



Title	大腸癌放出細胞外小胞に内包される特徴的 RNA 修飾体による腫瘍免疫制御機構の解明
Author(s)	物江, 祐弥
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105579
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和 7 年度 博士学位論文

大腸癌放出細胞外小胞に内包される
特徴的 RNA 修飾体による腫瘍免疫制御機構の解明

大阪大学 大学院薬学研究科
創成薬学専攻 再生適応学分野
物江 祐弥

目次

略語一覧	3
要旨	5
緒論	6
本論	7
第1章 大腸癌 EVs-m6A レベルの低下は腫瘍促進的に働く	7
第1節 大腸癌 Te-EVs 特徴的 RNA 修飾体の同定	7
第2節 sgALKBH5 大腸癌細胞由来 EVs による腫瘍形成への作用解析	10
第2章 大腸癌 EVs-m6A はマクロファージの炎症を誘導し腫瘍促進的に働く	12
第1節 大腸癌 Te-EVs のマクロファージに対する表現型解析	12
第2節 大腸癌 EVs-RNA によるマクロファージ炎症誘導検討	15
第3節 大腸癌 EVs-m6A によるマクロファージへの炎症誘導解析	17
第4節 Te-EVs -m6A レベルと臨床組織内炎症レベルの相関解析	20
第3章 EVs-m6A はマクロファージの TLR8 を介して炎症応答を誘導する	22
第4章 5'-half-GlyGCC 上の m6A が炎症応答を介して腫瘍促進的に働く	25
第1節 大腸癌 Te-EVs -RNA 網羅的解析	25
第2節 5'-half-GlyGCC による腫瘍形成能及び炎症誘導能の評価	27
考察	30
結論	33
実験材料と方法	34
引用文献	43
謝辞	47

略語一覽

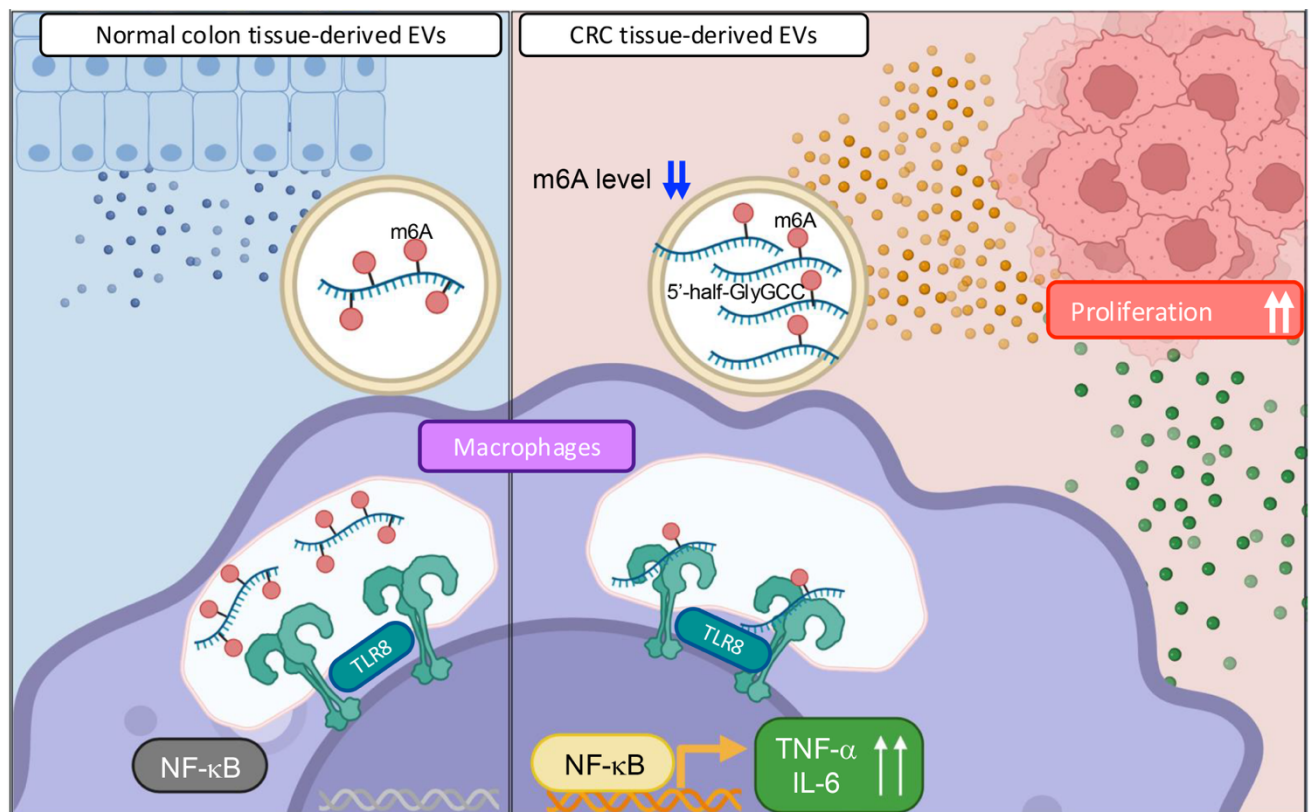
略語	名称
5'-half-GluCTC	5'-half-tRNA fragment-GluCTC
5'-half-GluTTC	5'-half-tRNA fragment-GluTTC
5'-half-GlyCCC	5'-half-tRNA fragment-GlyCCC
5'-half-GlyGCC	5'-half-tRNA fragment-GlyGCC
Alkbh5	alkB homolog 5
BSA	bovine serum albumin
DFS	disease-free survival
dsRNA	double-strand RNA
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EVs	extracellular vesicles
FBS	fetal bovine serum
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HRP	horseradish peroxidase
IHC	immunohistochemistry
IL-6	interleukin-6
m1A	N1-methyladenosine
m5C	5-methylcytosine
m6A	N6-methyladenosine
m7G	N7-methylguanosine
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MDM	monocyte-derived macrophage
NEAA	non-essential amino acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PKR	protein kinase R
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
rALKBH5	recombinant ALKBH5
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	size exclusion chromatography
ssRNA	single-stranded RNA

TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
Te-EVs	tissue-exudative EVs
TEM	transmission electron microscope
TLR3	toll-like receptor 3
TLR7	toll-like receptor 7
TLR8	toll-like receptor 8
TLRs	toll-like receptors
TNF- α	tumor necrosis factor- α
tRF	tRNA fragment
Tween20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
Ψ	pseudouridine

要旨

RNA 修飾は、細胞内プロセスにおいて非常に重要な機能を有しており、これらの異常が癌をはじめとした疾患の悪性化に寄与することが知られている。細胞外小胞(EVs: extracellular vesicles) は様々な RNA を内包しており、修飾体自体も存在すると考えられているが、EVs に内包される RNA 量は微量であるために検出が困難であった。私は、ultra-HPLC-MS/MS 測定系を用いて、EVs 中に存在する 22 種の RNA 修飾体の同定に成功した。この測定系により、大腸癌組織 EVs (Te-EVs: tissue-exudative EVs) で顕著に減少し、再発と相関の見られる修飾体として、N6-methyladenosine (m6A) を同定した。m6A 修飾体の脱修飾酵素である Alkbh5 (alkB homolog 5) ノックアウトマウス大腸癌細胞株由来 EVs では、m6A レベルが上昇し、*in vivo* において大腸癌腫瘍の形成が抑制された。この機序として、大腸癌 EVs-m6A レベルの減少により、マクロファージの TLR8 (toll-like receptor 8) を介して炎症応答を誘導し、TNF- α (tumor necrosis factor- α) 及び IL-6 (interleukin-6) 産生量を増加させることで大腸癌細胞の増殖促進に寄与することを明らかにした。さらに、EVs-RNA の網羅的解析により、大腸癌 Te-EVs に豊富に搭載される分子として、5'-half-tRNA fragment (5'-half)-GlyGCC を同定した。この時、大腸癌 Te-EVs 中の 5'-half-GlyGCC 上の m6A レベルは、正常大腸 Te-EVs に比べ顕著に低下していた。m6A 修飾を受けていない 5'-half-GlyGCC を搭載させた大腸癌 EVs は *in vivo* における腫瘍成長を促進し、マクロファージ枯渇モデルではこれらの効果が消失することを見出した。以上の結果は、EVs 中の癌特徴的な RNA 修飾変化が免疫制御を介して腫瘍の進展に寄与することを提示するものである。

<本研究の概要図>



緒論

RNA 修飾は、これまでに様々な種で実に 170 種以上もの修飾体が同定されている¹。これらの修飾体は細胞内プロセスの制御を担っており、RNA の転写や翻訳、局在、代謝といった多岐にわたる機能が報告されている²。細胞内における RNA 修飾体の修飾レベルの変化は、様々な疾患で特定されており³、癌においても癌細胞の増殖・転移あるいは免疫逃避に寄与することが報告されている⁴⁻⁷。しかしながら、多くの報告では RNA 修飾制御を担う修飾酵素、脱修飾酵素、修飾認識タンパク質に注目して、癌の進展や転移に対する機能に言及しており⁸、修飾体自体の変化とその機能に言及した報告は少ない。

大腸癌は、患者数が世界で第 3 位であり、死亡者数も第 2 位と代表的な癌種の 1 つである⁹。腸管という免疫細胞が集積している組織でもあることから、腫瘍内免疫の微小環境は大腸癌の進展と大きく関わっていると言われている¹⁰。大腸組織を含めた全身性の炎症は大腸癌における予後不良のマーカーとして知られており、TNF- α や IL-6 による慢性炎症は大腸癌増殖促進に寄与することが報告されている¹¹。現在までに、大腸癌では癌免疫療法として免疫チェックポイント阻害剤のペンブロリズマブが導入されているが、対象となる患者もマイクロサテライト不安定性が高く、T 細胞が応答しやすい高ネオアンチゲン腫瘍である MSI-high 大腸がんのみと全体のうち 5-10% 程度の患者に限定されており、奏功率も 30-40% と満足な治療効果が得られていない¹²。

m6A (N6-methyladenosine), m5C (5-methylcytosine), Ψ (pseudouridine) のような修飾体は、哺乳類の RNA において頻繁に修飾が施されており、Toll-like receptors (TLRs) による宿主の RNA に対する自然免疫応答を抑制的に制御している。一方で、ウイルスや細菌由来の RNA では修飾レベルが低く、TLRs は自己と非自己をこれら RNA 修飾体の修飾頻度によって識別することが示されている¹³。近年、m6A が腫瘍内免疫の調節に寄与することが示唆されており、癌微小環境内で異なる m6A 修飾パターンが見られることが明らかになっている¹⁴。しかしながら、腫瘍浸潤免疫細胞における m6A 修飾の詳細な機能や制御機構は未だ明らかでない。

細胞外小胞 (EVs: extracellular vesicles) は、癌細胞を含むあらゆる細胞より放出される小胞の総称であり、細胞間コミュニケーションを担うツールとして注目されている。EVs は、粒子のサイズによって大きく small EVs (<200 nm) と large EVs (>200 nm) に大別されている¹⁵。癌細胞が放出する EVs (癌 EVs) は、癌細胞自身、免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞といった種々の細胞に作用することで、癌の進展や転移を促進することが報告されている¹⁶⁻²⁰。EVs は、放出源となる細胞由来の多様な RNA を搭載していることを考慮すると、修飾を受けた RNA も存在していると考えられる。しかしながら、EVs に搭載されている RNA 量は細胞に比べ非常に少ないため、修飾体の機能おろかその存在自体これまで検出できていない。先行研究において、従来のエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) に比べ、より広範な分子を同時イオン化可能な高感度検出法である UHPLC-UniSpray-MS/MS の測定系により 46 種類の RNA 修飾体を同時に定量することに成功しており、卵巣癌および肺癌組織の RNA 修飾プロファイルを同定している^{6,7}。この高感度測定法により EVs 中の微量 RNA の修飾レベルの同定が可能である。

私は、「大腸癌細胞放出 EVs に搭載される RNA 修飾体が腫瘍免疫を制御することで癌促進的に作用するのではないか」と考えた。そこで、本研究では UHPLC-MS/MS の測定系を用いて大腸癌 EVs 中の RNA 修飾体を半網羅的に解析し、特徴的な修飾体を同定するだけでなく、その修飾体の大腸癌における病的意義を解明することを目的に検討を行った。

本論

第1章 大腸癌 EVs-m6A レベルの低下は腫瘍促進的に働く

第 1 節 大腸癌 Te-EVs 特徴的 RNA 修飾体の同定

大腸癌 EVs 中の RNA 修飾プロファイルを解析するため、まず、先行研究で開発した 組織滲出 EVs (Te-EVs: tissue-exudative EVs) 回収法 を用いて、正常大腸 Te-EVs (normal Te-EVs) および 大腸癌 Te-EVs (tumor Te-EVs) を small EVs として回収した (Figures 1A, B) ²¹。TRPS (tunable resistive pulse sensing) 法によるナノ粒子解析の結果、腫瘍重量あたりの放出粒子数に有意差は認められなかった一方で、粒子径は normal Te-EVs に比べ tumor Te-EVs がわずかに大きいことが確認された (Figures 1C-E)。さらに、EVs に内包されるタンパク量および RNA 量を測定したところ、1 粒子あたりのタンパク内包量に大きな差は見られなかったが、RNA 内包量は tumor Te-EVs で顕著に上昇していた (Figure 1F)。

次に、これら Te-EVs 及び放出源となった癌組織から精製した RNA をヌクレオシド単位に分解し、UHPLC-UniSpray-MS/MS を用いて 半網羅的 RNA 修飾解析 を行った (Figure 1G)。その結果、normal Te-EVs-RNA および tumor Te-EVs-RNA から 22 種の RNA 修飾体を同定でき、そのうち 14 種の修飾体は normal Te-EVs に比べ tumor Te-EVs で修飾レベルが低下していることが明らかとなった (Figure 1H)。一方、組織由来 RNA 修飾レベルは、正常大腸に比べ大腸癌組織で顕著な減少が見られた修飾体は 4 種にとどまった (Figure 1I)。これらの結果から、大腸癌 Te-EVs における RNA 修飾レベルの減少は単なる組織の情報を反映したものではなく、EVs-RNA に特異的な変化であることが示唆された。

ここで、大腸癌に特徴的に減少していた修飾体のうち、予後との関連が強いものに絞って検討を進めるため、臨床情報をもとに 転移や再発の有無に伴う修飾変化 を解析した。その結果、修飾レベルが低下していた 14 種の修飾体のうち、N6-methyladenosine (m6A) 修飾のみが再発患者の tumor Te-EVs でさらに顕著に低下していることが明らかとなった (Figures 1J, K)。さらに、EVs-m6A 修飾レベルの低い患者は高い患者に比べて生存率が有意に低下しており、予後不良との関連が示された (Figure 1L)。

以上より、大腸癌および正常大腸由来 Te-EVs 中の RNA 修飾体の同定に成功し、その中で 予後との関連が顕著な大腸癌 Te-EVs 特徴的修飾体として m6A を同定することができた。

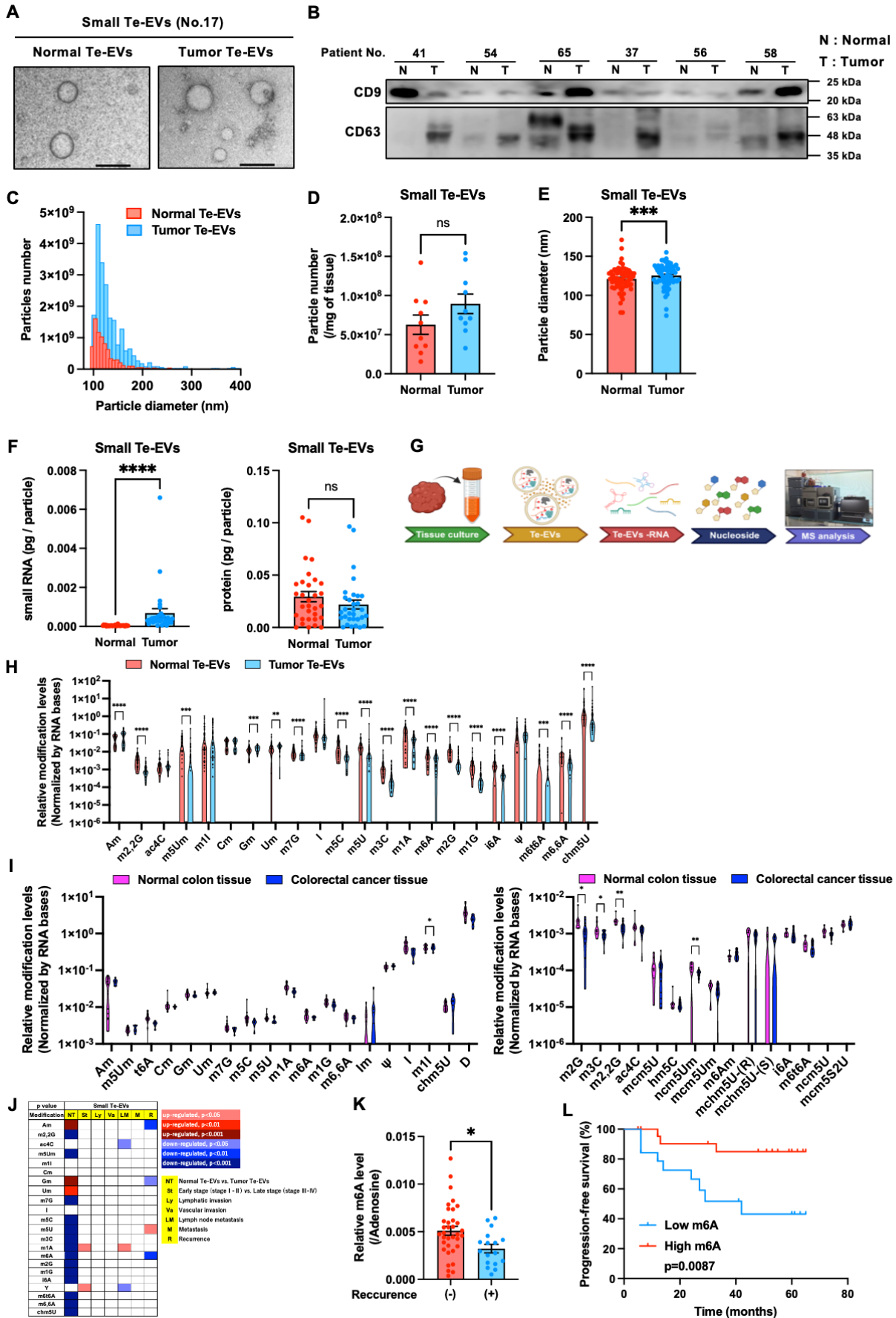


Fig. 1. Identification of characteristic RNA modification in colorectal cancer Te-EVs.

