

研究報告書

「癌細胞由来小分子 RNA による炎症細胞の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 幸谷 愛

1. 研究のねらい

EB ウイルスが引き起こす癌では、ウイルス感染に伴う炎症が癌発生に深く関与する。炎症細胞がないと腫瘍細胞は生存できない。元来ウイルス感染細胞を排除しようと集まった炎症細胞が、いつの間にかウイルス感染癌細胞を支持するように変化するが、そのメカニズムは未だ明らかではない。そこで、新しい細胞間コミュニケーターである「分泌性小分子 RNA」からそのメカニズムの解明を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

EBV 関連リンパ腫は化学療法抵抗性の難治症例が多く新規治療が必要である。EBV 関連リンパ腫は腫瘍組織内にも多数の炎症細胞の浸潤を認め、EBV 陽性ホジキンリンパ腫は腫瘍の 99%以上は非腫瘍性炎症細胞であり、腫瘍細胞は全体のわずか 1%程度を占めるにすぎず、腫瘍細胞は炎症細胞の存在下でしか生着できない。

炎症細胞は元来 EBV 腫瘍細胞を排除するために集積したもののだが、EBV の潜伏化とこれに伴う炎症の遷延化によってニッチと化すと考えられる

一方、最近遺伝子をコードしないゲノム領域から生成される小分子 EBV が、エクソソームに抱合されて分泌され、細胞間伝達物質として働くことが明らかとなった。

「EBV の潜伏化・炎症慢性化の過程で感染細胞により分泌される小分子 RNA が炎症細胞に対してどのような影響を与えるのか？」

この問いに答えを見出すために、試験管内、マウス生体内において EBV 感染細胞由来分泌性小分子 RNA の機能を解析した。

その結果、単球/マクロファージが選択的に EBV 感染リンパ腫細胞由来の小分子 RNA を取り込むこと、その結果、単球が増殖し、サイトカインプロファイルが腫瘍関連マクロファージ様に変化することを見出した。マウス生体内においては、これらの小分子 RNA を欠損する株と、野生型の株を比較して、これら小分子 RNA が炎症の遷延化、そしてリンパ腫発生に必須であることが明らかになった。更に、小分子 RNA を欠損する EBV を感染させたマウスに、これらの小分子 RNA を豊富に含むエクソソームを導入したところ、マクロファージの貪食能が極めて高いリンパ腫が発生したが、これらからマクロファージを除去することにより、EBV 陽性細胞の完全消退を誘導できた。腫瘍由来エクソソームをマクロファージが特異的に取り込む機序としては、エクソソーム上のリン脂質、フォスファチジルセリンに依存することを明らかにした。最後にヒト EBV 関連リンパ腫においてこれらの小分子 RNA の発現を検討したところ、腫瘍細胞あたりの産生量の高低で著しい生存期間の差を認め、EBV にコードされる miRNA の生物学的重要性に加え、診断的意義も高いことが示された。

以上からを EBV 感染腫瘍細胞由来分泌性小分子 RNA は炎症細胞、単球/マクロファージ

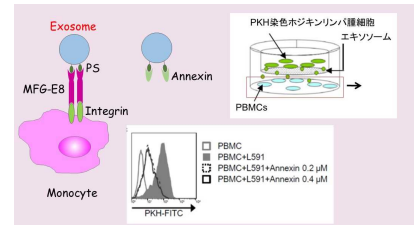
を制御してEBV感染細胞が引き起こす炎症の遷延化をもたらし、最終的には腫瘍発症、進展に深く関与することが明らかとなった。

(2) 詳細

研究テーマ1

腫瘍由来エクソソームがマクロファージに特異的に取り込まれるメカニズム

腫瘍由来分泌性小分子 RNA がエクソソームに内包され、単球/マクロファージに特異的に取り込まれることを、試験管内、ヒトリンパ腫検体において明らかにした。



その特異性を決定する機序について、長田重一領域

アドバイザーのアドバイスを基に、アポトーシス細胞がマクロファージに特異的に取り込まれる際に用いられる分子の関与を調べた。その結果、フォスファチジルセリン (PS)-MGF-E8-Integrin という、上記に必須分子が、腫瘍由来エクソソームがマクロファージに取り込まれる際にも必須である事を明らかにした。

