

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670158

研究課題名(和文) エキソソームへの積荷ソーティング調節を介した癌の悪性化制御

研究課題名(英文) Regulation of cancer malignancy through the cargo sorting into exosomes

研究代表者

中村 俊一 (Nakamura, Shun-ichi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40155833

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)：本研究では癌の悪性化に関与する分子としてMetに着目し、エキソソームへの輸送がS1Pシグナルの制御下にあるかを検討した。

ヒト・メラノーマB16-F10細胞を培養し、エキソソームを回収しMetの量を免疫プロット法にて定量した。細胞をスフィンゴシン・キナーゼ(SK)阻害薬HACPTで処理した細胞に於いてはMetの量は有意に減少していた。しかしながら、SK2をsiRNAを用いてノックダウンしたところ、Met量の優位な減少は認められなかった。現在更にCRISPR/Casシステムを用いてSK2のノックアウト細胞を作製し、引き続きMet輸送とS1Pシグナルの関係を解析中である。

研究成果の概要(英文)：In the present studies we investigated the role of S1P signal in the cargo sorting into exosomes. As for the cargo molecule, we focused Met protein, which is known to play roles in the malignancy of several cancers. We cultured human melanoma B16-F10 cells in the absence or presence of sphingosine kinase (SK) inhibitor, HACPT for 1 day and quantitated the amount of Met in the exosomes. HACPT caused a significant decrease in Met amount compared with the control. However, knockdown of SK2 by a specific siRNA showed no significant changes in the amount of Met. We are now preparing SK2-knockout cells by a CRISPR/Cas system to investigate further the role of S1P signal in the Met sorting into exosomes.

研究分野：生化学

キーワード：エキソソーム S1P スフィンゴシン・キナーゼ Met

1. 研究開始当初の背景

血液、リンパ球、体液には、直径 50-100nm の生体膜で包まれた小胞が存在し、一般にエキソソーム

(exosome) と称され、多くの細胞種から分泌されている。樹状細胞から放出されるエキソソームは抗原提示や、メラノサイトからのエキソソームはメラニン放出、更には最近では腫瘍幹細胞からのエキソソームは周囲の癌細胞の悪性化に必要な癌微小環境形成に関与すると考えられ、その医学生理学に於ける重要性からエキソソーム研究は最近関心が高まっている。

エキソソームの放出メカニズムに関しては、まずエンドサイトーシス等によって細胞内に取り込まれた外部成分が細胞膜で被包され初期エンドソームとなり、成熟を経て後期エンドソーム/multivesicularbody (MVB) となる。MVB はリソソームと融合して分解経路をたどるか、またあるものは細胞膜と融合して内容物の小胞をエキソソームとして細胞外に放出するいずれかの運命をたどる。MVB のリソソーム系への選別機構に関しては ESCRT(endosomal sorting complex required for transport) 因子群が次々に発見され、その選別機構の詳細が明らかにされた。一方、MVB のエキソソーム系への選別機構に関してはスフィンゴ脂質の代謝産物セラミドが重要な因子であるとの報告が米国のグループよりなされたものの (Trajkovic et al. (2008) Science 319, 1244)、その詳細に関しては現在も不明なままであった。報告者らのグループは最近、MVB 上に S1P の産生酵素、スフィンゴシン・キナーゼ 2 (SphK2) が特異的に集積することから、S1P と

MVB の成熟課程との関係を調べたところ、MVB 上の S1P 受容体の持続的活性化が積荷分子 (CD63 など) のエキソソーム系 MVB へのソーティングに必要不可欠であることを世界に先駆けて報告した (Kajimoto et al. (2013))。これらの結果を踏まえて報告者らは癌の悪性化関与する積荷分子のエキソソームへの放出に S1P シグナルが如何に関与しているかに焦点を絞り解析することにした。

2. 研究の目的

そこで本研究ではこの知見を更に推し進め、癌の転移・浸潤に関与し、エキソソームとして放出されることが知られる Met 遺伝子産物や miRNA などの「積荷分子」に注目し、これらの癌の悪性化に関与する分子が S1P シグナル依存性にエキソソーム中にソーティングされることを明らかにし、S1P シグナルを制御することで「積荷分子」のエキソソーム中へのソーティングが調節可能となり、実際に動物実験で癌細胞の転移・浸潤が制御できることを目的とした。

3. 研究の方法

メラノーマなどの転移性の高い細胞株 (B16-F10 細胞株) を用い、まず HACPT などのスフィンゴシンキナーゼ (SphK) 阻害剤や W146 などの S1P 受容体阻害剤を処置する、あるいは SphK2、S1P 受容体に選択的な siRNA をそれぞれリポフェクション法により導入し SphK2 または S1P 受容体の発現レベルを下げる、などの方法により SphK2 あるいは S1P 受容体の機能を抑制した状態で、血清中のエキソソームを超遠心法により取り除いた液体培地中で一定時間培養し、超遠心法により細胞培養上清中のエキソソームを回収し、エキソソーム中の積荷タンパク質 (Met やアミロイドタンパク質など) を免疫染色法を用いて同定した。

