

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15005

研究課題名（和文）がん由来細胞外分泌顆粒による悪性化獲得機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of cancer derived small vesicles related tumor malignancies

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、がん細胞が分泌するEV表面エンドグリンのがん悪性化に対する影響をマウスモデルにより評価し、さらに、EV表面エンドグリンが制御するシグナル伝達経路をRPPA解析によって同定し、得られた情報を基に数理モデルを構築することでEV表面エンドグリンのがん悪性化機構の分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに未解明であった癌細胞のエンドグリンの役割と癌細胞が放出する細胞外小胞の機能の一端を解明することができた。今後は、エンドグリン自身を治療の標的にするのがよいのか、または、エンドグリンが制御するシグナル伝達経路を遮断する方がよいのかを検討することで、新規治療方法の確立につながることを考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we first evaluated the effects of exosomal Endoglin on tumor malignancies via in vitro and in vivo model. Next, we tried to clarify which signal transduction pathway were activated by exosomal endoglin in vitro using Reverse Phase Protein Array systems (RPPA). We got multiple endoglin knockdown related phenotypes, but we could not identify exosomal endoglin related specific transduction pathways by RPPA.

研究分野：がん生物学

キーワード：EV 浸潤 がん

1. 研究開始当初の背景

がん転移はがん患者を死に至らしめる主要因の一つであるが、現在に至るまで有効な治療法が確立されていない。昨今、がん悪性化やがん転移において促進的な役割を果たす細胞外分泌顆粒(Extracellular Vesicle: EV)が、がん治療標的や診断マーカーの有望な候補として注目されている。 EVは生体内の様々な細胞から分泌される膜小胞であり、表面に膜タンパク質や脂質を、内部にタンパク質や mRNA、miRNA などを含んでおり、細胞間コミュニケーションツールとして働いている(Colonbo et al, 2014 Ann. Rev. Cell Dev. Biol.)。このため、EVを標的としたがん治療法の開発が試みられており、EVの部分的分泌抑制ががんの血管新生を阻害することや、膵臓がんの早期診断のためにEVが有望なマーカーとなりうることが示されている(Melo et al, 2015 Nature)。

申請者らは、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 EV 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(研究業績 1, 10)。一方、申請者らは、浸潤突起を形成しないがん細胞においても、同様にアクチン骨格依存的に形成される細胞膜辺縁部に形成される突起状の膜構造であるフィロポディアから EV が分泌されることを見出した。このフィロポディアから分泌される EV には、がん細胞への添加によってフィロポディア形成を誘導する活性が認められた(図 1、矢印)。さらに、EV 活性を指標としたプロテオミクス解析から、EV によるフィロポディア形成制御タンパク質としてエンドグリンを同定した。

エンドグリンは 1 型膜タンパク質で TGF- β 型受容体として働き、間質系細胞に広く発現している。特に血管内皮細胞で強く発現していることから、血管系における機能解析が多くされてきたが、EV 表面に局在する報告はなく、EV とエンドグリンの機能的関係性は不明である(Jonker, 2014 Microcirculation)。また、近年エンドグリンの発現量はがん患者の予後不良と相関することから注目されているが、がんにおけるエンドグリンの機能解析の報告はない。そこで、申請者はがん細胞におけるエンドグリンの機能を解明することを目指し、メラノーマ細胞でエンドグリン安定発現抑制株 (shEnd) を作成したところ、shEnd ではフィロポディア形成が減少した(図 2、shEnd)。この異常は、コントロール細胞(shLacZ)由来 EV の添加で回復するが(図 2、+shLacZ EV)、shEnd 由来 EV では回復しなかった(図 2、+shEnd EV)。したがって、EV 表面のエンドグリンにフィロポディア形成誘導活性があると考えられる。浸潤突起から分泌される EV が、がん細胞から周辺細胞への働きかけによる微小環境制御に使われるのに対して(研究業績 1, 10)、正常細胞あるいは悪性度の低い初期がんによってフィロポディアから分泌される EV には、がん細胞の増殖性亢進や浸潤性獲得などの悪性化を誘導する働きがあると予想される。

2. 研究の目的

申請者は、細胞運動や細胞間相互作用等のがん悪性化に関与することが知られている、突起状の細胞膜構造であるフィロポディアから細胞外分泌顆粒(Extracellular Vesicle: EV)が分泌されることを見出した。さらに、プロテオミクス解析を行い、EV によるフィロポディア形成制御タンパク質としてエンドグリンを同定した。本研究では、がん細胞が分泌する EV 表面エンドグリンによるがん悪性化の分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、EV 表面エンドグリンによるがん悪性化機構の分子メカニズムを明らかにするため、(1) エンドグリン安定発現抑制株(shENG)を作成し、マウス生体内でのがん悪性化への寄与を評価する。続いて、(2)がん細胞由来 EV 表面エンドグリンが正常細胞に及ぼす影響を評価し、最後に、(3)EV を受容した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する。以上の研究計画を遂行し、エンドグリンによるがん悪性化獲得の分子メカニズムを解明する。

本申請課題は、研究期間を 3 年間として、以下を明らかにするべき課題として研究を進める。

- (1) マウスモデルによって生体内における EV 表面エンドグリンの造腫瘍能や正常細胞への影響を明らかにする。
- (2) がん細胞が分泌する EV 表面エンドグリンがその EV を受容した細胞内で亢進するシグナル伝達経路を明らかにする。
- (3) (2)で得られた情報を元に数理モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) エンドグリンのがん悪性化への影響をマウスモデルを用いた評価
コントロール細胞(shLacZ)とエンドグリン安定発現抑制株(shEnd)をマウス皮下に移植し、腫瘍サイズを記録したところ、shEnd で優位に腫瘍サイズの低下が確認された。また、免

疫染色によって shEnd では微小環境が shLacZ と比較して異なることを見出した。

(2) がん細胞由来 EV 表面のエンドグリンが正常細胞に及ぼす影響

これまでに、エンドグリンは血管内皮細胞において重要な役割を果たすことが明らかになっている。一方、がん細胞由来 EV が血管内皮細胞のチューブ形成を制御することも報告されている (Gopal et al, 2016 Oncotarget)。これらを考慮し、まず、がん細胞由来 EV を精製して、血管内皮細胞に添加した際のチューブ形成能を評価したところ、shLacZ 由来 EV はチューブ形成能を促進したが、shEnd 由来 EV は PBS と変化がなかった。

(3) EV を受容した細胞内で亢進されるシグナル伝達経路を RPPA (Reverse Phase Protein Array) 解析により網羅的に同定

RPPA は細胞や組織抽出液をアレイヤー (先端直径数 100 μm 程度の針) でニトロセルロースに固相化し、特異的抗体を用いてタンパク質を定量的に評価できる系である。このことから、shLacZ と shEnd からそれぞれ EV を精製し、当量の EV を血管内皮細胞に添加後、6Hrs, 12Hrs, 24 Hrs, 48 Hrs 後のサンプルを回収して、RPPA 解析を行った。コントロールの PBS 処理と比較して EV 添加により、ある特定のシグナル伝達経路の亢進が確認されたが、エンドグリン特異的なシグナル変動の同定には至らなかった。

本研究では、上記の通り、これまでに未解明であった癌細胞のエンドグリンが EV に局在することで、がんの悪性化を制御していることを明らかにした。しかしながら、その分子メカニズムの解明には至っておらず、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----