

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06841

研究課題名(和文) 間質由来エクソソームの加齢性変化が関与するがん間質の新規発生機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel pathogenesis of cancer-associated fibroblast involved in age-related stromal exosome changes

研究代表者

梅津 知宏 (Umezu, Tomohiro)

東京医科大学・医学部・講師(特任)

研究者番号：40385547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常な間質細胞とがん間質が産生するエクソソームを比較し、腫瘍発生を抑制する正常間質由来エクソソーム含有miRNAを同定し、新規のエクソソーム治療法への応用を目指した。その結果、加齢に伴ってエクソソームに内包されるmiRNAのプロファイリングが異なることを見出した。また、若年者骨髄間質細胞が放出するエクソソームに腫瘍血管新生を抑制する効果があること、さらに、この若年者骨髄間質細胞由来エクソソームに特異的に内包されているmiR-340を高年齢者骨髄間質細胞由来エクソソームに直接導入して作成した「改変エクソソーム」でも同様の抗腫瘍血管新生能を示すことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stromal cells (BMSCs) and their exosomes are a promising area of cancer therapy; however, little is known about the age of BMSCs from which the exosomes came. Here, we investigated therapeutic effects of BMSC exosomes derived from young and elderly donors. The exosomes were isolated from conditioned medium of BMSCs. We performed exosomal miRNA profiling, and found that the donor's age decides senescent changes in BMSC, and exosomes derived from young BMSCs could block MM cell-induced angiogenesis in Matrigel plug. We also noted young BMSC-specific exosomal miRNA, such as miR-340. Of note is that the anti-angiogenic effect was potentiated by modifying exosomes of elderly BMSCs; exosomes are directly transfected with miR-340. Our results suggest that the BMSC exosomes is able to transfer the miRNAs, which have the ability to inhibit angiogenesis. The present study provides a new insight toward exosome-based cancer therapy by reconstruction of BMSC-derived exosomes.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：miRNA 細胞外小胞 骨髄間質細胞 がん微小環境 aging

1. 研究開始当初の背景

我々は、腫瘍細胞から放出される細胞外小胞(エクソソーム)における「がん微小環境」内での機能に注目し、これまでがん微小環境、特に低酸素環境に潜む腫瘍細胞において特異的に発現している miRNA(miR-135b)が、エクソソームを介して血管内皮細胞に受け渡され、HIF-1 経路を介した血管新生を亢進させることを報告し(引用文献 1)、がん微小環境における「腫瘍細胞から周辺細胞へ」という視点でのエクソソームを介した細胞間相互作用の解析を行ってきた。一方で、がん細胞は血管内皮細胞を含む周辺細胞「がん間質細胞」と情報のキャッチボールをしながらその微小環境を構築・維持している。このがん間質から放出されるエクソソームが微小環境へ与える影響も重要であると考えられる。造血器腫瘍の一種である多発性骨髄腫において腫瘍細胞の発育進展に骨髄間質細胞由来エクソソームに含有される miR-15a が関与していることが報告されている(引用文献 2)。

2. 研究の目的

がん細胞由来エクソソームの機能解析およびそれらをターゲットとした診断・治療への応用に向けた研究が進む中、「がん間質から腫瘍細胞へ」影響を与えるエクソソームの機能解析も新規エクソソーム治療戦略を考える上では今後さらに重要になると考えられた。そこで、本研究では「正常な間質細胞」と「がん間質」が産生するエクソソームとを比較し、腫瘍発生を抑制する正常間質由来エクソソームを同定すること、さらにはこれらの間質由来エクソソームを用いた新規エクソソーム治療の開発を目的とした。

3. 研究の方法

骨髄内の間質細胞を含む間葉系細胞は免疫系を制御する因子を産生して様々な傷害から生体を保護している。しかし、加齢により間質細胞の防御能力が衰退すると、腫瘍細胞の誘導により「がん間質」へと変貌して今度は腫瘍細胞の進展に加担してしまうと考えられている。そこで以下の実験を行った。

(1) 腫瘍細胞からの「がん間質誘導シグナル」の影響を受けやすくなっているのか(加齢ががん間質化の要因になっているか)?

