

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860047

研究課題名(和文) 高効率shRNAスクリーニング法によるエクソソームの産生と放出機構の解明

研究課題名(英文) Identification of key molecules that mediate exosome secretion by high-throughput shRNA screening

研究代表者

吉田 孟史 (YOSHIDA, Takeshi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員

研究者番号：60635100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：様々な生命現象や疾患は、細胞が互いにコミュニケーションをとることで引き起こされる。これまで細胞間伝達物質としてホルモンやサイトカインが注目されていたが、近年エクソソームと呼ばれる100nm前後の小胞が注目されている。特に、免疫細胞や癌細胞は多くのエクソソームを放出しコミュニケーションをとっているが、その分子機構は十分に解明されていない。本研究では、エクソソームの産生と放出を制御する分子をスクリーニングし、モーター蛋白質ミオシンを同定した。ミオシンを変異させた細胞やマウスを用いて免疫におけるエクソソームの放出を解析し、炎症時に免疫細胞がエクソソームを介して炎症を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cells constituting our body communicate with each other during various aspects of biological processes. The communications have been studied mainly through secretory molecules such as cytokines and hormones, but a novel mechanism of intercellular communication, mediated through exosomes, has recently received much attention as another communication mediator. Exosomes are small vesicles secreted from various kinds of cells particularly immune cells and cancer cells, but their secretory mechanism is still not well-elucidated. In this study, we screened molecules which is involved in exosome secretion, and then identified a motor protein myosin as the molecule. We studied about exosome secretion in cells or mice which had a mutation in myosin, and revealed that immune cells controlled inflammation by communication with each other via exosomes in microbial infection.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム shRNAライブラリー スクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の細胞は互いに連絡を取り合うことで多様な生命活動を支えている。細胞間の情報伝達機構としては、サイトカインなどの分泌蛋白質を介した伝達機構や表面蛋白質を介した細胞間結合による伝達機構がこれまで研究の中心であった。しかし最近、免疫細胞や神経細胞、癌細胞など様々な細胞がエクソソームと呼ばれる小型膜小胞を放出することにより、遠く離れた細胞まで情報を伝達している可能性が注目を集めている。エクソソームは直径 30-100 nm の脂質二重膜に覆われた膜小胞で、細胞内で不要になった物質の排出機構としてこれまで考えられてきた。しかし近年、エクソソームが分泌細胞とその標的細胞の間で mRNA、miRNA、蛋白質、脂質などを交換する重要なメッセンジャーであることが明らかとなりつつある。

特にエクソソームには、免疫細胞由来の生体内抗原や抗原ペプチド/MHC 複合体が含まれていることが示され、免疫細胞間での抗原情報の交換や、免疫細胞の活性化など様々な免疫応答を制御する可能性が示唆されている<sup>1</sup>。更に、エクソソームの内側には、分泌細胞由来の mRNA や miRNA が存在することが明らかとなり、細胞間の遺伝情報伝達や腫瘍細胞による免疫抑制誘導に関与する可能性が示唆されている<sup>2, 3</sup>。また、HIV などのレトロウイルスやヘルペスウイルスなどはエクソソームの放出経路を利用して宿主細胞から放出される事が明らかになっている<sup>4</sup>。更に、アルツハイマー病やプリオン病を引き起こす蛋白質は、エクソソームによって細胞外へ放出される事が明らかとなっている<sup>5</sup>。このようにエクソソームは、免疫、癌、ウイルス感染症、プリオン病など様々な生命現象や疾患に深く関与すると考えられている。しかしながら、これらの研究では、培養細胞上清から精製し濃縮したエクソソームが用いられており、生体内で放出されるエクソソームがこれらの生命現象や疾患にどのように関与するかは明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

エクソソームの生理的機能や疾患との関わりを明らかにする為には、エクソソームの放出を生体内で制御することが必要不可欠であり、その為にはエクソソームの産生と放出機構を解明することが最も重要な課題となっている。エクソソームは多胞性エンドソームと呼ばれる膜小胞の中で産生された後、細胞膜へと輸送され、多胞性エンドソームが細胞膜と融合することにより細胞外へと放出される。これまで多胞性エンドソームが細胞膜へと移動するのに関与する分子として RAB 低分子 GTPase が報告されているが<sup>6</sup>、多胞性エンドソーム内でエクソソームの産生を促進する分子機構、更には多胞性エンドソームと細胞膜との融合に関与する分子機

