

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K12550

研究課題名(和文) Exosomeの体内動態機序の解明に基づいたアクティブターゲティング技術の開発

研究課題名(英文) Characterization of tumor-derived exosomes for drug delivery

研究代表者

角田 慎一 (Tsunoda, Shin-ichi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：90357533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬物動態制御技術の確立に資する基礎情報を得ることを目的に、がんの臓器特異的転移のメカニズムに関わることが示唆されている分泌小胞(exosome)に着目し、exosomeの作用の解析及び機能分子の探索を実施した。本研究の結果、がん細胞が、血管新生の促進作用を有するexosomeを分泌していること、また、exosome上のEphA2を介して血管内皮細胞に増殖シグナルを伝えていることが判明した。今後、exosomeのin vivoでの動態など、がん転移との関連をより詳細に調べることにより、薬物動態制御技術に応用可能ながんの臓器特異的転移のメカニズム解明につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, characterization of tumor-derived exosomes were performed to collect basic knowledge useful for development of drug delivery technology. We found that lung cancer cells secreted angiogenic exosomes and in vitro tube-formation and proliferation of endothelial cells was stimulated via EphA2 on the exosomes. These data and also further investigation of metastasis-related exosomes would provide useful knowledge for active targeting and other drug delivery technologies.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：生体機能利用 生体分子 薬学 癌 exosome EphA2

1. 研究開始当初の背景

有効で安全な薬物治療を達成するためには、作用すべき組織や細胞により多くの薬物を送達し、それ以外の部位への分布はできるだけ抑制する方法論の確立が重要である。このような、必要な時に、必要な量だけ、必要な場所に薬物を送達する“Drug Delivery System (DDS)”の概念は、薬物の潜在的能力を最大限に発揮させるための技術として検討されてきた。近年、標的指向性のDDS医薬の一例として抗体-抗がん剤複合体(ADC)が臨床応用され、標的細胞に対して特異的に薬物を送達することが可能になっている。しかし、モノクローナル抗体に基づく医薬品であるADCのがん組織への集積は十分とはいえず、より有効なDDSの開発が期待される。

近年、exosomeと呼ばれるナノベシクルが、がん細胞などの各種細胞から分泌されており、exosome内や表面に包含されたタンパク質や核酸(mRNA・miRNAなど)を介して、遠隔の細胞に対する情報伝達に関与していることが示唆されている。そのため、exosomeは、従来のサイトカインやケモカインに加えて、新たな細胞情報伝達因子として注目されている。特に、血中安定性に乏しい核酸の輸送担体としての役割が注目されている。さらに、がん細胞分泌exosomeは特定の臓器・組織に送達され、がんの転移巣形成のための環境を整えている役割を担っていることも示唆されている。すなわち、exosomeは生体内で特異的な動態を示す担体であることから、exosomeの生化学的・動態学的特性を解析することで、DDSに応用できる知見が得られるものと期待される。

2. 研究の目的

上記背景に基づき、本研究では、薬物動態制御のためのアクティブターゲティング技術の確立に資する基礎情報を得ることを目的に、がんの臓器特異的転移のメカニズムに関わることが示唆されている分泌小胞(exosome)に着目し、がん細胞分泌exosomeの作用の解析及び機能分子の探索を実施した。モデルとして転移性肺がん細胞株から分泌されるexosomeの特性を分析し、転移と関連するexosome上の分子の探索を試みた。

3. 研究の方法

(1) exosomeとがん転移との関連解析

本項目では、exosomeと、がん転移巣の形成に重要と考えられる血管新生との関連性を調べるため、転移性がん細胞株由来のexosomeが培養血管内皮細胞の管腔形成に及ぼす影響を検討した。

細胞及び exosome: 培養ヒト肺がん細胞株 HARA-B は JCRB 細胞バンクより入手した。10% FCS (Biowest) 含有 RPMI-1640 培地で培養した。初代培養ヒト肺胞上皮細胞 HPAEpiC は ScienCell 社より購入し、専用培地で培養した。細胞の培養上清に分泌される exosome を

超遠心法により回収・精製し、各種実験に供した。各細胞を培養ディッシュ上で継代培養し、サブコンフルエント状態になったものを PBS で洗浄し、無血清培地 (OptiMEM 培地、Invitrogen) に置換して 72 時間培養した。培養上清を回収し、200 g で 5 分の遠心で細胞を除去し、上清を回収した。次に、上清を 16,000 g で 20 分間遠心分離し、上清を 0.22 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC) でろ過することで細胞デブリ等を除去した。回収した溶液を超遠心機により 140,000 g、70 分遠心分離し、ペレットに PBS を加えて、再度 140,000 g で 70 分遠心分離することで洗浄し、得られたペレットを PBS で懸濁し、exosome 分画として回収した。Exosome の回収状況は動的光散乱法による粒子系測定、および透過電子顕微鏡観察により、一般的に知られる exosome と同様な特性を示すことにより確認した。また、exosome 量は含有タンパク質量を指標とした。