LONZA 社から購入した若年者ドナー(19-22 歳)由来、高齢者ドナー(68-72 歳)由来骨髄間質細胞を用いて、腫瘍細胞(多発性骨髄腫細胞株: RPMI8226)とカルチャーインサートを用いた非接触型の共培養、もしくは骨髄間質細胞培養上清から単離したエクソソーム分画を添加した。腫瘍細胞の増殖および血管新生能(tube formation assay)の誘導を「がん間質」化の指標として解析した。

(2) 若年者由来間質細胞は、腫瘍細胞に対する防御能を有しているのか?

若年者もしくは高齢者由来間質細胞由来エクソソームを腫瘍細胞の培養系に添加し、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死(アポトーシス、Annexin V)の誘導を指標として解析した。

また、骨髄腫細胞(5x10⁶ 細胞)を 200μL のマトリゲルに骨髄間質細胞由来エクソソームと混合した状態でヌードマウスの皮下に移植し、3 週間後に腫瘍を回収し、血管新生能、腫瘍細胞の増殖を指標として解析した。

(3) 加齢性変化に伴う骨髄間質細胞由来エクソソームの機能解析

TaqMan PCR アレイ(ABI)を用いて、若年者由来、高齢者由来骨髄間質細胞由来エクソソーム含有 miRNA のプロファイリングを行うとともに、Exofect(SBI)を用いて候補 miRNA を導入した改変エクソソームを作成してその機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞の加齢は「がん間質化」の要因になっているか?

多発性骨髄腫細胞株 RPMI8226 との共培養を行うと、予想とは反して高齢者由来骨髄間質細胞では顕著な変化は見られなかった。一方、若年者由来骨髄間質細胞との共培養では、RPMI8226 の細胞増殖抑制、アポトーシスが誘導され、健常者由来骨髄間質細胞、特に若年者由来には腫瘍細胞の増殖抑制効果があることが分かった。

(2) 骨髄間質細胞由来エクソソームに内包された腫瘍抑制型エクソソームの同定

腫瘍細胞の増殖抑制効果の要因となる因子の同定のため、若年者由来骨髄間質細胞が分泌する因子、特に本研究ではエクソソーム内 miRNA に注目して解析を行った。その結果、若年者由来エクソソームに特異的に含有されている miRNA を 4 種類(miR-411, miR-374a, miR-340, miR-365) 同定した(図 1 参照)。

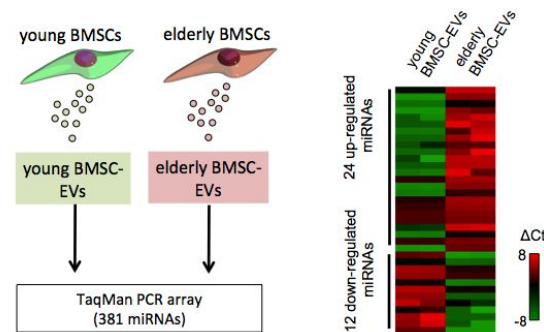


図 1. エクソソーム内 miRNA の網羅的解析

次に、高齢者由来エクソソームにこの 4 種類の miRNA 類似体を単独、または混合して直接導入し、「エクソソームの若返り」を試みたところ、miR-340 および miR-365 を導入した改変高齢者由来エクソソームにおいて若

年者由来エクソソームと同程度の抗腫瘍血管新生が得られることを見出した(図2参照)。

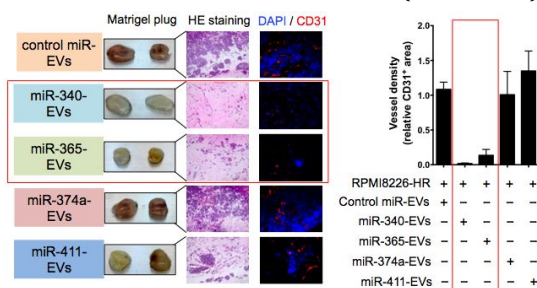


図2. 改変エクソソームの機能解析

<総括>

当初の計画では、健常者由来間質細胞を用いて「がん間質化モデル」の構築を試みたが、予想以上に健常者、特に若年者由来骨髄間質細胞の抗腫瘍効果が高く、がん間質の誘導には至らなかった。一方で、抗腫瘍効果として腫瘍細胞の増殖抑制には関与していなかったものの、腫瘍血管新生を抑制する骨髄間質細胞由来の因子、エクソソーム内 miR-340 を同定した。このような治療効果の高いエクソソーム内 miRNA の生理機能を利用した新規のがん治療法の開発へと結びつくと考えられる。今後は、患者由来骨髄間質細胞を用いて「がん間質化」メカニズムにアプローチしていくとともに、さらに骨髄間質細胞の加齢性変化とがん微小環境の関係性をより明らかにしていく。

<引用文献>

1. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1, *Blood*, 124(25), 2014, 3748-3757
2. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Tai YT, Reagan M, Ghobrial IM, BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression, *J Clin Invest*, 123(4), 2013, 1542-1555

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Ohyashiki JH, Umezu T, Ohyashiki K, Extracellular vesicle-mediated cell-cell communication in haematological neoplasms, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 査読有, 373(1737), 2018, pii: 20160484, DOI: 10.1098/rstb.2016.0484.
2. Umezu T, Imanishi S, Azuma K, Kobayashi C, Yoshizawa S, Ohyashiki K,

Ohyashiki JH, Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells with miR-340 inhibits myeloma related angiogenesis. *Blood Adv.*, 査読有, 1(13), 2017, 812-823, DOI:10.1182/bloodadvances.201600325

3. Imanishi S, Takahashi R, Katagiri S, Kobayashi C, Umezu T, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Teriflunomide restores 5-azacytidine sensitivity via activation of pyrimidine salvage in 5-azacytidine-resistant leukemia cells, *Oncotarget*, 査読有, 8(41), 2017, 69906-69915, DOI: 10.18632/oncotarget.19436.
4. Azuma K, Umezu T, Imanishi S, Asano M, Yoshizawa S, Katagiri S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Genetic variations of bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute leukemia and myelodysplastic syndrome by targeted deep sequencing, *Leuk Res.*, 査読有, 62, 2017, 23-28, DOI: 10.1016/j.leukres.2017.09.008.
5. Katagiri S, Umezu T, Azuma K, Asano M, Akahane D, Makishima H, Yoshida K, Watatani Y, Chiba K, Miyano S, Ogawa S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Hidden FLT3-D835Y clone in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia that evolved into very late relapse with T-lymphoblastic leukemia, *Leuk Lymphoma*, 査読有, 3, 2017, 1-4, DOI: 10.1080/10428194.2017.1382696.
6. Asano M, Umezu T, Katagiri S, Kobayashi C, Tauchi T, Gotoh M, Ando K, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Upregulated exosomal miRNA-140-3p in CML patients with musculoskeletal pain associated with discontinuation of tyrosine kinase inhibitors, *Int J Hematol*, 査読有, 105(4), 2017, 419-422, DOI: 10.1007/s12185-017-2199-z
7. Ohyashiki JH, Umezu T, Ohyashiki K, Exosomes promote bone marrow angiogenesis in hematologic neoplasia: the role of hypoxia, *Curr Opin Hematol*, 査読有, 23(3), 2016, 268-273, DOI: 10.1097/MOH.0000000000000235
8. Ohyashiki K, Umezu T, Katagiri S, Kobayashi C, Azuma K, Tauchi T, Okabe S, Fukuoka Y, Ohyashiki JH, Downregulation of plasma miR-215 in chronic myeloid leukemia patients with successful discontinuation of imatinib, *Int J Mol Sci*, 査読有, 17(4), 2016, 570, DOI: 10.3390/ijms17040570
9. Katagiri S, Tauchi T, Umezu T, Saito

Y, Suguro T, Asano M, Yoshizawa S, Kitahara T, Akahane D, Tanaka Y, Fujimoto H, Okabe S, Gotoh M, Ito Y, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Treatment-free molecular remission achieved by combination therapy with imatinib and IFN in CML with BIM deletion polymorphism relapsed after stop imatinib, *Rinsho Ketsueki*, 査読有, 56(2), 2015, 216-219, DOI: 10.11406/rinketsu.56.216