研究テーマ2

腫瘍由来分泌性小分子 RNA のマクロファージでの機能解析と標的遺伝子の同定

腫瘍由来分泌性小分子 RNA を内包するエクソソームは、小分子 RNA 依存的にヒト単球は CD69, IL-10, TNF の発現を増強した。そこで、腫瘍由来分泌性小分子 RNA による遺伝発現変化の網羅的解析、および、小分子 RNA の標的遺伝子の同定のために、ヒト単球系白血病由来細胞株 THP1 に対して、EBV コード miRNA である BART miRNAs (20 種類)をテトラサイクリン依存的に発現誘導する細胞株を樹立した。これを用いて、EBVmiRNAによって発現変化する遺伝子として、Arg1(15倍)をはじめとし、VEGF, TNF, IL23A, CCL2 等、免疫抑制性マクロファージ M2 において高発現している遺伝子の発現上昇を認め、腫瘍由来小分子 RNA がマクロファージを腫瘍支持性へ変化させることを明らかにした。標的遺伝子としては MEF2、CD1c を同定した。

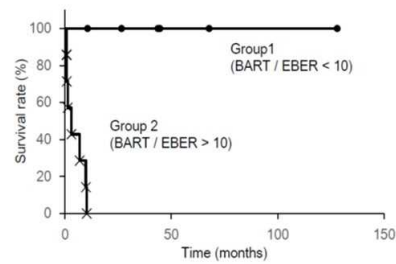
Upregulated genes

| Gene | Fold change |
|-------|-------------|
| ARG1 | 15.12 |
| VEGFA | 2.23 |
| TNF | 2.20 |
| IL23A | 2.02 |
| CCL2 | 2.28 |

研究テーマ 3

ヒト EBV リンパ腫における EBV コード miRNA と予後との関係性

ヒト EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)患者病理検体に対して、EBV コード miRNA の一つである BART13 の発現を、in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、標本全体の発現量と生存期間が統計学的有意差 ($P < 0.05$) をもって、相関した。更には、腫瘍細胞あたりの BART13 の産生量を算出し、生存期間との相関を解析したところ、極めて強い相関を認めた。 ($P < 0.001$) (右図)

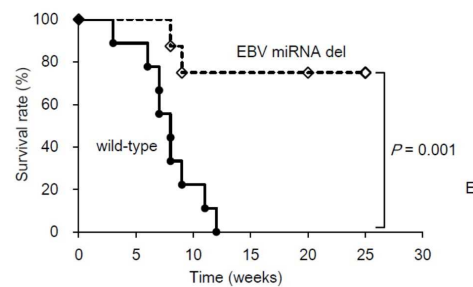


この結果はヒトのリンパ腫において、腫瘍由来小分子 RNA が、癌生物学的に極めて重要な機能を持つことを示唆した。

研究テーマ 4

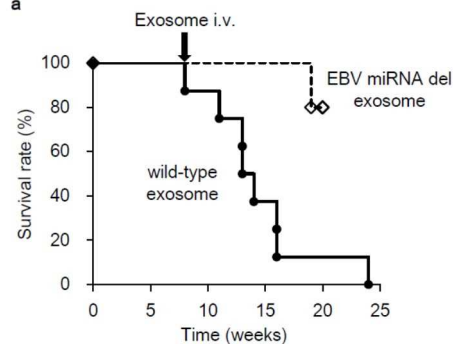
「EBV リンパ増殖疾患マウスモデルにおける、腫瘍由来小分子 RNA を内包するエクソソームの腫瘍形成における生物学的意義について」

EBV は霊長類にしか感染しない。そこで、超免疫不全マウス NOG マウスにヒト臍帯血より分離した CD34 陽性細胞を静注し、造血系ヒト化マウスを作製した。その 5 か月後 EBV を感染させ、リンパ増殖疾患を誘導する EBV リンパ増殖疾患モデルを確立した。この際 EBV コード miRNA 欠損株と野生型を用いて炎症や腫瘍形成に差があるか検討した。その結果欠損株において炎症、腫瘍が共に形成されにくく、EBV コード miRNA に炎症惹起、腫瘍形成促進作用があることが示唆された。(右図上)



上記の結果が分泌性 EBV コード miRNA によるものであるかを検討するため、野生型 EBV を感染させたリンパ球株から採取したエクソソームを、リンパ増殖疾患を発症しない EBV miRNA 欠損株を感染させたマウスに投与した際の腫瘍形成について検討したところ、全例においてリンパ増殖疾患の発症を認めた。

(右図下)更に発症したリンパ増殖疾患に対して、クオドロネートリポソームを用いてマクロファージを除去すると、腫瘍の完全消退が認められた。本腫瘍におけるマクロファージ制御の重要性が示された。