構は未だに明らかになっていない。そこで、本研究では多胞性エンドソームでのエクソソームの産生機構および多胞性エンドソームと細胞膜との融合機構の解明を目的とし、エクソソームの生理機能の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト白血病由来細胞 (K562 細胞) は 10% 非働化済み牛胎児血清 (FBS) 含有 RPMI-1640 培養液で培養した。また、エクソソームに関わる実験では、非働化済み FBS を PEG-10,000 (SIGMA 社) で処理することでエクソソームを除去したものをを用いた。

#### (2) マウス

Myosin Va 変異マウス (C57BL/6J-Myo5a<sup><d-n>/Nem</sup>) は RIKEN Bio Resource Center より入手し、8-16 週齢のマウスを実験に用いた。Myosin Va 遺伝子の両アレルに変異が存在するマウスを変異型マウスとして使用し、片アレルまたは両アレルとも野生型のマウスを野生型マウスとして使用した。

#### (3) 抗体

ウェスタンブロット法には Anti-human CD63 antibody (BioLegend 社)、Anti-mouse CD63 antibody (BioLegend 社)、Anti-mouse CD9 antibody (BioLegend 社)、Anti-mouse /rat CD81 antibody (BioLegend 社)、Anti-TSG101 antibody (SIGMA 社)、Anti-Myosin Va antibody (Cell Signaling 社)、Anti-Flotillin 2 antibody (BD 社)、Anti-mouse IgG-POD (Jackson Immuno Research 社)、Anti-rat IgG-POD (Jackson Immuno Research 社)、Anti-hamster IgG-POD (Jackson Immuno Research 社)、Anti-rabbit IgG-POD (Jackson Immuno Research 社) を用いた。

#### (4) FACS による細胞内エクソソーム量の評価

K562 細胞を 10  $\mu$ M monensin で 37  $^{\circ}$ C、1 時間処理することでエクソソームの放出を誘導した。続いて、細胞を monensin を含まない培養液で 37  $^{\circ}$ C、1 時間培養することで細胞にエクソソーム産生を誘導した。細胞回収 1 時間前に 50 nM LysoTracker (Thermo 社) で 1 時間処理することで細胞内のエクソソームを染色した。この各段階の細胞を回収し、FACS Aria (BD 社) を用いて LysoTracker のシグナルを測定することで細胞内エクソソームの量を評価した。

#### (5) エクソソーム放出関連分子のスクリーニング

K562 細胞 2 X 10<sup>7</sup> 細胞に DECIPHER Human shRNA ライブラリ (Cellecra 社) をレンチウイルスベクターにより MOI=0.5 で導入することにより、shRNA ライブラリ導入

K562 細胞を作製した。

ライブラリ導入細胞は 1 時間の monensin 処理を行い、細胞内エクソソーム量が多い細胞集団を FACS Aria で採取した。採取した細胞集団は細胞培養により増殖させた後、同様のスクリーニングを合計 5 回繰り返すことで、エクソソーム放出量の少ない細胞集団を濃縮した。

スクリーニングの結果得られた細胞集団  $1-10 \times 10^6$  細胞は Lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K] 500  $\mu\text{L}$  中で 55  $^{\circ}\text{C}$ 、4 時間浸透し溶解した。細胞溶解液 500  $\mu\text{L}$  に 2-プロパノール 400  $\mu\text{L}$  を添加し、15,000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間の遠心により得られたペレットを 70%エタノール 250  $\mu\text{L}$  で洗浄し、TE 100  $\mu\text{L}$  に溶解した。得られたゲノム DNA から標的遺伝子を特定するためのバーコード配列を PCR 法で増幅し、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社) にクローニングしシークエンス解析を行った。

#### (6) ウェスタンブロット法によるエクソソームの検出

細胞培養液またはマウス腹水回収液 8-10 mL は 800 X g、4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間の遠心の後、その上清を 12,000 X g、4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間の遠心を行い、さらにその上清を 100,000 X g、4  $^{\circ}\text{C}$ 、2-4 時間の遠心を行った。得られた沈殿物を 2 X SDS sample buffer [100 mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% glycerol, 0.001% BPB] 60-100  $\mu\text{L}$  で溶解し、ウェスタンブロット用サンプルとした。

ウェスタンブロット用サンプル 5-15  $\mu\text{L}/\text{lane}$  を 10% TGX gel (Bio-Rad 社) にアプライし、200V、35 分間電気泳動を行った後 PVDF メンブレンに転写を行った。メンブレンは 5%スキムミルク/PBS-T で室温、1 時間ブロッキングを行った後に、一次抗体/5%スキムミルク中で室温、1 時間インキュベーションした。続いて PBS-T で 3 回洗浄後、二次抗体/5%スキムミルク中で室温、30 分間インキュベーションを行った。最後に PBS-T で 3 回洗浄後、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo 社) と反応させ LAS4000 mini (GE 社) を用いて検出した。