4. 研究成果

まず始めに、悪性度の高いヒト・メラノーマ細胞 (B16-F10 細胞) を培養し、培養液に放出されたエキソソームを回収し、積荷タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動・銀染色法により解析した。コントロール条件に比べてスフィンゴシン・キナーゼ阻害薬 HACPT で処理した細胞に於いてはエキソソーム中の積荷タンパク質の量は有意に減少していた。しかしながら、銀染色のパターンで比較すると、HACPT 処理により有意に放出が減少するタンパク質が約三分の一認められるものの、HACPT 処理で変化しないタンパク質も残りの約三分の一に認められた。以上の結果から、エキソソームとして放出される積荷タンパク質の一部は S1P シグナルにより調節を受けることが確かめられた。しかしながらそれ以外のタンパク質はどのような制御を受けエキソソーム中に送られるのかは不明である。次に癌の悪性化に係わる既に報告されているタンパク質が S1P シグナルの制御を受けるか否かに関して解析を行った。これまで色々な癌細胞に於いて悪性化に寄与すると考えられている Met タンパク質に着目し、市販の抗体を用いて Met タンパク質の定量を試みた。B16-F10 細胞株を 1 日培養した培養液からエキソソームを回収し、エキソソーム中の内因性 Met 量の定量を試みたが、抗体の検出感度以下であったため、Met 発現細胞を用いて実験を行うことにした。まず、Met 遺伝子をクローニングし、これをネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドに入れ、Met を発現する B16-F10 細胞安定株を作成した。この安定株をスフィンゴシン・キナーゼ阻害薬 HACPT 処理細胞

と非処理細胞 (コントロール) で 1 日培養し、培養上清からエキソソームを回収した。次に Met 抗体を用いてエキソソーム中の Met を電気泳動、免疫ブロット法にて定量したところ、HACPT 処理により Met の量が有意に減少する結果が得られた。一方で、HACPT は SphK1 および SphK2 のアイソザイムをどちらも抑制する為に、SphK2 に特異的な現象を観察するために、SphK2 遺伝子に対する特異的な siRNA を用いて、SphK2 をノックダウンする実験を行った。その結果、コントロール siRNA に比べ SphK2-siRNA を作用させた細胞では、SphK2 タンパク質の量は約 50% 減少していたものの、SphK2-siRNA 細胞から回収したエキソソーム中の Met の量はコントロールに比べ、約 10% 程度の減少に留まった。この結果は申請者らが報告した先行論文 (Kajimoto et al. (2013)) の結果とは異なるものである。先行論文では HeLa 細胞からの CD63 のエキソソームへの放出は HACPT 処理により約 70~80% 抑制され、また SphK2 ノックダウン細胞でも約 50~60% の抑制が認められた。これらの差は HeLa 細胞と B16-F10 細胞との差にあるのか、積荷分子 CD63 と Met の差にあるのか確かめる必要がある。そこで申請者らは今回実験に用いた siRNA によるノックダウンの結果、残っている内因性の SphK2 の影響により計画通り S1P シグナルを遮断することが出来ず、エキソソーム中への Met タンパク質の放出が抑制出来なかった可能性を考えた。この可能性を証明するためには siRNA によるノックダウン実験ではなく、ダブル・アレル・ノックアウトを用いた完全消失実験を行

うことを計画した。そこで現在 SphK2 に対するガイド遺伝子を作成し、CRISPR/Cas システムを用いた B16-F10 細胞に於ける SphK2 の完全ノックアウト細胞を作成している段階である。この細胞を用いてエキソソーム中に放出される Met タンパク質の放出量をコントロール細胞と比較することにより、また更にノックアウト細胞に SphK2 遺伝子を戻すレスキュー実験を行うことにより、癌の悪性化に關与する Met タンパク質のエキソソームへの放出における S1P シグナルの關与を明らかにする予定である。

本研究は、申請者らの先行論文に記載された「S1P 仮説」を更に敷衍し、癌の悪性化に關与する癌微小環境の形成で最近注目を集めているエキソソーム中に輸送される積荷分子の一つである Met タンパク質に注目し、その輸送に於ける S1P シグナルの役割を解明することに重点を於いて進められた。現在ノックアウト細胞を作製し継続的に研究を進めてゆく予定であるが、今後 Met 分子のみならず、miRNA などの積荷分子にも着目し研究成果を論文等で報告する予定である。本研究の推進によりエキソソーム中に輸送される癌の悪性化に關与する分子が、S1P シグナルを調節することにより制御可能になれば、新たな癌に対する分子標的治療の開発につながることが期待される。また、今後神経変性疾患に關連するタンパク質のエキソソーム放出の病態生理学的意義も加えてエキソソームと疾患との關係を更に解析してゆく予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Jesko H, Okada T, Strosznajder RP, Nakamura S., Sphingosine kinases modulate the secretion of amyloid beta precursor protein from SH SY5Y neuroblastoma cells; the role of alpha-synuclein. Folia Neuropathol. (2014) 52, 70-78

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 梶本武利、岡田太郎、宮聡志、張麗芳、中村俊一 Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes

第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム

(2014) 10 月 京都

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 梶本武利、岡田太郎、中村俊一、「エキソソームの形成機構」細胞工学 (2015) 34, 168-173

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/gs/field/basic/biochem.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村俊一 (NAKAMURA, Shun-ichi)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40155833

(2) 研究分担者

岡田太郎 (OKADA, Taro)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80304088