



東京大学
THE UNIVERSITY OF TOKYO

令和 4 年 3 月 1 6 日

科学技術振興機構 (JST)
東 海 大 学
東 京 大 学

リンパ腫における細胞外小胞を介した新規発がんメカニズムを発見 ～脂質を軸とした新たな治療法の開発に期待～

ポイント

- リンパ腫では、「細胞外小胞 (Extracellular Vesicle: EV)」^{注1)}を介した腫瘍と腫瘍微小環境^{注2)}での相互作用により腫瘍形成が促進されるが、その詳細は不明であった。
- 腫瘍微小環境において、腫瘍由来EVはリン脂質分解酵素「sPLA₂」により分解され、その分解産物である脂質が腫瘍形成を促進するという新規メカニズムが明らかになった。
- リンパ腫の発生および悪性化につながる「sPLA₂-EV軸」という新たな免疫チェックポイントをターゲットとした新規治療法の開発が期待できる。

JST 戦略的創造研究推進事業およびAMED 次世代がん事業などにおいて、東海大学 医学部の幸谷 愛 (コウタニ アイ) 教授および東京大学 大学院医学系研究科の村上 誠 (ムラカミ マコト) 教授は、東海大学 大学院医学研究科の工藤 海 (クドウ カイ) 大学院生、東京大学 大学院医学系研究科の三木 寿美 (ミキ ヨシミ) 特任研究員らとともに、リンパ腫の発生や悪性化における細胞外小胞 (EV) の新規作動メカニズムを発見しました。

東海大学 幸谷グループでは、これまでにEpstein-Barrウイルス (EBV)^{注3)}陽性B細胞性悪性リンパ腫の発症におけるEVの役割を調査してきましたが、その作動メカニズムの全容は明らかになっていませんでした。一方、東京大学 村上グループでは、これまでに細胞外環境に存在するリン脂質^{注4)}分解酵素「分泌型ホスホリパーゼA₂ (sPLA₂)^{注5)}」が関与する数多くの生命現象を明らかにしてきましたが、実際にsPLA₂が細胞外で基質としているリン脂質の供給源は不明でした。

本研究では、悪性リンパ腫組織中の腫瘍随伴マクロファージ (TAM)^{注6)}から分泌されるsPLA₂が腫瘍細胞由来EVのリン脂質を分解することを証明しました。さらに、この分解により「細胞への取り込まれやすさ」や「免疫抑制効果」などのEVの機能が飛躍的に向上し、さまざまな生命現象が誘導されることが分かりました。このとき、EVリン脂質の分解産物であるリゾリン脂質などが細胞にシグナルを伝達しているという、これまでのEV生物学にはない新規作動メカニズムを介することを発見しました。そして

本研究グループはヒトにおけるリンパ腫発生を再現したモデルマウスを使って、sPLA₂によるEV分解が腫瘍形成において必要不可欠であることを証明しました。また実際のヒト患者検体の解析からもsPLA₂が腫瘍形成と悪性化に関わることを示しました。

一方で、本研究ではリンパ腫由来EVのみならず他のがん細胞由来EVもsPLA₂により分解されることを証明し、sPLA₂-EV軸は腫瘍形成において共通の現象であることを明らかにしました。今後はこのsPLA₂-EV軸が新たな「免疫チェックポイント」として、がん治療のための新しい薬物標的となることが期待されます。また本研究で証明されたsPLA₂によるEV機能の増強効果から、過去に幸谷グループで報告した「組織保護・抗炎症作用を持つEV」などのさまざまな種類のEVが持つ固有の能力をsPLA₂が増強するのではないかという仮説の検証も現在行っており、今後は治療的応用への発展も期待されます（特許出願中）。

本研究は、東海大学 血液腫瘍内科の安藤 潔 教授、東海大学 病理診断学の中村 直哉 教授、Joaquim Carrelus 講師、東北大学の井上 飛鳥 准教授、徳島大学の山本 圭 准教授、Massachusetts General Hospital / Harvard Medical Schoolの樋口 廣士 研究員、滋賀医科大学の森田 真也 教授、東京大学 大学院薬学系研究科の青木 淳賢 教授らを含む複数機関との共同研究によって得られました。

本研究成果は、2022年3月15日（米国東部時間）に米国科学誌「Cell Metabolism」のオンライン版で公開されます。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

J S T 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域：「細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた基盤技術の創出」
(研究総括：馬場 嘉信 名古屋大学 大学院工学研究科 教授)

研究課題名：「細胞外微粒子の1粒子解析技術の開発を基盤とした高次生命科学の新展開」

研究代表者：渡邊 力也 (理化学研究所 主任研究員)

研究分担者：幸谷 愛 (東海大学 医学部 教授)

研究期間：平成29年10月～令和6年3月

J S Tはこの領域で、細胞外微粒子に起因する生命現象の解明およびその理解に基づく制御技術の導出を目的とします。上記研究課題では、理・工・医学の融合により生体微粒子の組成・機能を解析し、疾患の制御に向けた新規医薬技術基盤の創出を目指します。

