

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650038

研究課題名(和文)がん悪性度マーカーとしてのExosome膜脂質の分析技術の確立

研究課題名(英文)Characterization of exosome membrane as cancer progressive markers

## 研究代表者

深見 希代子 (Fukami, Kiyoko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40181242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の悪性化に、がん細胞が放出する脂質小胞エクソソームが関与する。エクソソームは多胞性エンドソーム由来の小胞であることから、リン脂質やその代謝物等のシグナル脂質がエクソソーム膜に存在し、その脂質組成の違いががん細胞の性質を反映するという仮説を証明する事にした。

種々のメラノーマ細胞、大腸癌細胞等からエクソソームを単離し、イノシトールリン脂質がエクソソームに存在することが判明した。またがん細胞悪性化の1つ薬剤耐性とエクソソームとの関連性を検討し、ヒトメラノーマ細胞株を抗がん剤 Vemurafenibで処理するとエクソソームマーカーのCD63の発現量が顕著に増加することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Lipid small vesicle exosomes have been reported to be involved in cancer progression such as metastasis and drug resistance. We hypothesized that various kinds of phosphoinositides on exosome from cancers define the characters of exosome.

We confirmed the existence of phosphoinositides on exosome by using phosphoinositides-binding probes and mass analysis. We also examined the effect of B-Raf inhibitor Vemurafenib-treatment on exosome properties from melanoma cells. With treatment of Vemurafenib, the expression of exosome marker CD63 was dramatically increased.

研究分野：病態医科学

キーワード：エクソソーム がん悪性化 イノシトールリン脂質

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の悪性化には周りの細胞とのコミュニケーションが関わっていることが明らかになってきている。この手段の1つとしてがん細胞が放出する脂質小胞エクソソームが、周辺および遠隔部位の免疫細胞や線維芽細胞に取り込まれ、エクソソーム中に含まれるタンパク質や mRNA, miRNA が免疫抑制や転移環境の整備など、がん細胞の生存や転移に有利になるしくみを作り出している事が判明してきている (Nat. Med. 18, 883, 2012, Nat. Med. 18, 853, 2012 他)。がん細胞の生存にはイノシトールリン脂質である PIP3、および PIP3 のターゲットである AKT の活性化が重要な役割を持つ事は良く知られている。また、がん抑制遺伝子 PTEN などのリン脂質代謝酵素がエクソソームに入り細胞間を移動することが報告されている (Sci. Signal. ra70, 2012)。申請者らはこれまで細胞の増殖・分化や生存等の運命決定にリン脂質代謝が重要である事を報告してきており (EMBO J. 22, 2981, 2003, Mol. Cell Biol. 25, 10979, 2005 他)、リン脂質やその代謝物等のシグナル脂質がエクソソーム膜に存在し、その脂質組成が細胞の性質を反映するのではないかとこの着想に至った。エクソソームは多胞性エンドソーム由来の小胞であることから、エクソソーム膜を構成するリン脂質の組成ががん細胞特異的に変化している可能性は高い。特に PIP3 やリン脂質代謝の要の脂質である PIP2 動態はがん細胞の悪性化に伴って変化している事が予想される。そこで、「がん細胞の悪性度等に伴い、エクソソーム膜に含まれる PIP3 や PIP2 など細胞増殖、生存、移動に關与するシグナル脂質の動態に変化が生じる」という概念を検証する。エクソソーム膜構成イノシトールリン脂質の分析方法は確立されていないので、解析方法を多面的に検討する。

## 2. 研究の目的

エクソソーム膜脂質の解析は全く行われていないので、第一に、エクソソーム膜脂質の検出方法など解析技術を開発する。エクソソーム膜脂質の動態変化を網羅的に解析できる方法も開発する。これを基に、「がん細胞のエクソソーム膜に含まれる PIP3 や PIP2 など細胞増殖、生存、移動に關与するシグナル脂質の動態に変化が生じる」という仮説の検証を行なう。またがん細胞の薬剤耐性などの悪性化とエクソソーム膜動態の關連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) エクソソーム膜のシグナル脂質の測定技術の確立～種々ながん細胞でのエクソソーム単離法の確立：エクソソーム直径に留意しながら、種々のがん細胞からのエクソソームの単離方法を検討する。
- (2) エクソソーム膜のシグナル脂質の測定技術の確立～脂質結合ドメインの利用：シグナル脂質と結合する蛍光ラベルした脂質結合ドメインを細胞に発現させ、分泌するエクソソームの蛍光強度を FACS で調べることにより、エクソソーム中の脂質の同定と測定技術を開発する。
- (3) エクソソーム膜のシグナル脂質の同定と定量化：微量な exosome からリン脂質を抽出し、質量解析により、種々ながん細胞エクソソームからの網羅的なリン脂質の同定と定量化を試みる。正常な細胞からのエクソソームに存在する脂質との違い、存在量を検討する。
- (4) がん細胞悪性化とエクソソームとの關連性の検討：がん細胞の悪性化の1つに薬剤耐性がある。そこで BRAF 変異ヒトメラノーマ細胞株を BRAF 阻害剤 Vemurafenib で処理した時のエクソソームに与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

