

炎症性ニッチにおける腫瘍由来分泌性小分子 RNA

東海大学 医学部 基盤診療学系 再生医療科学 造血腫瘍分野

幸谷 愛

1. はじめに 目的

近年、miRNA などを含む小分子 RNA が、エキソソームに内包されて、体液中に安定的に存在することが明らかになった。更にそれらは、細胞内に取り込まれて機能し、サイトカインやケモカインと同様細胞間コミュニケーターとして働くことが明らかとなった。特に癌の転移ニッチ形成において不可欠であることが前立腺がん、乳がんでは報告されている。

EBV陽性ホジキンリンパ腫はHRS (Hodgkin and Reed Sternberg) 細胞とよばれる癌細胞と、“炎症性ニッチ”とよばれる多種多様な炎症細胞からなる血液腫瘍である。炎症性ニッチの成り立ちについては、抑制性マクロファージ(M0)の関与が特に大きいこと以外、既存の遺伝子を中心とした切り口では未解決な問題が多く残る。EBVコードmiRNAはEBV感染細胞にのみ発現するため、炎症性ニッチでは、腫瘍細胞だけに発現するが、それらがM0に選択的に取り込まれて、その機能変化に関与する手がかりを得た。そこで本研究では、試験管内、マウス生体内、そしてヒトEBV陽性ホジキンリンパ腫病理組織からなる多層的なアプローチにより、EBV陽性ホジキンリンパ腫におけるEBV潜伏化・炎症遷延化の過程で腫瘍細胞より分泌されるEBVコードmiRNAが炎症性ニッチの生成に及ぼす影響を、M0を軸に明らかにすることを目標とする。

ヒトホジキンリンパ腫病理組織においてEBVコードmiRNAがM0に選択的に取り込まれ (Fig1)、更にその機能を制御する手がかりを以下の通り得ている。

ヒトホジキンリンパ腫由来細胞株L591とその培養上清についてEBVコードmiRNAに対する定量PCRを行ない、上清中に大量のEBVコードmiRNAが検出されたため (Fig2)、同細胞から分泌されるエキソソームの末梢血単核球(PBMCs)での取り込みをPKH染色にて検討し、単球が選択的に取り込むことを示した (Fig3)。EBV感染にはType1, 2, 3があり、3にのみ免疫原性がある。

L591は樹立途中にType2からType3へ変化した細胞株であり、Type2由来のリンパ系細胞株は現在まで樹立されていないので、以後はType1とType3細胞株を用いて解析を行った。Type1細胞のDaudi細胞とType3細胞のX70-9細胞の培養上清からエキソソームを回収し、PBMCに添加したところ、Type3由来がType1由来のエキソソームよりCD14, CD69, IL-10, TNF α の発現著増を示した。(Fig4) Type1細胞が分泌するEBVコードmiRNAがType3細胞に比して全体的に少なかった。(Fig5)そこで、エキソソームに内包されるEBVコードmiRNAの単球への影響を調べるため、17種類のEBVコードmiRNAをコードするクラスター2BARTsを、Type1細胞中で過剰発現して、クラスター2BARTsの発現が数倍に増加したエキソソームを回収し単球に対する影響を検討した。その結果、単球のCD69, CD14の発現が増加し、Type3細胞由来のエキソソームの添加で認められたパターンと同様のパターンに変化した(Fig5A)。逆にBARTを欠損したEBVからType3細胞を樹立し同様の実験を行ったところType1パターンに変化した。

EBV陽性リンパ腫細胞から放出されたエキソソームに含まれるEBVコードmiRNAが単球に取り込まれて機能変化を引き起こす可能性が示唆された。興味深いことは、免疫原性がないType1細胞由来エキソソームにEBVコードmiRNAを導入すると、それを取り込んだ単球のFACSパターンが免疫原性のあるType3細胞由来と同じ表面形質になることである。分泌性EBVコードmiRNAがEBV感染細胞の潜伏化に伴う炎症細胞の制御に関与する可能性を示す重要な結果と考えられる。

2. 方法

そこで、以下の研究計画に沿って、分泌性EBVコードmiRNAの単球/M0に対する制御とその炎症性ニッチ形成での意義、機能を明らかにした。

(i) がん微小環境において重要な炎症性/抑制性M0の極性に対する影響の検討 (Fig6)

これまでに、CD14/69の発現が高いパターンにおいて抑制性M0のマーカーであるIL-10の発現が10倍以上高いとのデータを得ている。そこで、分泌性EBVコードmiRNAの炎症性/抑制性M0の極性バランスへの影響、炎症性ニッチ形成への関与を解析するため、それぞれを添加したPBMCsをM0へ分化誘導し、サイトカインプロファイル、形態、貪食作用、抗原提示能、白血球遊走能を検討し極性と免疫細胞への影響を明らかにする。

(ii) 単球/マクロファージ内のEBVコードmiRNAのターゲット遺伝子の同定 (Fig6)

一つのmiRNAは多数の遺伝子をターゲットとする。よってクラスターmiRNAsのターゲット遺伝子数は相当数となるが、in silico ターゲット遺伝子予測ソフトウェアのTargetScanとcDNAアレイを組み合わせる網羅的なターゲット遺伝子予測、同定を試みる。予測された遺伝子の3' UTRを導入したルシフェラーゼアッセイを用いて実験的にmiRNAによる発現抑制を確認した遺伝子についてパスウェイ解析を行って、EBVコードmiRNAがターゲットとする遺伝子群が関与する機能を明らかにする。

(iii) マウスモデルを用いての生体内炎症性ニッチ形成への影響

前述のシステムを用いて、NOGマウス生体内におけるEBV感染細胞と炎症細胞をイメージングし、体外から導入したエクソソームに含まれるEBVコードmiRNAの影響を生きたままのマウスで観察すると共に病理学的解析を行う。臍帯血においてエクソソーム合成酵素であるSMase2をノックダウンし、エクソソームを分泌できないヒト造血系を構築したNOGマウスを作製し、野生型EBVを感染させる。SMase2のノックアウトマウスは脂質代謝に異常を示すが造血システムは正常であるためSMase2をノックダウンしても造血系の構築が可能と考えられる。まず、腫瘍の生成の有無を観察する。その後、体外で同じ臍帯血に野生型、クラスター1, 2 BARTsやBART2-5pをそれぞれ、および全てを欠損する組み換えウイルスを感染させて作成したB細胞株の培養上清から、エクソソームを回収し腫瘍に局所注入して腫瘍表現形質の変化を検討し、エクソソーム、そこに含まれている分泌性EBVコードmiRNAの腫瘍形成における機能を解析する。組み換えウイルスの作製が困難である場合は(Kanda personal communication) 上記B細胞株にEBVコードmiRNAを過剰発現させ、EBVコードmiRNAを増量したEBV細胞株由来エクソソーム作成し、局注して、腫瘍形成能の変化を解析する。

3. 結果 研究成果

(1) ヒト末梢血単核球を用いた解析では、個体差が大きく、また検体の採取が限定的であるため、ヒト単核球白血病由来細胞株であるTHP1にテトラサイクリン誘導的にEBVコードmiRNAを導入し、その影響を調べることにした。

まず、テトラサイクリン依存的にEBVコードmiRNAを発現できるか否かを検討したところ、2種類のEBVmiRNAで、その発現誘導が確認された。

上記細胞株においてEBV miRNAを発現誘導した時の遺伝子発現をmicro Arrayを用いて網羅的に解析した。

その結果種々の免疫反応に関わる遺伝子の発現増減が認められた。(Fig 6)

発現が減少した遺伝子の中で、EBVmiRNAが標的としているとコンピューター解析で予想されている遺伝子群32個が同定され、その中には5つの転写因子が含まれていた。

(2) 上記のシステムで発現が低下し、EBVmiRNAの標的であることが明らかになっているNLRP3について、パスウェイ解析をした。その結果、NLRP3の下流に存在し、炎症惹起サイトカインの中でも重要な機能を持つIL-1の発現が低下しており、腫瘍排除に働くパスウェイの低下を見出した。

(3) EBVは霊長類にしか感染せず、マウスの造血系をヒト化する必要がある。その際にエクソソーム合成酵素であるSMase2に対するノックダウンコンストラクトの導入を試みたが、成功しなかった。

そこで、EBVmiRNA 欠損EBV株B95-8と野生型EBVを感染させた時に、両者の腫瘍形成能、腫瘍細胞の増殖能をそれぞれ、造血系ヒト化NOGマウス、ヒト臍帯血を用いて検討した。その結果、試験管内での増殖能はEBVmiRNA 欠損EBV株B95-8で樹立したリンパ芽球細胞株と野生型ではほぼ差異がない、むしろEBVmiRNA 欠損EBV株B95-8で樹立したリンパ芽球細胞株の方が増殖が速いとの結果を得た。

