

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18800

研究課題名（和文）上咽頭癌腫瘍微小環境におけるエクソソームを介した免疫寛容機構の解明

研究課題名（英文）Immune tolerance via exosome in microenvironment of nasopharyngeal cancer

研究代表者

阿河 光治（Aga, Mitsuharu）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90756230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：Epstein-Barrウイルス（EBV）関連上咽頭癌組織は細胞障害性T細胞が著明に浸潤する免疫抑制状態である。上咽頭癌細胞はEBV癌蛋白LMP1発現エクソソームを分泌すること、LMP1はM2型の腫瘍関連マクロファージを誘導するgalectinを誘導することから、この機構にはM2腫瘍関連マクロファージの誘導機構活性化が関与する。本研究では、EBV癌蛋白LMP1発現エクソソームと腫瘍関連マクロファージについて検証し、LMP1発現エクソソームがM2腫瘍関連マクロファージを増加させ、その阻害にファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬が有用であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行上咽頭癌において放射線化学療法は効果的であるが、再発例では治療に難渋する。免疫チェックポイント阻害剤は癌免疫逃避機構のブレーキを解除することで腫瘍微小環境における細胞障害性T細胞を活性化させ、間接的に抗腫瘍効果を発揮する新規免疫療法として期待されている。しかし、上咽頭癌再発例に対してpembrolizabを使用した報告では奏効率は22%であり効果は十分ではない。本研究の結果は、LMP1発現エクソソームによるM2腫瘍マクロファージの増加がEBV関連上咽頭がんの免疫微小環境の形成に重要であることを示したものであり、将来的な上咽頭癌の新規免疫治療法につながる重要な研究である。

研究成果の概要（英文）：The feature of Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma (NPC) reveals immunosuppressive environment that shows invasion of remarkable cytotoxic T cells. NPC cells secrete exosomes that contains EBV oncoprotein, latent membrane protein 1 (LMP1). On the other hand, LMP1 induces galectin that induces M2 tumor-associated macrophages. Taken together, immunosuppressive environment of NPC tissues associates activation of M2 tumor-associated macrophages. In this study, we have shown that LMP1-expressing exosomes induced increase of M2-macrophages. Besides, we revealed that inhibition of increase of M2 macrophages by the use of Farnesyltransferase inhibitor.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：上咽頭癌 エクソソーム 腫瘍関連マクロファージ LMP1

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の増殖にはこれを取りまく微小環境が極めて重要である。上咽頭癌の病理組織像は CD8+T リンパ球が大半を占める豊富なリンパ球浸潤を伴うことより、リンパ上皮腫と呼ばれている。これらのリンパ球がなぜ上咽頭癌細胞を攻撃しないのは、免疫チェックポイント機構が活性化されているためと考えられている。しかし、上咽頭癌再発例に対する免疫チェックポイント阻害剤効果は十分ではないことが報告されている。なぜ組織に豊富に存在する細胞障害性 T 細胞を活性化させる既知の免疫チェックポイント阻害剤は上咽頭癌で有効でないのだろうか？

まず我々は、CD8+T リンパ球を集簇させる機構に着目した。マクロファージ上に存在する CD40 に CD40 リガンドが結合することで抗原提示細胞として抗原をヘルパー T 細胞に提示し、腫瘍周囲に CD8+T リンパ球が集簇する。そして、上咽頭癌が発現している EBV 癌蛋白 LMP1 はその CD40 シグナルを模倣することができる。また、LMP1 が細胞外小胞エクソソームに乗り周囲の細胞に移動し機能すること、LMP1 発現エクソソームは免疫制御蛋白 galectin を含有していることが報告されている。galectin はマクロファージにおいて M1 型から M2 型へ誘導し、制御性 T 細胞を介して細胞障害性 T 細胞を抑制し腫瘍免疫を回避させる。さらに悪性リンパ腫における免疫組織学的検討では、EBV 感染による腫瘍関連マクロファージを介した腫瘍微小環境の免疫寛容が報告されており、加えて、上咽頭癌において腫瘍関連マクロファージによる制御性 T 細胞を介した免疫寛容機構が指摘されている。

