

リンパ腫の発生／悪性化における細胞外小胞の新規作動メカニズム —鍵因子としてのsPLA2

工藤 海, 幸谷 愛

1. はじめに

細胞外小胞 (EV) はタンパク質や遺伝物質等を脂質二重膜に内包した小胞であり, 2007年に mRNA や miRNA の輸送体として報告されて以来, 今日までにきわめて多岐にわたる生命現象や疾患に関与することが明らかにされてきた. 中でもがん領域ではさまざまな組織型のがんにおいて EV が腫瘍進展・微小環境構築に利用されることが知られており, 血液がんの一つである悪性リンパ腫も例外ではなく EV が病態進展に深く関与するという報告が数多くなされている. しかし実際には腫瘍由来 EV を構成する分子のうち何が効いているのか, どのように効いているのかなど, この機序にはまだまだ不明な点も多い. 本稿では筆者らが悪性リンパ腫の中でもきわめて予後不良な組織型である Epstein-Barr virus (EBV) 陽性リンパ腫における EV 研究から見いだした EV の「脂質」を介した新規作動メカニズム・発がんメカニズムについて紹介する (図 1).

2. EBV 陽性リンパ腫と EV

EBV 陽性リンパ腫はヒトがんウイルス EBV の感染した成熟リンパ球細胞に起因する造血腫瘍であり, Hodgkin リンパ腫や T 細胞リンパ腫, NK 細胞リンパ腫, びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) など, 数多くの組織型が存在する. DLBCL においては EBV 陽性である場合には標準治療である R-CHOP 療法に対し治療抵抗性を示し, このため EBV 陽性 DLBCL は高悪性度腫瘍に分類され¹⁾, 現代医学における重要な課題の一つとなっている. 本疾患

における腫瘍由来 EV の持つ生物学的効果に関する報告は数少ないが^{2,3)}, 最近になって筆者らのグループでは腫瘍由来 EV には複数種類の炎症制御性膜タンパク質が豊富に含まれることや⁴⁾, ウイルス由来の miRNA である “BamHI fragment A rightward transcript (BART) miRNA” が EV を介してマクロファージへ取り込まれることで, 腫瘍随伴マクロファージ (TAM) マーカーである *IL10* 等の発現増加が誘導され, 腫瘍微小環境構築および腫瘍形成に大きな影響を及ぼすことを報告した⁵⁾. しかし BART miRNA を強制発現させただけでは同等の生物学的効果を再現できないことも同研究の過程で明らかとなり, BART miRNA 以外の因子あるいはその他 EV 上の分子の重要性が示唆された. そこで筆者らのグループでは EV のもう一つの重要な構成成分である「脂質」に着目した.

EV 脂質は一般的にスフィンゴ脂質やコレステロール, 飽和脂肪酸を疎水基に持つホスファチジルコリン等に富み, EV 膜の剛性を支持していると考えられてきた他^{6,7)}, 最近になってさまざまな特性や機能が注目されるようになってきたが⁸⁾, 研究領域の複雑さと解析の難しさから EV 研究領域の中でも王道である miRNA やタンパク質等に比べ著しく研究が遅れているのが現状である. EBV 陽性リンパ腫由来の EV 脂質においても, その組成や機能はまったく不明であったが, 最近の研究成果から EV 膜リン脂質には ω -3 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が豊富に存在することや^{4,9)}, 腫瘍由来 EV にはさまざまな脂質メディエーターが顕著に濃縮されていることが明らかとなった⁹⁾. EV への脂質メディエーターの濃縮機構は不明であるが, 特定の脂質輸送体・脂質結合タンパク質が関与する可能性や, EV 合成の段階で組み込まれている可能性などが考えられる. 構造的に不安定な脂質メディエーターとしては, EV を介することで細胞外液中の不活性化酵素や分解酵素から保護され局所濃度を高めた上で標的細胞上の受容体へアクセス可能になるという利点があると考えられ, 実際に腫瘍由来 EV がプロスタグランジン E2 を輸送し腫瘍の成長を促進することなども報告されており¹⁰⁾, この合理的なシステムが生体内で採用されている可能性が高いと考えられる. EBV 陽性リンパ腫においても腫瘍微小環境の構築に寄与していることが推測されるが, 現段階ではその詳細は不明であり今後さらなる調査が期待される.

東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学 (〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143)

Lipid-orchestrated acceleration of malignant lymphoma via the secreted phospholipase A2-mediated modification of extracellular vesicles

Kai Kudo and Ai Kotani (Department of Innovative Medical Science, Tokai University School of Medicine, Shimokasuya 143, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950249

© 2023 公益社団法人日本生化学会

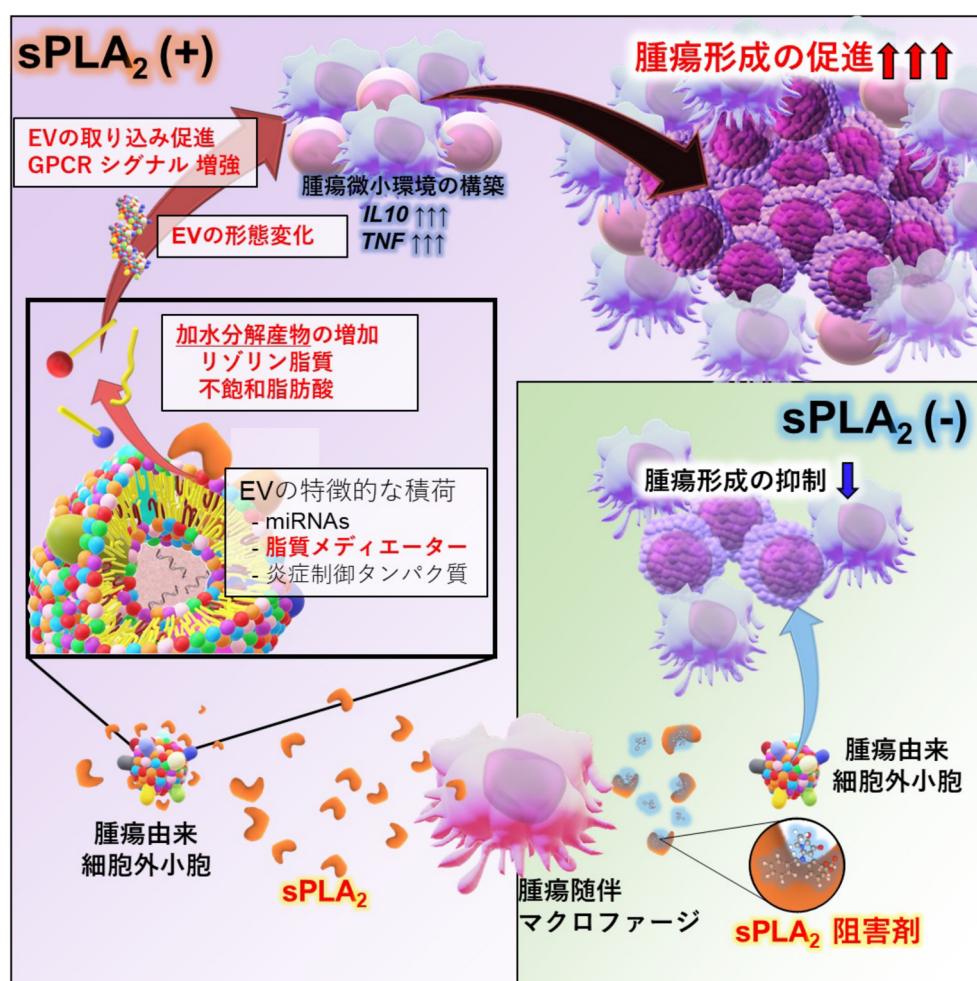


図1 悪性リンパ腫におけるEV脂質を介した腫瘍形成メカニズム「sPLA₂-EV軸」

腫瘍形成においては腫瘍組織中の腫瘍随伴マクロファージに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の膜リン脂質が修飾されると、さまざまな脂肪酸やリゾリン脂質が切り出され、EVの形態変化・GPCRシグナル増強・取り込みの促進等が誘導され、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（文献9より改変して引用）。

