

令和元年6月3日現在

機関番号：16101  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2016～2018  
 課題番号：16K18861  
 研究課題名(和文) 抗がん剤治療による腫瘍関連エキソソームの分泌変化とその創薬応用に関する研究

研究課題名(英文) Effects of anti-cancer drugs on secretion of tumor-related exosomes and its application for cancer treatment

研究代表者  
 安藤 英紀 (ANDO, Hidenori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・特任助教

研究者番号：00735524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤治療によるエキソソーム分泌変化を評価した。抗がん剤としてドキシソルピシン(DXR)あるいはDXR封入リポソーム(Doxil)を用い、正常マウスあるいは担がんマウスに静脈内投与した後、血中エキソソーム分泌変化を評価したところ、これら薬剤の投与によって血中エキソソーム量は顕著に変動した。脂質組成の異なるリポソームを調製し、がん細胞に添加した後のエキソソーム分泌変化を評価したところ、カチオン性のリポソームでエキソソーム分泌を顕著に増強させた。また分泌されたエキソソームの細胞内取り込みを評価したところ、幾つかのタンパク質が細胞内取り込みに寄与することを示した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗がん剤スクリーニングでは、抗がん剤本来の効果である殺細胞効果を主な指標として取捨選択されるが、実際は腫瘍内微小環境の変化や腫瘍関連免疫細胞の関与などの多くの要因が複雑に影響し合うことで制がん効果を発揮している。抗がん剤投与による腫瘍関連エキソソームの分泌変化と治療への影響を評価した報告は今回が初めてであり、実際の腫瘍微小環境に適応した包括的抗がん剤治療を実現するための学術的知見を得る大変意義深いものである。今後、がんの成長や転移に密接に関与するエキソソームの分泌変化を含めた抗がん剤スクリーニングを実施することで、より効果的・効率的な抗がん剤治療が実現可能となることを期待する。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of anti-cancer therapy on the secretion of exosomes.

In this study, we adopted doxorubicin (DXR) and liposomal DXR (Doxil) as model anti-cancer drugs. The treatment with DXR into normal mice obviously increased the serum exosome secretion, while the treatment with Doxil did not. In tumor-bearing mice, although the amount of serum exosomes was higher than normal mice, the either treatment of DXR or Doxil decreased the secretion of exosomes. Next, several types of liposomes were prepared and added to cancer cells in order to evaluate the effect on exosome secretion; cationic liposomes much increased the secretion of exosomes from cancer cells compared to neutral liposomes. We then demonstrated that the exosomes collected by stimulation with rigid-type cationic liposomes showed low-cellular uptake property and poorly expressed several membrane proteins.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム(DDS)

キーワード：エキソソーム がん治療 抗がん剤 ドキシソルピシン Doxil ドラッグデリバリーシステム リポソーム 細胞内取り込み

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは粒子径約 100 nm の閉鎖小胞からなる細胞外分泌小胞であり、ヒートショックプロテインを含む種々のタンパク質や RNA (mRNA、microRNA) などの機能性分子を内包している。加えて、膜表面には CD9 や CD63 等の 4 回膜貫通型タンパク質 (テトラスパニン)、MHC 分子、他のマーカータンパク質等が発現しており、特異性の高い細胞間シグナル伝達制御を担う (Figure 1)。特に近年、がんの成長や転移にエクソソームが寄与するという報告が数多くされている。転移性の高い乳がんでは、腫瘍関連エクソソームが転移先臓器の微小環境を制御することで転移しやすい足場を作ると共に腫瘍の成長を促し (Suetsugu A, *et al. Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012)、胃がんでは腫瘍関連エクソソームに含まれる CD97 タンパク質が胃がんのリンパ管転移を促す働きをする (Liu D, *et al. Gastric Cancer* 2015)。臨床でも、国立がん研究センターの落谷先生らのチームが「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」(NEDO 研究開発プロジェクト、H26 年~H30 年、総額 79 億円)として、エクソソーム中の microRNA の測定を介した新規がん診断技術の実用化を進めるなど、現在エクソソームががん領域において広く注目を集めている。

