

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15275

研究課題名(和文) ヒトT細胞エクソソームのmiRNAsによるISG誘導作用とがん間質抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of ISG-mediated suppression of mesenchymal tumor stromal cells by miRNAs in human T cell-released exosomes

研究代表者

百瀬 文康 (Momose, Fumiyasu)

三重大学・医学系研究科・産学官連携講座助教

研究者番号：20798326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はT細胞エクソソームのがん間質阻害薬を開発する過程で、エクソソームに含まれるmiRNAsの遺伝子解析を行い、Interferon-stimulated genes (ISGs)を介して間葉系幹細胞(MSC)を抑制する可能性のあるmiRNAs(miR-6089及びmiR-6090)を同定した。本研究では、両miRNA発現細胞モデルを構築し、両miRNAsのISGsやType 1 IFN関連遺伝子の誘導作用とMSCへの影響について検討した。その結果、両miRNAsはこれらの遺伝子の発現を上昇させることが明らかとなり、相互にIFN関連遺伝子に作用し、MSCの形態や増殖を左右す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

転移を伴うがん患者の生存率は、早期がん患者と比べ著しく低下する。そのため、現在がんの浸潤・転移を標的とした治療薬の早急な開発が社会的に求められている。本研究では、T細胞エクソソームに含まれるmiRNAsがISGsやIFN関連遺伝子を誘導し、がんの浸潤・転移を促進するMSCを抑制することを見出した。この様ながん間質細胞にフォーカスしたExosomal miRNAsの作用は世界的にも稀少で、がん転移機構の解明にとって重要である。本研究成果を踏まえた今後の発展により本機構が解明できれば、従来の抗がん剤とは異なる新規機序のがん浸潤・転移阻害薬を創製し、がん創薬研究が大きく進展する可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the development of inhibitors for modulation of mesenchymal tumor stroma, we have identified that the exosomal miR-6089 and miR-6090 released by human T cells have a possibility to suppress mesenchymal stem cell (MSC) activity in an interferon-stimulated gene (ISG)-mediated manner. In this study, we tried to investigate whether miR-6089 and miR-6090 induce ISGs and type I IFN-related genes, and consequently influence on MSC activities by establishing those miRNA-overexpression cell line models. As a result, miR-6089 and miR-6090 were found to enhance ISGs and type I IFN-related genes, such as IFN- $\gamma$ , expressions and influence on the proliferation and differentiation of MSCs. Our finding suggest that those miRNAs play a critical role in MSC activities in an ISG-mediated manner.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：エクソソーム miRNA 間葉系幹細胞 ISG Type-I IFN

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの浸潤・転移を標的とした治療薬の開発研究が世界各国で行われており、その中で特に注目されている新しい創薬標的のがん間質細胞がある。がん間質細胞は、TGF- $\beta$  や SDF-1 などの産生を通じてがん細胞の上皮間葉転換 (EMT) を促進し、がん細胞の浸潤・転移性の獲得を促すことが知られている。そのため、これらのがん間質細胞の働きを止めれば、がんの浸潤・転移抑制につながると考えられる。研究代表者らはマウスの CD8<sup>+</sup> T 細胞エクソソームの生理機能解析を行った結果、マウス CD8<sup>+</sup> T 細胞エクソソームががん微小環境中の間葉系幹細胞 (MSC) を抑制し、がんの浸潤・転移を抑えることを明らかにした。また、本作用にはエクソソームに含まれる miRNAs が寄与している可能性が示唆され、ヒトの活性化 T 細胞エクソソームに含まれる miRNAs の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、miRNAs (miR-6089 及び miR-6090) が Interferon-stimulated genes (ISGs) を誘導し、MSC を抑制する可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、miR-6089 及び miR-6090 高発現細胞モデルを作製し、両 miRNAs による ISGs や Type I IFN 関連遺伝子の誘導作用と MSC に及ぼす影響について検討する。その成果により、がん浸潤・転移阻害薬に向けた臨床応用の基盤構築を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず MSC 及び HEK293 細胞株を培養し、両細胞株に miR-6089 及び 6090 を組み込んだレトロウイルスベクターを感染させ遺伝子導入し、両 miRNA 発現細胞を構築した。次に、遺伝子導入した各細胞より mRNA を抽出し cDNA を作製後、リアルタイム PCR により、ISGs 及び Type I IFN 関連遺伝子の発現解析を行った。また、各細胞の培養上清を回収し、各細胞の Type I IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) 産生について ELISA により測定した。最後に、両 miRNA が細胞形態や増殖に及ぼす影響について検討するため、ギムザ染色法や xCELLigence を用いて、各細胞の動態観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) miR-6089 及び 6090 発現細胞モデルの構築

miR-6089 及び 6090 が ISGs や Type I IFN 関連遺伝子と細胞形態・増殖に及ぼす影響について検討するため、miR-6089 または miR-6090、その両 miRNAs を組み込んだレトロウイルスベクターを MSC 及び HEK293 に遺伝子導入し、両 miRNA 発現細胞モデルを構築した。その結果、各 miRNA の導入効率は、MSC 及び HEK293 とともに 40%~50%前後であった (図 1)。