3. 今後の展開

以上からEBV感染腫瘍細胞由来分泌性小分子RNAは炎症細胞、単球/マクロファージを制御してEBV感染細胞が引き起こす炎症の遷延化をもたらす、最終的には腫瘍発症、進展に深く関与することが明らかとなった。マクロファージが腫瘍形成維持におけるKey playerであることは、多くの研究によって明らかにされている。腫瘍由来エクソソームがこのマクロファージを制御して腫瘍形成維持に不可欠な機能を持つことを本研究が初めて明らかにした。更に、エクソソームの取り込みを阻害する、特定のサブセットを除去するなど、マクロファージを標的とする治療法が、現在有効な治療法のないEBV関連リンパ腫に対して、新たな治療になり得ることが示唆された。

今後はこれまで得られた知見を、患者さまに届けるためのTranslational Researchを進めていくと共に、本研究から新たに見出されたQuestion、1. 取り込みは同じ機序である死細胞とエクソソームのマクロファージ細胞内運命の劇的な差は、何によって規定されるのか。2. 本研究が世界で初めて明らかにした「腫瘍由来分泌性小分子RNA—マクロファージ腫瘍随伴化—腫瘍形成維持」という軸が他のウイルス感染癌、炎症癌において、一般化できる可能性について取り組みたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

1) 研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

当初の研究目的はほぼ達成された。研究実施体制については、研究開始当初、1人ですべてであったが、さきがけによる充実した研究費により、2人に増員でき、飛躍的に研究が進展した。しかしながら、論文化が遅れており、この点を今後迅速に行いたい。

2) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究により、EBV関連リンパ腫という疾患に対する知見を得たが、今後本研究から得られた腫瘍由来分泌性小分子RNAを内包するエクソソーム—マクロファージによる特異的な取り込み—マクロファージの腫瘍支持性変化—腫瘍形成維持というスキームが他炎症癌などに応用できれば、エクソソーム制御、マクロファージ制御による抗腫瘍治療開発という高い波及効果が得られる。

EBVリンパ腫自体は頻度の低いリンパ腫であるが(10万人に数人)、東アジアに多いという特徴があり、欧米で開発された現治療が無効である現状を踏まえると、本研究による知見は即、新規治療につながる可能性が高いと考える。

本さきがけ研究により、独立直後の研究室の活動性が安定しラボ運営が軌道に乗った。更に、日本を代表する研究者で構成される領域アドバイザーによる適切なアドバイスに加え、アドバイザーの研究室における詳細な指導により、研究の発展が大いに認められた。その結果、国際学会で講演が著しく増加し、招待講演も受け、本分野の日本のトップランナーの一人として目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

本研究領域での脂質関連研究者との交流から、本研究に新たな方向性が付与され、AMED-PRIME採択、および製薬会社との共同研究締結に至った。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

EBV 陽性ホジキンリンパ腫の腫瘍中にはわずか 1%程度しか腫瘍細胞が存在せず、腫瘍細胞は大部分を占める周囲の多種多様な炎症細胞の存在下でしか生着できない。本課題ではその腫瘍細胞と炎症細胞との相互作用について分泌性小分子 RNA の観点から検討を行い次のような結果を得ている。1)試験管内とヒトリンパ腫検体において、腫瘍由来分泌性小分子 RNA がエクソソームに内包され単球/マクロファージに特異的に取り込まれること、2)ヒト単球に対する腫瘍由来分泌性小分子 RNA を内包するエクソソームの作用を調べ CD69/IL-10/TNF の発現増強のほか、免疫抑制性の M2 マクロファージで高発現する遺伝子の発現上昇を引き起こし、マクロファージを腫瘍支持性へ変化させること、3)ヒト EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫患者病理検体における EBV コード miRNA の一つである BART13 の標本全体の発現量や腫瘍細胞あたりの産生量と生存期間が有意に相関し、腫瘍由来小分子 RNA が癌生物学的に極めて重要な機能を持つこと、4)造血系ヒト化 NOG マウスに EBV 感染させる EBV リンパ増殖疾患モデルを確立し、EBV コード miRNA 欠損株と野生型 EBV の作用を検討したところ欠損株において炎症や腫瘍の形成がされにくく、EBV コード miRNA に炎症惹起、腫瘍形成促進作用があることを明らかにした。

今後、エクソソームや特定のマクロファージサブセットを除去するなど、現在有効な治療法のない EBV 関連リンパ腫に対する新たな治療につながることで、また腫瘍由来分泌性小分子 RNA—マクロファージ腫瘍随伴化—腫瘍形成維持という軸が他のウイルス感染症・炎症癌においても一般化できる可能性が期待できる。これまでの研究成果を論文として公表するとともに、この領域をリードする研究者としてさらに成長することを期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表著者. 発表論文タイトル. 掲載誌名. 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他