AMED 次世代がん医療創生研究事業

研究課題名：「細胞外脂質代謝酵素によるエクソソームの脂質修飾を介したがん微小環境の制御」

研究代表者：村上 誠 (東京大学 大学院医学系研究科 教授)

研究分担者：幸谷 愛 (東海大学 医学部 教授)

研究期間：令和2年度～令和3年度

AMED-CREST 革新的先端研究開発支援事業

研究領域：「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」

(研究総括：吉村 昭彦 慶應義塾大学 医学部 教授)

研究課題名：「疾患脂質代謝に基づく生体組織の適応・修復機構の新基軸の創成と医療技術シーズの創出」

研究代表者：村上 誠 (東京大学 大学院医学系研究科 教授)

研究期間：令和2年度～令和7年度

J S P S 挑戦的研究 (萌芽)

研究課題名：「分泌性PLA₂による新しいエクソソームバイオロジーの構築」

研究代表者：幸谷 愛 (東海大学 医学部 教授)

研究期間：令和2年度～令和3年度

<研究の背景と経緯>

がんの発症や悪性化には、炎症の制御が深く関与しています。中でも炎症反応が長引くことで構築される腫瘍微小環境は、腫瘍形成において極めて重要な役割を担うと考えられています。東海大学 幸谷グループでは、これまでに Epstein-Barr ウイルス (EBV) 陽性 B 細胞性悪性リンパ腫の発症に関する研究から、ウイルス由来遺伝物質を運ぶ細胞外小胞 (EV) がリンパ腫悪性化のカギであることを証明してきました [Higuchi et al. Blood, 2018; 131(23)]。しかしそのウイルス由来遺伝物質のみでは悪性化が誘導されないことから、EV を構成するリン脂質に着目し、その分子内には抗炎症性脂質であるドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が多く含まれるということを示しました。PUFA は機能性脂質「脂質メディエーター^{注7)}」の前駆体であり、通常はリン脂質に結合した状態で存在しますが「分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂)」がこれをリン脂質から切り離すことで脂質メディエーター合成を開始させることが知られています。

一方で近年、炎症やがんにおいては脂質メディエーターの関与が大きいことが知られており、さまざまな疾患へのsPLA₂群の関与が注目されています。そこで「sPLA₂がEV膜上リン脂質に作用することで脂質メディエーターが生成され、腫瘍微小環境に多大な影響を及ぼしている」との仮説を立て、sPLA₂研究で国内随一の実績を持つ東京大学村上グループとの共同研究を行いました。EVを介した物質の輸送に関しては世界中で多くの研究が報告されていますが、その実験系構築の難しさや脂質という領域の複雑さからEVの膜脂質に着目した研究はごくわずかです。そのような中で、本研究グループは上記の仮説をもとに、「実際に腫瘍由来EVがsPLA₂の基質となり得るのか」を皮切りに、両研究グループの強みを生かして、詳細な脂質解析、その生物学的意義および腫瘍形成に及ぼす影響について検討を進めました。

<研究の内容>

本研究では、まず血中の免疫細胞をヒトの細胞に置き換えたヒト化マウス^{注8)}を作成し、EBVを感染させることでマウスにヒトのリンパ腫を自然発生させました。幸谷グループの属する東海大学では、このヒト化マウスモデルを国内最初に作成した実績があり、安定的に作成できました。この腫瘍モデルマウスの腫瘍組織内で発現するsPLA₂を解析したところ、sPLA₂群の中でも強力な活性を持つ「sPLA₂-X」が腫瘍随伴マクロファージ(TAM)に高発現していることが明らかとなりました(図1)。

そこでそのsPLA₂-Xと腫瘍由来EVを試験管内で反応させたところ、大量のリン脂質分解産物が検出され、腫瘍由来EVがsPLA₂に分解されることが証明されました(図1)。またこのときのEVを「クライオ電子顕微鏡」で観察したところ、この反応によりEVの形状が著しく変化することが世界で初めて観察されました(図2)。

次にそのsPLA₂処理EV(sPLA₂ EV)の機能についてさまざまな側面からの解析を行いました。その結果、

- ① EVの古典的作動メカニズムであるマクロファージへの取り込みが促進される
- ② マクロファージにおけるTAMマーカー発現が著しく増加する
- ③ 酵素反応によりEVから生成される脂質メディエーター分子そのものも①・②の機能を促進する
- ④ sPLA₂の酵素反応は腫瘍細胞由来・患者血清由来のEVで起こり、健常者血清由来のEVでは影響が小さい

ことを含むさまざまな現象が明らかとなりました。

一方で、この酵素反応により生成される脂質メディエーターは細胞膜上の「Gたんぱく質共役受容体(GPCR)^{注9)}」を活性化することで効果を発揮することが知られています。sPLA₂ EVでは上記の知見から脂質メディエーターによるGPCRの活性化の可能性が考えられたため、東北大学 井上 飛鳥 准教授、東京大学 大学院薬学系研究科 青木 淳賢 教授が開発した「TGF α Shedding assay [Inoue et al. Nature Methods, 2012; 9]」を用いて解析を行ったところ、EVを取り込む能力のある単球様細胞株THP-1だけでなくEVを取り込む能力の無いTリンパ球系細胞株であるJurkatでもsPLA₂ EVによるシグナル増強が確認されました。これは「EVは細胞に取り込まれずとも作用する」というこれまでのEV生物学にはない新規の作動メカニズムが存在することを意味しており、これにより生体内ではsPLA₂によってEVのターゲット層が大幅に拡大し、さまざまな細胞に影響し得ると考えられます

(図3)。

次に本研究グループは、そのsPLA₂ EVの効果を生体において実証するため、炎症モデルマウスにsPLA₂ EVを投与することで、リンパ腫由来EVが本来持っている抗炎症・免疫抑制効果がsPLA₂によって増強されるかを検討しました。その結果、脾臓(ひぞう)や肺におけるさまざまな抗炎症効果の増強が認められました(図4)。

さらに本研究グループはEBV感染腫瘍形成モデルでの検討も行いました。前述の先行研究においては、腫瘍由来EVを投与すると腫瘍形成が促進されるということが報告されていましたが、本研究では通常の腫瘍由来EVではなくsPLA₂ EVを投与したところ、劇的な腫瘍形成促進効果が確認されました(図4)。また、生体内に存在するsPLA₂を阻害剤によって抑制すると腫瘍形成が完全に抑制されました。

最後にこの現象が実際にヒトでも起こっているのか検討するために、東海大学医学部付属病院で過去にびまん性大細胞型B細胞リンパ腫^{注10)}と診断された患者の腫瘍組織検体全100例を用いてヒト腫瘍組織におけるsPLA₂の発現の有無を調査しました。その結果、sPLA₂-X陽性の患者では悪性度の指標となるバイオマーカーが陰性群より高値を示し、臨床病期も高い傾向が見られ、予後も不良であることが明らかとなりました。

以上の結果をまとめると、腫瘍形成においては腫瘍組織中のTAMより細胞外リン脂質分解酵素sPLA₂が分泌されており、これにより腫瘍細胞から分泌されたEVの膜リン脂質が分解されると、さまざまな脂肪酸やリゾリン脂質が生成され、EVの形態変化・GPCRシグナル増強・取り込みの促進などが誘導され、結果的には腫瘍微小環境の構築が急激に促進され腫瘍形成へとつながることが明らかになりました。一方でこのsPLA₂-EV軸を阻害するsPLA₂阻害剤の投与で腫瘍形成が抑制されたことから、がん治療の新規創薬ターゲットとなることが期待されます(図5)。

<今後の展開>

本研究から、悪性リンパ腫の発生および悪化におけるカギ「sPLA₂-EV軸」という新たな免疫チェックポイントの存在が明らかになったことより、今後はリンパ腫組織中のsPLA₂をターゲットとしたリンパ腫治療薬の開発やバイオマーカーとしての活用などが望めます。また、EV膜リン脂質の分解は、他のがん由来のEVにおいても起こることが証明されたことから、sPLA₂-EV軸をターゲットとした治療は全がんにおいて有効である可能性も秘めており、今後のさらなる研究が期待されます。

一方でsPLA₂が示したEVの機能向上効果を治療目的に応用する試みも進められており、幸谷グループでは組織保護作用・抗炎症作用を持つヒト肝細胞由来のEVにおいてsPLA₂がその組織保護・抗炎症効果を飛躍的に向上させることを確認しています。このようにsPLA₂-EV軸は腫瘍形成の枠にとどまらず、sPLA₂がEVの固有の能力を増強するという点でこの特殊なsPLA₂-EV代謝物を「sPLA₂ Reacted EV Derivatives; SPREDS」と名付け(特許出願中)、現在は新型コロナウイルス感染症を模した重症肺炎モデルにおける治療効果に重点を置いた検討が進められています。最終的にはSPREDSを用いた全身性に有効な抗炎症薬の開発につながることが期待されます。

