

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870243

研究課題名(和文)大腸癌分泌膜小胞による免疫寛容誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)Colorectal cancer-derived extracellular vesicles induce tumor immunotolerance

研究代表者

山田 名美 (Yamada, Nami)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40727319

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)：大腸がんがExtracellular vesicles (EVs)を分泌する意義を腫瘍免疫の観点から解明すべく、T細胞をEVsのRecipientとして、大腸がんによるEVsを介した免疫寛容誘導メカニズムを解析した。結果、大腸がん由来のEVsにはTGF- β が豊富に含まれており、T細胞のSmadシグナリングを活性化し制御性T細胞様細胞(Treg-like cell)への分化を誘導することがわかった。このTreg-like cellは腫瘍増殖促進作用を持つこともわかった。大腸がんはEVsを用いてT細胞内シグナルを操作し、腫瘍の進展に有益な細胞へと変化させることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Emerging studies on tumor cell-derived extracellular vesicles (EVs) have shown the biological significance in tumor development and microenvironment through reprogramming immune cells around cancer cells. In this study, we used colorectal cancer cells as EV-donor, and T cells as EV-recipient to examine whether EVs impair the T cell function.

As a result, we found that colorectal cancer cell-derived EVs (CRC-EVs) were enriched with TGF- β 1. Interestingly, CRC-EVs induced phenotypic alteration of the T cells to Treg-like cells through activating TGF- β /Smad signaling and inactivating SAPK signaling. Furthermore, the CRC-EVs-induced-Treg-like cells had a remarkable tumor-growth promoting activity in vitro and in vivo. These results suggest that colorectal cancer cells utilize EVs to tame immune cells for their prosperity.

研究分野：microRNAとがん

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム 細胞間コミュニケーション がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞がタンパク質や mRNA、microRNA(miRNA)を生体膜由来の小胞である膜小胞(exosome もしくは microvesicle と呼ばれる)に包んで積極的に分泌し、細胞間コミュニケーションツールとして用いていることが明らかとなり、注目を浴びている。膜小胞はあらゆる体液中に存在し、内包されている分子は非常に安定であるため、新規のバイオマーカーとして臨床応用への可能性も期待されている。

このような背景のもと、申請者らはこれまでにがん細胞由来の膜小胞に内包されている分子の同定や膜小胞の細胞間授受の証明、膜小胞の機能解析を行い、がんの膜小胞を用いた生存戦略解明に取り組んできた。しかし、膜小胞内に内包される分子の量や種類の選択機構や、膜小胞の分泌に関わる機構に関しては依然不明な点が多く、臨床応用への展開には多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの研究から膜小胞の単離方法を独自で確立しており、研究成果を発表してきている。がん細胞が膜小胞を用いて、自身にとって有益な微小環境形成を誘導していることが示されたことから、免疫担当細胞からの攻撃を回避するツールとしても用いているのではないかと考えた。

本研究は、分泌膜小胞を介した腫瘍免疫回避機構を明らかにすることで、がんが膜小胞を分泌する生物学的意義を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌分泌膜小胞に内包される免疫抑制性分子の同定および機能解析

予備的研究により、大腸癌分泌膜小胞はヒト T 細胞株 Jurkat の cell cycle を停止させ細胞増殖を抑制する機能を有していることがわかっている。その原因分子の一つとして膜小胞に相当量存在することをすでに確認している TGF β に着目し、因果関係を調べる。

膜小胞による免疫抑制メカニズムの解明：TGF β シグナルを中心に T 細胞・単球細胞で膜小胞により誘導される表現型および細胞内シグナルを調べる(遊走浸潤能解析、western blot, FACS)。

TGF β の膜小胞における局在を決定(膜表面に表出しているのか内包されているのか)：ELISA

リコンビナント TGF β による再現性の確認：T 細胞・単球細胞の表現型および細胞内シグナルを、膜小胞を作用させたときと比較(遊走浸潤能解析、western blot, FACS)。

