

がんになるとなぜ痩せるのか
—膵がん由来の細胞外小胞が脂肪分解を引き起こすメカニズムを解明—

1. 発表者：

柴田 智華子（東京大学医学部附属病院 消化器内科 病院診療医／
東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻 消化器内科学 医学博士課程／
日本学術振興会 特別研究員）
大塚 基之（東京大学医学部附属病院 消化器内科／
東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻 消化器内科学 講師）
藤城 光弘（東京大学医学部附属病院 消化器内科／
東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻 消化器内科学 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆膵がんから血液中に放出される細胞外小胞は、脂肪細胞と接着しやすい分子を持つことで脂肪分解を惹起することを同定し、膵がんにおける体重減少・がん悪液質の機序の一端を解明しました。
- ◆本研究では、血液中にある膵がん由来の細胞外小胞だけを単離解析する方法を新たに確立して、がんから血液中に放出される細胞外小胞の特徴を解析しました。
- ◆本研究の手法を応用することにより、血液中の細胞外小胞研究分野において従来の「不均一な細胞外小胞集団の一括解析研究」から「特異的な亜集団や個別の細胞外小胞を解析する研究」へとパラダイムシフトが起きることが期待されます。また、本研究で明らかにされたがん悪液質の発症機構は、がん患者の支持療法の開発につながると考えられます。

3. 発表概要：

進行したがんの患者では、全身の脂肪や筋肉が萎縮して体重が極端に減少する「悪液質」（注1）の症候がしばしば見られます。一方、膵がんでは、まだ病変が局所にとどまっているうちから体重減少を呈することが知られています。なぜ膵がんでは局所に限局する小さながん病巣であっても体重減少が起きるのか、そのメカニズムは十分には解明されていませんでした。東京大学医学部附属病院 消化器内科の柴田智華子 病院診療医、大塚基之 講師、藤城光弘 教授らの研究グループは、局所にとどまるがん病巣から血中に放出された細胞外小胞（注2）が全身の脂肪細胞に働いて脂肪分解や体重減少を起こすのではないかと仮説を立てて検討を行いました。本研究では、由来細胞がさまざま不均一な集団である血中の細胞外小胞群の中から、膵がん由来と考えられる細胞外小胞だけを単離して解析する方法を新たに確立しました。その解析によって、膵がん由来の細胞外小胞には脂肪細胞との接着に重要な接着因子（注3）が高発現しており、脂肪細胞に接着した細胞外小胞が脂肪細胞内に取り込まれた結果、脂肪分解が起きることをみいだしました。この結果は、がん由来の細胞外小胞を新たに特異的に解析したことで得られた知見であり、がん由来の細胞外小胞を標的としたがん支持療法（注4）の開発につながることが期待されます。本研究結果は、米国東部夏時間 10 月 31 日に *Clinical and Translational Medicine*（オンライン版）にて発表されます。

なお、本研究は科学技術振興機構（JST）CREST の「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」領域（研究課題名「細胞外微粒子の1粒子解析技術の

開発を基盤とした高次生命科学の新展開」研究代表者：渡邊力也 JPMJCR19H5）、日本医療研究開発機構（AMED）の肝炎等克服緊急対策研究事業（研究開発課題名「慢性炎症を背景とした肝発癌の機序解明と肝癌高危険群の囲い込み法の開発」研究代表者：大塚基之 22fk0210092）と革新的がん医療実用化研究事業（研究開発課題名「血中反復配列 RNA の高感度検出を基盤とした新規膵癌スクリーニング法の検証」研究代表者：大塚基之 22ck0106557）、および文部科学省科学研究費補助金（「肝星細胞由来の分泌膜小胞の超精密分析を基盤とした老化に伴う肝疾患の病態解明（20J20625）研究代表者：柴田智華子」、「膵癌における反復配列 RNA の機能解析と治療選択最適化への応用（22H02828）研究代表者：大塚基之」、「膵癌で高発現する新規環状 RNA の機能解明とバイオマーカーとしての有効性の検証（22K15390）研究代表者：清宮崇博」）などの支援により行われました。