<参考図>

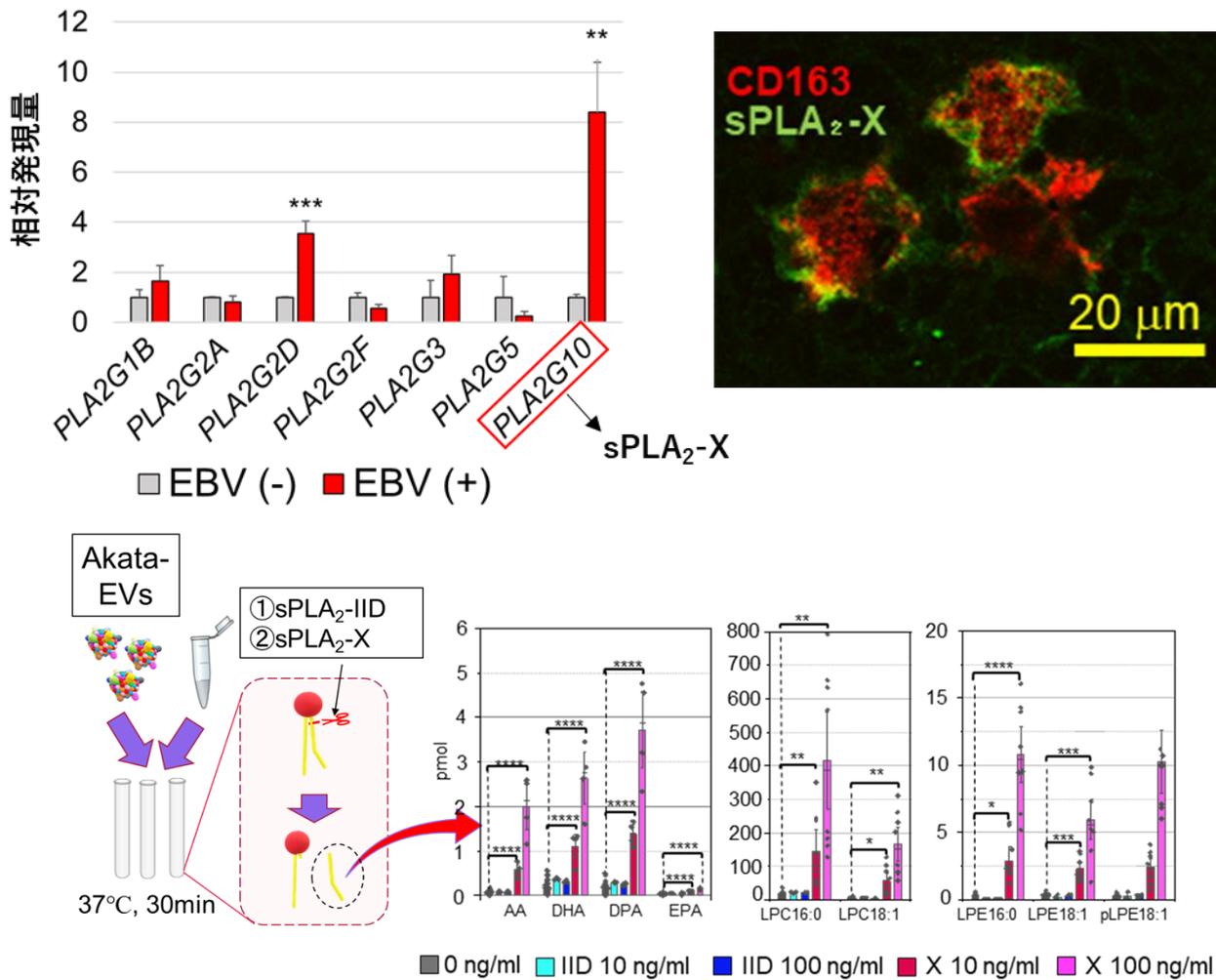


図1 sPLA₂は腫瘍組織中のM2型マクロファージ (TAM) に発現し、EV膜リン脂質を分解する

EBV陽性リンパ腫モデルマウスで発生した腫瘍組織中のsPLA₂発現を解析した。脾臓で発生したリンパ腫組織ではPLA2G10=sPLA₂-Xが正常脾臓組織; EBV(-)に比べて最も高発現だった(上段左図)。また同腫瘍組織の多重免疫染色の結果、PLA2G10=sPLA₂-XはCD163陽性細胞=M2型マクロファージに発現が認められた(上段右図)。このタイプのマクロファージは免疫抑制型の形質を示すことが知られており、腫瘍細胞に対する周りの免疫細胞の攻撃を抑制する方向に働き、がんの進行を促進する。ゆえに腫瘍随伴マクロファージ(Tumor-associated macrophage; TAM)とも呼ばれ、腫瘍微小環境の構築に大きな影響を与えることが分かっている。

発現増加が見られたsPLA₂をEBV陽性リンパ腫細胞から分泌されたEV(Akata EVs)と試験管内で反応させ、質量分析装置にてリン脂質分解産物を検出した。その結果、sPLA₂-Xと反応させた場合に分解産物の検出量が増加し、EVが分解されていることが証明された。しかし対照実験のsPLA₂-IIDではそのような変化は見られず、少なくともこの条件下では酵素活性を示さなかった(下段図)。