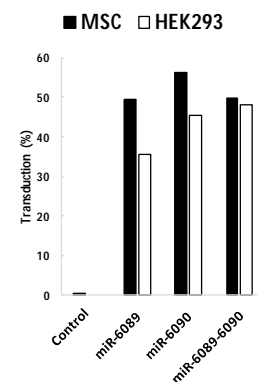
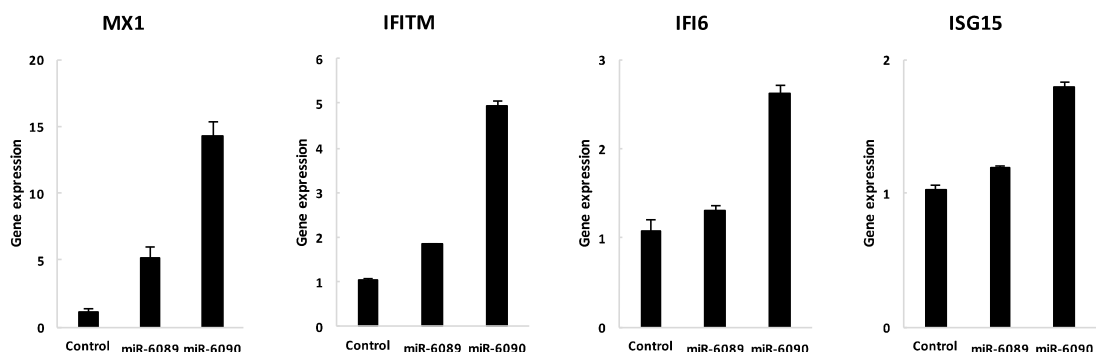


図 1 各細胞における miR-6089 及び 6090 の導入効率

#### (2) miR-6089 及び 6090 の ISGs 誘導作用

次に、miR-6089 及び 6090 の ISGs 誘導作用について検討するため、上記で構築した miR-6089 及び 6090 発現細胞の ISG 遺伝子 (MX1, IFITM, IFI6, ISG15) 発現について検討した。その結果、miR-6089 及び 6090 発現 MSC において、ISG 遺伝子の上昇が認められた (図 2A)。本作用は、どの ISGs においても miR-6089 より miR-6090 で顕著に認められる傾向にあった。一方、HEK293 においては、miR-6089 及び miR-6090 単独発現細胞では ISG 遺伝子の発現上昇は緩やかだったのに対し、両 miRNA 発現細胞では顕著に認められた (図 2B)。

#### (A)



(B)

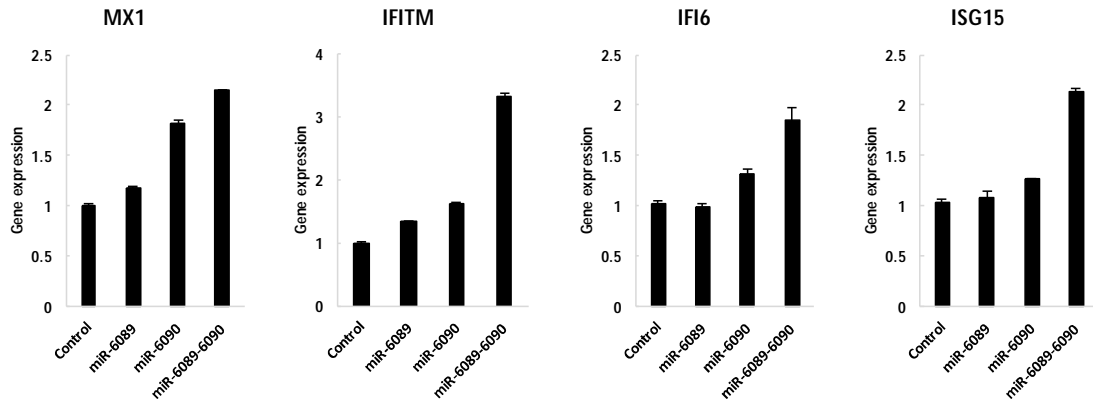
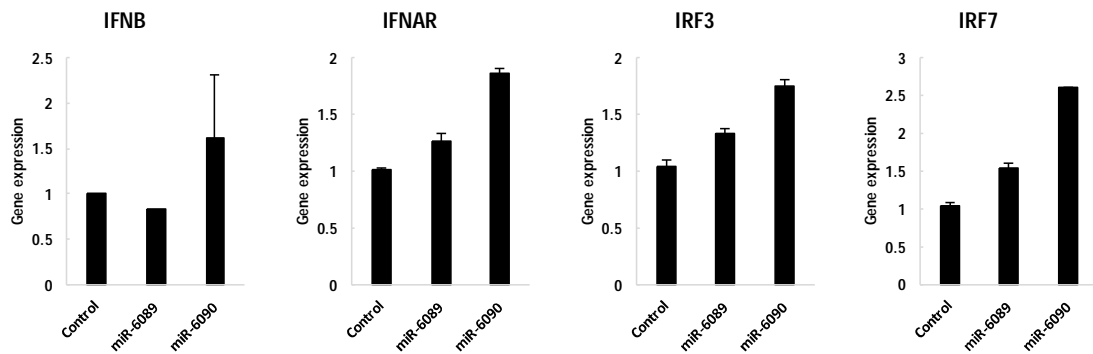


