

2. EBV 関連リンパ腫における腫瘍由来分泌性小分子 RNA 役割

幸谷 愛

東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野
東海大学医学部内科学系血液腫瘍内科

近年、大量の小分子 RNA を内包する 10-200nm 程度の小胞、エクソソームが脚光を浴びている。内包物の小分子 RNA、特に microRNA (miRNA) のプロファイルは、診断マーカーとして期待され、米国においては、NIH が、日本においへは、NEDO が、大型予算を配備、精力的な研究が行われている。更に最近、機能についても研究がすすみ、細胞間コミュニケーターとして重要な生体機能を担うことが明らかになってきた。エクソソーム単独で炎症を惹起でき、固形がんの転移に必須な現象である転移部位ニッチ形成に必須である等、興味深い知見が得られてきた。

このような背景のもと、炎症性癌である EBV 関連リンパ腫における腫瘍由来分泌性小分子 RNA の役割について検討した。

その結果、腫瘍由来分泌性小分子 RNA は単球 / マクロファージ (Mo/MΦ) によって、選択的に取り込まれ、その機能を腫瘍随伴マクロファージ (Tumor associated macrophage, TAM) 様へ変化させ、腫瘍形成に極めて重要な働きを示すことを明らかとなった。

ヒトゲノムが解読された 2003 年、ヒトとマウスで、遺伝子をコードする領域はほとんど同じであるという報告が多く、多くの研究者が衝撃を受けた¹⁾。ヒトとマウスの差は何によって生じるのか、その答えの 1 つがノンコーディング RNA と考えられる。これまでノンコーディング RNA をコードする DNA は「ゲノムのゴミ」であると考えられてきたが、最近の研究からノンコーディング RNA は生物学的に重要な機能をもつことがわかってきている^{2,3,4,5)}。

ノンコーディング RNA の一種である小分子 RNA 中でも miRNA は研究が進んでおり、その生物学的重要性が認識されている。EBV はそのゲノムに約 40 種類の miRNA をコードする。最近それらが、細胞外へと分泌されることがわかってきた。中でも、エクソソームという脂質二重膜に抱合されて放出される小分子 RNA は体液中で極めて安

定に存在する。エクソソームには小分子 RNA のみならず、蛋白や mRNA も含まれている⁶⁾。エクソソームは 1 型糖尿病モデルマウスにおいて炎症を惹起できることが報告されており²⁾、免疫の分野で早くから注目され、ワクチンとしての効果が期待され、多くの研究が行われてきた。更にはドラッグデリバリーのキャリアとしてのエクソソーム研究も近年精力的に行われている。

癌領域においては、転移についてエクソソームが必須という結果が報告されている。

ただし、原発巣においてはその影響はほとんどなかった。^{8,9)}

EBV リンパ腫は非腫瘍性免疫細胞の浸潤を多数伴う“炎症性のがん”である。

瘍細胞はわずか 1% である。非腫瘍性免疫細胞が存在しないと、腫瘍細胞は生存できない。

よって、本来 EBV 感染細胞を攻撃するため集積したと思われる免疫細胞が、いつのまにか腫瘍を支持するように性質変化を受けると推測されるが、そのメカニズムについては全く不明である。

このメカニズムに新しい観点、腫瘍由来分泌性小分子 RNA から解明を試みた。

EBV は約 40 種の固有の miRNA をコードする。それらは主に、3 つのクラスター、BHRF1, BART cluster1, cluster2 という領域から転写される一つの前駆体 (pri-

連絡先

〒 259-1193

神奈川県伊勢原市下糟屋 143

東海大学総合医学研究所造血腫瘍分野

東海大学医学部内科学系血液腫瘍内科

TEL: 0463-93-1121 (2781)

