

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16538

研究課題名（和文）エクソソームの宛先決定メカニズムの解明

研究課題名（英文）Exploring mechanisms for determining exosome destination

研究代表者

山田 名美（Yamada, Nami）

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40727319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、がん細胞は多くの情報伝達物質を内包した小胞エクソソームを分泌し、周囲の細胞とコミュニケーションを行なっていることが明らかとなった。これまで我々は大腸がん細胞が分泌するエクソソームの内包分子およびその機能について、研究をおこなってきた。その過程において、エクソソームはランダムに分泌されているのではなく、宛先が指定された状態で分泌されている可能性が示唆されたため、その分子メカニズムの解明を試みた。エクソソームに内包されるタンパク154種類を同定し、各タンパクについて既報論文やデータベースを解析して、宛先決定タンパク候補の絞り込みを行った。各タンパクの機能について現在解析を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は「エクソソームに宛先があること」および「がん転移には臓器指向性があること」の共通点に着眼し、新たな視点から「Seed and Soil説」の分子メカニズムにアプローチする研究である。すなわちがん転移の分子病態がエクソソームの観点より明らかになることで、がんの転移兆候を早期診断し、転移予防や転移抑制のための治療戦略を立てることに貢献できる可能性がある。具体的には、がんが分泌した転移促進エクソソームを透析に近い形で体液中より除去する方法の開発や、がんが分泌したエクソソームの宛先を取り払い、尿中へ排泄してしまう方法の開発など、発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have revealed that cancer cells secrete extracellular vesicles (EVs) to communicate with surrounding cells in the tumor microenvironment. We have focused on the roles of microRNAs packed within the EVs secreted by colorectal cancer (CRC) cells. In the process, we obtained a suggestive finding that EVs were not secreted at random but had a specific destination. Therefore, in this study we explored proteins and mechanisms for determining EV's destination.

We identified 154 proteins contained within the CRC cell-derived EVs by LC-MS/MS. We further studied structure and function of each protein, and narrowed down the candidates to 67 proteins. Detailed function of each protein in vitro is now being analyzed.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エクソソーム 細胞間コミュニケーション

1. 研究開始当初の背景

がん細胞が細胞外へ分泌する小胞には、エクソソーム、マイクロベジクル、アポトーシス小体などがある。これらはサイズと細胞内の由来によって分類されているが、機能的に分類・分取することは困難であるため、総括して細胞外小胞 (Extracellular vesicles, EVs) と呼ばれている。がん細胞は microRNA やタンパク質などを EVs に包んで分泌し、周囲の細胞に受け渡すことで微小環境を操作していることが近年明らかとなった。また、EVs は体液中で安定に存在できるため、遠隔組織での転移巣形成にも関与していると考えられている。我々はこれまでの研究を通して、「大腸がんは何のために EVs を分泌しているのか」について以下のように、説明してきた。

- (1) 細胞内で不要・有害な分子を細胞外に排出するため (Int J Mol Sci, 2014)
- (2) 血管新生を促進するため (Transl Oncol, 2013; Biochim Biophys Acta, 2014)
- (3) 免疫寛容を誘導するため (Oncotarget, 2016)

一連の過程において、大腸がん由来のエクソソームを取り込む細胞が限定される現象 (エクソソームの細胞指向性) を認めたが、そのメカニズムは不明である。特定の機能分子を特定のレシピエントに宛てて分泌することは、省エネルギーかつ高効率な手法であり、がん細胞が好む戦略と考えられる。加えて、エクソソームを転移予定組織 (土壌 soil) へ飛ばし、十分耕してからがん幹細胞 (種 seed) が定着し増殖する、というのも理にかなっていると考えられる。

2. 研究の目的

以上、まだ仮説ではあるが、すなわち大腸がん由来エクソソームの細胞指向性を決定する分子メカニズムを解明することにより、その先にある「Seed and Soil 説」の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

【研究 1】大腸がん由来エクソソームに含まれるタンパクの機能分析

大腸がん由来エクソソームの質量分析を行い、エクソソームに内包されるタンパクの網羅的解析を行う。さらに Gene Ontology 解析によって機能的に「establishment of localization」に関与するとされるタンパクを絞り込み、各タンパクについて、既報論文や Proiten Data Bank などを参照し、エクソソームの細胞指向性に関与するタンパクを選抜する。

