

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20969

研究課題名(和文)患者M1マクロファージ由来エクソソームを用いた新規卵巣がん核酸療法の樹立

研究課題名(英文)The establishment of a novel cancer therapy utilizing M1 macrophage derived exosomes from patients

研究代表者

清水 亜麻(Shimizu, Aasa)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10910268

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文):まず、健常人の末梢血から単球が培養できることを確認した。ただし、細胞数が十分ではなかったため、単球由来細胞株THP-1を用いて、大量のM1マクロファージを作成し、その上清よりエクソソームを分離回収した。その役割を卵巣がん細胞とT細胞に焦点を当てて解析を行った。卵巣がん細胞株に対する添加実験によりM1マクロファージ自体にがん細胞に対する細胞障害性があることを確認した。またがん細胞とT細胞の共培養実験で、エクソソーム添加により、T細胞の活性化がおり、癌細胞への殺細胞性が上昇する可能性を提示することができた。すなわち、M1マクロファージ由来のエクソソームのがん治療への有効性を提示することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では患者血液由来のエクソソームの癌治療への可能性を検討した。エクソソームの臨床応用のためには、必要時に患者から必要な量のエクソソームを抽出できることが望ましく、末梢血より腫瘍抑制的に働くエクソソームを分泌する細胞だけを分離培養しエクソソームを抽出する方法を考案した。いくつかのPreclinicalな報告はあるものの“治療用エクソソーム”はまだ世界中のどこでも実現していない。我々の研究はその先鞭をつけるものであると考えており、学術的意義は大きく今後さらなる発展が期待できる研究分野である。

研究成果の概要(英文):Exosomes can be a future drug carrier for cancer treatment, considering its specificity to cancer cells and evasion ability from immune responses. However, how to collect ample amounts of exosomes from patients remains a critical issue. Herein, we focused peripheral blood as a source of exosomes. First, we confirmed that monocytes can be cultured from peripheral blood of healthy volunteers. However, since the number of cells was not sufficient, we utilized the monocyte-derived cell line THP-1 for the collection of M1 macrophage derived exosomes. We analyzed its role by focusing on the direct effect on ovarian cancer cells and the T cell activation. M1 macrophage derived exosomes showed cytotoxicity against cancer cells. In a co-culture experiment of cancer cells and T cells, we presented that the addition of exosomes activates T cells and increases the cytotoxicity of cancer cells. In conclusion, we demonstrated the future efficacy of M1 macrophage derived exosomes for cancer therapy.

研究分野：産婦人科 婦人科腫瘍

キーワード：卵巣がん T細胞活性化 エクソソーム THP-1 M1マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は我が国において年々増加している一方で、現代でも少なくとも3分の1の患者が死亡する“致死的な”疾患である。卵巣癌におけるもっとも頻度の高い転移・再発形式は腹膜播種であり、この病態が進行すると癌性腹膜炎から腸閉塞や水腎症、腹水貯留を併発し、患者の全身状態は急速に悪化する。しかしながら、腹膜播種として再発した場合、その治療には極めて難渋し、抗癌剤治療や放射線治療は殆どの場合奏効しない。VEGFやPARP阻害剤など新規分子標的治療薬が臨床に導入されているが、まだまだ卵巣癌患者全体の生存期間を本質的に改善するような成果は得られていない。

この問題を解決するにはさらに革新的な新規分子標的治療の導入が必要不可欠である。siRNAなどの核酸医薬は癌遺伝子など特定の遺伝子を選択的に強力に抑制できるため、臨床応用できれば、卵巣癌の腹膜播種を抑制する有望な治療選択肢である。しかしながら、これらの核酸医薬をそのまま患者の腹腔内に投与しても、直ちに体液中に豊富に存在するRNAaseに分解されてしまう。核酸に修飾を加え分解されにくい構造にしても、網内系に取り込まれてしまい、病巣まで効果的に届けることができず、核酸医薬のがん治療への応用は未だ実現化していない。

