

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07495

研究課題名（和文）がんエクソソームの機能解明と臨床応用を目指した生体解析モデルの構築

研究課題名（英文）In vivo imaging system of cancer-derived exosome using a BRET reporter

研究代表者

疋田 智也（HIKITA, TOMOYA）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍制御学分野・研究員

研究者番号：20600935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体イメージングに適した光を放つBRETレポーターを用いて、産生されるエクソソームが光標識されるがん細胞を作製した。この細胞をマウスに移植することで、生体内におけるがんエクソソームの体内動態を可視化し、エクソソームが集積しやすい臓器や組織を同定することに成功した。また、エクソソーム産生を阻害すると考えられた薬剤をこのマウスに投与したところ、腫瘍の大きさには影響はなかったが、血中及び集積組織のエクソソーム由来の光量が顕著に低下した。このエクソソーム生体イメージング系は、がんエクソソームの体内動態やエクソソーム阻害薬の評価系として有用なツールである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は、エクソソームを介して近くや遠くの細胞へ作用し、腫瘍の増大やがん転移に有利な環境を作り出す。このため、がん細胞が産生するエクソソーム量やその集積組織を生体レベルで解析することは非常に重要である。しかし、エクソソームはナノサイズの微細な構造体であるため、これらの解析が非常に困難であった。本研究で構築した生体イメージング系は、高感度かつ定量的に生体内のがんエクソソーム量や集積組織の同定を可能とし、生体内におけるエクソソームの機能解析や阻害薬開発の有用なツールとして高い利用価値を有する。

研究成果の概要（英文）：The long-term monitoring of exosome dynamics in living organisms is essential to demonstrate real functions of cancer-derived exosomes. However, various experimental limitations have made it impossible. In this study, we developed the exosome-tracking mice model using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Transplantation of CD63-red-shifted reporter-expressing cells made it possible to monitor the amounts of cancer-derived exosomes released from primary tumor into the bloodstream, and to identify the exosome-mediated long-term homing behavior in certain organs or tissues. Furthermore, the exosome-derived luminescence in blood and tissues was attenuated by administering the tyrosine-kinase inhibitor dasatinib. Therefore, CD63-red-shifted reporter xenograft mice model would be a useful tool for elucidating the dynamics of cancer-derived exosomes and evaluating the effects of exosome inhibitors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エクソソーム がん 生体イメージング BRETレポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

直径約 30-150 nm の細胞外小胞であるエクソソームは、内包物（核酸、タンパク質、脂質、代謝物など）の受け渡しを行う細胞間コミュニケーションツールとして近年注目されている[1]。これまで腫瘍微小環境及び前転移ニッチの形成など、がん細胞由来エクソソーム（以下、がんエクソソーム）の多様な機能が報告され、がんの診断・治療への可能性が示されてきた[2]。しかし、がんエクソソームの機能及び体内動態は、大量の精製エクソソームを細胞又はマウスへ過剰に導入することで解析されており[3-5]、生体における本来のエクソソーム機能を反映しているのか疑問が持たれている。また、投与量や投与経路によっても異なる体内動態を示すことが知られており[6]、これまでのエクソソーム生体解析が適切であるとは言い難い。そのため、生体におけるエクソソーム機能の解明には、これまでのような artificial な実験系ではなく、持続的に産生されるがんエクソソームを生体レベルで検出可能な解析法が必要不可欠である[7]。我々はこの現状を改善するため、高輝度ルシフェラーゼ NanoLuc (Nluc) を用いて発光標識エクソソーム産生細胞を作製し、マウスへ移植することで、病態を反映したがんエクソソームの ex vivo イメージング解析法を報告してきた (Hikita T, et al, *Scientific Reports*, 8:14035, 2018)。しかし、本方法では短波長である Nluc 光の性質上、経時的かつ非侵襲的な観察が不可能であり、汎用的な解析手法として改良の余地を残している。非侵襲的かつ経時的にエクソソームの動態や組織集積性を観察可能なマウスモデルは、がんエクソソームの生体機能を解明する上で最も有用な解析ツールとなると考えられる。

2. 研究の目的

近年、Nluc 光で長波調光を産生する BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) システム Antares2 [8] や、ホタルルシフェラーゼ (Fluc) 改変産物 Akaluc [9] が開発され、生体深部の光イメージングが可能となった。これらの発光輝度は Fluc の 300~1000 倍であり、1 細胞レベルの検出を可能としている。そこで本研究では、Antares2 または Akaluc を用いてがんエクソソームの産生、血中への移行、及びその臓器指向性を非侵襲的かつ経時的に観察可能なマウスモデルを構築し、生体レベルでエクソソームの機能解析を行うことを主目的とする。また、作製したマウスモデルを用いて、エクソソーム産生阻害薬の評価系モデルとしての可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) エクソソーム生体イメージングモデルの構築：