1.Kazuki Okuyama, Tomokatsu Ikawa, Bernhard Gentner, Katsuto Hozumi, Ratanakanit Harnprasopwat, Jun Lu, Riu Yamashita, Daon Ha, Takae Toyoshima, Bidisha Chanda, Toyotaka Kawamata, Kazuaki Yokoyama, Shusheng Wang, Kiyoshi Ando, Harvey F. Lodish, Arinobu Tojo, Hiroshi Kawamoto, and *Ai Kotani
miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors
Proc Natl Acad Sci U. S.A. 2013 Aug 13; 110(33):13410-5. (IF10)

2. Kazuaki Yokoyama, Nozomi Yokoyama, Kiyoko Izawa, Ai Kotani, Akira Harashima, Katsuto Hozumi, and *Arinobu Tojo
In vivo leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor α chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells
BLOOD. 2013 Dec 19; 122(26):4259-63. (IF10)

- | |
|--|
| <p>3. Natsuko Yamakawa, Kazuki Okuyama, Jun Ogata, Akinori Kanai, Aleksandra Helwak, Masako Takamatsu, Ken-ichi Imadome, Koh-hei Takakura, Chanda Bidisha, Natsumi Kurosaki, Haruna Yamamoto, Kiyoshi Ando, Hirotaka Matsui, Toshiya Inaba,* Ai Kotani Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1 Nucleic Acids Res. 2014 Apr; 42(8):5289–301. (IF9)</p> |
| <p>4. Haruna Yamamoto, Jun Lu, Shigeyoshi Oba, Toyotaka Kawamata, Akihide Yoshimi, Natsumi Kurosaki, Kazuaki Yokoyama, Hiromichi Matsushita, Mineo Kurokawa, Arinobu Tojo, Kiyoshi Ando, Kazuhiro Morishita, Koko Katagiri, and Ai Kotani* miR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target Scientific Reports minor revised</p> |

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

- 2012.12 EBV-Specific Micro-RNA Via Exosome: A Key Inter-Cellular machinery between EBV+ Tumor and Tumor-Surrounding Immune Cells?
American Society of Hematology 54th Annual Meeting, Atlanta (Oral Presentation)
- 2013.12 A Single Micro-RNA Can Completely Rescue B-Cell Differentiation Arrest Due To EBF1 Deficiency: Can Micro-RNA Control Cell Fate As a Potential Alternative Of Transcriptional Factor?
54th Annual Meeting of American Society of Hematology New Orleans (Oral Presentation)
- 2013.11 EBV 関連リンパ腫から放出される分泌性 EBV コード小分子 RNA の炎症性ニッチ形成における役割
第 61 回日本ウイルス学会 神戸 (シンポジウム招待講演)
- 2013.10 治療標的としての AID
The 75th Annual Meeting of JSH (Japanese Society of Hematology) 札幌 (シンポジウム招待講演)
- 2013.10 Tumor derived small RNA regulates “inflammatory niche”
The 72th Annual Meeting of JCA201 (Annual meeting of Japan Cancer Association) 横浜 (International Session 招待講演)
- 2013.12 miRNA は細胞運命制御において転写因子をレスキューできる
第 36 回分子生物学会年会 神戸 (ワークショップ指定講演)
- 2014.4 A single micro-RNA can completely rescue B-cell differentiation arrest due to EBF1 deficiency-Can micro-RNA control cell fate as a potential alternative of transcriptional factor?
Cold Springs Harboer laboratory the seventh Cold Spring Harbor meeting;; Gene

Expression & Signaling in the Immune System New York USA (Talk)

2014.7 EBV 感染リンパ腫細胞より分泌される小分子 RNA の機能

第 35 回日本炎症・再生医学会 沖縄 (シンポジウム招待講演)

2015.3 A single miRNA can rescue B lineage commitment arrest due to EBF1 deficiency

Keystone Symposium The golden anniversary of B cell discovery Banff Canada

(Invited Speaker)

2015.10 miRNA が転写因子欠損をレスキューする

第 65 回日本癌学会 名古屋 (シンポジウム招待講演)

プレスリリース等

2013.7 白血病細胞の異常を修復するRNAの発見

科学技術振興機構報 第 971 号

<http://www.jst.go.jp/pr/info/info971/>