

# 研究終了報告書

## 「がん免疫を賦活化する細胞外小胞の生成メカニズムと作用機序の解明」

研究期間： 2017 年 12 月～2021 年 3 月

研究者： 諸石 寿朗

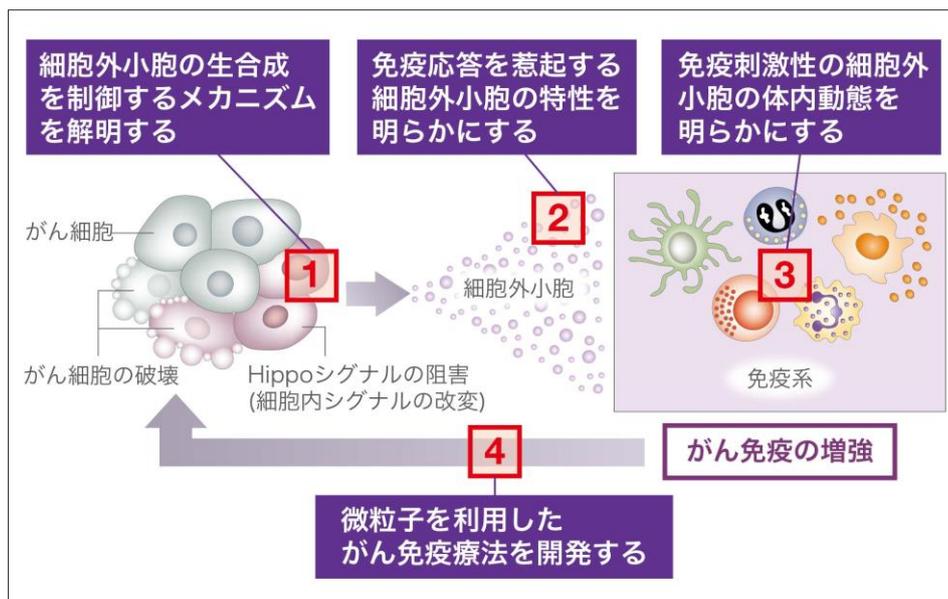
### 1. 研究のねらい

エクソソームを中心とした細胞外小胞は細胞同士のコミュニケーション方法として、その生物学的意義や疾患への関与、またリキッドバイオプシーなどの臨床応用も含めて近年注目を集めているが、その細胞内での生合成メカニズムや細胞外動態は大きなブラックボックスとなっている。また、細胞外小胞の生理機能に関しても不明な点が多く、特に免疫系との関連においては、各々の研究において設定された実験条件や細胞種の違いによって、細胞外小胞が免疫応答を刺激する作用や、反対に免疫応答を抑制する作用がそれぞれ報告されるなど、免疫系における細胞外小胞の生物学的意義は混沌としている [Nat. Rev. Immunol. 14, 195-208 (2014)]。この混乱の一因として、細胞外小胞が不均一な集団であることが挙げられる。細胞外小胞はその大きさや構造、内包する核酸やタンパク質などが一つ一つの細胞間で異なっており、それゆえ「細胞外小胞」として一括りにしてしまうと、一見すると矛盾するように見える多彩な生理機能を示すと考えられる。

がん免疫の研究分野では、一般にがん細胞が放出する細胞外小胞は免疫応答を抑制し、がん細胞の生存に有利に働くと考えられてきた。しかし、われわれは過去の研究で、がん細胞において Hippo 細胞内シグナル伝達経路を阻害することにより宿主のがんに対する免疫応答が誘導され、この際に放出される細胞外小胞は免疫応答を誘導する性質を持つことを明らかにした [Cell 167, 1525-1539 (2016)]。すなわち、細胞外小胞には免疫刺激性のものと免疫抑制性のものが混在すると考えられ、それぞれの細胞の特性(大きさや構造、内包する核酸やタンパク質)や生合成メカニズム、および生体内での動態を明らかにすることによって、細胞外小胞による免疫システムの制御に対する理解が進むものと考えられる。

そこで、本研究においては、免疫応答を刺激する性質のある細胞外小胞の生合成メカニズムと、その内包する構成分子の特性、および生体内における作用メカニズムを明らかにし、そのような特性を備えた人工微粒子を利用した新しいがん治療法の開発をめざした(図1)。この目的のため、以下の4つの項目に関して研究に取り組んだ。