(A) Representative images of non-cancerous colon Te-EVs (Normal Te-EVs) and colorectal cancer Te-EVs (Tumor Te-EVs). Black bars indicate 200 nm. **(B)** Western blot analysis of Te-EVs (Patient No. 37, 41, 54, 56, 58, 65) using an anti-CD9 and CD63 antibody. **(C)** Particle distributions of small Te-EVs. **(D)** Number of small Te-EVs per unit tissue weight (n = 10). Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Wilcoxon signed-rank test; ns: not significant. **(E)** Particle diameters of small (n = 66) Te-EVs. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Wilcoxon signed rank test; ***P < 0.001. **(F)** Amounts of small RNA and proteins in small (n = 31) Te-EVs. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Wilcoxon signed-rank test; ****P < 0.0001, ns: not significant. **(G)** Experimental scheme for Te-EV isolation and subsequent RNA modification analysis. **(H)** UHPLC-MS/MS results for normal small Te-EVs (n = 42) and tumor small Te-EVs (n = 42). Wilcoxon signed-rank test; **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. **(I)** UHPLC-MS/MS results for normal (n = 8) and tumor tissues (n = 24). Mann–Whitney test; *P < 0.05, **P < 0.01. **(J)** Comparison of RNA modifications detected in EVs in various clinical backgrounds. **(K)** m6A levels in tumor Te-EVs from patients with ((+); n = 11) or without ((-); n = 27) recurrence. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Mann–Whitney test; *P < 0.05. **(L)** Progression-free survival between colorectal cancer patients who had low (n=19) and high (n=23) m6A levels in tumor small Te-EVs. Long-rank test.

第2節 sgAlkbh5 大腸癌細胞由来 EVs による腫瘍形成への作用解析

次に、大腸癌 Te-EVs 特徴的修飾体として同定した m6A が、大腸癌腫瘍の形成において重要な機能を果たすのか検証するため、マウス大腸癌細胞株 colon26 において m6A 脱修飾酵素である Alkbh5 ノックアウト細胞株を作製した(Figure 2A)。Alkbh5 ノックアウトにより、colon26 由来 EVs はコントロール (sgControl) に比べ、ノックアウト (sgAlkbh5) で m6A 修飾レベルが顕著に増加していた(Figure 2B)。この colon26 EVs を用いて、*in vivo* 大腸癌皮下移植モデルで m6A レベルの変化が腫瘍形成にもたらす作用を検討することにした(Figure 2C)。PBS を投与した群に比べ、sgControl EVs を投与した群では腫瘍の顕著な増大が見られる一方で、sgAlkbh5 EVs ではこの効果がキャンセルされ、PBS 投与群と同程度の腫瘍成長を示す結果となった(Figures 2D, E)。このことから、大腸癌 EVs 中の m6A レベルの減少は腫瘍促進的な作用を持つ可能性が示唆された。さらに、腫瘍内での増殖マーカー Ki67 の発現は、sgControl EVs 投与群で顕著に増加し、sgAlkbh5 EVs 投与によりこの増加は打ち消されることが明らかとなった (Figures 2F, G)。一方、血管内皮マーカー CD31 の発現は、sgControl EVs 投与群でわずかな増加傾向が見られたものの有意差はなく、sgAlkbh5 EVs 投与群でも CD31 発現の上昇は確認されなかった (Figures 2F, H)。

ここで、sgAlkbh5 EVs で見られなくなる大腸癌の増殖促進作用が、EVs が癌細胞自身に直接作用することで見られる表現型か検証するため、*in vitro* において sgControl EVs 及び sgAlkbh5 EVs 添加時の colon26 増殖能の評価を行った。その結果、*in vivo* で見られていた sgControl EVs による大腸癌増殖促進作用が見られず、PBS 添加及び sgAlkbh5 EVs 添加群と同程度の増殖能にとどまった(Figure 2I)。

以上の結果より、大腸癌 EVs における m6A レベルの上昇によって腫瘍促進的な作用が抑制される、つまり m6A レベルの減少が大腸癌腫瘍促進的作用を有することが明らかとなった。また、腫瘍内で見られる癌細胞の増殖促進機能は EVs が癌細胞以外の異なる細胞種に作用することで結果的に癌細胞の増殖促進に寄与している可能性が示唆された。

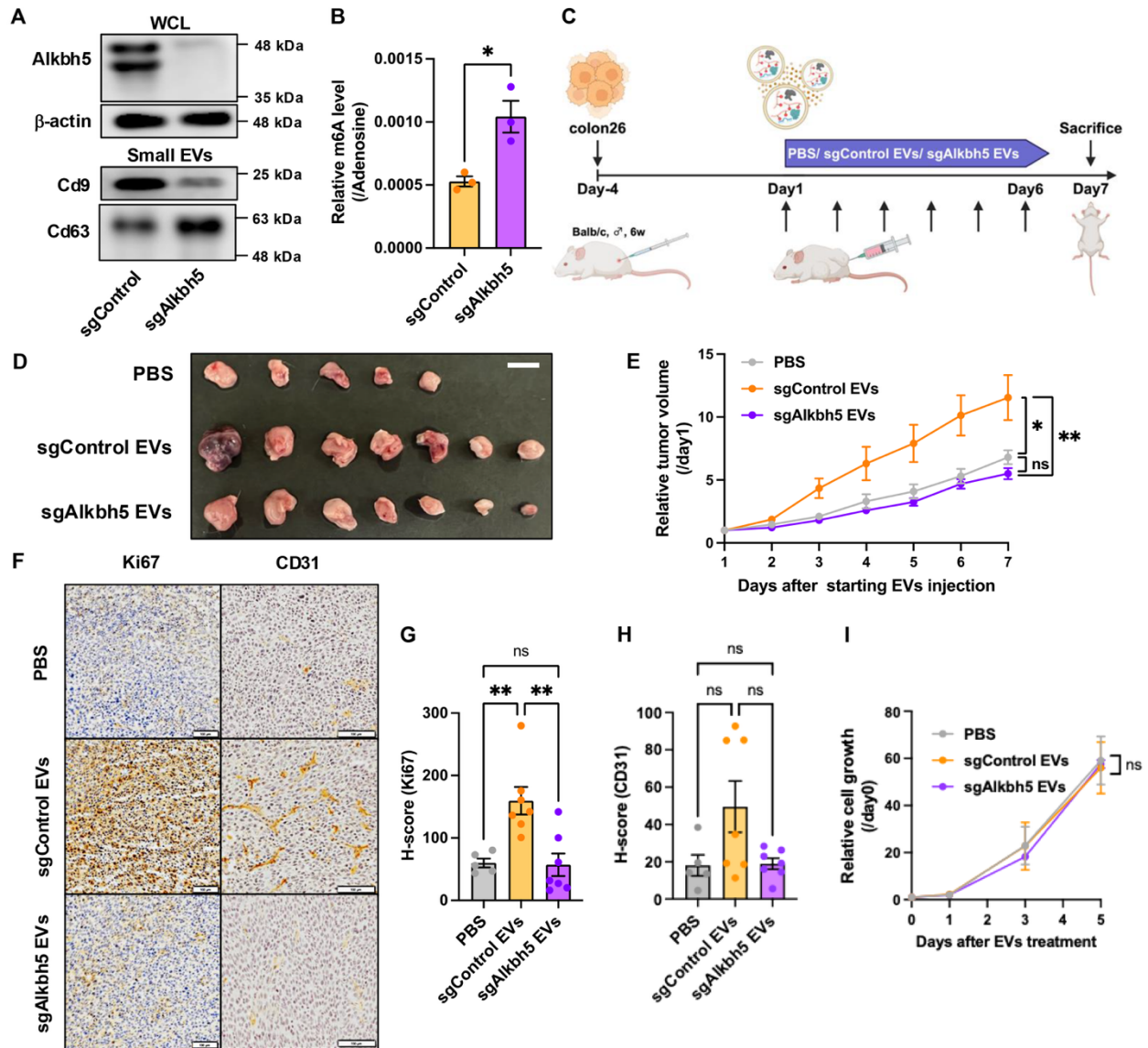


Fig. 2. Effects of Alkbh5 knockout colorectal cancer cell-derived EVs on tumor growth.

(A) Whole-cell lysates and small EVs obtained from control colon26 cells (sgControl) or Alkbh5 knockout colon26 cells (sgAlkbh5) were subjected to western blot analysis using anti-Alkbh5, anti-β-actin, anti-CD9, and anti-CD63 antibodies. Representative images from three independent experiments are shown. (B) UHPLC-MS/MS results for sgControl and sgAlkbh5 EVs. Values are presented as the mean ± SEM for each group. Unpaired t-test; *P < 0.05. (C) Experimental scheme for colon26 inoculation and subsequent EV injection. Colon26 cells were injected into BALB/c mice. PBS, sgControl EVs or sgAlkbh5 EVs were injected i.p., and the tumor size was measured and calculated every day. (D) Representative allograft tumor images. White scale bar, 1 cm. (E) Relative tumor volume. Values are presented as the mean ± SEM for each group. One-way ANOVA post-hoc Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01, ns: not significant. (F) The expression of Ki67 and CD31 in mouse tumors was examined using immunohistochemical staining. Black bars indicate 100 μm. Representative images of three samples are presented. H-score for Ki67 (G), CD31 (H) expression. Values are presented as the mean ± SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; **P < 0.01, ns: not significant. (I) colon26 cells were treated with PBS or sgControl EVs or sgAlkbh5 EVs. Values are presented as the mean ± SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; ns: not significant.

第2章 大腸癌 EVs-m6A はマクロファージの炎症反応を誘導し腫瘍促進的に働く

第1節 大腸癌 Te-EVs のマクロファージに対する表現型解析

次に、EVs-m6A レベルの変動により見られる大腸癌細胞増殖促進作用が、どの細胞に対する作用を介した表現型であるか検証するため、焦点を当てる細胞種を絞ることにした。既報として、免疫リッチな腸内環境に発生する大腸癌の進展は腫瘍内免疫と密接な関わりを持つだけでなく、RNA 修飾は自然免疫応答制御に重要な役割を果たすことが知られているため¹³、免疫細胞に焦点を当てて解析を進めることにした。まず、どの免疫細胞に対して大腸癌 EVs がより頻繁に取り込まれ影響を及ぼしやすいか検討するために、ヒト末梢血単核球 (PBMCs: peripheral blood mononuclear cells) に PKH26 で蛍光ラベリングを施した normal Te-EVs 及び tumor Te-EVs を作用させ、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球のそれぞれに取り込まれた割合をフローサイトメトリーにより解析した (Figures 3A, B)。その結果、normal Te-EVs, tumor Te-EVs 共に単球に最もよく取り込まれており、8 割以上の単球によって取り込まれていた。次いで、NK 細胞、B 細胞のうち 2-3 割程度の細胞が Te-EVs を取り込んでおり、T 細胞はほとんど Te-EVs を取り込まなかった (Figure 3C)。また、normal Te-EVs と tumor Te-EVs 間の取り込み割合に顕著な差は見られなかった (Figure 3C)。そこで、最も顕著な取り込みを示していた単球がより大腸癌 Te-EVs による作用を受けやすいと考え、単球に焦点を当てて検討を進めることとした。

単球の持つ機能の一つとして、炎症制御を含むサイトカイン産生が挙げられる。そこで、大腸癌 Te-EVs 添加時のサイトカイン、ケモカイン産生量の変化捉えるために、サイトカインアレイを用いて網羅的に解析を行った。その結果、normal Te-EVs 添加群に比べ tumor Te-EVs 添加群で 35 種のサイトカインの産生量増加が見られた (Figure 3D)。産生上昇の見られたサイトカイン群のエンリッチメント解析を行ったところ、RELA, NFkB1 といった NF- κ B 経路を制御する転写調節因子との関連が見られるサイトカインがエンリッチされていることが明らかとなった (Figure 3E)。単球は、腫瘍内においてその状態で存在しておらず、ほとんどがマクロファージへと分化して腫瘍内に浸潤し機能を発揮している (20)。そこで、より正確な大腸癌 Te-EVs の機能を探るため、ヒト初代培養のマクロファージ (MDM: monocyte-derived macrophage) を用いて同様に、大腸癌 Te-EVs 添加時のサイトカイン産生変化をサイトカインアレイによって解析した。単球と同様に、tumor Te-EVs 作用時に、26 種のサイトカインの顕著な産生量増加が見られた (Figure 3F)。また、これらの産生上昇が見られたサイトカインに関してエンリッチメント解析を行ったところ、単球と同様に NF- κ B 経路に関わるサイトカインがエンリッチされていることが明らかになった (Figure 3G)。

サイトカインアレイの結果から、大腸癌 Te-EVs がマクロファージに対して作用する機序として NF- κ B 経路との関連が示唆された。そこで、大腸癌 Te-EVs が NF- κ B 経路の活性化に寄与するか検証するために、古典経路で中核的な役割を果たす分子である p65 (RelA) の活性化状態を表すリン酸化レベルを確認することにした。ウェスタンブロットにより、normal Te-EVs 添加時に比べ tumor Te-EVs 添加時に p65 のリン酸化レベルが上昇することが明らかになった (Figure 3H)。さらに、NF- κ B 経路の下流で転写される代表的なサイトカインである TNF- α 及び IL-6 の産生量を ELISA により測定したところ、normal Te-EVs に比べ、tumor Te-EVs 添加時に顕著な産生増加が見られた (Figures 3I, J)。ここで、大腸癌 Te-EVs がマクロファージに作用することで、腫瘍促進的に働くか検証するために normal Te-EVs 及び tumor Te-EVs を作用させたマクロファージ培養上清を用いてヒト大腸癌細胞株 HT29 培

養した時の増殖能評価を行ったところ、tumor Te-EVs 添加培養上清で顕著な増殖能の亢進が見られた (Figure 3K)。

これらの結果から、大腸癌 Te-EVs はマクロファージの NF- κ B 経路を介して炎症応答を誘導することで大腸癌細胞の増殖促進に寄与している可能性が示唆された。

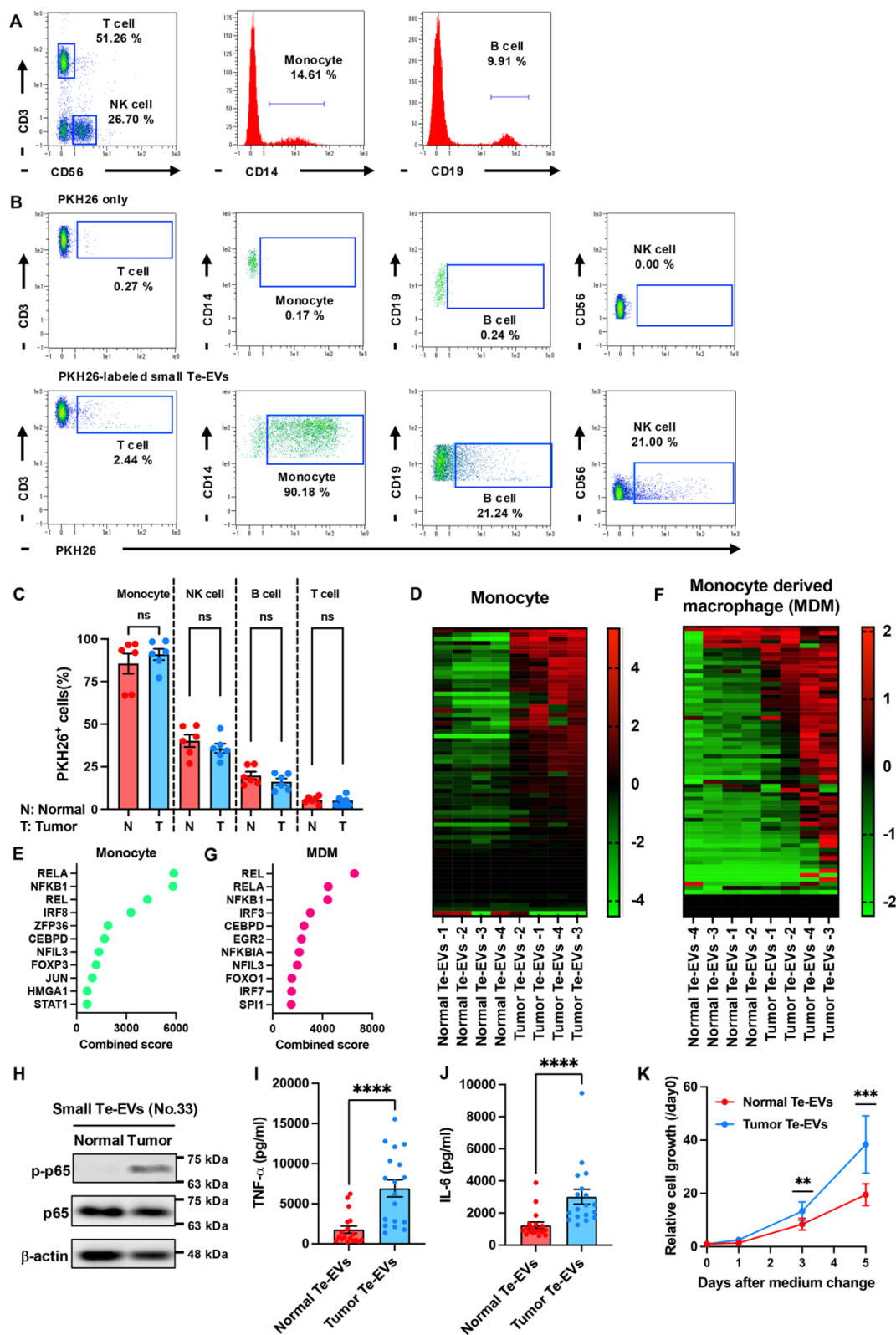


Fig. 3. Phenotypic analysis of colorectal cancer Te-EVs on macrophages.

PBMCs were pretreated with PKH26 labeled Te-EVs. **(A)** The percentage of each cell types and **(B)** PKH26-positive EVs in PBMCs were analyzed by flow cytometry. A representative image is shown. **(C)** Normal colon small EVs (N) and colon cancer tissue small EVs (T) were labeled with PKH26 and added to PBMCs. The percentage of PKH26-positive EVs in each PBMC sample was measured using flow cytometry. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Wilcoxon signed-rank test; ns: not significant. Heatmap of the cytokine array performed using conditioned medium from monocytes **(D)** or monocyte-derived macrophages (MDM, **F**) treated with normal (n = 4) or tumor (n = 4) small Te-EVs. Enrichment analysis of the cytokine array using conditioned medium from monocytes **(E)** or MDM **(G)** treated with normal (n = 4) or tumor (n = 4) small Te-EVs. **(H)** Whole-cell lysates obtained from normal or tumor small Te-EV-treated MDM were subjected to western blot analysis using anti-phospho p65 antibody, anti-p65 antibody, and anti- β -actin antibody. Representative images of three independent experiments are shown. ELISA was conducted using conditioned medium from MDM treated with normal (n = 18) or tumor (n = 18) small Te-EVs. TNF- α **(I)** and IL-6 **(J)** levels. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Wilcoxon signed-rank test; ****P < 0.0001. **(K)** HT29 cells were cultured in conditioned medium from MDM treated with normal (n = 18) or tumor (n = 18) small Te-EVs. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Wilcoxon signed-rank test: **P < 0.01, ***P < 0.001.

第2節 大腸癌 EVs-RNA によるマクロファージ炎症誘導検討

これまで、大腸癌患者検体由来 Te-EVs を用いた検討から、大腸癌 Te-EVs はマクロファージの NF- κ B 経路を介して炎症応答を誘導し、大腸癌細胞の増殖を亢進させていることが示唆されている。この炎症応答誘導の分子機序を探索するにあたり、これらの表現型が細胞株を用いた検討でも同様に確認できるか検証することにした。まず、ヒト正常大腸細胞株 CCD-841-CoN、ヒト大腸癌細胞株 HT29, SW620 からそれぞれ small EVs を回収し、電子顕微鏡および TRPS 法によるナノ粒子解析により EVs の存在及び性状を確認した (Figures 4A, B)。次に、ヒト単球様細胞株 THP-1 をマクロファージ様細胞 (dTHP-1) に分化させた後、EVs を作用させたところ、TNF- α , IL-6 いずれのサイトカインも CCD-841-CoN EVs に比べ、HT29 EVs, SW620 EVs 作用時に顕著な産生増加を示した (Figure 4C)。この結果から、大腸癌 Te-EVs で見られたマクロファージの炎症応答誘導は細胞株由来 EVs を用いた検討でも同様の表現型が得られることが明らかとなった。

マクロファージの炎症応答を誘導する大腸癌 EVs 中の分子が RNA 修飾、特に m6A を介したものであるかを検証するため、まず EVs-RNA が炎症応答誘導に寄与しているかを確認した。細胞株由来 EVs から抽出した total RNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いて dTHP-1 細胞にトランスフェクションしたところ、EVs 添加時と同様に、CCD-841-CoN EVs に比べ HT29 EVs および SW620 EVs の RNA 添加で TNF- α および IL-6 産生が顕著に増加した (Figure 4D)。

さらに、これらの炎症誘導が EVs の膜外側に存在する cell-free RNA による作用ではないことを確認するため、サイズ排除カラムクロマトグラフィー (SEC: size exclusion chromatography) で精製した EVs を dTHP-1 に作用させた場合も、HT29 EVs および SW620 EVs 添加で顕著な炎症誘導が確認された (Figure 4E)。加えて、EVs 懸濁液を RNase 処理し、再度精製した EVs を dTHP-1 に作用させた場合も、RNase 処理前後で炎症応答誘導能の減弱は認められなかった (Figure 4F)。これらの結果から、大腸癌 EVs 中の炎症応答誘導分子は EVs 内に保持された RNA に依存しており、膜外側の cell-free RNA ではないことが示唆された。

次に、大腸癌細胞株由来 EVs を作用させた dTHP-1 培養上清が、大腸癌細胞の増殖を促進するかを検証した。結果として、CCD-841-CoN EVs 添加の dTHP-1 培養上清に比べ、HT29 EVs 添加の dTHP-1 培養上清では HT29 細胞の増殖が顕著に促進されることが確認された (Figure 4G)。さらに、TNF- α 抗体または IL-6 抗体を同時添加すると、この増殖促進作用が打ち消されることも明らかとなった (Figure 4G)。

以上の結果から、大腸癌 Te-EVs によるマクロファージの炎症応答誘導は、細胞株由来 EVs を用いた系でも再現され、大腸癌 EVs-RNA に依存した炎症誘導であることが示された。また、この炎症応答によって産生された TNF- α および IL-6 が、大腸癌細胞の増殖促進に寄与していることも明らかとなった。

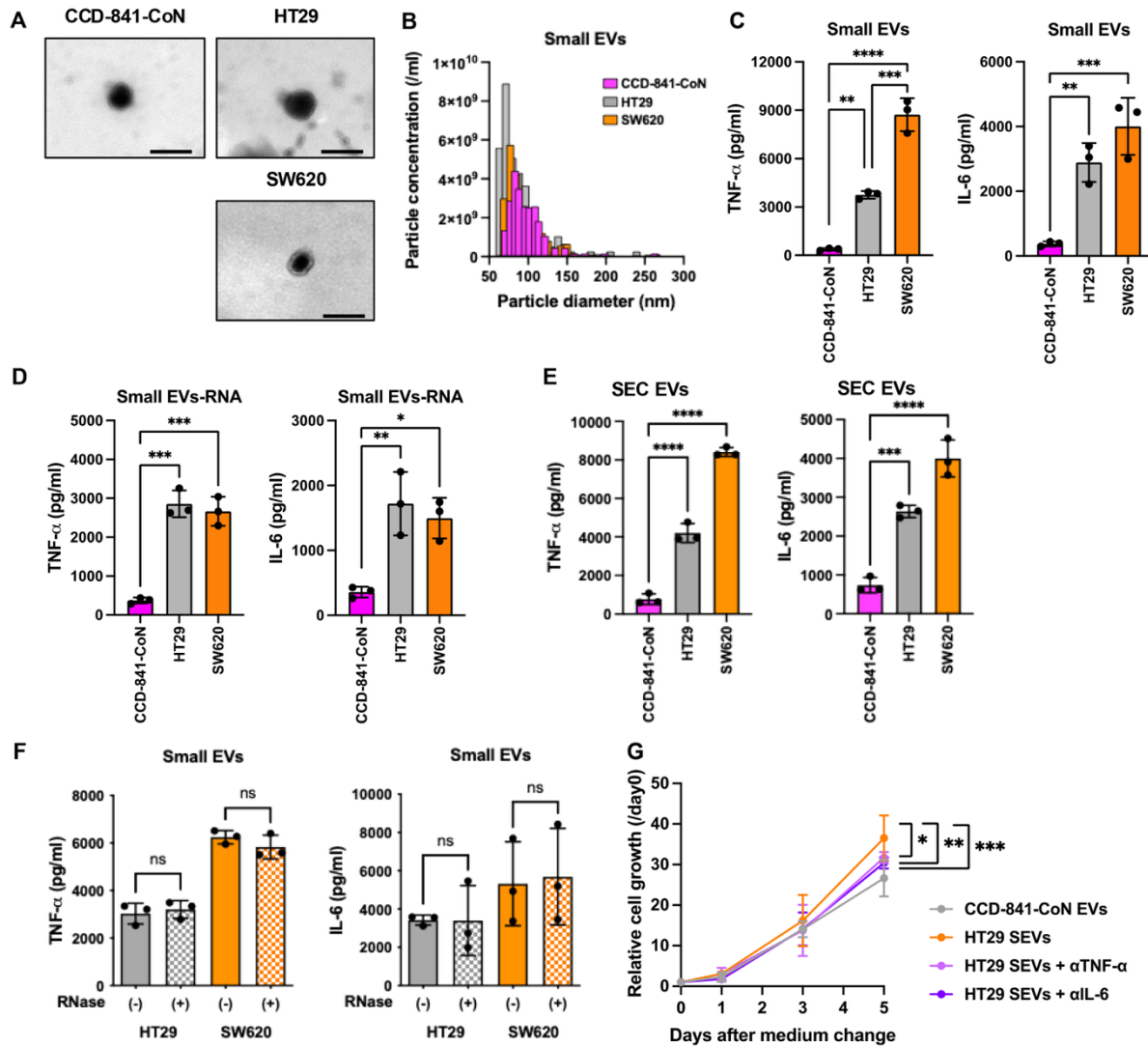


Fig. 4. Colorectal cancer cell-derived EVs-RNA induce inflammation in macrophages.

(A) Representative images of CCD-841-CoN, HT29, and SW620 EVs. Black bars indicate 200 nm. (B) Particle distribution of cell line-derived small EVs. ELISA was conducted using conditioned medium from differentiated THP-1 cells (dTHP-1) treated with small cell line-derived EVs. TNF- α (C, left) and IL-6 (C, right) concentration. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ELISA was conducted using conditioned medium from dTHP-1 cells transfected with cell line-derived small EVs-RNA. TNF- α (D, left) and IL-6 (D, right) concentration. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Cell line-derived EVs were pretreated with or without RNase. ELISA was conducted using conditioned medium from dTHP-1 cells treated with small cell line-derived EVs. TNF- α (E, left) and IL-6 (E, right) concentration. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; ns: not significant. Cell line-derived EVs were purified by size exclusion chromatography. ELISA was conducted using conditioned medium from dTHP-1 cells treated with purified small cell line-derived EVs. TNF- α (F, left) and IL-6 (F, right). (G) HT29 cells were cultured in conditioned medium with differentiated THP-1 (dTHP-1) cells treated with CCD-841-CoN small EVs or HT29 small EVs alone or in combination with TNF- α or IL6 antibodies. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

第3節 大腸癌 EVs-m6A によるマクロファージへの炎症誘導解析

ここまで、大腸癌細胞株 EVs を用いた検討から、大腸癌 EVs-RNA がマクロファージの炎症応答の誘導に寄与することが明らかになっている。そこで、この EVs-RNA による炎症応答誘導が m6A レベルの変化によって制御されるのか検証することにした。まず、sgControl EVs および sgAlkbh5 EVs を投与した colon26 腫瘍内での炎症状態に変化が見られているか検証するために、IHC により腫瘍内の TNF- α および IL-6 の発現量を確認した。sgControl EVs 投与群では、TNF- α , IL-6 とともに顕著な発現増加が見られた一方で、sgAlkbh5 EVs 投与群ではそれらの発現上昇がキャンセルされた(Figures 5A-D)。また、マクロファージマーカー F4/80 の染色スコア (H-score) には顕著な違いが見られないことから、マクロファージの浸潤数には影響はなく、炎症応答の活性に寄与していることが示唆された。このことから、EVs-m6A レベルの減少が腫瘍浸潤マクロファージに対して、炎症応答を誘導する可能性が示唆された。

次に、腫瘍浸潤マクロファージで見られた炎症応答が EVs-m6A によって直接誘導されたものか検証するために、マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 細胞を用いて sgControl EVs 及び sgAlkbh5 EVs を作用させた時のサイトカイン産生変化を確認することにした。サイトカインアレイによって、NF- κ B に関連する炎症性サイトカインを測定したところ、sgControl EVs 作用時には顕著な炎症誘導が見られる一方で、sgAlkbh5 EVs ではこれらの作用が抑制された(Figure 5E)。また、この表現型の変化がヒト細胞を用いた検討でも確認できるか検証するために、ALKBH5 ノックアウト HT29 細胞株を樹立した(Figures 5F, G)。ヒト細胞株を用いた検討でも同様に、sgControl EVs 作用時には見られる dTHP-1 の炎症応答が、sgALKBH5 EVs では減弱されることが確認された(Figures 5H, I)。このことから、ALKBH5 ノックアウトにより上昇した EVs-m6A レベルはマクロファージへの炎症応答誘導能を減弱させることが明らかになった。

ここで見られた EVs-m6A の上昇による炎症応答の減弱とは逆に、EVs-m6A の低下によって炎症応答が増強されるかについても検証することにした。ヒト ALKBH5 のリコンビナントタンパク質 (rALKBH5) を用いて、事前に精製した HT29 EVs-RNA に対して酵素反応を行い、m6A レベルが顕著に低下することを確認した(Figure 5J)。この時、熱変性を加えたリコンビナントタンパク質では修飾レベルの低下が見られなかったことから、ALKBH5 の酵素反応依存的な脱修飾であることが確認されている。rALKBH5 によって m6A レベルを減少させた EVs-RNA を dTHP-1 に導入したところ、未処理の EVs-RNA に比べて、顕著な炎症誘導が見られた(Figure 5K)。また、熱変性 rALKBH5 を反応させた EVs-RNA では顕著な炎症応答の増強は見られなかった。

以上の結果から、大腸癌 EVs は内包する RNA の m6A レベルを減少させることで腫瘍に浸潤するマクロファージに対して炎症応答を誘導することで、腫瘍促進的に働くことが明らかになった。

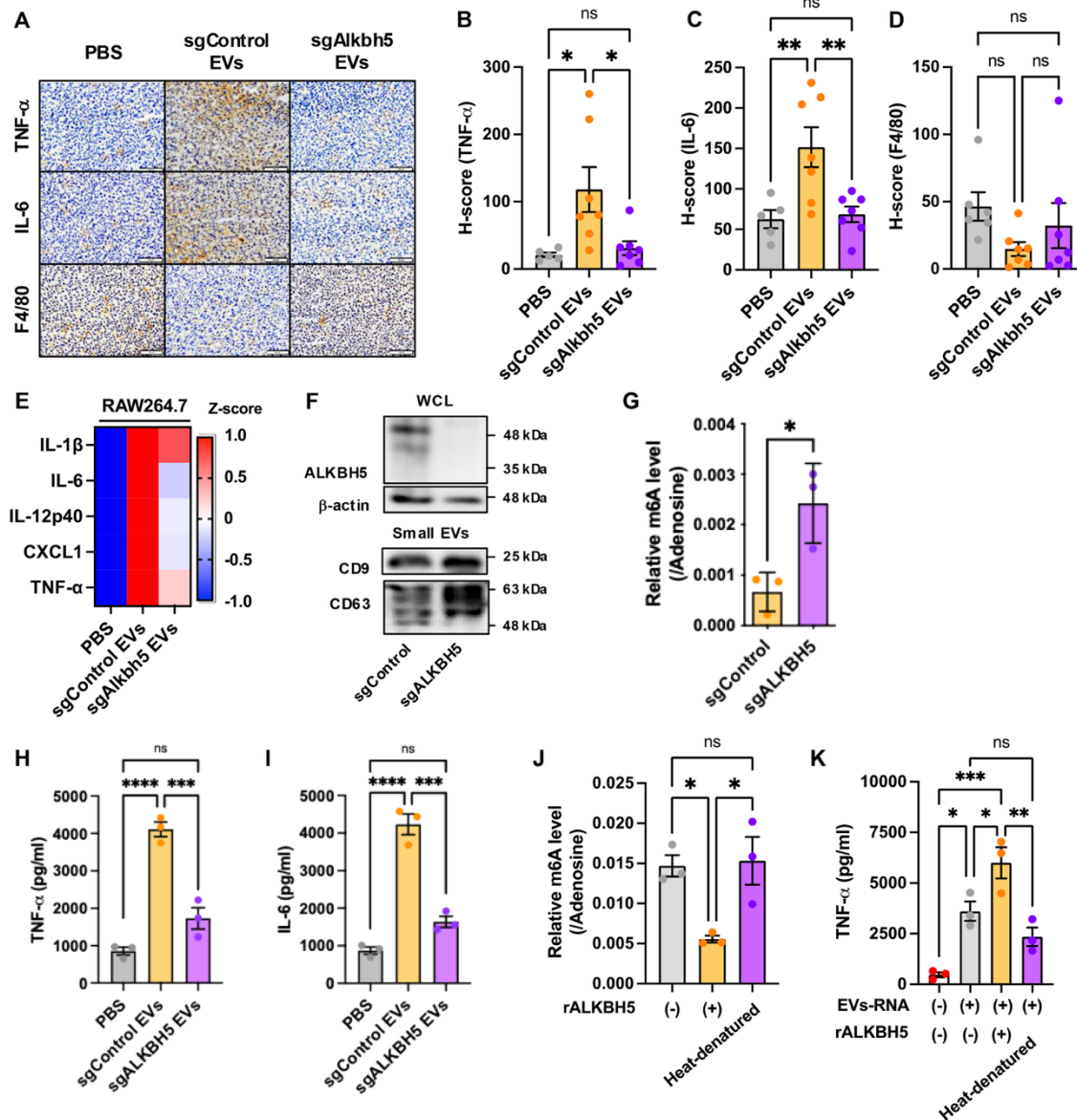


Fig. 5. Analysis of inflammation induction in macrophages by colorectal cancer EVs-m6A

(A) Immunohistochemical analysis of TNF- α , IL-6, and F4/80 expression in the tumor tissues of mice inoculated with small EVs obtained from Alkbh5 knockout (sgAlkbh5 EVs) or control colon26 cells (sgControl EVs). Scale bar: 100 μ m. Representative images of five (PBS group) and seven (sgControl EVs and sgAlkbh5 group) independent experiments are shown. H-scores of TNF- α (B), IL-6 (C), and F4/80 (D) expression. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; * P < 0.05. ns: not significant. (E) Heatmap of cytokine array using conditioned medium from RAW264.7 cells treated with sgControl EVs (n = 4) or sgAlkbh5 EVs (n = 4). (F) Whole-cell lysates and small EVs obtained from control HT29 cells (sgControl) or ALKBH5 knockout HT29 cells (sgALKBH5) were subjected to western blot analysis using anti-ALKBH5, anti- β -actin, anti-CD9, and anti-CD63 antibodies. Representative images from three independent experiments are shown. (G) UHPLC-MS/MS results for sgControl and sgALKBH5 EVs. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; * P < 0.05. ELISA was conducted using conditioned medium from dTHP-1 cells treated with sgControl or sgALKBH5 HT29 small EVs. TNF- α (H) and IL-6 (I) concentration. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *** P < 0.001, **** P < 0.0001, ns: not significant. (J) HT29-derived EV-

RNA was reacted with recombinant ALKBH5 (rALKBH5), and m6A levels were measured. Heat-denatured rALKBH5 served as a negative control. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, ns: not significant. **(K)** HT29-derived EV-RNA was pretreated with or without rALKBH5 and introduced into dTHP-1 cells. TNF- α concentration was then measured via ELISA using conditioned medium from dTHP-1 cells. Heat-denatured rALKBH5 served as a negative control. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. ns: not significant.

第4節 Te-EVs -m6A レベルと臨床組織内炎症レベルの相関解析

ここまでの検討から、大腸癌 EVs-m6A の低下が腫瘍浸潤マクロファージに対して、NF- κ B を介した炎症応答を誘導することで腫瘍促進的に作用していることが明らかになった。そこで、これまでに見られた EVs-m6A レベルとマクロファージにおける炎症誘導の表現型の関係性が実際の患者検体を用いた検討でも見られるか検証することにした。まず、第 1 章第 1 節で測定した大腸癌 Te-EVs の半網羅的 RNA 修飾解析によって得られた各検体の m6A レベルと、第 2 章第 1 節で検討した大腸癌 Te-EVs を作用させたマクロファージによる炎症性サイトカイン産生量の相関関係を解析したところ、m6A レベルと TNF- α 及び IL-6 いずれとも負の相関が見られた(Figures 6A, B)。このことから、大腸癌 Te-EVs 中の m6A レベルが低いほどマクロファージに対して顕著な炎症応答を誘導していることが示唆された。

次に、Te-EVs の放出源となっている大腸癌患者腫瘍内での炎症状態との関連を検討するために、免疫組織染色 (IHC: Immunohistochemistry) を行った。その結果、再発ありの患者腫瘍内では、再発なし患者に比べ TNF- α 及び IL-6 の染色スコア(H-score)が顕著に増加していることが明らかになった(Figures 6C-F)。これは、大腸癌 Te-EVs m6A レベルが再発あり患者で顕著に低下していることと矛盾しない結果となった。また、ヒトマクロファージのマーカーである CD68 染色スコアは大きな変化が見られないことから、マクロファージ自体の浸潤数には影響なく、炎症応答の活性が重要であることが示唆された(Figures 6C, F)。

実際の患者腫瘍内での炎症プロファイルが、放出された Te-EVs 中の m6A レベルと相関が見られるかさらに解析を行った。腫瘍内の TNF- α 及び IL-6 の発現量は、放出された Te-EVs 中の m6A レベルと負の相関が見られることが明らかになった(Figures 6G, H)。つまり、Te-EVs m6A レベルが低下するほど腫瘍内での炎症応答が増強されていることが示唆された。

以上の結果より、大腸癌 Te-EVs m6A の減少は実際の患者腫瘍内においてもマクロファージに対して、NF- κ B を介した炎症応答を誘導している可能性が示唆された。

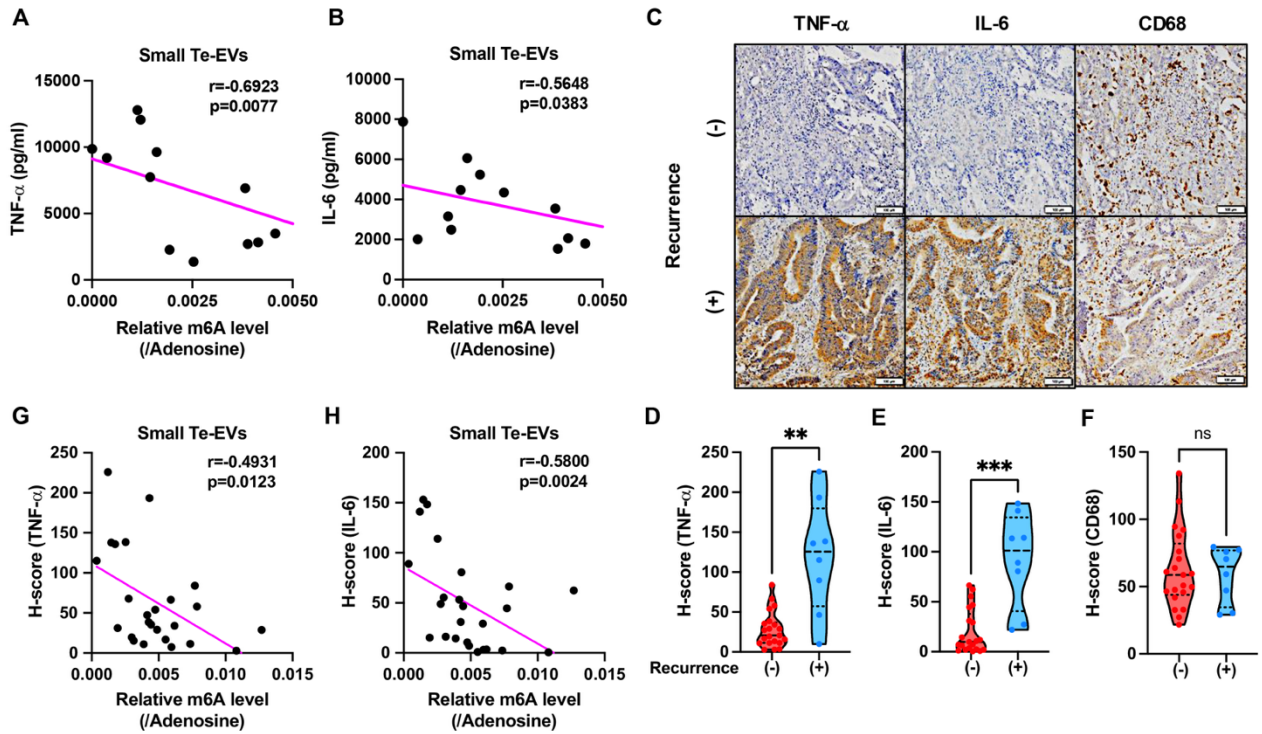


Fig. 6. Association of m6A levels in tumor Te-EVs with inflammatory status of clinical tumor tissues.

Correlation analysis of m6A levels in tumor small Te-EVs and the amount of TNF- α (A) or IL-6 (B) released from tumor small Te-EV-treated monocyte-derived macrophages (MDMs). Spearman's correlation coefficient r was calculated. (C) Immunohistochemical analysis of TNF- α , IL-6, and CD68 expression in colorectal cancer clinical tissue with or without recurrence. Representative images are shown (21 tumor tissues obtained from recurrence-free patients and eight tumor tissues from relapsed patients). Scale bar shows 100 μ m. H-score of TNF- α (D) IL-6 (E) and CD68 (F) expression. Mann-Whitney test; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: not significant. Correlation analysis of m6A levels in tumor small Te-EVs and the H-scores of TNF- α (G) or IL-6 (H) in corresponding colorectal cancer clinical tissues. Spearman's correlation coefficient (r) was calculated.

第3章 EVs-m6A はマクロファージの TLR8 を介して炎症応答を誘導する

大腸癌 EVs-m6A がマクロファージの NF- κ B 経路を介して炎症応答を誘導していることが明らかになったが、NF- κ B 経路を活性化させている機序は不明である。自然免疫において、NF- κ B 経路を下流にもつ RNA 認識受容体として Toll-like receptor (TLR) が考えられる。特に、TLR3, TLR7, TLR8 は RNA を認識するファミリーであり、RNA 修飾の頻度により自己と非自己を識別していることが知られている¹³。EVs 中のどのような配列が NF- κ B 経路の活性化に寄与するか不明なため、dsRNA を認識する TLR3 及びマクロファージにおける発現量が高く ssRNA を認識する TLR8 に注目し、検討を行った。CU-CPT-4a (TLR3 阻害剤)、CUCPT-9a (TLR8 阻害剤) を用いて、HT29 EVs と同時に dTHP-1 に作用させると、CU-CPT-4a では p65 リン酸化レベルの顕著な変化は見られなかった一方で、CU-CPT-9a 作用時に p65 リン酸化レベルの上昇が減弱した(Figure 7A)。また、この時の TNF- α 及び IL-6 の産生量も CU-CPT-9a 添加により顕著に減少していた(Figures 7B, C)。このことから、大腸癌 EVs は、マクロファージの TLR8 を介して炎症応答を誘導している可能性が示唆された。

次に、siRNA を用いてマクロファージの TLR3, TLR8 ノックダウン時においても同様の結果が得られるか検証することにした。siRNA を用いて、dTHP-1 の TLR3 及び TLR8 がノックダウンされていることをそれぞれ確認した(Figures 7D, E)。この時、TLR7 の発現に変化は見られないことからオフターゲット効果や TLR7 による代償的な発現上昇などは起きていないと考えられる。阻害剤を用いた検討と同様に、TLR8 ノックダウン時に HT29 EVs による p65 のリン酸化レベルの上昇が抑制されることが明らかになった(Figure 7F)。一方で、TLR3 ノックダウン時は p65 のリン酸化レベルの減少は見られなかった(Figure 7G)。この時、TNF- α 及び IL-6 産生量も TLR8 ノックダウン時のみ顕著な減少が見られた(Figures 7H, I)。さらに、この dTHP-1 細胞培養上清を用いて HT29 細胞の増殖能を評価したところ、HT29 EVs 添加 dTHP-1 上清によって見られる増殖能の亢進が TLR8 ノックダウン dTHP-1 上清ではキャンセルされた(Figure 7J)。

ここまでの結果から、大腸癌 EVs が TLR8 を介してマクロファージの NF- κ B を活性化し、炎症応答を誘導していることが明らかになった。そこで、この TLR8 を介した免疫応答が m6A の変化による炎症誘導能の変化を制御しているか検討することにした。リコンビナント ALKBH5 タンパク質 (rALKBH5) を反応させた HT29 EVs-RNA を TLR8 ノックダウン dTHP-1 に導入したところ、m6A レベルの低下によって見られていた炎症応答誘導の増強が、rALKBH5 未処理 RNA の TLR8 ノックダウンサンプルと同程度まで減弱された(Figures 7K, L)。

以上の結果から、大腸癌 EVs-m6A は、マクロファージにおける TLR8 を介して炎症応答を誘導し、癌細胞の増殖促進に寄与していることが明らかになった。

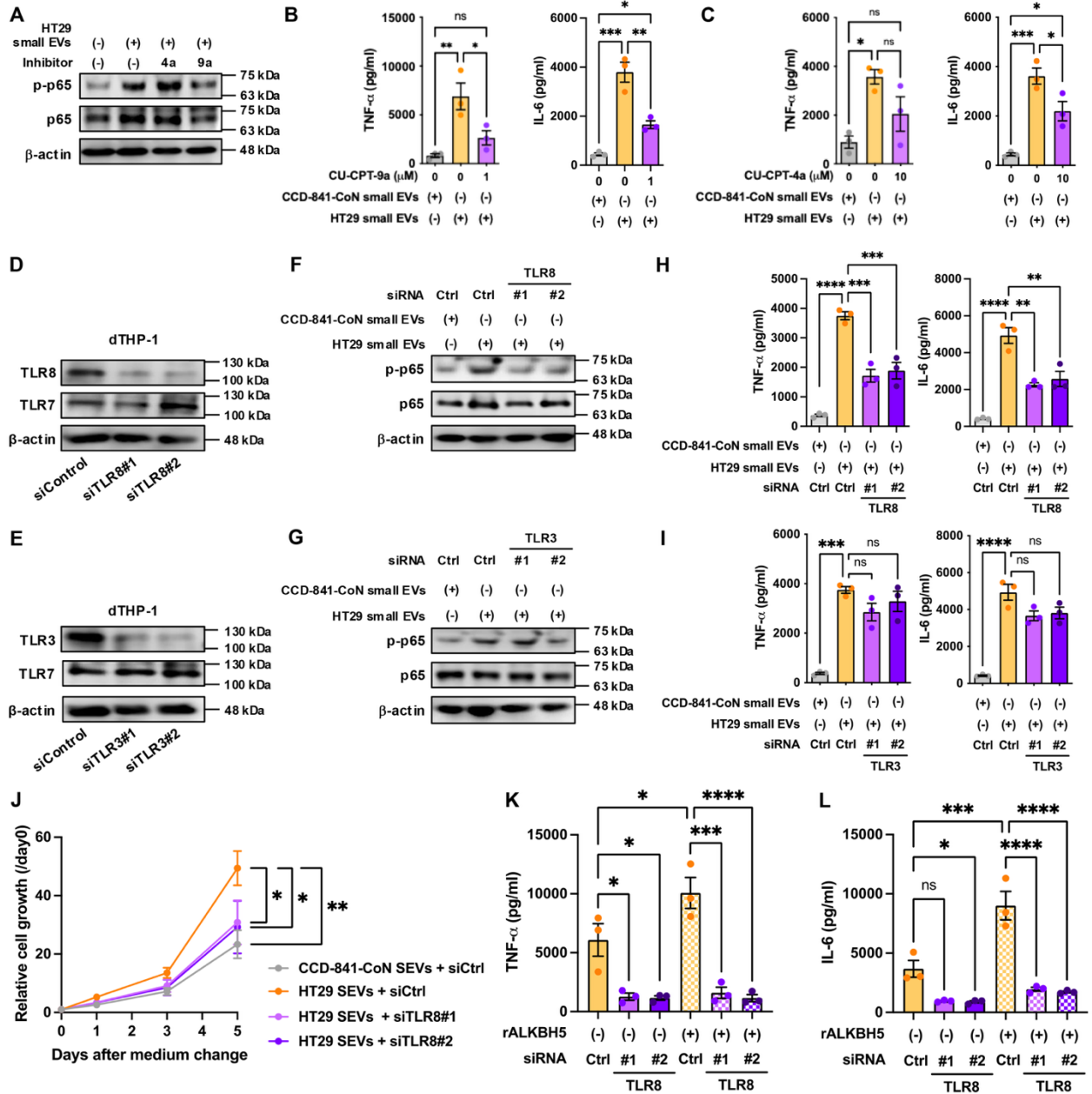


Fig. 7. m6A levels in EVs regulate inflammatory responses via TLR8 in macrophages.

