

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18421

研究課題名(和文) がん由来エクソソームの臓器・組織特異的な局在の検出と転移促進機構の解明

研究課題名(英文) Development of in vivo detection system of exosome distribution for elucidation of metastasis-promoting mechanism of cancer-derived exosomes

研究代表者

西田 奈央 (Nishida-Aoki, Nao)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：80737114

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)：本研究の目的は、がん細胞が分泌する直径100 nmほどの細胞外小胞であるエクソソームの体内挙動を検出し、エクソソームによる転移促進機構を、生体内の局在から明らかにすることであった。エクソソームはウイルスと同程度のサイズであるため、受け渡しの検出は滅びの技術では難しい。そのため、本研究ではCre-LoxPシステムを応用したがん細胞由来のエクソソームの受け渡しを検出する実験系の構築を行った。エクソソーム内へのCre recombinaseの導入効率を上げるための技術の開発などを行ったが、最終的に狙っていた通りのエクソソームの受け渡しは検出することができなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to detect in vivo distribution of exosomes, which are an extracellular vesicle of about 100 nm diameter, secreted by cancer cells. The in vivo distribution of exosomes is expected to provide useful information to clarify the mechanism of promoting metastasis by cancer-derived exosomes. Because exosomes are about the same size as viruses, detection of delivery is difficult with current technologies. Therefore, in this study, we constructed an experimental system to detect delivery of exosomes derived from cancer cells by applying Cre-LoxP system. We developed technologies to increase the efficiency of the introduction of Cre recombinase into exosomes. However, we could not detect exosome delivery within this project.

研究分野：分子生物学、細胞生化学、腫瘍生物学

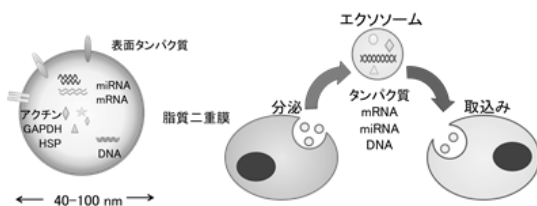
キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 Cre recombinase 体内挙動 Rapamycin

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソームはほぼ全ての細胞が分泌する細胞外小胞である。脂質二重膜に囲まれた直径 40-100 nm の小胞で、miRNA, mRNA, DNA, タンパク質などを含む。エクソソームは細胞間で受け渡しされ、内包する分子は受け取った細胞内で機能する。そのためエクソソームは細胞間の情報伝達を担うと考えられている (図1)。

がん細胞もまたエクソソームを大量に分泌する。がん細胞の増殖には周囲の微小環境が大きく影響するが、最近の研究では、がん細胞はエクソソームを分泌することで周囲の正常細胞に働きかけ、自身の増殖に有利な環境に改変することが分かってきた。さらに、がん細胞はエクソソームを分泌することで転移先の臓器の環境を改変し、転移を有利に進める可能性が示唆された。がんの転移はがん治療の未だ克服できていない課題であり、がんによる死のほとんどは転移が原因である。エクソソームはがんの転移の新たな機構を明らかにすると期待されているが、エクソソームが転移を促進する分子機構は未解明である。

がん細胞の分泌したエクソソームが取り込まれる先の臓器を決定することは、がん細胞由来のエクソソームの作用を理解する上で重要な情報である。先行研究のエクソソームの *in vivo* 検出法ではエクソソームを蛍光タンパク質、染色、酵素の提示などでラベルしていたが、課題が2つあった。エクソソームは直径 100 nm ほどであるため感度が低く、*in vivo* では明確な局在の観察が困難である点と、細胞に取り込まれた後の検出が困難である点である。また、染色による検出は、色素が外れてしまったことによる人為的な結果である可能性も示唆されていた。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞が分泌する直径 100 nm ほどの細胞外小胞であるエクソソームの体内挙動を検出し、エクソソームによるがんの転移促進機構を、生体内の局在から明らかにすることであった。

まず、がん細胞由来のエクソソームを取り込んだ細胞を *in vivo* で検出する実験系を、

マウスモデルで開発する。そのマウスの実験系を応用して、転移先が異なるがん細胞由来のエクソソームの局在を比較し、エクソソームの局在からがん細胞が分泌するエクソソームの転移の促進機構の解明を行う。

### 3. 研究の方法

エクソソームの受け渡しの検出系として Cre-LoxP システムを応用することにした。この検出系は、Cre-LoxP システムとルシフェラーゼ遺伝子を組み合わせ、エクソソームを受け取った細胞を発光で検出することで感度の問題を解決し、さらにエクソソームが作用した細胞を検出できるという利点を兼ね備えている (図2)。