4. 発表内容：

【研究の背景】

がん悪液質はそれ自体が日常の生活動作や生命予後の悪化をもたらすため、そこへの介入法の開発は、がん患者の支持療法を強化するためにも重要な課題です。一方、がんの中でも特に膵がんは、早期の段階から著明な体重減少をきたすことが特徴ですが、なぜ局所にとどまるがん病巣が全身性の脂肪分解や体重減少を起こすのか、その詳細は不明でした。

本研究では、局所にとどまる病巣が全身性に影響を及ぼす要因として、細胞外小胞に着目しました。血液中には 1ml あたり 10^{12} 個程度の細胞外小胞が存在しますが、これらの粒子は多彩な生理機能を有していることが知られています。がん細胞も多くの細胞外小胞を血中に放出することから、これが全身の脂肪細胞に働いて脂肪の分解を惹起しているのではないかと仮説を立てました。

【研究内容】

まず、膵がん細胞株を含む培養細胞の上清から単離した細胞外小胞を用いた検討を行いました。試験管内で分化させたヒト脂肪細胞に、ヒト正常膵管上皮細胞株 HPNE、ヒト膵がん細胞株 3 種（Panc-1、Miapaca-2、Capan-2）の培養上清から単離した細胞外小胞を添加すると、Panc-1 と Miapaca-2 の膵がん細胞株の上清から単離した細胞外小胞でのみ有意な脂肪分解を認めました。脂肪分解を起こす因子として重要な cAMP（注 5）の小胞内の含有量は、各細胞株から単離した細胞外小胞間で差を認めなかったことから、惹起された脂肪分解の差は細胞外小胞内の cAMP 量以外の要因が決定づけていることが想定されました。同様に健常者血清・膵がん患者血清から単離した細胞外小胞を脂肪細胞に添加すると、膵がん患者血清由来の細胞外小胞で有意に顕著な脂肪分解をきたしたものの、それぞれの細胞外小胞に含有される cAMP 量には差がなく、惹起された脂肪分解の程度の差はやはり細胞外小胞内の cAMP 量以外の要因が考えられました。

次に、蛍光ラベルした細胞外小胞を用いた検討で、Panc-1 由来の細胞外小胞は脂肪細胞によく取り込まれるものの、Capan-2 由来の細胞外小胞はほとんど取り込まれなかったことから、脂肪分解の程度の差は細胞外小胞の脂肪細胞への取り込みの差によるのではないかと考えました。そこで、Panc-1 由来の細胞外小胞の in vivo での分布を追跡するために、Panc-1 由来の細胞外小胞内に人工的なペプチド配列を含有したレポーター小胞（注 6）を作成して、マウスの尾静脈から静脈注射し各臓器への分布を確認しました。その結果、Panc-1 由来の細胞外小胞は、脂肪や肺への取り込みが多いものの、骨格筋や肝臓への取り込みは少ないことが分かりました。

「細胞外小胞の表面上に発現する接着因子のインテグリン（注7）の種類が、細胞外小胞の組織分布を規定する」という既報を参考に、膵がん細胞株由来の細胞外小胞に発現するインテグリンの種類を検討したところ、脂肪分解を起こす Panc-1 や Miapaca-2 由来の細胞外小胞にはインテグリン $\alpha 6$ (ITGA6)・ $\beta 1$ (ITGB1)・ αV (ITGAV) が高発現しているのに対し、脂肪分解を起こさない Capan-2 の細胞外小胞には ITGB1 は発現していませんでした。ITGB1 と ITGA6 が対合したインテグリン $\alpha 6\beta 1$ はラミニン（注8）に結合するインテグリンですが、脂肪組織や肺にはラミニンが高発現しているものの骨格筋や肝臓ではその発現が少ないことから、インテグリン $\alpha 6\beta 1$ とラミニンの相互作用が膵がん由来の細胞外小胞の脂肪組織への伝播を促進させ、その結果、脂肪分解が惹起される可能性が考えられました。実際に、Panc-1 由来の細胞外小胞を脂肪細胞に添加すると脂肪細胞の表面に多数の小胞が接着しますが、ITGB1 を遺伝子編集でノックアウト（注9）した細胞外小胞ではほとんど接着しないことが、Nanosuit 法（注10）を用いた電子顕微鏡観察で確認できました（図1）。

