

令和元年6月12日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07152

研究課題名(和文) 基板吸着を利用したエクソソーム解析法の開発

研究課題名(英文) Adsorption behaviors and characterization of extracellular vesicles

研究代表者

松村 幸子 (Matsumura, Sachiko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 蛋白創製研究部・特任研究員

研究者番号：90414052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは細胞から放出された小胞で、細胞間で情報を伝達しがんなどの疾患にも深く関わっている。エクソソームには様々な性質の小胞が含まれており、それぞれを見分け適切に評価することが、診断や治療に利用するためには必要である。そこでエクソソームが基板に吸着する現象を利用して性質を見分けることを目指して研究を始めた。その過程で、がん細胞由来のエクソソームにはホスファチジルセリンという脂質が表面に露出した小胞があり、その露出率が異なる2つのサブタイプがあることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホスファチジルセリンは通常の細胞では細胞膜の内側に存在するが、がん細胞やがん細胞由来エクソソームでは細胞膜の外側に露出し、がんの進展への寄与が示唆されている。本研究で見出した、ホスファチジルセリンの露出率が異なる2つのエクソソームサブタイプの性質や機能を明らかにすることで、がんの生物学的理解が深まるだけでなく、エクソソームをがんの診断や治療に利用する上で役立つ情報が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are extracellular vesicles secreted from various cells. Intercellular communication mediated by exosomes plays important roles in cancer, therefore, exosomes are potentially useful for tumor diagnosis and therapy. Because exosomes contain heterogeneous populations, it is necessary to distinguish exosome subtypes and understand them for their applications. We tried to develop a method to distinguish exosomes using adsorption behaviors of exosomes on substrates. During this process, we found that tumor-derived exosomes have two subtypes with differently externalized phosphatidylserine (PS). Phosphatidylserine is normally located in the inner plasma membrane but externalized on the outer membrane in tumor cells. Reportedly, tumor cells release PS-positive exosomes, which are indicated to contribute to tumor progression. Therefore, the characterization of the subtypes of PS-positive exosomes will provide useful information for developing exosome-based tumor diagnosis and therapy.

研究分野：ナノバイオ、生体関連化学

キーワード：細胞外小胞 がん 原子間力顕微鏡 エクソソーム ホスファチジルセリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から放出された脂質二分子膜で覆われた小胞（ベシクル）で、放出した親細胞に由来する核酸やタンパク質、脂質などを含んでいる。これらの情報は細胞間で伝達され、ベシクルを介した細胞間コミュニケーションとして、正常な生理的現象から疾患まで広く行われていることが認識されるようになった。がんにおいても、がんの増殖、転移、薬剤耐性などに深く関与することを示す報告が相次いでいた。エクソソームは血液、尿、唾液、涙などの体液に含まれていることから、体液を利用した非侵襲的な診断（リキッドバイオプシー）や治療への利用が期待され、精力的に研究が進められていた。一方で、「エクソソーム」は総称で、一般的な手法で採取されたエクソソームの中には様々なベシクルが含まれていることが指摘されており、エクソソームのサブクラスによって性質や機能が異なると推測されていた。それぞれのベシクルがどのような性質と機能をもつのかを明らかにし、エクソソームを適切に理解、評価することは、診断や治療にエクソソームを適切かつ有効に利用する上で欠かせない。しかし、どのようにサブクラスを分けるかはまだ研究の途上にあり、それぞれの性質や機能の解明も十分ではなかった。

一般的には、エクソソームは「サイズ」と「密度」によって分けられてきたが、我々は「基板表面への吸着」に着目して研究を進めていた。種々の基板を用いた検討から、基板によってベシクルの吸着の仕方が異なること、また由来する細胞によって吸着時の形状などが異なることを明らかにしていた。そこで、基板上でエクソソームの性質の違いを見極める技術へと発展させるために、異なる基板を利用して、ベシクルの膜の外側/内側に局在する分子の検出や、基板吸着時のベシクルの形状に反映されるエクソソームの性質の調査などを行うことにした。