しかし、マウス生体内において、生存はEBVmiRNA欠損株感染マウスの方が長く、腫瘍形成を認めないとの結果を得たこれに対し、野生型感染マウスでは全例に腫瘍形成を認めた。

EBVmiRNA欠損株においては生存マウスにおいてEBV陽性細胞は認められるものの、リンパ増殖疾患を発症したものはなく、野生型では全例に発症例を認めた。

4. 考察 まとめ

以上より腫瘍由来EBVmiRNAが炎症性ニッチを形成するマクロファージに選択的に取り込まれ、それによるマクロファージの形質変化が腫瘍形成に大きな影響を与えることが明らかとなった。

5. 発表論文、参考文献

1. In vivo leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor α chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells.

Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, Tojo A. Blood. 2013 Oct 30

2. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors.

Okuyama K, Ikawa T, Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 13;110(33):13410-5.

申請No1207 図表

Fig1 ヒトホジキンリンパ腫病理検体においてマクロファージに腫瘍由来EBVコードmiRNAが検出される

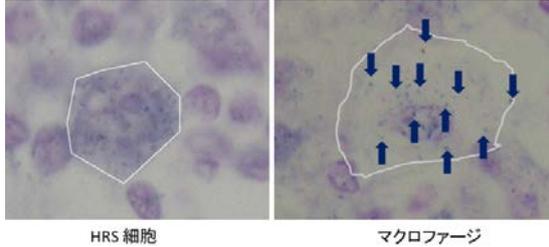


Fig2 L591 上清には細胞内に比して相当量の EBV コード miRNA 量が検出される。

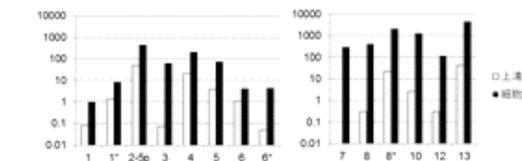


Fig2 分選性EBVコードmiRNAは単球のCD14/CD69発現パターンに影響する

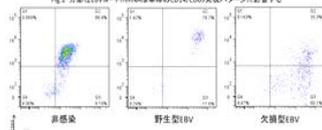


Fig3 L591 由来エキソソームは単球に取り込まれ、リンパ球には取り込まれない

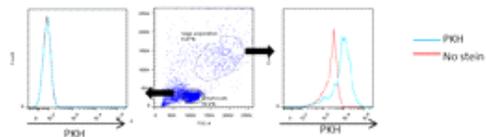


Fig4 TypeI/Type3 細胞由来エキソソームは異なる刺激を単球に与える。

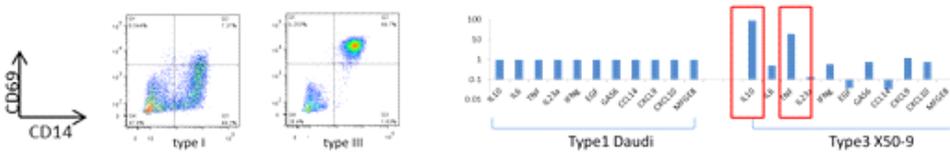


Fig5. EBV コード miRNA は単球を Type1 から Type3由来エキソソーム刺激パターンへと変化させる

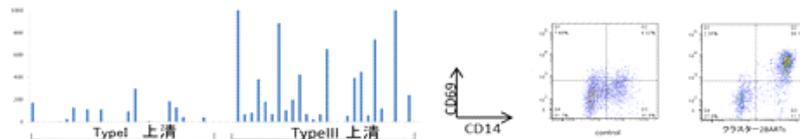
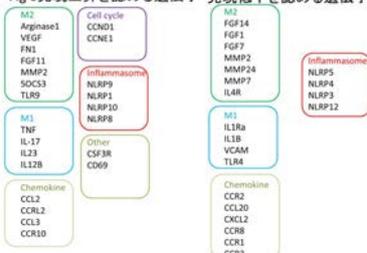


Fig 6発現上昇を認める遺伝子 発現低下を認める遺伝子



BART miRNAs はリンパ腫形成を促進