ここまでの結果から、膵がん由来の細胞外小胞は ITGB1 と ITGA6 を高発現していることが多く、その結果として脂肪細胞へ伝播しやすいことが膵がん患者で高度な脂肪分解が起き一つの要因ではないかと考えられました。しかしながら「健常者の血液中の細胞外小胞と膵がん患者の血液中の細胞外小胞ではこれらのインテグリンの発現量には差がない」という既報もありました。この不一致を説明するためには、従来行われているような血液中の細胞外小胞の集団を一括で解析する手法ではなく、がん由来と考えられる細胞外小胞だけを特異的に単離して解析する必要があると考えました。そこで、膵がんの血清マーカーとして臨床的によく使われている糖鎖抗原 CA19-9（注11）に着目し、膵がん由来の細胞外小胞にも CA19-9 が発現していることを確認後、抗 CA19-9 抗体を用いた免疫沈降法（注12）によって CA19-9 を持つ膵がん細胞由来の細胞外小胞のみを単離濃縮する方法を確立しました。その結果、血中の細胞外小胞を一括で解析したときに比べて、がん由来の細胞外小胞を対象とした解析では、ITGB1 と ITGA6 を発現する細胞外小胞の割合が有意に多いことを確認できました（図2）。

【社会的意義・今後の展開】

以上の結果から、膵がん由来の細胞外小胞の表面に ITGB1 と ITGA6 が高発現していることが脂肪分解惹起に重要であることが示されるとともに、がん由来の細胞外小胞のみを特異的に単離して解析すると、不均一な細胞外小胞集団を一括解析するだけでは分からなかった精緻な結果が得られることが示されました（図3）。今後、このような特異的な細胞外小胞の単離解析とそこへの介入法開発を進めることで、病態に関わる新たな知見の取得や新たな治療法の創生につながる可能性があると考えられています。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Clinical and Translational Medicine*」（オンライン版：10月31日）

論文タイトル：Lipolysis by pancreatic cancer-derived extracellular vesicles in cancer-associated cachexia via specific integrins.

著者：柴田智華子、大塚基之*、清宮崇博、岸川孝弘、石垣和祥、藤城光弘

*：責任著者

DOI 番号：10.1002/ctm2.1089

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 消化器内科

病院診療医 柴田 智華子（しばた ちかこ）

講師 大塚 基之（おおつか もとゆき）

<広報担当者連絡先>

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター

担当：渡部、小岩井

電話：03-5800-9188（直通） E-mail：pr[at]adm.h.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

電話：03-5214-8404 FAX：03-5214-8432 E-mail：jstkoho[at]jst.go.jp

<JST事業に関すること>

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ

保田 睦子（やすだ むつこ）

電話：03-3512-3524 FAX：03-3222-2064 E-mail：crest[at]jst.go.jp

7. 用語解説：

注1）悪液質・がん悪液質： 悪液質とは体重減少や筋肉量減少、脂肪量減少といった症候を呈する病態のことである。このうちがん患者で見られる悪液質は、がんに伴う病態の一つで、がんの予後悪化因子とも捉えられており、新たな介入法の開発が求められている。

注2）細胞外小胞： 血液中にはさまざまな細胞が放出する径 70-160 nm 程度の小胞が多数存在する。これらの細胞外小胞は多彩な生理活性物質を包含しており、それを他の細胞に伝播することで細胞間の情報伝達の役割を担っていると考えられている。

注3）接着因子： 細胞と細胞、細胞と基質など、何かと何かの接着を介在する因子。多数の分子が知られているが、インテグリンは接着因子のなかの一つのファミリーを形成する。

注4）支持療法： がんに伴う症状や併発症、副作用、後遺症などを予防や緩和するための治療法。がん治療において、がんそのものに対する治療も重要であるが、支持療法も実際のがん患者のケアにおいては重要である。

注5）cAMP： サイクリックアデノシンモノリン酸。多くの細胞内情報伝達経路でセカンドメッセンジャーとして使われ、特定の基質タンパク質のリン酸化を担う cAMP 依存性プロテインキナーゼを活性化。脂肪細胞では cAMP 量が増えることによって、プロテインキナーゼ A の活性化、ホルモン感受性リパーゼの活性化が起きる結果、脂肪滴が分解されグリセロールが放出される。