- (1) 種々ながん細胞でのエクソソーム単離

## 法の確立

まずエクソソーム単離にあたり、超遠心法、市販キットの利用等を検討し、収量や純度(エクソソームの大きさの分布)を確認しながら、単離法を確立した。直径はナノサイトで測定し、150 nm を越えない単離法を確立した。その方法に従って、メラノーマ細胞 A375、G361、HT-144、SK-MEL28、乳がん細胞 MDA-MB-231、MCF7、大腸癌細胞 SW620、DLD-1、膵臓癌細胞 Panc1 からエクソソームを単離することができた。エクソソームマーカータンパク質 CD63 を用いたウエスタンブロットにより、エクソソーム量を比較した所、高転移性メラノーマ細胞 A375 等では、多くのエクソソームが分泌されていることが判明した。

### (2) 脂質結合ドメインを利用したエクソソームでのイノシトールリン脂質の検出

リン脂質 PIP2 との結合性が報告されている PLC $\delta$ 1 PH-GFP を安定発現した大腸癌細胞 DLD1 を無血清培地中で培養し、その上清から改変超遠心法によりエクソソームを調製したところ、エクソソーム画分に PLC $\delta$ 1 PH-GFP タンパク質を検出した。一方、リン脂質 PIP2 との結合性のない PLC $\delta$ 1 PH-GFP/R40L 変異体はエクソソーム画分に検出されなかった。この結果は、PIP2 結合能依存的に PLC $\delta$ 1 PH タンパク質がエクソソームに運搬されたことを示唆しており、PIP2 がエクソソームに存在することを示している。同様の結果を膵臓癌細胞 Panc1、大腸癌細胞 SW620 でも得た。Akt PH-GFP など他の様々な脂質特異的なプローブを用いることで、エクソソームに存在する PIP3 などの脂質の推定が可能であると考えられる。

### (3) エクソソーム膜のシグナル脂質の同定と定量化

エクソソームから抽出したリン脂質量は微量であるが、質量分析による網羅的な

リン脂質の同定と定量化が可能になった。そこで高転移性メラノーマ細胞 A375 の培養上清から調製したエクソソームの脂質成分を解析したところ、PIP2 を検出することができた。このことにより、脂質結合ドメインを利用した方法と同様にエクソソームにイノシトールリン脂質が存在することが判明した。エクソソームに特有なりゾリン脂質の存在も明らかになった。

### (4) がん細胞悪性化とエクソソームとの関連性の検討

がん細胞の悪性化の1つに薬剤耐性がある。そこで BRAF 変異ヒトメラノーマ細胞株 A375 および HT-144 を抗がん剤 Vemurafenib (BRAF 阻害剤)で処理し、エクソソームに与える影響を検討した。どちらの細胞株においても、薬剤処理によりエクソソームマーカーの1つであるテトラスパンニン CD63 のエクソソームタンパク質画分における存在量が顕著に増加した。一方、同ファミリー分子である CD9 および膜タンパク質である Flotillin では変化が認められなかった。また面白いことに、薬剤処理により、CD63 分子量が高分子側に大きくシフトし、細胞免疫染色では細胞膜への移行の促進が観察された。CD63 は N-型糖鎖修飾部位を持つ糖タンパク質で、その細胞膜への移行には糖鎖修飾が重要であることが報告されている。そこで、Vemurafenib と糖鎖付加阻害剤 Tunicamycin で細胞を同時に処理したところ、CD63 のコアタンパク質に相当するバンドがウエスタンブロットにより検出された。このことから Vemurafenib は CD63 の糖鎖修飾、あるいは糖鎖修飾によって調節される結合分子に影響を与えることで細胞膜への移行を促進し、エクソソーム中の CD63 存在量を増加させている可能性が考えられた。これらの結果は、抗癌剤が癌細胞由来エクソソームの性質を変

化させる可能性を示唆している。現在薬剤処理時や薬剤耐性株からのエクソソーム膜脂質の種類の違いや脂肪酸組成の違いを検討している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Nakamura Y., Kanemaru K., Kojima R., Hashimoto Y., Marunouchi T., Oka N., Ogura T., Tanonaka K., Fukami K. Simultaneous loss of phospholipase C $\delta$ 1 and phospholipase C $\delta$ 3 causes cardiomyocyte apoptosis and cardiomyopathy. *Cell Death & Dis.* 5,1215 (2014)
  2. Ishida S., Matsu-ura T., Fukami K., Michikawa T., Mikoshiba, K. Phospholipase C- $\beta$ 1 and  $\beta$ 4 contribute to non-genetic cell-to-cell variability in histamine-induced calcium signals in HeLa cells. *PLoS One.* 9, 86410 (2014)
  3. Satow R., Hirano T., Batori R., Nakamura, T., Murayama Y., Fukami, K. Phospholipase C delta 1 induces E-cadherin expression and suppresses malignancy in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 13505-13510 (2014)
  4. Kanemaru K., Matsuyuki A., Nakamura Y., Fukami K. Obesity exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like epidermal hyperplasia and interleukin 17 and interleukin 22 production in mice. *Exp. Dermatol.* 24, 436-442(2015), doi: 10.1111/exd.12691. Epub 2015 Apr 16.
  5. Kudo K., Uchida T., Sawada M., Nakamura Y., Yoneda A., Fukami K. Phospholipase C  $\delta$ 1 in macrophages negatively regulates TLR4-induced proinflammatory cytokine production and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *Adv Biol Regul.* S2212-4926 15, 30022-1 (2015)
- [学会発表](計 10 件)
1. Reiko Satow, Tamaki, Hirano, Ryosuke, Batori, Tomomi Nakamura, Yumi Murayama, Kiyoko Fukami. Phospholipase C delta 1 induces E-cadherin expression and suppresses malignancy in colorectal cancer cells, 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2015/2, Tokyo
  2. Kohya Kudo, Takashi Uchida, Atsuko Yoneda, Kiyoko Fukami. The Cellular Functions of Phospholipase C $\delta$ 1 in Macrophages, 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2015/2, Tokyo
  3. Atsuko Yoneda, Marie Morgan-Fisher, Kiyoko Fukami, John R. Couchman. GSK3 Phosphorylation and mRNA Splicing of Collapsin Response Mediator Protein-2 Control ROCK II-dependent Carcinoma Cell Migration and Invasion, 9<sup>th</sup> International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2015/8, Seoul
  4. Kiyoko Fukami. Loss of phospholipase C $\delta$ 1 impairs Epidermal barrier and skin inflammation. The 2<sup>nd</sup> special international symposium on Phospholipid-related signaling in physiology and pathology. 2015/12, Gyeongju/Korea
  5. 藤中良介、原島望、土屋夏希、岸佑、米田敦子、深見希代子、PIP<sub>2</sub> のマスクングによるインテグリンを介した癌細胞の接着/遊走の調節、第 4 7 回日本結合組織学会学術大会、2015/5、東京
  6. 中村由和、金丸佳織、深見希代子、ホスホリパーゼ Cdelta1 の減少は p38MAPK の過剰活性化を介し表皮バリア機能を低下させる、第 5 7 回日本脂質生化学会、2015/5、東京

7. Atsuko Yoneda, Marie Morgan-Fisher, John R. Couchman, Kiyoko Fukami. Phosphorylation and mRNA Splicing of Collapsin Response Mediator Protein-2 Determine Inhibition of Rho-associated Protein Kinase (ROCK) II Function in Carcinoma Cell Migration and Invasion, 第67回日本細胞生物学会大会、2015/6、東京
8. 佐藤礼子、深見希代子、メラノーマ悪性化を促進する遺伝子の探索と機能解析、第88回日本生化学会、2015/12、神戸
9. 中村由和、金丸佳織、深見希代子、ホスホリパーゼC 1は正常な皮膚バリアの形成に必要である、第88回日本生化学会、2015/12、神戸
10. 下澤誠、佐藤礼子、深見希代子、大腸がん細胞において PLC 1はオートファジーを制御する、第88回日本生化学会、2015/12、神戸

〔図書〕(計 3 件)

1. Fukami K, Nakamura Y. The role of phospholipase C isozymes in cellular homeostasis. *Phospholipases in Health and Disease* **10**, 201-210 (2014)
2. 深見希代子、中村由和 ホスホリパーゼC (PLC)による恒常性維持機構とその破綻がもたらす疾病 医学のあゆみ 248 (13) 1051-1058 (2014).
3. 中村由和、金丸佳織、深見希代子 「炎症性皮膚疾患とイノシトールリン脂質代謝系」、実験医学増刊 脂質疾患学～脂質研究から疾患制御へ～ 羊土社、126-132 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：腫瘍細胞の悪性化抑制剤及び抗腫剤  
 発明者：深見希代子 佐藤礼子  
 権利者：  
 種類：  
 番号：2015-93980  
 出願年月日：2015.5.1

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ：  
<http://toyaku-ls-genome.com>

6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 深見希代子 (FUKAMI, Kiyoko)  
 東京薬科大学生命科学部・教授  
 研究者番号：40181242

(2)研究分担者  
 無し