E-mail: aikotani@k-lab.jp

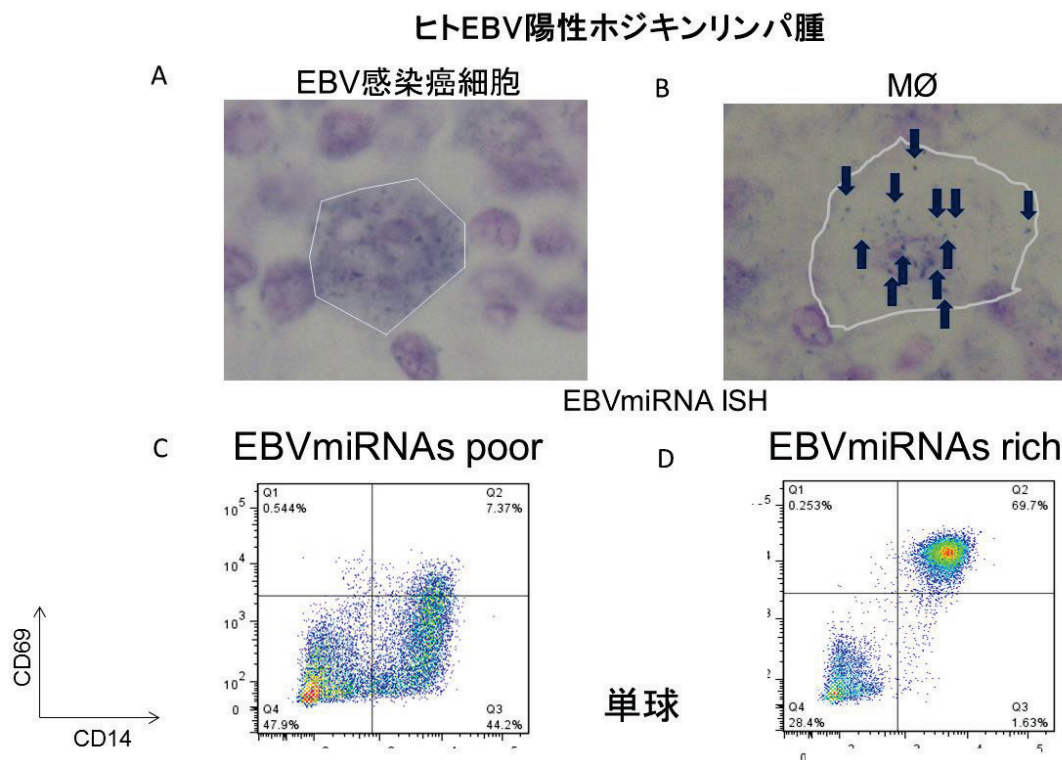


図1 EBV 陽性ホジキンリンパ腫におけるエクソソームを介した炎症性ニッチの制御

・ in situ hybridization 法を用いて EBV 陽性ホジキンリンパ腫における EBV コード miRNA の発現を調べた。腫瘍 (A) と非腫瘍細胞であるマクロファージ (B) にシグナルを認め、腫瘍由来 miRNA がマクロファージに取り込まれている。EBV 腫瘍由来エクソソームを取り込んだ単球/マクロファージは EBV コード miRNA 依存的に CD69 の発現を変化させる。(C) EBV コード miRNA が少ないエクソソームおよび (D) EBV コード miRNA の多いエクソソームは単球の CD69 の発現に大きな差を生じる。

miRNA) から Drosha, Dicer という RNase 酵素によって合成される。

近年それらがエクソソームに内包されて放出され、EBV 非感染細胞に取り込まれることが明らかとなった。更には、EBV 非感染細胞である樹状細胞に取り込まれた EBV コード miRNA である BHRF1 はターゲット遺伝子のひとつであるケモカイン CXCL11/i-Tac の発現を減少させることが明らかにされ、エクソソームを介した分泌性 EBV 感染細胞由来 EBV コード miRNA が、細胞間コミュニケーションとして機能的である可能性が示された¹⁰⁾。

筆者らは EBV 関連リンパ腫における EBV 陽性リンパ腫細胞由来エクソソームが非腫瘍性炎症細胞に及ぼす影響を検討している。EBV 陽性ホジキンリンパ腫は 1% に満たない HRS (Hodgkin and Reed Sternberg) 細胞とよばれる癌細胞と、99% 以上を占める“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、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。よって腫瘍組織において EBV 非感染細胞に EBV コード miRNA が検出されたならば、それらが EBV 由来エクソソームを介して移行したものであることが明確である。