膜小胞に内包される免疫抑制性 miRNA を同定：T 細胞の増殖抑制、細胞死、マクロファージの遊走能抑制に関連する miRNA を同定し、pre-miRNA をトランス

フェクションすることにより再現性を確認する。

(2) Donor、Recipient 間の膜小胞を介した情報伝達の証明

Recipient による膜小胞の取り込みを証明：膜小胞の脂質膜に蛍光標識を施し、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡にて Recipient 細胞による取り込みを確認する。

Recipient による膜小胞内 RNA 分子の取り込みを証明：5-Ethynyl Uridine (EU) により Donor 由来 RNA に標識を施し、その標識 RNA が分泌膜小胞内、Recipient 細胞内に存在することを追跡し膜小胞を介した伝播を証明する。

(3) 膜小胞分泌メカニズムの解明

がん細胞は積極的に膜小胞を分泌していることが報告されているため、膜小胞分泌機構に関連する分子・シグナルも正常と比較し活性化していると仮定し以下を検証する。

膜小胞分泌関連分子の同定：細胞内膜輸送関連分子、エキソサイトーシス関連分子に焦点を当て、膜小胞分泌に関与する分子を検索、同定する。

同定した分子に対する siRNA を用いて、大腸癌細胞の膜小胞分泌量の変化を NanoSight により定量する。

同定した分子を標的とする miRNA を TargetScan データベースにて検索し、pre-miRNA のトランスフェクションによる膜小胞分泌抑制効果を siRNA と比較定量する。

(4) 膜小胞分泌メカニズムを抑制することによる抗腫瘍効果の検証

上記で同定した分子に対する siRNA および miRNA が大腸癌細胞にどのような影響を与えるのか、膜小胞分泌機構以外の細胞内シグナルの変化を in vitro であきらかにする。

担癌マウスにおける膜小胞分泌機構を標的とした miRNA 補充療法または siRNA の抗腫瘍効果を検証する。大腸癌細胞を異色した担癌マウスを作成し、膜小胞分泌機構関連分子を標的とした miRNA の腫瘍内局所投与、および尾静脈からの全身投与を行う。マウスの体重、腫瘍サイズを計測、マウス血中に放出される膜小胞の数を定量する。

4. 研究成果

(1) 膜小胞に内包される免疫抑制関連分子の発現および機能解析

大腸癌細胞が分泌する膜小胞には TGF- β が豊富に含まれており、膜小胞の Recipient である T 細胞内の Smad シグナルを活性化、JNK/p38 シグナルを抑制することによって、T 細胞の Cell-cycle arrest を引き起こし、増

殖を抑制した。

(2) 膜小胞の Recipient である T 細胞の表現型解析

Smad シグナルの下流遺伝子の発現解析によって、免疫寛容の担い手である制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) 関連遺伝子の発現が軒並み亢進していることがわかった。そこで、この膜小胞によって誘導された表現型を持つ T 細胞を Treg 様細胞 (Treg-like cell) と名付けた。

(3) 膜小胞に含まれる TGF- β の機能解析

上記の結果をもたらしたものが、膜小胞に含まれる TGF- β によるものであることを証明するため、TGF- β の siRNA および中和抗体を用いて、膜小胞に含まれる TGF- β 量の変化および、Treg 関連遺伝子の発現を解析した。結果、siRNA をトランスフェクションした大腸癌細胞が分泌する膜小胞に内包される TGF- β が減少し、T 細胞内の Treg 関連遺伝子発現誘導効果が著しく低下した。また、大腸癌細胞が分泌した膜小胞浮遊液にあらかじめ TGF- β 中和抗体を混合し、T 細胞に投与すると、同じく、Treg 関連遺伝子発現誘導効果が著しく低下した。よって、膜小胞が Treg-like cell を誘導した主たる原因は膜小胞に内包される TGF- β であることが示された。

