

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660294

研究課題名(和文)メラノーマはexosomeを介して腫瘍免疫に抵抗するか？

研究課題名(英文)The role of exosome derived melanoma cells in tumor immunity

研究代表者

野口 俊助 (Noguchi, Shunsuke)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：10701295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマ細胞由来exosome内には制御性T細胞への分化を促進するTGF- β が内包されていることが明らかとなった。このことはメラノーマ細胞がexosomeを介した抗腫瘍免疫活性を有していることを示唆している。細胞から分泌されたexosomeを可視化することは、exosomeの細胞間コミュニケーションに果たす役割を明らかにするために重要であるため、exosomeマーカーであるCD9に着目し、pEGFP-N1プラスミドベクターを用いてCD9/GFP融合タンパクを発現するベクターを作製した。このベクターを利用することで、今後exosomeの動態をより詳細に検証することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that TGF- β , which promotes the differentiation of T cells to regulatory T cells, was included in the exosomes derived from melanoma cells. This finding indicates that melanoma cells inhibit anti-tumor immunity via exosome secretion. Visualization of exosomes is important to elucidate the role of exosomes in cell to cell communication. Therefore, we constructed the expression vector of CD9/GFP fusion protein using pEGFP-N1 vector. This vector makes us trace exosomes in vitro and in vivo.

研究分野：獣医臨床腫瘍学

キーワード：エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、従来の外科治療、化学療法、放射線治療という3大がん治療に加え、第4の治療法としてがん免疫療法が登場した。がん細胞は様々なメカニズムを通して宿主のがん免疫から逃避する。がん免疫において細胞障害性T細胞(CTL)が中心的な役割を担っているが、その細胞膜上に発現する免疫チェックポイント分子(PD-1やCTLA-4といった受容体)が、がん組織において刺激されることで細胞障害活性が減弱される。がん免疫療法では、免疫チェックポイント分子に対する抗体医薬を用いることで、がん組織内のCTLの活性化を促し、メラノーマなどにおいて著効を示している。

Exosomeは直径100nm以下の分泌膜小胞であり、様々なタンパクやmicroRNAをはじめとする核酸を含んでいる。exosomeを互いに受け渡すことにより、細胞間のコミュニケーションツールとして利用されていることが示唆されている。特に、がん組織の微小環境内においてはニッチ形成に重要とされる。

このような背景を基に、がん細胞が免疫により排除されることから逃れるメカニズムにおいて、がん細胞から分泌されるexosomeが重要な役割を担っているのではないかと考えた。

さらに、メラノーマにおいて低発現しておりがん抑制遺伝子として機能するmicroRNA(miR)-203はexosomeの産生に重要なRab27aを発現低下させることから、exosomeを介した抗免疫活性においてmiR-203が関与していることも考えられた。

2. 研究の目的

メラノーマ細胞由来exosomeがCTLの活性に及ぼす影響を検証するとともに、exosomeを介した抗腫瘍免疫活性におけるmiR-203の関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

exosome内のタンパク発現の検証

Total exosome isolation (from cell culture media)を用いて、ヒトメラノーマ細胞培養上清中からexosomeを単離した。ヒトメラノーマ細胞として、A2058、Mewo、およびcoLo679を用いた。その後、定法に従いタンパク抽出後、ウェスタンブロッティングによってPD-L1(PD-1受容体リガンド)、CD80(CTLA-4受容体リガンド)およびTGF- β の発現を検証した。細胞培養には10%のexosome free FBSを含むメディウムを使用した。プラスチックにて6日間培養し100%コンフルエント

になった段階で培養上清を回収し、2000g、30分間の遠心により細胞のデブリスを除去した後、使用するまで-80で凍結保存した。

miR-203導入によるexosome分泌量の変化の検証

メラノーマ細胞にmiR-203(20nM)をトランスフェクションし、十分に効果が発揮されたタイミングで(48hr後)培養上清を回収した。miR-203のトランスフェクションにはLipofectamine RNAiMaxを用いた。Exosomeを分離後PBSに浮遊させ、Nanosightによる直径100nm前後の粒子数の計測およびウェスタンブロッティングによるexosomeマーカー(CD9、TSG101、およびAlix)の発現量検証によりexosome分泌量の変化を推定した。

CTLの活性に対するexosomeの効果

ヒト末梢血より単核球分離を行い、セルソーターでCD8陽性CTLを分離した。その後、*in vitro*でCTLを活性化し、メラノーマ細胞を共培養し、LDH放出試験によりCTLの活性を定量した。

