

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22565

研究課題名（和文）カベオラ小胞を利用した癌治療薬送達技術の科学的基盤の構築と開発

研究課題名（英文）Construction of scientific foundation for drug delivery technology using caveolae vesicles

研究代表者

山口 知也（YAMAGUCHI, Tomoya）

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：70452191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、カベオラ形成因子として新たに見出したROR1分子によるカベオラ依存的な人工的小胞の作製と、その小胞を利用した薬剤伝達法の開発に向けた科学的基盤の構築を目的とした。これまでの研究から、大腸菌やヒト細胞において検証済みの癌化に寄与しない必要最低限の部分的ROR1蛋白質とともに、カベオラ構成分子であるCAV1、CAVIN1蛋白質を発現させ、*in vitro*再構築系を立ち上げた。また、CAV1やCAVIN1の結合力など生化学的解析に加え、宿主細胞の状態やタンパク質の発現程度、安定性など改善点が見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工的に精製したカベオラから生まれる小胞は、従来の合成ミセル等に代表される試験管内での再構築系に比べ、安く大量に作ることができることから、精製したカプセル剤を医学的に応用できると考える。本研究により科学的な研究成果の基盤情報に基づいて、今回研究代表者らが提案したROR1分子によるカベオラを介した機能的人工小胞の作製は、薬剤を腫瘍など体内の必要な場所に正確に届けるDDSとしての可能性を大いに有しており、標的細胞としての癌へのこれまでにない薬剤の送達手段方法の確立につながる可能性を有しており、新しい治療法につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Caveolae are 50-100 nm invaginations of the plasma membrane that play various physiological roles. Caveolin-1 (CAV1) is an essential structural component of caveolae, and cavin-1 (also known as PTRF), a soluble cytosolic protein, associates with CAV1 and prevents its lysosomal degradation. This association enables CAV1 and cavin-1 to be stably confined to the plasma membrane, a process that is thought to be an indispensable prerequisite for caveolae formation. We previously have reported that the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) sustains pro-survival signaling directly downstream of the lineage-survival oncogene NKX2-1/TTF-1 in lung adenocarcinoma. Here we report an unanticipated function of this receptor tyrosine kinase (RTK) as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1 (CAV1), two essential structural components of caveolae. This kinase-independent function of ROR1 facilitates the interactions of cavin-1 and CAV1 at the plasma membrane.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：カベオラ 人工小胞 ドラッグデリバリー 薬剤伝達法 がん治療

1. 研究開始当初の背景

薬物などの生理活性物質を「必要なときに、必要な場所で、必要な量だけ作用させる」ことを目的としたドラッグデリバリーシステム(DDS)は、薬物治療の新しい概念としてこれまでに著しい発展を遂げてきた。なかでも、水溶性高分子、PEG化リポソーム、高分子ミセルなどの高分子キャリアを利用したDDSは、がん治療を中心として高い注目を集めており、現在までに多くの研究開発が行われているが、臨床的に未だ有用なDDSが開発されていない。そのような中、現在、カベオラが注目を集めている。カベオラとは、細胞膜に存在する直径約100nmのフラスコ状の窪みであり、CAV1を骨格とした構造物であるとともに、コレステロールやスフィンゴ脂質に富み、エンドソーム(小胞)を形成する。人工的に精製したカベオラから生まれる小胞は、従来の合成ミセル等に代表される試験管内での再構築系に比べ、安く大量に作ることができることから、精製したカプセル剤を医学的に応用できると考える。

これまでに研究代表者らは、ROR1がキナーゼ活性非依存的に、カベオラ構成分子であるCAV1やcavin-1と相互作用するスキヤフォールド蛋白質として機能することで、カベオラ形成の安定化を促し、カベオラに集積するEGFRやMET、IGF-IRなど様々なRTKの活性化を維持することで、肺腺癌細胞の生存シグナルを担うことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これらの知見から、ROR1がカベオラ形成を介した普遍的な細胞膜の構造と生理機能を調節する新たな制御分子であることが判明し、我々の想像を超えた小胞制御の新たな発展につながる可能性が考えられた。そこで本研究では、研究代表者らがカベオラ制御因子として新たに見出したROR1分子によるカベオラ依存的な人工的小胞の作製と、その小胞を利用した薬剤伝達法の開発に向けた科学的基盤の構築に挑戦した。インビトロ再構築系でのROR1発現による機能的な人工小胞の精製に挑戦し、将来的には薬剤を腫瘍など体内の必要な場所に正確に届けるDDSとしての開発、及び臨床応用を念頭に研究を遂行した。