Cre recombinase 発現プラスミド、および LoxP 配列に挟まれた Stop コドンをレポーター遺伝子の上流に持ち、Cre recombinase に応答してレポーター遺伝子を発現するプラスミドを構築した。それらをヒト、マウス乳がん細胞株や、HEK293 細胞株に導入し、エクソソームの受け渡しを観察した。さらに、同様の Cre recombinase に応答する遺伝子を有するマウスを購入、自家繁殖した。

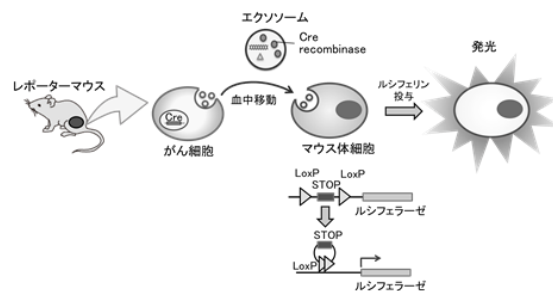


図2 がん細胞エクソソームの生体内局在の *in vivo* 検出系

### 4. 研究成果

初年度は、Cre recombinase のレポーターを有するマウスを購入して安定的に自家繁殖した。まず、エクソソーム非処理の場合には、レポーター遺伝子が発現していないことを確認した。また、Cre recombinase 発現プラスミド、および、LoxP を含み Cre recombinase に応答して蛍光タンパク質を発現するレポーターを持つプラスミドを構築した。それらをヒト乳がん細胞株、マウス乳がん細胞に導入して安定発現株を作製したのち、エクソソームの受け渡しを共培養や、精製したエクソソームの添加などで観察した。しかし、受け渡しの証拠であるレポーター遺伝子の発現の検出はできなかった。その原因として、エクソソーム内への Cre recombinase の導入効率が低いことが考えられた。

そこで、次年度は、エクソソーム内への Cre recombinase の導入効率を上昇させる実験系を作成した。ラパマイシンを介した二量体を形成するタンパク質複合体を利用して、ラパマイシン添加時にエクソソームへ Cre recombinase が高効率に導入される系を作成した (図 3)。エクソソーム膜へ運び役の二量体の片方を局在させるために、エクソソーム膜タンパク質、および脂質アンカー型を用意した。

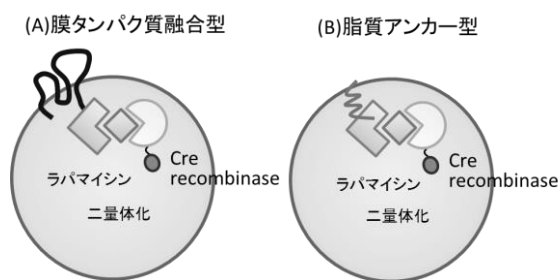


図 3 エクソソーム内への Cre recombinase の導入効率を上昇させる実験系

図のような複数の構造で、タンパク質の発現量の上昇のためのプロモーターの改変など、様々な条件で検討した結果、実際にこのラパマイシンを添加した場合、非添加時に比較して、Cre recombinase のエクソソーム内への導入効率が上昇する系を構築できた (図 4)。

### 抗 Cre recombinase 抗体

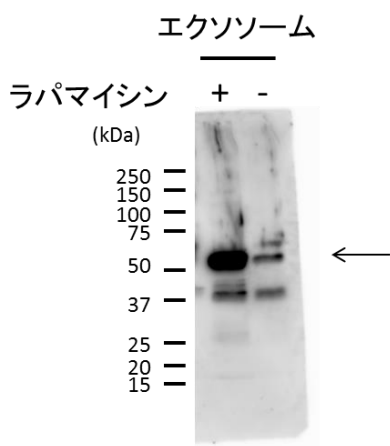


図 4 ラパマイシン添加、非添加時のエクソソーム内への Cre recombinase の導入効率

この高効率に Cre recombinase を内包するエクソソームを、LoxP レポーターを含む細胞株に添加、及び、レポーターを有するマウスに投与して、エクソソームを介した Cre recombinase の運搬をレポーター遺伝子の発

現で検出できるかどうか試みた。しかし、Cre recombinase の活性の指標であるレポーター遺伝子の発現は、最終的には細胞株でも、マウスモデルでも観察できなかった。以上より、少なくとも今回の実験系においては、エクソソームが細胞に取り込まれて、エクソソームに内包されたタンパク質が放出されても、受け取り先の細胞で機能する効率は非常に低いことが分かった。今回の系では、Cre recombinase を含む内包するタンパク質は、細胞のリソソームの分解経路に輸送された可能性がある。エクソソームに内包されるタンパク質のうち、受け取り先の細胞で機能するタンパク質と、分解経路に運ばれるタンパク質の違いは現時点では不明である。今後の研究による解明が必要である。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
西田 奈央 (NISHIDA, Nao)  
国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野・学振特別研究員 (PD)

研究者番号：80737114

(2)研究分担者  
特になし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
特になし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
特になし ( )

研究者番号：