

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18424

研究課題名(和文)エクソソームによるがん悪性化機構の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of tumour malignancy via exosomes

## 研究代表者

星野 大輔(Daisuke, Hoshino)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・副技幹・主任研究員

研究者番号：30571434

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)：本研究では、細胞生物学的手法、および数理モデリング手法を組み合わせ、がん悪性化を駆動するエクソソームの構成分子の網羅的同定とこのエクソソームにより活性化されるがん悪性化分子の相互作用ネットワークの可視化をすることで、がん悪性化機構を統合的に理解することを目的として研究を行った。がん悪性化を駆動するエクソソームの構成分子を複数同定し、それらが培養細胞レベルでがんの悪性化に関与することを見出した。

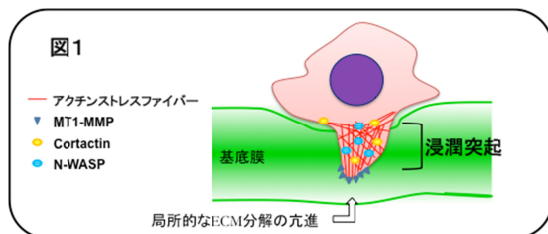
研究成果の概要(英文)：Here, I identified tumour malignancy promoting exosome cargoes using cell biology and mathematical modeling. First, I identified the proteins that is activated by exosomes. Next, to visualize the molecular interactions between these proteins, we performed network analysis. Finally, I identified multiple key proteins by statistical analysis and confirmed these proteins regulate tumour malignancies in cell biology level.

研究分野：がん生物学

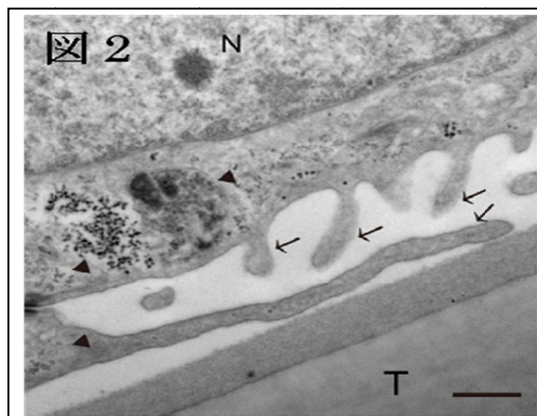
キーワード：がん 浸潤 細胞運動

### 1. 研究開始当初の背景

悪性化したがん細胞は、運動性と細胞外基質(ECM)分解活性の亢進により、浸潤・転移能を獲得する。このような細胞運動の亢進とECM分解を統合的に制御する細胞膜構造として、悪性度の高いがん細胞がECMとの接着面に形成する、浸潤突起が知られている(図1)。



浸潤突起を形成したがん細胞は、突起方向へ高い運動性を示し、その先端面に細胞外プロテアーゼ(膜型マトリックスメタロプロテアーゼ: MT-MMP など)を濃縮させることで、局所的なECM分解を起こしながら、基底膜や間質組織を破壊する。このため、浸潤突起は、悪性化がん疾患の治療標的になりうるタンパク質複合体として基礎研究が活発に行われており、特に、この細胞膜構造の形成機構とこれを介した細胞外基質の分解機構に焦点を当てた研究を中心に理解が進んできた。申請者は最近の研究で、浸潤突起が形成される細胞膜部位において、局所的に多胞体(Multivesicular body: MVB)が濃縮し、さらにこれらのMVBが浸潤突起に融合することを見出している(図2: 悪性化がん細胞の細胞膜近傍を捉えた電子顕微鏡写真 N: 核、矢印: 浸潤突起、矢頭: 多胞体)。



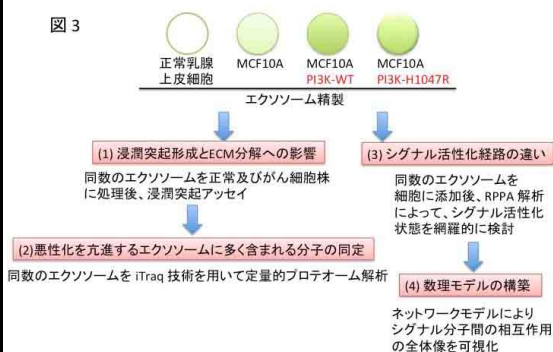
MVBはエンドサイトーシス経路上に位置する細胞内オルガネラの一つであり、後期ゴルジ体から輸送された小胞が後期エンドソームに融合することで形成される。特にリソソムの酸性化やその構成分子の供給に重要な役割を担うため、生理的に必須の働きを持つオルガネラとして認識されているが、昨今、がん細胞においては、悪性化の一因と考えられているエクソソームを形成する場としても注目され始めている。エクソソームは、microRNAやECM分解酵素などを豊富に含む細胞外分泌顆粒であり、MVBで形成された後に、細胞膜への逆行性小胞輸送によって、細胞外

へと分泌されると考えられている(Raposo and Stoorvogel, 2013, J Cell Biol)。細胞外に分泌されたエクソソームは、近傍の正常細胞やがん化細胞に取り込まれ、悪性化に関わるmRNAやタンパク質の受け渡しによって、がん化・悪性化に寄与すると考えられているが、最終的に細胞膜のどこから、どのようにして細胞外へと放出されているのかについては、長らく不明であった。申請者はこれまでの研究から、浸潤突起の形成が細胞外のエクソソーム量を増大させること、浸潤突起がエクソソームの分泌サイトとして機能していることを明らかにしている。申請者はまた、浸潤突起の形成がエクソソームの分泌を亢進させることを明らかとした一方で、エクソソームの分泌によって浸潤突起の形成が亢進することも見出している。すなわち、浸潤突起とエクソソームが、相互に影響し合っており、それぞれの機能亢進を誘導し合うという現象が起こっていることが明らかとなりつつある。このことは、がん細胞において、浸潤突起とエクソソームという二つの悪性化機構を連動させて、がん悪性化を加速させるメカニズムが存在することを想起させるが未だ同定に至っていない。