## 2. 研究の目的

これまでの背景から LMP1 発現エクソソームを介してマクロファージに移動した galectin が M2 型マクロファージを誘導し免疫寛容を起こしているのではないかと考えた。galectin は M2 型の腫瘍関連マクロファージを誘導すること、上咽頭癌細胞は EBV 癌蛋白 LMP1 発現エクソソームを分泌すること、そして、LMP1 は galectin を誘導することから、この免疫抑制機構には M2 と呼ばれる腫瘍関連マクロファージの誘導機構活性化が関与することが推察される。本研究では、仮説「上咽頭癌腫瘍微小環境において EBV 癌蛋白 LMP1 発現エクソソームが腫瘍関連マクロファージを介して免疫寛容を誘導する」を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### EBV 感染細胞での原子間力顕微鏡による LMP1 タンパク検出

EBV 感染の経時的な変化として B リンパ球に細胞膜融合、細胞内侵入、EBV 脱カプシド、核内移行、エピゾームとして DNA 付着というステップがある。潜伏感染遺伝子 LMP1 を発現する感染細胞を作成する。LMP1 は脂質ラフトに局在することで下流シグナルを活性化している。蛍光免疫染色法で局在を見たときの写真ではラフトは一か所のように見えるが数あるラフトの中で本当に一か所に集まるのかを原子間力顕微鏡で確認する。

II. 上咽頭癌組織における 1) マクロファージ (M1 型+M2 型、M1 型、M2 型)、2) EBERs、LMP1、LMP2A、EBNA1 (EBV 潜伏感染) 3) ZEBRA、Rta 蛋白 (EBV 溶解感染) の検出  
上咽頭癌患者 30 症例の生検組織連続切片で検討を行う。EBV 感染様式には潜伏感染と溶解感染があり、どちらの状態が腫瘍関連マクロファージに寄与しているか検討を行う。

### III. エクソソーム内の LMP1 の局在

エクソソームは脂質二重膜で囲まれた細胞外小胞であり、LMP1 発現細胞から放出されたエクソソームは LMP1 と galectin を含んでいる。ウェスタンブロットによる解析などではそれらは脂質二重膜に含まれていると考えられているが、脂質ラフトに存在しているか形態学的な解析を原子間力顕微鏡で行う。

### IV. LMP1 エクソソームによる腫瘍関連マクロファージ誘導

予備実験での上咽頭癌組織標本における LMP1 発現と M2 型マクロファージ数の有意な正の相関を LMP1 発現エクソソームによる腫瘍関連マクロファージ誘導によるものとして作業仮説を立て in vitro で検証する。具体的には LMP1 発現細胞からエクソソーム抽出し、マクロファージ細胞株 THP-1 と共培養後、フローサイトメトリーで M1 型と M2 型の解析を行う。

### V. 薬剤によるマクロファージ誘導変化の検証

ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬と mock で調整した LMP1 発現細胞、LMP1 非発現細胞、それぞれからのエクソソームを抽出し、フローサイトメトリーで M1 型と M2 型の解析を施行する。

## 4. 研究成果

LMP1 発現細胞における脂質ラフトの局在を原子顕微鏡で確認したところ、蛍光免疫染色での局在同様に脂質ラフトは一箇所局在していることは確認できた。

上咽頭癌組織 30 症例の連続切片で検討したところ、全例で EBER が発現していること、LMP1 が有意に発現している症例では M2 型が有意に発現している症例を多く認めた。一方、ZEBRA や Rta などの溶解感染遺伝子の発現は低い状態であった。

次にマクロファージ細胞株 THP-1 と LMP1 エクソソームの共培養を行い、M1/M2 解析も行うと、当初の予想通り、M2 型が有意であることが判明した。

最後にファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬で調整した LMP1 発現細胞からのエクソソームでは M2 型が有意に減少することが判明した。

以上から、LMP1 発現エクソソームは腫瘍関連マクロファージを M2 型に変化させ、その阻害にはファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬によって阻害できることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mitsuharu Aga, Tomokazu Yoshizaki
2. 発表標題 A retrospective study of intra-arterial chemotherapy with concurrent radiotherapy for resectable locally advanced HPV-positive oropharyngeal carcinoma
3. 学会等名 EUROGIN (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------