この優れたシステムを利用し、試験管内実験系、更には患者検体において、腫瘍由来 miRNA が単球マクロファージ (Mo/MØ) に選択的に取り込まれることを見出した。

EBV の潜伏感染は Type1,2,3 と主に 3 種類があり、Type1 が最も免疫原性が低く Type3 が最も高い。

この潜伏感染のタイプによってエクソソームに含まれる EBV 由来 miRNA 量は大きく異なった。これらのエクソソームが単球/MØ に及ぼす機能変化は大きく異なり、その違いがエクソソームに含まれる EBV コード miRNA の量によって規定されることを見出した。(図 1)

つまり Type3 では多くの EBV コード miRNA が含まれ、Type1 では少ない。Type3 が Type1 より単球/MØ の細胞数維持に働き、活性化マーカー CD69 の発現を上昇させた。マーカーのみならず、サイトカインプロファイルも大きな変化を示した。IL-10, TNF α などが Type3 由来の EBV コー

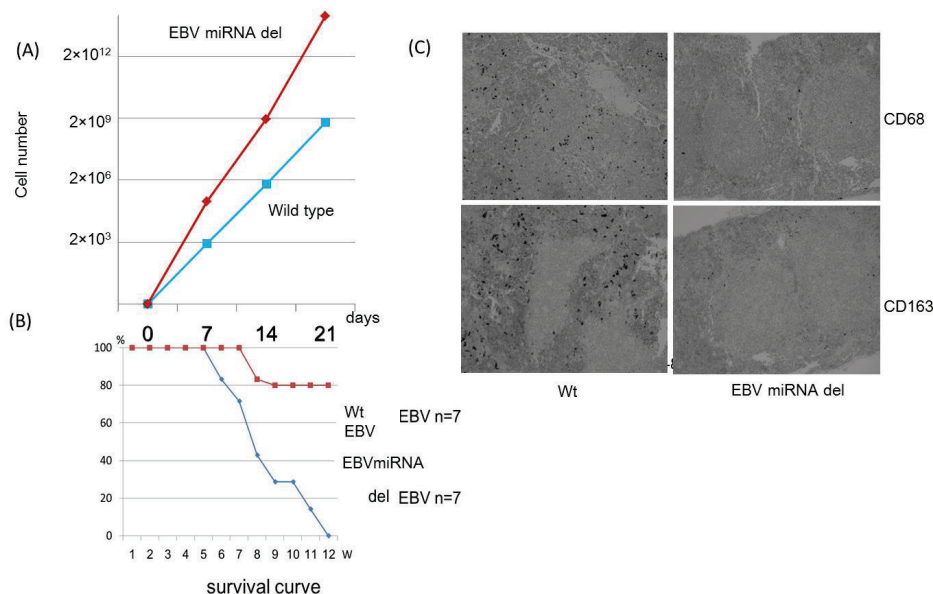


図2 マウス生体内における EBV コード miRNA の影響

EBVmiRNA 欠損株 (B95-8) と野生株 (Akata), それぞれを 3.0×10^4 TFU (Transformant Unit) ずつ, を造血系ヒト化マウスに静注し, LPD を誘発すると共に, 試験管内では同じウイルスを臍帯血に感染させ不死化リンパ球細胞株 (lymphoblastoid cell lines LCL) を樹立した. その結果, (A) 試験管内増殖速度は EBVmiRNA 欠損株由来 LCL が野生株由来 LCL より早いにもかかわらず, マウス生体内腫瘍形成能が極めて弱いとの結果を得た. (図) LPD には CD68 陽性マクロファージ, CD163 陽性マクロファージの著しい浸潤が認められた.

ド miRNA によって発現上昇した.

更にマウス生体内でのエクソソームに含まれる分泌性 EBV コード miRNA の影響を検討した. EBV は霊長類にしか感染しないため, 免疫不全マウス NOG マウスをヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて造血系をヒト化した後, EBV を投与して感染実験を行った.