3. 研究の方法

1) リコンビナントROR1精製タンパク質の作製

種類の異なる大腸菌やバキュロウイルスを用いた昆虫細胞を利用して、ROR1タンパク質の精製を行った。ROR1の野生型に加え、細胞外領域のみ、細胞内領域のみ、キナーゼドメインのみ、あるいは、様々な欠損変異体の発現実験を行い、可溶性画分にどの程度含まれるのかどうかについて、生化学的な解析を行った。IPTGを添加してから、18時間培養したサンプルを超音波破碎後、遠心で上清画分と、沈殿画分に分離し、検証を行った。

2) 細胞ベースによるROR1とカベオラ構成分子の細胞内局在観察

ROR1とカベオラ構成分子(CAV1、CAVIN1、CAVIN3)との結合状態を反映する蛍光シグナルを自動数値化する検出系の構築を行った。ROR1と融合させた4量体形成能を有する蛍光タンパク質(FP-tag)を作製するとともに、カベオラ構成分子と融合させた多量体形成能を有する会合性タンパク質(Ash-tag)の作製を行った。両者を安定的に発現する恒常的発現細胞株を構築するとともに、両者の結合状態を蛍光シグナルの強度(蛍光輝点)として検出できるかどうかについて詳細に検証を行った。

3) ROR1/CAV1/CAVIN1を発現させるインビトロ再構築系の樹立

通常カベオラを持たない大腸菌やヒト細胞の中に、ヒトのROR1やCAV1遺伝子を組み込み、宿主由来の脂質やコレステロールを利用した、これまでにない人工小胞の作製を目的として、大腸菌を用いたROR1/CAV1/CAVIN1の三者複合体の過剰発現を行った。その後、SDS-PAGEによる検証を行い、各々のタンパク質発現状態の評価を行った。また、ROR1/CAV1/CAVIN1を発現していない肺腺癌細胞株A427細胞を用いて、三者を共発現させ、ショ糖濃度勾配法により、細胞抽出液の分画を行い

ROR1/CAV1/CAVIN1 の局在・配向について確認を行った。

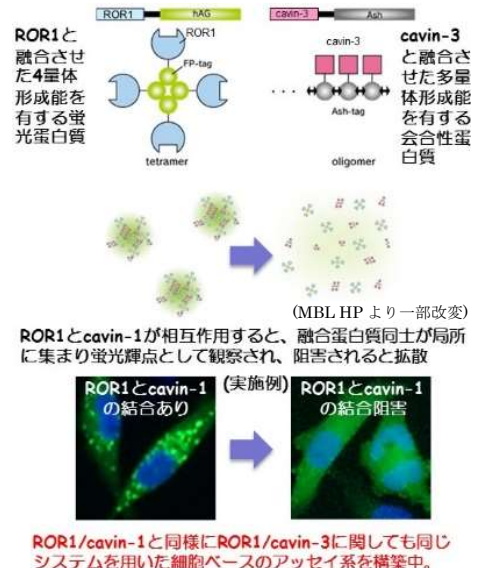
4. 研究成果

1) リコンビナント ROR1 精製タンパク質の作製

様々な標識 Tag (His-や GST-など)や野生型を含む各種欠損変異体を用いた ROR1 タンパク質の精製を行ったところ、Tag の標識によって精製度合いにそれほどの影響は認められなかったが、大腸菌、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞では、ROR1 全長の野生型を精製することは困難であった。宿主の細胞内で ROR1 タンパク質の分解が惹起され不安定な状態になると考えられた。しかしながら、カベオラ構成分子である CAV1 や CAVIN1、CAVIN3 が相互作用する ROR1 の細胞内領域を含む ROR1 精製タンパク質については、カラム精製後に直ちに透析を実施し、-80℃に凍結することで安定して大量に精製することが可能となった。今回の検討から、リコンビナント ROR1 のタンパク質精製は、容易なものではなく、バッファーの組成が異なる場合や 4℃で保存した場合などでは精製物の状態が不安定になることも明らかとなった。

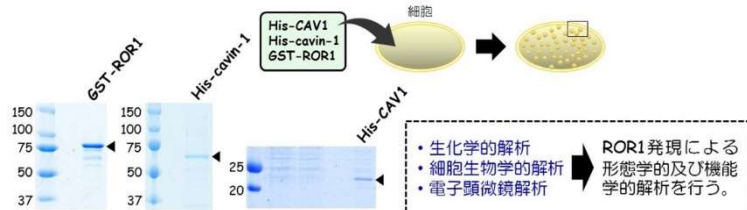
2) 細胞ベースによる ROR1 とカベオラ構成分子の細胞内局在観察

生きた細胞内でのタンパク質間相互作用を測定するための細胞ベースの検出系の構築を行った。MBL 社から販売されている Fluoppi システムをベースに、ROR1 と ROR1 結合分子である CAV1 や CAVIN1、CAVIN3 のそれぞれの融合タンパク質を安定的に発現させた恒常的発現細胞株を樹立することに成功した。この構築系でタンパク質間相互作用を細胞内において蛍光の foci として検出することができ、対照にその逆では、その結合の解離とともに蛍光の foci は分散して一様の蛍光になることを確認した。具体的には、Fluoppi システムに基づいて、ROR1 と ROR1 結合分子である CAV1 や CAVIN1、CAVIN3 の各々に各 tag を融合したプラスミドを作製し、融合位置 (N 末端あるいは C 末端) と融合する tag (FP-tag あるいは Ash-tag) の様々な組み合わせを試すことによる、最適な組み合わせの探索・同定を行い、HEK293 細胞や HeLa 細胞を用いて、最適な組み合わせのプラスミドを恒常的に導入して安定に発現させた細胞株の樹立(クローン化)を行った。ROR1 と CAVIN1、の結合状態を細胞ベースで検出することができ、RNAi 干渉法による CAVIN1 の発現抑制によってその相互作用が抑制されることを確認した(右図)。



3) ROR1/CAV1/CAVIN1 を発現させるインビトロ再構築系の樹立

これまでの研究結果から、ROR1 は、キナーゼ活性非依存的に、カベオラ構成分子である CAV1 や cavin-1 と相互作用するスキャフォールド蛋白質として機能することで、カベオラ形成の安定化を促し、カベオラに集積する EGFR や MET、IGF-IR など様々な RTK の活性化を維持し、肺腺癌細胞の生存シグナルを担うことが明らかとなっているが、今回の ROR1/CAV1/CAVIN1 三者複合体の発現検証により、ROR1 陽性ヒト細胞において予め ROR1 の発現を抑制させると、その後、CAV1 を発現させることが困難となることを見出した。このことから、ROR1 はカベオラ形成において足場的な機能を有している可能性が示唆された。次に、大腸菌の細胞の中で GST-ROR1、His-CAVIN1、さらには His-CAV1 を同時にかつ大量、そして安定的に発現させることに成功した(右図)。また、大腸菌の細胞に加え、ROR1/CAV1/CAVIN1 を発現していない肺腺癌細胞株 A427 細胞を用いて、三者を共発現させ、シヨ糖濃度勾配法に



より、細胞抽出液の分画を行った結果、ROR1 発現存在下で、同じ画分に CAV1 や CAVIN1 の発現が認められることが分かった。対照的に、ROR1 を発現させなかった場合、CAV1 や CAVIN1 は、発現そのものが不安定であったり、異なる画分に移動するといったことが観察されたことから、やはり ROR1 の発現そのものが、CAV1 や CAVIN1 の発現の安定化、適切な局在化に重要であることが判明した。今後、これらの構築系を用いることで、生化学的な性状解析や、電子顕微鏡を用いた形態学的機能解析を進めたいと考えている。また、蛋白質・脂質の構造や分子分布を正確に保ったまま動的な脂質膜を二次元の平面として観察でき、空間統計学的方法で定量、比較、評価することが可能な急速凍結・凍結切断レプリカ標識法による電子顕微鏡解析を行う予定である。

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

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