【研究 2】大腸がん由来エクソソームの細胞指向性を決定するタンパクの同定

- (1) 大腸がん細胞 DLD-1 によるエクソソームの生成・分泌の観察
エクソソームの膜タンパクである CD9、CD81 と蛍光タンパクの遺伝子を直列につないだ mEmerald-CD9、mCherry-CD81 を DLD-1 に導入し、安定発現株を作成、蛍光顕微鏡によりエクソソーム分泌をリアルタイムで観察する。
- (2) エクソソームの細胞指向性の検証
mEmerald-CD9、mCherry-CD81 発現 DLD-1 株よりエクソソームを抽出し、各種レシピエント細胞に投与し、エクソソームの取り込み効率を算出する(算出方法:免疫染色、RT-PCR、Western blotting、Image J)。
- (3) エクソソームの細胞指向性を決定するタンパクの同定
mEmerald-CD9、mCherry-CD81 発現 DLD-1 株を用いて【研究 1】で絞り込んだタンパクをノックダウンし、エクソソームを抽出、各種レシピエント細胞のエクソソーム取り込み効率を再度算出する。エクソソーム取り込み効率が総合的に低下したタンパクを“エクソソームの細胞指向性決定タンパク”の有力候補とする。

【研究 3】エクソソームの細胞指向性を決定するタンパクを介したエクソソーム取り込み制御メカニズムの解明

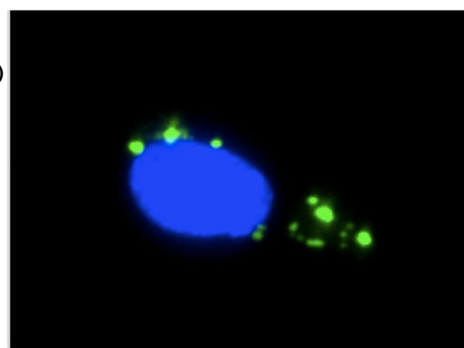
- (1) “エクソソームの細胞指向性決定タンパク”有力候補の蛍光タグつき過剰発現ベクターを作成する。mEmerald-CD9、mCherry-CD81 発現 DLD-1 株に導入し、タンパクの局在および動態 (エクソソームに搭載され、そのエクソソームがレシピエントに取り込まれるまで) を蛍光顕微鏡にてリアルタイムに観察する。またレシピエントのエクソソーム取り込み効率が上昇するか、細胞指向性が増強されるかなどを評価する。

- (2) エクソソームの細胞指向性を決定するタンパクを同定し、そのタンパクを介したエクソソーム取り込み関連シグナルを解明する。
- (3) mCherry-CD81 発現 DLD-1 株をヌードマウスの皮下に移植し、局所における腫瘍増殖、血管外浸潤から転移までを *in vivo* イメージングにて描出することを試みる。さらに可能ならば生体内でどこに蛍光エクソソームが集積するのかを同定する。エクソソームの細胞指向性決定タンパクを過剰発現もしくはノックダウンした mCherry-CD81 発現 DLD-1 株を移植した場合と比較する。

4 . 研究成果

- (1) 大腸がん細胞が分泌するエクソソームに含まれる microRNA-92a-3p が血管内皮細胞に与える効果について解析を行った。大腸がん細胞が分泌するエクソソームに蛍光色素で標識をつけ、血管内皮細胞の培地に投与し、血管内皮細胞への取り込みを経時的に観察した。投与後 16 時間で血管内皮細胞内にエクソソームが最も多く集積した。また、エクソソームを取り込んだ血管内皮細胞内の microRNA-92a-3p の量が有意に増加した。さらに血管内皮細胞の proliferation、migration、tube formation (血管新生の指標となる所見) が有意に促進された。その分子メカニズムを解明するため、microRNA-92a-3p 投与後に血管内皮細胞内で動く遺伝子を網羅的に解析した。その結果、microRNA-92a-3p の標的遺伝子として我々が以前に報告した *Dkk-3* (Yamada N et al., *Transl Oncol*, 2013, 6(4):482-492) をはじめとして、標的遺伝子として知られている *ITGA5*, *CD69* の有意な発現低下を確認するとともに、細胞間接着関連分子である *claudin-11* を新規に標的遺伝子として同定した。*claudin-11* の発現低下、*snail*, *vimentin* の発現上昇を認めことから、microRNA-92a-3p による血管内皮細胞の部分間葉転換 (partial EndoMT) が誘導されている可能性が示唆された。上記の結果をまとめて International Journal of Molecular Medicine 誌上で発表した (Yamada N et al., *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4406)。