- ① 細胞外小胞の生合成を制御するメカニズムを解明する
- ② 免疫応答を惹起する細胞外小胞の特性を明らかにする
- ③ 細胞外小胞の生体内での体内動態を明らかにする
- ④ 微粒子を利用したがん免疫療法を開発する

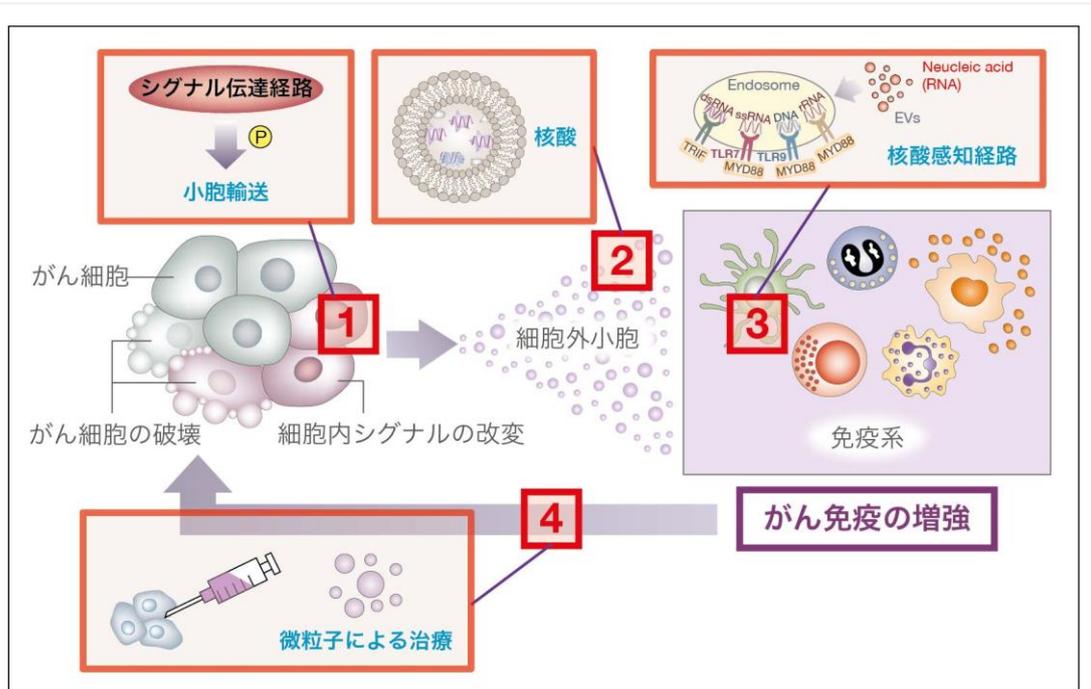


[図1] 研究のねらい | 免疫刺激性の細胞外小胞の生成メカニズムおよび生体内における作用メカニズムを明らかにする。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

がん細胞において細胞外小胞の生合成が制御されるメカニズムとして、Hippo 細胞内シグナル伝達経路が細胞内小胞輸送を制御し、LC3 のエンドソーム膜への結合を介した機構により細胞外小胞への核酸の集積に関与することを見出した。また、免疫刺激性の細胞外小胞には RNA を中心とした核酸が多く含まれ、これが樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれることによって宿主の核酸感知経路を刺激し、免疫応答が誘導されることが分かった。さらに、このような免疫刺激性の細胞外小胞の特性を模倣する微粒子として、抗原提示細胞への取り込みを促す糖鎖と、核酸感知経路を刺激する TLR7 リガンドを金ナノ粒子に結合させた微粒子を利用し、マウス B16 メラノーマモデルにおいて治療効果を得た(図2)。