注6) レポーター小胞： 細胞外小胞の体内分布を可視化するために、本研究では細胞外小胞内に含有される蛋白の一つ **beta-actin** の末端に特殊なペプチドを連結した細胞外小胞を作成した。ここでは、このペプチドに対する抗体で染色することで、この細胞外小胞がどの組織に分布しているかを判定することができる。

注7) インテグリン： 接着因子の中のファミリーの一つ。 α 鎖と β 鎖の二つのサブユニットからなるヘテロダイマーを形成し受容体として機能する。ヒトでは、少なくとも α サブユニットが 18 種類、 β サブユニットが 8 種類あり、その組み合わせはこれまでに 24 種類見つかった。

注8) ラミニン： 細胞接着因子のファミリーの一つ。は α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖が 1:1:1 で会合する。他の接着因子と比べると、ラミニンはインテグリンとの極めて高い結合活性を持つ。

注9) ノックアウト： 特定の遺伝子を欠失させる技術。最近では、遺伝子編集の手法を応用して、目的の遺伝子配列にランダムに変異を導入しその遺伝子の発現をなくす手法が用いられることが多い。

注10) Nanosuit 法： 電子顕微鏡観察で行われる高真空下でも気体と液体の放出を防ぐ特殊なコーティングをすることで、本来の生きた状態での微細構造を観察可能にする方法。

注11) CA19-9： 進行したがんでしばしば高発現する糖鎖抗原。血清で発現量を測定でき、腫瘍マーカーとして用いられる。膵臓がんでは異常高値になることが多い。細胞膜表面に位置するルイス式血液型抗原のうちルイス A 糖鎖にシアル酸が付加したシアリルルイス A が抗原の本体。血液中ではムチンとよばれる高分子のタンパク質に結合した状態でも存在する。

注12) 免疫沈降法： 目的の抗原に対して担体を付加した抗体を反応させて沈殿させることで目的の抗原とその関連物質を単離する方法。ここでは、細胞外小胞表面にある CA19-9 に対する抗体を用いて、CA19-9 を発現するがん由来と考えられる細胞外小胞のみを単離するのに使用した。

8. 添付資料：

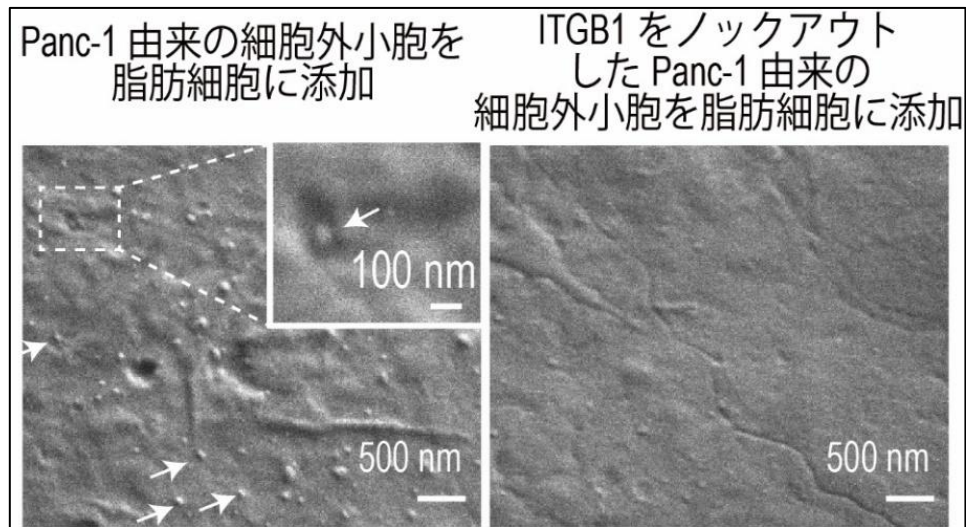


図1. ヒト脂肪細胞に膵がん細胞株由来の細胞外小胞を添加したときの電子顕微鏡像
ヒト脂肪細胞に膵がん細胞株 Panc-1 の上清由来の細胞外小胞を添加した場合（左）と、ITGB1 をノックアウトした Panc-1 由来の細胞外小胞を添加した場合（右）の、脂肪細胞表面の電子顕微鏡像。通常の細胞外小胞を添加した場合は、脂肪細胞の表面に粒状に細胞外小胞が接着しているのが分かる。一部は細胞内に入り込んでいく像も見られている（左拡大図）。一方で、ITGB1 をノックアウトした細胞外小胞を添加した場合は、脂肪細胞との接着はほとんど観察できない（右図）。