血管新生誘導能の解析: ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を細胞外マトリックス成分であるマトリゲル®の層上で培養することで管腔形成の程度を測定し、培養液に exosome を添加した際に管腔形成に与える影響を評価した。陽性コントロールとして、リコンビナント huVEGF を添加した。細胞を Calcein-AM で蛍光染色し、管腔長は蛍光顕微鏡および MetaExpress Software (Molecular Device) により計測した。

細胞内シグナルの解析: HUVEC の主な血管新生関連細胞内シグナル伝達分子として、VEGFR2, Erk1/2, p38 の活性化 (リン酸化) をウエスタンブロット法により解析した。

(2) 血管新生誘導に関わる exosome 膜タンパク質の探索

プロテオーム解析: HARA-B および HPAEpiC 由来 exosome 上のタンパク質を、質量分析法によるプロテオーム解析により同定した。タンパク量として 1 μg の exosome を 50 μl Tris-HCl (pH 8.0) 100 μl に希釈し、20 ng のトリプシンを添加後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間反応させることで、タンパク質を消化した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮した後、ZipTip C18 チップを用いて精製してサンプル溶液とした。質量分析には LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) を用いた。タンパク質の同定には、Mascot search により swiss prot のデータベースをもとに解析した。

血管新生誘導関連分子の機能解析: 候補分子として同定した膜タンパク質 EphA2 に着目し、リコンビナント EphA2-Fc キメラタンパク質、および抗 EphA2 抗体を添加した際の HUVEC の細胞増殖に与える影響を解析した。細胞増殖は WST-8 assay キットにより解析した。

4. 研究成果

(1) exosome とがん転移との関連解析

Exosome が適切に回収・精製できていることを確かめるため、動的光散乱法及び電子顕微鏡観察を行った (図 1)。解析の結果、exosome として一般的に知られているサイズ (直径 100nm 程度) と形状を有していたことから、適切に exosome が調製できているものと考えられた。

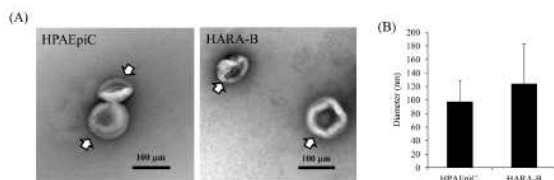


図 1 HARA-B 細胞と HPAEpic 細胞由来 exosome の形状分析

(A) 透過電子顕微鏡観察像 (B) 動的光散乱法による粒子径

次に、がん細胞分泌 exosome が、転移巣の形成に関与する可能性を探るため、血管新生に対する影響を評価した。培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞増殖及びマトリゲル上での管腔形成に与える影響を検討したところ、HARA-B 由来 exosome は、HPAEpic 由来 exosome に比べて管腔形成を有意に促進した (図 2)。

