

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16694

研究課題名（和文）好中球に着目した、腎細胞癌特異的エクソソームによる癌微小環境制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cancer microenvironment regulation by renal cell carcinoma-specific exosomes focusing on neutrophils

研究代表者

中田 渡（Nakata, Wataru）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30648019

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）：腎細胞癌由来のエクソソームタンパクがT細胞の制御に関与しているという仮説を立て、プロテオミクスにより腎細胞癌由来エクソソームで有意に高発現する106個のタンパクを同定した。それらにはT細胞の増殖抑制に関与するPAG1、LAIR1が含まれていた。Caki-2は両タンパクを高発現している細胞株であり、Caki-2から由来のエクソソームはCD4陽性T細胞の増殖を有意に抑制することを確認した。一方、両タンパクの発現が低いその他の腎癌細胞株由来のエクソソームでは表現型の変化は起こらなかった。腎細胞癌由来のエクソソーム中のPAG1、LAIR1がCD4陽性T細胞の増殖抑制に関与してい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

我々は「腎細胞癌により、末梢血中免疫細胞の遺伝子発現プロファイルが変化する」、また、「腎細胞癌は癌特異的エクソソームを放出し、血管透過性を亢進する」こと、即ち腎細胞癌がエクソソームを介して癌微小環境を制御していることを明らかにしてきた。近年、腎細胞癌に対する免疫療法が注目されているが、好中球に着目し腎癌細胞由来のエクソソームが免疫細胞の増殖を抑制し、エクソソームが今後免疫療法の効果を高めるための治療標的となりうることを示した本研究の社会的意義は大きい。さらにプロテオミクスにより癌特異的なエクソソームタンパクを同定しており、今後さらにバイオマーカーへの応用や複合免疫療法開発など、臨床応用を目指す。

研究成果の概要（英文）：Based on the hypothesis that renal cell carcinoma-derived exosomal proteins are involved in T cell regulation, we identified 106 proteins that are significantly expressed in renal cell carcinoma-derived exosomes by proteomics. Caki-2 is a cell line that highly expresses both proteins, and we confirmed that exosomes derived from Caki-2 significantly suppress the proliferation of CD4-positive T cells. On the other hand, exosomes derived from other renal cancer cell lines with low expression of both proteins did not cause phenotypic changes. These results suggest that PAG1 and LAIR1 in exosomes derived from renal cell carcinoma may be involved in the suppression of CD4-positive T cell proliferation.

研究分野：癌免疫

キーワード：腎細胞癌 エクソソーム プロテオミクス 好中球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は「腎細胞癌により、末梢血中免疫細胞の遺伝子発現プロファイルが変化する」、また、「腎細胞癌は癌特異的エクソソームを放出し、血管透過性を亢進する」こと、即ち腎細胞癌がエクソソームを介して癌微小環境を制御していることを明らかにしてきた。近年、腎細胞癌組織中への好中球浸潤有無と予後とに関連があること、さらに、癌組織内へと浸潤した好中球は癌関連好中球(TAN)と呼ばれ、癌促進的に働くことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究ではこれらに着目し、癌特異的エクソソームによる好中球遺伝子プロファイル変化を解析し、腎細胞癌由来の癌特異的エクソソームを介した免疫細胞の制御メカニズムを分子生物学的に解明することを目的とする。さらに、免疫を制御しているエクソソーム内のマイクロ RNA(miRNA)、タンパクを同定することで、バイオマーカーへの応用や複合免疫療法開発など、臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

[1] 「ccRCC 癌組織由来エクソソームは好中球を TAN に変化させうるのか？」
ccRCC 患者末梢血を用いた microarray 解析より、ccRCC 癌細胞と好中球間では、直接あるいはエクソソームを介した間接的接触が起こることで好中球が TAN へと変化し、ccRCC の進行に寄与していると推察される。

そこで、(1) 蛍光色素 PKH26 でラベルをした ccRCC 癌組織由来エクソソームが好中球に取り込まれうるのかを検討する。(2) ccRCC 癌組織由来エクソソームが好中球の TAN マーカー発現に与える影響をリアルタイム PCR にて検討する。(3) ccRCC 癌組織由来エクソソームを取り込んだ好中球と癌細胞株を共培養することで、腎癌細胞の増殖、遊走能、浸潤能に与える影響をそれぞれ WST-1 assay、wound healing assay、invasion assay により検討し、その生理的意義を検討する。

