

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06039・19K21174

研究課題名(和文) エキソソームの多様性を生み出す細胞内小胞輸送経路の解明

研究課題名(英文) The elucidation of membrane traffic pathway required for the exosomal heterogeneity generation

研究代表者

松井 貴英 (Matsui, Takahide)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10827794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：エキソソームは細胞外小胞の一種であり、特定のタンパク質や脂質、核酸が豊富に含まれることから、その生理作用やガンなどの疾患との関連性について多くの研究がなされている。最近になり、単一の細胞が多様なエキソソームを分泌することがわかっている。しかし細胞内でエキソソームの多様性がどのように生じるかは全くわかっていなかった。本研究で我々は、エキソソームの多様性を研究すべく、新し実験系を構築した。その結果、細胞内には互いに非依存的な2種類のエキソソーム生合成機構があることを見出した。現在この内容を論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エキソソームは特定の分子を含み、新しい細胞間コミュニケーションの方法として着目されている。実際に細胞間の恒常性維持に重要な役割を持つことも示唆されている。また、ある種のガン細胞では浸潤を促進するために特殊なエキソソームを分泌し、周囲の細胞の性質を変える可能性があることもわかってきている。本研究では、単一細胞における多様なエキソソームの生合成機構の解明に取り組んだ。したがって、本研究の知見が、生体内におけるガンの浸潤、進行のメカニズム解明の一助となる可能性もあり得る。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are extracellular vesicles that have various physiological and pathological functions. Recently, the exosomal heterogeneity, that is, various types (e.g., sizes and contents) of exosomes being released from a single cell, has been reported. Because once the heterogeneous exosomes are released into the extracellular space, it is extremely difficult to distinguish, collect, and analyze them separately. Thus, the mechanisms by which heterogeneous exosomes are produced within cells are poorly understood, so far. In this study, we for the first time established a method to efficiently analyze the exosome heterogeneity by using epithelial MDCK cell. And we found that MDCK cells release two distinct types of exosomes with distinct protein compositions via two independent mechanisms.

研究分野：細胞生物学

キーワード：exosome endosomal ESCRT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、細胞外に放出された直径 30nm–100nm の小胞で、蛋白質、核酸、脂質などを含んでいる。先行研究から、エクソソームは生体内のほぼすべての細胞から分泌されると考えられており、新たな細胞間コミュニケーションの手段として注目されている。実際に、近年の研究からエクソソームが様々な生理機能や、がんや免疫応答などのヒトの疾患との関わりがあることがわかってきている。

一般的に、エクソソームは内腔側に多数の小胞を含む多胞体 (Multivesicular body、以下 MVB と表記) と呼ばれる後期エンドソームの一種が細胞膜と融合し、内部の小胞が細胞外に放出されることで生じる。最近になり、生体内には、サイズや内容物の違いにより様々な種類のエクソソームが存在することが知られている。これまで、このようなエクソソームの違いは、宿主細胞種の違いから生じていると思われていたが、実際には同種の細胞からも多種のエクソソームが分泌されることがわかってきている。しかし、現在までに、細胞内でエクソソームの多様性がどのように生み出されるのか、その分子メカニズムはほとんどわかっていない。その最大の理由として、エクソソームがどのように形成され、どのように輸送され、どこから、どのように放出されるのかという基本的な分子機構に未解明な点がかかり多いことにある。

2. 研究の目的

エクソソームの多様性を生み出す細胞内メカニズムを解明するためには、単一の細胞から分泌される多様なエクソソームを別個に回収し、解析する必要がある。しかし技術的な問題から、性質に異なるエクソソームを区別して回収することは難しく、これまでのエクソソーム研究の多くは、培養液中に放出されたエクソソームを一緒に回収していた。そこで本研究では、密着結合により物理的に隔てられた二種類の性質の異なる細胞膜(頂端膜と側底膜)を持つ上皮細胞(イヌ腎臓尿細管上皮由来の MDCK 細胞)を用いることで、異なる細胞膜から分泌される異種のエクソソームの形成、輸送・分泌の分子メカニズムの違いに着目した。極性を持たない一般的な培養細胞とは異なり、生体を構成する細胞は特定の細胞膜領域から分泌を行うことから、MDCK 細胞のような極性を持つ上皮細胞をモデルに用いることは生理的にも意義があると考えられる。本研究で、このモデル系を用いることで、エクソソームの形成・輸送・分泌過程の分子メカニズムを解明し、最終的にはエクソソームの多様性を生み出す分子基盤を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 異なる細胞膜(頂端膜と側底膜)から分泌されるエクソソームの生化学的・形態学的違いの確認、及び各エクソソームのマーカー分子の同定

MDCK 細胞をフィルター上で平面培養し、頂端膜側及び側底膜側の培養上清から頂端膜エクソソーム、側底膜エクソソームを生化学的に単離・精製した。頂端膜エクソソーム、側底膜エクソソームの組成、形態的差異を明らかにするために、得られたエクソソームを質量分析によるプロテオーム解析、及びネガティブ染色による電子顕微鏡解析、ナノ粒子トラッキング解析を行った。

また、既知のエクソソームマーカー蛋白質の中から、そしてプロテオーム解析の結果から、頂端膜エクソソーム、側底膜エクソソームの特異的マーカー分子の探索を行った。

(2). 多様なエキソソームの形成に関わるタンパク質の探索

MVB の形成に関与する因子群として ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) 複合体が知られている。そこで ESCRT 複合体を構成するタンパク質を RNA 干渉法によるノックダウン (KD) を行い、頂端膜エキソソーム、側底膜エキソソームの分泌への影響を検討した。また、ESCRT 複合体とは独立して MVB 形成を制御するいくつかの因子についても KD によりエキソソーム分泌に影響が出るか検討した。

4. 研究成果

(1). 異なる細胞膜(頂端膜と側底膜)から分泌されるエキソソームの生化学的・形態学的違いの確認、及び各エキソソームのマーカー分子の同定

まず、MDCK 細胞がエキソソームの多様性研究に適しているかを検討するために、MDCK 細胞の頂端膜側及び側底膜側から実際に性質の異なるエキソソームが分泌されているか解析した。具体的には、MDCK 細胞を専用のフィルター上で培養し、頂端膜側及び側底膜側の培養上清から頂端膜エキソソーム、側底膜エキソソームをポリエチレングリコール沈殿 (PEG 沈殿) により生化学的に単離・精製した。

まず、精製したエキソソームをウェスタンブロットにより解析したところ、図 1 に示すように、既知のエキソソームマーカータンパク質の存在量が頂端膜エキソソームと側底膜エキソソームとで異なることが分かった。つまり、頂端膜側と側底膜側ではタンパク質組成の異なるエキソソームが分泌されていると考えられる。

次に、単離したエキソソームをネガティブ染色による電子顕微鏡解析、ナノ粒子トラッキング解析で形態、サイズ解析を行ったところ、頂端膜エキソソームと側底膜エキソソームは主に 50-100 nm サイズであった。これらは一般的なエキソソームサイズであり、両者に形態的、サイズの違いは無かった (図 2)

さらに頂端膜エキソソームと側底膜エキソソーム間における網羅的なタンパク質組成の違いを検討するために、単離した各エキソソームを用いてプロテオーム解析を行った。その結果、多くのエキソソームタンパク質は存在量の違いはあれど、頂端膜エキソ

ソームと側底膜エキソソームの両方に存在していることが分かった。また、頂端膜エキソソームか側底膜エキソソームかのどちらかでのみ検出されたタンパク質を探索したところ、

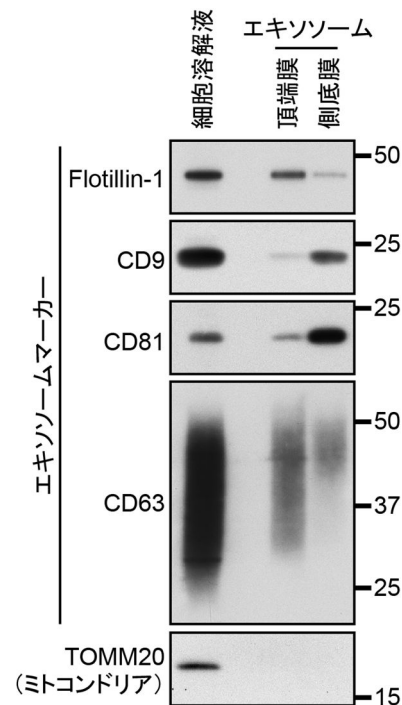


図 1. 頂端膜、側底膜エキソソームではマーカータンパク質組成が異なる

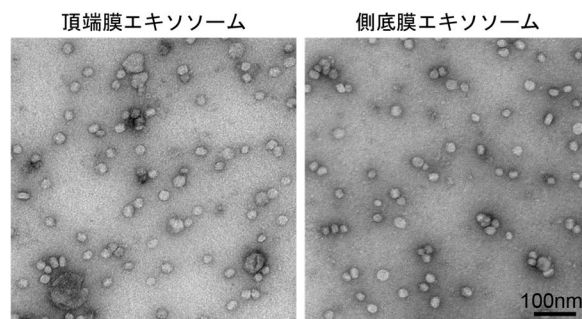


図 2. 精製エキソソームの形態
共に 100nm 以下の小胞が多数を占める。

GPRC5C (G protein-coupled receptor class C group 5 member C) が頂端膜エキソソームにのみ存在するタンパク質であることを発見した。GPRC5C はこれまでにエキソソームに存在することは報告されていないため、本研究により、GPRC5C が頂端膜エキソソームにのみ存在する新規のエキソソーム分子であることが分かった。

(2). 多様なエキソソームの形成に関わるタンパク質の探索

前述のように、細胞からエキソソームが分泌されるには、MVB の形成、MVB の細胞膜近傍への輸送、細胞膜と MVB の融合、の 3 過程が必要である。本研究では特に、MVB の形成に着目した。MDCK 細胞からタンパク質組成の異なる頂端膜エキソソームと側底膜エキソソームを分泌するには、異なる MVB (例えば GPRC5C を含む MVB、含まない MVB) が形成される必要がある。

一般的に MVB 形成に関与する分子として ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) タンパク質群が知られている。ESCRT タンパク質群は主に 6 つのサブグループに分けられ、それぞれのグループが MVB 形成において重要な役割を果たしている。そこで、これらのサブグループに属する遺伝子を RNA 干渉法によるノックダウン (KD) を行い、頂端膜エキソソームと側底膜エキソソーム分泌への影響を検討した。未発表データのため遺伝子名は伏せるが、KD した遺伝子のうち、ある一つの遺伝子 (以下、X と表記) において頂端膜エキソソームの分泌が顕著に阻害されることが分かった。つまりこの結果は、ESCRT タンパク質群全体の機能は分泌性 MVB 形成には必要ではなく、X のみが必要であると考えられる。さらに X の欠損は側底膜エキソソーム分泌には影響しなかったことから、側底膜エキソソームを含む MVB 形成は、ESCRT、および X に非依存的なメカニズムによるものと推測された。

そのような側底膜エキソソームを含む MVB 形成メカニズムを明らかにするために、ESCRT とは非依存的に MVB 形成を制御すると報告があるいくつかの分子について、側底膜エキソソーム分泌との関与を検討した。その中で、実際にある遺伝子 Y の欠損により頂端膜エキソソームの分泌は影響しないが、側底膜エキソソーム分泌が顕著に低下することを見出した。さらに X と Y の同時欠損により MDCK 細胞からのエキソソーム分泌全体が顕著に減少したことから、X と Y は実際に互いに非依存的にエキソソーム分泌を制御していることが分かった。

以上の結果から、MDCK 細胞はタンパク質 X と Y が互いに非依存的に分泌性 MVB の形成を制御することで、頂端膜エキソソームと側底膜エキソソームという組成の異なるエキソソームを分泌することが明らかとなった。現在、ここまでの内容をまとめ論文として投稿中である。また、形成された分泌性 MVB の細胞膜近傍までの細胞内輸送機構についても現在解析中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 松井貴英、福田光則	4. 巻 272
2. 論文標題 エクソソームの生合成機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 293-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----