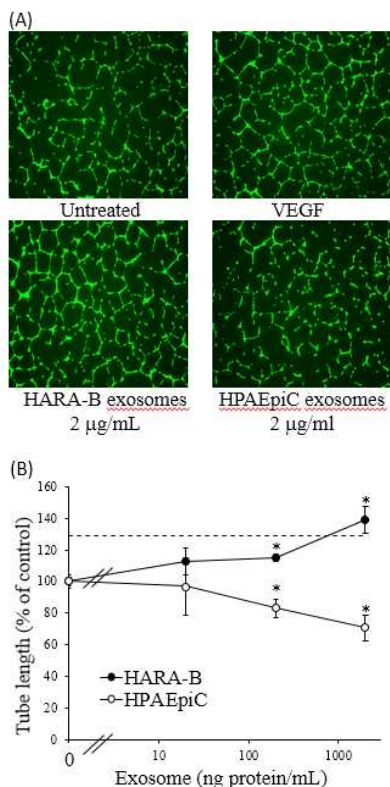


図 2 HARA-B 細胞と HPAEpic 細胞由来 exosome の HUVEC 管腔形成への影響

(A) 蛍光顕微鏡像 (B) ImageExpress による測定結果

また、HUVEC の細胞内シグナルを解析した結果、HARA-B 由来 exosome の作用により、MAPK 経路が活性化されていることが判明した (図 3)。

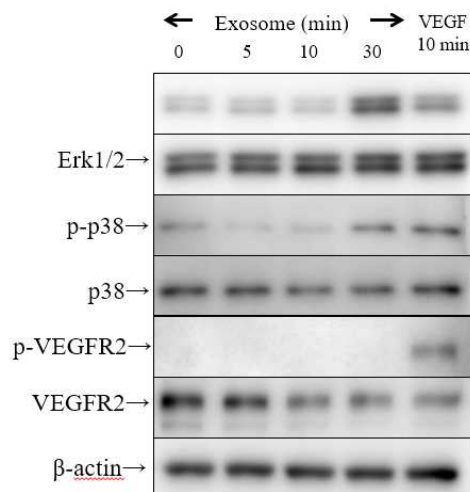


図 3 HARA-B 細胞と HPAEpic 細胞由来 exosome による HUVEC 細胞内シグナル活性化

Exosome を作用させた際の主要な MAPK 経路のリン酸化の経時変化をウエスタンブロット法により解析した。

(2) 血管新生誘導に関わる exosome 膜タンパク質の探索

exosome 膜上に発現するタンパク質のプロテオーム解析を行い、EPhAEpic 由来 exosome では同定されず、HARA-B 由来 exosome のみで同定されたタンパク質について検討した。その中の 1 つに、MAPK 経路を活性化する分子として知られる膜タンパク質 EphA2 が同定された (data not shown)。

そこで、exosome 上の EphA2 が HUVEC の血管新生促進作用に関与するか確かめるため、HUVEC にリコンビナント EphA2-Fc を作用させる、あるいは exosome を作用させる際に抗 EphA2 抗体を加えて検討した。その結果、HUVEC は EphA2-Fc の濃度依存的に増殖が促進され、また、HARA-B 由来 exosome で促進される HUVEC の細胞増殖は抗 EphA2 抗体の添加により阻害された (図 4)。よって、HARA-B 由来 exosome による HUVEC の増殖促進作用は、EphA2 を介しているものと考えられた。

以上の結果は、がん細胞が、転移巣の形成に必要な血管新生の促進作用を有する exosome を分泌していること、また、exosome 上の EphA2 を介して血管内皮細胞に増殖シグナルを伝えていることを示唆するものである。今後、exosome の in vivo での動態など、がん転移との関連をより詳細に調べることにより、アクティブターゲティング技術に応用可能ながんの臓器特異的転移のメカニズム解明につながるものと期待される。

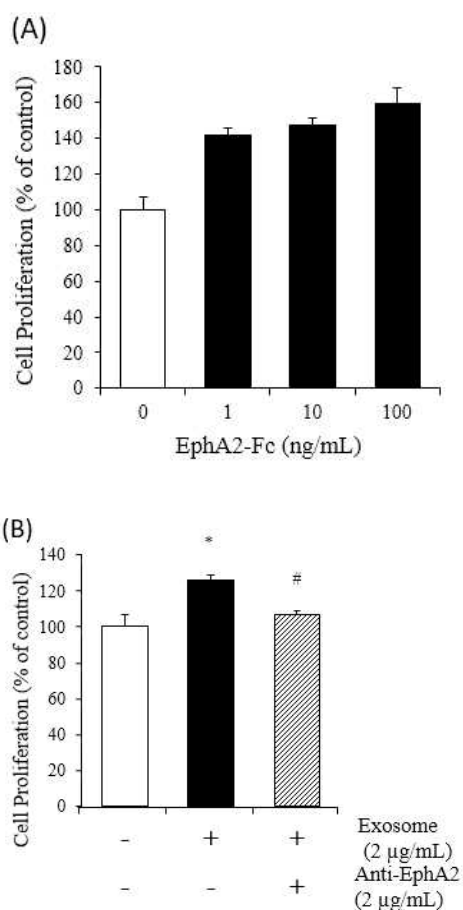


図4 HARA-B由来 exosome 上の EphA2 を介した HUVEC の増殖促進作用

(A) HUVEC にリコンビナント EphA2-Fc を 12 時間作用させ、細胞増殖を測定した。(B) HARA-B 由来 exosome 及び抗 EphA2 抗体添加時の HUVEC 細胞増殖。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Taki S, Kamada H, Inoue M, Nagano K, Mukai Y, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S. A Novel Bispecific Antibody against Human CD3 and Ephrin Receptor A10 for Breast Cancer Therapy. PLoS One (2015) 10:e0144712. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0144712.
- ② 角田慎一、タンパク質機能改変体創製技術による革新的バイオ創薬、生産と技術 (2016) 68:69-71. (査読無)
<http://seisan.server-shared.com/68-1-pdf.html>

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 角田慎一、Discovery of cell-internalizing antibodies by a scFV phage display library screening system. 第30回日本薬物動態学会、2015年11月12日、タワーホール船堀(東京).

- ② Nagano K, Imai S, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Mukai Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. High-throughput validation of lymph node metastasis-related proteins in lung tumor by antibody proteomics technology. AAPS National Biotechnology Conference, June 8-10, 2015, San Francisco (USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 慎一 (Tsunoda, Shin-ichi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：90357533