投与するウイルス量によって潜伏感染とリンパ増殖性疾患 (LPD) を誘発できる.

EBVmiRNA 欠損株 (B95-8) と野生株 (Akata), それぞれを 3.0×10^4 TFU (Transformant Unit) ずつ, を造血系ヒト化マウスに静注し, LPD を誘発すると共に, 試験管内では同じウイルスを臍帯血に感染させ不死化リンパ球細胞株 (lymphoblastoid cell lines LCL) を樹立した. その結果, 試験管内増殖速度は EBVmiRNA 欠損株由来 LCL が野生株由来 LCL より早いにもかかわらず, マウス生体内腫瘍形成能が極めて弱いとの結果を得た. (図 2)

また腫瘍内は CD68 陽性 CD163 陽性マクロファージの著しい浸潤が認められた.

以上の結果は, EBV 陽性腫瘍細胞そのものの細胞増殖は EBVmiRNA によって抑制させる, よって腫瘍由来 EBVmiRNA は腫瘍抑制因子として働くが, マウス生体内においては, 腫瘍形成を促進する腫瘍促進因子として働く

ことを示している. よって腫瘍由来分泌性小分子 RNA EBVmiRNA は腫瘍細胞以外の非腫瘍細胞から成る微小環境形成に重要な機能を持つことが示唆された.

更に, 重要なことに, EBV 感染腫瘍細胞由来 EBV コード miRNA を選択的に取り込み, 性質変化を示したマクロファージをクオドロネートリポソームを用いて除去すると, 腫瘍細胞数が激減した. (図 3)

以上より, 腫瘍由来分泌性小分子 RNA がマクロファージを介して, 腫瘍形成に重要な機能を持つことが示唆された. 加えて, EBV コード miRNA に対する in situ hybridization をヒト EBV 陽性リンパ腫に対して行ったところ, 全組織中 EBV コード miRNA シグナルの強度と予後に相関関係が認められた. よって, EBV リンパ腫において分泌性腫瘍由来 EBV コード miRNA が腫瘍形成に大きな機能を果たしており, その制御が新しい治療ターゲットになる可能性が示唆された. (図 4)

EBV は癌以外にも多発性硬化症, SLE などの自己免疫疾患に関与することが報告されている. よって EBV 関連リンパ腫のみならず, EBV が関与する病態においてエクソソームの果たす役割は多き可能性があり解明が待たれる.

古くは赤血球が放出する脂質二重膜が発見され, そこか

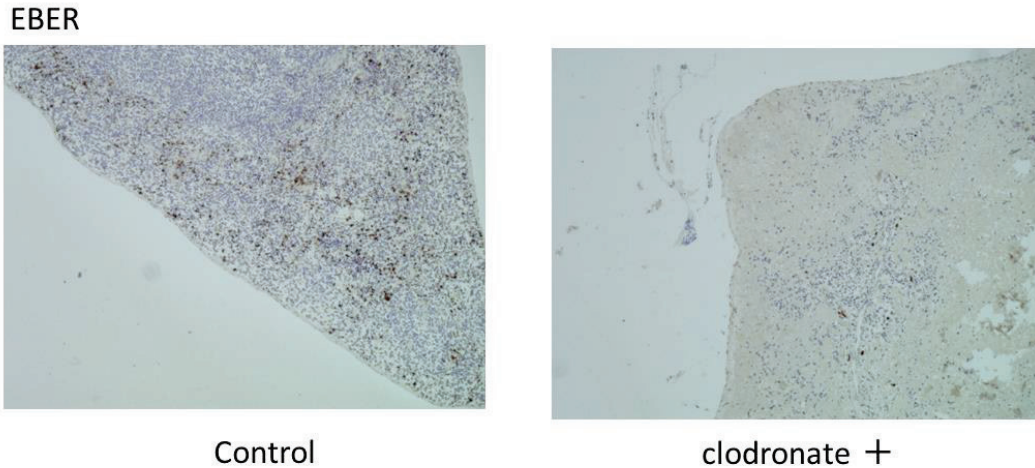


図3 マクロファージ除去による腫瘍細胞の消失

EBV 感染腫瘍細胞由来 EBV コード miRNA を選択的に取り込み, 性質変化を示したマクロファージをクオドロネートリポソームを用いて除去すると, 腫瘍細胞数が激減した。

