

令和 4 年 5 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16825

研究課題名(和文)自己血T細胞エクソソームを用いた新規免疫放射線療法の開発

研究課題名(英文) Novel immunoradiation strategy based on autologous T cells derived exosome

研究代表者

窪田 光 (Hikaru, Kubota)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60824208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は生体からのエクソソーム単離方法を確立した。次に、マウスの脾臓からCD8陽性T細胞を単離し、培養上清においてエクソソームマーカーであるCD9が発現している事を確認した。また、CD8陽性T細胞由来エクソソームを抽出し、PD-1が発現している事を確認した。PD-1を発現した自己エクソソームを投与することで、同一個体から単離したPD-1/PD-L1の親和性を考えると、通常の免疫チェックポイント阻害剤より効果的である可能性がある。最後に、CD8陽性T細胞由来エクソソームにおいてはCD47が発現していることを確認した。CD47発現により、投与時にマクロファージによる貪食を回避できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は自己血T細胞由来エクソソームを用いた新規免疫放射線治療戦略を前進させるものである。我々はCD8陽性T細胞から放出されるエクソソームを抽出し、その膜上にPD-1が発現している事を確認した。CD8陽性T細胞由来のエクソソーム膜解析の中で、CD47発現が確認された。CD47は所謂「don't eat me signal」である。通常であればエクソソームは網内系で貪食されるが、それを回避することが可能であることを示唆している。自己血T細胞由来のエクソソームが免疫チェックポイント阻害剤を代替できることを示すことができれば、その社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：We have established a method for isolating exosomes in vivo. Next, CD8-positive T cells were isolated from the spleen of mice, and it was confirmed that the exosome marker CD9 was expressed in the culture supernatant. In addition, CD8-positive T cell-derived exosomes were extracted and confirmed that PD-1 was expressed. In terms of the affinity of PD-1 / PD-L, it was suggested that administration of PD-1 expressing autologous-exosomes may be more effective than conventional immune checkpoint inhibitors. Finally, it was confirmed that CD47 was expressed in exosomes derived from CD8-positive T cells. CD47 expression may avoid macrophage phagocytosis in vivo.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 免疫チェックポイント阻害剤 免疫放射線治療 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療戦略は病理組織型や臨床病期、患者の全身状態に応じて手術、化学療法、放射線治療が標準治療として選択されてきたが、最近新たに免疫チェックポイント阻害剤が標準治療として位置付けられるようになった。免疫治療は様々ながん種に有効性を示し、適応拡大を進めているものの、抗 programmed cell death-1 (PD-1) 抗体や抗 programmed cell death ligand 1 (PD-L1) 抗体等の奏効割合は 20%程度と十分とは言えず、放射線治療を含む併用療法での治療開発に期待が大きい。放射線照射は腫瘍微小環境において免疫表現型を変化させることで免疫チェックポイント阻害効果の増強が報告されており、腫瘍免疫活性化のトリガーとして新たな役割が提起されている。実際に、標準治療として取り入れられているがん種もある。免疫放射線治療が根治治療として明確な抗腫瘍効果を示しているものの、現状ではどのような患者に対して、免疫治療の上乗せ効果があるという根拠は十分ではなく、新たな視点を加えた治療方法の開発が急務である。現在 PD-1/PDL1 以外にも cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) の臨床応用がなされており、これら異なる免疫チェックポイント阻害剤の併用により悪性黒色腫などで高い奏効率が示されている。その他にも、免疫チェックポイント分子に関してはいずれも前臨床段階であるものの、T-cell immunereceptorwith Ig and ITIM domains (TIGIT)、T-cellmembrane protein-3 (TIM-3)、B- and T-lymphocyteattenuator (BTLA)、V-domain Ig suppressor of T-cell activation (VISTA) 等多くの免疫チェックポイント機構に関する基礎的報告がなされている。これらの新規の免疫チェックポイントを阻害することで、PD-L1 や CTLA4 だけでは十分な効果が得られなかった症例でも、さらなる抗腫瘍効果が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は CD8 陽性 T 細胞から放出されたエクソソームによる新規免疫治療を開発することである。エクソソームは、生体内のほぼすべての細胞から放出される約 100nm の細胞外小胞で、ドナー細胞膜上の重要なタンパク質や miRNA 等を包含し、他の細胞にこれらの情報を伝達する。がん患者における末梢血 CD8 陽性 T 細胞には PD-1 が発現していることが報告されている。がん患者由来の末梢血 CD8 陽性 T 細胞を採取/培養し、Ex-vivo でエクソソームを分泌させることで、PD-1 が発現したエクソソームを得る。この PD-1 発現エクソソームが腫瘍に発現した PD-L1 と結合することで抗 PD-L1 阻害剤と同様の作用を示し、T 細胞抑制を回避することができる可能性がある。つまり自己 T 細胞由来のエクソソームを用いて免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-L1 阻害剤) を代替できる可能性を秘めており、独自性が非常に高い。それだけではなく、PD-1 以外の免疫チェックポイント因子も T 細胞上に複数発現しているため、T 細胞由来エクソソームを用いて一度に複数の免疫チェックポイント阻害効果が得られるという創造性もある。異なる免疫チェックポイント阻害により奏効率の向上が期待されるため、複数の免疫チェックポイントシグナル阻害効果を持つエクソソームを採取ができれば、さらなる抗腫瘍効果の増強につながる。

3. 研究の方法

CD8 陽性 T 細胞由来エクソソームの放出確認
マウス脾臓から CD8 を単離し、エクソソームマーカー (CD9) 確認する

CD8 陽性 T 細胞由来エクソソーム表面上に発現する膜蛋白の解析
CD8 エクソソーム膜表面タンパク質 (PD-1) の確認のため、ウエスタンブロッティング法を用いて CD8 陽性 T 細胞由来エクソソーム PD-1 を確認する

正常細胞由来 CD8 エクソソームの CD47 (don't eat me signal) 確認
単純にエクソソームを投与するのみではマクロファージにより貪食される可能性が高い。CD47 は所謂 don't eat me signal であり、投与時にマクロファージによる貪食を回避できる可能性がある。ウエスタンブロッティング法を用いて CD8 EXO-CD47 の発現確認を行う。

4. 研究成果

CD8 陽性 T 細胞由来エクソソームの放出確認

マウスの脾臓から CD8 陽性 T 細胞を単離し、72 時間増殖させた (図 1)

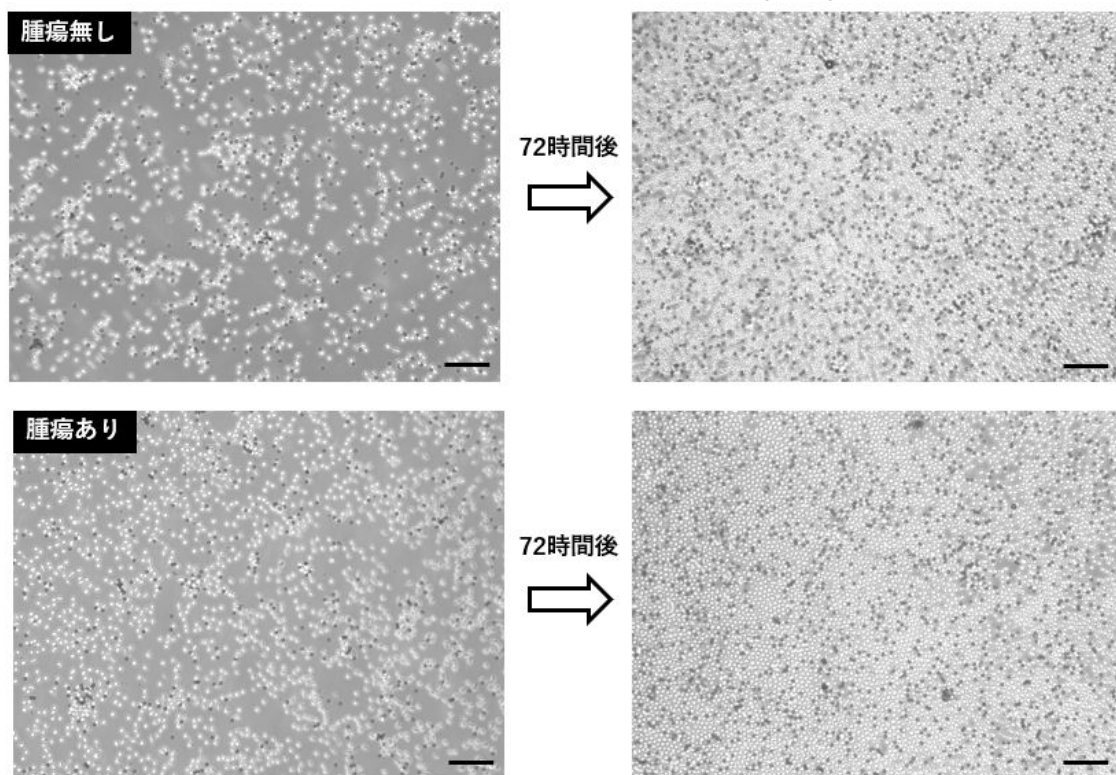


図 1 : 脾臓 CD8 培養

CD8 陽性 T 細胞培養上清においてエクソソームマーカーである CD9 が発現している事を、ウエスタンブロットング法を用いて確認した (図 2)。

マウスCD9(25kDa)

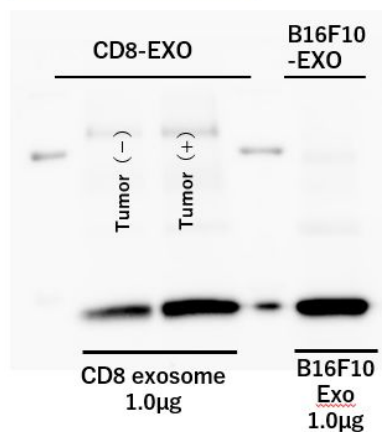


図 2 : 脾臓 CD8 培養上清における CD9 発現の確認

CD8 陽性 T 細胞由来エクソソーム表面上に発現する膜蛋白の解析
CD8 陽性 T 細胞由来エクソソームに PD-1 が発現している事を確認した (図 3)。

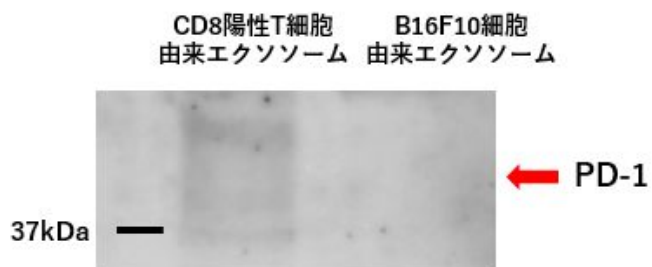


図 3 : エクソソーム膜 PD-1 発現

CD8 陽性 T 細胞由来エクソソームの CD47 (don't eat me signal) 確認
CD8-EXO では、CD47 が発現していた、一方でメラノーマ細胞 B16F10-EXO では CD47 が発現していなかった (図 4)。

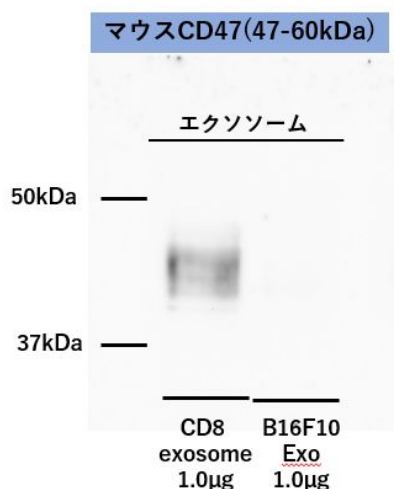


図 4 : エクソソーム膜 CD47 発現

CD8 陽性 T 細胞から単離したエクソソームには PD-1 や CD47 が発現しており、同一個体から単離した PD-1/PD-L1 の親和性を考えると PD-L1 阻害剤として、免疫疲弊のブレーキ療法への応用が期待できる。今後、PD-1 以外の免疫チェックポイント因子も T 細胞上に複数発現していることが確認できれば、T 細胞由来エクソソームを用いて一度に複数の免疫チェックポイント阻害効果が得られる可能性も期待される。

今後は、生体からの CD8-EXO-PD-1 単離量の確保が課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakaoka Ai, Nakahana Makiko, Inubushi Sachiko, Akasaka Hiroaki, Salah Mohammed, Fujita Yoshiko, Kubota Hikaru, Hassan Mennaallah, Nishikawa Ryo, Mukumoto Naritoshi, Ishihara Takeaki, Miyawaki Daisuke, Sasayama Takashi, Sasaki Ryohei	4. 巻 45
2. 論文標題 Exosome-mediated radiosensitizing effect on neighboring cancer cells via increase in intracellular levels of reactive oxygen species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.7964	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hikaru Kubota, Yoshiko Fujita, Mohammed Salah, Yasuyuki Shimizu, Hiroaki Akasaka, Ryohei Sasaki
2. 発表標題 Titanium peroxide nanoparticle enhance the efficacy of immuno-radiotherapy via activated CD8+ T cell dependent antitumor effect in vivo
3. 学会等名 American Society for Radiation Oncology 62nd Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------	---------