

フェロトシス依存的細胞外小胞(FedEVs)による アスベスト発がん機構の解明 ～マクロファージの細胞死に伴って分泌される FedEVs は フェリチン供与を介し中皮細胞の発がんに寄与する～

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学大学院医学系研究科生体反応病理学の伊藤文哉（いとうふみや）研究員、梁取いずみ（やなとり いずみ）助教、豊國 伸哉（とよくに しんや）教授の研究グループは同大循環器内科学の加藤勝洋（かとう かつひろ）病院助教と室原 豊明（むろはら とよあき）教授による研究グループとの共同研究により、細胞外小胞^{*1}（EV:エクソソーム、マイクロベジクルなど）が発がん要因となる鉄を輸送しアスベスト発がんの一端を担うことを明らかにしました。私たちは昨年、アスベスト投与生体環境についての詳細な解析により、マクロファージの鉄依存的細胞死（フェロトシス）が発がん環境として発生しているという報告をしました。しかし、このマクロファージの細胞死からどのような機構で中皮細胞に発がん因子が届けられるのかについては疑問が残っていました。本研究では、発がん因子を届ける生理活性の高い物質として、細胞外小胞がその役割を担っているという仮説のもとに、マクロファージ由来のフェロトシス依存性 EV（FedEV^{*2}）をタンパク質の網羅的解析などにより詳細に解析しました。すると、FedEVにはフェリチンや触媒性 Fe(II)^{*3}が多量に含まれていることが判明しました。また、FedEV を取り込んだ中皮細胞の網羅的遺伝子発現解析により、細胞内で鉄が過剰となっていること、細胞分裂期に取り込まれていることが分かり、DNA 合成の活発な時期にEVが取り込まれ鉄依存的酸化傷害が生じていることを示しました。この FedEV を取り込んだ中皮細胞から腫瘍が発生するものと考えられます。今後、FedEV の取り込みをコントロールできるようになれば、中皮細胞への鉄の過剰蓄積を防ぎ、すでにアスベスト^{*4}に曝露した方への発がん予防となることが期待できます。

本研究は、科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 CREST「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」研究領域（研究総括：馬場嘉信 名古屋大学教授）における研究課題名「細胞外微粒子への生体応答と発がん・動脈硬化症との関連の解析」（研究代表者：豊國伸哉 名古屋大学教授）（JPMJCR19H4）の支援を受けたものです。

本研究結果は、科学誌「Redox Biology」（電子版）に2021年10月21日に掲載されました。

ポイント

- アスベストによるマクロファージの鉄依存的細胞死（フェロトーシス）は細胞外小胞を分泌する。
- 細胞外小胞はアスベスト由来の発がん因子を中皮細胞に伝達する。
- 細胞外小胞に含まれる主な発がんに寄与する主な分子はフェリチンである。
- 細胞外小胞を取り込んだ中皮細胞は細胞分裂期において DNA の酸化傷害を受ける。
- 以上より、細胞外小胞が発がんという新たな病態へ関与することを示した。

1. 背景

アスベストはいまだに世界中で多量に使用されており、悪性中皮腫や肺癌のリスクとなる発がん物質として広く問題視されています。アスベスト繊維の発がん機構の研究は2つの観点から進められてきました。すなわち、アスベスト繊維が中皮細胞に取り込まれ、核内へも直接作用することで発がんが起こるとする仮説と、アスベストが引き起こす炎症を介して間接的に中皮細胞をがん化させるという仮説です。本研究では、後者の分子機構の寄与を仮定して研究をデザインしました。昨年、アスベスト曝露により形成される炎症環境（肉芽腫^{※5}）内部にアスベストがマクロファージに貪食される発がん環境を同定しました。その炎症環境を再現した実験系で、中皮細胞はアスベストに直接接していないにも関わらず、がん抑制遺伝子 *p16^{INK4a}* の欠失が確認されました。しかし、どのように肉芽腫内のアスベストから中皮細胞へと発がん因子が伝搬するかという疑問は解決されていません。そこで、本研究では、生理活性物質を伝搬する細胞外小胞に着目し、細胞外小胞がアスベスト発がんに関与するのではないかとする仮説のもとで、発がん性の高いアスベストであるクロシドライト（青石綿）曝露により生じる細胞外小胞に焦点を定めた実験を行いました。

2. 研究成果

本研究では、最初にマウスの腹腔内にクロシドライトを投与するモデルを用いて、生体防御反応として生じる肉芽腫における FedEV の存在について検討しました。蛍光免疫染色の結果から、アスベスト繊維は CD68 陽性マクロファージに存在しており、 α SMA 陽性筋線維芽細胞やメゾセリン陽性中皮細胞には確認されませんでした。特筆すべき点として、細胞外小胞（EV）のマーカである CD63 の発現は筋線維芽細胞および中皮細胞において強い顆粒状パターンで認められました（図 1 b）。次に、中皮細胞の FedEV 取り込みの実験を行いました。GFP-CD63 を恒常的に発現する THP1 マクロファージ細胞およびフェロトーシス陽性細胞である HT1080 線維肉腫細胞の2つを樹立し、これらの細胞から GFP^{※6} がラベルされた EV を回収しました。この FedEV を中皮培養細胞 MeT-5A に添加したところ、添加後 6-9 時間で、FedEV はエンドサイトーシスにて完全に取り込まれることが判明しました。とくに、レシピエント中皮細胞の内在性 CD63 とマクロファージ由来の GFP-CD63 は添加後 24 時間においてサイトゾル（エンドソーム、後期エンドソーム～リソソーム様パターン）に強く共局在していることが判明しました（図 1 c）。