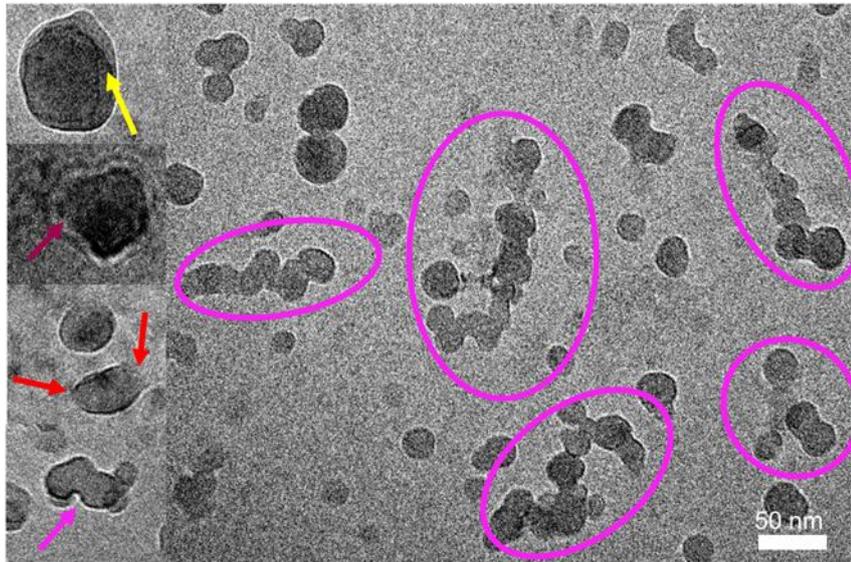


図2 sPLA₂-XによるEVの分解はEVの形態的变化を誘導する

sPLA₂-Xと反応直後に最新技術である「クライオ電子顕微鏡」で形態变化を観察した。この結果、脂質2重膜の内層と外層の間隔が不均一となるような形態（黄色矢印）、いびつな形態（紫色矢印）、EV膜の一部欠損（赤色矢印）、さらにはEV同士の融合とそれによる数珠つなぎ状の凝集（ピンク矢印、ピンク円）が高頻度に観察された。EVの融合により個々のEVの中身は多数のEVとで共有され、マクロファージに取り込まれる際には効率よくEVの中身が取り込まれることで、通常のEVの何倍も強力な影響を与える可能性が示唆された。

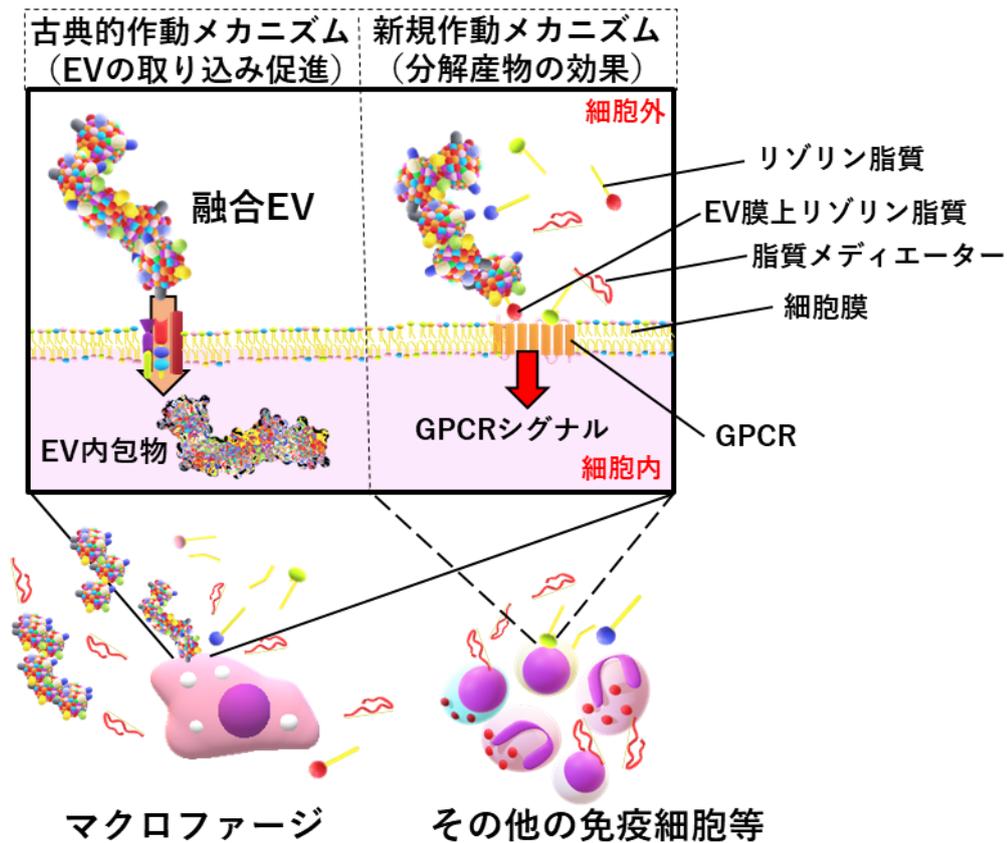


図3 sPLA₂処理により増強されるEVの古典的作動メカニズムと新たに発揮される新規作動メカニズム

sPLA₂処理されたEVでは膜融合により複数のEV内包物が一度に取り込まれる(古典的作動メカニズムの強化)。またsPLA₂処理により発生した分解産物であるリゾリン脂質や脂質メディエーターは細胞膜上のGPCRを介してシグナルを伝達する。マクロファージにおいては両方の作動メカニズムを介して強力なシグナルが入りTAM誘導が促進される。他の免疫細胞などでもEVの取り込みはできないもののGPCRシグナルによりさまざまな生命現象を引き起こす。

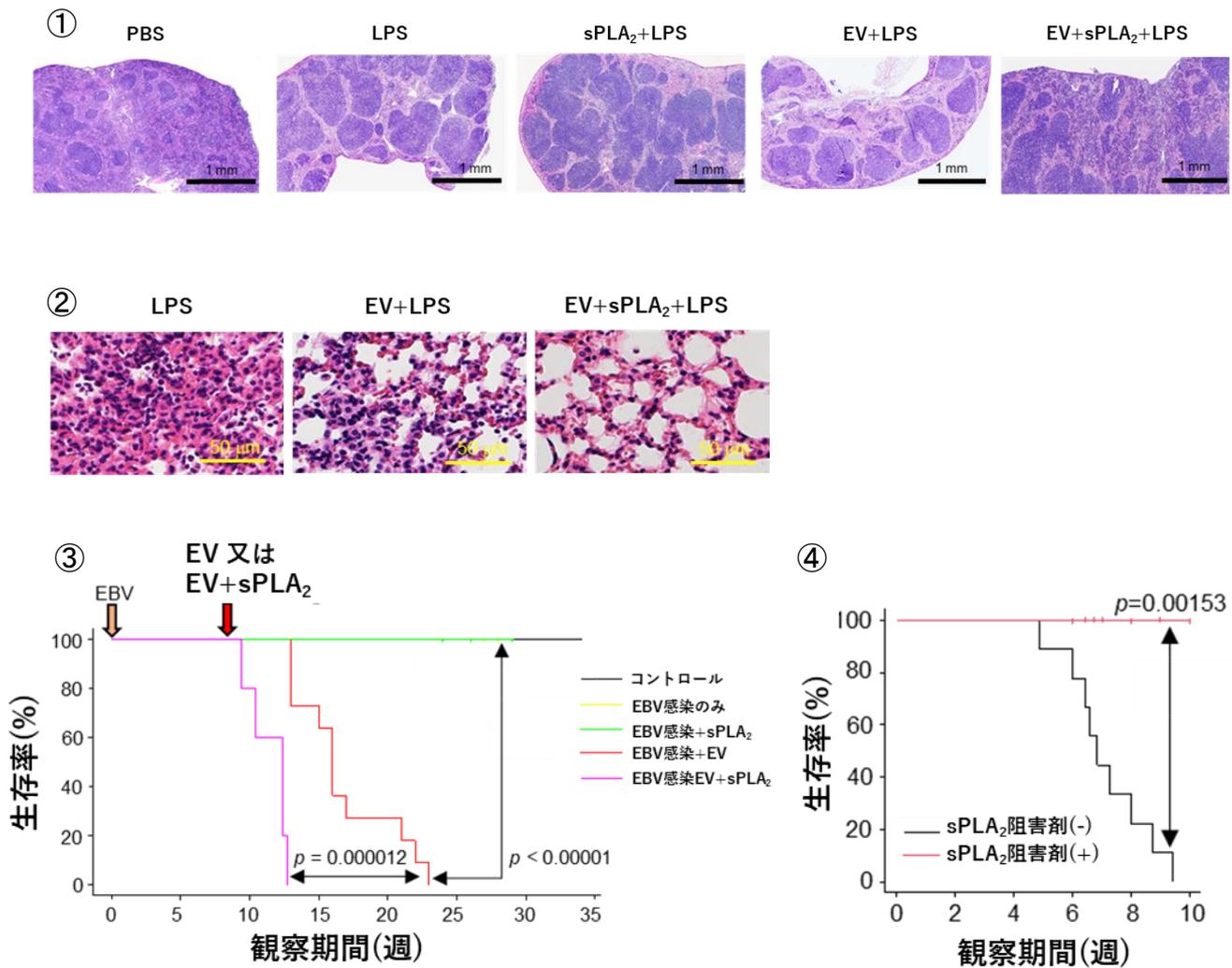


図4 sPLA₂ EVは抗炎症（免疫抑制）効果を示し、腫瘍形成を促進する

マウスに炎症を誘導するため大腸菌由来の毒素リポポリサッカライド（LPS）を用いた。このLPSの投与により白脾髄領域（紫色の濃い類円形領域）が増大したが、sPLA₂ EVの投与によりそれがほとんど打ち消された（①）。また、この抗炎症効果を肺でも同様に評価したところ、LPS投与により肺胞腔の領域に好中球等免疫細胞が著しく増加したが、これもsPLA₂ EVの投与で打ち消され、sPLA₂ EVの全身性に有効かつ強力な抗炎症（免疫抑制）効果が証明された（②）。

次に、そのsPLA₂ EVを造血系ヒト化マウスを用いたEBV陽性リンパ腫モデルに投与した時の腫瘍形成促進効果（③）とsPLA₂阻害時の腫瘍形成への影響（④）を評価した。腫瘍形成促進効果を評価する際には、低力価の感染では腫瘍形成を引き起こさないEBVであるB95-8株を感染させ、そこへsPLA₂ EVなどを投与した。このときEV投与により腫瘍形成は見られたものの、sPLA₂ EV投与時にはそれよりも急速に腫瘍が形成された。一方で腫瘍組織におけるsPLA₂阻害効果を評価する際には、感染のみで腫瘍形成を引き起こすEBVであるAkata株を感染させた。このときsPLA₂阻害剤はウイルス感染時より浸透圧ポンプを体内に留置することで観察している間持続的に投与した。この結果sPLA₂阻害により腫瘍形成が完全に抑制された。

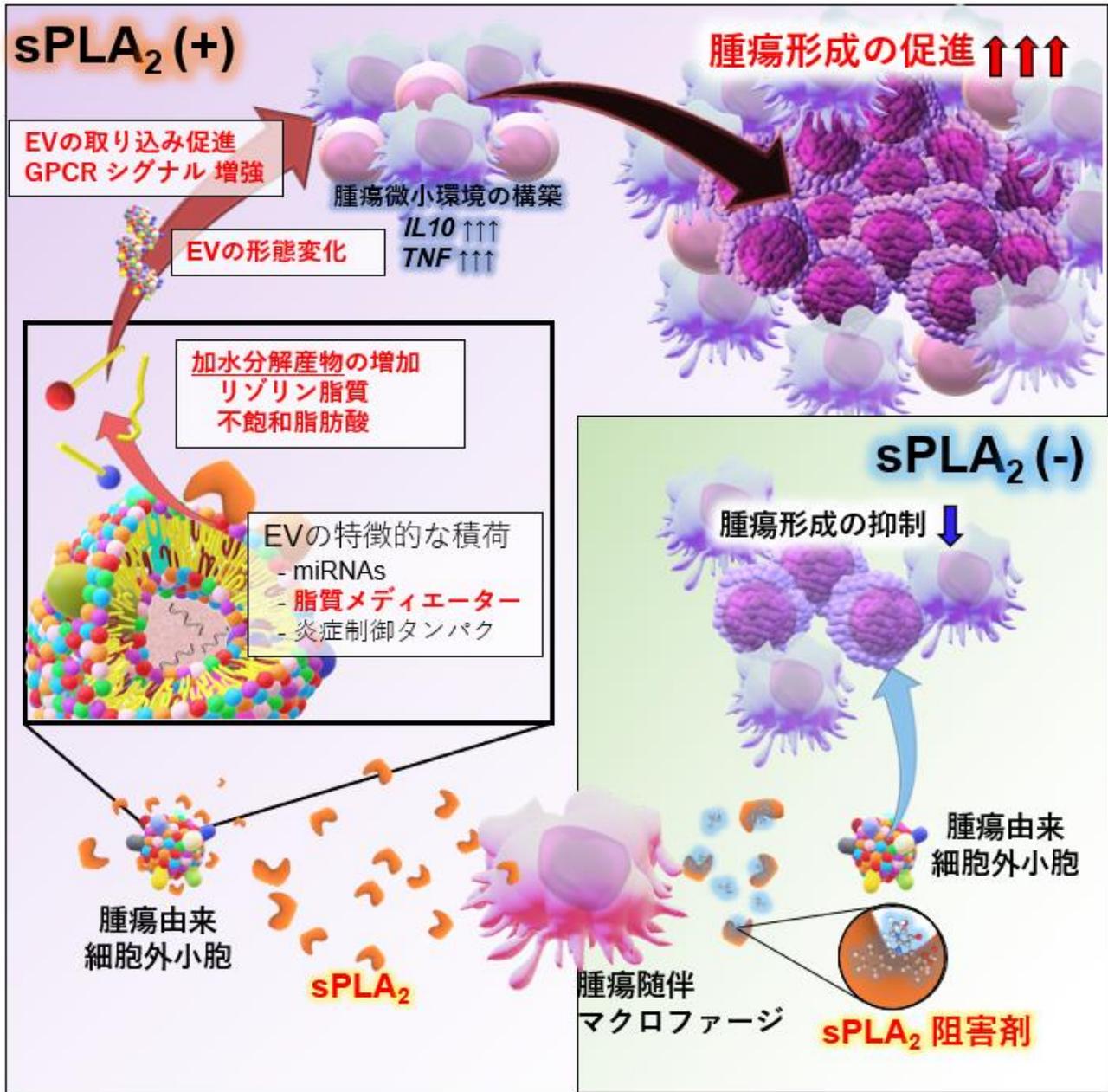


図5 本研究成果から明らかとなった悪性リンパ腫における s P L A₂ - E V 軸を中心とした腫瘍形成メカニズム

<用語解説>

注1) 細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV)

細胞から放出される核を持たない脂質2重膜で囲まれた粒子。がん研究の分野では、EVがさまざまなたんぱく質や核酸を輸送することで、がんの生存や悪性を促す働きが注目を集めている。

注2) 腫瘍微小環境

がん細胞(腫瘍)の周囲を囲む環境のこと。正常組織や免疫細胞、細胞外マトリックス、血管などから構成される。微小環境から腫瘍が栄養の供給を受けるなど、腫瘍と微小環境は相互に影響を及ぼし合っており、微小環境が腫瘍の縮小や増殖にも影響を及ぼすと考えられている。

注3) Epstein-Barrウイルス (EBV)

2本鎖DNAをゲノムとして持つヘルペスウイルスの一種。EBV関連疾患の多くは悪性リンパ腫などの血液腫瘍だが、まれに胃がんなどの上皮細胞がんも引き起こすことが知られている。本研究課題では腫瘍形成能の強いAkata株とそれに比べて弱いB95-8株の2種類のウイルス株を用いた。

