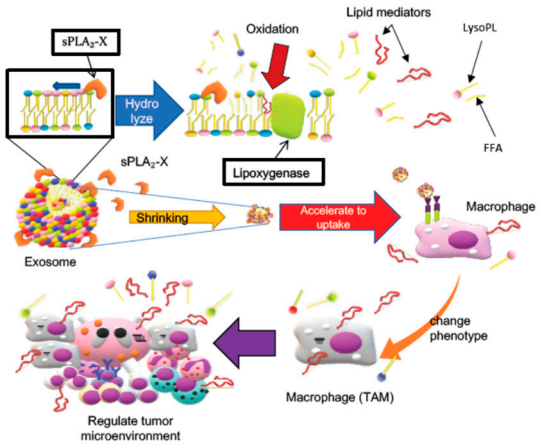
101　ウィルス癌由来エクソソームの新機能	幸谷　愛

【目的】我々は、Epstein-Barr ウィルス（EBV）感染による B 細胞性悪性リンパ腫の発症に関連して、EBV 由来小分子 RNA が細胞外小胞エクソソームを介してマクロファージ特異的に取り込まれることがリンパ腫悪性化の鍵となることを明らかにした。しかし、この内容物の輸送だけで腫瘍悪性化機構の全てを説明しきれないという課題が残ったことから、エクソソーム膜を構成するリン脂質（PL）に着目し解析を行ったところ、腫瘍由来エクソソームの独特な膜 PL 組成が明らかとなった。この知見から、「エクソソーム膜状の PL が脂質メディエーターの供給源になるのではないか」という仮説を考えた。脂質メディエーターにはプロスタグランジン等強力な生理活性を持つ物質が多いため、我々はその産生に関与するリン脂質分解酵素、分泌性ホスホリパーゼ A2（$sPLA_2$）に着目し、エクソソームとの反応性を検証した。その結果、エクソソームが $sPLA_2$の基質となることが明らかとなり、その新たな機能の存在が示唆された。そこで本研究では、癌におけるエクソソーム膜の PL の生物学的意義のさらなる解明に迫ることを目的とした。

【方法】$sPLA_2$処理を行ったエクソソームを用いて以下の実験を行った。1. クライオ電顕による観察：東京大学の共用設備を利用し $sPLA_2$処理後エクソソームの観察を行った。2. 取り込み速度変化の観察：THP-1 細胞株に標識エクソソームを添加し取り込みの様子を FACS と共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。3. $sPLA_2$処理中にエクソソーム上で産生されるメディエーターの同定：質量分析にて酸化脂肪酸の検出を酵素処理前後で行い比較した。4. エクソソームから遊離したメディエーターの検出：$sPLA_2$処理後に限外濾過フィルターを用いてエクソソームと $sPLA_2$により遊離したものとに分画し質量分析にてそれぞれに含まれる脂質を検出した。5. GPCR の活性化：AP-TGFαを THP-1、Jurkat 細胞に発現させ、エクソソームを添加後、その活性の変化をアルカリホスファターゼ活性値として検出した。6. *In vivo* でのフェノタイプ検出：健常マウスに複数回エクソソームを投与し、更に炎症を誘発させたときの変化を ELISA や組織学的手法にて解析した。

【結果】1. クライオ電顕による観察：粒子径の縮小だけでなく膜構造の変化や連銭形成などエクソソームの様々な形態変化が観察された。2. 取り込み速度変化の観察：$sPLA_2$処理エクソソームにて取り込み速度の劇的な亢進が観測された。3. $sPLA_2$処理中にエクソソーム上で産生されるメディエーターの同定：強力な免疫抑制性メディエーターであるレゾルビン D_2（RvD_2）が On site で合成されている可能性が示唆され、さらにこれが取り込み促進に寄与するという側面も明らかとなった。4. エクソソームから遊離したメディエーターの検出：$sPLA_2$処理を行うと多くの脂肪酸やリゾリン脂質、脂質メディエーターが細胞外環境に遊離することが明らかとなった。5. GPCR の活性化：$sPLA_2$処理エクソソームが細胞膜上の GPCR を著しく活性化させることが明らかとなった。6. *In vivo* でのフェノタイプ検出：$sPLA_2$ エクソソームが免疫抑制型フェノタイプを劇的に誘導することが明らかとなった。

EBV 関連癌におけるエクソソームの新機能



101. ウィルス癌由来エクソソームの新機能

幸谷　愛

東海大学 医学部 内科学系 血液・腫瘍内科学

Key words：エクソソーム，EBV，sPLA2

緒　言

癌の発症や悪性化には、炎症の制御が深く関与する。特にウィルス感染により引き起こされる癌の場合は、感染細胞を排除するために惹起された炎症反応の遷延化が癌の発症に寄与する一因ではないかと考えられる。しかしながら、炎症が適切に寛解するのか、それとも遷延化に至るのかを制御する仕組みは未だ十分に解明されていない。本研究では、新しい研究分野である細胞外分泌小胞エクソソームに着目し、そのリン脂質組成の変化が炎症の寛解・遷延化に及ぼす影響を解析する。

我々はこれまでに、Epstein-Barr ウィルス（EBV）感染による B 細胞性悪性リンパ腫の発症に関する研究を遂行してきた。その過程で、リンパ腫細胞から分泌されるエクソソームが、リンパ腫微小環境の炎症制御に極めて重要であり、リンパ腫悪性化に多大な影響を与えることを明らかにした［1］。この先行研究では、1．EBV 感染細胞由来エクソソームがリン脂質の一種であるフォスファチジルセリン（PS）によってマクロファージ特異的に取り込まれ、2．EBV 由来小分子 RNA を輸送することにより、3．IL-10 や TNFα といったサイトカイン産生を促進することがリンパ腫悪性化の鍵となることが明らかにされた。しかし、小分子 RNA の輸送の効果は限定的であり、上記劇的な効果の原因としては一部に留まることが示唆された。そこで、エクソソームを構成するリン脂質組成に着目した。

脂質は、生体膜成分やネルギー源として必須の生体分子であるが、炎症制御に関与する様々な脂質メディエーターの供給源となることも知られる［2］。リン脂質から脂質メディエーターを生成する酵素である PLA_2の遺伝子多型と大腸癌との関連性が示され、癌における脂質メディエーターの供給源としてリン脂質は特に重要と考えられている［3］。

既に EBV 感染によって、抗炎症性脂質である DHA などのω3 多価不飽和脂肪酸と炎症惹起性脂質であるアラキドン酸などのω6 多価不飽和脂肪酸のリン脂質の側鎖構成比がω3 に優位に劇的に変化し、更に細胞に比べ、エクソソームにω3 脂肪酸が濃縮されていること、試験管内においてこのエクソソームが分泌型 PLA_2によって加水分解を受け、ω3 脂肪酸やリゾリン脂質を産生することを見出している。

そこで本研究では、エクソソーム自身を構成するリン脂質が脂質メディエーターに変換されることが、リンパ腫組織中の炎症を制御し、リンパ腫発症に関わる可能性を検証する。

方法および結果

$sPLA_2$処理を行ったエクソソームを用いて以下の実験を行った。

1. クライオ電顕による観察：東京大学の共用設備を利用し $sPLA_2$処理後エクソソームの観察を行ったところ、粒子径の縮小だけでなく膜構造の変化や連銭形成などエクソソームの様々な形態変化が観察された（図 1）。
2. 取り込み速度変化の観察：THP-1 細胞株に標識エクソソームを添加し取り込みの様子を FACS と共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、$sPLA_2$処理エクソソームにて取り込み速度の劇的な亢進が観測された（図 2）。
3. $sPLA_2$処理中にエクソソーム上で産生されるメディエーターの同定：質量分析にて酸化脂肪酸の検出を酵素処理前後で行い比較した。強力な免疫抑制性メディエーターであるレゾルビン D_2（RvD_2）が On site で合成されている可能性が示唆され、さらにこれが取り込み促進に寄与するという側面も明らかとなった（図 3）。