2. 研究の目的

エクソソームの基板への吸着を利用して、基板上でエクソソームサブクラスの性質の違いを見極める技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 基板上でエクソソームの膜の外側/内側の分子を検出する方法を開発するために、まずエクソソームの膜に存在するマーカータンパク質 CD63 に着目し、その細胞質側末端に蛍光タンパク質 EGFP を融合したタンパク質を発現する細胞を作製した。作製した細胞の培養液から回収されたエクソソームでは膜の外側の CD63 と内側の EGFP を、それぞれの抗体を用いて見分けられるはずである。このエクソソームを用いて基板に吸着させたベシクルの内側を露出させる方法を検討した。ベシクルを抗体と金ナノ粒子を用いてラベルし、外側/内側の分子を検出できているか、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察によって評価した。続いて、脂質膜成分のホスファチジルセリン (PS) や細胞骨格タンパク質のアクチンについてベシクルでの局在を調べた。

(2) がん細胞株の培養液を回収し、分画遠心法によってエクソソームを採取した。さらに密度勾配遠心によって分画し、それぞれの画分を基板に吸着させた。AFM で観察しベシクルのサイズや形状を比較した。また、溶液中のサイズや表面電位を測定し、基板上での吸着挙動との関連性について検討した。

4. 研究成果

(1) CD63 と EGFP の融合タンパク質を発現したエクソソームを用いて、基板上でベシクル内部の分子を露出させる条件を検討した。基板上にエクソソームを吸着させた後に窒素ガスを吹きつけると、ベシクルが融合して大きな膜になってしまい、個々のベシクルを判別できないという問題が生じた。しかし周囲を牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングしてから適切な条件で窒素ガスを吹きつけることで、個々のベシクルが独立したままベシクル内部を露出させることができた。CD63 および EGFP に対する抗体とサイズの異なる金粒子を用いることで、外側の CD63 と内側の EGFP をそれぞれ区別して AFM で検出できることが明らかとなった。また、EGFP を mCherry に変えた系でも同様に検出できた (図 1)。このように、ベシクルの内側と外側の分子を検出することが可能となったので、この手法を用いて、アクチンおよび PS の検出をそれぞれに対する抗体を用いて試みた。アクチンについては、ごく一部のベシクル内部で検出されるにとどまった。アクチンの存在量自体が少なく、抗体での検出が困難だったものと推察された。PS については、

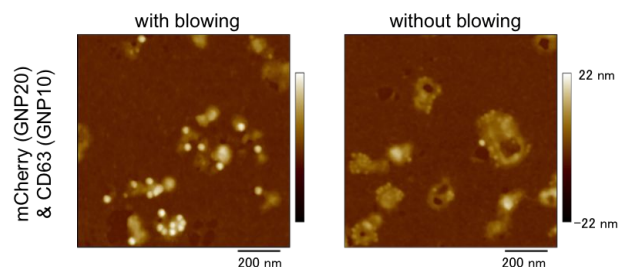


図 1. 膜外側の CD63 を 10 nm の金粒子で、内側の mCherry を 20 nm の金粒子でラベルしたエクソソームの大気中 AFM イメージ。窒素ガスを吹きつけて内部を露出させた状態 (左) でも個々のベシクルを認識できている。20 nm の金粒子は、吹き飛ばしを行った場合 (左) は多数結合しているが、吹き飛ばしを行わない場合 (右) は結合していない。逆に、10 nm の金粒子は (右) で多数の結合がみられる。

予想に反してベシクルの外側で検出された。PS は通常、細胞膜の内側に多く存在していること（リン脂質の非対称分布）が知られている。しかし、がん細胞などの特殊な一部の細胞では細胞膜の外側に PS が露出しており、がんのマーカーや治療の対象としての可能性も検討されている。がん細胞由来のエクソソームでも PS が露出しており、がんを促進させることを示唆する報告もあるが、その詳細は明らかになっていない。がんの診断や治療に利用するには、PS を露出したエクソソームの詳細を明らかにすることが必要であると考え、エクソソームサブクラスを見分けるにあたり PS の局在に着目して研究を進めることにした。