[2] 免疫を制御している、癌特異的エクソソームに含まれる miRNA、タンパクはあるのか？

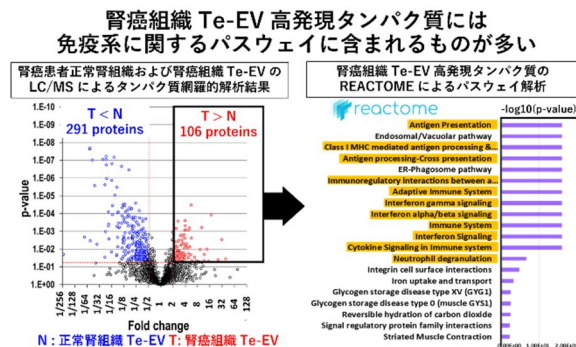
申請者はこれまでに術後癌組織(癌部・非癌部)を用い、ccRCC における miRNA および mRNA の網羅的発現解析を行っている(Nakata W, Oncotarget 2015 (28), 21645-54、Hase H, Nakata W, Mol Cancer Res. 2014 (12), 1807-17)。そこで、ccRCC 癌組織由来エクソソーム内に含まれる miRNA、タンパクと、ccRCC 癌組織自体の miRNA、mRNA 発現プロファイルを網羅的に比較することにより、ccRCC 癌組織由来エクソソーム内に特異的に含まれる miRNA、タンパクを明らかとし治療標的分子候補を同定する。

4. 研究成果

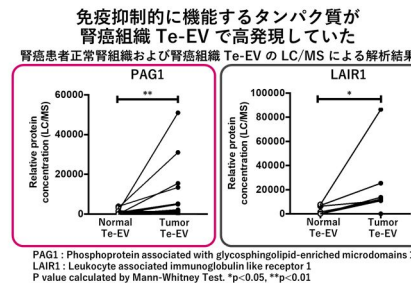
腎細胞癌はエクソソームを介して好中球を癌関連好中球(TAN)に誘導しているかを明らかにするために、まず腎癌手術検体より癌組織と正常組織をそれぞれ採取し、それらを培養液中で培養し、分泌されたエクソソームを超遠心法により

分離・回収した。組織培養液から得られた癌組織由来エクソソーム中の miRNA に着目して解析を行ったところ、腎癌組織由来、正常組織由来での発現に有意差のある miRNA は少なかった。実際この方法を用いて、回収した癌組織由来エクソソームおよび正常組織由来エクソソームを末梢血より抽出したナイーブな好中球に作用させ、その遺伝子発現変化の解析を行ったところ、有意に変動する遺伝子が同定されたものの、TAN 関連マーカーとして報告されていた遺伝子とは違っていた。以上のことから、好中球以外にも免疫細胞として T 細胞に腎細胞癌特異的エクソソームによる制御機構の解明に方針転換をした。

続いて、腎細胞癌由来のエクソソームタンパクが T 細胞の制御に関与しているか？という仮説に対し、まず腎癌特異的なエクソソームタンパクを同定すべく、腎細胞癌組織および正常腎組織から回収したエクソソームについて LC-MS/MS による比較プロテオミクスを行った。その結果、腎細胞癌由来エクソソームで有意に高発現する 106 個のタンパクを同定した（上図）。

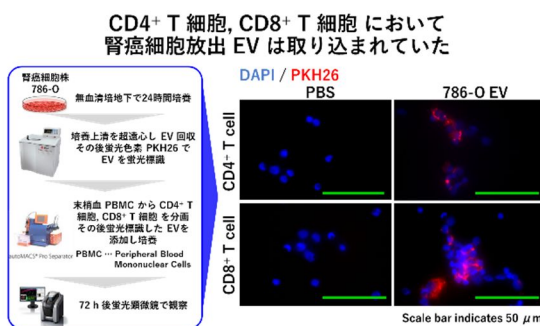


それらの中には T 細胞の増殖抑制に関与するタンパクである PAG1、LAIR1 が含まれ、さらにこれらは腎細胞癌由来エクソソーム特異的に検出されていた（右図）。



続いて、腎細胞癌由来エクソソームにおける PAG1、LAIR1 の発現を確認するために

4 種の腎癌細胞株(786-O、Caki-1、Caki-2、ACHN)由来のエクソソーム中の PAG1、LAIR1 の発現をウエスタンブロットで評価したところ、4 種の細胞株全てのエクソソームで PAG1、LAIR1 の発現が確認され、発現量は両タンパクともに Caki-2、ACHN、Caki-1、786-O の順に多かった。上記 4 種の細胞株から回収したエクソソームを、それぞれ末梢血単核細胞から抽出した CD4 陽性 T 細胞に添加したところ、Caki-2 由来のエクソソームを添加した培養液中の CD4 陽性 T 細胞の増殖が有意に抑制されることを確認した。Caki-2 以外の細胞株由来のエクソソーム中の PAG1、LAIR1 の発現量と、CD4 陽性 T 細胞の増殖抑制の効果の程度は相関していた。なお、蛍光色素 PKH26 を用いた検討により腎癌細胞株由来のエクソソームが CD4+T 細胞に取り込まれていることを確認した（右図）。



以上により腎細胞癌由来のエクソソーム中の PAG1、LAIR1 が CD4 陽性 T 細胞の増殖抑制に関与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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------