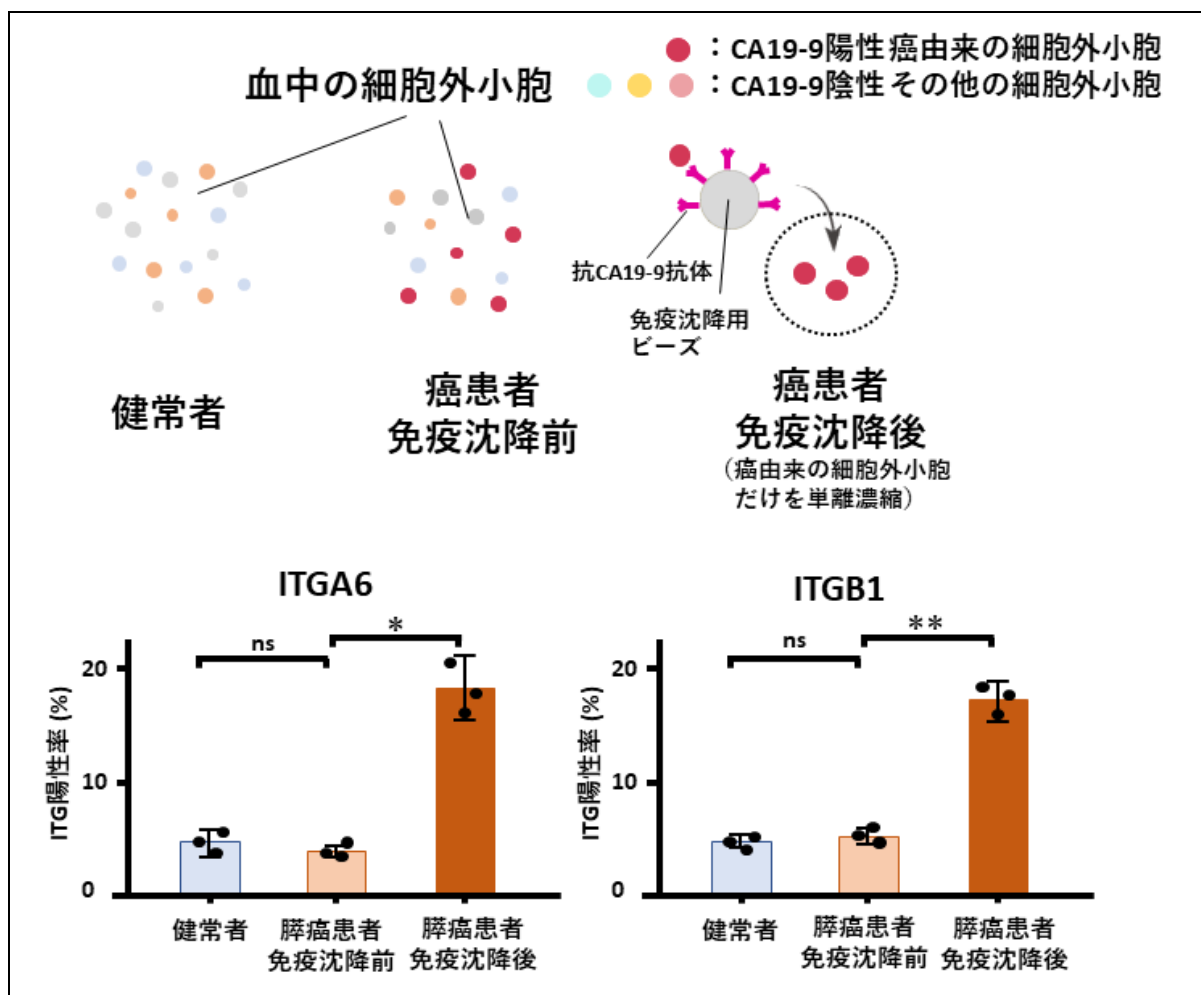


図2. 血液中の細胞外小胞の集団からがん由来の細胞外小胞のみを単離濃縮して解析
 血液中にはさまざまな細胞由来の細胞外小胞が不均一に存在する。その中から 抗 CA19-9 抗体を用いて膵がん細胞由来と考えられる細胞外小胞のみを単離した（右上部分）。それぞれの細胞外小胞集団でインテグリン発現（ITGA6 と ITGB1）の陽性率を蛍光標識してみると、免疫沈降による濃縮前のがん患者由来の細胞外小胞集団での解析では健康者から得られた細胞外小胞で解析した場合と比較して差が見られないのに対して、免疫沈降後にはその陽性率が高いことが確認できる（下段の棒グラフ）。