そこで核酸試薬をがん組織に選択的に到達させるCarrierとして、患者細胞が放出する100nm程度の小胞であるエクソソームに着目した。エクソソーム表面にはCD47が発現しており、“Don't eat me”シグナルが伝達されるため、免疫系細胞からの貪食から逃れ血中に安定して存在できる。これまでの先行研究で、卵巣癌では初回手術の際に必ず大網を切除すること、その大網から線維芽細胞の初代培養が可能であることに着目し、大網由来線維芽細胞より抽出したエクソソームに封入したmiRNAやsiRNAが体内においても患者の免疫細胞からの捕捉やヌクレアーゼにより分解されずに比較的安定して存在し、またモデルマウスに腹腔内投与をすると専ら腫瘍特異的にエクソソームが取り込まれることを明らかにし、患者細胞由来のエクソソームが画期的な核酸のDrug Delivery System (DDS) となりうることを報告した (Biochem Biophys Res Commun. 2020 Jun 18;527(1):153-161.)。ただし、大網摘出は初回手術の一度しかできず、この方法では肝心の再発時点で新たにエクソソームを採取することができない。つまり、臨床応用のためには、必要時に患者から必要な量のエクソソームを抽出できることが望ましい。そこで、安定したエクソソームの供給のために患者末梢血を用いることを思いついた。ただし、普通に患者末梢血よりエクソソームを抽出すれば、腫瘍由来のがん浸潤を促進するエクソソームが多く混入してしまう。その問題を解決するためには、末梢血より腫瘍抑制的に働くエクソソームを分泌する細胞だけを分離培養することが鍵なのではないかと考えた。近年腫瘍抑制的にM1マクロファージ由来のエクソソームが癌ワクチンとして有望な可能性 (Mol Ther. 2017 Jul 5;25(7):1665-1675.) や抗がん剤の感受性を亢進させる (Theranostics. 2019; 9(6): 1714-1727.) ことが報告されている。そこで、患者末梢血より、単球を分離し、さらにIn vitroで腫瘍抑制的に働くM1マクロファージに分化させ、それよりエクソソームを抽出し、核酸医薬のDDSとして利用することを考案した。M1マクロファージ由来のエクソソームそのものがそれ自体がん抑制的に働くのみならず、このエクソソームをがん遺伝子に対するsiRNAのCarrierとして用いることでsiRNAによる治療効果と相乗的な治療効果が期待できる。末梢血はどのような状況の患者からも採取できるため、本法によるエクソソームの核酸治療のDrug DeliveryのCarrierとしての可能性は極めて有望である。いくつかのPreclinicalな報告はあるものの“治療用エクソソーム”はまだ世界中のどこでも実現していない。

2. 研究の目的

M1マクロファージ由来のエクソソームそのものがそれ自体がん抑制的に働くのみならず、このエクソソームをがん遺伝子に対するsiRNAのCarrierとして用いることでsiRNAによる治療効果と相乗的な治療効果が期待できる。末梢血はどのような状況の患者からも採取できるため、本法によるエクソソームの核酸治療のDrug DeliveryのCarrierとしての可能性は極めて有望である。そこで、本研究では患者の末梢血から単球を分離し、さらにIn vitroで腫瘍抑制的に働くM1マクロファージに分化させ、それよりエクソソームを抽出し、核酸医薬のDDSとして利用することが可能であるかの基礎的な検証を行うことを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 末梢血単球の初代培養およびM1マクロファージへの分化

ボランティアの健常人より末梢血10mlを採取し、Lymphocyte Separation Medium (MP Biomedicals) を用いた濃度勾配遠心法により、リンパ球を分離する。それをCD14マグネットビースでPositive Selectionし、単球を単離し培養する。培養した単球をGM-CSF (1ng/ml) およびM-CSF (10ng/ml) で5日間培養し、M0マクロファージに分化させる。さらにLPS (100ng/ml) とIFN γ (20 ng/mL) で24時間刺激することにより、M1マクロファージに分化させる。M1マクロファージであることはWestern BlotでCD68の発現とCD163の発現が消失することで確認する。

(2) 単球細胞株 THP-1 の M1 マクロファージへの分化

研究の最終的な目標は健常人の末梢血より M1 マクロファージを採取することであるが、実験系が安定するまでは、細胞株を使って検討をかさねる方針とし、そのため、単球由来の細胞株 THP-1 を培養した。THP-1 を 24 時間 PMA (150nM) で刺激した後 24 時間経過すると M0 マクロファージに分化する。それを、さらに LPS (10 ng/ml) と IFN γ (20 ng/mL) で 24 時間刺激することにより、M1 マクロファージに分化させる。