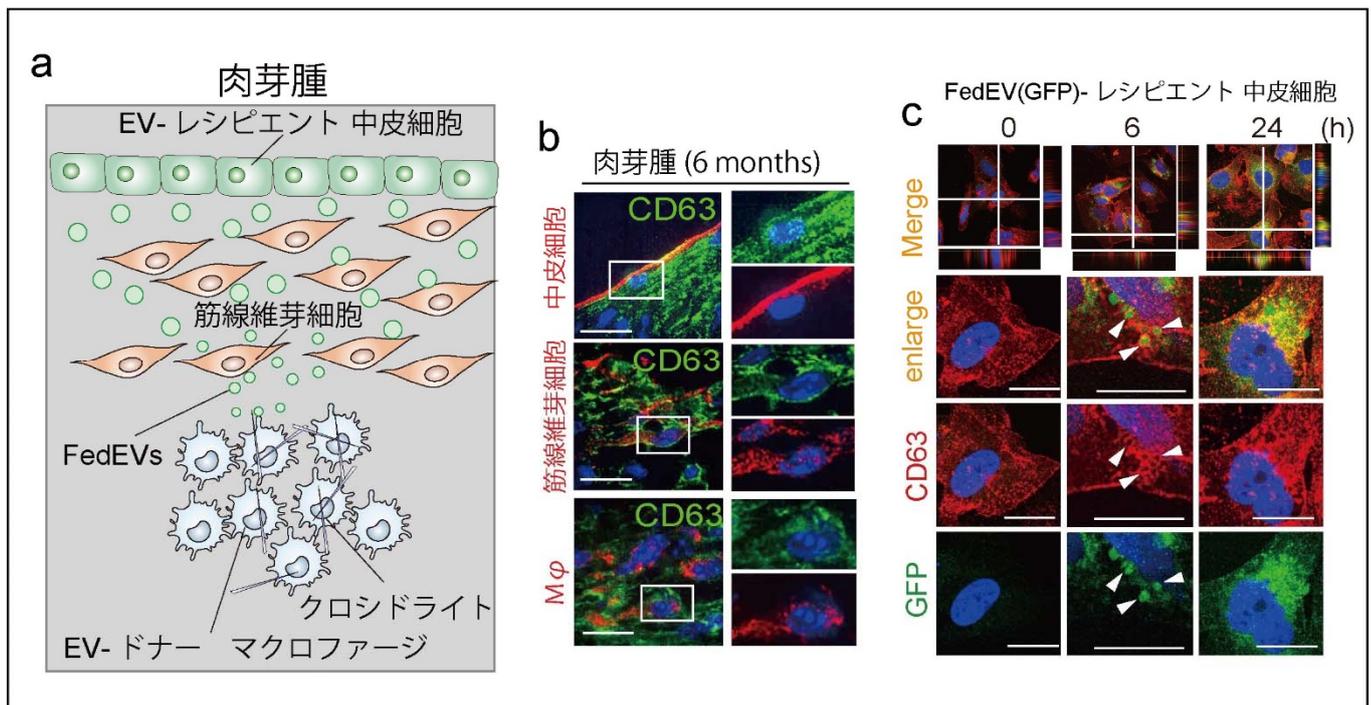


図 1 : CD63 陽性フェロトシス依存性 EV (FedEV)はクロシドライトおよび鉄に曝露されたマクロファージより分泌される。

(a,b)アスベスト繊維は肉芽腫内のマクロファージに貪食され存在しており、生体防御機構として筋線維芽細胞が中皮細胞とアスベスト貪食マクロファージとの間に介在している。EV (CD63 陽性) は筋線維芽細胞の細胞外基質において確認できる。(c)GFP-CD63 発現マクロファージ培養細胞に対し、鉄とクロシドライトを曝露した細胞から EV を回収。これを、中皮細胞に曝露させ、蛍光免疫染色を行った。内在性 CD63 (赤)、GFP-CD63 (緑)。

FedEV に含有する蛋白質を調べるために、LC-MS による蛋白質の網羅的解析を行ったところ、FedEV にはフェリチン (FtL および FtH) が多く含まれていることが判明しました (図 2 a)。とくに、鉄あるいは鉄とアスベスト繊維の曝露下においてのみ、細胞外小胞の鉄貯蔵蛋白質であるフェリチンが増大することは、鉄過剰病態において重要な点であると考えられます。次に、FedEV 曝露による中皮細胞への DNA 傷害について解析しました。FedEV 曝露後 24 時間にて、レシピエント中皮細胞の核内で DNA の酸化傷害 (8-OH dG^{*7})、DNA の 2 重鎖切断 (γ H2AX^{*8}) が増大することが判明しました (図 2b)。また、肉芽腫近傍の中皮細胞では CD63、フェリチン、DNA の 2 重鎖切断が共存することが確認されました。