このように、血液中の細胞外小胞群の中に占めるがん由来の細胞外小胞だけを単離して解析すると、不均一な母集団に埋もれていた精緻な事象が見えてくるものと考えられる。

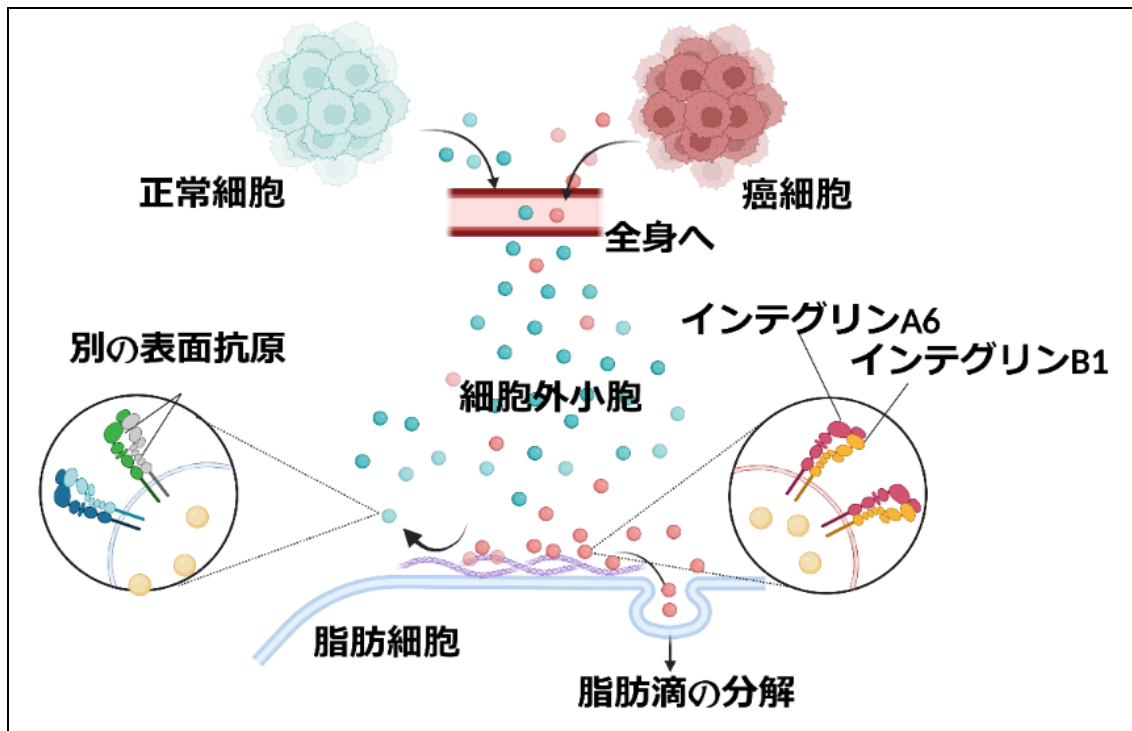


図3. がん由来の細胞外小胞は脂肪細胞に接着し脂肪分解を惹起する

血液中にはさまざまな細胞由来の細胞外小胞が不均一に存在するが、膵がん細胞由来の細胞外小胞は ITGA6・ITGAB1 を介して脂肪細胞に接着し脂肪細胞に取り込まれて脂肪分解を惹起する（図の右側）。一方、その他の細胞由来の細胞外小胞は脂肪細胞との接着は少なく脂肪細胞への影響は少ない（図の左側）。