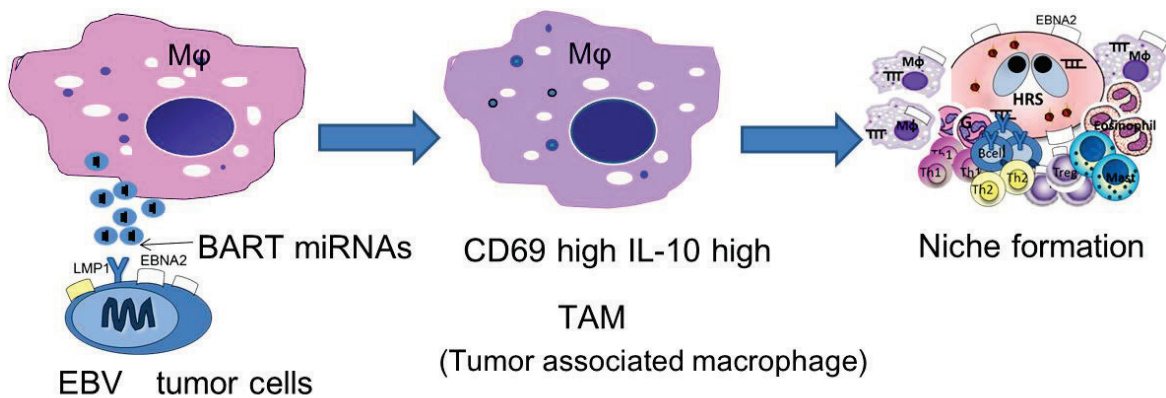


図4 概念図

EBV 感染腫瘍細胞由来 EBV コード miRNA はエクソソームに内包されて分泌され, マクロファージに選択的に取り込まれる。腫瘍由来エクソソームを取り込んだマクロファージは EBV コード miRNA によって TAM 様な性質変化を引き起こす。この性質変化が LPD 形成に必須である。

らエクソソーム研究が始まったわけであるが, 血液疾患・免疫疾患におけるエクソソーム研究は癌などに比べ知見が少ない^{11,12,13)}。しかし, エクソソームがデコイとして働き薬剤耐性に関わること, 自己免疫疾患の原因の一つである免疫反応を惹起すること, 逆に免疫抑制的な未熟 DC 由来のエクソソームが自己免疫疾患の治療に有効である等の

報告より, エクソソームが有望な治療のターゲットになり得る魅力的な分野である。自己免疫疾患, 悪性腫瘍疾患において, ターゲットとなる機能性エクソソームを表面蛋白などで分別し, 選択的に除去したり, 分泌を制御するなどの治療法の開発が進むことが期待される。