3. 分泌型ホスホリパーゼA2 (sPLA₂) によるEV膜リン脂質の加水分解

筆者らの研究成果からEBV陽性リンパ腫由来EVのリン脂質組成が明らかにされたが、その生物学的意義についてはまったく不明であった。そこで着目したのが“細胞外の”リン脂質を分解し、脂質メディエーター合成の起点となるボトルネック酵素「分泌型ホスホリパーゼA2 (sPLA₂)」であった。sPLA₂は組織分布や基質特異性が異なる11種類のアイソザイムが同定されており、近年では遺伝子改変マウスを用いた研究から、個々のsPLA₂がさまざまな病態・生理現象を制御することが報告されているが¹¹⁾、これを踏まえて筆者らは「sPLA₂により腫瘍由来EVの膜リン脂質に濃縮されたPUFAが遊離し、脂質メディエーターへと変換されることで腫瘍微小環境に影響を及ぼしている」との

仮説に至った。

まず初めに筆者らは造血系ヒト化マウスにEBVを感染させることでヒトにおけるEBV陽性DLBCLを再現したマウスモデルを作製し、形成された腫瘍組織におけるヒトのsPLA₂発現プロファイルを調べたところ、sPLA₂-IIDとsPLA₂-Xという二つのアイソザイムの発現が増加していることが確認された。そこでこれら二つのsPLA₂を試験管内にてリンパ腫由来EVと反応させたところ、sPLA₂-XがEVに対する酵素活性を示すことが明らかとなり、EBV陽性リンパ腫においてsPLA₂-Xと腫瘍由来EVを軸とした脂質メディエーター誘導機構が存在する可能性が示唆された（図2）。