(3) M1 マクロファージ由来のエクソソームの回収

エクソソームは超遠心を用いたペレットダウン法で回収した。(1)および(2)で作成した M1 マクロファージをエクソソームを除去した 10%FBS (100000g*16 時間の超遠心で) 存在下に 48 時間培養した後に培養上清を回収した。それを 2000g*10 分の遠心および 0.2 μ m のフィルターで死細胞を除去した後に、100000g*84 分の超遠心を 2 回行ったのちに上清を除去し、残存したペレットよりエクソソームを回収した。

(4) (3)で回収したペレットがエクソソームであることの確認

(3)で回収したペレットがエクソソームであるかどうかを電子顕微鏡で確認した。また、ペレットを RIPA バッファーに溶解し、エクソソームのマーカである CD9、CD63、CD81 で Western blot を行った。

(5) M1 マクロファージ由来エクソソームの卵巣がん細胞に対する直接的な細胞障害性の検討

M1 マクロファージ由来エクソソームを卵巣がん細胞株 CAOV3 と OVCAR3 にそれぞれ 3.65 μ g・1.83 μ g・0.91 μ g を添加し(対照群は PBS)、48 時間培養後、MTS assay を行い吸光度の平均値の比を求めた。

(6) M1 マクロファージ由来エクソソームの T 細胞活性化の有無の検討

T cell activation assay (Promega)を用いて行った。卵巣がん細胞株 OVCAR3 (1 \times 10⁴/well) と TCR/CD3 Effector Cells (5 \times 10⁴/well) をエクソソームもしくは陰性コントロールとして PBS を添加し、それぞれの T 細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイで比較検討した。

4. 研究成果

(1) 末梢血単球の初代培養および M1 マクロファージへの分化

ボランティアの健常人より末梢血 10ml を採取し、Lymphocyte Separation Medium (MP Biomedicals) を用いた濃度勾配遠心法により、リンパ球を分離した。図 1 に実際の写真を示す、中央の白色の層に単核球(リンパ球、単球)と血小板が含まれる。それを CD14 マグネットビースで Positive Selection し、単球を単離し培養したところ、末梢血 9mL で 1.2 \times 10⁶ 個の単球の生細胞を回収することができた。

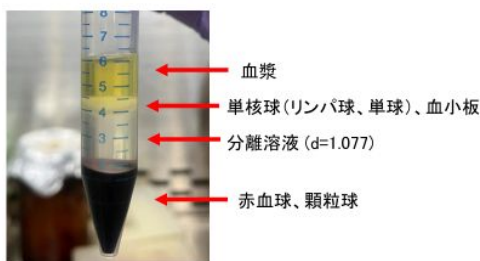


図1 Lymphocyte Separation Medium を用いた単核球、血小板の分離

(2) 単球細胞株 THP-1 の M1 マクロファージへの分化

(1)の手法で末梢血より単球を採取する手技は確立したが、エクソソーム実験を安定して行うには十分な量ではないと判断した。そこで、安定して M1 マクロファージ由来のエクソソームを確保するために単球由来の細胞株である THP-1 を使用した。THP-1 を上述した方法で(図 2A)、M1 マクロファージに分化させ(図 2B)、得られた細胞が M1 マクロファージであることを CD68 陽性、CD163 陰性で確認した(図 2C)。

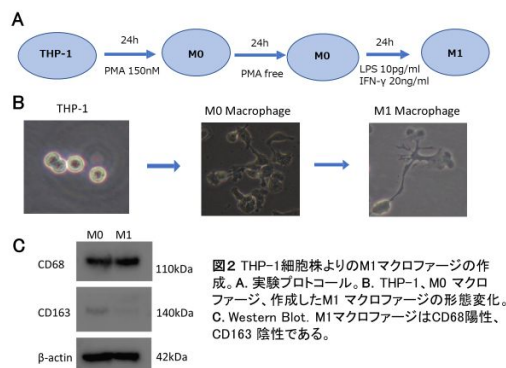


図2 THP-1細胞株よりのM1マクロファージの作成。A. 実験プロトコール。B. THP-1, M0 マクロファージ、作成したM1 マクロファージの形態変化。C. Western Blot. M1マクロファージはCD68陽性、CD163 陰性である。

