

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15790

研究課題名（和文）脂質認識GPCRを介した細胞外小胞による情報伝達機構の解明

研究課題名（英文）Deciphering the intercellular signaling via extracellular vesicles by lipid-recognizing GPCRs

研究代表者

曾宮 正晴（Somiya, Masaharu）

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50788974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞から分泌される細胞外小胞（extracellular vesicles, EV）の新規細胞間情報伝達メカニズムとして、EVの脂質を認識する細胞表面受容体の同定をおこなった。その結果、7回膜貫通膜タンパク質であるGタンパク質共役受容体GPCRがEVの脂質成分を認識することを明らかにし、さらにGPCRを介した細胞内シグナルの活性化メカニズムの一端を明らかにした。ヒトのゲノムには約800種類のGPCRがコードされていることが知られているが、本研究では300種類以上のGPCRを網羅的に解析した結果、EVの脂質を認識する可能性のあるものが複数種類存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞EVが細胞間情報伝達に関与していることが近年明らかになってきている。これまでの研究は主にEVの内部に含まれている核酸（特に小分子RNA）やタンパク質が情報伝達を担っているということが示唆されているが、本研究では新たにEV表面の脂質分子が細胞表面の受容体に認識されて細胞内のシグナル経路を活性化するという新たなメカニズムが存在することを発見したことに意義がある。特に複数種類のGPCRがEVを認識している可能性を明らかにしたという点で新規性が高い。

研究成果の概要（英文）：Extracellular vesicles (EVs) have been known to involve in intercellular communications by delivering cargo molecules. In this study, we identified the novel mechanism of EV-mediated intercellular communication via the interaction between the lipid moiety of EVs and cell surface receptor, G protein-coupled receptors (GPCRs). By using the library of engineered GPCRs that include over 300 human GPCRs, we found multiple candidate GPCRs possibly recognize the lipid moiety of EVs. Those GPCRs may recognize the lipids of EVs and induce intracellular signaling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム GPCR 細胞内シグナリング

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞(extracellular vesicles, EVs)は細胞から分泌されるナノ粒子であり、脂質二重膜とタンパク質で構成される構造物の内部に、タンパク質、核酸、その他の代謝物など、分泌細胞由来の生体分子を含んでいる。2017年にEV内部にRNAが含まれている事が指摘され(Valadi et al., Nat. Cel. Biol., 2007)、EVがRNAを介して細胞間の情報伝達に関与していると考えられ、近年盛んに研究が行われている。しかしながら、生体内で実際にEVの内包物がやりとりされているのか、未だに実験的な証拠が得られていないのが現実である。特に、EV内の小分子RNAが細胞間で交換されている事を示唆する研究論文は多く発表されているが、大半は培養細胞での検証のとどまっており、「EV内のRNAが生体内で細胞間の情報交換に寄与している」という仮説は確固たるものになっていない(Margolis and Sadovsky, PLOS Biol., 2019)。一方で、EVの内包物よりも、EV表面のタンパク質や脂質分子が細胞間情報伝達に寄与するメカニズムも近年指摘されている。例えばShelkeらは、マスト細胞の分泌するEVの表面にTGF- β 1が存在し、このTGF- β 1は間葉系幹細胞に取り込まれ、細胞の遊走を誘導する事を報告している(Shelke et al., J. Extracel. Vesicle., 2019)。すなわち、これまではRNAに代表されるEVの内包物に注目が集まっていたが、EVの表面分子が細胞間情報伝達に寄与している事が徐々に明らかになってきている。

本研究の代表者は、細胞に脂質ナノ粒子であるリポソームやエクソソームを添加した場合に、細胞内の脂質代謝が顕著に変化し、それに伴って細胞内に脂肪滴が多く形成されることを見出している(Fujita et al., BBRC, 2019)。これは、細胞が「ナノ粒子表面に露出している脂質分子」を認識して応答している結果、細胞内の脂質代謝を調節しているのだと思われる。また、この応答は、脂質とタンパク質からなるウイルス様粒子(ワクチンの主成分)などでも生じることから、ウイルスの様な外来性ナノ粒子に対する応答であることも示唆されている。さらに、ナノ粒子に対する応答は、ヒト細胞に限らず、他種の培養細胞(齧歯類、霊長類)でも同様に見られたことから、生物種を超えた普遍的なメカニズムであることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞表面の受容体がナノ粒子表面の脂質成分を認識した結果、細胞内シグナルが活性化する新たなメカニズムが存在するという仮説をたてて検証した結果、シグナル経路にはGタンパク質共役受容体(G-protein coupled receptor: GPCR)が関与していることを突き止めている。この知見は、細胞外に存在する、EVをはじめとする脂質ナノ粒子をGPCRが感知し、細胞内のシグナル経路を活性化させて応答するという、「ナノ粒子応答機構」の存在を示唆している。