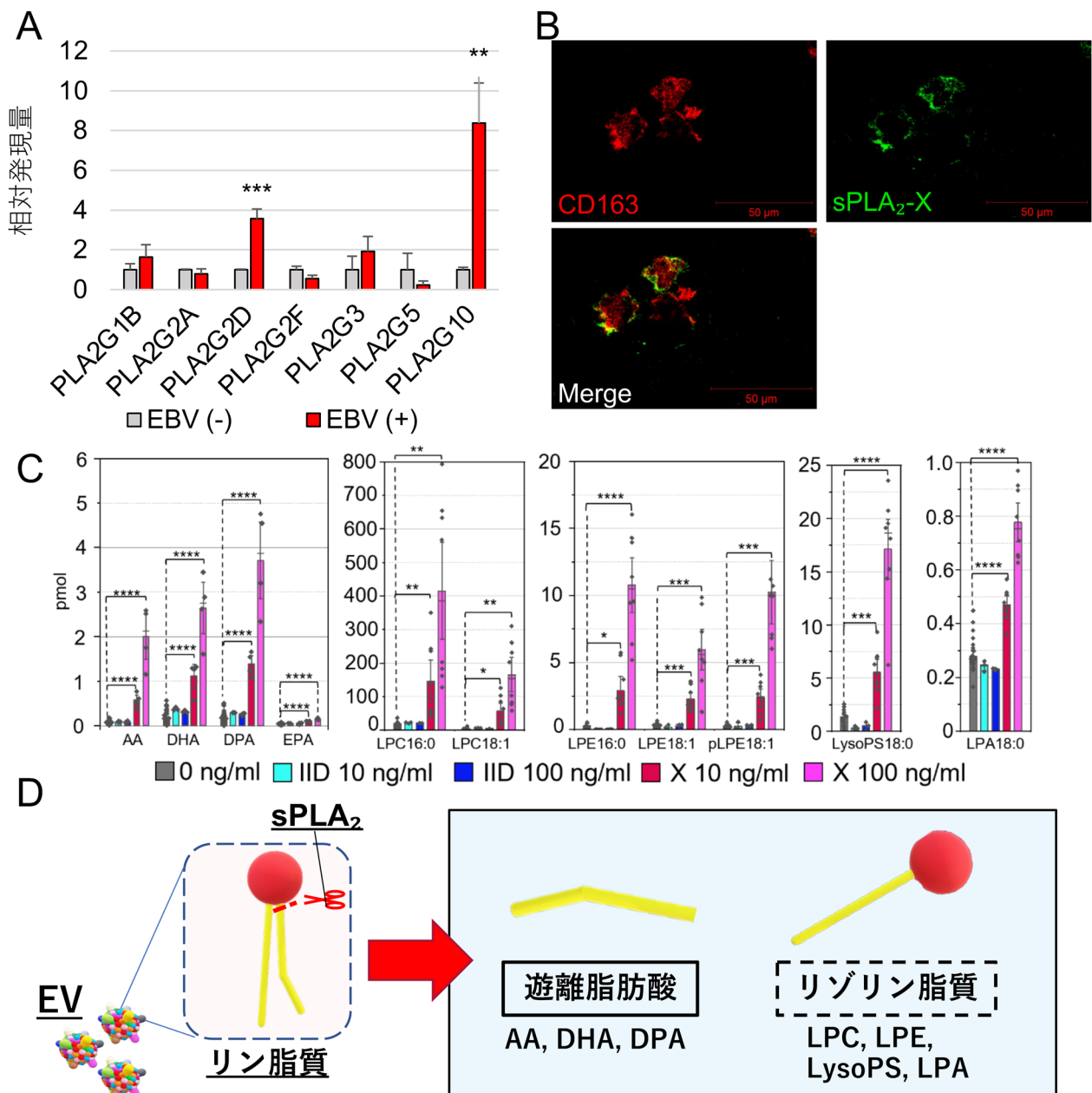


図2 sPLA₂は腫瘍微小環境のTAMに発現し、EV膜リン脂質を分解する

(A) 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. (B) 同腫瘍組織のCD163 (M2マクロファージマーカー)・sPLA₂-Xの二重免疫染色の結果. (C) 腫瘍組織にて発現増加がみられたsPLA₂と腫瘍由来EVの酵素反応により検出されたリン脂質分解産物. 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が、sPLA₂-IIDでは同条件下では分解はみられなかった. (D) (C)における実験の概要図. AA: アラキドン酸, DHA: ドコサヘキサエン酸, DPA: ドコサペンタエン酸, EPA: エイコサペンタエン酸, LPC: リゾホスファチジルコリン, LPE: リゾホスファチジルエタノールアミン (A~C: 文献9より改変して引用).

4. EV分解産物脂質が切り開く新規作動機序; GPCRシグナル

リン脂質がsPLA₂により加水分解されると遊離型PUFAやリゾリン脂質が産生されるが、これらはGタンパク質共役受容体 (GPCR) を介したシグナル伝達によりさまざ

まな生命応答を誘導することが知られている¹²⁾. EBV陽性リンパ腫においてはGPCRを介した脂質シグナルに関する報告はこれまで皆無であったが、筆者らはGPCRシグナル検出系「TGFα-shedding assay¹³⁾」にてアゴニストとしてEVと加水分解EVを用いて検証したところ、加水分解EVにてそのGPCRシグナル強度が著しく増強され、さらにそ