10. 梅津知宏、大屋敷純子、エクソソームと腫瘍血管、*血管医学*、査読無、16(29)、2015、19-24
11. 梅津知宏、大屋敷純子、大屋敷一馬、造血器腫瘍におけるエクソソームを介した細胞間シグナル伝達機構：多発性骨髄腫を中心に、*血液内科*、査読無、71(3)、2015、396-400

〔学会発表〕(計 26 件)

1. Umezumi T, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Cross-talk mediated by bone marrow stromal cells-derived extracellular vesicles, Tokyo Medical University, Institute of Medical Science, 1st International Symposium "Role of Aging and Cancer" (国際学会), 2017
2. Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Inhibition of extracellular vesicle secretion induces apoptosis of bone marrow stromal cells derived from multiple myeloma patients, The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association (JCA2017), 2017
3. Yoshizawa S, Umezumi T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Altered exosomal miRNA expression of late onset acute graft-versus-host disease in allogenic hematopoietic stem cell transplantation, The 79th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology (JSH2017), 2017
4. Ohki T, Umezumi T, Ohyashiki JH, Fukuoka Y, A statistical integrative analysis method for small size expression data of microRNAs and genes, 39th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC2017) (国際学会), 2017
5. Umezumi T, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, A role of exosomal miR-10a in bone marrow stromal cells obtained from patients with multiple myeloma, 6th Annual Meeting of International Society for Extracellular Vesicles (ISEV2017) (国際学会), 2017
6. Ohyashiki K, Asano M, Umezumi T, Katagiri S, Kobayashi C, Tauchi T, Gotoh M, Ando K, Okabe S, Ohyashiki JH, miRNA profiling of circulating extracellular vesicles in CML patients with musculoskeletal pain associated with discontinuation of tyrosine kinase inhibitors, 22nd Congress of European Hematology Association (EHA2017) (国際学会), 2017
7. Umezumi T, Imanishi S, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Inhibition of extracellular vesicle secretion induces apoptosis of bone marrow stromal cells: Towards soil-targeted therapy in multiple myeloma, 22nd Congress of European Hematology Association (EHA2017) (国際学会), 2017
8. Ohyashiki K, Saitoh Y, Imanishi S, Umezumi T, Yoshizawa S, Asano M, Fujimoto H, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Extracellular vesicles (EVs) released by bone marrow stromal cells show a distinct miRNA profile in high-risk MDS patients, The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS2017) (国際学会), 2017
9. 梅津知宏、大屋敷一馬、大屋敷純子、多発性骨髄腫における骨髄内微小環境でのエクソソームの役割、第19回癌と骨病変研究会(招待講演)、2016年11月11日、東京
10. Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Anti-angiogenic effect of normal bone marrow stromal cell-derived exosomes rejuvenated by miR-340, The 78th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology (JSH2016), 2016年10月13日~2016年10月15日、横浜
11. 梅津知宏、大屋敷一馬、大屋敷純子、がん環境を標的とした治療戦略：骨髄間質細胞由来エクソソームおよびその内包型 miRNAの役割、第8回日本RNAi研究会・第3回日本細胞外小胞学会(招待講演)、2016年08月31日~2016年09月02日、広島
12. 梅津知宏、大屋敷一馬、大屋敷純子、多発性骨髄腫における骨髄内微小環境でのエクソソームの役割、第41回日本骨髄腫学会学術集会(招待講演)、2016年05月28日~2016年05月29日、徳島
13. Katagiri S, Umezumi T, Kobayashi C, Azuma K, Tauchi T, Okabe S, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Clinical relevance of plasma miR-215 level in CML patients treated with imatinib, 7th JSH International Symposium 2016 (国際学

- 会), 2016年05月13日 ~ 2016年05月14日, Awaji
14. Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Kobayashi C, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, Towards exosome-based cancer therapy: rejuvenation of exosomes derived from normal bone marrow stromal cells, ISEV2016 (5th Annual Meeting of International Society for Extracellular Vesicles) (国際学会), 2016年05月04日 ~ 2016年05月07日, Rotterdam
 15. 大木拓也、福岡 豊、大屋敷純子、梅津知宏、miRNAとmRNAの統合解析における発現変化の閾値の最適化、第55回日本生体医工学会大会、2016年04月26日 ~ 2016年04月28日、富山
 16. Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Kobayashi C, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, Bone marrow stromal cells from young healthy donors secrete exosomes that inhibit in vivo angiogenesis in multiple myeloma, 10th AACR-JCA Joint Conference (国際学会), 2016年02月16日 ~ 2016年02月20日, Maui, Hawaii
 17. Ohayashiki K, Umezumi T, Katagiri S, Kobayashi C, Azuma K, Tsuchi T, Okabe S, Fukuoka Y, Ohayashiki JH, Down-regulation of plasma miR-215 in chronic myeloid leukemia patients with successful imatinib discontinuation, 10th AACR-JCA Joint Conference (国際学会), 2016年02月16日 ~ 2016年02月20日, Maui, Hawaii
 18. Yoshizawa S, Umezumi T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohayashiki JH, Ohayashiki K, Exosomal miRNA signature of late onset acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 第77回日本血液学会学術集会学術集会, 2015年10月16日 ~ 2015年10月18日, 金沢
 19. Umezumi T, Azuma K, Yoshizawa S, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, **Hypoxia-resistant multiple myeloma cells and their exosomes enhances angiogenesis in vivo**, 第77回日本血液学会学術集会学術集会, 2015年10月16日 ~ 2015年10月18日, 金沢
 20. Saitoh Y, Imanishi S, Umezumi T, Yoshizawa S, Asano M, Fujimoto H, Akahane D, Yamamoto Y, Kobayashi C, Ohayashiki JH, Ohayashiki K, Exosomal miRNA signature of bone marrow mesenchymal stromal cells derived from MDS patients, 第77回日本血液学会学術集会学術集会, 2015年10月16日 ~ 2015年10月18日, 金沢
 21. Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, Exosome-based therapeutic approach using exosomal miRNAs derived from bone marrow mesenchymal stromal cells, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月08日 ~ 2015年10月10日, 名古屋
 22. Azuma K, Takeuchi K, Umezumi T, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, Establishment and characterization of a novel chronic hypoxia-resistant multiple myeloma cell lines, IM-9-HR, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月08日 ~ 2015年10月10日, 名古屋
 23. Ohayashiki K, Umezumi T, Imanishi S, Ohayashiki JH, Leukemia cells under persistent hypoxia secrete exosomes enhancing angiogenesis in mice, ISEH 44th Annual Scientific Meeting (国際学会), 2015年09月17日 ~ 2015年09月19日, 京都
 24. Umezumi T, Imanishi S, Azuma K, Yoshizawa S, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, Bone marrow mesenchymal stromal cells from healthy donors secrete exosomes that inhibit in vivo tumor growth and angiogenesis in multiple myeloma, 20th Congress of European Hematology Association (EHA) (国際学会), 2015年06月11日 ~ 2015年06月14日, Vienna, Austria
 25. Yoshizawa S, Umezumi T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohayashiki JH, Ohayashiki K, Distinct exosomal miRNA expression of late onset graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 20th Congress of European Hematology Association (EHA) (国際学会), 2015年06月11日 ~ 2015年06月14日, Vienna, Austria
 26. Umezumi T, Imanishi S, Yoshizawa S, Saitoh Y, Yamamoto Y, Ohayashiki K, Ohayashiki JH, Age-related alterations in exosomal miRNAs derived from bone marrow mesenchymal stromal cells, 6th JSH International Symposium 2015 (国際学会), 2015年05月22日 ~ 2015年05月23日, 軽井沢
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
梅津 知宏 (UMEZU, Tomohiro)
東京医科大学・医学部・講師 (特任)
研究者番号: 4 0 3 8 5 5 4 7
 - (2) 研究分担者
 - (3) 研究分担者