【図2】 研究成果の概要 | 免疫刺激性の細胞外小胞の生成・作用メカニズムの一端が明らかになった。

## (2) 詳細

### 研究テーマ①「細胞外小胞の生合成を制御するメカニズムの解明」

Hippo 細胞内シグナルは LATS1/2 キナーゼを中心としたリン酸化シグナル伝達経路であり、転写共役因子 YAP/TAZ をリン酸化することによって転写を制御することが一般に知られている。しかし、Hippo 経路による細胞外小胞の生合成制御に関しては YAP/TAZ の関与は部分的であることがわかり、そのため LATS1/2 キナーゼの下流で細胞外小胞の生合成を制御する分子を、リン酸化プロテオミクスを用いて網羅的に探索した。これにより Hippo 経路と細胞内小胞輸送の関係性が示唆され、これらの分子の中から RAB11FIP ファミリータンパク質 (特に class I に分類される RAB11FIP1/2/5) に焦点を絞りメカニズムの解明を進めた。LATS1 キナーゼは RAB11FIP1 を直接リン酸化し、Hippo 経路を阻害した (LATS1/2 キナーゼを欠損させた) 細胞では RAB11FIP1 の細胞内分布のパターンが変化することがわかった。すなわち、Hippo 経路が RAB11FIP1 の分子機能を制御する可能性が示唆された。

一般に、RAB11FIP は小胞輸送タンパク質 RAB11 のエフェクター分子として機能することが知られている。また、過去の研究において、RAB11 はオートファジー関連タンパク質 LC3 の膜への結合に関与することが報告されており [Dev. Cell 45, 114–131 (2018)]、さらに、最近の研究で、LC3 のエンドソーム膜への結合が細胞外小胞への RNA の集積に関与している可能性が見出された [Nat. Cell Biol. 22, 187–199 (2020)]。研究項目②において、LATS1/2 欠損がん細胞から放出され

る細胞外小胞には RNA が多く含まれることを見出していたため、このような研究背景から、Hippo 経路による細胞外小胞の生合成制御に LC3 が関与する可能性を調べた。

野生型と LATS1/2 欠損がん細胞において LC3 の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察したところ、LATS1/2 欠損がん細胞では LC3 の斑点 (puncta) が認められることを見出した。RAB5 の恒常活性化変異体を発現させたところ、この LC3 puncta は RAB5 compartment に存在したことから、LATS1/2 欠損がん細胞ではエンドソームへの LC3 の結合が促進されている可能性が示唆された。さらに、LATS1/2 によってリン酸化されない RAB11FIP1 変異体を過剰発現した細胞でも同様に LC3 puncta が認められ、逆に、リン酸化擬似 RAB11FIP1 変異体を過剰発現した LATS1/2 欠損がん細胞では LC3 puncta が消失した。以上の結果から、LATS1/2 による RAB11FIP class I protein (RAB11FIP1/2/5) のリン酸化はエンドソームへの LC3 の結合を抑制しており、LATS1/2 欠損がん細胞では RAB11FIP class I protein (RAB11FIP1/2/5) がリン酸化されないためにエンドソームへの LC3 の結合が誘導され、その結果、細胞外小胞への RNA loading が促進される、というモデルが考えられた。

#### 研究テーマ②「免疫応答を惹起する細胞外小胞の特性の解明」

様々な組織由来のがん細胞において Hippo 経路を阻害したがん細胞株を作出し、免疫刺激性の細胞外小胞の特性を細胞横断的に評価した。これらのがん細胞をマウスに移植した場合、がん種によらず宿主の強力な抗腫瘍免疫応答を誘導することがわかった。また、細胞外小胞中に存在するタンパク質のプロテオミクス解析を行なった結果、Hippo 経路を阻害することで細胞外小胞中に RNA 結合タンパク質が増加し、その RNA 含有量が増加することがわかった。さらに、核酸感知経路に異常のある遺伝子改変マウスでは、Hippo 経路の阻害による抗腫瘍免疫応答の増強効果も減弱することもわかり、これらの結果から、RNA を多く含む細胞外小胞が免疫応答を誘導する性質を持つ可能性が示された。一方、細胞外小胞に内包される RNA の配列を次世代シーケンサーにて詳細に解析したが、免疫応答を誘導する特定の RNA 配列の同定には至らなかった。本研究項目の推進により、宿主の核酸シグナルを刺激する特性をもった細胞外小胞が抗腫瘍免疫応答の誘導に重要であることが明らかになったが、免疫刺激性の細胞外小胞に関してはその特性の一端が明らかになったにすぎず、その膜表面 (糖鎖修飾など) や内包物の特徴をさらに解明していくことが今後の研究の課題である。

#### 研究テーマ③「細胞外小胞の生体内での体内動態の解明」

がん細胞から分泌される細胞外小胞を可視化するため、細胞外小胞のマーカーとなる CD63 とルシフェラーゼ nanoLuc を融合させた CD63-nanoLuc 融合タンパク質を発現させたがん細胞をマウスに移植し、がん細胞由来の細胞外小胞を取り込む細胞を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、マクロファージや樹状細胞などの

