

主論文の要旨

**Malignant extracellular vesicles carrying *MMP1* mRNA  
facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer**

〔*MMP1* 遺伝子含有悪性エクソソームによる  
卵巣がん腹膜播種性転移促進機構の解明〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

横井 暁

## 【緒言】

卵巣がん細胞は極めて容易に腹腔内へ転移を起こし、診断時多くの患者はすでに腹膜播種性転移を伴った進行期の状態である。その進展メカニズムには不明な点が多く残されており、有効な治療法も存在しない。卵巣がん患者は腹水を伴い、がん細胞が腹水中を浮遊することが知られていることから、細胞外の液性因子のようなものが、がんの悪性化に関わるのではないかと考え、未だ報告のない、新たな情報伝達ツールであるエクソソーム (Exosomes, Extracellular vesicles; EVs) に着目をした。エクソソームはあらゆる細胞が放出する 100 nm 前後の膜小胞でタンパク質や核酸などを内包し、細胞間で受け渡しをすることで機能することが知られている。本研究では、卵巣がん細胞が放出するエクソソームを解析することにより、卵巣がんの新たな悪性化メカニズムを解明することを目的とした。

## 【方法】

卵巣がん細胞株を用いて、それぞれの細胞が放出するエクソソームを超遠心法にて回収し、粒子数など基礎的な検討をした。卵巣がん細胞の他に腹膜中皮細胞、卵巣上皮細胞を解析に用いた。卵巣がん細胞株の悪性度の確認やエクソソームによる腹膜播種の変化を観察するため、同所移植マウスモデルを作成し利用した。遺伝子発現はPCR法を主に用い、タンパク質発現はウエスタンブロッティング法を主に用いた。遺伝子網羅的解析のためマイクロアレイ解析を行った。患者腹水を用いた解析を行うため、施設倫理審査委員会の承認を受け、腹水サンプルの収集をした。

## 【結果】

4種の卵巣がん細胞株をマウスの左卵巣に移植し (Fig.1 a-c)、腫瘍の進展を観察した結果、ES-2細胞を移植したマウスが、他と比較して有意に腹膜播種の進展速度が速い、すなわち悪性度が高い細胞株であることが分かった (Fig. 1 d-e)。逆に、A2780細胞やSKOV3細胞は1-2か月で転移が成立する、中等度の悪性度であることが分かり、RMG-1細胞は転移をしない細胞であることが分かった。以上から、最も悪性度が高いES-2細胞が分泌するエクソソームに着目することとした。次に、A2780細胞を移植したマウスの腹腔内に、ES-2細胞由来のエクソソーム (ES-2 EV)、およびRMG-1細胞由来や卵巣の正常上皮細胞 (HOSE1) 由来のエクソソームを投与した (Fig. 2 a, b)。その結果、がん細胞を移植した左卵巣、いわば原発腫瘍に差はないものの、腹膜播種はES-2 EVを投与した群で有意に亢進していたことが分かった (Fig. 2 c)。エクソソームの分泌に関わる *nSmase2* 遺伝子の発現抑制をした細胞を移植すると、エクソソームの分泌放出抑制により転移が抑えられることが分かった (Fig. 2 d)。また、ES-2 EVによる転移促進は4回投与では不十分で、6回の投与が必要なことが分かった (Fig. 2 e)。以上から、高転移能を有するES-2細胞が放出するエクソソームは動物実験において、腹膜播種を促進させることが分かった。次に、その詳細なメカニズムを解析するために、腹膜の主要構成成分である腹膜中皮細胞に着目をした (Fig. 3 a)。卵巣がん細胞は

原発巣である卵巣を離れ、腹膜に転移巣を形成するためには、腹膜バリアを何らかの方法で除去していると考えられたためである。まず *in vivo* の実験系によって、ES-2 EV が中皮細胞をアポトーシスへと誘導されることが明らかになった (Fig. 3 b-e)。さらに電子顕微鏡解析の結果、微絨毛が豊富な腹膜が、ES-2 EV の投与により、中皮細胞の欠落による穴を生じることを確認した (Fig. 3 f-g)。次に *in vitro* の解析でも、ES-2 EV が中皮細胞の形態変化を起こすことを確認した (Fig. 4)。これら事象の原因となる遺伝子を特定すべく、種々のエクソソームを投与した中皮細胞のマイクロアレイ解析を行った (Fig. 5 a-c)。結果、ES-2 EV を投与した中皮細胞では有意に *MMP1* が上昇していることが分かった (Fig. 5 d)。さらなる解析で、ES-2 EV には *MMP1* mRNA の翻訳領域の全長が内包されていることを発見し、中皮細胞内の *MMP1* の発現上昇はエクソソームによる直接輸送であることが分かった。さらに、*MMP1* が受け手の中皮細胞内でタンパク質へ翻訳されることや、*MMP1* の発現抑制実験、強制発現実験の結果から *MMP1* 遺伝子が中皮細胞のアポトーシスに必要な遺伝子であることを示した (Fig. 5 e-j)。次に、大規模公共データベースを利用して卵巣がん組織の解析をした結果、*MMP1* が卵巣がん患者にとって重要な予後規定因子であることが分かり、さらに、ステージ I の初期患者においては *MMP1* の発現が予後をより精度高く予測することが分かった (Fig. 6 a)。次に、患者腹水中のエクソソームに、*MMP1* を多く含む ES-2 EV のようなエクソソームが存在するのかを、腹水サンプルを用いて検討した (Fig. 6 b)。全 60 サンプルの腹水中エクソソームを検討した結果、良性患者の腹水と比較して明らかに *MMP1* mRNA を多く含むがん患者群が存在することが分かった。さらにその *MMP1* mRNA 量は腹水採取前に化学療法を受けると低下する傾向にあった (Fig. 6 c)。最後に、患者腹水中の *MMP1* mRNA を多く含んだエクソソームが *in vitro* の実験系に戻して、中皮細胞のアポトーシスを誘導することを確認した (Fig. 6 d-f)。以上から、患者腹水中にも腹膜播種を促進させる、*MMP1* 遺伝子を搭載した悪性エクソソームが存在することがわかった。

### 【考察】

*MMP1* タンパク質は細胞外マトリックスの分解が主な役割として認識されているが、*MMP1* の mRNA がエクソソームに内包され、アポトーシスに関わるという事実は過去の *MMP* 研究とは一線を画した新しい発見である。また本研究は、エクソソームに着目し、未だ報告のない腹膜播種性転移に焦点をあて、卵巣がん細胞由来のエクソソームが、腹腔内で腹水を媒介してダイナミックに関わっていることを証明した。*MMP1* mRNA を内包したエクソソームは患者予後を予測するバイオマーカーとして、また将来的な腹膜播種を抑制するような治療標的として、多くの可能性を有していると期待される。

### 【結語】

卵巣がん細胞が *MMP1* mRNA をエクソソームに内包させ分泌し、腹膜中皮細胞をアポトーシスに誘導することにより、腹膜播種性転移を促進させる機構を解明した。