### 2. 研究の目的

申請者は、浸潤性悪性がんが細胞膜に形成する、組織破壊性の膜構造である浸潤突起から、細胞膜小胞エクソソームが分泌され、これが浸潤活性亢進に寄与することを見出している。本研究では、細胞生物学的手法、プロテオミクス手法および数理モデリング手法を組み合わせ、がん悪性化を駆動するエクソソームの構成分子の網羅的同定とこのエクソソームにより活性化されるがん悪性化分子の相互作用ネットワークの可視化をすることで、がん悪性化機構を統合的に理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法



本研究計画の全体像を図3に示す。

本研究では、エクソソームと浸潤突起によるがん悪性化の分子機構を明らかにするため、(1)悪性化段階の異なるがん細胞及び正常細胞株からエクソソームを精製し、正常及びがん細胞株における浸潤突起形成、ECM分解と運動能への影響を解析した。

続いて、(2)がん浸潤亢進活性が高いエクソソームで発現が変動しているタンパク質の同定とその変動レベルの定量化をした。最後に、(3)エクソソームを受容したがん細胞内で亢進されるシグナル伝達経路をRPPA(Reverse Phase Protein Array)解析によって網羅的に同定し、数理モデルで可視化した。

本研究では、乳腺上皮由来株とこれを基に作製した悪性化モデル株を用いて、2年計画で研究を行った。

#### 4. 研究成果

##### 《研究計画(1)を実施》

エクソソームのがん浸潤亢進活性とがん悪性化の関係を明らかにするために、非腫瘍性乳腺由来細胞株とこれを基に作製した悪性化モデル株を用いて解析した。本研究で使用したモデル株は、非腫瘍性乳腺上皮由来MCF10A株を基に、これに野生型PI3キナーゼあるいは恒常活性化型PI3キナーゼを過剰発現した株(MCF10A-PI3KあるいはMCF10A-PI3K(H1047R))とする。PI3キナーゼの活性化亢進は、申請者の以前の研究から、予後不良性の頭部頸部がん患者でよく認められ、悪性黒色腫および乳がんにおいても悪性化を亢進することが明らかになっている。従って、これらの株を用いることで、PI3キナーゼに由来する変動を特異的に抽出することが可能となり、効率的にがん悪性化の分子機構解析を進めることができる。本研究では、これらのMCF10A、MCF10A-PI3KおよびMCF10A-PI3K(H1047R)株に加えて、正常乳腺細胞も比較解析のために用いた。まず、これらの細胞の浸潤突起形成能を調べたところ、H1047R株でのみ浸潤突起形成能が増加していた。次に、エクソソームの分泌量を調べたところ、予想通りH1047R株でのみ分泌量も増加していた。次に、悪性度の高いがん細胞由来エクソソームが悪性度の低いがん細胞の浸潤能を亢進することができるかを検討するため、H1047R株が分泌するエクソソームを細胞培養液から精製し、浸潤性が低い細胞株(MCF10A)への添加による浸潤誘導活性を比較解析した。予想と反し、H1047R由来エクソソームはMCF10A株の浸潤突起形成を誘導することができなかった。一方で、申請者らは浸潤突起を形成する悪性化がん細胞株でエクソソーム分泌を阻害することで、浸潤突起形成も抑制されることを見出している。また、浸潤突起形成は、形成から成熟までのステップが知られており、エクソソームは浸潤突起形成の初期過程に関与するのではなく、後期過程に関与することが推測された。

##### 《研究計画(2)を実施》

続いて、上記の細胞株を、ボイデンチャンバーを用いたマトリゲル浸潤アッセイおよ

びI型コラーゲン浸潤アッセイにより定量したところ、H1047R株でのみ浸潤能が増加していた。H1047R株が分泌するエクソソームを細胞培養液から精製し、浸潤性が低い細胞株(MCF10A)への添加による浸潤誘導活性を比較解析したところ、H1047R由来エクソソームは

MCF10A株の浸潤能を優位に増加することが明らかになった。研究計画(1)でH1047R由来エクソソームは浸潤突起形成能に変化がなかったことから、H1047R由来エクソソームは細胞の浸潤能を亢進するというより、むしろ、細胞運動に関与することが考えられた。この可能性を検討したところ、H1047R由来エクソソームはMCF10A細胞の運動能を増加させることを見出した。

##### 《研究計画(3)を実施》

エクソソームを受容したがん細胞内で亢進されるシグナル伝達経路を、申請者が確立したRPPA解析の系を以下の2種類に適用することで網羅的に同定した。

(1)運動能を亢進するエクソソームと亢進しないエクソソームを悪性度の最も高いMCF10A-PI3K-H1047R細胞に処理後RPPA解析によって活性化されるシグナル伝達経路の違いを明らかにした。

(2)悪性度の高いMCF10A-PI3K(H1047R)のエクソソームに対する感受性が高い細胞と低い細胞におけるエクソソームによるシグナル伝達経路の活性化の違いを解析した。

RPPA解析で得られた情報は統計学的処理を行い、数理モデルを構築した。

#### 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 1 件)

星野 大輔、がん細胞の浸潤性転換を制御するPI3K-PKCa $\alpha$ シグナルの解明、大24回日本がん転移学会、2015年7月23日、シテイプラザ大阪(大阪府、大阪市)

〔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

星野 大輔 (Hoshino, Daisuke)  
神奈川県立がんセンター臨床研究所・主任  
研究員  
研究者番号：30571434

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )