

令和元年6月20日現在

機関番号：32206

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07059

研究課題名(和文) 骨髄異形成症候群におけるエクソソーム性細胞間相互作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cell-cell interaction in myelodysplastic syndromes via tumor exosome

研究代表者

澁田 樹 (Shibuta, Tatsuki)

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・助教

研究者番号：20799192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)が放出するエクソソームが他の細胞に及ぼす影響を解明するため、MDS由来細胞株の培養上清からエクソソームを回収し他の細胞の培養液に添加後、エクソソームを取り込んだ細胞内のmiRNAおよび産生したサイトカインを測定した。健康人末梢血から分取した制御性T細胞はMDS細胞由来エクソソームを十分に取り込み、エクソソームに含まれていたmiRNAを高発現していることがわかった。また制御性T細胞培養上清中のIL-10の量が増加しており、MDS細胞由来のエクソソームは免疫機能に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)は多くの症例で遺伝子・染色体異常が見られるが、慢性に進行し最終的には骨髄性白血病へと進展する。通常ごく少量の腫瘍細胞は免疫システムにより排除されるが、このような慢性腫瘍で排除が進まない原因が不明であった。本研究により、腫瘍細胞自身が免疫システムに干渉し排除を逃れている可能性が示唆された。エクソソームを標的とした新たな創薬・診断薬の開発を目指すことで、MDSの早期診断・病態進展の抑制が期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming at the elucidation of the effects of exosomes derived from tumor cells in myelodysplastic syndromes, we analyzed miRNAs and cytokines in various cells that took up MDS-exosomes. After adding exosomes to each cell culture, these exosomes were most abundant in regulatory T cells (Tregs). Besides, Tregs highly expressed miRNAs which were included in MDS-exosomes. The amount of IL-10 was increased in supernatant of Tregs culture, and the expression of IL-10 mRNA was also increased in Tregs. These data suggested MDS-exosome affects the immune system of patients.

研究分野：病態検査学

キーワード：MDS Exosome miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(Myeloid Dysplastic Syndrome, 以下 MDS)は様々な染色体異常, 遺伝子発現異常を含む難治性造血器疾患である。我が国では近年増加しつつあり, 年間 5,000 例以上が発症し, その多くは 60 歳以上の高齢者である。急性白血病への移行後に診断されるケースも少なくなく, 高齢化が進行している中で本疾患の詳細な病態解明および早期診断や効果的な薬物療法の開発が急務である。

MDS においては 5-Azacitidine が著効することもありエピジェネティクス研究やスプライシング異常の研究が中心であるが, 体内では腫瘍細胞も正常細胞と同様に他の細胞と複雑なネットワークを形成しており, 病態形成メカニズムの 1 つとして解明していく必要がある。その中でも腫瘍細胞が放出する「エクソソーム」はバイオマーカーとしての有用であることが報告されている他, 造血微小環境(造血ニッチ)中では細胞間相互作用の手段として用いられている可能性がある。エクソソームはさまざまな細胞が放出する直径 100nm 程度の小胞であり, タンパクや mRNA, 低分子 RNA 等を内包している。他の細胞にエンドサイトーシスで取り込まれることにより, その細胞の形態や機能に影響を与える生理活性を保有している。

エクソソームを含め, 造血微小環境の病態形成メカニズムへの関与について急性骨髄性白血病での報告は数多くあるが, MDS ではほとんど研究されておらず未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では, MDS 由来の細胞株が放出するエクソソームを介した細胞間相互作用の解析を実施し MDS の病態解明を行うことを目的とした。

具体的には, MDS 由来の細胞株が放出したエクソソームおよびエクソソームを添加された細胞内の miRNA 発現を網羅的に解析し, さらにこれらの細胞において増殖能やサイトカイン分泌等の細胞機能の変化を測定することにより, MDS における異常芽球が他の細胞に影響を与え自身の生存・増殖能を高めているかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの回収・純化

培養後の MDS 由来株化細胞(MDS-L)上清からエクソソームを超遠心法(Optima™ MAX, Beckman Coulter)を用いて回収した。また高収量が必要な際には miRCURY® Exosome Cell/Urine/CSF Kit (Qiagen)を用いて回収した。培養上清は 10,000 x g で細胞残渣を取り除いた後さらに 0.45µm のフィルターを通して細胞成分を取り除いた。

(2) エクソソーム回収の確認

エクソソームが回収できているか確認するために, PE 標識 CD63 抗体および FACS Aria II Cell Sorter (Becton Dickinson)を用いてエクソソームの純度を測定した。

(3) 共培養およびエクソソーム添加培養

MDS 由来株化細胞と線維芽細胞(HUC-Fm)および健康人末梢血より分取した制御性 T 細胞(Treg)とを Transwell(Corning)を使用して共培養した。