抗原提示細胞にがん細胞由来の細胞外小胞が多く取り込まれていることを見出した。次に、CD63-nanoLuc を発現するがん細胞をマウスに移植し、腫瘍微小環境から免疫細胞をセルソーターで分離し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、同様に樹状細胞の細胞表面マーカーを持つ細胞集団にルシフェラーゼ活性があることがわかった。これらの結果から、免疫刺激性の細胞外小胞は樹状細胞に取り込まれることが示唆された。さらに、これらの樹状細胞内のシグナルの変化をマスサイトメーターによる解析で調べたところ、樹状細胞の抗原提示能力に関わるとされる ERK や AMPK のリン酸化レベルが変化していた。本研究項目の推進により、免疫刺激性の細胞外小胞が樹状細胞に取り込まれ、その性質を変化させるという体内動態の一端が明らかになったが、これらの観察は全てスナップショットでしか達成できておらず、ライブでの観察や半減期の把握など、生体における体内動態の全体像の把握にはさらなる研究開発が必要である。

#### 研究テーマ④「微粒子を利用したがん免疫療法の開発」

上記項目を踏まえて明らかになった細胞外小胞の特性のうち、抗原提示細胞への取り込みを促す糖鎖と、核酸感知経路を刺激する TLR7 リガンドを微粒子(金ナノ粒子)に結合させることで、がんに対する免疫応答の誘導が可能かを検証した。マウス B16 シンジェニックメラノーマモデルにおいてこのような微粒子の腫瘍内直接投与を行ったところ、腫瘍に対する免疫応答が増強され、がんの進行が有意に抑制されることを見出した。次に、金ナノ粒子に結合させる糖鎖の種類によって、誘導される免疫応答の性質に違いがあるかも検討した。その結果、同じ TLR7 リガンドでも糖鎖の種類によって抗腫瘍免疫応答に重要な Th1 型細胞性免疫の誘導能が大きく異なることが明らかになった。このことは、免疫応答を刺激する TLR7 リガンドの作用のみでなく、金ナノ粒子がどの細胞に取り込まれるかを規定する糖鎖の種類が、効率的な免疫応答の誘導に影響を与えることを示唆している。本研究項目の推進により、宿主の核酸感知経路を刺激する TLR7 リガンドを微粒子の利用によって抗原提示細胞へ取り込ませることで、がんに対する免疫応答の誘導を促進できる可能性が示唆された。

### 3. 今後の展開

本研究の推進により、がん細胞において免疫応答を刺激する細胞外小胞が生成される仕組みとその特性の一端が明らかになった。研究項目①に関しては、Hippo 経路による RAB11FIP の制御と LC3 のエンドソーム膜への結合、細胞外小胞への RNA 集積の関係性が明らかになったが、今後は RAB11FIP が LC3 のエンドソーム結合を制御するメカニズムを分子レベルでより詳細に解明していく必要がある。さらに、それらの分子を標的として、免疫刺激性の細胞外小胞の生合成を制御する手法(低分子阻害剤の利用など)の開発にも研究を発展させていきたい。研究項目②に関しては、細胞外小胞の膜表面の糖鎖修飾などを含めてさらに特

性を明らかにしていく必要があるが、がん細胞が放出する細胞外小胞における核酸、特に RNA 含有量とがん細胞の免疫応答性の関係をヒトサンプルにおいて調べることにより、がん治療のバイオマーカーとしての有用性を検証していきたい。研究項目③④に関しては、宿主の核酸感知経路を刺激する TLR7 リガンドを微粒子の利用によって樹状細胞へ取り込ませることで、がんに対する免疫応答の誘導を促進できる可能性が示唆されたため、将来的な社会実装に向けた開発を推進していく。具体的には、本研究で用いたシンジェニックマウスモデルのみでなく、遺伝子改変マウスにおける発癌モデル等でも効果を検証する。また、より効果的な糖鎖の種類を検討や、投与方法の検討、体内動態の把握なども将来的な治療応用に向けて必要となると考えられ、このような研究開発を進めていきたい。