(4) Treg-like cell の機能解析

T 細胞から膜小胞によって誘導された Treg-like cell がどのような機能を持っているのか、大腸癌細胞、大腸癌細胞由来のスフェロイド、大腸癌の担癌マウスを用いて検証した。結果、Treg-like cell と共培養した大腸癌細胞、大腸癌細胞由来のスフェロイドは共に、増殖が有意に亢進した。また担癌マウスの大腸癌腫瘍の周辺に Treg-like cell を注射し、経時的に腫瘍径を計測したところ、コントロールと比較して有意に腫瘍径の増大を認めた。よって、膜小胞によって誘導された Treg-like cell は大腸癌の増殖を促進する機能を持っていることがわかった。すなわち、大腸癌細胞は膜小胞を分泌することによって、自身を攻撃する免疫担当細胞を手なづけ、自身にとって無害なもしくは有益な細胞へと変化させることができるということがわかった。

(5) 膜小胞分泌メカニズムの解析

まずは他の研究グループによる既発表論文を参考に、分泌機構を抑制するとされる試薬を複数購入し、大腸癌細胞における膜小胞分泌抑制効果を検討した。各試薬を大腸癌細胞に投与し、NanoSight を用いて膜小胞数の計測および膜小胞に含まれる miRNA の標的遺伝子の発現抑制効果の検討を行ったが、明らかな膜小胞分泌抑制および標的遺伝子の抑制効果の減弱は認められなかった。細胞種によって分泌に関わる機構に多様性があるのか

もしれない。もしくは、膜小胞の抽出や定量方法に Gold Standard がないことが、研究グループによって結果が異なる大きな要因なのかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Yamada NO, Extracellular vesicles: Emerging mediators of intercellular communication and tumor angiogenesis, *Annals of Translational Medicine*, 5:59, 2017, doi:10.21037/atm.2017.01.14 (査読あり)

Tujimura N, Yamada NO, Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Akao Y, A novel role of dickkopf-related protein 3 in macropinocytosis in human bladder cancer T24 cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 17:1846, 2017, doi: 10.3390/ijms17111846 (査読あり)

Yamada NO, Extracellular vesicles in cancer: current status and challenges, *Translational Cancer Research*, 5:S561-S563, 2016, doi: 10.21037/tcr.2016.09.14 (査読あり)

Yamada N, Akao Y, Extracellular vesicles in cancer, *Advances in biomembranes and lipid self-assembly*, 23:187-204, 2016, doi: 10.1016/bs.abl.2016.01.004 (査読あり)

Yamada N, Kuranaga Y, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Akao Y, Colorectal cancer cell-derived extracellular vesicles induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor-beta-1-mediated suppression, *Oncotarget*, 7:27033-27043, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7041 (査読あり)

[学会発表](計5件)

Nami O. Yamada, Yuki Kuranaga, Shuji Matsuda, Yukihiro Akao, Takao Senda, Colorectal cancer-derived extracellular vesicles induce tumor immunotolerance, 第122回日本解剖学会総会・学術集会、2017年3月28日～3月30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市)

山田名美、倉永祐希、松田修二、赤尾幸博、千田隆夫、大腸癌における細胞外小胞と免疫寛容誘導メカニズム、第76回日本解剖学会中部支部学術集会、2016年10月8日～10月9日、信州大学

医学部附属病院大会議室（長野県・松本市）

Yuki Kuranaga, Nami Yamada, Minami Kumazaki 他、大腸癌分泌膜小胞によるT細胞分化誘導メカニズム、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日～9月27日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

山田名美、倉永祐希、赤尾幸博、大腸癌分泌膜小胞による免疫寛容誘導メカニズム、第18回日本がん免疫学会総会、2014年7月30日～8月1日、ひめぎんホール（愛媛県・松山市）

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/kaibou/>

6．研究組織

(1)研究代表者

山田 名美（YAMADA, Nami）

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40727319