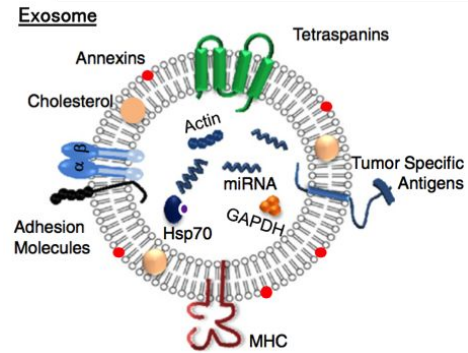


Figure 1. エクソソームの模式図  
(引用: Kbaraziha P, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 2012)

ところで、抗がん剤を用いたがん治療では抗がん剤本来の効果であるがん細胞の増殖阻害による治療効果だけでなく、腫瘍関連免疫細胞の増減を介した間接的な治療制御が重要であることが報告されている。例えば、抗がん剤の一つであるドキシソルピシンはそれ自身のがん細胞増殖抑制効果に加え、免疫細胞の攻撃から腫瘍を保護する役割を担う Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) を低下させることで腫瘍への免疫応答を高めると共に、免疫反応の中心的役割を担う CD8<sup>+</sup>T 細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞の比率を高めることで、抗腫瘍免疫を含む効率的な制がん効果を発揮する (Alizadeh D, *et al. Cancer Res.* 2013)。即ち、腫瘍微小環境を劇的に変化させる抗がん剤治療において腫瘍関連免疫細胞の変動を介した治療制御は治療効果に影響を与える決定的な要素であり、同様に腫瘍微小環境の変化によって生じる腫瘍関連エクソソームの分泌変化もまた、抗がん剤治療に影響を与える決定的な要素であることは十分に考えられる。現在までで既存の抗がん剤治療における腫瘍関連エクソソームの分泌変化を評価した報告はなく、これらエクソソーム分泌変化を評価することは、包括的な抗がん剤治療を実現する上で非常に意義深い知見となり得る。

### 2. 研究の目的

抗がん剤治療によるエクソソームの分泌変化を評価するため、実験動物 (マウス) に抗がん剤を投与した後の血清中エクソソーム分泌量を測定し、その変動を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 正常マウスに抗がん剤を投与した際の血清中エクソソームの分泌変化

Balb/c マウス (5 週齢、雄性、日本 SLC) に、モデル抗がん剤としてドキシソルピシン (DXR) あるいは DXR 封入リポソーム製剤 (Doxil) を用い、これらを静脈内投与した後の血液を回収した。血清化し、血清中エクソソームを ExoQuick™ あるいは超遠心法で回収した。エクソソーム量はタンパク定量法 (DC Protein Assay、Bio-Rad) で測定した。回収したエクソソームの粒子径を Zetasizer Nano (Malvern) を用いて測定した。エクソソームのマーカータンパクである CD9、CD63、および TSG101 の発現量をウェスタンブロットティングで評価した。

#### (2) 担がんマウスに抗がん剤を投与した際の血清中エクソソームの分泌変化

Colon26 マウス結腸癌細胞を BALB/c マウスに皮下移植することで担がんマウスを作成した。本担がんマウスに、DXR あるいは Doxil を静脈内投与した後の血液を回収し、血清中エクソソームを ExoQuick™ で抽出した。エクソソーム量はタンパク定量法 (DC Protein Assay) で測定した。次いで、Colon26 細胞の培養上清からエクソソームを回収し (C26 エクソソーム)、Colon26 腫瘍成長に対する効果を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

#### (3) 脂質組成の異なるリポソームで刺激した際のエクソソーム分泌変化

中性リポソーム (NL) およびカチオン性リポソーム (CL) をそれぞれ調製した。種々のがん細胞 (C26 マウス結腸癌細胞、B16 マウスメラノーマ細胞、MKN45 ヒト胃癌細胞、DLD-1 ヒト結腸癌細胞) に NK あるいは CL を添加し、分泌したエクソソームを ExoQuick™ で回収した。エクソソーム量はタンパク定量法 (DC Protein Assay) で測定した。エクソソームのマーカータンパクである CD63、TSG101、および CD81 の発現量をウェスタンブロットティングで評価した。膜流動性を変えた 2 種類の CL を調製し、これらで B16 細胞を刺激した後の培養上清中エクソソーム