図2 各細胞における miR-6089 及び 6090 の ISGs 誘導作用

(3) miR-6089 及び 6090 の Type I IFN 関連遺伝子誘導作用と IFN 産生

次に miR-6089 及び 6090 の Type I IFN 関連遺伝子や IFN- $\alpha$ / IFN- $\beta$  産生誘導作用について検討するため、miR-6089 及び 6090 発現細胞の Type I IFN 関連遺伝子( IFNA1, IFNA2, IFNAR, IFNB )とその転写因子( IRF3, IRF7 )の発現について検討した。その結果、miR-6089 及び 6090 発現 MSC において、IFNB や IFNAR、転写因子 IRF3、IRF7 の上昇が認められた( 図 3A )。本作用は、ISGs 誘導作用と同様に、miR-6089 よりも miR-6090 において顕著に認められた。一方、HEK293 においては、ISGs 誘導作用同様、miR-6089 及び 6090 単独発現細胞では IFN 関連遺伝子の発現上昇は緩やかだったが、両 miRNA 発現細胞では顕著に認められた( 図 3B )。IFNA1、IFNA2 については、MSC、HEK293 両細胞共に検出されず、IFN- $\alpha$  及び IFN- $\beta$  産生についても認められなかった。

(A)



(B)

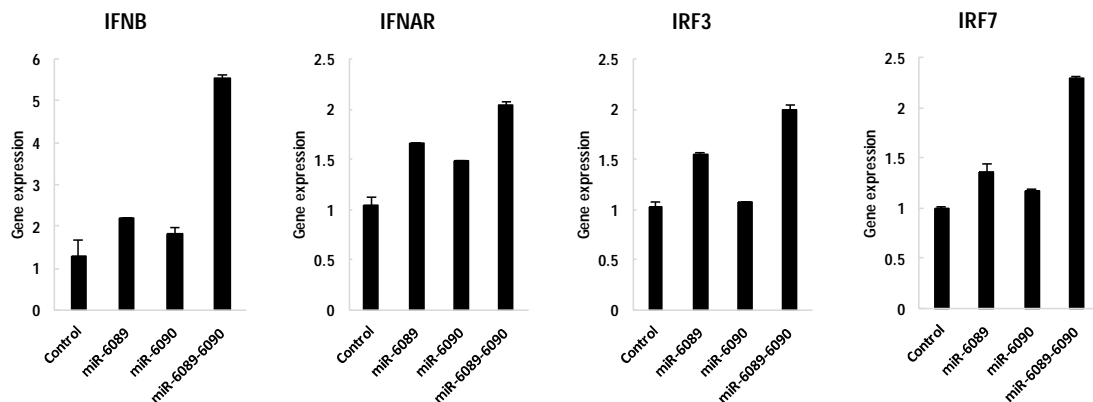
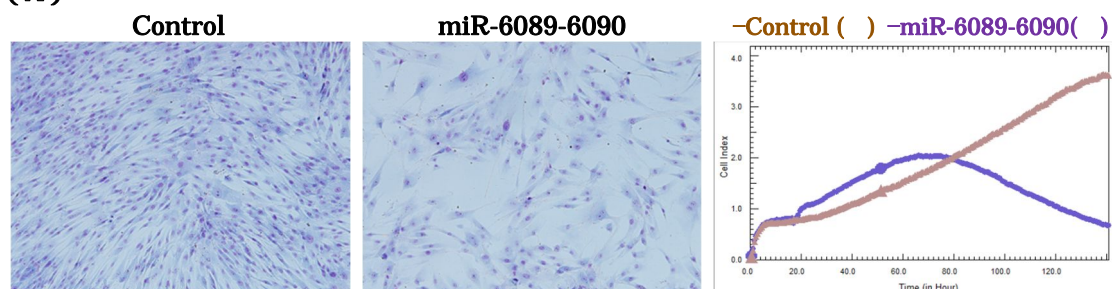