文 献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium
Eric S. Lander, Lauren M. Linton, Bruce Birren, Chad Nussbaum, Michael C. Zody, Jennifer Baldwin, Keri Devon, Ken Dewar, Michael Doyle, William FitzHugh, Roel Funke, Diane Gage, Katrina Harris, Andrew Heaford, John Howland, Lisa Kann, Jessica Lehoczy, Rosie LeVine, Paul McEwan, Kevin McKernan, James Meldrim, Jill P. Mesirov, Cher Miranda, William Morris, Jerome Naylor, Christina Raymond, Mark Rosetti, Ralph Santos, Andrew Sheridan, Carrie Sougnez, Nicole Stange-Thomann, Nikola Stojanovic, Aravind Subramanian & Dudley Wyman, Jane Rogers, John Sulston, Rachael Ainscough, Stephan Beck, David Bentley, John Burton, Christopher Clee, Nigel Carter, Alan Coulson, Rebecca Deadman, Panos Deloukas, Andrew Dunham, Ian Dunham, Richard Durbin, Lisa French, Darren Grafham, Simon Gregory, Tim Hubbard², Sean Humphray, Adrienne Hunt, Matthew Jones, Christine Lloyd, Amanda McMurray, Lucy Matthews, Simon Mercer, Sarah Milne, James C. Mullikin, Andrew Mungall, Robert Plumb, Mark Ross, Ratna Shownkeen & Sarah Sims, Robert H. Waterston, Richard K. Wilson, LaDeana W. Hillier, John D. McPherson, Marco A. Marra, Elaine R. Mardis, Lucinda A. Fulton, Asif T. Chinwalla, Kymberlie H. Pepin, Warren R. Gish³, Stephanie L. Chissoe, Michael C. Wendl, Kim D. Delehaunty, Tracie L. Miner, Andrew: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001
- 2) Kotani A: Guest editorial: noncoding RNA in hematopoietic system. *Int J Hematol.* 2014 May;99(5):529-30.
- 3) Okuyama K, Ogata J, Yamakawa N, Chanda B, Kotani A. : Small RNA as a regulator of hematopoietic development, immune response in infection and tumorigenesis. *Int J Hematol.* 2014 May;99(5):553-60.
- 4) Alvarez-Dominguez JR¹, Hu W, Gromatzky AA, Lodish HF. Long noncoding RNAs during normal and malignant hematopoiesis. *Int J Hematol.* 99(5):531-41. 2014
- 5) Ikeda S, Tagawa H : Dysregulation of microRNAs and their association in the pathogenesis of T-cell lymphoma/leukemias. *Int J Hematol*;99(5):542-52. 2014
- 6) Flanagan J¹, Middeldorp J, Sculley T: Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol.* 84(Pt 7):1871-9. 2003
- 7) Sheng H, Hassanali S, Nugent C, Wen L, Hamilton-Williams E, Dias P, Dai YD. I nsulinoma-released exosomes or microparticles are immunostimulatory and can activate autoreactive T cells spontaneously developed in nonobese diabetic mice. *J Immunol.*;187(4): 1591-600. 2011
- 8) Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 18(6):883-91. 2012
- 9) Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.*;288 (15):10849-59. 2013
- 10) Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 6;107(14):6328-33 Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM.
- 11) Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M.: Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One.* 4(5):e5532; 2009
- 12) Moon PG, Lee JE, You S, Kim TK, Cho JH, Kim IS, Kwon TH, Kim CD, Park SH, Hwang D, Kim YL, Baek MC: Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *Proteomics.*;11(12):2459-75. 2011

The role of tumor-derived secretory small RNAs in EBV related lymphoma

Ai KOTANI

Tokai University the Institute of Medical Science Division of Hematological malignancy
Tokai University School of Medicine, Internal Medicine, Hematology and Oncology
143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, Japan
aikotani@k-lab.jp

EB virus (EBV) is associated with heterogeneous lymphomas. In these lymphomas EBV+ lymphoma cells are embedded in non-neoplastic bystanders: B and T cells, macrophages. Without these bystander cells, the lymphoma cells are incapable of being engrafted in immunodeficient mice. In this context, the bystanders are tumor-supportive "inflammatory niche". Recently, EBV-infected cells produce exosomes that contain EBV specifically encoded miRNAs (EBV-miRNAs). Accordingly, we hypothesized that exosomal EBV-miRNAs might redirect tumor surrounding immune cells from tumor reactive into tumor-supportive "inflammatory niche".

The EBV-miRNAs in the exosome secreted from EBV positive lymphoma cells significantly influenced on monocyte/macrophage Mo/Mf in inducing CD69, IL-10, and TNF, suggesting that EBV-miRNAs might polarize Mo/Mf into tumor associated Mf (TAM). EBV-miRNAs were required to develop lymphoproliferative disease (LPD) in vivo mouse model. Moreover, when Mfs were depleted by clodronate liposome, EBV positive tumor cells disappeared. These results suggest that lymphoma-derived secretory EBV-miRNAs regulate Mo/Mf to support the lymphoma survival or development. Most importantly, exosomal EBV-miRNAs derived from the lymphoma cells were transferred to Mf in human EBV+ lymphoma samples, which showed correlation with prognosis.