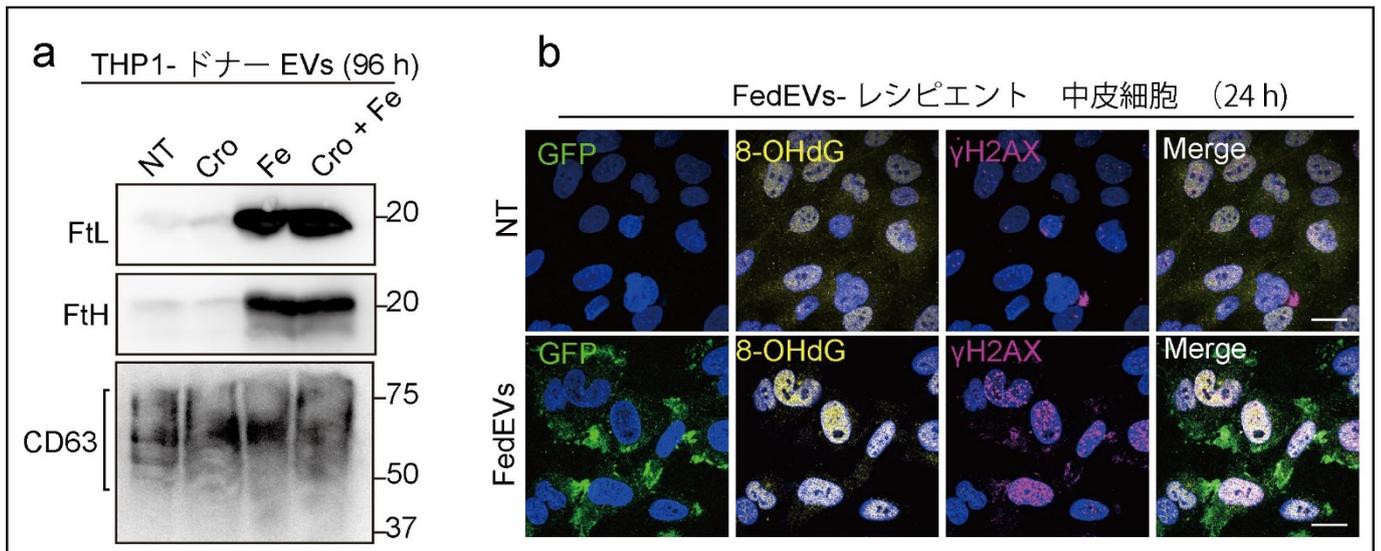


図2 レシピエント中皮細胞による FedEV の取り込みを介した DNA 傷害 (a) THP1 マクロファージ由来の細胞外小胞のイムノブロット (b) FedEV レシピエント中皮細胞の蛍光免疫染色、FedEV 曝露後 24 時間にて観察した。GFP-CD63 FedEV (緑)、8-OHdG (DNA 酸化傷害：黄)、 γ H2AX (DNA 二重鎖切断、マゼンタ) (スケール：10 μ m)。

3. 今後の展開

本研究成果により、細胞外小胞の新たな病態への関与として発がんに寄与する可能性が示されました。EV の発がんにおける役割に関する研究展開が期待できます。同時にアスベスト発がんにおいても FedEV が内包するフェリチンや触媒性 Fe (II) を中皮細胞へと供与する発がん機構の一端が明らかにされました。この機構は、がん予防のための標的となる可能性があります。また、より詳細な FedEV の解析により中皮腫患者のバイオマーカーとしての利用も期待できます。

4. 用語説明

※1 細胞外小胞：細胞のエンドソームから分泌される脂質二重膜構造をもつ小胞。内部に DNA, RNA、蛋白質を含有し、サイズの大きさ、産生機構の違いからエクソソーム、マイクロベジクル、アポトーシス小体に分類される。

※2 FedEV：Ferroptosis-dependent Extracellular Vesicle。鉄依存的細胞死により放出される細胞外小胞。

※3 触媒性 Fe(II)：フェントン反応 ($\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) は生体内で最も反応性の高い化学種である $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシルラジカル) を生じる反応であり、Fe(II)はこの反応を触媒する。

※4 アスベスト：天然の繊維状鉱物。耐久性、耐熱性、電気絶縁性に優れ、安価であったため、前世紀においては全世界で多量に使用された。建築材料、電気製品、衣料などに用いられていた。長期間の吸入により、肺がん、悪性中皮腫、石綿肺などの発生原因となる。発展途上国では今でも多量に使用されている。

※5 肉芽腫にくくぼしづ：生体内に異物や結核菌などすぐには排除できないものが存在するとき、貪食細胞で

あるマクロファージが多数集合してできる病変。

※6 GFP : Green-fluorescent protein。緑色蛍光タンパク質はオワンクラゲがもつ分子量約 27 kDa の蛍光性をもつタンパク質であり、タンパク質の実験における可視化によく使用されている。1960 年代に（故）下村脩博士によってイクオリンとともに発見・分離精製された。下村博士はこの発見で 2008 年にノーベル化学賞を受賞している。

※7 8-OHdG : DNA 修飾塩基を含むデオキシヌクレオシド。グアニンにヒドロキシラジカルがあたるとできる修飾塩基であり、最も頻度が高い。正常でも 100 万塩基あたり数塩基存在するとされる。

※8 γ H2AX:DNA の 2 本鎖切断部位にその修復のために集まるタンパク質。そのため、DNA2 本鎖切断が起こっていることの指標として使用される。

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Redox Biology

論文タイトル : Ferroptosis-dependent extracellular vesicles from macrophage contribute to asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through loading ferritin

著者 : Fumiya Ito¹, Katsuhiko Kato², Izumi Yanatori¹, Toyoaki Murohara², and Shinya Toyokuni^{*1,3}

所属 : ¹Department of Pathology and Biological Responses, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan; ² Department of Cardiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65; ³Center for Low-temperature Plasma Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102174>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Red_Bio_211021en.pdf