また培養液 30mL を用いて(1)の方法で得られたエクソソームを同様に線維芽細胞および Treg 細胞の培養液に添加して培養した。添加するエクソソームは PKH67(Sigma Aldrich)で標識した。

培養はどちらも 37°C で 24 時間行った。

(4) miRNA の抽出および qRT-PCR

各細胞および回収したエクソソームから Nucleospin miRNA(タカラバイオ)を用いて miRNA を抽出した。MultiScribe™ Reverse Transcriptase および TaqMan MicroRNA Assays, 7500 Fast Real-Time PCR Systems (いずれも Thermo Fisher Sci.)により miRNA qRT-PCR 解析を実施した。

mRNA については標的遺伝子に対するプライマーを設計・合成した後, PrimeScript™ RT reagent Kit および TB Green® Premix Ex Taq™ (いずれもタカラバイオ), 上記 Real-Time PCR Systems を使用して発現解析を行った。内部コントロール遺伝子として GAPDH を同時に測定した。

(5) miRNA の網羅的解析

抽出された miRNA について Genopal®(三菱ケミカル)を使用して網羅的な発現解析を実施した。Genopal は発癌との関連が報告されている約 200 種の miRNA を検出できるオリゴが搭載された DNA チップであり, 既知濃度の spike in control を用いて各サンプル間の補正を行った。

(6) 培養上清中 IL-10 定量

Treg 細胞の培養上清中の IL-10 を ELISA 法により測定した(Human IL-10 detection Kit, Chondrex)。

4. 研究成果

(1) エクソソームの回収 FCM

MDS 由来の株化細胞を 30mL, 3 日間培養し, その培養上清と沈殿試薬を用いてエクソソームを回収後した。

PE 標識 CD63 抗体で純度を確認したところ陽性率は 90%を超え(平均 91.5%), 今回用いた方法で概ね回収できていると考えられた(図 1)。小胞のサイズが小さくフローサイトメトリーによる解析では夾雑物の混入が避けられなかった。

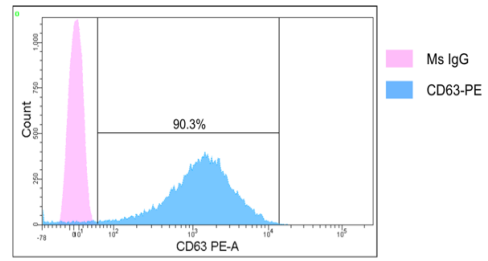


図 1 エクソソーム純度測定

(2) エクソソーム局在解析

(1)の方法により得られたエクソソームを PKH67 により標識し, Treg 細胞および線維芽細胞の培養液(3mL)に添加した。線維芽細胞ではエクソソームの取り込みがほぼ見られなかった。一方, Treg 細胞では細胞質内に標識物が充満しており, MDS 細胞由来のエクソソームが十分に取り込まれていることが分かった。今回の実験系では添加するエクソソームの量が多かったため, 細胞質内に均一に分散していたと考えられる(図 2)。

Transwell を用いた共培養についてはエクソソームの標識が困難なため, 局在解析を実施しておらず RNA 発現解析のみを実施した。

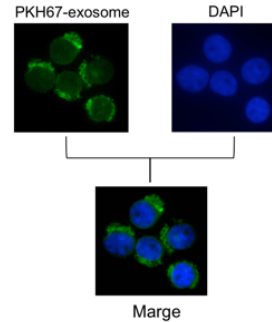


図 2 エクソソーム局在解析

(3) 網羅的解析

MDS 由来のエクソソームから miRNA 抽出し, miRNA の有無を網羅的に解析したところ DNA チップに搭載されている約 200 種の miRNA のうち, 14 種についてはエクソソームに含まれていることが分かった。

次いでエクソソームを添加した Treg 細胞から miRNA を抽出し同様に網羅的に発現を解析した。非添加の Treg に比べ上記の 14 種の miRNA うち 9 種で発現増加が確認された。(図 3)

さらに 1:1 の共培養系で得られた Treg 細胞について同様の解析を実施したところ, エクソソームを添加した場合よりも発現量は低いが, 同じ 9 種の miRNA で発現が増加していることが判明した。

Targetsan(http://www.targetsan.org/vert_72/)によりこれらの miRNA が標的とする mRNA を調べたところ, 5 つが IL-10 発現に関わる遺伝子を標的としていたことから次に IL-10 の定量解析を実施した。

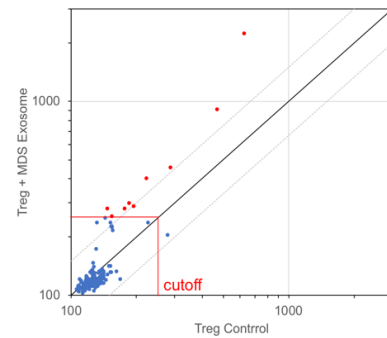


図 3 Treg 細胞内 miRNA 網羅的解析

(4) IL-10 解析

エクソソーム添加培養した Treg 細胞の培養上清に存在する IL-10 を ELISA 法により測定した。エクソソームを添加することにより培養液中の IL-10 の量は約 1.6 倍に増加していた(図 4 左)。

また同時に Treg 細胞も回収し IL-10 mRNA の発現も定量的に解析した。非添加の Treg 細胞に対し, 約 2.7 倍増加しておりタンパク量と相関した結果が得られた(図 4 右)。

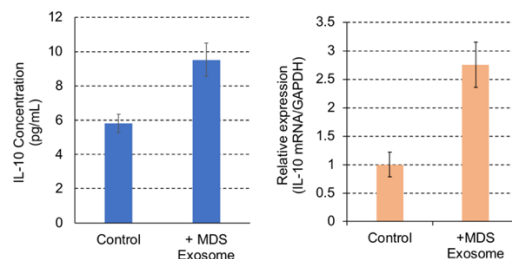


図 4 Treg 細胞 IL-10 定量解析結果
左) 培養上清中 IL-10
右) 細胞内 IL-10 mRNA

以上の結果より, MDS 細胞は放出するエクソソームを利用して miRNA を Treg 細胞に伝播し, Treg 細胞の IL-10 産生に影響を及ぼしていることが判明した。

IL-10 は免疫系に対し抑制的に機能するサイトカインであり, MDS 細胞が免疫系からの排除を逃れ慢性的に進行している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Shiotsu H, Okada K, Shibuta T, Kobayashi Y, Shirahama S, Kuroki C, Ueda S, Ohkuma M, Ikeda K, Ando Y, Matsui H, Kayamori Y, Umemura T
The Influence of Pre-Analytical Factors on the Analysis of Circulating MicroRNA.
MicroRNA, 7(3), pp 195-203, 2018
DOI: 10.2174/2211536607666180709143335

[学会発表] (計 9 件)

- ① Tatsuki Shibuta, Yukichi Takada, Tsukuru Umemura
Interaction via exosome miRNAs between myelodysplastic cell and normal Treg.
International Society for Extracellular Vesicles, Kyoto, 2019
- ② Yukichi Takada, Tatsuki Shibuta, Tsukuru Umemura
Circulating miR-451a is a useful biomarker for hemolysis
International Society for Extracellular Vesicles, Kyoto, 2019
- ③ 澁田 樹, 清水 穂乃香, 富安 聡, 四丸 知弥, 高田 勇吉, 梅村 創
骨髓異形成症候群におけるエクソソーム miRNA の解析
第 65 回日本臨床検査医学会, 2018
- ④ 高田勇吉, 澁田樹, 波多野真優, 古賀眞理, 四丸和弥, 富安聡, 佐藤謙一, 志村華絵,
志村華絵, 原田哲太, 梅村創, 梅村創
赤血球内エクソソームマイクロ RNA の解析
第 65 回日本臨床検査医学会, 2018
- ⑤ 四丸 知弥, 富安 聡, 澁田 樹, 高田 勇吉, 佐藤 謙一, 志村 華絵, 太田 昭一郎,
梅村 創, 大田 喜孝, 佐藤 信也
子宮体癌幹細胞を選択的に分取するための有用なマーカー探索
第 65 回日本臨床検査医学会, 2018
- ⑥ Mari Koga, Tatsuki Shibuta, Satoshi Tomiyasu, Ayaka Ishibashi, Yukichi Takata,
Takashi Kumano, Hanae Shimura, Noriyasu Fukushima, Tetsuhiro Harada,
Tsukuru Umemura
MicroRNA biomarker for atypical lymphocytosis
第 80 回日本血液学会, 2018
- ⑦ 高田 勇吉, 波多野 真優, 澁田 樹, 古賀 眞理, 志村 華絵, 梅村 創
血清 miR-451 を利用した溶血の評価
第 19 回日本検査血液学会, 2018
- ⑧ 神尾 成美, 澁田 樹, 福島 伯泰, 梅村 創, 富安 聡, 志村 華絵
健常人における Eosin-5-Maleimide(EMA)結合能検査の条件検討
第 19 回日本検査血液学会, 2018
- ⑨ Umemura Tsukuru, Tatsuki Shibuta
Exosome microRNA in Erythropoiesis
A Special Symposium “Extracellular Vesicle: Research Focus and Clinical Applications”, 2018

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。