

放射線照射時における子宮頸部腺がん細胞から分泌される細胞外小胞体の機能解析 —子宮温存を目指した子宮頸部腺がんの放射線治療抵抗性の克服にむけて—

Functional analysis of extracellular vesicle secreted from cervical adenocarcinoma cells by irradiation.

犬伏祥子¹⁾・吉田賢史²⁾・佐々木良平²⁾

要約 子宮頸がんは全世界の女性の死因の第2位に位置している。近年、子宮頸がんは、日本においては20代後半から30代の女性においてもっとも罹患率の高いがんである。我々は、子宮頸癌の中でも子宮頸がん検診では発見されにくく、治療が困難であるがんの一つである子宮頸部腺がんに着目した。本研究では、子宮頸部腺がんの放射線抵抗性メカニズムを明らかにするために、細胞外小胞体であるエクソソームに着目した。エクソソームは約100nm程度の細胞から分泌される小胞体で、細胞同士がコミュニケーションをとる情報伝達物質を内包している。近年、このエクソソームによるがんの転移や薬剤耐性獲得、早期診断、予後予測に関与することが明らかとなっている。本研究では子宮頸部腺がん細胞に放射線を照射した際のエクソソームの動態を明らかにすることを目的とする。

Summary Cervical cancer is the second leading cause of cancer deaths among female cancer worldwide. In recent years, cervical cancer is the most prevalent cancer in women in their late 20s to 30s in Japan. We focused on cervical adenocarcinoma which is one of cervical cancers. Cervical adenocarcinoma is said to be difficult to treat because it is difficult to detect in cervical cancer screening and it is resistant to radiation and chemotherapy. Circulating non-coding RNAs, including microRNAs and long non-coding RNAs, and the protein components of extracellular vesicles are promising biomarkers for the non-invasive detection of cancer at an early stage, metastasis of cancer, acquisition of drug resistance, and prognosis prediction. In this study, we investigated the role of extracellular vesicle secreted from cervical adenocarcinoma cell.

Key words; cervical adenocarcinoma, exosome, radiation

Sachiko Inubushi, Kenji Yoshida, Ryohei Sasaki

1) 神戸大学大学院 医学研究科 放射線腫瘍学分野 2) 神戸大学医学部附属病院 放射線腫瘍科
1, 2) Department of Radiation Oncology, Kobe University Graduate School of Medicine

背景および目的

子宮頸がんは全世界の女性のがんによる死亡原因の第2位に位置しており¹⁾、近年日本では、子宮がん検診の推進により、子宮頸がんは早期に発見され、その死亡率は減少傾向である。しかしながら20代から30代で発症するがんの第一位を占めることから、早期に診断、治療をすることが望まれている。

子宮頸がんは扁平上皮がんと腺がんがあり、扁平上皮がんがその大部分を占めている。これまでは子宮頸部腺がんは子宮頸がん全体の約5%と以前は言われていたが、最近では腺がんの割合が増加し、子宮頸がんの約25%を占めるようになってきている。子宮頸部・腺がんは扁平上皮がんより奥の方に発生するため、細胞診断で採取することが難しく、進行した状態で発見される。また、初期からリンパ節への転移が起こりやすいこと、放射線や化学療法に対して抵抗性があることなどから、治療が難しいがんと言われている。子宮頸部・腺がんは初期で発見された場合でも転移しやすいことなどから、子宮の全摘出が推奨されている。近年は子宮の温存治療の一つとして放射線治療があるが、子宮頸部・腺がんは放射線抵抗性を有していることが知られていることから早期発見、早期治療につながる分子機序の解明が望まれる。そこで我々は、子宮温存治療方法の開発に向けて、研究を行っている。

これまで子宮頸がんの原因は性交渉によるヒトパピローマウイルス (Human papilloma virus: HPV) が主たる原因とされているが、HPVの既感染者が必ずしも子宮頸がんを発症するわけではないことから、子宮頸部腺がんの新しい個別化治療方法を確立するために、子宮頸部腺がんのエクソソームに着目した。

細胞は細胞から分泌されるエクソソームと呼ばれる細胞外小胞体を用いて、遠隔地の細胞と情報交換を行っている。エクソソームは血中だけでなく、尿、涙、母乳などの様々な体液に含まれており、脂質二重膜で包まれた約100nmの小胞体であ

