

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14400

研究課題名(和文)がん特異的代謝シグネチャーのエクソソームからの読み取り

研究課題名(英文)Reading cancer specific-metabolism signature from exosome

研究代表者

芝 清隆 (Shiba, Kiyotaka)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他

研究者番号：40196415

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、がん細胞に観察される、がん細胞に特徴的な代謝経路の活性化が注目を集めている。したがって、ある代謝経路が特異的に活性化されている場合、それに関係した膜のトランスポーターの発現も上昇している可能性が考えられる、さらに、細胞から放出されるエクソソームにも反映されている可能性が考えられる。これをうまく利用することで、がん細胞由来のエクソソームのみを特異的に標識できる可能性が考えられる。このような背景のもと、本研究では、P-糖タンパク質発現細胞が放出するエクソソームにP-糖タンパク質が存在することを確認した。このP-糖タンパク質の活性を利用した特異的標識条件の確立にはいたらなかった。

研究成果の概要(英文)：This research has confirmed that P-glycoprotein, which is known to be involved in multidrug resistance of cancer cell, is expressed on the exosomes that are released from the cells expressing P-glycoprotein. The conditions that allow specific fluorescence labelling of the P-glycoprotein-expressing exosomes using substrates of P-glycoprotein have been sought. However, sticky nature of exosomes under the assay conditions did not allow the establishment of the quantification method.

研究分野：生物学

キーワード：エクソソーム 細胞外分泌小胞 P-糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞外分泌小胞 (Extracellular Vesicles, EVs) は、ほとんど全ての細胞から体液中に放出されている、極めて小さな (直径が数十 nm ~ 数百 nm) 小胞体を集散的に現す言葉である。ヘテロ性の高い集団で、その実体については不明な部分が多いが、しばしば細胞外分泌小胞 = エクソソーム (エキソソーム、Exosomes) として呼称されるので、ここでは以下、エクソソームと呼ぶことにする。

エクソソームは、放出親細胞由来のタンパク質、microRNA、mRNA、lncRNA、DNAなどをその内部や表面にもっており、さらには、これらの生体情報分子は、そのエクソソームと取り込んだ、受け手細胞の中で機能を発現することが明らかにされている。このようなエクソソームを介した細胞間のコミュニケーションがいろいろな生命現象に関わっていることが明らかにされつつあり、がん分野においても、がん転移におけるがん微小環境の形成や、がん免疫のモジュレーション、抗がん剤耐性の獲得、などいろいろな側面でエクソソームが関わっているといった報告が相次いでいる。

このような背景のもと、エクソソームをがんの「診断」「治療」「予防」に利用しようとする研究が活発化している。特に、がんの分子標的医薬が次々と開発されつつある現在、がんの治療方針決定のための、即時的な診断方法の開発が強く待ち望まれており、侵襲性の低い、体液診断により、体の内部のがん状態に関する情報を取得する新しい方法が希求されている。エクソソームは、血液、唾液、尿、髄液、精液、骨髄液、腹水、胸水などのあらゆる体液に多量に存在しており、いわゆるリキッド・バイオプシーの材料としてはうってつけのターゲットである。

血液などの体液に循環するエクソソームから、がんの診断情報を引き出す方法としては、エクソソームの大きさ、数、密度などの物理情報に加えて、エクソソームが運ぶ、miRNAの種類と量、タンパク質の種類と量、lncRNAの種類、リン脂質の種類、低分子代謝産物など、いくつもの可能性があり、それぞれ精力的に研究されている。臨床データ主導の診断法を開発するなら、エクソソームから取得できる情報なら、あらゆる可能性を追究すべきである。エクソソーム診断の開発は、新たな解析対象の発掘も精力的に進めるべきステージにある。

さらに、即時性の高い診断法を確立するためには、シンプルで安定な観測手法が望ましい。大型解析装置や長時間の作業と必要とする診断法では、臨床現場への実装が難しくなる。

