

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K08611
 研究課題名(和文)リンパ脈管筋腫症の病巣形成や病態における細胞外小胞の役割

 研究課題名(英文)The role of extracellular vesicles in the pathobiology of lymphangi leiomyomatosis

 研究代表者
 瀬山 邦明(SEYAMA, KUNIAKI)

 順天堂大学・医学部・教授

 研究者番号：10226681
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：LAM病態に特徴的な乳び胸水は病態解明に有用な解析対象である。乳び胸水中のエクソソームをヒト胎児線維芽細胞株に添加すると、NOTCH1、RHEBのmRNA発現は1.5～2倍に増加したが、タンパクレベルでの変化は確認できなかった。miRNAの網羅的解析では対照乳び液に比してLAM乳び由来のエクソソームでは5種類のmiRNAの減少を認めしたが、血清中miRNAとの関連性やシロリムス治療に伴う変動には定まった方向性は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者診療により得られる病態解明への示唆や臨床検体を研究に生かし、「TSC変異陽性LAM細胞はEVsを分泌し周辺細胞にphenotype transferして病巣を形成する。このメカニズムを明らかにすれば、病態解明と新規治療の開発につながるのではないか？」という学術的問いを解明する、学術的および社会的意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Chyle leak is a peculiar complication in lymphangi leiomyomatosis (LAM) and therefore must be precious material to elucidate pathobiology of LAM. We examined the exosomes obtained from serum and chylous pleural effusion (CPL) in patients with LAM. When fetal lung fibroblast cell line (HFL-1) were exposed with the exosomes from CPL (CPL-exosomes), we found the expression of NOTCH1 and RHEB mRNAs were upregulated about 1.5-2.0 fold. However, we could not demonstrate this upregulation in protein levels. Microarray analysis of miRNAs in CPL-exosomes revealed that the expression levels of 5 miRNAs (miR-21, miR-23a, miR-23b, miR-26, and miR-451a) were significantly decreased as compared with those in the exosomes from control chylous pleural effusions. However, this was not associated with the miRNAs levels in serum from LAM patients irrespective of during or before sirolimus treatment.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：リンパ脈管筋腫症 細胞外小胞 リンパ管新生 mTORシグナル 形質転換

1. 研究開始当初の背景

リンパ脈管筋腫症 (lymphangiomyomatosis: LAM) は平滑筋細胞様の形態を示す LAM 細胞が肺、体軸リンパ管系で増殖し、病変内にリンパ管新生を伴う腫瘍性疾患である。LAM 細胞は腫瘍抑制遺伝子として機能する *TSC* 遺伝子 (*TSC1* 遺伝子あるいは *TSC2* 遺伝子のどちらか一方) の遺伝子変異によって形質転換を起こした腫瘍細胞である。*TSC1* (あるいは *TSC2*) 遺伝子変異が生じると、ラパマイシン標的蛋白質 (mammalian target of rapamycin: mTOR) の活性制御異常に陥り、恒常的に活性化され LAM 細胞が増殖する。このような病態解明を基盤とし、mTOR 阻害剤であるラパマイシンの LAM に対する分子標的薬としての有用性が国際共同二重盲検臨床試験で示され¹⁾、日本においては 2014 年 12 月から保険適応薬として実臨床で使用されるようになった。しかし、ラパマイシンは LAM 細胞に対して静細胞的で投与を中止すると再び肺機能の低下が始まることが明らかにされており、さらなる病態解明と治療を目指した治療法の開発が求められている。

最近の遺伝子解析技術の進歩により、LAM 病巣には形態的に同一に見えても *TSC* 変異を持たない LAM 細胞 (*TSC* 変異陰性 LAM 細胞) が多数存在することが分かった^{2,3)}。即ち、*TSC* 変異陽性 LAM 細胞が何らかの方法により周辺細胞を形質転換させ (以下、phenotype transfer と呼称) LAM 細胞様に変化させると推測される。申請者は、phenotype transfer は *TSC* 変異陽性 LAM 細胞と周辺細胞間の情報伝達手段により生じると推測したが、最近、*TSC* モデルマウス実験において *tsc1*^{-/-} 神経細胞 (*tsc1* null 神経細胞) 由来のエクソソームが周辺の神経細胞を機能的・形態的に *tsc1* null 細胞と同様の phenotype にすることが報告された⁴⁾。エクソソームや microvesicles などの細胞外小胞 extracellular vesicles (EVs) は、細胞間の情報伝達に重要な役割を担っているとして注目されている⁵⁾。エクソソームは直径 30-100 nm、microvesicles は直径 100-1000 nm ほどの小胞で分泌過程が異なるが、分泌細胞由来の脂質 2 重膜を持ち分泌細胞に特異的な膜蛋白や mRNA、miRNA (= microRNA) を内包している点は共通している。特に、エクソソームではがんの遠隔転移におけるニッチの形成⁶⁾ など腫瘍の病態形成への関与が解明されつつある。