4. エクソソームから遊離したメディエーターの検出：sPLA$_2$処理後に限外濾過フィルターを用いてエクソソームとsPLA$_2$により遊離したものとに分画し質量分析にてそれぞれに含まれる脂質を検出した。その結果 sPLA$_2$処理を行うと多くの脂肪酸やリゾリン脂質、脂質メディエーターが細胞外環境に遊離することが明らかとなった。
5. GPCR の活性化：AP-TGF α を THP-1、Jurkat 細胞に発現させ、エクソソームを添加後、その活性の変化をアルカリホスファターゼ活性値として検出した［4］。その結果 sPLA$_2$処理エクソソームが細胞膜上の GPCR を著しく活性化させることが明らかとなった（図 4）。
6. *In vivo* でのフェノタイプ検出：健常マウスに複数回エクソソームを投与し、更に炎症を誘発させたときの変化をELISA や組織学的手法にて解析した。その結果、sPLA$_2$エクソソーム免疫抑制型フェノタイプを劇的に誘導することが明らかとなった（図 5）。

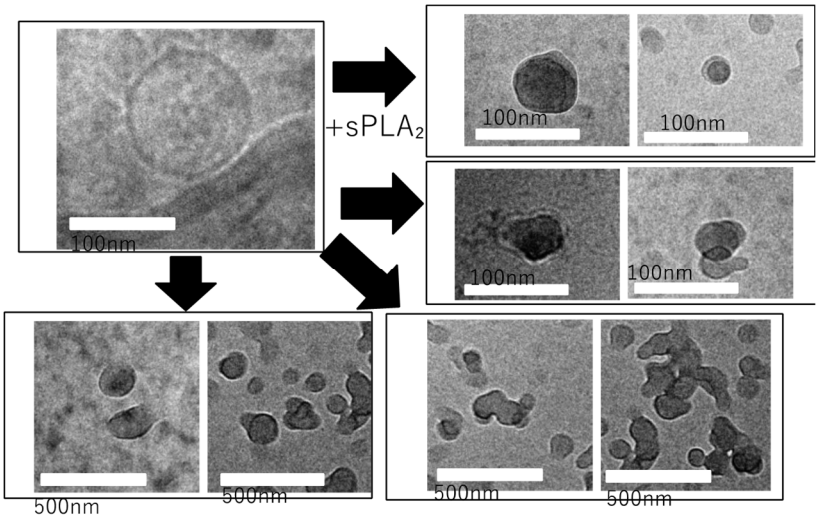


図 1. sPLA$_2$処理によってエクソソームの粒径が小さくなり、融合像が認められる

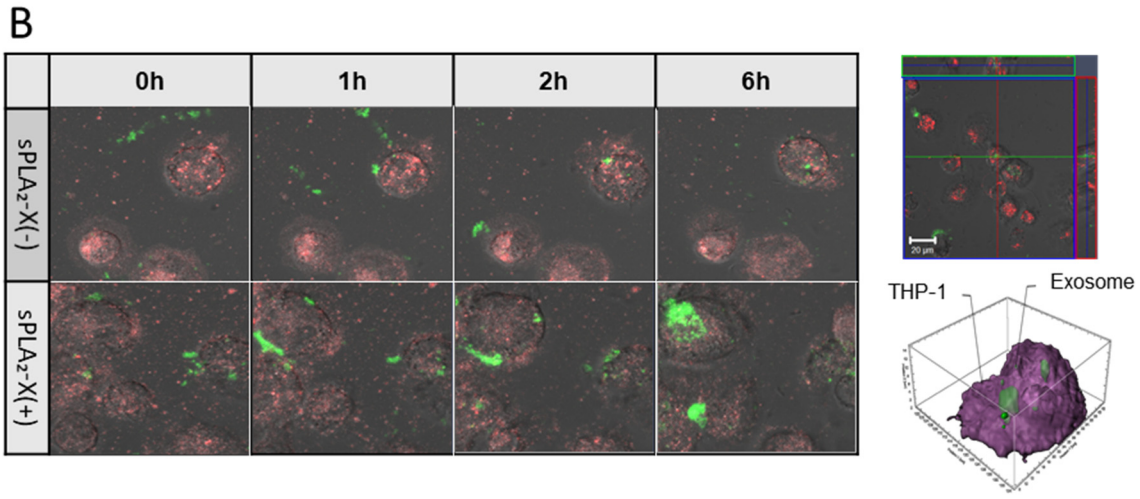


図 2. sPLA$_2$処理したエクソソームのマクロファージによる取り込みは増加する

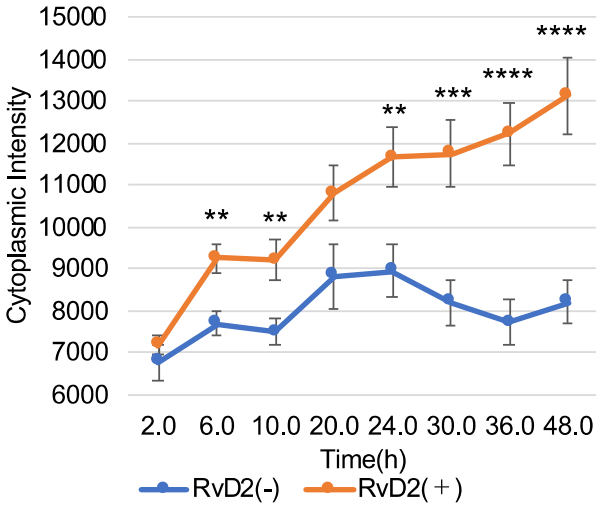


図 3. $sPLA_2$処理によってレゾルビンがエクソソーム中で増加し、レゾルビンはマクロファージによる取り込みを増加させた T test、$P<0.05$。

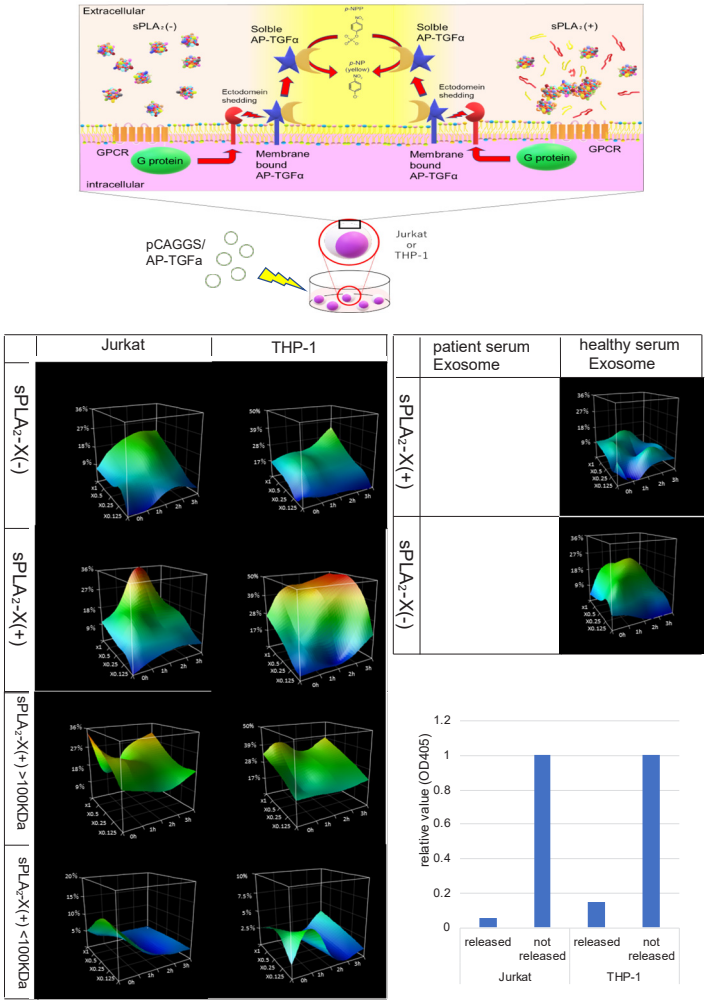


図 4. リゾリン脂質やレゾルビンの受容体である GPCR を検出する TGF α 切断アッセイによって、$sPLA_2$処理エクソソームは取り込みなく細胞にシグナルを伝えることが明らかになった