申請者は、エクソソーム産生能の高い細胞株として、ヒト前立腺がん PC3 細胞を同定した。そこで、PC3 細胞の産生エクソソームを発光標識するため、エクソソームマーカータンパク質 CD63 と Antares2 または Akaluc の融合遺伝子を細胞に導入した。また、EGFP を同時に発現させることで、細胞とエクソソームの発光を区別可能な細胞の作製を試みた (PC3/EGFP/CD63-Antares2 細胞の作製)。この発光・蛍光標識 PC3 細胞をヌードマウスに皮下移植し、経時的に IVIS (in vivo imaging system) を用いた生体イメージング及び血中発光量の測定を行った。さらに移植後 30 日をエンドポイントとし、基質投与後に摘出した各臓器の ex vivo イメージング解析を行うことで、PC3 細胞由来エクソソームのより詳細な集積臓器の特定を行った。さらに、発光が検出された臓器の組織切片を作製し、Antares2 を構成する NanoLuc に対する抗体を用いた免疫組織染色を行い、臓器内のより詳細なエクソソーム集積及び取り込み細胞の同定を試みた。

(2) エクソソーム産生阻害薬評価系の検証：

エクソソーム生体イメージングモデルは、血中のがんエクソソーム量及び組織集積量を発光として定量・可視化可能なため、エクソソーム制御薬剤の効果予測や新規薬剤の in vivo スクリーニングなどに応用できると考えられる。そこでまず、PC3/EGFP/CD63-Antares2 細胞と様々なシグナル伝達阻害剤を用いて、PC3 細胞のエクソソーム産生を抑制する薬剤の同定を行った。同定したエクソソーム産生阻害剤を、PC3/EGFP/CD63-Antares2 皮下移植マウスに投与し、血中がんエクソソーム量、及び組織蓄積性を比較定量化し、本解析モデルの薬剤開発への利用可能性を検証した。

(3) がんエクソソームによる病態機能解明：

生体イメージング解析より得られたエクソソーム集積臓器または組織の生化学的、組織学的変化に着目し、がんエクソソームの本来の生体機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) エクソソーム生体イメージングモデルの構築：

CD63-Antares2 及び CD63-Akaluc の遺伝子導入後、培養上清中の発光値を測定した結果、Antares2 由来の強い発光は検出されたが、Akaluc の発光は検出されなかった。産生エクソソーム内に Akaluc の存在が認められるにも関わらず発光を示さないことから、エクソソーム発光標識には Antares2 が適切であることが分かった。培養上清中の発光量は細胞数及びエクソソーム数に比例して変化していたことから、PC3/EGFP/CD63-Antares2 細胞は高精度・高感度なエクソソーム定量測定系として使用可能であることが明らかになった (図 1)。

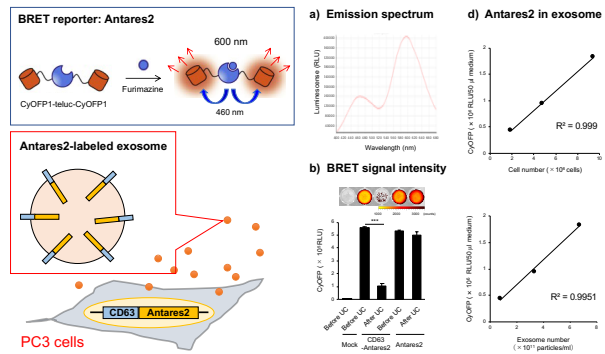


図 1: Antares2 標識化エクソソーム産生細胞の作製

PC3/EGFP/CD63-Antares2 担がんマウスの血中 Antares2 活性は、細胞移植 10 日後から時間経過とともに増加し、体外からの非侵襲的イメージングにおいても同時期よりエクソソームシグナルが検出された。また、ex vivo イメージングでは、肺、胃、脾臓、生殖臓器、腸に強い発光シグナルを検出した。さらに、免疫組織染色の結果より、ヒト前立腺がん PC3 細胞由来の EVs は気管支上皮細胞、脾臓実質組織、腸管膜リンパ節、脂肪組織へ高い集積を示すことが明らかとなった (図 2d)。

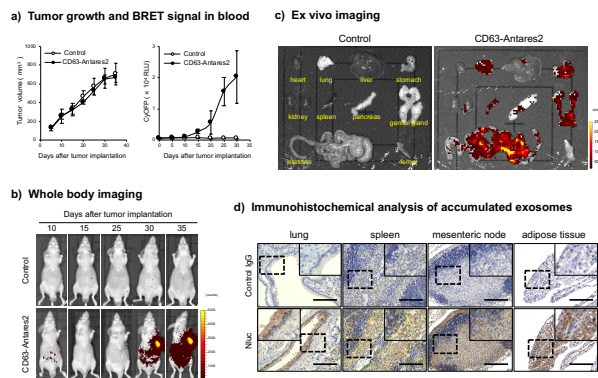


図 2: エクソソーム生体イメージングマウスの構築とその評価

(2) エクソソーム産生阻害薬評価系の検証: エクソソーム定量細胞系を用いたシグナル阻害剤スクリーニングにより、チロシンキナーゼ阻害剤 Dasatinib が、PC3 細胞のエクソソーム産生を有意に抑制することを見出した。PC3/EGFP/CD63-Antares2 皮下移植マウスに低容量の Dasatinib を投与したところ、腫瘍の大きさには変化は見られなかったが、エクソソーム由来の血中発光値の濃度依存的な減少が検出された (図 3a)。さらに、体外及び ex vivo のイメージングや免疫組織学的解析においても、Dasatinib 投与により顕著なエクソソームシグナルの減弱が確認された (図 3b, c)。これらの結果は、構築したエクソソーム生体イメージングモデルが、エクソソーム産生阻害薬の評価系モデルとして有用であることを示唆している。

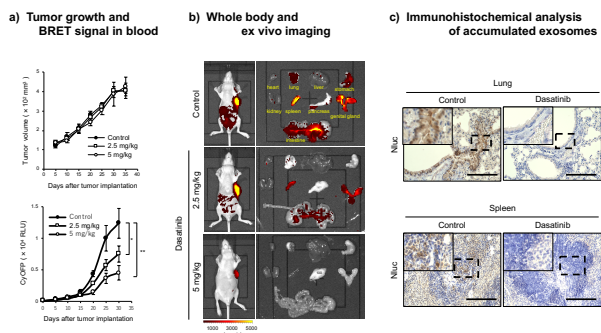


図 3: 生体イメージングマウスのエクソソーム産生阻害薬評価系への応用可能性

(3) がんエクソソームによる病態機能解明: PC3 細胞由来エクソソームの集積が見られた臓器の組織学的観察から、白色脂肪細胞からベージュ細胞への褐色化と脂肪分解が誘導されていることを発見した (図 2d)。脂肪分解や分解に伴う遊離脂肪酸の産生は、がん悪性進展に深く関与する現象であるが [3, 4]、集積 EVs がそれら機能発現に関与しているかは不明である。現在、がん EVs による脂肪褐色化・分解への寄与、およびその分子機構解析を行っているところである。

<引用文献>

[1] van Niel, G et al, *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:213-228, 2018. [2] Peinado, H et al, *Nat Rev Cancer* 17:302-317, 2017. [3] Takahashi, Y et al, *J Biotechnol* 165:77-84, 2013. [4] Lai, CP et al, *ACS Nano* 8:483-494, 2014. [5] Gangadaran, P et al, *Front Pharmacol* 9:817, 2018. [6] Wiklander, OP et al, *J Extracell Vesicles* 4:26316, 2015. [7] Ruivo, CF et al, *Cancer Res* 77:6480-6488, 2017. [8] Yeh, HW et al, *Nat Methods* 14:971-974, 2017. [9] Iwano, S et al, *Science* 359:935-939, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoya Hikita, Mamiko Miyata, Risayo Watanabe, Chitose Oneyama	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 In vivo imaging of long-term accumulation of cancer-derived exosomes using a BRET-based reporter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73580-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 疋田 智也、小根山 千歳
2. 発表標題 がん細胞由来エクソソームのin vivoイメージング
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 疋田 智也、小根山 千歳
2. 発表標題 がん細胞由来エクソソームのin vivoイメージング解析
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Hikita, Chitose Oneyama
2. 発表標題 In vivo imaging of long-term accumulated cancer-derived exosome by CD63-fused BRET reporter
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会（横浜）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 疋田 智也
2. 発表標題 がん細胞由来エクソソームの長期体内動態解析
3. 学会等名 第5回 Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 疋田智也、小根山千歳
2. 発表標題 がん細胞由来エクソソームのin vivoイメージング
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（京都）
4. 発表年 2020年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関