る。この小さなエクソソームの中には多種多様なタンパク質や核酸がそれぞれの細胞の分子の特徴を保ったまま存在するといわれている。近年、がん細胞と間質細胞の双方がエクソソームを分泌し情報交換を行うことで、がんの進展や転移、薬剤耐性などに関与しているということも明らかとなっていることから、このエクソソームの役割について注目を集めている。

本研究では子宮頸部・腺がん細胞株であるHCA-1細胞を用い、放射線を照射したHCA-1細胞から分泌されたエクソソームについて解析を行い、子宮頸部腺がん細胞での放射線治療効果につながる遺伝子マーカーを探索することを目的として研究を開始した。

方法

子宮内頸部腺がん細胞株であるHCA-1細胞(JCRB細胞バンクより購入)²⁾を用い、MEM培養液を用いて培養した。放射線照射の前日にT75フラスコに細胞を播いた。翌日、放射線照射の直前に、培養中や通常培養時のFBS内に含まれるエクソソームを持ち越さないようにPBSで2回洗浄後、エクソソームをあらかじめ除いたFBSを含む培地に交換し、放射線照射(0 Gy、5 Gy)を行った。放射線照射48時間後に培養上清を回収し、遠心にて死細胞等を除き、上清のみを0.22 μ mのフィルターで濾過した。その濾過済み培養上清を用いて超遠心法にてエクソソームを回収³⁾した。得られたエクソソームを用いてナノサイトによる解析を行い、エクソソームの粒子数およびその粒径を確認した。次にエクソソームの表面を脂質に親和性の高いPKH26を用いて蛍光色素を標識し、HCA-1細胞に添加し培養した。エクソソームを加えてから24時間後、Hoechst33342を用いて生細胞の核のみを標識したのち、細胞を固定し、標識済みエクソソームが細胞に取り込まれた数を測定した。

結果

HCA-1細胞由来のエクソソームの採取

まず、HCA-1細胞由来のエクソソームの単離を

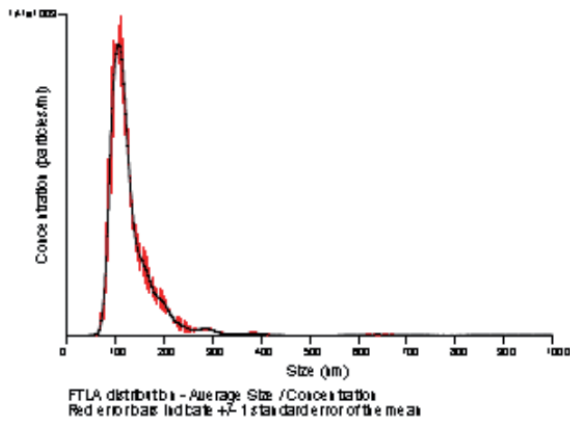


図1. Nanosight を用いたエクソソームの粒子径および粒子数の分布図

行い、得られたエクソソームについて NanoSight を用いてその粒子数および粒子径を測定した (図1)。その結果、HCA-1 細胞由来のエクソソームが約 130nm であることが明らかとなった。

HCA-1 細胞由来のエクソソームの細胞内取り込みについて

次に放射線未照射細胞の培養上清から得られたエクソソーム (HCA-1 0Gy-Exo) および照射細胞から分泌したエクソソーム (HCA-1 5Gy-Exo) の表面脂質を PKH26 で蛍光標識し、蛍光標識済みエクソソームをレシピエント細胞である未照射の HCA-1 細胞に添加し、エクソソームの取り込みを解析した (図2A)。エクソームの細胞内取り込み量については Keyence の解析ソフトを用い、エクソソームを取り込んだ細胞数を算出した。

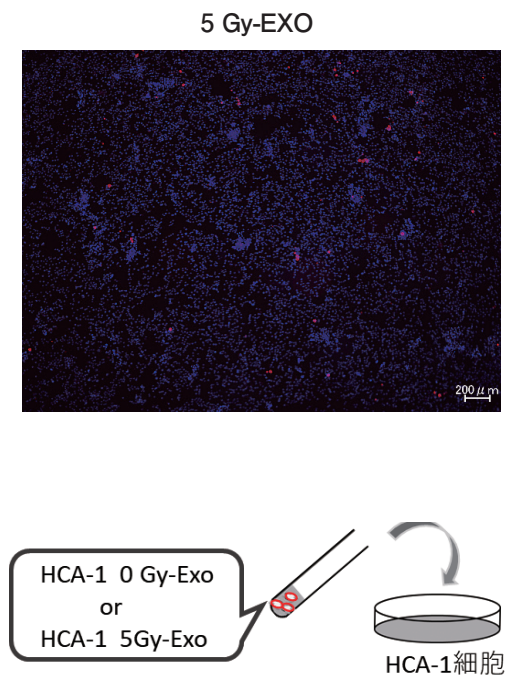
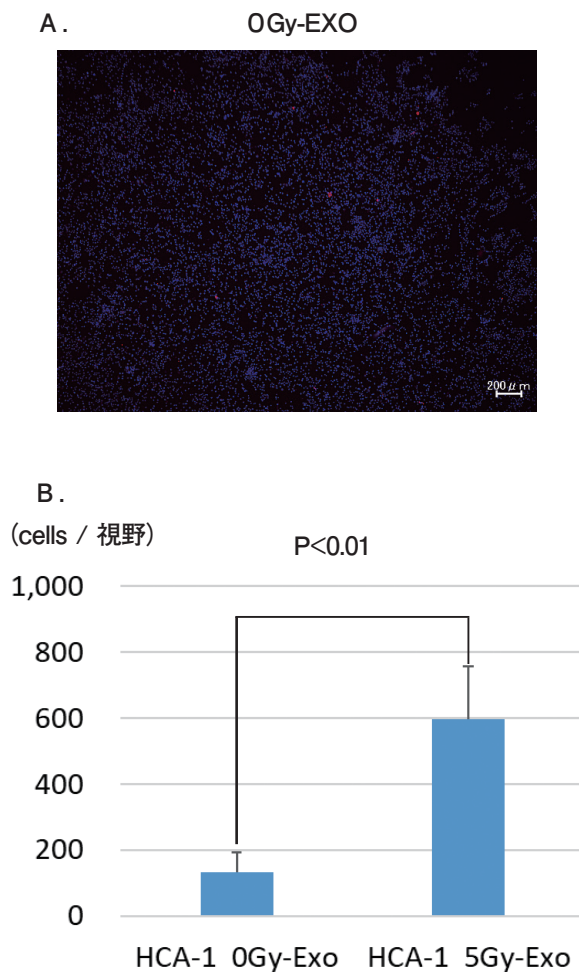


図2. エクソソームを取り込んだ細胞の計測

A. エクソソームを取り込んだ細胞の観察。
赤：蛍光標識したエクソソーム、青：生細胞の核
B. エクソソームを取り込んだ細胞数のグラフ。
Keyence 解析。× 200 倍で撮影した4視野の平均値を算出した。エクソソーム (赤) を取り込んだ生細胞 (青) の数を表す。

結果、5Gy-Exoの方が0Gy-Exoよりも細胞内への取り込みが多く(図2B)、放射線照射後分泌したエクソソームは未照射細胞に取り込まれやすいことが明らかとなった。

考察

本実験結果より、X線照射したHCA-1細胞から分泌されたエクソソームは未照射のHCA-1細胞に取り込まれやすいことが明らかとなった。これまでの報告でもグリオブラストーマ細胞などにおいてX線を照射した細胞から分泌したエクソソームが未照射のレシピエント細胞に取り込まれやすいことは報告されてきた⁴⁾⁵⁾。X線照射後の細胞から分泌するエクソソームによる細胞への作用は、細胞を生存の方向へと導くものと死へ導くものの両方の報告がある。今後、子宮頸部腺がん細胞において、放射線照射後に分泌されたエクソソームの役割やエクソソーム内のmicroRNAの変動について詳細に解析していく必要があると考えている。

我々は最終的には患者組織サンプルのエクソソームを利用した、子宮頸部腺がんの早期診断および予後予測につながる研究につなげていきたいと考えている。

[文献]

- 1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
- 2) Shimoda T, Kuramoto H: HCA-1. *Human Cell* 1: 455-1988.
- 3) Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun*. 2017 Mar 6;8:14470.
- 4) Mutschelknaus L, Peters C, Winkler K, Yentrapalli R, Heider T, Atkinson MJ, Moertl S. Exosomes Derived from Squamous Head

and Neck Cancer Promote Cell Survival after Ionizing Radiation. *PLoS One*. 2016 Mar 23;11
5) Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Transl Oncol*. 2013 Dec 1;6:638-48.