#### (7) LPS による樹状細胞からのエクソソーム放出

マウス大腿骨および下腿骨から骨髓細胞を採取し、ACK lysing buffer (Thermo 社) で溶血させた後に、骨髓細胞  $5 \times 10^5$  cells/24-well plate で播種し BMDC medium (20 ng/mL GM-CSF, 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol, 10% FBS/DMEM) 500  $\mu\text{L}/\text{well}$  中で 37  $^{\circ}\text{C}$ 、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。2-3 日毎に培養液を新しい BMDC medium に交換し、培養 6-9 日目の細胞を BMDC として

使用した。分化誘導 6-9 日目の BMDC は 0.1 または 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 存在下で 24 時間刺激した。

#### (8) Myosin Va のリン酸化の検出

細胞を RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.25% Sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40] で 4  $^{\circ}\text{C}$ 、20 分間溶解し、15,000 X g、4  $^{\circ}\text{C}$ 、20 分間遠心することで細胞溶解液を回収した。細胞溶解液 20  $\mu\text{g}$  と Phos-tag agarose (Wako 社) 40  $\mu\text{L}$  を反応させた後に 2 X SDS sample buffer 20  $\mu\text{L}$  でリン酸化蛋白質を溶出した。溶出したリン酸化タンパク質は 7.5% SDS polyacrylamide gel で電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは 5%スキムミルクでブロッキングを行った後に、Anti-Myosin Va antibody および Anti-rabbit IgG-POD を処理することでリン酸化 Myosin Va を検出した。

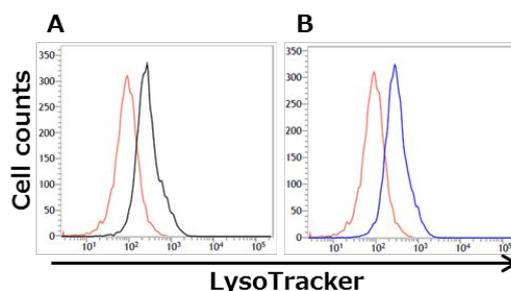
#### (9) 腹膜炎によるエクソソームの放出

マウスに heat killed E.coli 500 mg/kg を腹腔内投与した。24 時間後、PBS 8 mL を用いて腹水を回収した。回収した腹水は 800 X g および 12,000 X g の遠心後の上清を超遠心することによりエクソソームを精製し、ウェスタンブロット法により検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) エクソソーム放出関連分子のハイスループットスクリーニング

エクソソーム放出関連分子を同定するために、FACS を用いたエクソソーム放出能評価系の構築をおこなった。ヒト白血病細胞株 K562 細胞は Ca<sup>2+</sup>刺激によりエクソソームを放出することが知られている。細胞内のエクソソーム貯留している器官である MVE を LysoTracker で染色することで、この現象を

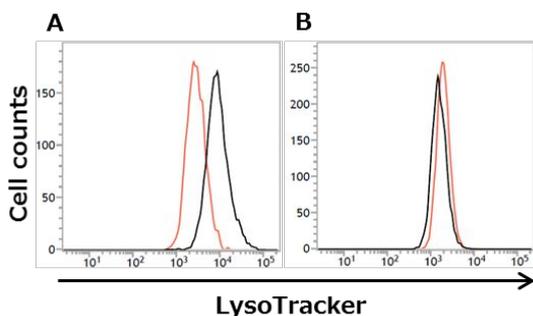


**図 1 FACS を用いたエクソソーム産生および放出の解析**

(A) K562 細胞を monensin 刺激した細胞 (赤) では monensin 未刺激細胞 (黒) に比べ細胞内エクソソームが放出されたことにより LysoTracker のシグナルが減少した。(B) Monensin 刺激した K562 細胞を monensin 除去後 1 時間培養した細胞 (青) では monensin 刺激細胞 (赤) に比べ細胞内エクソソームが産生されたことにより LysoTracker のシグナルが増加した。

FACS を用いて解析可能であるかを検討した。その結果、monensin により  $Ca^{2+}$  流入を誘導した細胞では monensin 未処理の細胞に比べ LysoTracker のシグナルが弱く、細胞内 MVE の減少を反映する結果が得られた (図 1A)。さらに、monensin で 1 時間刺激した後に、monensin を除去した細胞では細胞内 MVE が再び産生される現象が LysoTracker 染色により確認された (図 1B) 以上の結果より、LysoTracker 染色により FACS を用いたエクソソーム放出解析が可能であることが示され、FACS Aria を用いてエクソソーム放出能に異常を持つ細胞を選別することが可能となった。

次に、レンチウイルス shRNA ライブラリを K562 細胞に導入することで shRNA 導入 K562 細胞ライブラリを作成した。このライブラリに monensin 刺激を与えたとき、MVE の放出に障害を持つ細胞、つまり LysoTracker のシグナルが高く維持されている細胞を FACS Aria を用いて選別した。選別した細胞を増殖し、この操作を 5 回繰り返した。その結果、monensin 刺激を与えても MVE の放出が誘導されない細胞が濃縮された (図 2)。これらの細胞のシーケンス解析を行うことで、shRNA の標的遺伝子として Myosin Va を特定した。



**図 2 エクソソーム放出関連分子のスクリーニング**

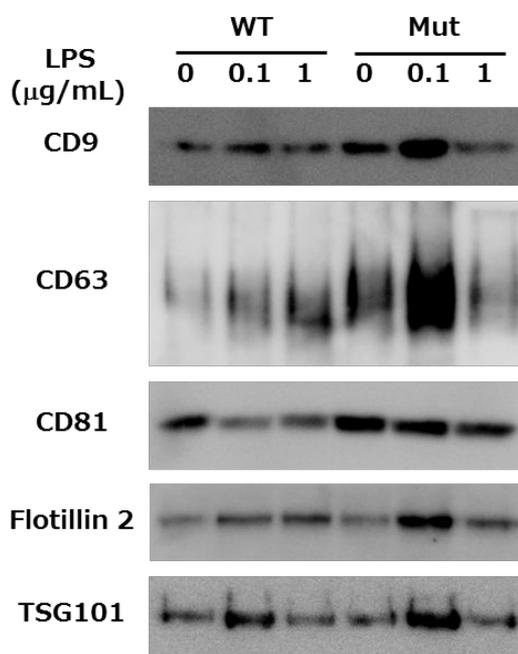
(A) スクリーニング前の shRNA ライブラリ導入 K562 細胞に monensin 刺激をおこなった (黒; 刺激前、赤; 刺激後)。 (B) 5 回 スクリーニング後の shRNA ライブラリ導入 K562 細胞に monensin 刺激をおこなった (黒; 刺激前、赤; 刺激後)。

## (2) Myosin Va 変異体発現細胞でのエクソソーム放出

2010 年、Ostrowski らは RAB27A がエクソソーム放出を制御することを報告している<sup>6</sup>。私たちが取得した Myosin Va は Rab27A と相互作用することが知られていることから<sup>7,8</sup>、Myosin Va も同様にエクソソームの放出に関与する可能性が高いことが推察された。また、Myosin Va はマクロファージや樹状細胞などで高発現している。近年、樹状細胞が放出するエクソソームには抗原-MHC 複合体が含まれており、エクソソームを介し

た抗原提示が行われる可能性が示唆されている<sup>9</sup>。そこで、Myosin Va が樹状細胞のエクソソーム放出にどのように関わっているのかを、Myosin Va 変異体発現細胞を用いて検証した。

Myosin Va の機能欠損変異体発現マウスから採取した骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いて、培養上清に放出されたエクソソームをウェスタンブロット法により検出した。その結果、Myosin Va 変異体発現 BMDC では野生型に比べエクソソーム放出量が高い結果が得られた。また、BMDC はリポ多糖 (LPS) 刺激することによりエクソソーム放出が促進するが、0.1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激においても同様に Myosin Va 変異体発現 BMDC でエクソソームの放出が亢進していた。一方、1  $\mu\text{g/mL}$  LPS 刺激時は細胞毒性が強すぎたため、エクソソーム放出量の亢進は認められなかった (図 3)。

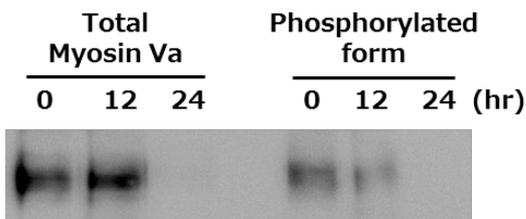


**図 3 Myosin Va はエクソソームの放出を制御する**

野生型または Myosin Va 変異型マウス由来 BMDC を用いて、LPS 刺激により BMDC から分泌されるエクソソームをウェスタンブロット法で検出した。

次に、Myosin Va の活性化について検証を行った。Myosin Va はリン酸化されることで活性化されることが知られており、LPS 刺激時のリン酸化 Myosin Va の量を Phos-tag と Myosin Va 抗体を用いてウェスタンブロット法により検出した。その結果、LPS 刺激 12 時間後にはリン酸化 Myosin Va が減少しており、24 時間後には Myosin Va 蛋白質自体が大きく減少していた (図 4)。これらの結果から、定常状態ではリン酸化 Myosin Va によりエクソソーム放出が抑制されているが

LPS 刺激時には脱リン酸化および Myosin Va が分解されることでエクソソーム放出が促進されることが示された。このことは Myosin Va がエクソソームをリソソームなど分解器官へと輸送する過程に参与している可能性を示しており、今後さらに詳細な検証が必要である。

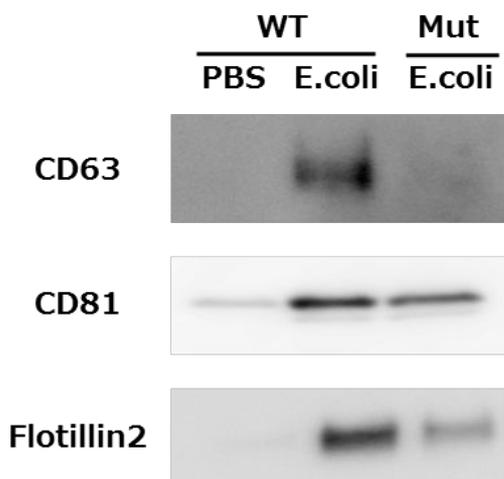


**図4 LPS 刺激時の活性化 Myosin Va の変動**

野生型マウス由来 BMDC を用いて、LPS 刺激時の Myosin Va の発現(左)およびリン酸化 Myosin Va の発現(右)をウェスタンブロット法で検出した。

(3) Myosin Va 変異体発現マウスでの自然免疫におけるエクソソーム放出

生体内でのエクソソームの役割を Myosin Va 変異体発現マウスを用いて検証した。大腸菌により腹膜炎を誘導した野生型マウスではエクソソームの放出が促進するが、Myosin Va 変異体発現マウスではエクソソームの放出が促進していなかった(図5)。この結果は *in vitro* での LPS 刺激によるエクソソーム放出の結果を反映していなかった。この理由として Myosin Va が細胞の遊走にも関わっていることが報告されており<sup>10</sup>、変異体発現マウスではエクソソーム放出細胞の腹腔内への遊走が減少したことで、結果としてエクソソームが減少したことが推察される。今後は、



**図5 Myosin Va 変異体発現マウスでは炎症時のエクソソームの放出が制御される**

野生型または Myosin Va 変異型マウスに E.coli による腹膜炎を引き起こした。腹腔内のエクソソームの分泌量をウェスタンブロット法により検出した。

用いる病原菌や抗原などを工夫することで遊走能の差が小さい実験系を目指すことで、あるいは *ex vivo* での検証をおこなうことで樹状細胞が放出するエクソソームがどのように抗原提示に関わっているのか、またその際に Myosin Va がどのような機構で関わっているのかを明らかにする。

(4) 結論

本研究では、エクソソーム放出関連分子のハイスループットスクリーニング系を構築し、shRNA ライブラリ導入白血病細胞からエクソソーム放出に関わる分子として Myosin Va を取得した。Myosin Va 変異体を発現した樹状細胞での解析から、エクソソーム放出が Myosin Va により制御されていることを明らかとした。樹状細胞が放出するエクソソームには抗原-MHC 複合体が発現していることから、Myosin Va はエクソソームを介した抗原提示において重要な分子である可能性が考えられる。今後、エクソソームを介した抗原提示が実際に生体内でどのように引き起こされているか詳細な検証が必要と考えられる。

< 引用文献 >

- (1) Thery C, et al., Nat Rev Immunol. 9: 581-593 (2009)
- (2) Skog J, et al., Nat Cell Biol. 10: 1470-1476 (2008)
- (3) Ueda R, et al, Proc Natl Acad Sci USA. 106: 10746-10751 (2009)
- (4) Mori Y, et al., Traffic. 9: 1728-42 (2008)
- (5) Rajendan L, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 103: 11172-11177 (2006)
- (6) Ostowski M, et al., Nat Cell Biol. 12: 19-30 (2010)
- (7) Wilson SM, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97:7933-7938 (2000)
- (8) Wu X, et al., J Cell Sci. 114:1091-1100 (2001)
- (9) Zitvogel L, et al., Nat Med. 4:594-600 (1998)
- (10) Eppinga RD, et al., Cell Motil Cytoskeleton. 65:197-215 (2008)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
吉田 孟史 (YOSHIDA, Takeshi)  
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員  
研究者番号: 60635100

(2) 研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし