

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18943

研究課題名(和文) エクソソームの組織指向性に依存したがん転移機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of the organ-specific metastasis

研究代表者

堀部 紗世 (Horibe, Sayo)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50389110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは、様々な細胞から分泌される脂質二重膜の小胞体で、タンパク質および核酸を含む。エクソソームは、ドナー細胞由来の細胞情報を伝達し、臓器特異的転移などの様々な生理学的および病理学的事象に関与する。しかしながら、ドナー細胞によって分泌されたエクソソームがレシピエント細胞に選択的または非選択的に組み込まれているかどうかは不明である。我々の結果は、ドナー細胞によって分泌されたエクソソームはレシピエント細胞に非選択的に取り込まれ、エクソソームの取り込みのメカニズムはレシピエント細胞によって異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Exosomes, small membrane vesicles, are secreted by the cells and include several types of proteins and nucleic acids. Exosomes transfer the cellular information derived from the donor cells and are involved in various physiological and pathological events, such as the organ-specific metastasis. However, it is unknown whether the exosomes secreted by the donor cells are selectively or non-selectively incorporated into the recipient cells. The capability of exosome uptake was different depending on the recipient cell type and did not depend on the donor cell type. Our results suggest that the exosomes secreted by the donor cells are non-selectively incorporated into the recipient cells and that the mechanism of exosome uptake is different depending on the recipient cells. Thus, the different capability of the recipient cells for the exosome uptake may be involved in the organ-specific metastasis.

研究分野：医療薬学

キーワード：エクソソーム エンドサイトーシス がん 転移

1. 研究開始当初の背景

エクソソームによる新しい概念の細胞間伝達機構が示されつつあり、エクソソームに含まれる核酸、とくに分泌型マイクロ RNA は、がん転移において潜在的な機能を有すると示唆されている。分泌型マイクロ RNA を含むドナーがん細胞由来のエクソソームは、正常レシピエント細胞に取り込まれ、転移部位での異常な細胞機能の伝達が示唆されているが、その詳細な機構は不明である。

2. 研究の目的

がん細胞由来エクソソームには、組織指向性があり、特異的に正常組織細胞に選択的に取り込まれ、分泌型マイクロ RNA を介して悪性化能を伝達させるとの仮説づけ、ヒト肺がん由来 A549 細胞、ヒト大腸がん由来 HCT116 細胞および COLO205 細胞を用いて、以下の項目を検討した。

(1) エクソソームの抽出方法およびエクソソームのマーカー分子の発現を比較検討する。

(2) エクソソームの細胞内取り込みが選択的および非選択的に取り込まれるか明らかにする。

(3) エクソソームの細胞内取り込みにエンドサイトーシスが関与するが、どのエンドサイトーシスの経路が関与するか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの抽出

A549 細胞、HCT116 細胞および COLO205 細胞から細胞培養上清を回収し、不純物を遠心で除去後、Exoquick-TC™ (Biosystem)、Total exosome isolation kit (Invitrogen) および超遠心法を用いて抽出した。エクソソームのマーカー分子の発現は、抽出したエクソソームを 5×RIPA を加えてエクソソームを溶解し、ウェスタンブロットで確認した。

(2) エンドサイトーシス関連分子の発現

各細胞から total RNA およびタンパク質を抽出し、カベオリン-1、クラスリンの発現を real-time PCRT およびウェスタンブロットで確認した。

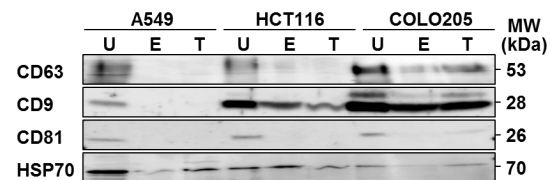
(3) エクソソームの細胞内取り込み

抽出したエクソソームを 1 mM DiO を添加し、37°C で 20 min インキュベートした。余分な DiO を除去するために、Exosome Spin Columns (MW3000) (Invitrogen) を用い、DiO 標識エクソソームを作製した。A549 細胞、HCT116 細胞および COLO205 細胞を 8 well チャンバースライドに播種し、48 時間後に DiO 標識したエクソソームを添加し、CO₂ インキュベーター内で 3 時間培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定後、Phalloidin で F-actin で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。観察した画像を

ImageJ で解析し、細胞当たりの DiO の蛍光強度を算出し、評価した。カベオリンの阻害剤であるゲニステインおよびクラスリンの阻害剤である Pitstop は、エクソソームを添加する 10 分前に前処置し、DiO で標識したエクソソームを添加した。ゲニステインのみエクソソームを存在下で取り込み実験を行った。

4. 研究成果

(1) エクソソームの膜表面には、CD63、CD9 及び CD81 といったテトラスパニン類が発現しているとされており、エクソソームのマーカーとして汎用されている。各細胞の培養上清から超遠心で精製したエクソソームには、CD63、CD9、CD81 及び HSP70 がすべて発現していた。一方で、ExoQuick-TC™ 及び Total Exosome Isolation で精製したエクソソームには、CD81 の発現が認められなかった。また、CD63 の発現は、超遠心で精製したエクソソームと比較し、減弱していた。また、2 つの異なる COLO205 細胞由来エクソソームで、各マーカータンパク質の発現を評価して再確認したところ、超遠心で精製したエクソソームは、4 種類のエクソソームマーカータンパク質がすべて発現していた。しかし、ExoQuick-TC™ 及び Total Exosome Isolation で精製したエクソソームでは、HSP70 の発現が変動した。さらに、A549 細胞由来エクソソームは、HCT116 細胞及び COLO205 細胞由来エクソソームと比較し、CD9 の発現が減弱していた。しかし、HSP70 の発現は増強していた (図 1)。



U, ultracentrifugation; E, Exoquick-TC™; T, Total exosome isolation.

図 1 エクソソームマーカーの検出

超遠心法 (U)、Exoquick-TC™ (E) および Total exosome isolation kit (T) を用いて、A549、HCT116 および COLO205 細胞培養上清からエクソソームを単離し、エクソソームのマーカー分子 (CD63、CD9、CD81 および HSP70) の発現をウェスタンブロットにより検討しました。

(2) エクソソームの細胞内取り込みに選択性がある検討した結果、A549 細胞由来エクソソームは、A549 細胞のみならず HCT116 および COLO205 細胞に取り込まれた。HCT116 細胞および COLO205 細胞由来エクソソームも同様に、A549、HCT116 および COLO205 細胞に取り込まれた。また、A549 細胞由来エクソソームを A549、HCT116 および COLO205 細胞に取り込ませた場合、細胞内への取り込み量は、COLO205、A549、HCT116 細胞の順に多かった (図 2a)。HCT116 および COLO205 細胞由来エ

クソソームを各細胞種に取り込ませた場合も同様に、細胞内への取り込み量は、COL0205、A549、HCT116 細胞の順に多かった (図 2b, c)

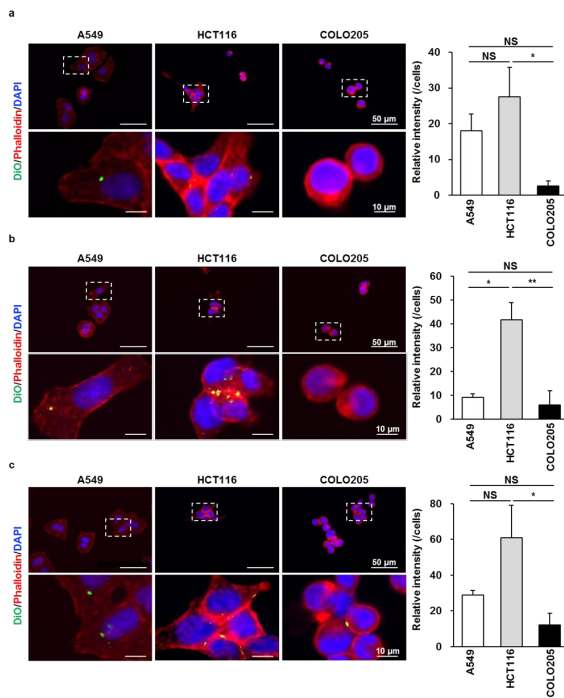


図 2 A549 (a)、HCT116 (b) および COL0205 (c) 細胞由来エクソソームの各種細胞への取り込み

A549、HCT116 および COL0205 細胞から抽出したエクソソームを DiO 標識して A549、HCT116 および COL0205 細胞に添加後、細胞を固定して Alexa-555 Phalloidine および DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。撮影した画像を Image J で解析し、細胞一個当たりの DiO 標識エクソソームの蛍光強度を算出した。

(3) エンドサイトーシスに關する機能分子であるカベオリン-1 の発現は、COL0205、A549、HCT116 の順に高くなった (図 3a)、一方、クラスリンの発現は、A549、HCT116、COL0205 細胞の順に高くなった (図 3b)。

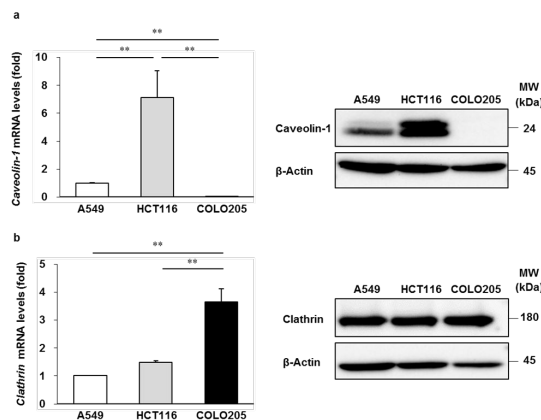


図 3 エンドサイトーシスマーカー分子の発現

A549、HCT116 および COL0205 細胞におけるカベオリン-1 (a) とクラスリン (b) の発現を real-time PCR およびウエスタンブロットで評価した。

(4) HCT116 細胞におけるエクソソーム取り込み能の亢進がカベオリン-1 の発現と關連するかどうかを評価するために、カベオラ依存性エンドサイトーシスの阻害剤であるゲニステインを用いて、取り込み機構について検討した。HCT116 細胞における DiO 標識 COL0205 細胞由来エクソソームの取り込みに、ゲニステインは影響をおよぼさなかった (図 5a)。クラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤である Pitstop2 により、HCT116 細胞では、DiO 標識 COL0205 細胞由来エクソソームの取り込みは阻害された (図 4a)。これらの結果は、HCT116 細胞におけるエクソソームの取り込みに、クラスリン依存性エンドサイトーシスが關与するが、カベオラ依存性エンドサイトーシスは關与しないことが示された。次に、A549 および COL0205 細胞におけるエクソソーム取り込みのメカニズムが HCT116 細胞におけるものと同じかどうかを明らかにするために、DiO 標識 A549 由来エクソソームを用いて検討した。その結果、HCT116 細胞では COL0205 細胞由来エクソソームの時同様に、ゲニステインは取り込み阻害しなかったが、Pitstop2 では阻害した (図 4b)。さらに、COL0205 細胞では 2 つの阻害剤により取り込みが阻害されたが、A549 細胞ではいずれも阻害しなかった (図 4b)。これらの結果は、COL0205 細胞におけるエクソソームの細胞内取り込みは、クラスリン依存性エンドサイトーシスおよびカベオラ依存性エンドサイトーシスの両方が關与し、HCT116 細胞では、クラスリン依存性は關与するがカベオラ依存性エンドサイトーシスは關与していないことが明らかとなった。また、A549 ではいずれの取り込み機構も關与していないことが示された。

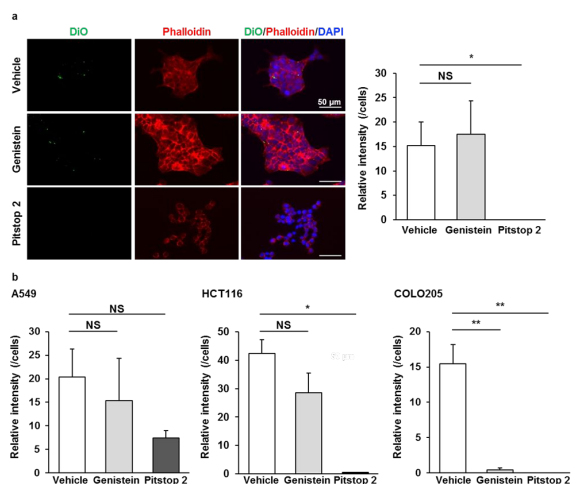


図 4 エクソソームの細胞内取り込み機構 a; ゲニステインおよび Pitstop2 存在下で

COL0205 由来エクソソームを HCT116 細胞に取り込ませた。b; ゲニステインおよび Pitostop2 存在下で A549 由来エクソソームを A549、HCT116、COL0205 細胞に取り込ませた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

Horibe Sayo, Murakami Yoshiki, Tanahashi Toshihito, Membrane proteins of exosomes derived from donor cells and cellular uptake in recipient cells, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.8, 名古屋国際会議場(愛知県)

堀部紗世、河内正二、浅野優子、小西杏奈、日野友矢、村上善基、棚橋俊仁、レシピエント細胞に依存したエクソソーム取り込み機構の解析、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015.12.01、神戸国際会議場(兵庫県)

田中一也、堀部紗世、清田実希、松尾杏奈、河内正二、力武良行、エクソソームの細胞内取り込み能とレシピエント細胞のカベオリン-1 発現との関連、第 63 回日本生化学会近畿支部例会、2016.05.21.、神戸薬科大学(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀部 紗世 (HORIBE Sayo)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50389110

(2) 研究協力者

棚橋俊仁 (TANAHASHI Toshihito)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30380067

村上善基 (MURAKAMI Yoshiki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00397556