

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15315

研究課題名（和文）癌由来エクソソームの自然免疫系による腹膜播種抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Inhibition mechanism of peritoneal dissemination of cancer-derived exosomes by innate immune system

研究代表者

徳田 彩（Tokuda, Aya）

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80814392

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウス由来大腸癌細胞株であるCT26細胞からエクソソームを収集し、エクソソームがマクロファージに及ぼす影響について検討した。マウス由来脾細胞を採取し、CT26由来エクソソームにて刺激を行ったところ、エクソソームで刺激した脾細胞ではIFN-gammaの産生が上昇し、CT26由来エクソソームはNK細胞を活性化すると考えられた。サイトカインアレイでは、エクソソーム投与群ではケモカインとIFN-gammaの上昇を認めた。マウス腹腔内細胞をがん由来のエクソソームによる刺激で、iNOSのmRNAレベルが上昇し、エクソソームが腹腔内のマクロファージのM1への分化を促進すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは、癌の増殖や転移に関わるとされ、癌細胞由来のエクソソームが特定の臓器に取り込まれることで転移前ニッチの形成に関わるとの報告がある。しかし、これらのエクソソームが癌進展における自然免疫への役割については未だ明らかではない。今回、大腸がんモデルマウスのCT26大腸がん由来のエクソソームを腹腔内投与することで、NK細胞によるIFN-gammaの産生が促進された。これらのエクソソームによる免疫の活性化は機序は、まだ明らかではないが、今後、他の癌種の腹膜転移を抑制する新しい戦略を設計する上で有益であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We collected exosomes from CT26 cells, a mouse-derived colon cancer cell line, and investigated the effect of exosomes on macrophages. When mouse-derived spleen cells were stimulated with CT26-derived exosomes, the production of IFN-gamma was increased, suggesting that CT26-derived exosomes activate NK cells. Cytokine array showed an increase in chemokines and IFN-gamma in response to cancer-derived exosome. Stimulation of mouse intraperitoneal cells with cancer-derived exosomes increased the mRNA level of iNOS, suggesting that exosomes promote the differentiation of intraperitoneal macrophages into M1.

研究分野：自然免疫

キーワード：自然免疫 大腸癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然免疫は NK 細胞やマクロファージから癌の抑制に重要な役割を果たしていることが知られている。例えば活性化した NK 細胞は癌細胞を攻撃するだけでなく、IFN-gamma などのサイトカインを産生し、T 細胞など獲得免疫を誘導することで、癌の制御に重要な役割を担っている。一方で、腹膜播種における自然免疫の重要性については未だ明らかではない。

エクソソームは、細胞から分泌される細胞外小型膜小胞であり、microRNA ( miRNA )、DNA、蛋白質を内包する。エクソソームは後期エンドソームにおいて内向きに invagination が生じることにより、多胞性小胞となり、細胞外へ開口分泌されることが知られている。自然免疫は癌の進展成長と腫瘍免疫の両面において重要であることが知られているが、癌由来エクソソームが自然免疫に及ぼす影響については十分に明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的として、癌由来エクソソームが自然免疫に及ぼす影響について NK 細胞、高救急、マクロファージなどの培養細胞やマウスモデルを用いて検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

NK 細胞、好中球、マクロファージやそれらの細胞株を用いて、癌由来のエクソソームに対する変化を検討する。増殖能、遊走能の変化、サイトカイン産生や、M1/M2 マクロファージへの分化誘導、アポトーシスの有無など、癌由来エクソソームが自然免疫系に及ぼす影響について検討を *In Vitro* で行う。また、エクソソームをマウスに投与することで、腹水中の免疫細胞の活性化について *In Vivo* で検討を行った。