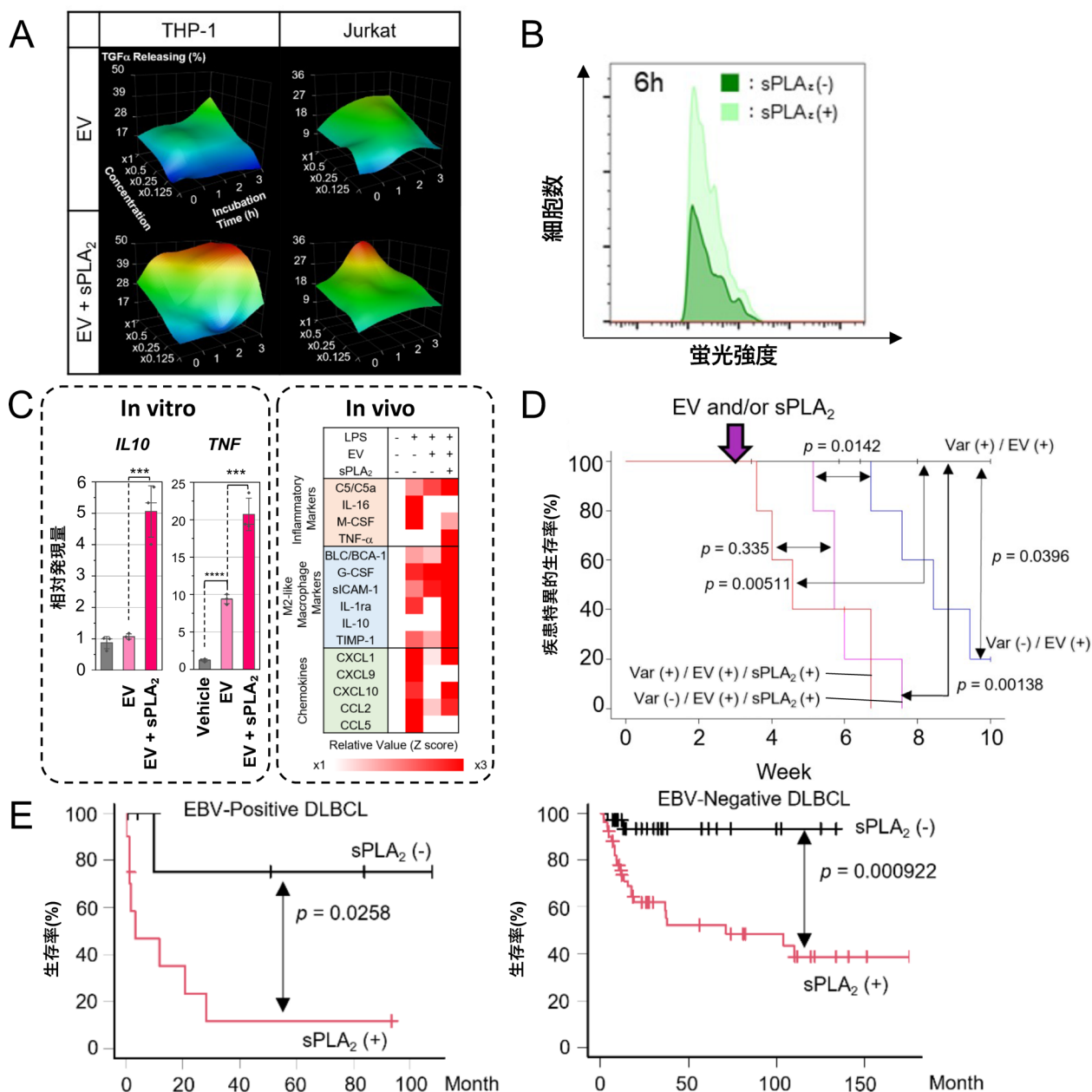


図3 EBV陽性リンパ腫におけるSPREDsの生物学的効果

(A) THP-1, Jurkat細胞における加水分解EV (EV+sPLA $_2$)によるGPCRシグナルの増強。縦軸はシグナル強度、横軸はEV濃度 (Concentration) とEV添加後から検出までの反応時間 (Incubation Time) を示す。(B)加水分解によるEV取り込みの促進。EV投与から6時間後までを観察。(C)加水分解EVの投与によるTAMマーカー・M2マクロファージマーカー発現の誘導の機能。左側のパネルはTHP-1を用いた*in vitro*での結果を示し、右側のパネルはマウスに投与した際の血清サイトカインアレイ結果を示している。(D)EBV陽性リンパ腫モデルマウスにおけるsPLA $_2$ 阻害剤 (Varespladib : Var) および加水分解EVの投与。(E)臨床病理検体を用いた予後解析。東海大学医学部付属病院におけるDLBCL患者100例を対象とし、組織切片 (tissue microarray) のsPLA $_2$ -X発現を解析。sPLA $_2$ -X陽性群と陰性群に分け臨床データと照合した (文献9より改変して引用)。

れはリゾホスファチジン酸受容体 (LPA) アンタゴニストの添加により阻害されることを見いだした⁹⁾。つまりこれは腫瘍由来EVの加水分解から派生したリゾホスファチジン酸 (LPA) がその受容体 (LPA) を介してGPCRシグナルを誘導していることを意味しており、従来EVはマ

クロファージなど貪食細胞に取り込まれることで内包物の機能・細胞間コミュニケーションとしての機能を発揮するものと考えられてきたが、実際にはsPLA $_2$ を介することでEVは「取り込まれずとも機能を発揮しうる」ということが明らかとなった。またこの新たなEV作動様式につい

て本研究では通常EVを取り込む能力のないT細胞（Jurkat細胞）においてもシグナルが増強されることを見いだしており（図3A），このことよりEVは加水分解を受けることで免疫細胞や上皮細胞，間質細胞などきわめて多岐にわたる細胞種にまでターゲット層を拡大することが可能となっていると推察される．一方で，EVにはさまざまな親水基を持つリゾリン脂質をLPAに変換する酵素Autotaxinの活性も検出されており，加水分解により産生されたリゾリン脂質はEV上でLPAに変換され，GPCRシグナルを強力に誘導するという可能性も示唆された．LPAはGPCRを通して免疫やがんなど多くの生命現象に関与することが知られているが¹⁴⁾，上記知見を踏まえてEBV陽性リンパ腫においてもEVを絡めた本機構がきわめて重要な経路であることが示唆される．

5. リンパ腫発生における sPLA₂ Reacted EV Derivatives (SPREDs) の生物学的効果

筆者らは次にEBV陽性リンパ腫におけるEV加水分解産物；sPLA₂ Reacted EV Derivatives (SPREDs) の生物学的効果を検証した．この結果，TAMマーカーの発現誘導やEVの古典的作動機序である貪食細胞への取り込みがSPREDs化することで促進され（図3B），さらに*in vivo*に投与した際には血清中のIL10やTNF- α の他さまざまなM2マクロファージマーカーの増加や，脾臓における大腸菌由来毒素（LPS）刺激に対する炎症性変化の抑制といった，もともとEBV陽性リンパ腫EVで証明されていた免疫抑制効果・腫瘍微小環境構築促進効果がSPREDs化することによってさらに増強されることが明らかとなった（図3C）．また先行研究ではEBV B95-8株（BART miRNA⁻）感染マウスにEBV Akata株（BART miRNA⁺）感染リンパ腫細胞由来EVの投与により腫瘍形成が促進されることが証明されていたが，これをSPREDs化して投与した場合にはその腫瘍形成促進効果もさらに増強されることが明らかとなった．一方でEBV Akata株感染マウスではウイルス感染のみでも腫瘍形成がみられるが，sPLA₂阻害剤（Varespladib）の投与により抑制され，そこへSPREDsを投与した場合にはその腫瘍形成抑制効果がキャンセルされることが明らかとなった（図3D）．つまり，EBV陽性リンパ腫においてはsPLA₂による腫瘍由来EVの加水分解，SPREDs化が腫瘍形成に重要なイベントである可能性が示唆された．また実際の悪性リンパ腫患者組織を用いた解析からはEBVの有無を問わずsPLA₂陽性の場合予後不良であることが明らかとなり，本現象がEBV感染症に限定されるものではないことが示唆された（図3E）．最近ではそれを裏づけるように，リンパ腫以外のEVもSPREDs化されうることや，*in silico*解析では全がんにおいてsPLA₂-X高発現群で予後不良であるこ

とも証明されており，本研究で示されたsPLA₂-EV軸が多くのがんにおいて共通の経路である可能性が示唆された．

6. おわりに

EVは細胞間における重要なコミュニケーションツールとしてさまざまなメッセージを伝達することが知られてきたが，本研究で解明された新規作動メカニズムによりEVはsPLA₂濃度の高い局所，腫瘍微小環境内でより広範な細胞群に対してその真価を発揮しているのだと推測される．逆に捉えるとsPLA₂濃度の低い循環血中に流れたEVは，その道中で分解される可能性が低いために離れた部位だとしても内包物の構造を保持しながら運ばれ，sPLA₂量の多い局所に到達したときに初めて内包物・脂質の機能が発揮されるというシステムを構築し，腫瘍が遠隔転移する際の微小環境構築などに関与している可能性も考えられる．

最近では加水分解されにくいEVの特徴や加水分解効率を左右するタンパクの存在，TAMからsPLA₂が分泌されるメカニズムなどsPLA₂-EV軸を取り巻くさまざまな因果関係も着々と解明されつつあり，今後はそれらを含む詳細な解析を経て悪性リンパ腫を含む多くのがんにおける有望な診断ツールおよび，新規治療戦略の開発へつながることが期待される．またその他筆者らのグループでは肝細胞由来EVの有する組織修復・抗炎症効果も増強されることなどが明らかとなっており，がんの側面のみならず近年注目されているEVを用いた治療応用の側面への波及効果も期待される．EV研究は非常に多くの研究領域にて爆発的な発展を続けているが，そのような中でも本研究がタンパク質・核酸等の内包物に隔たっている現在のEV研究に一石を投じた仕事として存在感を示し，領域全体をさらなる発展・新たなフェーズへと導く起点となることを願っている．

