negr1 を過剰発現することによりマイクログリアへの取り込みが阻害されていた。しかし、本研究で膠芽腫細胞へ応用したが、同様の取り込み阻害効果を得ることはできなかった。様々なアプローチ法を検討したが、当初の計画をあきらめざるを得なかった。

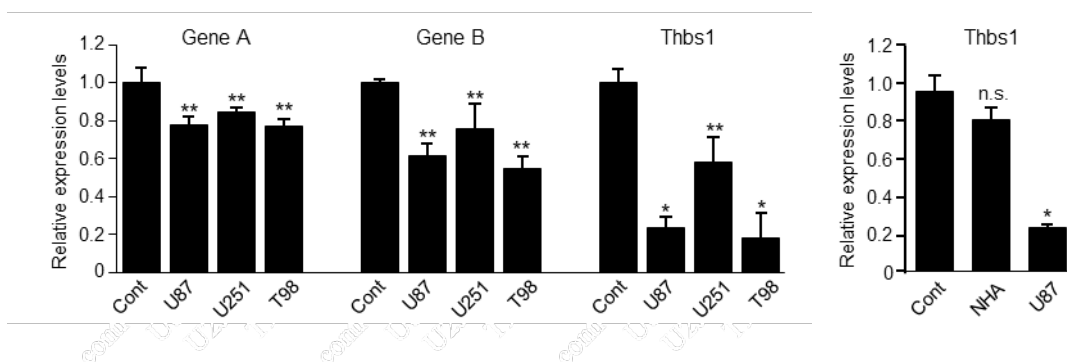
(2) エクソソームがどの程度、膠芽腫の腫瘍原性と関連するかを検証するために、エクソソーム産生関連分子である TSG101 をノックアウトさせた膠芽腫細胞株 U87MG (KO1 株) を樹立した。エクソソームの産生能力がコントロール株 (Cont 株) と比較して約半分に低下していることを確認した。in vitro では細胞増殖能や遊走能に大きな差がないことを示した上で、マウスを脳内に細胞を移植して脳腫瘍モデルマウスを作成した。すると、エクソソーム低産生株 (KO1 株) で腫瘍の大きさに有意な低下を認め、生存期間においても有意な延長を認めた。これにより、エクソソーム産生の抑制による腫瘍細胞自体の細胞形質への影響は大きくはないが、in vivo でのエクソソームと腫瘍周囲細胞との強い関連性を示すことができた。



(3)これまでの報告でも膠芽腫とその周囲のマイクログリアとの関係は多く報告されている。われわれもモデルマウスにおいて、正常脳と腫瘍をそれぞれ免疫染色することでマイクログリアが腫瘍にリクルートされる様子を観察した。これと、前実験(1)の結果をあわせて考慮し、膠芽腫のエクソソームの標的細胞の一つとしてマイクログリアが示唆された。



そこで、複数の膠芽腫細胞株 (U87MG, U251MG, T98G) から精製したエクソソームをそれぞれマイクログリア株 MG6 に添加し、マイクログリア細胞内での mRNA の発現の変化を、RNA シークエンスで網羅的に解析した。発現が増減する因子が多数検出されたが、その中から文献学的にも有用な因子を抽出し、実際に定量的 PCR 法にて発現が低下するかどうか確認した。その中で最も発現低下の度合いが強い Thbs1 を同定した。正常星細胞 (NHA) 由来のエクソソームではマイクログリア細胞内 Thbs1 発現に影響を及ぼさなかったことから、この Thbs1 発現抑制効果は膠芽腫細胞由来エクソソームに特異的であることが示された。これまでに Thbs1 は血管新生抑制因子であると報告されており、このことから膠芽腫のエクソソームを利用したマイクログリア活性化による血管新生の機序が示唆された。



今後、このエクソソームによる血管新生活活性化を種々の実験系で示し、その阻害による腫瘍抑制効果を得ることができれば、新規治療に直結する結果となる。また、マイクログリア細胞内の遺伝子変化をもたらす因子がエクソソーム内に含有されることが予想されるため、エクソソームの内容物を検察することでさらなるメカニズムの解明を行うことができる。その機序を利用した抗腫瘍治療と現行治療の相乗効果を示すことができれば、将来的には臨床応用も可能となる研究成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 第77回日本脳神経外科学会学術総会、仙台、2018年  
 筒井泰史 「神経膠芽腫由来エクソソームによる腫瘍微小環境整備機構の解明」
- (2) 第76回日本脳神経外科学会学術総会、名古屋、2017年  
 筒井泰史 「膠芽腫細胞が分泌するエクソソームによるマイクログリア内 mRNA の変化」

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。