Differentiated THP-1 cells (dTHP-1) were pretreated with or without CU-CPT-9a and CU-CPT-4a. **(A)** Whole-cell lysates obtained from dTHP-1 cells treated with HT29 small EVs were subjected to western blot analysis using anti-phospho p65 antibody, anti-p65 antibody, and anti-β-actin antibody. Representative images from three independent experiments are shown. Conditioned medium from dTHP-1 cells treated with CCD-841-CoN or HT29 small EVs was used for ELISA. TNF-α **(B, left, and C, left)**, and IL-6 **(B, right, and C, right)**. Values are presented as the mean ± SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. ns: not significant. Whole-cell lysates obtained from dTHP-1 cells transfected with TLR8 **(D)** or TLR3 **(E)** siRNAs were analyzed by western blotting using anti-TLR3, anti-TLR8, anti-TLR7 and anti-β-actin antibodies. Representative images from three independent experiments are shown. dTHP-1 cells were pre-transfected with or without TLR8 siRNA. **(F)** Whole-cell lysates obtained from dTHP-1 cells treated with CCD-841-CoN small EVs or HT29 small

EVs were subjected to western blot analysis using anti-phospho p65 antibody, anti-p65 antibody, and anti- β -actin antibody. Representative images from three independent experiments are shown. dTHP-1 cells were pre-transfected with or without TLR3 siRNA. **(G)** Whole-cell lysates obtained from dTHP-1 cells treated with CCD-841-CoN small EVs or HT29 small EVs were subjected to western blot analysis using anti-phospho p65 antibody, anti-p65 antibody, and anti- β -actin antibody. Representative images from three independent experiments are shown. Conditioned medium was used for the ELISA. TNF- α **(H, left, and I, left)** and IL-6 **(H, right, and I, right)**. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, ns: not significant. **(J)** HT29 cells were cultured in conditioned medium from dTHP-1 cells transfected with or without TLR8 siRNA and CCD-841-CoN small EVs or HT29 small EVs. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01. HT29-derived EVs-RNA were pretreated with or without rALKBH5 and introduced into dTHP-1 cells transfected with or without TLR8 siRNA. TNF- α **(K)** and IL-6 **(L)** concentrations were measured via ELISA using conditioned medium from dTHP-1 cells. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, ns: not significant.

第4章 5'-half-GlyGCC 上の m6A が炎症応答を介して腫瘍促進的に働く

第1節 大腸癌 Te-EVs -RNA 網羅的解析

ここまでの結果より、大腸癌 EVs-RNA の m6A レベルの減少がマクロファージの TLR8 を介して炎症応答を誘導し、腫瘍促進的に働くことが明らかになった。しかし、どのような RNA 配列において m6A レベルが減少し、炎症応答を誘導しているか明らかでない。そこで、正常大腸 Te-EVs-RNA (normal Te-EVs RNA) および 大腸癌 Te-EVs-RNA (tumor Te-EVs RNA) について、RNAseq を行い、大腸癌 Te-EVs で特徴的な配列の同定を試みた。Normal Te-EVs RNA と tumor Te-EVs RNA 間で顕著な搭載 RNA プロファイルの変化が捉えられた(Figure 8A)。搭載されている RNA 種について、その割合を比較したところ、normal Te-EVs RNA にくらべ、tumor Te-EVs RNA で tRNA の内包割合が顕著に増加していることが明らかとなった(Figures 8B, C)。さらに、Te-EVs 中で検出された tRNA 配列情報を解析したところ、mature tRNA の全長配列はほとんど存在せず、基本的に断片化された tRNA fragment (tRF) として存在しており、中でも 5'-half-tRNA fragment (5'-half) が最も多い割合を占めていた(Figure 8B)。次に、この 5'-half 配列をコードするアンチコドンごとに分類したところ、Gly-GCC をコードする 5'-half-GlyGCC のリード数が tumor Te-EVs で顕著に増加していることが明らかとなった(Figures 8B, D)。一方で、normal Te-EVs で存在割合の多かった 5'-half-GluTTC, 5'-half-GluCTC, 5'-half-GlyCCC は、顕著な検出数の違いは見られなかった(Figure 8E)。以上の結果より、大腸癌 Te-EVs 特徴的な RNA 配列として 5'-half-GlyGCC に焦点を当てて以降の検討を行うことにした。

大腸癌 Te-EVs に内包される 5'-half-GlyGCC が炎症誘導に寄与しているか検証するために、Te-EVs 中での存在量がマクロファージの炎症応答誘導能と相関が見られるか検討した。Te-EVs 中の 5'-half-GlyGCC 量を qPCR で定量したところ、Te-EVs のマクロファージへの炎症応答誘導能と顕著な正の相関が見られることが明らかとなった(Figures 8F, G)。さらに、Te-EVs-m6A レベルとの相関も解析したところ、顕著な負の相関があることが明らかとなった(Figure 8H)。このことから、大腸癌 Te-EVs 中 5'-half-GlyGCC は存在量が多いほど全体としての m6A レベルは低く、炎症応答を誘導しやすいことが示唆された。

ここで、Te-EVs 中の 5'-half-GlyGCC が実際に m6A 修飾を受けているか、また、受けていた場合、その修飾レベルは大腸癌 Te-EVs で低下しているか検討することにした。5'-half-GlyGCC 特異的に結合できるアンチセンスオリゴを用いて、Te-EVs-RNA より 5'-half-GlyGCC を精製した後に質量分析により RNA 修飾レベルを解析した(Figure 8I)。5'-half-GlyGCC 上でも m6A 修飾体の存在を確認することができただけでなく、tumor Te-EVs 中 5'-half-GlyGCC の m6A レベルが顕著に減少していることが明らかとなった(Figure 8J)。

以上の結果から、マクロファージの TLR8 を介した炎症応答を誘導する RNA 配列候補として、5'-half-GlyGCC を同定し、かつこの配列上の m6A レベルが減少している Te-EVs では炎症応答を誘導しやすいことが明らかとなった。

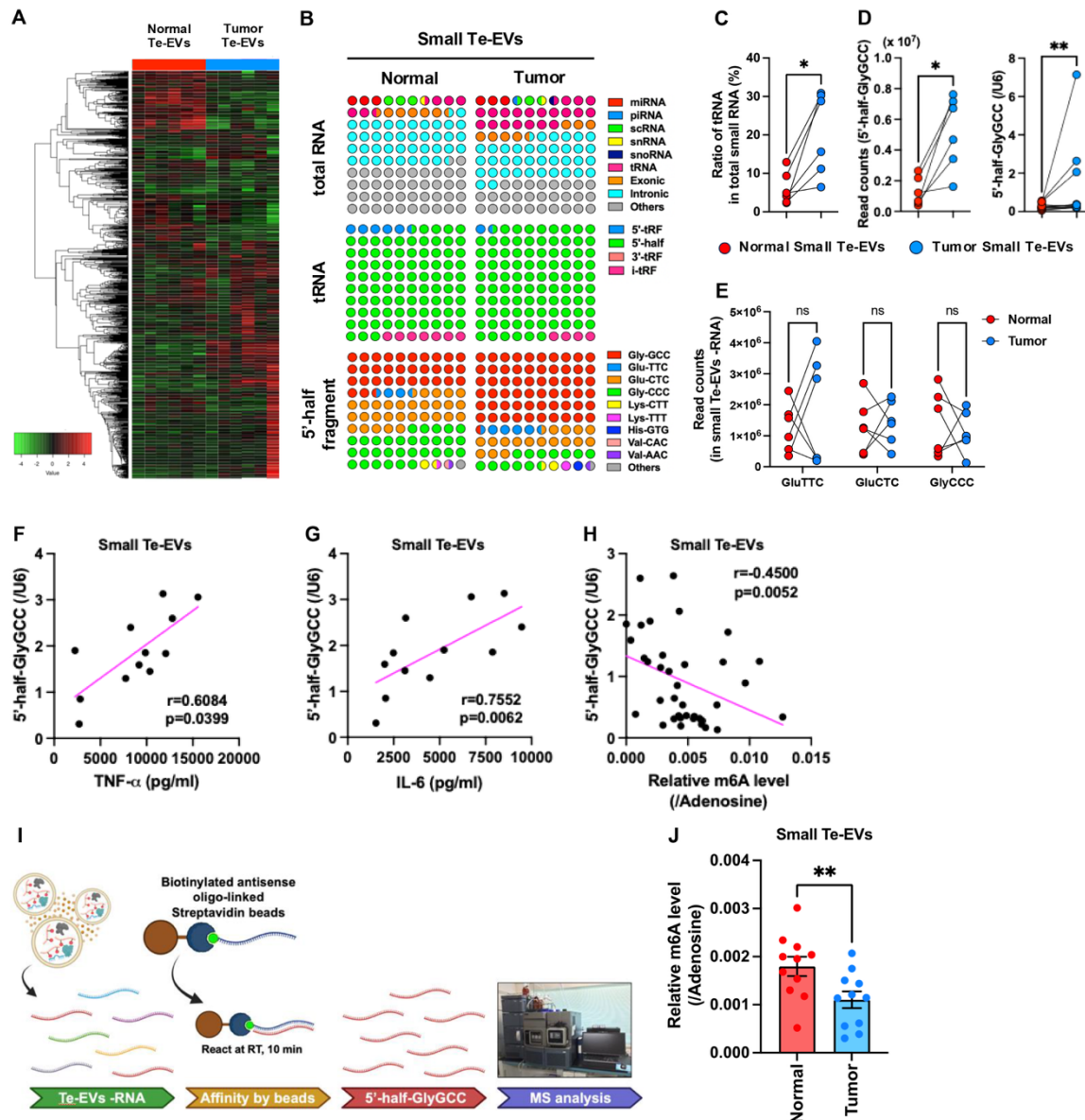


Fig. 8. 5'-half-GlyGCC is enriched in both small and large tumor Te-EVs with reduced m6A levels.

(A) Heatmap of small RNA-seq data obtained from normal (n = 6) and tumor (n = 6) small Te-EVs. (B) Percentage dot plot of each RNA species, tRNA fragment species, and tRF-encoded amino acid species in Te-EVs from small RNA-seq data. (C) Ratio of tRNA in normal (n = 6) and tumor (n = 6) small Te-EVs from small RNA-seq data. Read counts of 5'-half-GlyGCC in normal (n = 6) and tumor (n = 6) small Te-EVs (D, left). Quantitative PCR results for 5'-half-GlyGCC (D, right, n = 11). (E) Read counts of 5'-half-Glu-TTC, 5'-half-Glu-CTC, and 5'-half-GlyCCC in normal (n = 6) and tumor (n = 6) small Te-EVs. Correlation analysis of 5'-half-GlyGCC levels in small Te-EVs and the amount of TNF-α (F) or IL-6 (G) released from small Te-EV-treated monocyte-derived macrophage (MDMs). Spearman's correlation coefficient (r) was calculated. (H) Correlation analysis of m6A and 5'-half-GlyGCC levels in small Te-EVs. Spearman's correlation coefficient (r) was calculated. (I) Experimental scheme for Te-EVs: RNA isolation, pull-down of 5'-half-GlyGCC, and subsequent RNA modification analysis. (J) m6A levels of 5'-half-GlyGCC obtained from normal and tumor-derived EV-RNA. Values are presented as the mean ± SEM for each group. Wilcoxon signed-rank test; **P < 0.01 (n = 11).

第2節 5'-half-GlyGCC による腫瘍形成能及び炎症誘導能の評価

次に、5'-half-GlyGCC が実際に炎症応答を誘導し、腫瘍促進的に働くか検証した。*In vitro* 転写系を用いて修飾を受けていない 5'-half-GlyGCC を調製し、検証に用いた。炎症誘導能を検証するために、dTHP-1 細胞に *in vitro* 転写産物 (5'-half-GlyGCC) を導入したところ、TNF- α および IL-6 の産生量が顕著に増加した (Figures 9A, B)。また、TLR8 ノックダウン dTHP-1 ではこの作用がキャンセルされた (Figures 9A, B)。一方で、Te-EVs 中で含有量が多かった 5'-half-GluTTC, 5'-half-GluCTC, 5'-half-GlyCCC の転写産物も同様に dTHP-1 に導入したが、顕著な炎症誘導は見られなかった (Figure 9C)。このことから、5'-half-GlyGCC 特徴的にマクロファージの TLR8 を介した炎症応答を誘導するポテンシャルを有していることが明らかとなった。さらに、この時の培養上清を用いて HT29 細胞の増殖能を評価したところ、5'-half-GlyGCC 導入 dTHP-1 上清で顕著な増殖亢進と、TLR8 ノックダウンによるキャンセルが確認された (Figure 9D)。

ここまでの検討で見られた 5'-half-GlyGCC による炎症応答誘導が *in vivo* でも見られるか検証するために、5'-half-GlyGCC を colon26 EVs に導入した GlyGCC(+) EVs および未導入の control EVs を調製した (Figures 9E, F)。GlyGCC(+) EVs を RAW264.7 細胞に添加したところ、TNF- α および IL-6 の顕著な産生増加が確認できた (Figures 9G, H)。調製した EVs を colon26 皮下移植マウスに投与したところ、PBS 投与群に比べ、control EVs 投与群で腫瘍の増大が見られたが、GlyGCC(+) EVs 投与群はそれを大きく上回る腫瘍形成能の亢進が見られた (Figures 9I, J)。

ここで見られた GlyGCC(+) EVs による腫瘍促進作用がマクロファージを介した作用であるか検証するために、クロドロン酸リボソームを用いてマクロファージを枯渇させたマウスモデルで同様の検討を行った。その結果、これまで見られていた GlyGCC(+) EVs による腫瘍促進作用がキャンセルされた (Figures 9K, L)。これらの結果より、5'-half-GlyGCC は生体内においてマクロファージを介して腫瘍促進的に作用することが明らかとなった。次に、この時の腫瘍内における炎症状態を確認することにした。GlyGCC(+) EVs 投与群により TNF- α および IL-6 の顕著な染色スコア (H-score) 増加が見られる一方で、クロドロン酸投与群ではこれらの作用がキャンセルされることが明らかとなった (Figures 9M-O)。また、このときマクロファージマーカーである F4/80 の染色スコアに顕著な変化は見られなかったことから、マクロファージの活性に寄与している可能性が示唆された (Figures 9M, P)。

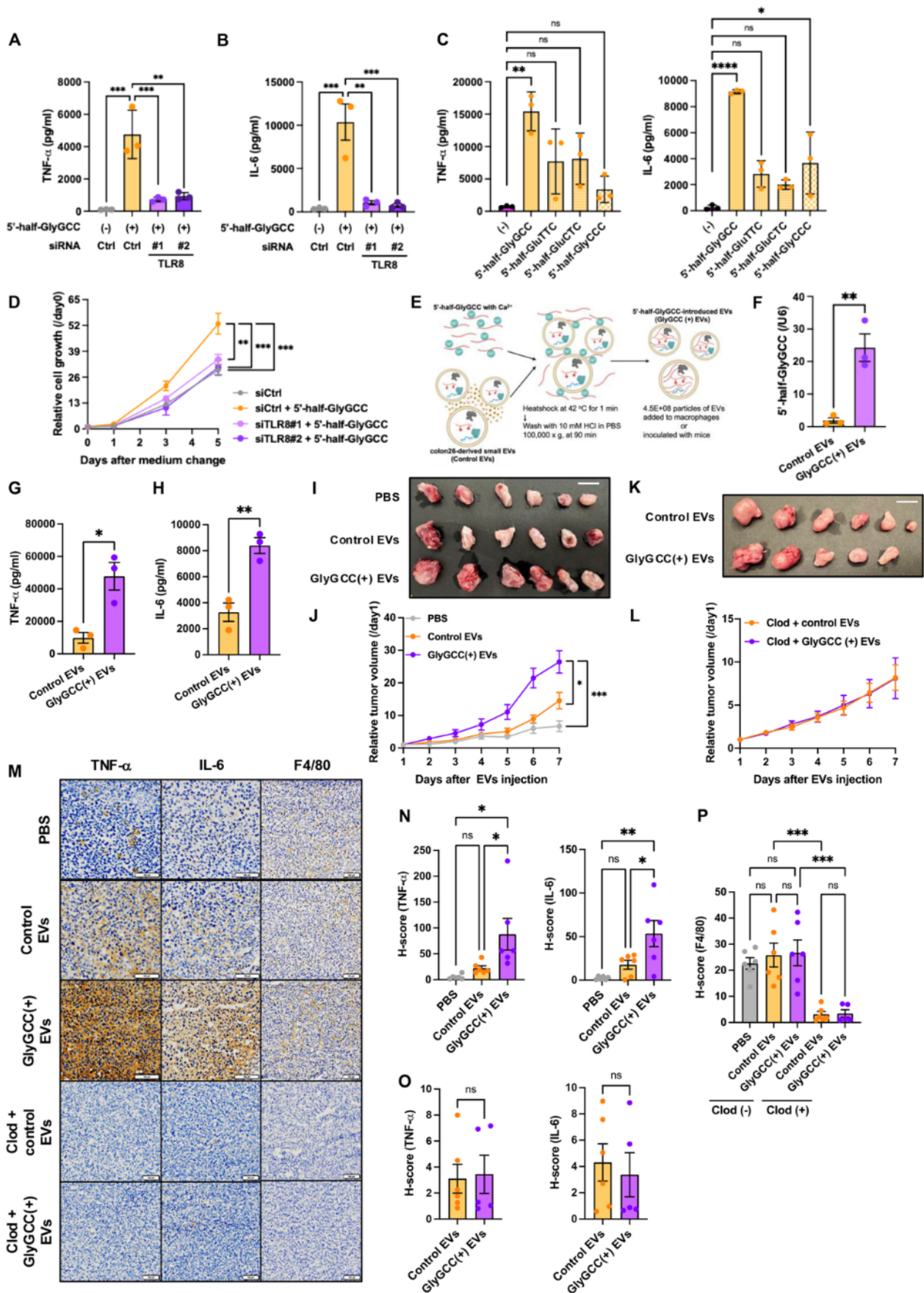


Fig. 9. 5'-half-GlyGCC in tumor EVs promotes tumor growth *in vivo*.