注4) リン脂質

コリンやセリンなどの親水性の分子と疎水性を示す2本の脂肪酸を持つ両親媒性の脂質。細胞膜や細胞外小胞の膜などの生体膜の主要な構成成分として知られている。また親水性分子の種類と2本の脂肪酸の種類からその組み合わせは無数にあり、膨大な数の分子種が存在することが明らかになっている。

注5) 分泌性ホスホリパーゼA₂ (sPLA₂)

リン脂質に結合する2本の脂肪酸のうちsn-2位と呼ばれる部位には不飽和脂肪酸を結合していることが多いが、sPLA₂はその部分を切断しリン脂質から脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素である。遊離された脂肪酸とリゾリン脂質は強力な脂質メディエーター^{注7)}へと変換されることが知られていることから、sPLA₂は脂質メディエーター合成の律速因子であるとされている。生体においてsPLA₂はリンパ組織におけるオメガ(ω)-3脂肪酸の遊離を介した獲得免疫へのブレーキや(sPLA₂-IID)、気道上皮における自然免疫リンパ球ILC2の活性化促進によるぜんそくの悪化(sPLA₂-X)など、それぞれ異なる組織分布と基質選択性を示すことで組織固有の生命応答を引き起こすことが知られている。

注6) 腫瘍随伴マクロファージ (TAM)

マクロファージとは体の中に侵入してきたウイルスや細菌など異物の排除に関与する重要な免疫細胞の1つであり、腫瘍随伴マクロファージは腫瘍組織に浸潤しているマクロファージの総称。主に免疫抑制型の形質を示すM2型マクロファージがこれに含まれる。そのため、この細胞の浸潤した腫瘍組織では正常な抗腫瘍免疫が抑制され、腫瘍の進展が促進されることが知られている。

注7) 脂質メディエーター

不飽和脂肪酸やリゾリン脂質から派生する機能性脂質で、生理活性脂質とも呼ばれる。一般的にはプロスタグランジンやロイコトリエンなどが有名であり、生体内においては炎症を促進する効果を持つオメガ (ω) - 6系脂肪酸 (アラキドン酸など) に由来する脂質メディエーターと、反対に炎症を鎮める効果を持つ ω -3系脂肪酸 (ドコサヘキサエン酸など) が互いに拮抗 (きっこう) することで、正常な生命活動のバランスが保たれている。一方、リゾリン脂質性の脂質メディエーターとしてはリゾホスファチジン酸 (LPA) が知られている。脂質メディエーターのほとんどはGPCRを介してシグナルを伝達する。

注8) 造血系ヒト化マウス

重症免疫不全マウス (NOD/shi-scid, IL-2R γ KOマウス) にヒト臍帯 (さいたい) 血由来の造血幹細胞を移植したマウス。マウス生体内に生着したヒト造血幹細胞からヒトの血液細胞が再構築されるため、ヒトの造血研究などで有用なツールとして用いられている。

注9) Gたんぱく質共役型受容体 (GPCR)

細胞膜上に存在する膜貫通型の受容体で、その種類は数百種類にもおよぶ。現在出回っている薬剤の多くがこのGPCRを介して機能することが知られており、創薬における重要な標的分子であるとされている。

注10) びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)

B細胞性悪性リンパ腫の一種。日本においては最も頻度の高い悪性リンパ腫であり、リンパ腫全体のおよそ30パーセント程度を占めることが知られている。

<論文タイトル>

“Secreted phospholipase A2 modifies extracellular vesicles and accelerates B-cell lymphoma”

(分泌性ホスホリパーゼA2は細胞外小胞を修飾しB細胞リンパ腫形成を促進する)

DOI : 10.1016/j.cmet.2022.02.011

<お問い合わせ先>

<研究に関すること>

幸谷 愛 (コウタニ アイ)

東海大学医学部 基盤診療学系 先端医療科学 教授

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143

Tel : 0463-93-1121 (内線 2781)

E-mail : aikotani[at]k-lab.jp

村上 誠 (ムラカミ マコト)

東京大学 大学院医学系研究科 教授

〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1
TEL : 03-5841-1431
E-mail : makmurak[at]m.u-tokyo.ac.jp

<JST事業に関すること>

保田 睦子 (ヤスタ ムツコ)

科学技術振興機構 戦略研究推進部 ライフイノベーショングループ
〒102-0076 東京都千代田区五番町7 K's 五番町
Tel : 03-3512-3524 Fax : 03-3222-2064
E-mail : crest[at]jst.go.jp

<報道担当>

科学技術振興機構 広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町5番地3
Tel : 03-5214-8404 Fax : 03-5214-8432
E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

東海大学 広報担当 喜友名 浩史 (キユナ ヒロシ)

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目4-1-1
Tel : 0463-58-1211 (代表)
E-mail : pr[at]tsc.u-tokai.ac.jp

東京大学 医学部・医学系研究科 総務担当

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1
Tel : 03-5841-3304