

令和 3 年 4 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19474

研究課題名(和文) エクソソームのがん間質傷害作用を利用した腫瘍浸潤がん細胞傷害性T細胞の最適化

研究課題名(英文) Optimization of tumor-infiltrating of cytotoxic T cells using capacity of the anti-mesenchymal tumor stromal cells of CD8+ T cell exosomes

研究代表者

瀬尾 尚宏 (Seo, Naohiro)

三重大学・医学系研究科・産学官連携講座講師

研究者番号：50283354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：正常マウスのCD8+ T細胞エクソソームのがん組織への投与では、がん間質の間葉系細胞傷害は観察されるものの、T細胞の腫瘍浸潤に劇的な改善が見られなかったため、がん細胞に特異性を付与したCAR-T細胞の培養上清から得られるエクソソームを用いた実験を行うこととした。CAR-T細胞エクソソームには、CARに特異的ながん細胞を傷害すると共に、CAFやMSCなどの間質細胞をも傷害するデュアル機能を持つことが明らかとなった。CAR-T細胞エクソソームがCARに特異的ながん組織の微小環境を劇的に変化させ、がん特異的なT細胞治療の補助剤になる可能性が高いと考えられ、現在研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん組織は、がん細胞からなるがん実質とがん関連線維芽細胞(CAF)や間葉系幹細胞(MSC)などからなるがん間質からなり、それらが、どのように協調しがん組織を形成し、抗腫瘍免疫応答に対する回避機構を獲得しているのかについては、未だ変わらないことが多い。本研究は、非特異的なCD8+ T細胞エクソソームからがん細胞に特異的なCAR-T細胞の放出するエクソソームへと使用するエクソソームを変更したが、エクソソームのがん間質細胞に取り込まれやすい性質は、がんの微小環境の理解を深めることはもちろん、がん治療の補助剤としての利用価値もあり、学術的にも社会的にも重要だと考えている。

研究成果の概要(英文)：Administration of normal CD8+ T cell exosomes to tumor lesions showed no dramatic improvement in T cell infiltration of tumor. We decided to conduct an experiment using exosomes obtained from the culture supernatant of CAR-T cells that had been given specificity to the tumor cells. It was revealed that CAR-T cell exosomes have a dual cytotoxic function of CAR-specific tumor cells as well as stromal cells such as CAF and MSC. CAR-T cell exosomes have a possibility to be an effective adjuvant for modulating tumor microenvironment in T cell therapy, and we are currently conducting research.

研究分野：細胞外小胞

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム がん がん間質 がん関連線維芽細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

<これまでの研究成果>

全体細胞から放出される直径 50-200 nm の脂質二重膜小胞であるエクソソームは、放出細胞由来の生理活性物質を豊富に包含し、放出細胞の近傍もしくは遠隔の標的細胞へ安定的にしかも効率的にそれら物質を送り届け、標的細胞の性質を変化させることができる (Nat Commun 2: 282, 2011; Immunity 41: 89, 2014)。エクソソームは培養上清から超遠心方で分取するのが一般的だが、これまでのエクソソーム研究の多くは、大量の培養上清が得やすいがん細胞の放出するエクソソームの機能研究である (Cancer Cell 31: 172, 2017; Cell 159: 499, 2014)。従ってがん増殖や浸潤転移といったがん進行に促進的に働くエクソソームの役割については多くの知見がある。我々は、がん細胞排除の中心として働く CD8⁺ T 細胞に由来したエクソソームが、がん進行に対して抑制的に働く可能性があると考え、その腫瘍内投与実験を行い以下の結果を得た (Nat Commun 2017, under revision)。

- 腫瘍実質のがん細胞には直接作用しない。
- 腫瘍間質を構成する間葉系幹細胞 (MSC) やがん関連線維芽細胞 (CAF) などの間葉系細胞をアポトーシス傷害する (傷害機構の一部をエクソソーム包含マイクロ (mi) RNA が担う)。
- 間葉系細胞を失った腫瘍は、浸潤能及び転移能を著しく損なう。
- 上記作用を持つ機能的 CD8⁺ T 細胞エクソソームは、正常マウスの CD8⁺ T 細胞の活性化段階の一時期に放出され、担がんマウス CD8⁺ T 細胞からは放出されない。

<近年のがん免疫療法の大きな問題点>

悪性腫瘍は、がん細胞の密集する実質と MSC や CAF に代表される間葉系細胞などで構成されるがん間質よりなり、がん間質はがん細胞の浸潤性や転移性獲得を促進する本体である (Nat Rev Drug Discov 16:35, 2017, EMBO Rep 13: 412, 2012; Nat Rev Cancer 9, 239, 2009; Curr Opin Oncol 25: 76, 2013)。CD8⁺ T 細胞はキラー T 細胞と呼ばれ、がん細胞が主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子で提示したがん抗原ペプチドをその T 細胞抗原リセプター (TCR) で認識し、強力にがん細胞を傷害できるため、がん抗原ペプチドを用いたがんワクチン研究が盛んに行われた。近年、がん細胞特異的な TCR 遺伝子やキメラ抗体遺伝子を導入した T 細胞をがん治療に応用する T 細胞移入療法が盛んだ (Cancer Cell 31: 311, 2017)。しかし、両治療法ともがん細胞特異的 T 細胞の腫瘍内遊走は観察されるが、多くの場合、標的となるがん細胞が密集する実質領域ではなく間質領域に停留する現象が観られ、これが大きな問題となっている。

2. 研究の目的

がん間質構造が維持された状態でのがん特異的 T 細胞のがん間質領域での停留は、担がんマウスの CD8⁺ T 細胞エクソソームががん間質を障害できないのと同様に、間質停留移入 T 細胞が機能的エクソソームを放出していない可能性を強く示唆する。そこで本研究では、がん特異的 T 細胞療法で腫瘍内遊走した T 細胞の機能的エクソソーム放出の有無を調べ、その腫瘍に正常マウス CD8⁺ T 細胞に由来する機能的エクソソームを投与し、がん間質崩壊と共に間質停留 T 細胞のがん実質領域への移動を観察し、その分子メカニズムを解明する。この機能的 CD8⁺ T 細胞エクソソームによる、がん間質崩壊後のがんの浸潤及び転移能阻害と間質停留 T 細胞のがん実質領域への侵入 (デュアルアクション) の解明は、機能的 CD8⁺ T 細胞エクソソームが全てのがん免疫療法の補助剤となる大きな可能性を秘めている。

3. 研究の方法

- マウス実験ががん細胞特異的ながん抗原ペプチドを用いたワクチン法やがん細胞特異的T細胞移入後の移入T細胞のがん間質遊走を腫瘍切片の免疫組織染色で確認する。さらに機能的エクソソーム非産生を、腫瘍から分取したT細胞の培養上清から得られるエクソソームの *in vitro* MSC障害試験で確認する。
- T細胞療法と正常マウス由来CD8⁺ T細胞エクソソームの皮下移植腫瘍内投与とを併用し、その後の腫瘍内CD8⁺ T細胞動態を腫瘍切片の免疫組織染色で確認する。さらにケモカインリセプター (CCR5やCXCR3など) や細胞傷害物質 (パーフォリン、グランザイムB、TNF- α 、FAS、PD-L1など) の変動をフローサイトメーター、ウェスタンブロットティング、定量PCR等で測定する。
- T細胞療法と正常マウス由来CD8⁺ T細胞エクソソームの皮下移植腫瘍内投与とを併用し、その後の腫瘍内がん間質動態を腫瘍切片の免疫組織染色 (CD140a, ER-TR7, α -SMA, Sca-1, CD31等) で確認する。さらにアポトーシス (Annexin V, Caspase-3, Bcl-1等) や上皮間葉転換関連遺伝子発現 (TGF- β , Snail, EGF, p63, PI3K/AKT, MMP-2, 9, 13等) の変動をウェスタンブロットティング、定量PCR等で測定する。同時に、腫瘍増殖や肺転移の観察を並行して行う。がん間質変動については、全遺伝子アレイ解析も実施する。