ムを超速心法で回収し、PKH67 (Sigma-Aldrich) で蛍光標識した。この蛍光標識エキソソームを再び B16 細胞あるいは C26 細胞に添加し、細胞への取り込みを蛍光顕微鏡あるいはフローサイトメトリーで測定した。回収したエキソソームに発現しているタンパクを LC-MS/MS を用いたショットガン解析により、網羅的に解析した。得られた結果を元に、エキソソームの取り込みに寄与するタンパク質の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 正常マウスに抗がん剤を投与した際の血清中エキソソームの分泌変化

抗がん剤投与による血清中エキソソーム分泌変化を *in vivo* で評価した。モデル抗がん剤として DXR あるいは Doxil を用い、BALB/c マウスに静脈内投与した 24 時間後の血清中エキソソームを ExoQuick™ で回収した。無処置群と比較し、DXR 投与群において血清中エキソソームの有意な上昇が認められた。一方、Doxil 投与群ではその上昇が見られなかった (Figure 2)。エキソソーム回収法として超速心法でも同様の検討を行ったところ、DXR 投与においてのみ有意な血清中エキソソーム量の上昇が認められた。DXR あるいは Doxil 投与後に回収した血清中エキソソームの物性を評価したところ、いずれも 100 nm 前後の粒子系を示し、エキソソームのマーカーである CD9、CD63、TSG101 の発現レベルも同程度であった。DXR あるいは Doxil 投与後の血清中エキソソームの継時的変化を評価したところ、Doxil が投与 48 時間まで全く変化しなかったのに対し、DXR は投与 24 時間後に血清中エキソソームの上昇が認められ、その後 48 時間まで緩やかに減少した。次いで、BALB/c マウスの脾臓を手術により摘出することで脾臓摘出マウスを作成し、DXR あるいは Doxil を静脈内投与した後の血清中エキソソーム量を測定した。その結果、興味深いことに、脾臓摘出マウスにおいて DXR 投与による血清中エキソソームの分泌上昇が完全に消失した。Doxil 投与においても血清中エキソソームの上昇は認められなかった。脾臓には多くの免疫細胞 (B 細胞、T 細胞、樹状細胞など) が存在し、またエキソソームは種々の免疫細胞から分泌されることが報告されている。これより、DXR 投与は免疫細胞由来エキソソームの分泌を増加させることを明らかとした。

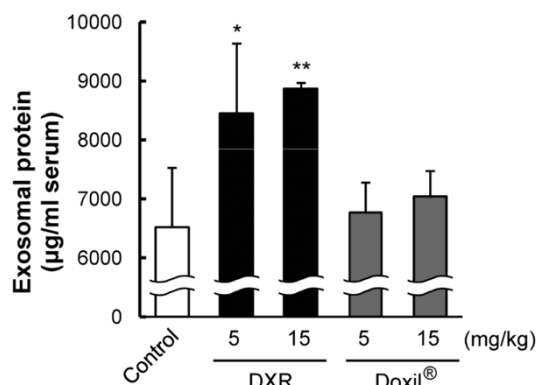


Figure 2. DXR あるいは Doxil 投与後の血清中エキソソーム変化 (引用: Emam SE, et al. Biol Pharm. Bull. 2018)