(2) 密度勾配遠心によって腫瘍細胞株由来のエクソソームを分画し、それぞれの密度画分について粒子サイズ分布、総タンパク質量、発現タンパク質を調べた。ヒト膵がん細胞株 MiaPaca-2 では Fr.3 にエクソソームマーカータンパク質が多く濃縮しており、密度も既報のエクソソームに相当していた。しかし、それより密度の低い画分（Fr.1）にも多くの粒子が存在した。それぞれの画分を基板に吸着させて AFM で観察したところ、Fr.1 のベシクルは Fr.3 よりサイズが大きく、また基板上で変形しやすくサイズ分布が広いという特徴がみられた（図 2）。溶液中でのナノ粒子のブラウン運動を利用したサイズ計測法（ナノ粒子トラッキング分析）では、Fr.1 が Fr.3 よりサイズが大きいものの、分布の広さに違いはみられなかった。表面電位について

東京大学の一木隆範教授の協力により調べたところ、Fr.1 のゼータ電位は Fr.3 より負電荷に偏っていることがわかった。AFM で用いた基板表面は正電荷を帯び

ているため、Fr.1 のより負電荷を帯びたベシクルのほうが基板との相互作用が強く、変形が起きやすくなった可能性がある。また、タンパク質や RNA の量はどちらも同程度であったが、体積あたりに換算すると Fr.1 のほうが少なくなった。このように、表面電位や中身の多寡などのベシクルの性質の違いが基板上での吸着挙動に反映されていることが示唆され、基板吸着からベシクルの性質の違いを読み取れる可能性の一端が示された。

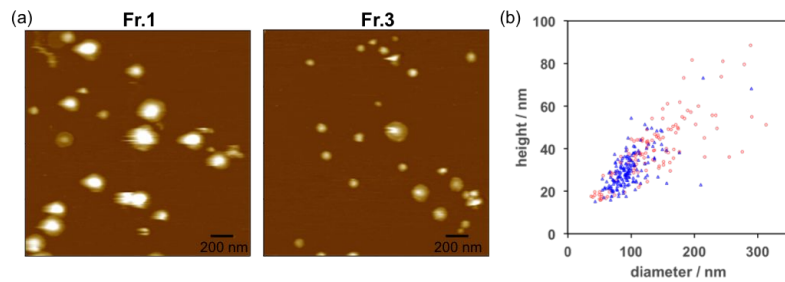


図 2 . 密度勾配遠心で分画した MiaPaca-2 由来エクソソームの Fr.1 と Fr.3 の液中 AFM イメージ (a) と、AFM で計測したベシクルのサイズ分布 (b)。Fr.1 : 赤、Fr.3 : 青。Fr.3 に比べて Fr.1 のサイズが大きく、変形しやすいため分布も広いことがわかる。

(3) 次に、それぞれの画分について PS の検出を試みた。ベシクルを基板に吸着させた後、既報の 2 種類の PS 結合タンパク質（アネキシン V と MFGE8）を用いて PS を金粒子でラベルし、AFM 観察により検出した（図 3）。どちらの場合でも、Fr.1 の方が Fr.3 より金粒子が結合したベシクルの割合が高くなった。ベシクルを基板に固定せず、溶液中に浮遊した状態での PS の露出についても調べた。血液凝固反応を利用したトロンピンアッセイを行ったところ、やはり Fr.1 のほうが Fr.3 より露出した PS が多かったことがわかった。他の腫瘍細胞株として、ヒト結腸がん細胞 HT-29 とヒト繊維肉腫 HT1080 について

も調べた。細胞での PS の露出を調べると、HT-29 は MiaPaca-2 と同じくらい PS 陽性細胞の割合が高かったが、HT-1080 の陽性率は低かった。HT-29 および HT-1080 からエクソソームを採取し、密度で分画して同様に調べたところ、

両者で MiaPaca-2 と同様の結果が得られ、一般的なエクソソームとそれより密度が低いベシクルが存在し、低密度タイプのほうがサイズが大きく PS の露出率が高いことがわかった。以上の結果により、エクソソームには PS 露出率の異なるサブタイプが存在し、一般的なエクソソームより密度の低いサブタイプのほうが PS 露出率が高いことを明らかにした。Fr.1 の低密度サブタイプは、Fr.3 に比べるとエクソソームマーカータンパク質の発現は低いものの、総タンパク質量は遜色なく、また、Fr.1 のほうに多く存在するタンパク質もあった。PS を露出したエクソ

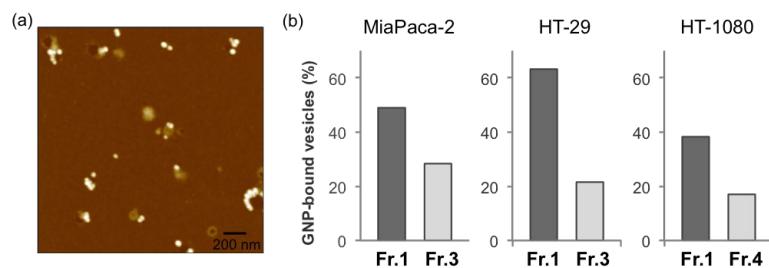


図 3 . PS 結合タンパク質 MFGE8 でコートした金粒子（20 nm）でラベルした MiaPaca-2 由来エクソソームの大気中 AFM イメージ (a)。ヒト腫瘍細胞株由来エクソソーム中の金粒子が結合したベシクルの割合 (b)。いずれの細胞株でも、一般的なエクソソームの画分（Fr.3 あるいは Fr.4）に比べて密度の低い画分（Fr.1）の PS 露出率が高い。

ソームについては、がんの免疫抑制的な腫瘍環境の形成に寄与し、がんを進展させているとの報告もある。本研究で明らかにした2つのサブタイプのどちらがこの役割を担っているのかを明らかにすることが今後の課題である。この2つのサブタイプは生成機構が異なると推定されるので、今後、それぞれの生成機構や機能を明らかにすることで、がんとPS陽性エクソソームの関係が明らかとなり、診断や治療に役立つ有用な情報が得られると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Matsumura, S., Minamisawa, T., Suga, K., Kishita, H., Akagi, T., Ichiki, T., Ichikawa, Y. and Shiba, K., Subtypes of tumour cell-derived small extracellular vesicles having differently externalized phosphatidylserine, 査読有, J. Extracellular Vesicles. 2019, VOL. 8, 1579541.
DOI: 10.1080/20013078.2019.1579541

〔学会発表〕(計4件)

Matsumura, S., Minamisawa, T., Suga, and Shiba, K., Exposed aminophospholipids enriched in a subtype of small extracellular vesicles from tumor cell lines, The 8th International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) Annual Meeting, 2019
松村幸子、南澤宝美后、市川雄貴、芝 清隆、ナノ粒子を利用したエクソソームサブタイプの簡便な検出法の開発、第5回日本細胞外小胞学会、2018
松村幸子、南澤宝美后、菅 加奈子、芝 清隆、ホスファチジルセリンの露出の異なる細胞外ベシクルサブタイプ、第4回日本細胞外小胞学会、2017
松村幸子、南澤宝美后、芝 清隆、異なる密度画分に分離されるエクソソームの性質解析、第3回日本細胞外小胞学会、2016

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: DETECTION OF EXTRACELLULAR VESICLES USING NANOPARTICLES

発明者: 市川雄貴、芝清隆、松村幸子

権利者: イムラ アメリカ インコーポレイテッド、公益財団法人がん研究会

種類: 特許

番号: US 出願番号 15/958241

出願年: 2018年

国内外の別: 米国

〔その他〕

ホームページ等: 公益財団法人がん研究会がん研究所蛋白創製研究部ホームページ

<http://molcraft.org>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。