図3 各細胞における miR-6089 及び 6090 の Type I IFN 関連遺伝子誘導作用

#### (4) miR-6089 及び 6090 の細胞形態・増殖への影響

最後に、miR-6089 及び 6090 が細胞形態や増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、miR-6089 及び 6090 発現 MSC において、細胞の形態変化や増殖抑制が認められた (図 4A)。一方、HEK293 においては、同様の作用は顕著に認められなかった (図 4B)。MSC においても増殖抑制は必ずしも認められるわけではなく、miRNA 単独発現細胞で認められない場合もあった。これは遺伝子導入の際のレトロウイルス感染が各細胞の増殖に影響した可能性が示唆された。本作用は、同様の ISGs や IFN 関連遺伝子誘導作用を有する両 miRNAs が相互に作用した結果、MSC の形態や増殖に影響を及ぼした可能性が示唆された。

#### (A)



#### (B)

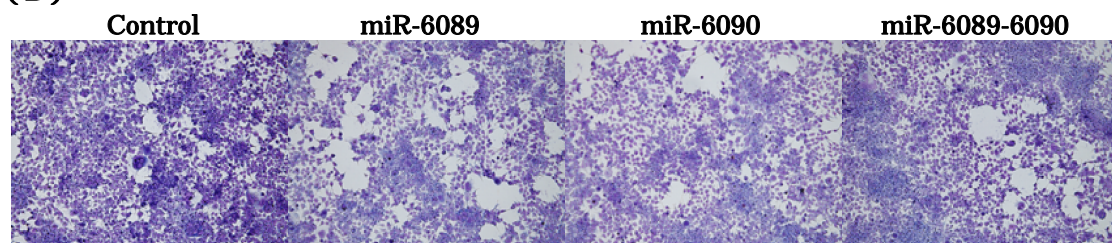


図 4 各細胞における miR-6089 及び 6090 の細胞形態・増殖への影響

以上の結果より、miR-6089 及び 6090 は MSC や HEK293 の ISGs や Type I IFN 関連遺伝子を誘導する働きがあることが明らかになった。また、本作用は miRNA 単独発現細胞よりも、両 miRNA 発現細胞において顕著に認められる傾向にあり、各 miRNA はこれらの遺伝子に相互に作用し合い、MSC の形態や増殖を左右する可能性が示唆された。

本研究を基礎とした今後の発展により、本機構についてさらに解明できれば、がん浸潤・転移阻害薬の創製が期待できる。本研究に引き続き、現在我々は本機構の詳細な解析を進めており、がん浸潤・転移阻害薬に向けた臨床応用の基盤を構築したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Park EJ, Prajuabjinda O, Soe ZY, Darkwah S, Appiah MG, Kawamoto E, Momose F, Shiku H and Shimaoka M	4. 巻 3 (1)
2. 論文標題 Exosomal regulation of lymphocyte homing to the gut	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3656-3666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2018024877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Seo N, Shirakura Y, Tahara Y, Momose F, Harada N, Ikeda H, Akiyoshi K, Shiku H	4. 巻 9:435
2. 論文標題 Activated CD8+ T Cell Extracellular Vesicles Prevent Tumour Progression by Targeting of Lesional Mesenchymal Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-02865-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naohiro Seo, Tsuguhiro Kaneda, Junko Nakamura, Fumiyasu Momose, Kazunari Akiyoshi, Hiroshi Shiku
2. 発表標題 Only a portion of the T cell-released exosomes has a capacity to destruct mesenchymal tumor stroma
3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles 2019 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬尾 尚宏, 中村 純子, 百瀬 文康, 下田 麻子, 秋吉 一成, 金田 次弘, 珠玖 洋
2. 発表標題 Preparation of human T cell-derived exosomes with high purity and quality for clinical use against advanced tumor
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬尾 尚宏, 中村 純子, 百瀬 文康, 下田 麻子, 秋吉 一成, 金田 次弘, 珠玖 洋
2. 発表標題 CTLの放出するエクソソームの一部が間葉系細胞で構成されるがん間質傷害に関与する
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬尾 尚宏, 金田 次弘, 中村 純子, 百瀬 文康, 秋吉 一成, 珠玖 洋
2. 発表標題 Relationship between diversity of CD8+ T cell exosomes and destruction of mesenchymal tumor stroma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
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
---------	---------