右図：血管内皮細胞内で確認された
大腸がん細胞由来のエクソソーム (投与後 16h)
green : エクソソーム
blue : 血管内皮細胞の核
(Yamada N et al., *Int J Mol Sci*, 2019,
20(18):4406)



- (2) 【研究 1】大腸がん由来エクソソームの質量分析 (LC-MS/MS) を行い、内包されるタンパク質の種類を同定した。その結果、大腸がん由来エクソソームにはタンパク 154 種類が内包されていることがわかった。その中でもさらに「establishment of localization」に関与するとされるタンパクを 67 種類同定した。この 67 種類のタンパクから、エクソソームの宛先を決定しているタンパクを絞り込むため、各タンパクの機能に関する既報の論文を参照した。また、「膜融合」「エンドサイトーシス」「リガンド」などのキーワードに基づき Protein Data Bank から特定のタンパクの絞り込みを行った。また、【研究 2】エクソソームの膜タンパクである CD9、CD81 と蛍光タンパクの遺伝子を直列につないだ mEmerald-CD9、mCherry-CD81 を大腸がん細胞株 DLD-1 に導入し、セルソーターにより安定的に蛍光を発する細胞のみを分取した。タイムラプス蛍光顕微鏡観察によりエクソソームが分泌される瞬間を撮影することに成功した。その後コロナ禍に入り、実験中断が余儀なくされたが、オンラインでの学会発表、論文の執筆を行うことで、以下のように研究活動をできる範囲で継続した。
- (3) 2019 年度日本解剖学会 (オンライン) において、「がん微小環境における細胞間コミュニケーションの解明」というタイトルで奨励賞を受賞した。
- (4) 大腸がんが分泌するエクソソームに含まれる microRNA-92a-3p の機能およびバイオマーカーとしての有用性に関して、総説論文 (欧文) を執筆し、Medical Molecular Morphology 誌上で発表した (Yamada N et al., *Med Mol Morphol*, 2021, 54(3):193-202)。
- (5) Extracellular vesicles を用いたがん細胞の生存戦略について、概説した論文 (邦文) を執筆し、月刊「細胞」誌上 (山田名美、月刊「細胞」、2021, 53(10):624-626) および、

アグリバイオ誌上で発表した（山田名美、アグリバイオ、2021,5(13):1170-1173）。

- （ 6 ） 2021 年度日本臨床分子形態学会において、「Extracellular vesicles を用いたがん細胞の生存戦略」というタイトルで奨励賞を受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山田名美	4. 巻 53
2. 論文標題 細胞外小胞を用いたがん細胞の生存戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 624-626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山田名美	4. 巻 5
2. 論文標題 がん細胞の生存戦略におけるExtracellular vesiclesの役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「アグリバイオ」	6. 最初と最後の頁 1170-1173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Nami O., Senda Takao	4. 巻 54
2. 論文標題 Circulating microRNA-92a-3p in colorectal cancer: a review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 193 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00282-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Nami O., Senda Takao	4. 巻 -
2. 論文標題 Correction to: Circulating microRNA-92a-3p in colorectal cancer: a review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00284-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Nami O., Heishima Kazuki, Akao Yukihiro, Senda Takao	4. 巻 20
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Containing MicroRNA-92a-3p Facilitate Partial Endothelial-Mesenchymal Transition and Angiogenesis in Endothelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4406 ~ 4406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山田名美
2. 発表標題 Extracellular vesiclesを用いたがん細胞の生存戦略
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川名美
2. 発表標題 がんにおけるmicroRNAの機能研究と解剖学
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nami Yamada
2. 発表標題 Intercellular communication via extracellular vesicles in tumor angiogenesis
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会 合同大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田名美
2. 発表標題 がん微小環境における細胞間コミュニケーションの解明
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関