申請者は、LAM 病巣が病理形態学的には識別しがたい *TSC* 変異陽性と陰性の LAM 細胞で構成される理由は、*TSC* モデルマウスの神経病変と同様に変異陽性 LAM 細胞からの EVs により phenotype transfer がなされているためと考えた。そこで、LAM 患者の乳び液中に検出できる LAM 細胞クラスター (LCC = 表面を一層のリンパ管内皮細胞で覆われた LAM 細胞集塊) を電子顕微鏡で観察したところ、細胞膜に EVs と矛盾しない小胞を多数認め (未発表データ)。また、予備的実験で LAM 患者由来の乳び液から超遠心法で EVs の分離を試みたところエクソソームが分離できることを確認した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*TSC* 変異陽性 LAM 細胞から分泌される EVs を分離し、周辺細胞 (恐らく線維芽細胞のような間葉系細胞やリンパ管内皮細胞) を *TSC* 変異陰性 LAM 細胞へと変化させるのか (phenotype transfer するのか?) phenotype transferするのであれば、EVs に内包される蛋白質、esRNA (exosomal shuttle mRNA)、miRNA 等の機能分子の中で、どの機能分子がどのような機序で *TSC* 変異陰性 LAM 細胞へと変えるのか、を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 乳び胸水や培養細胞上清からの細胞外小胞 (EVs) の回収

検体により適切な粗遠心 (10,000g × 10 分) 上清のフィルター濾過 (0.22 μm) を行った後に、Beckman Coulter XL-90 を使用して 100,000g × 70 分で超遠心を行い EVs を得た。エクソソームが回収できているかどうかは、Nano-Sight (レーザー光線を用いてブラウン運動から溶液中の微粒子のサイズ、数を測定する装置) および Exoscreen を用いて確認した。Exoscreen とはエクソソーム膜上に存在する蛋白質を異なる修飾が施された 2 種類の抗体で挟み込み、2 種類の抗体が 200nm 以内に近接する場合のみ蛍光シグナルが発生し、エクソソームの検出を微量の検体で可能にするものである。今回はエクソソームに特異的な膜蛋白である CD9 および CD63 を使用して Exoscreen を施行した。エクソソーム中に含まれる miRNA は、東レに外注して miRNA の網羅的発現解析 (マイクロアレイ) を行った。

2) LAM 細胞の *TSC* 遺伝子変異の同定

次世代シーケンサーを用いて既報の方法で *TSC* 遺伝子変異の有無を検討した³⁾。

3) ヒト肺間葉系細胞の分離と培養

原発性肺癌の治療のため肺葉切除を受けた患者の摘出肺の一部 (非癌部正常肺組織) を蛋白分解酵素で消化して細胞浮遊液を調整し、既報⁷⁾に基づいて Fluorescence-activated cell sorter (FACS) により間葉系細胞を分離し、培養した。

4) LAM 組織の免疫組織染色

ホルマリン固定組織標本を用い標準的方法で免疫染色を行った。

4. 研究成果

1) LAM 病巣には *TSC* 変異陽性 LAM 細胞と *TSC* 変異陰性 LAM 細胞の 2 種類が混在する事の確認

Badri ら²⁾、及び自身³⁾の研究でも上記をすでに報告しているが、今回は 3 例の乳糜胸水中の LAM 細胞クラスター (LCC) を用いて、次世代シーケンサーにて *TSC* 変異解析を行い、再現性があることを改めて確認した。*TSC2* 変異の allelic frequency は 20% 弱であり、何らかの機序により LCC 内で phenotype transfer が起こっていることが示唆された。また、1 例については LCC 内に 2 種類の *TSC2* 体細胞変異をもつ two-hit 細胞を同定した。これらの結果から LCC は遺伝学的背景の異なる LAM 細胞からなることが確認でき、two-hit 細胞と周辺野生型細胞との細胞間コミュニケーションにより類似の形態をとる集団に変化し病巣を形成していることを示唆する根拠を深めることができた。また、LAM 細胞の起源は神経堤細胞集団由来と推測されているが、各種の神経細胞系マーカー {nestin, peripherin, Neuron specific β -III tubulin, Neuron specific enolase (NSE), Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Neural cell adhesion molecule 1 (CD56), synaptophysin, chromogranin A} の発現を免疫組織化学的手法で検討し、8 種類のマーカー中 4 つのマーカーの高発現を認めた。これらの研究成果から、LAM 病巣は少数の two-hit LAM 細胞と周囲の野生型細胞のコミュニケーションにより、LAM 細胞の起源と推測される神経間葉系細胞の一部の性質を保持したまま正常細胞とは異なる細胞コミュニティを形成する病態であることが示唆された。

2) 乳糜胸水中の細胞外小胞 (EVs) と phenotype transfer の検討

LAM 患者の乳び胸水から、超遠心法を用いて EVs を分離することに成功した。エクソソームであることは、粒子数測定及び抗 CD9 抗体・抗 CD63 抗体を用いたビーズ発光法により確認した。

次に、LAM 患者由来の乳び胸水、乳び胸水から分離した細胞外小胞 (EVs) をそれぞれヒト胎児線維芽細胞株 (HFL-1) へ添加し phenotype transfer が生じるのか検証を行った。LAM 患者由来の乳び胸水及び分離した EVs を添加した結果、mTOR 系の上流経路にある *NOTCH1*、*RHEB* の mRNA 発現レベルは 2~1.5 倍に発現増加を認めた。しかし、タンパクレベルにおいては mTOR 系蛋白の発現に明らかな亢進は認めなかった。

LAM 患者に合併する乳び胸水、乳び胸水から分離した EVs により phenotype transfer が生じるか、ヒト肺組織から分離した初代培養線維芽細胞を用いて検討した。ヒト肺線維芽細胞は肺癌患者の摘出肺の非癌部から FACS で上皮細胞や内皮細胞を除いた細胞集団を間葉系細胞として分離し、培養した。LAM 患者由来の乳び胸水そのもの、乳び胸水由来の EVs、および LAM 移植肺由来間葉系細胞の培養上清から採取した EVs を、それぞれ初代培養ヒト肺線維芽細胞へ添加して Phenotype transfer が起きるのか検討した。異なる 3 例の肺癌患者の非癌部から初代培養ヒト肺線維芽細胞を準備し、
、
を培養上清に添加して細胞形態の変化を観察したが、乳び液そのものを添加した際にのみ線維芽細胞の細胞質が大きくなって増殖が早くなる傾向をみとめた。しかし、乳び液中には多種類の増殖因子やサイトカインが含まれることが予想され、特に TGF- β が間葉系細胞に上記のような細胞形態の変化を及ぼすことが考えられたため、抗 TGF- β 抗体を乳び液とともにヒト肺線維芽細胞に添加して観察したところ、線維芽細胞の形態や増殖には変化が見られなかった。

3) 乳糜胸水中の細胞外小胞 (EVs) に含まれるエクソソーム中の成分の検討

LAM 患者由来の乳び胸水と良性疾患患者由来の乳び胸水について、各々 3 例ずつ EVs を分離し、miRNA の網羅的発現解析(マイクロアレイ)を行った。うち 1 例の LAM 患者においては mTOR 阻害剤 (シロリムス) の投与前後の乳び胸水から分離した EVs 中の miRNA 発現を比較した。その結果、LAM 患者由来の乳び胸水中の EVs では miR-21、miR-23a、miR-23b、miR-26、miR-451a の 5 種類の miRNA の発現が有意に低いことを見出した。また、シロリムス治療後の LAM 患者由来乳び胸水の EVs では miRNA の発現パターンがコントロール群に近似しており、前記 5 種類の miRNA の発現はコントロール検体と同等の発現になっていた (発現低下を認めなくなった)。以上の結果から前記 5 種類の miRNA が診断、治療効果判定のマーカーになり得ると考え、20 例の LAM 患者のシロリムス治療前後の血清、20 例の健常人の血清から EVs を分離し、前記の miRNA について qPCR で発現量を比較した (miR-16 をリファレンスとして評価)。その結果、乳び胸水と血清では EVs 中の miRNA 発現が異なり、前記の 5 つの miRNA は治療効果判定のマーカーには有用でなかった。具体的には、mir-21、mir-23a、mir-23 は、健常人対照者、LAM のシロリムス治療前後で一定の傾向を認めなかった。一方、mir-26 は、LAM 患者の血清では治療の有無に関わらず、健常人対照者に比べて発現が低下していた。そして、シロリムス治療前後で一定の傾向は認めなかった。miR-451a の発現は、乳び胸水中 EVs の解析結果と異なり、LAM 血清中の EVs で有意に発現が高かった。しかし、mir-26 と同様にシロリムス治療前後で一定の傾向は認めなかった。

乳び胸水と血清から分離した各 EVs 中の miRNA の網羅的発現解析を行い、LAM 細胞特

有の蛋白質発現を誘導する候補 miRNA を同定する予定であったが、十分な RNA 量が得られず断念した。保存中に分解されてしまった可能性を考えている。

5 . 文献

1. McCormack FX, et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 2011;364:1595-606
2. Badri KR et al. Exonic mutations of TSC2/TSC1 are common but not seen in all sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:663-5.
3. Fujita A et al. Detection of low-prevalence somatic TSC2 mutations in sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis tissues by deep sequencing. *Hum Genet* 2015; 135:61-8.
4. Patel B et al. Exosomes mediate the acquisition of the disease phenotypes by cells with normal genome in tuberous sclerosis complex. *Oncogene* 2015;35:3027-36
5. Kosaka N et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest.* 2016;126:1163-72.
6. Hoshino A et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015;527:329-35
7. Ando K et al. Isolation of individual cellular components from lung tissues of patients with lymphangioleiomyomatosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;310:L899-908.

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