##### (2) 担がんマウスに抗がん剤を投与した際の血清中エキソソームの分泌変化

Colon26 マウス結腸癌細胞をマウス皮下に移植して作成した Colon26 担がんマウスの血清中エキソソーム量を測定したところ、正常マウスの血清中エキソソーム量と比較しておよそ 2 倍程度に上昇することが明らかとなった。この担がんマウスに DXR あるいは Doxil を静脈内投与し、24 時間後の血清中エキソソーム量を測定した。無処置群と比較し、DXR 投与では血清中エキソソーム量に減少傾向が認められ、Doxil 投与では血清中エキソソーム量が有意に減少することが明らかとなった。Colon26 細胞培養上清から回収した C26 エキソソームを *in vitro* で Colon26 細胞に添加したところ、C26 エキソソーム添加量依存的な Colon26 細胞の増殖促進が認められた。また、*in vivo* において、Colon26 担がんマウスに C26 エキソソームを連日静脈内投与したところ、無処置群および血清中エキソソーム投与群と比較し、腫瘍成長が顕著に増加することが明らかとなった。以上より、DXR および Doxil は腫瘍関連エキソソームの分泌抑制を介して腫瘍の成長を制御する可能性を示した。

##### (3) 脂質組成の異なるリポソームで刺激した際のエキソソーム分泌変化

これまで、DXR あるいは DXR 封入リポソームである Doxil を用い、健康マウスあるいは担がんマウスに静脈内投与することで血清中エキソソーム分泌が変化することを明らかにした。これらの結果は、遊離型 DXR あるいは Doxil のキャリアであるリポソームががん細胞に作用し、エキソソーム分泌を変化させたことを示唆している。そこで、エキソソーム分泌を変化させる要素としてリポソームに着目し、複数種類の脂質を組み合わせることで物性の異なるリポソームを調製し、これらをごん細胞に添加した際のエキソソーム分泌変化を評価した。

NL あるいは CL を種々のがん細胞に添加した後のエキソソーム分泌変化を評価したところ、いずれもエキソソーム分泌を増強したが、CLの方がより顕著に分泌量を増加させた。また、この分泌増加はポリエチレングリコール (PEG) をリポソーム表面に修飾することでマスクされた (Figure 3)。分泌されたエキソソームの物性を評価したところ、エキソソームのマーカータンパク質 (CD63、TSG101、CD81) はいずれも同程度発現していた。次に、膜流動性を変えた 2 種類の CL を用いて B16 細胞からのエキソソーム分泌を増強させ、培養上清から回収したエキソソームを再び B16 細胞あるいは C26 細胞に添加し、細胞取り込みを評価した。流動性の低い CL で回収したエキソソーム (exo-S1) は細胞取り込み能が著しく低く、逆に流動性の高い CL で回収したエキソソーム (exo-S2) は、無刺激で回収したエキソソーム (exo-N) と比較して細胞取

り込みが同程度であることが明らかとなった。回収したエキソソーム (exo-N、exo-S1、exo-S2) のタンパク発現を網羅的に解析したところ、exo-S1 には CD9、Annexin-A2 等のタンパク質発現が著しく低く、これらががん細胞への取り込みに寄与していることを示した。実際に、ウェスタンブロッティングにてこれらタンパク質 (CD9、Annexin-A2、Flotillin-1、EGF cleaved form 1、EGF cleaved form 2) の発現を観察したところ、exo-N および exo-S2 と比較し、exo-S1 で発現量が極めて低いことを明らかにした。また、これらタンパク質に対する特異抗体を用い、細胞に添加した後の exo-N あるいは exo-S2 の細胞取り込みを評価したところ、実際に取り込み量が低下することを示した。以上の結果より、リポソームを用いたがん細胞への刺激によりエキソソーム分泌を増強させることが可能であり、またこれらエキソソームの細胞取り込みには種々の膜タンパク質の発現が寄与していることを明らかにした。