Differentiated THP-1 cells (dTHP-1) were pre-transfected with or without TLR8 siRNA and 5'-half-GlyGCC. Conditioned medium from dTHP-1 cells was used for the ELISA. TNF- α (A) and IL-6 (B). Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; **P < 0.01, ***P < 0.001. dTHP-1 were transfected with 5'-half-GlyGCC, 5'-half-GluTTC, 5'-half-GluCTC, or 5'-half-GlyCCC. Conditioned medium from dTHP-1 cells was used for ELISA. TNF- α (C, left) and IL-6 (C, right). Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001, ns: not significant. (D) HT29 cells were cultured in conditioned medium from dTHP-1 cells transfected with or without TLR8 siRNA and 5'-half-GlyGCC. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; **P < 0.01, ***P < 0.001. (E) Experimental scheme for the introduction of 5'-half-GlyGCC into colon26 small EVs and subsequent analysis. (F) Results of quantitative PCR of 5'-half-GlyGCC-loaded colon26 small EVs (GlyGCC(+) EVs). Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; **P < 0.01. ELISA was conducted using conditioned medium from RAW264.7 cells treated with GlyGCC(+) EVs. TNF- α (G) and IL-6 (H) concentration. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; *P < 0.05, **P < 0.01. Colon26 cells were injected into BALB/c mice. PBS, Control EVs or GlyGCC(+) EVs were injected i.p. Representative xenograft tumor images (I) are shown. White scale bar, 1 cm. Tumor size was measured and calculated daily (J). Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, ***P < 0.001. Colon26 cells were injected into BALB/c mice. PBS, Control EVs or GlyGCC(+) EVs and clodronate liposomes were injected i.p. Representative xenograft tumor images (K) are shown. White scale bar, 1 cm. Tumor size was measured and calculated every day (L). Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; ns: not significant. (M) Immunohistochemical analysis of TNF- α , IL-6, and F4/80 expression in tumor tissues of mice inoculated with small EVs obtained from GlyGCC(+) EVs and clodronate liposomes. Scale bar: 100 μ m. Representative images of six (PBS, Control EVs, GlyGCC(+) EVs, and Control EVs with clodronate liposomes) or five (GlyGCC(+) EVs with clodronate liposomes) independent experiments are shown. H-scores of TNF- α (N, left) and IL-6 (N, right) expression in GlyGCC(+) EV injection experiments. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. One-way ANOVA post hoc Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01, ns: not significant. H-score of TNF- α (O, left) and IL-6 (O, right) expression in GlyGCC(+) EVs combined with clodronate liposome injection. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; ns: not significant. (P) H-score of F4/80 expression in GlyGCC(+) EVs, with or without clodronate liposome injection. Values are presented as the mean $\pm$ SEM for each group. Unpaired t-test; ns: not significant.

考察

本研究により、癌細胞が本来はウイルスや細菌感染から宿主を防御するための機構を、EV 中の RNA 修飾体を介して巧妙に利用し、腫瘍に有利な環境形成へと誘導していることを明らかにした。本機構の中心的因子である EV-RNA 修飾体について、本研究では EV 内に 22 種類の RNA 修飾体を検出することに成功し、その多くが大腸癌由来 Te-EVs において顕著に減少していた。本研究では、予後との関連性から m6A に着目して詳細に検討を進めてきたが、減少していたその他の修飾体のうち N7-methylguanosine (m7G)、N1-methyladenosine (m1A)、pseudouridine (Ψ) などは、TLR シグナルの応答性を制御することが報告されている^{2,13}。したがって、EV 中でこれらの修飾体が減少することによっても、免疫応答が誘導される可能性が示唆される。今後は、m6A 以外の修飾体についても、今回明らかとなった炎症応答を含めた免疫応答への寄与を体系的に検証することが重要である。さらに、今回検出された 22 種の RNA 修飾体のうち 14 種で様な修飾レベルの低下が認められたが、これらの修飾体が EV 内でどのように選択的に制御され、搭載されているのかといった分子機構は、現時点では明らかになっていない。先行研究では、低酸素環境が卵巣癌組織内の RNA 修飾プロファイルを制御することが報告されている⁷。この知見を踏まえると、EV に含まれる RNA 修飾体のプロファイルについても、腫瘍微小環境に存在する特定の要因によって制御を受けている可能性が考えられる。

本研究では、炎症応答を誘導する配列として大腸癌 EVs に濃縮される 5'-half-GlyGCC を同定した。先行研究では、大腸癌細胞株と THP-1 細胞を共培養することで、THP-1 細胞内における 5'-half-GlyGCC の蓄積が増加することが報告されている²²。また、大腸癌細胞において ALKBH3 が高発現しており、5'-half-GlyGCC の産生に寄与することも示されている²³。さらに、健常人と比較して大腸癌患者の血中 5'-half-GlyGCC 濃度が高いことが報告されており²²、本研究で見出した大腸癌 EVs における 5'-half-GlyGCC の濃縮を支持するとともに、その変動が全身レベルに反映されている可能性を示唆する。種々の癌において、EVs が遠隔転移先の組織で前転移ニッチ形成に寄与することが知られている^{24,25}。これらの知見を踏まえると、5'-half-GlyGCC を搭載した大腸癌 EVs も血中へ放出され、遠隔転移部位で炎症応答を誘導することで前転移ニッチ形成に関与する可能性が考えられる。

他方で、5'-half-GlyGCC が EVs にどのようにして搭載されるかは不明である。これまでに、miRNA を始めとした RNA は EVs への搭載に必要な配列である EXO-motif の存在が報告されている²⁶。5'-half-GlyGCC 上にも EXO-motif の一つである GGUG モチーフが存在しており、EVs への搭載に寄与している可能性がある。一方で、EVs に搭載される tRF 配列の多くは tRNA の 5' 末端を含む 5'-tRF や 5'-half であることが明らかになったことから、EXO-motif 以外にも、5' 末端の特徴的構造により EVs への搭載が選択される機構、あるいは 3' 末端配列を持つ RNA が EVs に搭載されず代謝される機構が存在する可能性も示唆される。

本研究では、m6A 制御のツールとして Alkbh5 のノックアウトやリコンビナントタンパク質を用いた検討を行ったが、乳癌細胞において 5'-half-GlyGCC は m6A の異なる脱修飾酵素である FTO と結合し、FTO の脱修飾酵素活性を上昇させることが報告されている²⁷。この知見は、EV 中で 5'-half-GlyGCC 上の m6A レベルが低下している結果を支持するものである。また、m6A 修飾酵素である METTL14 は正常大腸組織に比べ大腸癌組織で顕著に低下し、予後不良に寄与していることも報告されている²⁸。これらの報告は、大腸癌において 5'-half-GlyGCC 上の m6A レベルの低下が、腫瘍進展に寄与している

可能性を示唆するものである。

これまでの報告から、癌組織において TNF- α および IL-6 が顕著に高発現している大腸癌患者は、無病生存期間 (DFS: disease-free survival) が有意に短いことが示されている^{29,30}。また、血中 IL-6 濃度が上昇している患者でも DFS が短くなることが報告されている^{31,32}。さらに、IL-6 は大腸癌細胞において 転写調節因子 FRA1 (Fos-related antigen 1) を介して癌幹細胞性の獲得に寄与することも明らかにされている³³。大腸癌における Treg 細胞の浸潤数は DFS と相関しており³⁴、TNF- α 高発現組織では CCR8 のリガンドである CCL18 陽性マクロファージの浸潤が増加し、CCR8 陽性 Treg 細胞の浸潤を促進していることも報告されている³⁵。これらの知見から、大腸癌組織における IL-6 および TNF- α の高発現は癌進展に重要な役割を果たすことが示唆される。今回の検討では、腫瘍浸潤マクロファージの数には顕著な差は見られなかったが、再発患者群において TNF- α および IL-6 の高発現が顕著であった。また、大腸癌 Te-EVs の m6A レベルは、組織における TNF- α および IL-6 発現と負の相関を示していた。これらの結果は、大腸癌 EVs がマクロファージの浸潤数には影響を与えない一方で、TNF- α および IL-6 の産生促進作用を介して再発や予後不良に寄与している可能性を示唆する。

以上より、大腸癌 EVs の m6A レベルの低下は、腫瘍浸潤マクロファージの TNF- α および IL-6 産生を誘導し、大腸癌の再発に寄与していることが明らかとなった。

エフェクター配列として、5'-half-GlyGCC を同定しているが、既報として tRNA Val half がマクロファージの TLR7 を活性化し、TNF- α などの炎症性サイトカイン産生を促進することが報告されている³⁶。今回の検討では、tRNA Val half は 5'-half-GlyGCC に比べ大腸癌 Te-EVs では内包量は非常に少なく、5'-half-GlyGCC が TLR8 依存的に炎症応答を誘導することを明らかにしている。また、Te-EVs に内包されている割合が高い配列に関しても TLR8 を介した炎症応答の誘導を検証しているが、それ以外のマイナーな配列に関しても炎症応答の誘導能を有する可能性がある。また、今回の検討では TLR3 阻害剤 CU-CPT-4a 及び TLR3 siRNA を用いた検討より、TLR3 による炎症応答への寄与はほとんどなかった。一方で、5'-half-GlyGCC はダイマーを形成することが知られており³⁷、他の tRF 配列でも同様にダイマーを形成する場合、dsRNA を認識する TLR3 に対する炎症応答を誘導する可能性が考えられる。

免疫応答に代表される RNA を認識するパターン認識受容体は、TLRs 以外にも RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I)、MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5)、PKR (protein kinase R) などが存在する^{38,39}。これらの受容体も RNA 修飾体特に、m6A や Ψ による自己と非自己を区別する機能が報告されている⁴⁰⁻⁴²。ただ、RIG-I は 5'-ppp を持つ ssRNA あるいは short dsRNA を認識し、MDA5 は長鎖 dsRNA を、PKR も dsRNA を認識することから、今回同定した 5'-half-GlyGCC による応答への寄与は少ないと考えられる。

TLR7 と TLR8 はいずれも 一本鎖 RNA (ssRNA) を認識する TLR ファミリーであるが、本研究では大腸癌 EVs による TLR8 依存的な表現型が観察された。ヒトでは、TLR7 は主に pDC (plasmacytoid dendritic cell) に多く発現し、TLR8 は マクロファージ に多く発現している^{43,44}。認識する配列パターンに関しても、TLR7 が強く認識する UU モチーフは 5'-half-GlyGCC 上には比較的少なく、一方で TLR8 が認識しやすい AU および GU モチーフが多く含まれることから、5'-half-GlyGCC は TLR8 に優先的に結合すると考えられる。また、ヒトにおいて TLR7 は pDC での I 型 IFN 応答を強く誘導する一方、NF- κ B 経路の活性化は主に TLR8 下流で観察される^{38,44}。今回の検討では NF- κ B 経路の顕

著な活性化が確認されており、これらを総合すると、5'-half-GlyGCC はヒトにおいて TLR8 に対してより顕著な作用を示すと考えられる。一方、マウスにおいては TLR8 の活性はほとんど見られないことが報告されている⁴⁵。マウスマクロファージでは、TLR7 の発現が確認されており、NF- κ B 経路を介した炎症応答を誘導する受容体として機能しており⁴⁶、ヒト TLR8 に認識されやすい GU-rich モチーフはマウスにおいては TLR7 依存的に応答することが知られている⁴⁷。今回の検討では、マウスマクロファージにおいても 5'-half-GlyGCC による炎症応答誘導が観察されたが、これはマウス TLR8 への応答だけでなく、TLR7 を介し代替的な炎症応答の可能性も示唆される。

本研究ではこれまで T 細胞に注目したがん免疫療法が開発されてきたが、本研究では自然免疫細胞であるマクロファージの炎症応答制御を標的とした新たな癌免疫療法のコンセプトを打ち出す一端を担っていると考える。また、本研究は EVs 中における RNA 修飾体を同定するだけでなく、EVs-m6A 修飾の大腸癌における病的意義を明らかにし、EV を対象とした研究において新たな研究領域を開拓する重要な知見を見出した。また、大腸癌特徴的 RNA 修飾体が付加されている 5'-half-GlyGCC はアンチセンス核酸による阻害効果が期待され、EVs 中の核酸を標的にした新たな治療法の開発につながる可能性がある。

結論

- UHPLC-MS/MS により EVs-RNA 修飾体 22 種を同時に検出することに成功した。大腸癌 Te-EVs で 14 種の修飾体が顕著に減少しており、再発との相関が見られる特徴的修飾体として m6A を同定した。
- EVs-m6A レベルの減少は、*in vivo* において大腸癌腫瘍の進展を促進した。
- 大腸癌 Te-EVs は、マクロファージの NF- κ B 経路を活性し炎症性サイトカイン産生を誘導する。大腸癌 EVs-RNA の m6A レベルの減少がマクロファージに対して、炎症応答を誘導した。
- 患者大腸癌組織において、再発患者の炎症性サイトカイン発現が顕著に亢進しており、Te-EVs 中 m6A レベルと相関が見られた。
- 大腸癌 EVs-RNA m6A レベルの減少によるマクロファージの炎症応答は、TLR8 依存的に誘導されており、炎症性サイトカイン産生量の増加によって大腸癌細胞の増殖能を亢進していた。
- RNA-seq によって、大腸癌 Te-EVs で m6A レベルの低下により TLR8 に作用し炎症誘導を行う分子の候補として、5'-half-GlyGCC を同定した。
- 5'-half-GlyGCC を搭載した EVs は、マクロファージ依存的にマウス大腸癌組織における炎症性サイトカイン産生量を亢進させることで腫瘍成長を促進した。

実験材料と方法

1. 臨床検体

大阪医科薬科大学附属病院で大腸癌切除術を受けた患者から、76 例の癌組織および正常大腸組織を採取した。各患者から書面によるインフォームドコンセントを取得し、本研究は大阪医科薬科大学病院倫理審査委員会 (2305 および 2808)、ならびに大阪大学大学院薬学研究科 (Yakuhito30-17-3) の承認を得て、ヘルシンキ宣言に準拠して実施した。検体の臨床的および組織病理学的背景は下記に示すとおりである。

<i>Stage</i>		<i>Lymph node metastasis</i>	
Normal	76	(-)	38
I	6	(+)	38
II	29	<i>Metastasis</i>	
III	27	(-)	64
IV	13	(+)	12
unknown	1	<i>Recurrence</i>	
<i>Lymphatic invasion</i>		(-)	44
(-)	24	(+)	17
(+)	52	unknown	15
<i>Vascular invasion</i>			
(-)	22		
(+)	54		

2. 細胞培養

Precision for Medicine (Bethesda, MD, USA) より入手したヒト末梢血単核球 (PBMCs) およびヒト末梢血 CD14⁺ 単球を、10% ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Thermo Fisher Scientific)、1 × NCAA (Thermo Fisher Scientific)、2 mM L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific)、0.1 mg/mL カナマイシン (Wako)、100 U/mL ペニシリン G (Wako)、0.1 mg/mL ストレプトマイシン (Wako) を添加した RPMI-1640 培地 (Wako) で培養した。

ヒト大腸癌細胞株 HT29、正常結腸細胞株 CCD-841-CoN、ヒト単球細胞株 THP-1 は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より入手した。マウス大腸癌細胞株 colon26 は、JCRB 細胞バンクより入手した。これらの細胞は、10% FBS (Thermo Fisher Scientific) および 0.1 mg/mL カナマイシンを添加した RPMI-1640 培地 (Wako) で培養した。ヒト大腸癌細胞株 SW620 (ATCC) およびマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 (ATCC) は、10% FBS (Thermo Fisher Scientific) および 0.1 mg/mL カナマイシン (Wako) を添加した DMEM (Wako) で培養した。

3. ヒト単球由来マクロファージの調製

ヒト末梢血 CD14⁺ 単球を、ヒト GM-CSF (Wako) 20 ng/mL を添加した培地で 48 時間培養し、マクロファージへ分化させた。THP-1 細胞は、50 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Wako, CAS No. 16561-29-8) を添加した培地で 24 時間培養し、マクロファージ様細胞 (dTHP-1 細胞) に分化さ

せた。その後、PMA を含まない培地に交換し 24 時間培養して使用した。

4. Alkbh5 ノックアウト細胞の樹立

5' -CACCGCTCAAGTCCATGACGTCCC-3' および 5' -CACCGAAGAAGTACTTGTTCGCGCAG-3' を標的とする 2 つの gRNA を px330-U6-Chimeric_BB_CBh-hSpCas9 ベクター (Addgene, Watertown, MA, USA) に挿入し、Alkbh5 ノックアウト細胞の樹立に使用した。HT29 細胞および Colon26 細胞 (8×10^4 細胞) を 12 well プレートに播種し、24 時間後、培地を Opti-MEM (Wako) に交換した。次に、gRNA を挿入した Cas9 ベクター 500 ng と、ピューロマイシン耐性遺伝子を挿入した pGL4.84 ベクター (Addgene) 500 ng を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 3 μ L と混合し、細胞に co-transfection した。トランスフェクション 24 時間後、培地をピューロマイシン (1 μ g/mL) 添加 RPMI 培地に交換し、セレクションを行った。ピューロマイシンによるセレクション後、生存細胞を限界希釈法でシングルセルクローン化した。クローンは抗 Alkbh5 抗体 (1:2000、Proteintech) を用いたウェスタンブロッティングでスクリーニングし、m6A レベルをコントロール細胞 (sgControl) と比較した。

