

氏 名 徳田 彩

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第 914 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 令和 3 年 9 月 8 日

学 位 論 文 題 目 Cancer-derived Exosomes Activate Immune Surveillance and Suppress Peritoneal Metastasis of Murine Colonic Cancer

(癌由来エクソソームは免疫監視機構を活性化し、マウス結腸癌の腹膜播種を抑制する)

審 査 委 員 主査 教授 九嶋 亮治

副査 教授 平田 多佳子

副査 教授 安藤 朗

論 文 内 容 要 旨

*整理番号	924	(ふりがな) 氏 名	とくだ あや 徳田 彩
学位論文題目	Cancer-derived Exosomes Activate Immune Surveillance and Suppress Peritoneal Metastasis of Murine Colonic Cancer (癌由来エクソソームは免疫監視機構を活性化し、マウス結腸癌の腹膜播種を抑制する)		
<p>【目的】 腹膜播種は原発腫瘍が漿膜外に浸潤し、腫瘍から腹腔内に散布された癌細胞が腹膜に定着することで形成される転移形式である。消化管癌において腹膜播種は一般的な再発形式であり、全外科的切除後の再発率が 29% である。結腸癌の腹膜播種再発は 2.3% と他の消化器癌に比して低いが、その原因は解明されていない。 エクソソームは種々の細胞から分泌される細胞外膜小胞であり、ドナー細胞由来のタンパク質や核酸を内包し、伝達する。エクソソームは特定の細胞に取り込まれ、レシピエント細胞の機能を調節することが知られている。癌由来のエクソソームは腫瘍微小環境を改変し、癌の進行や転移に関与するが、腹膜播種転移における癌由来エクソソームの影響は十分明らかではない。本研究では、マウス腹膜播種モデルを用いて、癌由来エクソソームの腹膜播種への影響を解明することを目的とした。</p> <p>【方法】 マウス大腸癌細胞株 (CT26) の培養上清から超遠心分離によりエクソソームを精製した。精製したエクソソームはウエスタンブロット法とナノサイトで確認した。In vitro で CT26 細胞に癌由来エクソソームを投与し、増殖能および移動能を検討した。BALB/c マウスに癌由来エクソソームまたは PBS を腹腔内に前投与し、CT26 細胞を腹腔内投与して腹膜播種モデルを作成した。両群で形成された腹膜播種の個数を比較した。腫瘍微小環境の変化を検討するため、マウスに癌由来エクソソームを腹腔内投与した後、腹膜、腹腔内細胞を採取し、比較した。腹膜の比較を Hematoxylin and eosin (HE) 染色、免疫組織染色、RT-PCR で行った。腹腔内細胞はフローサイトメトリー、RT-PCR で解析した。</p> <p>【結果】 In vitro において、CT26 細胞を癌由来エクソソームで刺激したところ、細胞増殖、移動能に PBS と比較して差を認めなかった。In vivo モデルを用いた腹膜播種の検討では、エクソソーム群は腹膜播種を認めなかった。獲得免疫の関連を除外するため、ヌードマウスを用いて同じ検討を行うと、エクソソーム群は PBS 群と比較して腹膜播</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

種が有意に少なく、予後も延長した。これらの癌由来エクソソームの腹膜播種抑制機序を解明するため、腫瘍微小環境に着目した。エクソソームの投与後、腹膜に中皮の肥厚や線維化マーカーの発現、接着因子などの変化は認められなかった。エクソソーム群では、洗浄腹水中の tumor necrosis factor α (TNF α), chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9), CXCL10, CXCL11, interferon- γ (IFN- γ)など種々のサイトカインの発現増加がみられ、腹腔内マクロファージ数の増加、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase ; iNOS) の発現が増加した。

また、癌由来エクソソームは natural killer (NK)細胞を活性化し、IFN- γ の発現を増加させた。

【考察】

癌由来エクソソームが腫瘍微小環境や転移に与える影響について、chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)や heat shock protein (HSP)70 など免疫活性化により抗腫瘍効果が高めるとの報告がある一方、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)や Fas リガンドを含むエクソソームが抗腫瘍免疫を抑制するとの報告もあり、一定の見解が得られていない。本研究では、癌由来エクソソームの前投与によりマウス大腸癌の腹膜播種が抑制され、癌由来エクソソーム投与後のマウスでは、腹腔内マクロファージ数が増加した。腹膜播種には原発腫瘍からの癌細胞の剥離から遠隔臓器への定着まで、複数の段階が必要であり、腫瘍微小環境において腹腔内マクロファージは癌細胞の腹腔内への生着を防ぐのに重要な要素の1つである。IFN- γ は、M1 マクロファージを誘導し、炎症誘発性サイトカインや活性窒素種、活性酸素種などを産生して感染防御や抗腫瘍効果を発揮する。本研究で我々は、癌由来エクソソーム投与により、NK 細胞での IFN- γ 発現増加、洗浄腹水中の IFN- γ 誘導遺伝子で M1 マクロファージのマーカーである CXCL11 の発現増加、iNOS を発現した M1 マクロファージの増加を示した。これにより、癌由来エクソソームが NK 細胞の活性化を介して M1 マクロファージを誘導し、腹膜播種を抑制する可能性が示唆された。

【結論】

CT26 癌細胞由来のエクソソームはマウスモデルにおいて腹膜播種を抑制した。その機序として、癌由来エクソソームが NK 細胞を活性化して IFN- γ の分泌を促進することで、腹腔内マクロファージの M1 マクロファージへの分化を誘導する経路が考えられた。

博士論文審査の結果の要旨

整理番号	924	氏名	徳田 彩
論文審査委員			
<p>(博士論文審査の結果の要旨)</p> <p>本論文では、マウス大腸癌細胞株 (CT26) の培養上清から精製したエクソソームを <i>in vitro</i> でCT26細胞に投与し、増殖能と移動能を検討した。また、BALB/cマウスにCT26由来エクソソームまたはPBSを腹腔内に前投与した後、CT26細胞を腹腔内投与して腹膜播種モデルを作成した。さらに、獲得免疫の関連を除外するためヌードマウスを用いて同じ検討を行ったところ、以下の点が明らかになった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) <i>in vitro</i>において、CT26細胞をエクソソームで刺激したところPBSと比較して細胞増殖・移動能に差を認めなかった。 2) <i>in vivo</i>モデル (BALB/cマウス) を用いた腹膜播種の検討で、エクソソームを前投与した群では播種巣を認めなかった。 3) ヌードマウスでもエクソソーム群はPBS群と比較して腹膜播種が有意に少なく、予後も延長した。 4) BALB/cマウスにエクソソームを腹腔内に連日投与したところ、腹膜に線維化は生じないが、洗浄腹水中でマクロファージに関連する種々のケモカインとマクロファージ数の増加が認められた。腹腔内細胞をエクソソームで刺激するとM1マクロファージのマーカであるiNOSの発現が増加した。 5) エクソソームはマクロファージを直接活性化しないが、脾臓由来NK細胞のINF γ 産生を誘導していると考えられた。 <p>本論文は、癌由来エクソソームによる大腸癌腹膜播種の抑制について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(令和3年8月25日)</p>			