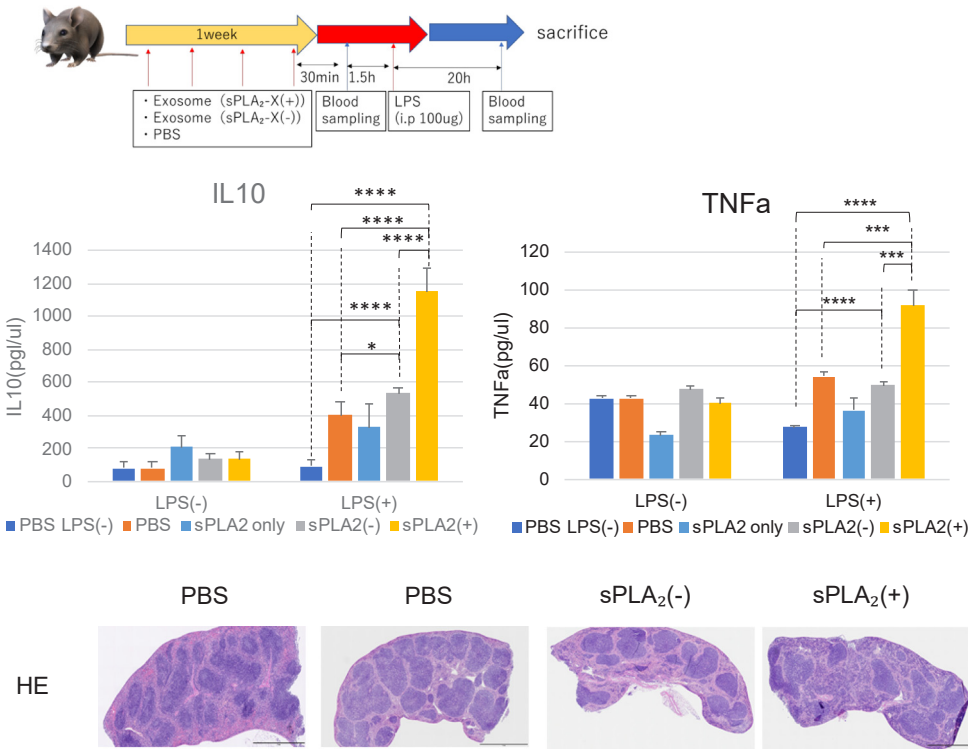


図 5. sPLA2 処理によりエクソソームは強い免疫抑制効果を示す
T test、P<0.05、スケールバー：300 μm。

考　察

腫瘍環境においては、エクソソームは $sPLA_2$による分解を受けることでその機能を飛躍的に向上させるということが明らかとなった。また一方で取り込まれずとも効果を発揮し得る、というエクソソームバイオロジーにおける革新的な作動原理の存在が示唆された。今後の展望としては EBV 腫瘍モデルマウスを使った検討を行い、本現象における治療ターゲットとしての可能性を探索していきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学研究科の村上誠である。

文　献

1) Higuchi H, Yamakawa N, Imadome KI, Yahata T, Kotaki R, Ogata J, Kakizaki M, Fujita K, Lu J, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Alba SM, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Handa H, Kuroda M, Nakamura N, Kotani A. Role of Exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma. Blood. 2018 Jun 7;131(23):2552-2567. doi: 10.1182/blood-2017-07-794529.

2) Serhan CN Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. Nature. 2014 Jun 5;510(7503):92-101. doi: 10.1038/nature13479.

3) Murakami M, Yamamoto K, Miki Y, Murase R, Sato H, Taketomi Y.The Roles of the Secreted Phospholipase A2 Gene Family in Immunology.Adv Immunol. 2016;132:91-134. doi: 10.1016/bs.ai.2016.05.001.

4) Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGFα shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. Nat Methods. 2012 Oct;9(10):1021-9. doi: 10.1038/nmeth.2172