文 献

- 1) Beltran, B.E., Alva, J.C., Morales, D., Quinones, P., & Castillo, J.J. (2011) R-CHOP in the treatment of EBV-diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood*, **118**, 4988.
- 2) Aga, M., Bentz, G.L., Raffa, S., Torrisi, M.R., Kondo, S., Wakisaka, N., Yoshizaki, T., Pagano, J.S., & Shackelford, J. (2014) Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene*, **33**, 4613–4622.
- 3) Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquère, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., & Busson, P. (2006) Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer*, **6**, 283.
- 4) Ito, M., Kudo, K., Higuchi, H., Otsuka, H., Tanaka, M., Fuku-nishi, N., Araki, T., Takamatsu, M., Ino, Y., Kimura, Y., et al. (2021) Proteomic and phospholipidomic characterization of ex-

- tracellular vesicles inducing tumor microenvironment in Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *FASEB J.*, **35**, e21505.
- 5) Higuchi, H., Yamakawa, N., Imadome, K.I., Yahata, T., Kotaki, R., Ogata, J., Kakizaki, M., Fujita, K., Lu, J., Yokoyama, K., et al. (2018) Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma. *Blood*, **131**, 2552–2567.
 - 6) Llorente, A., Skotland, T., Sylv  ne, T., Kauhanen, D., R  g, T., Orlowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., & Sandvig, K. (2013) Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1831**, 1302–1309.
 - 7) Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Br  gger, B., & Simons, M. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, **319**, 1244–1247.
 - 8) Skotland, T., Sagini, K., Sandvig, K., & Llorente, A. (2020) An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **159**, 308–321.
 - 9) Kudo, K., Miki, Y., Carreras, J., Nakayama, S., Nakamoto, Y., Ito, M., Nagashima, E., Yamamoto, K., Higuchi, H., Morita, S.Y., et al. (2022) Secreted phospholipase A(2) modifies extracellular vesicles and accelerates B cell lymphoma. *Cell Metab.*, **34**, 615–633.e618.
 - 10) Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., et al. (2010) Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.*, **51**, 2105–2120.
 - 11) Murakami, M., Yamamoto, K., Miki, Y., Murase, R., Sato, H., & Taketomi, Y. (2016) The roles of the secreted phospholipase A. *Adv. Immunol.*, **132**, 91–134.
 - 12) Yung, Y.C., Stoddard, N.C., & Chun, J. (2014) LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.*, **55**, 1192–1214.
 - 13) Inoue, A., Ishiguro, J., Kitamura, H., Arima, N., Okutani, M., Shuto, A., Higashiyama, S., Ohwada, T., Arai, H., Makide, K., et al. (2012) TGF   shedding assay: An accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods*, **9**, 1021–1029.
 - 14) Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J., et al. (2004) Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J. Biol. Chem.*, **279**, 17634–17639.

著者寸描

●工藤 海 (くどう かい)

東海大学医学部基盤診療学系先端医療科学奨励研究員。博士(医学)。

■略歴 1992年青森県に生る。2015年弘前大学医学部保健学科検査技術科学専攻卒業、18年同大学院保健学研究科生体機能科学領域修了、22年東海大学大学院医学研究科先端医科学専攻修了。同年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞外小胞と脂質代謝に関連する研究。特に悪性リンパ腫・EBウイルス関連疾患を標的とした基礎研究に取り組んでいます。

■ウェブサイト <http://k-lab.jp/>

■趣味 草野球、お酒。

●幸谷 愛 (こうたに あい)

東海大学医学部教授。医学博士。

■略歴 1996年京都大学医学部卒業後、臨床研修を経て2003年学位取得。京都大学・本庶佑教授、MIT Harvey Lodishの元で学術振興会特別研究員、東京大学医科学研究所血液腫瘍内科助教を経て11年東海大学創造科学研究機構独立准教授、16年東海大学総合医学研究所教授。

■研究テーマと抱負 造血悪性疾患に対する新規治療開発と病気が露呈する新しいサイエンスの発見。新たに見つかったサイエンスを新規治療開発に結実させることにも今後は注力していきたい。

■ウェブサイト <http://k-lab.jp/index.html>

■趣味 山登り、温泉、料理番組。