Exosomeの動態解析

Exosomeを可視化するためにCD9/GFP融合タンパクを発現するベクターを作製し、A2058細胞へ導入、安定的に発現する細胞株を作製した。同細胞の培養上清よりTotal exosome isolation (from cell culture media)でexosomeを分離後、さらにExosome human CD9 isolation reagentによりCD9発現exosomeのみを回収した。まず、メラノーマ細胞の培養上清にCD9/GFP陽性exosomeを添加し、細胞への取り込みを共焦点顕微鏡で確認した。

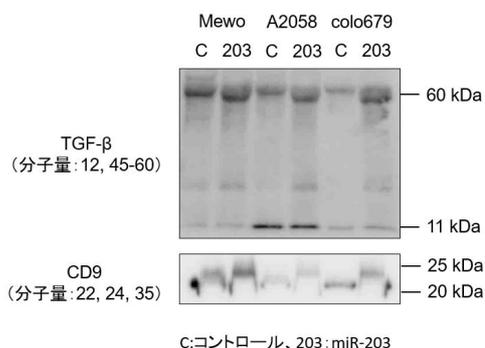
4. 研究成果

メラノーマ細胞由来exosomeにはTGF- β が内包されていることが明らかとなった。しかしながら、PD-L1およびCD80の発現は認められなかった(下図)。この結果より、予想通り、メラノーマ細胞によるがん免疫からの逃避メカニズムにexosomeが関与していることが示唆された。

miR-203導入によって、exosome分泌量が減少することが予想された。しかしながら、miR-203導入細胞のexosomeにおいて発現するCD9の分子量に変化がみられたが、exosomeの分泌量はNanosightおよびウェスタンブロッティングによって明らかな変化は認められなかった(下図)。これらの結果より、過去の報告とは異なり、メラノーマにおいてはexosomeの産生にRab27a以外の分子の関与が重

要であることが示唆された。

メラノーマ細胞由来exosomeにおけるタンパク発現



Nanosightによって解析した直径100nm前後の粒子数

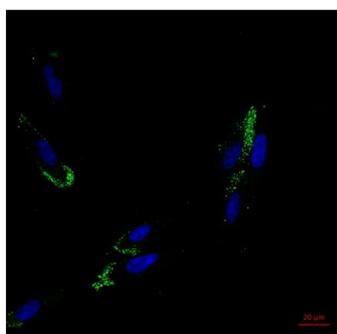
	Cont	miR-203	miR-203i
A2058	2.51 x 10 ⁸	2.72 x 10 ⁸	1.59 x 10 ⁸
Mewo	3.38 x 10 ⁸	3.88 x 10 ⁸	4.84 x 10 ⁸

miR-203i: anti-miR-203

メラノーマ細胞に対する CTL の細胞障害活性がうまく誘導されないため、現在 CTL の活性化のためのペプチドについて種類を変えて検証中である。また、メラノーマ細胞由来 exosome には TGF- β が主に内包されていることから CTL のみならず CD4 陽性 T 細胞の制御性 T 細胞への分化を検証する必要があると考えられた。

pEGFP-N1 ベクターに CD9 の ORF を挿入し、CD9/GFP 融合タンパク発現ベクターを作製した。メラノーマ細胞に導入し、CD9/GFP を安定的に発現させた。GFP 発現にばらつきがみられたので、セルソーターにより GFP 高発現細胞のみを分離し、実験に用いた (A2058/CD9/GFP)。A2058/CD9/GFP 細胞の培養上清より CD9 陽性 exosome を免疫沈降により回収した。同 exosome をメラノーマ細胞培養上清に添加すると、細胞質に取り込まれたことが共焦点顕微鏡下の観察で明らかとなった (下図)。

A2058細胞培養上清にCD9/GFP陽性exosomeを添加後の共焦点顕微鏡像



今後、この exosome を用いることで *in vitro* および *in vivo* において exosome の動態を解析することが可能となった。

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 1件)
Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor-1-mediated suppression. Yamada N, Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Akao Y. Oncotarget, 2016, doi: 10.18632.査読有.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権] 出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
現在準備中である。

6. 研究組織

(1)研究代表者
野口 俊助 (NOGUCHI, Shunsuke)
山口大学共同獣医学部・准教授
研究者番号：10701295

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者

赤尾 幸博 (AKAO, Yukihiro)

岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究
科・教授

研究者番号：00222505