

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：94313

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16821

研究課題名(和文) エクソソームによる、細胞内分子を標的としたがん治療の創出

研究課題名(英文) Establishment of new cancer treatment targeting Intracellular molecules via extracellular vesicles

研究代表者

稲野 将二郎 (INANO, SHOJIRO)

株式会社関西メディカルネット(関西電力医学研究所)・臨床腫瘍研究部・上級特別研究員

研究者番号：70811199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：まず、エクソソーム移行配列-ユビキチン化酵素-nanobodyからなるキメラ蛋白をスクリーニングし、GFPに対するnanobodyを用いて、GFPを効率よく分解するものをスクリーニングした。がん治療に応用するため、次にnanobodyを置換してKRASの分解が可能かどうか検証した。KRASに注目したのは、いまだ有効な治療法の存在しない膵癌において中心的な役割を果たしているからである。結果、KRASの活性化型特異的な分解を達成した。この蛋白を産生する293Tの培養上清から超遠心法を用いて抽出したエクソソームを加えることで、KRASの分解及び増殖抑制を5つの膵癌細胞株において誘導することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療は日々進歩を続けているものの、細胞内の分子を標的とする手段はまだまだ少なく、特にKRASは長年がん治療の標的として有望視されてきたものの、いまだに制御する手段が乏しいと言わざるを得ません。本研究ではエクソソームを解して直接的に活性化型KRASの分解を促す蛋白を細胞に移行させることでKRASの活性化型特異的な分解を達成しました。この方法をウイルスによる遺伝子治療、あるいは細胞治療と組み合わせることで、新しいがん治療樹立の可能性が見えてきます。

研究成果の概要(英文)：We screened and generated a chimeric protein composed of "extracellular vesicle transition sequence"- "substrate recognition subunit of CRL complex"- "anti-GFP nanobody", which efficiently degraded GFP via ubiquitilation. Next, we focused on KRAS protein that plays central role in pancreatic cancer. By replacing GFP nanobody with KRAS binding motif, we achieved GTP-bound type specific KRAS degradation in several cell lines including 293T, HeLa, or U2OS, as well as five pancreatic cancer cell lines. Finally, we isolated extracellular vesicles from culture supernatant of 293T cells expressing this protein, and treated pancreatic cancer cell line. Treated cells exhibited decreased KRAS expression and impaired proliferation, confirming the direct transfer of functional protein via extracellular vesicles.

研究分野：血液内科、腫瘍内科

キーワード：エクソソーム ユビキチン化 膵癌 KRAS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内分子標的治療には一定の限界が存在する。すなわち、細胞膜を透過するサイズにとどめつつ、かつ対象の分子に特異性をもって結合できるデザインが構築できることが要求される、という点である。次世代シーケンサーをはじめとした解析技術の進展によって、今後は自由に細胞内の分子を標的とした治療手段への需要が大きくなっていくものと予想される。そのための基盤を創出することを目的として本研究を開始した。まず、予後不良である膵癌において社会的要
求の大きい KRAS を標的として、新しい分子標的治療の樹立を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新しい分子標的治療を創出することであるが、まずは KRAS を標的とした治療を念頭において研究を進めることとした。具体的には、KRAS を分解してかつエクソソームに移行する蛋白をデザインし、これを膵癌細胞株に取り込ませることで KRAS の分解、増殖抑制を達成することを目指した。

3. 研究の方法

大きく分けて、

1) 293T 細胞株における人工蛋白の骨格を形成する E3 酵素のスクリーニング、2) KRAS の分解を達成するための基質結合部位の改変、3) エクソソームへの移行性の検証、4) 標的細胞に取り込まれた後のエンドソーム回避のための表面蛋白改変、5) 膵癌細胞株における検証、を行った。

4. 研究成果

1) GFP nanobody を用いたスクリーニング

エクソソーム移行配列-ユビキチン化コンポーネント-GFP nanobody というキメラ蛋白を作成し、複数のユビキチン化コンポーネントを用いてスクリーニングを行い、効率よく標的蛋白(GFP)の分解を生じるものを抽出した。