5. 動物実験

マウス大腸癌アログラフトモデルを樹立するために、BALB/c マウス (♂, 6-7 w) を清水実験材料より購入した。動物は 22°C~24°C、12 時間明暗サイクル下で飼育した。マウスに 1×10^6 cells の Colon26 細胞を皮下移植した。移植後、6 日後から Days 1~6 の間に、PBS または EVs (4.5×10^8 particles/100 μ L PBS) を毎日、腹腔内投与した。マクロファージ枯渇マウスモデルでは、EVs 投与 2 日前にクロドロン酸リポソーム (HYGIEIA BIOSCIENCE) を腹腔内投与した。その後、Day 1~6 の間に、PBS または EVs (4.5×10^8 particles) を腹腔内投与した。腫瘍体積は、(腫瘍の長径) $\times$ (腫瘍の短径²) / 2 として計算した。エンドポイントにて腫瘍を摘出し、凍結組織を作成後、免疫組織化学を行った。すべての動物実験は、大阪大学大学院薬学研究科動物実験委員会 (動物実験承認番号 R03-14) の承認を得て実施した。

6. EVs の精製・回収

術後組織検体 (約 100 mg) を、FBS 不含 DMEM (Wako) 5 mL に直ちに浸漬し、37°C、2 時間培養した。組織培養上清は $2,000 \times g$ で 30 分間遠心分離し、細胞デブリを除去した後、再度 $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離した。さらに、上清を $100,000 \times g$ で 90 分間超遠心 (Optima L-90K; SW55 ローター; Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA) にかけた。ペレットを PBS で $100,000 \times g$ 、90 分間洗浄し、ペレットを 1 mL の PBS で懸濁し small Te-EVs として回収した。

細胞培養上清から EVs を回収するため、HT29、SW620、CCD-841-CoN および colon26 細胞を、EVs フリー FBS (Thermo Fisher Scientific) 10% 添加 RPMI-1640 培地 8 mL/dish、10cm dish 5 枚分に播種し、96 時間培養した。培養上清を $2,000 \times g$ で 30 分間遠心分離し細胞デブリを除去した後、回収した上清を $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離した。上清をさらに、超遠心分離 (Optima L-90K; SW28 ローター; Beckman Coulter) を $100,000 \times g$ で 90 分間行った。ペレットを PBS で $100,000 \times g$ 、90 分間洗浄し、1 mL の PBS で懸濁し、small EVs として回収した。

HT29 および SW620 細胞培養上清から回収した EVs の精製は、qEV35 original column (Izon

Science Ltd., Christchurch, UK) を用いて製品プロトコールに従って行った。

EVs のサイズおよび濃度は、NP150 ナノポアを用いて qNano Gold (Izon Science Ltd., Christchurch, UK) により測定した。全ての EVs サンプルおよびキャリブレーション粒子 (Izon Science Ltd.) は、47.0 mm の伸長、0.5 kPa、0.5~0.8 V の電圧条件で測定した。データ解析には Izon Control Suite Software (V3.3.2.2001) を用いた。

2.7 透過型電子顕微鏡 (TEM)

TEM は Cecilia ら⁴⁸による既報の方法に従って実施した。簡潔に述べると、EVs サンプル (1 µg) を formvar carbon-coated nickel grid 上に 1 時間載置し、2% パラホルムアルデヒドで固定した後、透過型電子顕微鏡 (HT7800; hitachi) で観察した。

8. ウェスタンブロッティング

細胞および EVs は、2-メルカプトエタノール添加または非添加の Laemmli 用 SDS サンプルバッファを用いて溶解した。タンパク質サンプル (細胞溶解液 10 µg および EV 溶解液 3 µg) を熱変性させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いて 10~12% ゲルで分離した後、BioRad セミドライ転写システム (1 時間、12 V、BioRad, Hercules, CA, USA) により、PVDF へ転写した。メンブレンは 3% BSA/TBS に 0.1% Tween 20 (TBS-T) を加えた溶液で 1 時間ブロッキングした後、以下の一次抗体で反応させた： rabbit anti-mouse Alkbh5 pAb (1:2,000, Protein Tech)、mouse anti-β-actin mAb (1:1,000, clone: 6D1, wako)、rabbit anti-human phospho-p65 (Ser536) (1:500, clone: 93H1, Cell Signalling Technology)、rabbit anti-human p65 (1:1000, clone: D14E12, CST)、mouse anti-human TLR3 (1:500, clone: TLR3.7, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、mouse anti-human TLR8 (1:500, clone: D-8, Santa Cruz)、mouse anti-human CD9 (1:1,000, clone: 12A12, COSMO BIO)、mouse anti-human CD63 (1:1,000, clone: 8A12, COSMO BIO)、rat anti-mouse CD9 (1:1,000, clone: MZ3, BioLegend)、anti-mouse CD63 (1:1,000, clone: NVG-2, BioLegend) を用いた。その後、メンブレンを、horseradish peroxidase (HRP) 標識 horse anti-mouse IgG 二次抗体 (1:5,000、CST)、HRP 標識 goat anti-rabbit IgG 二次抗体 (1:5,000、CST)、および HRP 標識 goat anti-rat IgG 二次抗体 (1:5,000、CST) とともにインキュベートし、その後、enhanced chemiluminescence (ECL) ウェスタンブロッティング検出試薬 (GE Healthcare) を用いて検出を行った。撮影は、Amersham Imager 680 (GE Healthcare) を用いて行った。

9. EVs および細胞からの RNA 抽出

EVs、細胞、組織由来 RNA は、miRNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて製品プロトコールに従い、抽出した。RNA は、small EVs (5×10^8 particles)、細胞 (1×10^6 cells)、組織 (10 mg) から抽出した。細胞、正常大腸組織 8 検体、大腸癌組織 24 検体から抽出した RNA 濃度は、NanoDrop 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。65 検体の small Te-EVs から分離した EVs-RNA の濃度およびサイズ分布は、Bioanalyzer (Agilent) を用いて解析した。

10. タンパク質の定量

31 検体の small Te-EVs から抽出したタンパク質を 10 倍に希釈し、Micro BCA protein assay kit

(Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。細胞から回収したタンパク質量は、TaKaRa BCA タンパク質アッセイキット (TaKaRa Bio) を用いて測定した。

11. RNA 修飾レベルの定量解析

RNA 修飾レベルの定量解析は、既報の方法^{6,7}に従い、Xevo TQ-XS UHPLC-UniSpray-MS/MS (Waters Corporation) を用いて実施した。42 検体の正常および大腸癌 small Te-EVs RNA、8 検体の正常大腸組織 RNA、および 24 検体の大腸癌組織 RNA サンプルを RNA 修飾分析に供した。測定前の調製として、100 ng の RNA サンプルに 1 ng の dG15N5 (内部標準) を混合し、ヌクレアーゼ P1 (Wako) を用いて 45°C で 2 時間処理した。その後、ヌクレオチドサンプルを bacterial alkaline phosphatase (TaKaRa Bio) で 37°C、2 時間処理した。ヌクレオシドサンプルの定量は、UHPLC-UniSpray-MS/MS システムを用いて測定した。各サンプルは、内部標準物質のピーク面積に対する比を用いて補正し定量した。それぞれの修飾ヌクレオシドと非修飾ヌクレオシドの濃度は、標準物質のピーク面積から検量線を作成し、既知濃度に基づいて算出した。全てのピークは MASSLYNX XS ソフトウェア (Waters Corporation) で自動検出した。

12. 化合物

ここではヌクレオシドは略称を用いて記載し、正式名称は下記一覧に示す。A、C、G および I は富士フイルム和光純薬より入手した。S4U は Abcam (Cambridge, UK)、t6A は BIOLOG (Hayward, California, USA)、m1A、m6A、Im、m1G、ac4C、f5C、mcm5U、m5Um、ca5C、chm5U、Ψ は Carbosynth (Compton, UK) より入手した。i6A、D、m5D は Granlen, Inc. (Zhengzhou, China) より入手した。m7G および mcm5S2U は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より入手した。hm5C は Biosearch Technologies (Hoddesdon, UK) より入手し、m2G および U は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より入手した。Am、Gm、m5C、Cm、m5U、Um は東京化成工業株より入手した。m6,6A、m6Am、m1I、m2,2G、m3C、S2U は Toronto Research Chemicals, Inc. (Toronto, Ontario, Canada) より入手した。dG15N5 は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA) より入手した。m6t6A、ncm5U、nchm5U、(R)-mchm5U、(S)-mchm5U、mnm5S2U、ncm5S2U、mcm5Um および ncm5Um は、大阪大学大学院薬学研究科で合成したものを使用した。液体クロマトグラフィー-質量分析用グレードの酢酸アンモニウム ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 、CAS No. 631-61-8) およびメタノール (MeOH、CAS No. 67-56-1) は、富士フイルム和光純薬から入手した。

Abbreviation	Full name	CAS No.	Calibration range (ng · mL ⁻¹)
A	Adenosine	58-61-7	0.005-1
m1A	1-methyladenosine	15763-06-1	0.0025-2.5
m6A	N6-methyladenosine	1867-73-8	0.001-1
i6A	N6-isopentenyladenosine	7724-76-7	0.0025-5
t6A	N6-threonylcarbamoyladenosine	24719-82-2	0.01-5
m6,6A	N6,N6-dimethyladenosine	2620-62-4	0.001-1
m6t6A	N6-methyl-N6-threonylcarbamoyladenosine	39667-81-7	0.0025-1
Am	2'-O-methyladenosine	2140-79-6	0.001-1
m6Am	N6,2'-O-dimethyladenosine	57817-83-1	0.005-1
I	Inosine	58-63-9	0.01-2.5
m1I	1-methylinosine	2140-73-0	0.001-2.5
Im	2'-O-methylinosine	3881-21-8	0.0025-5
G	Guanosine	118-00-3	0.005-5
m1G	1-methylguanosine	2140-65-0	0.0025-5
m2G	N2-methylguanosine	2140-77-4	0.0005-2.5
m7G	7-methylguanosine	20244-86-4	0.0025-2.5
m2,2G	N2,N2-dimethylguanosine	2140-67-2	0.001-2.5
Gm	2'-O-methylguanosine	2140-71-8	0.0025-2.5
C	Cytidine	65-46-3	0.025-2.5
m3C	3-methylcytidine	2140-64-9	0.0005-2.5
m5C	5-methylcytidine	2140-61-6	0.001-5
ac4C	N4-acetylcytidine	3768-18-1	0.001-2.5
f5C	5-formylcytidine	148608-53-1	0.001-5
hm5C	5-hydroxymethylcytidine	19235-17-7	0.005-5
Cm	2'-O-methylcytidine	2140-72-9	0.0025-2.5
U	Uridine	58-96-8	0.025-2.5
m5U	5-methyluridine	1463-10-1	0.01-5
ho5U	5-hydroxyuridine	957-77-7	0.5-10
S2U	2-thiouridine	20235-78-3	0.025-5
S4U	4-thiouridine	13957-31-8	0.25-5
cm5U	5-carboxymethyluridine	20964-06-1	0.1-10
mcm5U	5-methoxycarbonylmethyluridine	29428-50-0	0.01-5
ncm5U	5-carboamoylmethyluridine	29569-30-0	0.01-5
nchm5U	5-carbamoylhydroxymethyluridine	2450329-74-3	0.025-10
(R)-mchm5U	(R)-5-(carboxyhydroxymethyl)uridine methyl ester	89665-84-9	0.25-10
(S)-mchm5U	(S)-5-(carboxyhydroxymethyl)uridine methyl ester	89665-83-8	0.25-10
mcm5S2U	5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine	20299-15-4	0.025-5
mnm5S2U	5-methylaminomethyl-2-thiouridine	32860-54-1	0.005-5
Um	2'-O-methyluridine	2140-76-3	0.01-5
m3Um	N3-methyl-2'-O-methyluridine	7103-27-7	0.0025-2.5
m5Um	N5-methyl-2'-O-methyluridine	114952-97-5	0.005-2.5
mcm5Um	5-methoxycarbonylmethyl-2'-O-methyluridine	60197-31-1	0.0025-2.5
ncm5Um	5-carbamoylmethyl-2'-O-methyluridine	60197-30-0	0.01-1
Ψ	Pseudouridine	1445-07-4	0.25-5
D	Dihydrouridine	5627-05-4	0.01-5
m5D	5-methyldihydrouridine	23067-10-9	0.025-10
dG15N5	2'-deoxyguanosine-15N5	312693-72-4	-

13. 免疫組織化学染色 (IHC)

腫瘍組織サンプルを Tissue-Tek OCT Compound (サクラファインテック) に浸漬し、凍結後、8 μ m 厚の切片を作成した。切片を 30 分間風乾した後、10% ホルマリンで 10 分間固定した。その後、PBS-T (PBS + 0.02% Tween20) および PBS で各 3 分間、3 回洗浄した。切片を 0.2% Triton-X (Sigma-Aldrich) で 10 分間透過処理し、PBS で 3 分間ずつ 2 回洗浄した。その後、peroxidase blocking reagent (BioRad) で 15 分間処理し、4% BSA/PBS で 37°C で 1 時間ブロッキングした。切片を rabbit anti-mouse TNF- α pAb (1:200, ProteinTech)、rabbit anti-mouse IL-6 pAb (1:100, GeneTex)、rabbit anti-mouse F4/80 pAb (1:2,000, ProteinTech)、rabbit anti-Ki67 pAb (1:600, ProteinTech)、rabbit anti-mouse CD31 pAb (1:1,000, ProteinTech)、rabbit anti-CD68 pAb (1:4,000, ProteinTech) で 4°C 一晩反応させた。その後、PBS-T および PBS で各 3 分間、計 3 回洗浄した。切片を HRP 標識 goat anti-rabbit IgG 二次抗体 (CST) または HRP 標識 donkey anti-goat IgG 二次抗体 (1:1,000, Thermo Fisher Scientific) および Envision+ Dual Link System HRP (Agilent) で室温 30 分間インキュベートした。その後、スライドを PBS-T で 3 分間ずつ 3 回洗浄し、Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Agilent) を用いて発色させた。スライドをヘマトキシリンで 5 分間対比染色し、流水で 3 分間洗浄した。その後、切片を 90% エタノールで 1 回、100% エタノールで 1 分間ずつ 3 回脱水し、Lemosol (Wako, CAS No. 5989-27-5) で 3 分間ずつ 3 回透過処理した。スライドは MOUNT-QUICK (DAIDO) を用いて封入した。染色・封入した切片はリサーチスライドスキャナー VS200 (Olympus) で観察した。H-score は HALO ソフトウェア (HALO AI) を用いて算出した。まず陽性細胞の閾値を決定するため、isotype 染色および positive control 染色組織サンプルを HALO AI による機械学習をさせた。陽性細胞は染色強度に基づき weak, moderate, strong に分類され、各強度には weak=1 point、moderate=2 point、strong=3 point が割り当てられた。各強度に割り当てられた点数に陽性細胞の割合を乗じ、それらを合計することで H-score を算出した。

14. PKH26 標識 Te-EVs 取り込みアッセイおよびサイトカインアレイ

PKH26 1 mM (Sigma-Aldrich) を PBS で 4 μ M に希釈した。次に、EV 懸濁液を等量で希釈した PKH26 (4 μ M) と混合し、5 分間反応させた。等量の 1% BSA/PBS を添加し、small EVs を 100,000 $\times$ g で 90 分間超遠心して EVs を洗浄した。PBMCs (1 $\times$ 10⁵ cells) を 96 well plate に播種し、PKH26 標識 Te-EVs (small Te-EVs : 3.95 $\times$ 10⁹ particles/mL, n = 6) を添加した。24 時間後、PBMCs の培養上清をサイトカインアレイ分析に使用した。PBMCs を APC anti-human CD3 抗体 (1:200, clone: REA613/SK7, Miltenyi)、APC-Vio770 標識 anti-human CD14 抗体 (1:200, clone: REA599/TUK4, Miltenyi)、PE-Vio770 anti-human CD19 抗体 (1:200, REA675/SJ25-C1, Miltenyi)、FITC anti-human CD56 抗体 (1:100, clone: HCD56, BioLegend) で染色し、ZE5 セルアナライザー (BioRad) を用いて解析した。サイトカインアレイ解析は、Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening panel, 48-Plex (BioRad) および Bio-Plex Pro Human Chemokine Screening panel, 40-Plex (BioRad) を用い、製造元のプロトコルに従って実施した。分析には 4 倍希釈した培養上清を用いた。

15. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

マクロファージ培養上清中の炎症性サイトカイン (TNF- α および IL-6) 濃度は、ELISA MAX Standard Set (BioLegend) を用いて測定した。コーティング用抗体は coating buffer (pH 9.5) で 200 倍希釈し、Immuno Clear Standard Modules (Thermo Fisher Scientific) に 4°C, O.N. でコーティングした。プレートは Wellwash™ Macroplate Washer (Thermo Fisher Scientific) を用いて PBS-T で 3 回洗浄した。サンプルを 20~200 倍に希釈し、37°C で 3 時間、コーティング抗体と反応させた。その後プレートを PBS-T で 3 回洗浄し、HRP 標識検出抗体を 37°C で 30 分間インキュベートした。プレートを PBS-T で 4 回洗浄し、TMB Substrate Set (BioLegend) を用いて horseradish peroxidase (HRP) を検出した。TMB 反応は 10% H₂SO₄ で停止させ、Multiskan FC マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm での吸光度を測定した。