本研究の目的は、細胞が脂質ナノ粒子を認識するために必要な受容体(GPCR)を同定し、GPCRを介した細胞内シグナルによって細胞がEVやその他の脂質ナノ粒子に応答するメカニズムを解明する事である。脂質ナノ粒子には、細胞が自ら分泌するEVだけでなく、環境中の外因性小胞や、脂質二重膜を持つエンベロープウイルス、さらにはワクチン抗原や薬物キャリアとしての脂質ナノ粒子など人工物を含めると、様々な物質・材料に対する包括的な細胞応答を理解することにつながると期待される。このように広範な物質やストレスに応答するメカニズムを解明する本研究は、極めて重要である。

3. 研究の方法

複数のヒト由来細胞株を使用し、EVやEVのモデルとしてリポソームを添加した際の細胞内シグナルの活性化を、各種のレポーター系によって測定した。また、EVやリポソームの添加時にGPCRの活性化を阻害する種々の阻害剤を使用して、シグナル伝達メカニズムの同定を行った。EVの脂質に応答するヒトGPCRの同定には、PRESTO-Tango法を利用した。これは、任意のリガンドに結合して活性化するGPCRを同定する、改変ヒトGPCRのライブラリを用いた方法であり(Kroeze et al., Nat. Struc. Mol. Biol., 2015)、300種類以上のヒトGPCR融合タンパク質のDNAを含むライブラリを利用してリガンド添加時のGPCRの活性化を網羅的に解析することができる。この方法によって、脂質ナノ粒子に結合して活性化する可能性のあるGPCRを網羅的に解析した。

PRESTO-Tango法と並行して、公共のデータベースから各種細胞株におけるGPCRの発現パターンを抽出し、実験的に得られた各種細胞株におけるEVやリポソーム添加時のGPCR活性化のパターンとを照らし合わせ、脂質に応答する可能性のあるGPCRの絞り込みをおこなった。

4 . 研究成果

各種阻害剤を用いた実験結果より、EV やリポソームの添加時に細胞内で生じるシグナル伝達系は、GPCR および G タンパク質を介した古典的なシグナル活性経路であることが明らかになった。汎用されるヒト細胞株 5 種類を用いた結果から、EV 添加時に活性化されるものと活性化されないものがあるため、これは GPCR の発現パターンの違いによるものか、あるいは他の要因に起因するのかは不明であるが、前者の可能性を考慮して、公共のデータベースの各種細胞株の遺伝子発現パターンを解析して、GPCR の発現パターンと脂質成分に対する反応性との関連を調べた結果、複数種類の GPCR が脂質に応答していることを示唆する結果が得られた。

当初の予定通り、脂質成分に応答するヒト GPCR の同定のために PRESTO-Tango 法を使用した。HEK293T 細胞に改変 GPCR を遺伝子導入し、EV またはリポソーム添加時におけるレポーター遺伝子の発現上昇を指標にして脂質成分に反応する可能性のある GPCR の同定をおこなった。その結果、ライブラリに含まれる約 3 1 0 種類のヒト GPCR のうち、脂質に反応していると思われるものを複数種類同定した。同定した GPCR の中には、これまでに脂質を認識すると報告されているものとそうでないもの両方を含んでおり、さらにオーファン GPCR も含まれていた。つまりこれまで脂質を認識することが知られていなかった GPCR を複数同定した可能性が高い。

これらの結果を踏まえ、本研究によって EV やリポソームといった脂質ナノ粒子を認識する可能性の高い GPCR を複数種類同定することに成功したと考えた。しかしながら、これらの GPCR が具体的にどのようなメカニズムで脂質分子を認識し、細胞間情報伝達に寄与しているかはまだ全く未解明のままであり、今後の更なる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 93
2. 論文標題 Real-Time Luminescence Assay for Cytoplasmic Cargo Delivery of Extracellular Vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5612 ~ 5620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c00339	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 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Reporter gene assay for membrane fusion of extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 e12171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jev2.12171	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 -

1. 著者名 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Engineering of Extracellular Vesicles for Small Molecule-Regulated Cargo Loading and Cytoplasmic Delivery of Bioactive Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	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) 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00192	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------