2) KRAS の分解

上記キメラ蛋白の GFP nanobody を KRAS 標的化のために置換し(DEG^{KRAS})、HiBiT タグを付加した KRAS を発現する 293T 細胞を用いて KRAS の分解能を検証した。膵癌で頻繁に見られる KRAS G12C, G12D などの種々の変異では高い分解効率が観察された一方で、非活性化型の変異体(KRAS K104Q)ではほぼ分解が生じないことから、GTP 結合型 KRAS 特異的な分解が生じているものと考えられた。

また、DEG^{KRAS} を 5 つの膵癌細胞株(PK-1, PK-45H, PK-59, T3M-4, PANC-1)に発現させたところ、いずれの細胞株においても KRAS の分解、及び ERK リン酸化の消失を認めた。その結果としてほぼ停止に近い増殖抑制が認められたものの、KRAS の除去のみで死滅したのは T3M-4 のみであり、combination therapy の必要性が示唆された。

3) エクソソームへの移行

上記蛋白はエクソソームへの移行配列を有しているが、移行率を HiBiT tag による発光法及びウエスタンブロットで検証したところ、細胞内に比してエクソソームに含まれるキメラ蛋白は 1%程度であった。しかしながら、bafilomycin A1 や concanamycin A など lysosome の阻害剤で処理すると、エクソソームへの移行率が 10 倍以上に上昇することが分かった。

293T 細胞に DEG^{KRAS} を発現させ、bafilomycin A1 で処理後に上清を超速心法で回収、同じく 293T 細胞に投与することで、KRAS の分解を確認することができた。しかしながら純化したエクソソームとして投与した場合、細胞内の半減期は数時間以内であり、きわめて短いことがわかった。そこで、共培養での効果を確認したところ、bafilomycin A1 処理がないためキメラ蛋白の移行率ははるかに低いにも関わらず、KRAS の分解能ははるかに高いことが確認され、持続的な暴露が有効であることが示唆された。

4) エンドソームの突破

3) でエクソソームに含まれるキメラ蛋白の半減期がきわめて短いことの原因として、エンドソームでの分解が生じることが考えられた。エクソソームの細胞内移行経路としてはマクロピノサイトーシスと言われているが、実際 PKH67 でエクソソームを標識して投与した場合、マクロピノサイトーシスの阻害剤である EIPA によって劇的に PKH シグナルが減少することが観察された。マクロピノサイトーシスで取り込まれたエクソソームの運命はリソソームに癒合して分解されるか、細胞内にリリースされるかの二択と考えられるが、後者を促進するために様々な方法が報告されている。中心的な方法は EX vivo でエクソソームを純化した後に細胞透過性ペプチド等を付加する方法であるが、実臨床を見据えた場合、コストと手間が大きな障害となると考えられ、EV 表面の蛋白を改変することで対応することとした。

5) 膵癌細胞株の制御

DEG^{KRAS}、および上述の改変 EV 表面蛋白をドキシサイクリン依存性に発現させる Piggy Bac vector を作成し、膵癌細胞株への効果を検証した。まず 293T 細胞を遺伝子改変し、luciferase 発現膵癌細胞株との共培養を行ったところ、EV 表面蛋白により増殖抑制効果が明らかに改善しているという結果が得られた。この減少は transwell (0.45 μ m) を介した共培養でも保たれていたことから、エクソソームを介した蛋白の直接的伝搬が主体となっていると考えられた。また、上述のベクターを用いて膵癌細胞株に遺伝子導入を行い、同じく luciferase 発現細胞株と共培養したところ、増殖抑制が確認された。このことは、ウイルスベクターで膵癌細胞株を標的とした KRAS の分解を行い、周囲の癌細胞に伝染させることができる可能性を示唆するものと考えられた。

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〕

特許取得準備中です。

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
---------	---------