### 4. 研究成果

大腸癌由来エクソソームが自然免疫に関する腹腔内微小環境のみに影響を検討するため、エクソソームの腹腔内投与を行い、腹腔内免疫環境の変化を検討した。マウスモデルにおいて、癌由来エクソソーム投与群では腹腔内洗浄液中の F4/80 陽性 CD3 陰性の細胞群の増加を認め、腹水中のマクロファージ数が増加していた。( PBS 群:  $2.51 \times 10^6 \pm 5.08 \times 10^5$  vs エクソソーム投与群:  $4.33 \times 10^6 \pm 4.11 \times 10^5$ ,  $n=12$ ;  $p=0.016$  ) このことから癌由来エクソソームが刺激となり、腹腔内のマクロファージが腹腔内に誘導されることが考えられた。マクロファージは M1 マクロファージと M2 マクロファージに分化することで、それぞれ生体内での役割が異なることが知られている。そのため、エクソソームによるマクロファージの分化について検討を行った。その結果、癌由来エクソソーム投与群では腹腔内マクロファージで iNOS の発現が上昇していた。この結果から、エクソソームは腹腔内にマクロファージを誘導し、また、そのマクロファージは M1 への分化していることが示唆された(図 1)。

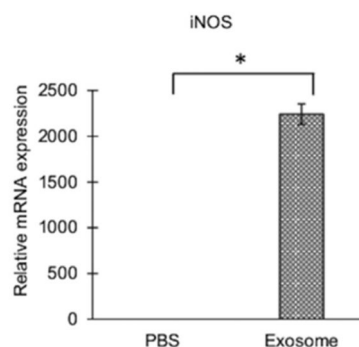


図 1: 腹腔内マクロファージの iNOS 産生  
エクソソーム投与によりマクロファージでの iNOS の増加を認めた。

エクソソームによる腹腔内免疫環境の変化の機序については、腹腔内のサイトカインなどの産生によりエクソソームが間接的に免疫細胞に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、エクソソームをマウスの腹腔内投与し、腹水を回収することで、腹水中のサイトカイン産生についてサイトカインアレイを用いて検討を行った。エクソソーム投与群ではPBS投与群と比較して、CXCL9、CXCL10、CXCL13 などケモカインと IFN-gamma の上昇を認めた(図2)。この結果からエクソソームは腹腔内でのサイトカインやケモカインの産生を介してマクロファージを誘導している可能性が示唆された。サイトカインアレイの結果から、腹水中の IFN-gamma が上昇していた事に注目した。IFN-gamma はマクロファージの M1 への誘導に重要であり、また、T 細胞の活性化を誘導し、獲得免疫への橋渡しとなる重要な因子であることから、IFN-gamma の産生機序についてさらなる解析を行うこととした。また、自然免疫において IFN-gamma を産生する細胞として NK 細胞を候補として考えた。NK 細胞は自然免疫における重要な細胞の一つで、活性化することでグランザイム B などを産生し、MHC class I の発現が低下した細胞に対して直接細胞障害活性を有するだけでなく、IFN-gamma などのサイトカインを産生することにより自然免疫の後に獲得免疫を活性化することが知られている。そこで、マウスの脾臓を採取し、脾細胞をエクソソームで刺激することで、IFN-gamma の産生について FACS を用いて検討を行った。脾細胞ではエクソソームの刺激に応じて IFN-gamma の産生がコントロールの PBS 群と比較して上昇していた。更に IFN-gamma の産生は DX5 陽性である NK 細胞から認められた。これらの結果から、エクソソームは NK 細胞を活性化することで、IFN-gamma の産生を誘導することが示唆された(図3)。

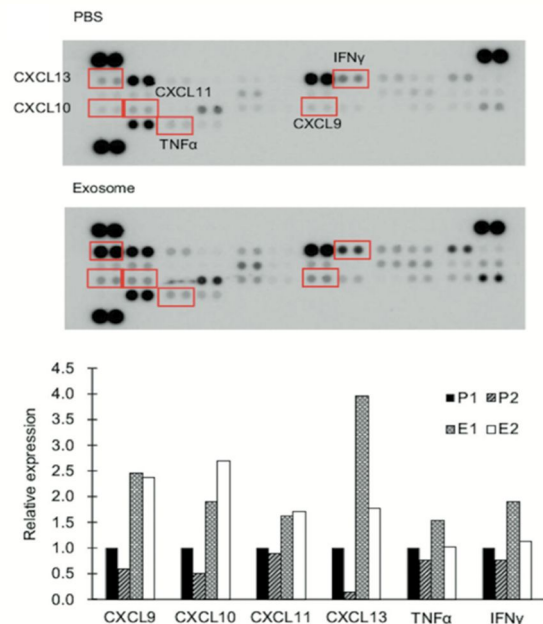


図2: 腹水中のサイトカインアレイ  
エクソソーム投与によりケモカイン産生の増加を認めた。

今回の検討から、エクソソームが腹腔内においてマクロファージを誘導することで、腹腔内免疫環境を変化させる可能性があり、実際にサイトカインやケモカインなど多様な因子の産生が増加することが示唆された。また、腹腔内に誘導されたマクロファージは M1 に分化しており、抗腫瘍効果などを示す可能性が考えられた。エクソソームで NK 細胞や脾細胞を刺激すると IFN-gamma の産生が上昇することから、これらの変化に NK 細胞から産生された IFN-gamma が関与していることが考えられた。一方で、エクソソームが NK 細胞を活性化する機序については明らかではなく、エクソソームに存在する蛋白による刺激や mirRNA などによる可能性が候補として考えられるが、その機序については今回の検討では明らかではなく、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

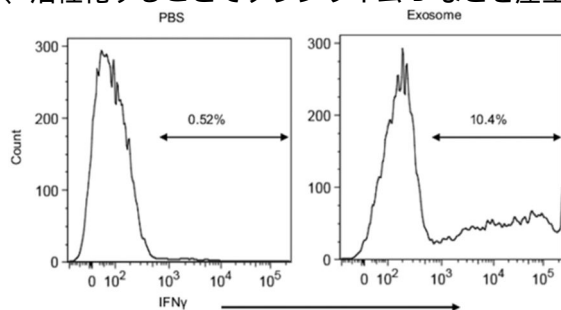


図3:脾細胞による IFN-gamma 産生  
エクソソーム投与により IFN-gamma の産生の増加を認めた。

これらの結果から、エクソソームは NK 細胞を活性化することで、IFN-gamma の産生を誘導することが示唆された(図3)。今回の検討から、エクソソームが腹腔内においてマクロファージを誘導することで、腹腔内免疫環境を変化させる可能性があり、実際にサイトカインやケモカインなど多様な因子の産生が増加することが示唆された。また、腹腔内に誘導されたマクロファージは M1 に分化しており、抗腫瘍効果などを示す可能性が考えられた。エクソソームで NK 細胞や脾細胞を刺激すると IFN-gamma の産生が上昇することから、これらの変化に NK 細胞から産生された IFN-gamma が関与していることが考えられた。一方で、エクソソームが NK 細胞を活性化する機序については明らかではなく、エクソソームに存在する蛋白による刺激や mirRNA などによる可能性が候補として考えられるが、その機序については今回の検討では明らかではなく、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TOKUDA AYA, MIYAKE TORU, YASUKAWA DAIKI, IKUTA DAIJI, MUKAISHO KEN-ICHI, MURATA SATOSHI, SHIMIZU TOMOHARU, TANI MASAJI	4. 巻 41
2. 論文標題 Cancer-derived Exosomes Activate Immune Surveillance and Suppress Peritoneal Metastasis of Murine Colonic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1327 ~ 1339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14890	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳田 彩
2. 発表標題 大腸癌由来エクソソームはM1マクロファージの誘導により腹膜播種を抑制する
3. 学会等名 バイオセラピー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aya Tokuda, Toru Miyake, Daiji Ikuta, Satoshi Murata, Ken-ichi Mukaisho and Masaji Tani
2. 発表標題 Exosomes derived from murine colon cancer cell line inhibit peritoneal dissemination in vivo.
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------