#### 4. 自己評価

本研究においては、免疫応答を刺激する性質のある細胞外小胞の生成メカニズムと、その内包する構成分子の特性、および生体内における作用機序を明らかにし、そのような特性を備えた人工微粒子を利用した新しいがん治療法を開発することを目標に研究を推進した。

細胞外小胞の生成メカニズムの解明に関しては、それまで未解明であった Hippo 経路と細胞内小胞輸送の関連を明らかにし、Hippo 経路の下流で細胞外小胞に RNA が積み込まれる仕組みが分子レベルで明らかになりつつある点は評価される。一方で、RAB11FIP と LC3 を結ぶ詳細な分子間相互作用に関しては現時点で証明が不十分であり、今後の研究で全貌を解明し、原著論文として研究成果を発表していく必要がある。

また、免疫刺激性の細胞外小胞の特性と体内動態に関しては、核酸を多く含む細胞外小胞が樹状細胞などの抗原提示細胞において核酸感知経路を活性化することで、がんに対する免疫応答を誘導することが明らかになった。このように、細胞外小胞による免疫応答誘導の作用機序の概要が明らかになったものの、例えば、樹状細胞の中でもこういったサブセットのものに取り込まれやすいか、なぜ樹状細胞に取り込まれやすいのか、樹状細胞に取り込まれた後に分子レベルで何が起きているのか、など、多くの学術的課題や疑問が残されており、その全体像把握には更なる研究の推進が必須である。

最後に、人工微粒子を利用したがん治療法の開発に関しては、糖鎖と TLR7 リガンドを結合した微粒子によりがん免疫の誘導が可能であるという概念を提案できた点は評価できる。一方で、今後の展開の項目で述べたように、社会的な実装に向けては多くの課題が山積しており、今後の研究の進展に期待したい。

研究課題全体を通しての反省点は、研究期間内に英文原著論文という形で研究成果の発表ができなかったことが挙げられる。一つ一つの研究開発項目に関してはそれぞれ進捗が認められ、個々の進捗は学会等で外部発表も行なったものの、研究開発項目①～④を通じた形での、全体としての論文発表が達成できなかった。この原因として、1) 研究計画当初の目標設定を大きくしすぎ、個々の要素ごとに細かく論文として発表するのではなく、全ての要素をまとめて大きな形で論

文化しようとしたために多大な実験データを要したこと。2) それにより個々の課題の推進力が分散してしまい、短い研究期間内での完遂が難しかったこと、3) 研究期間内に研究室の立ち上げがあり、研究環境整の変化に適応するのに時間を要したこと、などが反省すべき点である。しかし、本研究で明らかになった学術的項目は今後の自身の研究にとって礎となるものであり、これらの反省をもとに論文投稿の準備を進めるとともに、将来的な研究の発展に向けて本課題をさらに昇華していきたい。特に、本研究で開発した免疫応答を誘導する微粒子は今後のがん治療への応用を期待させるものであり、上述の展望で述べた項目を中心に、社会実装へ向けての開発をより一層進めていきたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Shinchii, H., Yamaguchi, T., Moroishi, T., Yuki, M., Wakao, M., Hayashi, T., Cottam, H.B., Carson, D.A., and Suda, Y. Gold nanoparticles co-immobilized with small molecule toll-like receptor 7 ligand and  $\alpha$ -mannose as adjuvants. *Bioconjugate Chem.* 30, 2811–2821 (2019).

本論文では金ナノ粒子にTLR7リガンドの一種である1V209とマンノースを結合させることにより、免疫応答を誘導するアジュバント活性がもたらされることを報告した。

### (2) 特許出願

該当なし

### (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)

1. [学会発表] 諸石寿朗、Hippo 経路と細胞外小胞によるがん免疫の制御、第41回日本分子生物学会年会(横浜, 2018)
2. [総説論文] Yamauchi, T., and Moroishi, T. Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. *Cells* 8, 398 (2019).
3. [学会発表] 諸石寿朗、細胞外小胞による免疫応答の制御、第42回日本分子生物学会年会(福岡, 2019)
4. [学会発表] Moroishi, T. Regulation of anti-tumor immunity by extracellular vesicles and the Hippo pathway 第93回日本生化学会大会(オンライン, 2020)

5. [総説論文] Yamauchi, T., and Moroishi, T. The Yin and Yang of tumor-derived extracellular vesicles in tumor immunity. *J. Biochem*, in press, doi: 10.1093/jb/mvaa132 (2020).