16. 細胞増殖アッセイ

HT29 (0.5×10^3 cells) および sgAlkbh5 colon26 (0.4×10^3 cells) を 96 well plate に播種した。翌日、WST-8 試薬 (DOJINDO) 10 μ L を細胞に添加し、2 時間インキュベートした後、Multiskan FC マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて Day 0 の OD450 nm-OD630 nm を測定した。その後、培地を 75 μ L の RPMI 培地と 25 μ L の dTHP-1 培養上清の混合液に交換し、播種後、48, 96, 120 時間で同様に WST-8 試薬による測定を行った。

17. 細胞株由来 EVs の dTHP-1 細胞への作用解析

細胞株由来 EVs (small EVs : 3.95×10^9 particles/mL) を、RNase (10 μ g/mL, NIPPON GENE) の有無にかかわらず、37°C で 30 分間前処理した後、small EVs を $100,000 \times g$ の超遠心で PBS を用いて洗浄した。dTHP-1 細胞由来の培養上清は、EVs 処理 48 時間後に回収した。その後、細胞を $2,000 \times g$ で遠心分離し細胞デブリを除去した後、ELISA に供した。

18. EV-RNA の dTHP-1 細胞への導入

EV-RNA (21 ng) を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 2.5 μ L と混合し、dTHP-1 細胞 (1×10^5 cells) に導入した。EV-RNA 処理 48 時間後に dTHP-1 培養上清を回収した。その後、細胞を $2,000 \times g$ で遠心分離し細胞デブリを除去した後、ELISA を実施した。

19. リコンビナント ALKBH5 (rALKBH5) による EVs-RNA の in vitro 脱メチル化反応

EVs-RNA (200 ng) を、400 ng の rALKBH5、0.3 mM ケトグルタル酸 (Wako)、150 μ M FeSO₄ (Wako) とともに 37°C で 4 時間反応させた。熱変性サンプルは、混合液を 95°C で 10 分間加熱し調製した。反応後、3 M 酢酸ナトリウム (Wako) を溶液の 1/10 量、100% エタノール (Wako) を溶液の 2 倍量加え、氷上で 30 分間インキュベートした。 $15,000 \times g$ で遠心分離後、上清を廃棄した。沈殿を 70% エタノールで 2 回洗浄し、超純水に溶解して以降の実験に使用した。

20. TLR 阻害剤及び siRNA 実験

TLR8 アゴニスト (Motolimod)、TLR3 アゴニスト (Poly(I:C))、TLR8 阻害剤 (CU-CPT9a)、TLR3

阻害剤 (CU-CPT-4a) は MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA) より購入した。dTHP-1 細胞 (1×10^5 cells) を 24 well plate に播種し、EVs またはアゴニストと同時に阻害剤を添加し 48 時間培養した。

TLR3 および TLR8 siRNA は Thermo Fisher Scientific より購入した。dTHP-1 細胞 (1×10^5 cells) を 24 well plate に播種し、1.0 μ L の Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて 20 nM の siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後、培地を EVs 添加培地 (3.95×10^9 particles/mL) に交換した。dTHP-1 細胞の培養上清 (CM) を 48 時間培養後に回収し、2,000 $\times$ g で遠心分離して細胞デブリを除去した後、ELISA あるいは、HT29 細胞、colon26 細胞を用いた細胞増殖アッセイに供した。

21. Te-EVs-RNA シーケンス解析 (RNA-seq)

Te-EVs-RNA は、small Te-EVs ($n = 12$) 5.0×10^8 particles 抽出し、供した。RNA ライブラリは、NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB) を用いて構築し、ライブラリは HiSeq 2500 platform (Illumina) で 75 bp シングルエンドリードとしてシーケンス解析した。Small RNA-seq 解析は、CLC Genomics Workbench v9.5.3 (Qiagen) を用いて、デフォルトパラメータによる small RNA アライメントに従って実施した。RNAseq データは、Subio Platform および Subio Basic Plug-in (v1.20; Subio, Inc.) において、両側 student t-test ($p < 0.05$) を用いてサンプル間の fold-change として算出された。

22. 5'-half-GlyGCC に対する qPCR 解析

Total EVs-RNA 10 ng から cDNA を合成するために、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara, Clontech) を使用した。qPCR 解析には CFX Connect 96 plate (BioRad) を用いた。以下の条件を用いて qPCR を行った：98°C で 30 秒の初期ステップ、5'-half-GlyGCC および U6 に対して 95°C で 2 秒、63°C で 5 秒の 40 サイクル。プライマー配列は以下の通り：

5'-half-GlyGCC forward, 5'-GGCAGGCGAGAATTCTACCACTGAACCACCAA-3', reverse, the mRQ3' universal primer. U6 forward, reverse primer は Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit に附属のものを使用した。

23. Te-EVs からの 5'-half-GlyGCC の精製

EVs-RNA 中の 5'-half-GlyGCC は、Dynabeads M-270 streptavidin (Thermo Fisher Scientific) を用いて単離した。ビオチン標識 5'-half-GlyGCC アンチセンスオリゴ (50 pmol) を 10 μ L の Dynabeads に室温で 10 分間結合させた。次に、50 ng の EV-RNA をオリゴ結合ビーズと 15 分間反応させた。回収した RNA を 10 μ L の超純水で溶出し、1 μ L の RNA を用いて Bioanalyzer (Agilent) で分析した。

24. 5'-half tRNA の *in vitro* 転写

In vitro 転写は、RiboMAX Large-Scale RNA Production System-T7 (Promega) を用いて実施した。得られた転写産物は、電気泳動およびサンガー法による塩基配列決定により確認した。

25. 5'-half-GlyGCC およびアンチセンスオリゴの EV への導入

1.0×10^9 particles/100 μ L の EVs を、1 M CaCl_2 を EV 溶液の 1/10 量および 500 ng の 5'-half-GlyGCC *in vitro* 転写産物またはアンチセンスオリゴと混合した。混合液を室温 (18~22°C) で 30 分間静置し、EVs と 5'-half-GlyGCC 互いを近傍に吸着させた。その後、EVs を 42°C で 1 分間ヒートショック処理し、氷上に 5 分間静置した。余剰の 5'-half-GlyGCC を除去するため、EVs を RNase A (Wako、10 μ g/mL) と共に 37°C で 30 分間反応させた。その後、リン酸カルシウム沈殿を除去するため、溶液の 1/10 量の 0.1 M HCl を添加した。超遠心 (100,000 $\times$ g、90 分) により PBS を用いて EVs を洗浄した。EVs を PBS で懸濁し回収後、以降の検討に使用した。アンチセンスオリゴの配列は以下の通りに設計した：5' -tAcCaCtGaAcCaCcCaTgC-3' (大文字：LNA、小文字：DNA)。

26. 統計解析

統計解析およびグラフによる可視化は、GraphPad Prism ソフトウェア (GraphPad Prism 10、GraphPad software) を用いて実施した。定量データの評価には、Mann-Whitney test、Student t-test、one-way ANOVA post hoc Tukey's test を行った。臨床検体の対応のある群間比較には、Wilcoxon-signed rank test を用いた。統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

引用文献

1. Liu WW, Zheng SQ, Li T, et al. RNA modifications in cellular metabolism: implications for metabolism-targeted therapy and immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):70. doi:10.1038/s41392-024-01777-5
2. Cui L, Ma R, Cai J, et al. RNA modifications: importance in immune cell biology and related diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):334. doi:10.1038/s41392-022-01175-9
3. Frye M, Harada BT, Behm M, He C. RNA modifications modulate gene expression during development. *Science (1979).* 2018;361(6409):1346-1349. doi:10.1126/science.aau1646
4. Barbieri I, Kouzarides T. Role of RNA modifications in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(6):303-322. doi:10.1038/s41568-020-0253-2
5. Yang B, Wang JQ, Tan Y, Yuan R, Chen ZS, Zou C. RNA methylation and cancer treatment. *Pharmacol Res.* 2021;174:105937. doi:10.1016/j.phrs.2021.105937
6. Kogaki T, Ohshio I, Ura H, et al. Development of a highly sensitive method for the quantitative analysis of modified nucleosides using UHPLC-UniSpray-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;197:113943. doi:10.1016/j.jpba.2021.113943
7. Monoe Y, Miyamoto S, Jingushi K, et al. Hypoxia regulates tumour characteristic <scp>RNA</scp> modifications in ovarian cancers. *FEBS J.* 2023;290(8):2085-2096. doi:10.1111/febs.16688
8. Orsolic I, Carrier A, Esteller M. Genetic and epigenetic defects of the RNA modification machinery in cancer. *Trends Genet.* 2023;39(1):74-88. doi:10.1016/j.tig.2022.10.004
9. Abedizadeh R, Majidi F, Khorasani HR, Abedi H, Sabour D. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments. *Cancer Metastasis Rev.* Published online December 19, 2023;43(2):729-753. doi:10.1007/s10555-023-10158-3
10. Jang JH, Kim DH, Surh YJ. Dynamic roles of inflammasomes in inflammatory tumor microenvironment. *NPJ Precis Oncol.* 2021;5(1):18. doi:10.1038/s41698-021-00154-7
11. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(10):653-667. doi:10.1038/s41577-021-00534-x
12. Heregger R, Huemer F, Steiner M, Gonzalez-Martinez A, Greil R, Weiss L. Unraveling Resistance to Immunotherapy in MSI-High Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2023;15(20):5090. doi:10.3390/cancers15205090
13. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* 2005;23(2). doi:10.1016/j.immuni.2005.06.008
14. Liu T, Li H, Du G, et al. Comprehensive analysis of m6A regulator-based methylation modification patterns characterized by distinct immune profiles in colon adenocarcinomas. *Gene.* 2022;821:146250. doi:10.1016/j.gene.2022.146250
15. Jeppesen DK, Zhang Q, Franklin JL, Coffey RJ. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging

complexities. *Trends Cell Biol.* 2023;33(8):667-681. doi:10.1016/j.tcb.2023.01.002

16. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *Journal of Clinical Investigation.* 2016;126(4). doi:10.1172/JCI81130
17. Urabe F, Kosaka N, Yoshioka Y, Egawa S, Ochiya T. The small vesicular culprits: the investigation of extracellular vesicles as new targets for cancer treatment. *Clin Transl Med.* 2017;6(1). doi:10.1186/s40169-017-0176-z
18. Möller A, Lobb RJ. The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(12):697-709. doi:10.1038/s41568-020-00299-w
19. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell.* 2016;30(6):836-848. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.009
20. Paskeh MDA, Entezari M, Mirzaei S, et al. Emerging role of exosomes in cancer progression and tumor microenvironment remodeling. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):83. doi:10.1186/s13045-022-01305-4
21. Jingushi K, Uemura M, Ohnishi N, et al. Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin. *Int J Cancer.* 2018;142(3). doi:10.1002/ijc.31080
22. Wu Y, Yang X, Jiang G, et al. 5'-tRF-GlyGCC: a tRNA-derived small RNA as a novel biomarker for colorectal cancer diagnosis. *Genome Med.* 2021;13(1):20. doi:10.1186/s13073-021-00833-x
23. Chen Z, Qi M, Shen B, et al. Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(5):2533-2545. doi:10.1093/nar/gky1250
24. Si G, Chen X, Li Y, Yuan X. Exosomes promote pre-metastatic niche formation in colorectal cancer. *Heliyon.* 2024;10(6):e27572. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e27572
25. Guo Y, Ji X, Liu J, et al. Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors. *Mol Cancer.* 2019;18(1):39. doi:10.1186/s12943-019-0995-1
26. Garcia-Martin R, Wang G, Brandão BB, et al. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature.* 2022;601(7893):446-451. doi:10.1038/s41586-021-04234-3
27. Chen F, Song C, Meng F, et al. 5'-tRF-GlyGCC promotes breast cancer metastasis by increasing fat mass and obesity-associated protein demethylase activity. *Int J Biol Macromol.* 2023;226:397-409. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.295
28. Yang X, Zhang S, He C, et al. METTL14 suppresses proliferation and metastasis of colorectal cancer by down-regulating oncogenic long non-coding RNA XIST. *Mol Cancer.* 2020;19(1):46. doi:10.1186/s12943-020-1146-4
29. Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, et al. Tumor necrosis factor- α is associated with positive lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer--indications for anti-TNF- α agents in cancer treatment. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2010;33(3):151-163. doi:10.3233/ACP-CLO-2010-

30. Toyoshima Y, Kitamura H, Xiang H, et al. IL6 Modulates the Immune Status of the Tumor Microenvironment to Facilitate Metastatic Colonization of Colorectal Cancer Cells. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(12):1944-1957. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0766
31. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, et al. Preoperative Serum Interleukin-6 Is a Potential Prognostic Factor for Colorectal Cancer, including Stage II Patients. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:9701574. doi:10.1155/2016/9701574
32. Cheng E, Shi Q, Shields AF, et al. Association of Inflammatory Biomarkers With Survival Among Patients With Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2023;9(3):404-413. doi:10.1001/jamaoncol.2022.6911
33. Wang T, Song P, Zhong T, et al. The inflammatory cytokine IL-6 induces FRA1 deacetylation promoting colorectal cancer stem-like properties. *Oncogene*. 2019;38(25):4932-4947. doi:10.1038/s41388-019-0763-0
34. Saito T, Nishikawa H, Wada H, et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016;22(6):679-684. doi:10.1038/nm.4086
35. Guo Y, Xie F, Liu X, et al. Blockade of TNF- α /TNFR2 signalling suppresses colorectal cancer and enhances the efficacy of anti-PD1 immunotherapy by decreasing CCR8+ T regulatory cells. *J Mol Cell Biol*. Published online November 3, 2023. doi:10.1093/jmcb/mjad067
36. Pawar K, Kawamura T, Kirino Y. The tRNA Val half: A strong endogenous Toll-like receptor 7 ligand with a 5' -terminal universal sequence signature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2024;121(19). doi:10.1073/pnas.2319569121
37. Tosar JP, Gámbaro F, Darré L, Pantano S, Westhof E, Cayota A. Dimerization confers increased stability to nucleases in 5' halves from glycine and glutamic acid tRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(17):9081-9093. doi:10.1093/nar/gky495
38. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
39. Dabo S, Meurs EF. dsRNA-Dependent Protein Kinase PKR and its Role in Stress, Signaling and HCV Infection. *Viruses*. 2012;4(11):2598-2635. doi:10.3390/v4112598
40. Züst R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, et al. Ribose 2' -O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol*. 2011;12(2):137-143. doi:10.1038/ni.1979
41. Qiu W, Zhang Q, Zhang R, et al. N6-methyladenosine RNA modification suppresses antiviral innate sensing pathways via reshaping double-stranded RNA. *Nat Commun*. 2021;12(1):1582. doi:10.1038/s41467-021-21904-y
42. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(9):537-551. doi:10.1038/s41577-020-0288-3
43. Tong AJ, Leylek R, Herzner AM, et al. Nucleotide modifications enable rational design of TLR7-selective ligands by blocking RNase cleavage. *Journal of Experimental Medicine*. 2024;221(2).

doi:10.1084/jem.20230341

44. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human Dendritic Cells Stimulated via TLR7 and/or TLR8 Induce the Sequential Production of IL-10, IFN- γ , and IL-17A by Naive CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 2009;182(6):3372-3379. doi:10.4049/jimmunol.0801969
45. Barrat FJ. TLR8: No gain, no pain. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(12):2964-2966. doi:10.1084/jem.20181899
46. Asami T, Ishii M, Fujii H, et al. Modulation of Murine Macrophage TLR7/8-Mediated Cytokine Expression by Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:1-13. doi:10.1155/2013/264260
47. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science (1979)*. 2004;303(5663):1526-1529. doi:10.1126/science.1093620
48. Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012;(59):e3037. doi:10.3791/3037

謝辞

本稿を終えるにあたり、時に厳しく時に温かくご指導賜り、研究の楽しさを教えていただきました大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野教授 深田宗一郎先生ならびに附属化合物ライブラリー・スクリーニングセンター特任教授 辻川和丈先生に心より御礼申し上げます。

分野配属時より一貫して熱いご指導賜り、様々な研究に挑戦する機会をいただき、今後の研究者としての人生の基礎を鍛えていただいた大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野講師 神宮司健太郎先生に謹んで感謝深謝申し上げます。

いつも研究に新たな発想を与えていただき、研究がより良い方向へ進むようご指導、ご助言賜りました大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野助教 長谷拓朗明先生に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、臨床の観点からのご助言ならびに臨床検体の提供をいただきました大阪医科薬科大学一般・消化器外科教室教授 李相雄先生、ならびに大阪医科薬科大学総合医学研究センタートランスレーショナルリサーチ部門講師 谷口高平先生はじめ大阪医科薬科大学一般・消化器外科教室の先生方に謹んで御礼申し上げます。

また、日々の研究において、技術的指導、あるいは研究室運営面でのサポート賜りました、附属化合物ライブラリー・スクリーニングセンター 北恵郁緒里特任研究員、創薬サイエンス研究支援拠点技術補佐員 川脇公子さん、秘書 岩渕彩さん、三宅葉子さん、西村恭子さんに心より感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程を過ごす中で支えとなり、時に刺激を与えてくれた大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野および旧細胞生理学分野の諸先輩方ならび後輩の皆様に深く感謝申し上げます。