近年、がん細胞に観察される、がん細胞に特徴的な代謝経路の活性化が注目を集めている。代謝経路の構成成分には、膜に存在するトランスポーターも含まれる。したがって、

ある代謝経路が特異的に活性化されている場合、それに関係した膜のトランスポーターの発現も上昇している可能性が考えられる、さらに、この膜に存在するトランスポーターの上昇が、そのままその細胞から放出されるエクソソームにも反映されている可能性が考えられる。すなわち、がん細胞から放出されるエクソソームは、特徴的なトランスポーター活性を有している可能性があり、これをうまく利用することで、がん細胞由来のエクソソームのみを特異的に標識できる可能性が考えられる。

このような背景のもと、研究実施者はある種のがん細胞でその発現が増加している「P-糖タンパク質」に着目し、そのトランスポーターとしての性質をエクソソーム診断に利用する可能性に興味をもち、本研究を開始した。

2. 研究の目的

がん細胞に特徴的な細胞内代謝の変化は、細胞膜上のトランスポーターにも反映される。そして、そのトランスポーターの変化はがん細胞から分泌される細エクソソームの性質にも反映されると予想される。したがって、エクソソームが運ぶトランスポーターと、その特異的な基質・阻害剤などを組み合わせることで、体液中のがん関連エクソソームサブクラスを標識・定量化できる可能性が高いと考えられる。本研究では特に抗がん剤耐

性獲得の責任トランスポーターであるP-糖タンパク質に焦点をあて、(1) がん細胞でのP-糖タンパク質発現がそのがん細胞から放出されるエクソソームに反映されるか否かを確認すること。(2) もし、発現されていた場合には、このエクソソーム上のP-糖タンパク質の基質輸送能力を利用して、P-糖タンパク質発現エクソソームを特異的に標識する条件を探索する、ことを目的とした。

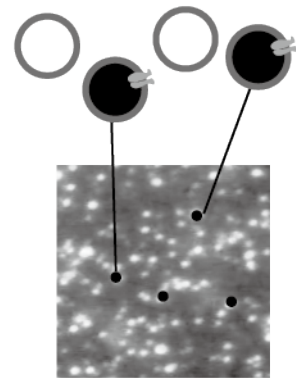
がん特有の代謝経路で発現したトランスポーター



エクソソーム



そのトランスポーターに特異的な蛍光基質で選択的標識



エクソソームのトランスポーターに反映されたがん細胞の代謝変化を利用したがん由来エクソソームの定量化をめざした。

### 3. 研究の方法

P-糖タンパク質陽性細胞株としては大腸がん由来の HCT-15 を用いた。また陰性コントロール株としては同じく大腸がん由来の HT-29 を用いた。これらの細胞を仔牛血清を含まない培養液で 2 日間培養したのちに (仔牛血清に多量のエクソソームが含まれるため)、培養上清だけを回収し、超遠心によりエクソソーム粗分画を得た。得られたエクソソーム粗分画は、OptiPrep を用いた密度勾配超遠心法により、密度の違いにより分画した。各、密度分画を、エクソソームマーカー (CD63 など)、および P-糖タンパク質に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングをおこなった。エクソソームの濃度は、NanoSight を用いたナノ粒子トラッキング法により求めた。

エクソソームマーカーがウェスタンブロッティングにより検出された分画をエクソソーム分画とし、P-糖タンパク質の基質である蛍光分子 CMFDA と Rhodamine123 の取り込みを評価した。取り込まれた蛍光分子は、超遠心で沈殿してくる画分として評価した。また、この実験において、P-糖タンパク質のトランスポート活性を阻害することが分かっている Verapamil を阻害剤として共存させる条件での実験もおこなった。

### 4. 研究成果

大腸がん由来の HCT-15 は、既に P-糖タンパク質高発現株としていくつかの論文で使われている細胞株である。同じく大腸がん由来の HT-29 は、エクソソームの実験でもよく使われている細胞株である。まず、これらの細胞株の細胞抽出液を用いたウェスタンブロッティングから、今回実験に用いた HCT-15 が確かに P-糖タンパク質を発現していること、また HT-29 からは P-糖タンパク質の発現が観察されないことを確認した。