(3) M1 マクロファージ由来のエクソソームの回収

THP-1 1.0×10^7 個ずつ 6 枚の 15cm Dish にまき、上述の方法でマクロファージに分化させた。そのうち、48 時間培養し、150ml の上清を回収した。それを用いて、ペレットダウン法で M1 マクロファージ由来のエクソソーム $17.5 \mu\text{g}$ を収集した (図 3)。それを以下の実験に用いた。

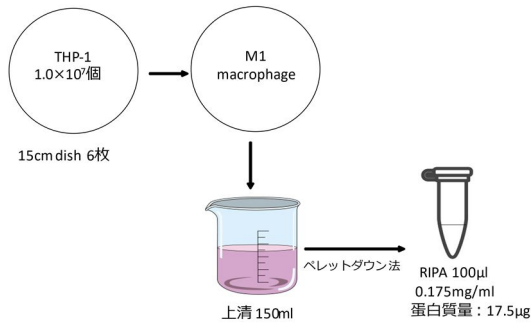


図3 M1マクロファージ由来エクソソームの作成。THP-1 15cm Dish 6枚より150mlの上清を回収し、それよりペレットダウン法でエクソソーム $17.5 \mu\text{g}$ を収集することができた。

(4) (3)で回収したペレットがエクソソームであることの確認

(3)で回収したペレットがエクソソームであるかどうかを電子顕微鏡で確認した(図 4A)。また、ペレットを RIPA バッファーに溶解し、エクソソームのマーカである CD9、CD63、CD81 で Western blot を行い、その発現を確認した(図 4B)。

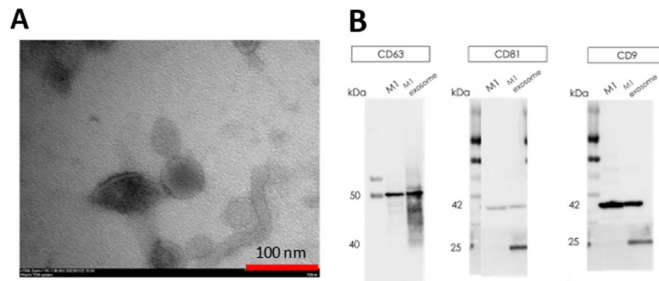


図4A M1マクロファージ由来エクソソームの電子顕微鏡画像。100nm以下の小囊胞が確認できる。B. Western Blotting. M1 マクロファージ由来のエクソソームは表面マーカーであるCD63、CD81、CD9を発現している。

(5) M1 マクロファージ由来エクソソームの卵巣がん細胞に対する直接的な細胞障害性の検討

M1 マクロファージ由来エクソソームを卵巣がん細胞株 CAOV3 と OVCAR3 にそれぞれ $3.65 \mu\text{g}$ ・ $1.83 \mu\text{g}$ ・ $0.91 \mu\text{g}$ を添加し(対照群は PBS)、48 時間培養後、MTS assay を行い吸光度の平均値の比を求めた。特に OVCAR3 細胞株でエクソソーム添加により生細胞数の減少を確認でき、M1 マクロファージ由来エクソソームには細胞障害性がある可能性が示唆された。

(6) M1 マクロファージ由来エクソソームの T 細胞活性化の有無の検討

卵巣がん細胞株 OVCAR3 (1×10^4 /well) と TCR/CD3 Effector Cells (5×10^4 /well) を共培養し、エクソソームもしくは陰性コントロールとして PBS を添加し、それぞれの T 細胞の活性化をルシフェラーゼアッセイで比較検討した。結果を図 5 に示した通り、M1 マクロファージ由来エクソソームの添加により、T 細胞の活性化が誘導されている。

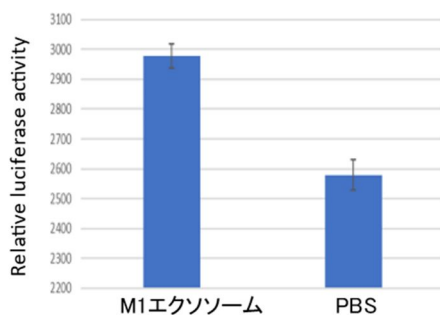


図5 T cell activation assay. OVCAR3 と TCR/CD3 Effector Cells との共培養実験。M1エクソソームとの添加により、T 細胞が活性化している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)		
研究協力者	折出 唯志 (Oride Tadashi)		

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