4. 研究成果

当初の予定では、正常状態の CD8⁺ T 細胞を培養して得られるエクソソームのがん間質傷害作用の確認の下、実験を遂行することになっていたが、正常マウスから得られた CD8⁺ T 細胞エクソソームのがん組織への投与では、がん間質の間葉系細胞傷害は観察されるものの、特異性に関係なく T 細胞の腫瘍浸潤に劇的な改善が見られなかったため、がん細胞に特異性を付与した CAR-T 細胞の培養上清から得られるエクソソームを用いた実験を行うこととした。レトロウイルス感染により MAGE-A4 または CEA 特異的 CAR-T 細胞を作製し、MAGE-A4 や CEA CAR の発現が、CD4⁺ T 細胞及び CD8⁺ T 細胞の 50%以上で観られる T 細胞を用い実験を行った。作製した MAGE-A4 および CEA 特異的 CAR-T 細胞をエフェクター細胞とし、MAGE-A4 または CEA 陽性がん細胞とがん関連線維芽細胞 (CAF) や間葉系幹細胞 (MSC) との単独または混合細胞を標的細胞として、トランスウェルを用いた非接触系培養もしくは CAR-T 細胞培養上清から超遠心法で分取した細胞外小胞 (EV) の添加による傷害性を中心とした標的細胞変化を検討した。その結果、MAGE-A4 および CEA 特異的 CAR-T 細胞は、非接触系培養や調製した EV の添加により、3 日後には単独で培養した CAF や MSC に活性化 Caspase-3 が観察されアポトーシス関連の形態的な変化が観察されるが、MAGE-A4 または CEA 陰性がん細胞とその CAF または MSC との混合細胞に対しては、なんのがん細胞死も起こらず、CAF や MSC もアポトーシスのサインを示さなかった。MAGE-A4 および CEA 陽性がん細胞には、非接触系培養でも EV 添加でもがん細胞傷害が観察された。また、EV 放出阻害剤である GW4869 で処理した CAR-T 細胞では、特異的ながん細胞傷害は起こらなかった。興味深いことに、MAGE-A4 および CEA 陽性がん細胞とその CAF または MSC との混合細胞に対しては、非接触系培養でも EV 添加でもがん細胞死とともに、CAF や MSC のアポトーシス傷害も起こり、混合細胞全てが消失することもわかった。以上のように、CAR-T 細胞 EV は、CAR に特異的ながん細胞を傷害すると共に、CAF や MSC などの間質細胞をも傷害するデュアル機能を持つことが明らかとなった。CAR-T 細胞エクソソームが CAR に特異的ながん組織の微小環境を劇的に変化させ、がん特異的な T 細胞治療の補助剤になる可能性が高いと考えられ、現在研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 D Muraoka, N Seo, T Hayashi, Y Tahara, K Fujii, I Tawara, Y Miyahara, K Okamoto, H Yagita, S Imoto, R Yamaguchi, M Komura, S Miyano, M Goto, S Sawada, A Asai, H Ikeda, K Akiyoshi, N Harada, H Shiku	4. 巻 129
2. 論文標題 Antigen delivery targeting tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1278-1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI97642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 N Seo, Y Shirakura, Y Tahara, F Momose, N Harada, H Ikeda, K Akiyoshi, H Shiku	4. 巻 9
2. 論文標題 Activated CD8+ T Cell extracellular vesicles prevent tumor 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 435
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 -
1. 著者名 N Seo, K Akiyoshi, H Shiku	4. 巻 109
2. 論文標題 Exosome-mediated regulation of tumor immunology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2998-3004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13735	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 Y Akahori, L Wang, M Yoneyama, N Seo, S Okumura, Y Miyahara, Y Amaishi, S Okamoto, J Mineno, H Ikeda, T Maki, H Fujiwara, T Kato, H Shiku	4. 巻 132
2. 論文標題 Anti-tumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1134-1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-08-802926	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 D Muraoka, N Seo, T Hayashi, Y Tahara, K Fujii, I Tawara, Y Miyahara, K Okamoto, H Yagita, S Imoto, R Yamaguchi, M Komura, S Miyano, M Goto, S Sawada, A Asai, H Ikeda, K Akiyoshi, N Harada, H Shiku	4. 巻 129
2. 論文標題 Antigen delivery targeting tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1278-1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI97642	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 瀬尾尚宏、珠玖洋	4. 巻 36
2. 論文標題 活性化CD8+ T細胞から放出されるエクソソームはがん間質の間葉系細胞に働きかけ、がんの進行を抑制する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学 (羊土社)	6. 最初と最後の頁 1894-1897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 瀬尾尚宏	4. 巻 73
2. 論文標題 免疫疾患におけるエクソソーム (細胞外小胞顆粒と疾患)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 1196-1202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 N. Seo, Ts. Kaneda, J. Nakamura, F. Momose, K. Akiyoshi, Hiroshi Shiku1
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 ISEV 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬尾尚宏
2. 発表標題 T細胞エクソソームと腫瘍微小環境変化
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018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回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N Seo, T Kaneda, J Nakamura, K Akiyoshi, H 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 ISEV2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エクソソームの製造方法	発明者 珠玖洋、瀬尾尚宏、 金田次弘、中村純 子、秋吉一成	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-143200	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------