次に、HCT-15、HT-29 それぞれの培養上清からエクソソームの分離をおこなった。細胞培養時に加える仔牛血清には多量のエクソソームが含まれていることが分かっているので、無血清培地に移して、48 時間培養することで、仔牛血清由来からのエクソソーム持ち込みを回避した。集めた培養上清を低速遠心にかけ、細胞成分などを除去して、エクソソーム粗分画を得た。このエクソソーム粗分画を、さらに密度勾配超遠心法により、密度の違いから 10 の分画に分けた。それぞれの分画をナノ粒子トラッキング法で解析することで、粒子 (エクソソーム) の定量化をおこなった。同時に、各分画に対して、CD63、CD9 などのエクソソームマーカーの存在をウェスタンブロッティングで解析した。最後に、各分画を、抗 P-糖タンパク質抗体でウェスタンブロッティング解析した。その結果、HCT-15 から得られたエクソソーム分画から、P-糖タンパク質の

共局在が確認された。これは予想通り、P-糖タンパク質を高発現する細胞株が放出するエクソソームには、P-糖タンパク質が存在することを示している。H-29 からは、この上演では P-糖タンパク質はエクソソーム分画には検出されなかった。

このように、当初の目的の 1 つめである (1) がん細胞での P-糖タンパク質発現がそのがん細胞から放出されるエクソソームに反映されるか否かについては、「反映する」といった結果が得られた。

次に、このエクソソームに存在する P-糖タンパク質のトランスポート活性による、特異的なエクソソームの標識実験に進めた。エクソソーム膜の配向は、親細胞の膜の配向と同じものと考えられる。したがって、細胞内部の抗がん化合物を細胞外に排出する役目を担う P-糖タンパク質は、エクソソームにおいても、エクソソームの内部から、エクソソームの外部に向かってその基質をトランスポートすることが予想される。しかしながら、この「内部から外部」への輸送能力を利用したのでは、エクソソームの標識が難しい。しかしながら、エクソソームの膜の配向が一定の割合で「インサイト・アウト」になっているとの報告もあり、この「インサイト・アウト」のエクソソームが存在するならば、外部から与えた標識化合物を、P-糖タンパク質のトランスポート活性を利用して内部に入れることが可能である。また、トランスポート活性の逆反応を利用する事で、内部への標識化合物の移入も可能となるかもしれない。いずれにせよ、実験的には、精製したエクソソーム溶液に、P-糖タンパク質の基質となる標識化合物を加えて、これがエクソソームの内部に取り込まれる条件を探索することである。

このために、P-糖タンパク質の基質である蛍光分子 CMFDA と Rhodamine123 を用い、HT-15 由来のエクソソームに特異的なこれらの化合物の取り込みが観察される条件を捜した。エクソソームへの取り込みには、超遠心で沈殿させたエクソソーム分画の蛍光を定量化することでおこなった。また、P-糖タンパク質のトランスポート活性が、Verapamil で阻害されることを利用して、観察される取り込みが、P-糖タンパク質の活性に依存していることを確認使用とした。

基質の濃度、バッファー、遠心条件などのいろいろな条件を検討しながら、HT-15 由来のエクソソームに特異的な蛍光標識が起こる条件を探索したが、残念ながら、研究期間内には、目的とした条件は見いだせなかった。この原因の 1 つには、精製したエクソソームを用いた標識実験の反応条件では、エクソソームが極めて凝集しやすく、かつ、フリーの標識化合物を共沈殿するといった、当初予期していなかった問題が生じたためである。超遠心に頼らない、蛍光標識されたエクソソームの解析法などの開発が必要となるが、今後の課題である。

また、前提となる「インサイト・アウトのエクソソームが一定量存在する」「P-糖タンパク質のトランスポート活性の逆反応が起こる」についても、現時点では、これらの可能性が否定されたとまで言い切るだけの実験結果は得られていない。こも問題に対しても、引き続き、他の研究助成を受けながら、追究していきたい。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

芝 清隆 (SHIBA, Kiyotaka)

公益財団法人がん研究会・がん研究所蛋白  
創製研究部・部長

研究者番号：4 0 1 9 6 4 1 5

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

##### (4) 研究協力者