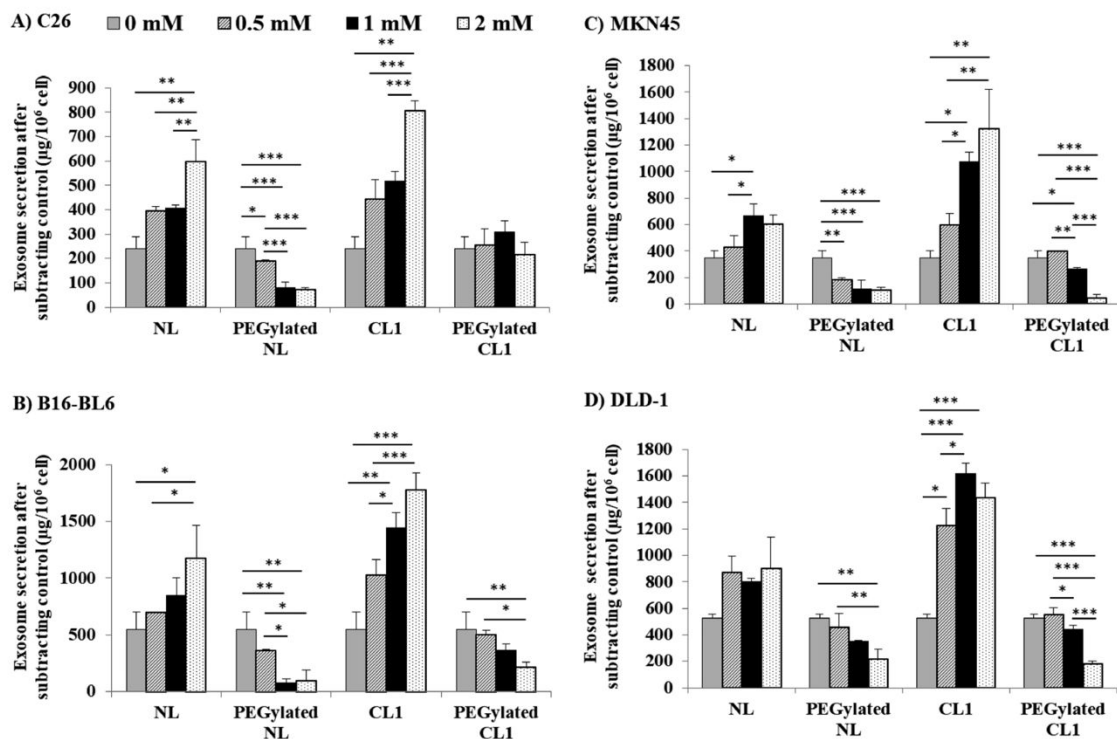


Figure 3. 脂質組成の異なるリポソームの刺激によるエキソソーム分泌変化 (引用: Emam SE, *et al. Biol Pharm. Bull.* 2018)

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Emam SE, Ando H, Abu Lila AS, Shimizu T, Okuhira K, Ishima Y, Mahdy MA, Ghazy FS, Sagawa I, Ishida T. Liposome co-incubation with cancer cells secreted exosomes (extracellular vesicles) with different proteins expressions and different uptake pathways. *Sci. Rep.*, **8**, 14493 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32861-w>. 査読有

Emam SE, Ando H, Abu Lila AS, Kobayashi S, Shimizu T, Okuhira K, Ishima Y, Ishida T. Doxorubicin expands in vivo secretion of circulating exosome in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1078-1083 (2018), <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00202>. 査読有

Emam SE, Ando H, Abu Lila AS, Shimizu T, Ukawa M, Okuhira K, Ishima Y, Mahdy MA, Ghazy FS, Ishida T. A novel strategy to increase the yield of exosomes (extracellular vesicles) for an expansion of basic research. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 733-742 (2018), <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00919>. 査読有

### 〔学会発表〕(計3件)

Emam SE, Ando H, Abu Lila AS, Ishima Y, Mahdy MA, Ghazy FS, Ishida T. The effect of liposome co-incubation with cancer cells on the secretion, uptake propensity and expression of certain surface proteins of cancer cell-derived exosomes (extracellular vesicles). 2018 CRS Annual Meeting & Exposition (2018).

Emam SE, 安藤 英紀, 石田 竜弘, A novel strategy to increase the yield of exosomes, 日本薬剤学会第32年会 (2017)

Emam SE, 安藤 英紀, Abu Lila AS, Mahdy MA, Ghazy FS, 石田 竜弘, Interaction of cancer cells with liposomes; the extent of exosome release, 第32回日本DDS学会 (2016)

〔その他〕  
ホームページ等

<https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/ykz/>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。