

研究終了報告書

「肺腺がんにおける内因性微粒子の制御機構の解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：山口 知也

1. 研究のねらい

近年、エクソソームと呼ばれる内因性微粒子の存在が注目されており、特に癌や各種疾患における役割が急速に報告されている。その性質や構造から医療分野などで、診断や再生医療、ドラッグデリバリーシステム等、様々な活用法が期待され、また特に血液や尿などの体液から検出されるということで、低侵襲な診断への期待から、がんなどの診断を目的とした研究が進んでいる。しかしながら、これほど注目を集め、治療や診断への応用が展開されている中、未だにエクソソームがどのように生成され、放出されるのか詳細な分子機序が分かっておらず、不明な点が多い。多胞性エンドソームの基となるエンドソームはいつどこでどのように生じるのか、また腔内膜小胞の形成はどのような制御下で調節されているのか、など分子機構の解明は、今後のエクソソーム研究の発展に欠かせない、喫緊の課題である。

これまでに研究代表者は、リネジ生存癌遺伝子である TTF-1 によって転写活性化される ROR1 が EGFR からの肺腺癌の生存シグナルの維持に必要な受容体型チロシンキナーゼ (RTK) であることを見出し、また最近 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 CAVIN1、CAVIN3 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、カベオラの形成やカベオラ依存的エンドサイトーシスを促し、カベオラに集積する EGFR や MET、IGF-IR など様々な RTK の活性化の維持に寄与することで、肺腺癌での重要な生存シグナルを担うことを明らかにした。

そこで本研究では、これまで誰も明らかにしていないカベオラ制御分子として見出した ROR1 を基軸に、新しい内因性微粒子のダイナミクス制御の全貌を解き明かすことを目的とする。これまで多くの謎に包まれてきた内因性微粒子の生成・放出過程や生理機能、さらには内因性微粒子制御における分子メカニズムなど、肺腺がんを含めた普遍的な癌細胞における多様な機能の分子機序の解明を行う。本研究を遂行することで、前述の詳細な分子機構が明らかになるだけでなく、内因性微粒子による疾患発生のメカニズムや悪性化機構、細胞間のコミュニケーション制御など、癌細胞での細胞外、及び細胞内の微粒子ワールドの全貌の解明につながり、さらには本研究の知見に基づく、内因性微粒子を標的とした新しい診断法や革新的な治療法の開発に結びつくことが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

リネジ生存癌遺伝子である TTF-1 によって転写活性化される ROR1 は、EGFR からの肺腺癌の生存シグナルの維持に必要な受容体型チロシンキナーゼであるとともに、細胞膜でのカベオラ形成やカベオラ依存的エンドサイトーシスを安定化させ、カベオラに集積する様々な受容体の活性化の維持に寄与することで、肺腺癌の重要な生存シグナルを担う。本研究では、研究代表者

がこれまでに得た結果を含む最新かつ詳細な知見を発展させるべく、カベオラ制御分子として新たに見出した ROR1 を基軸にエクソソームを含む内因性微粒子の詳細な生理的機能と「がん」との関連性を明らかにすることで、肺腺癌細胞での新しい内因性微粒子のダイナミクス制御機構の全貌を解き明かすことを目的とした。具体的には、肺腺癌細胞におけるエクソソームの生成に伴う詳細な分子機序の解明と、細胞外に放出されるエクソソームの性状解析、及び診断にも応用可能なエクソソーム検出系の構築を実施した。

これまでの研究成果から、肺腺癌細胞において、ROR1 は ESCRT 複合体と相互作用することで、複合体を形成する蛋白質同士の結合や、膜分画への ESCRT 蛋白質のリクルートメント、さらには ESCRT 蛋白質の安定化に関わる、癌細胞にとって非常に重要な分子であることが分かった。また、ROR1 はエクソソームの生成過程の間である多胞体に存在していることが分かり、ROR1 の発現抑制は多胞体形成に異常が認められることが判明した。さらに、ROR1 の発現抑制は恒常的活性化型 Rab5 による Rab5 コンパートメントの大きさを著しく小さくさせることから、ROR1 が初期エンドソームから形成される多胞体のサイズ制御に深く関与している可能性が示唆された。このことから、癌細胞において ROR1 分子が ESCRT 装置を制御することで、内因性微粒子として一部のエクソソームの生成過程に関与するという、これまでにない新しいエクソソームの生成機構を示すことができた。次に、ROR1 陽性の肺腺癌細胞から単離したエクソソームには CD63 や CD9 等のエクソソームマーカーであるテトラスパニン蛋白質と同様に ROR1 が高発現していることを見出し、対症的に ROR1 陰性の肺腺癌細胞や、私たちが樹立したヒト正常末梢気道上皮細胞から得られたエクソソーム画分では検出されないことが判明した。そこで、これまで得られた知見に基づき、癌特異的発現を示す ROR1 分子に基づく肺腺癌特異的エクソソームに対して、高感度かつ簡便に検出可能な「癌診断検出キット」を構築した。これまでの検討から、確立した高感度検出法により、ROR1 陽性、及び ROR1 陰性の肺腺癌細胞から単離したエクソソームを用いて解析を行い、ROR1 陽性の肺腺癌細胞のエクソソーム特異的に検出することに成功した。このことから、研究開発代表者が独自に開発した「癌診断検出キット」が、コンパニオン診断や早期診断に活用できる、これまでにない体外診断用医薬品としての革新的な診断法の開発につながる可能性を示すことができた。

(2) 詳細

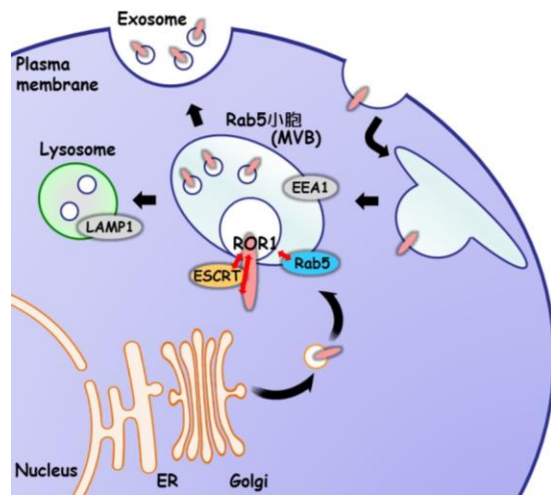
研究テーマ①「肺腺癌細胞におけるエクソソームの生成に伴う詳細な分子機序の解明」

これまでの研究成果から、ROR1 は ESCRT 複合体と相互作用することで、複合体を形成する蛋白質同士の結合や、膜分画への ESCRT 蛋白質のリクルートメント、さらには ESCRT 蛋白質の安定化に関わる、癌細胞にとって非常に重要な分子であることが分かった。また、ROR1 の発現抑制は恒常的活性化型 Rab5 による Rab5 コンパートメントの大きさを著しく小さくさせることから、ROR1 が初期エンドソームから形成される多胞体のサイズ制御に深く関与している可能性が示唆された。PLA 法を用いた解析からも、恒常的活性化型 Rab5 発現に伴う Rab5 コンパートメントにおいて、ROR1 が存在し、その小胞膜へ ESCRT タンパク質がリクルートされることで、膜上で ROR1 と会合することを見出した。さらに、癌特異的な ROR1 制御システムを明らかにするため、APEX2 を用いた近接ラベリング法を構築し、調節タンパク質や制御下にある相互作用分子の同定を行ったところ、複数の有力な候補分子の同定に成功した。またその候補分子の中に Rab5 が有意に検出されたことから、ROR1 を介した ESCRT-0 複合体の安定化機構、あるいは小胞形成

における生理的機能に Rab5 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、ROR1 が実際にエクソソームの生成過程の場である MVB(多胞体)に存在しているかどうかについて、順天堂大学の藤本豊士博士のご支援の下、Rab5 コンパートメントにおける ROR1 分子の免疫電子顕微鏡解析や、超高解像度共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察、さらには、APEX2 を用いた近接ラベリング法による ROR1-APEX2 の電子顕微鏡解析などを通じて、ROR1 の MVB における詳細な局在を検討した。その結果、ROR1 は MVB の小胞膜、および、MVB 内の将来エクソソームになる予定の小胞に存在していることが判明した。さらに、電子顕微鏡を用いた形態学的機能解析により、ROR1 の発現を抑制させると、異常な小胞の形成(小胞内への陥入状態で停止しているもの、あるいは小胞内に 1 つだけ小さな小胞が存在しているもの)が認められ、正常な MVB の構造は観察されないことを明らかにした。また、ROR1 と同じ受容体型チロシンキナーゼである EGFR の発現抑制では、同じような表現型は観察されないことも確認した。さらに、電子顕微鏡による連続切片を試みた結果、ROR1 発現抑制に伴う異常小胞、および小胞内の構造物は、膜を有した小胞であることを確認した。ROR1 の発現抑制は、CD63 や CD9 等のエクソソームマーカーであるテトラスパンin蛋白質の顕著な局在変化を惹起させ、電子顕微鏡による観察においては、MVB の痕跡らしき部分に CD63 の非常に弱い反応が認められることが分かった。これらの結果から、癌細胞において ROR1 分子が ESCRT 装置を制御することで、内因性微粒子としての一部のエクソソームの生成過程に関与する可能性を示すことができた。以上のことから、当初の研究計画に沿って、研究は遂行でき、目標としたマイルストーンをおおむね達成できたと考えられる。

【ROR1分子による内因性微粒子の制御機構】



研究テーマ②「細胞外に放出されるエクソソームの性状解析、及びエクソソーム検出系の構築」

細胞外に放出されるエクソソームの性状解析について、愛知県がんセンターの高橋隆博士のご支援の下、肺腺癌細胞を用いて細胞上清を回収し、様々な方法によりエクソソームの単離・抽出を行った。遠心によるペレットダウン法、免疫沈降法、粒子サイズによる分画法、カラムへのエクソソームの吸着法を行ったところ、超遠心による方法が最も効率が良く、CD63 や CD9、CD81 の発現が認められるエクソソーム画分を単離することが可能であった。他の方法では、スタート時のサンプル量が遠心法と比べ数倍以上必要となることや単離・抽出まで想定より時間がかかる上、エクソソーム画分の回収効率が低かった。また、肺腺癌細胞株から単離・抽出したエクソソーム画分はいずれの方法においても4℃で保存した場合、3~4週間以上放置したものは、テトラスパンin蛋白質の分解が起こっていた。以上の結果から、肺腺癌細胞からエクソソーム画分を単離・抽出する場合、超遠心によるペレットダウン法が最も効率的であり、単離後のエクソソーム画分は、なるべく速やかに解析に用いる必要があることが分かった。このことから、以後の研究においてエクソソーム画分を用いる場合、超遠心による単離法を採用することにした。

次に、放出されたエクソソームの詳細な検討を行ったところ、ROR1 陽性の肺腺癌細胞から超遠心法により単離したエクソソーム画分において、ROR1 が高発現していることが判明した。また、肺腺癌細胞での ROR1 抑制はエクソソームの放出量を顕著に低下させることから、エクソソームの生成過程と ROR1 分子との関連性を支持する結果が得られた。さらに、ナノ粒子解析システムであるナノサイトを用いてエクソソームの粒子径や濃度について調べたところ、ROR1 の発現抑制は、エクソソームの粒子径に大きな差異は認められなかったが、培養上清から得られた全体のエクソソームの濃度が顕著に低下していることが明らかとなった。

そこで、これらの科学的知見に基づき、癌特異的発現を示す ROR1 分子に基づく肺腺癌特異的細胞外小胞に対して、高感度かつ簡便に検出可能な「癌診断検出キット」を構築した。これまでの検討から、確立した高感度検出法により、ROR1 陽性、及び ROR1 陰性の肺腺癌細胞から単離したエクソソームを用いて解析を行い、ROR1 陽性の肺腺癌細胞のエクソソーム特異的に検出することに成功した。また、ROR1 の発現が認められない、ヒト正常末梢気道上皮細胞から得られたエクソソーム画分では検出されないことが判明した。恒常的 ROR1 発現細胞株を用いた検討からも、エクソソーム量に依存して、検出量が増加することや、僅かなサンプル量からでも検出が可能であることも確認でき、正確性と特異性を兼ね備えた検出法であることが分かった。この検出法により、正常細胞由来のエクソソームには反応せず、肺腺癌細胞由来のエクソソームのみを捕捉することが可能となり、僅かな生体サンプルから検出できることから、本検出キットがコンパニオン診断や早期診断に活用できる、これまでにない体外診断用医薬品としての革新的な診断法の開発につながる可能性を示すことができた。以上のことから、当初の研究計画に沿って、研究は遂行でき、目標としたマイルストーンをおおむね達成できたと考えられる。

3. 今後の展開

これまでの研究成果により、肺腺癌細胞におけるエクソソームの生成機構に ROR1 分子が重要な役割を担っていることが明らかとなった。ROR1 が ESCRT 分子を制御することで、MVB の形成に関与し、内因性微粒子としてのエクソソームの生成と放出に、少なくとも一部は関わっていると考えられる。しかしながら、癌胎児性抗原としての性質を有する ROR1 分子が、癌の発生・進展過程において、いかにそのような制御機構を獲得するのか、いかにこの制御機構が癌細胞にとって重要であるのか、など、今後、さらに詳細な検討が必要となる。これまでに、癌特異的な ROR1 制御システムを明らかにするため、APEX2 を用いた近接ラベリング法を構築し、調節タンパク質や制御下にある相互作用分子の同定を行った。質量分析の結果、Rab5 を含めた、様々な有力な候補分子が同定できたことから、これらの分子が、ROR1-HRS-STAM1 の制御機構にどのように関わっているのか、分子機序も含めて今後検討する余地があると思われる。また、同様の手法で、APEX2-ROR1 による ROR1 の発現・局在に注目した、SILAC 法を組み合わせた解析による新たな相互作用分子の同定を試みており、Integrin と結合しシグナルを伝達し、特に肺がんではエクソソーム放出様式に従って分泌され、癌の発生や進展過程に関わる、CYR61 を同定した。今後の解析が必要となってくるが、ROR1-HRS-STAM1 制御による多胞体形成からのエクソソームに CYR61 が存在し、癌形質獲得などの重要な役割を果たしている可能性についても検証する必要がある。さらに、癌細胞で ROR1 がいかに ESCRT 分子を制御し、エクソソームの生成に関わっているかという質問に答えるためにも、癌胎児性抗原としての性質を持つ ROR1 が正常な発生初期段階で、エクソソームの制御や放出、機能に関わる可能性についてしっかり追

究する必要がある。これまでの研究成果からも、ROR1 は進化的に保存されていることから、発生過程を個体レベルで詳細に検討が可能なショウジョウバエモデルを利用し、これまで細胞レベルで得られた詳細な ROR1 による内因性微粒子の制御機構の検証を行った。結果として、ショウジョウバエの個体で ROR1 (dror) の発現を抑制させると、正常に発生はしてくるものの、非常に顕著な形で翅に異常な空胞が出現することを見出すとともに、dror の異なる配列の RNAi を用いた検討においても、さらに翅の様々な部分で dror を抑制させた検討においても、全ての個体で異常な空胞が認められることが判明している。これまでの報告から、この空胞(みず膨れ様形態)は、Integrin の翅上皮細胞への供給(トラフィッキング)が損なわれることで惹起される表現型であり、Blisterd wing と呼ばれている。多胞体(MVB)や様々な小胞輸送、Rab タンパク質ファミリーが関与している可能性が示唆されており、今後、発生初期での ROR1 と ESCRT-0 複合体、あるいは Rab5 との相互作用による内因性微粒子の制御機構との関係性を明らかにすることが、癌細胞での ROR1 のエクソソーム制御のさらなる解明につながると考えられる。

次に、これまでの科学的知見から、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 CAVIN1、CAVIN3 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、カベオラの形成やカベオラ依存的エンドサイトーシスを促し、カベオラに集積する EGFR や MET、IGF-IR など様々な RTK の活性化の維持に寄与することで、肺腺癌での重要な生存シグナルを担うことが明らかとなっている。そこで、本研究で明らかとなった ROR1 によるエクソソーム制御機構にカベオラが関わる可能性について検証する必要がある。これまでの報告から、MVB にカベオラが存在していることや、私たちも確認しているが細胞外に放出されたエクソソームにも CAV1 の発現が認められる。このことから、MVB の形成や成熟機構、選別機構にカベオラが関わる可能性について解析することで、ROR1 を介したカベオラ制御機構とエクソソーム制御との強い関連性を示すことができ、さらなるエクソソーム生成プロセスの解明につながると考えられる。

また、本研究成果から、肺腺癌細胞から放出されたエクソソームに ROR1 が高発現していることを見出している。このことから、放出された ROR1 陽性のエクソソームの生理的機能について、今後解析をする必要がある。エクソソームの安定性に関わっているのか、エクソソームの取り込み過程に寄与しているのかなど、詳細な検証が必要であるとともに、癌細胞間のコミュニケーション機構や癌形質の獲得、癌シグナル伝達機構など、受け取り側の細胞における癌の悪性化に関わる分子機構などを解析することで、細胞外へ放出されたエクソソームにおける ROR1 の重要性について検討を行いたい。

次に、肺腺癌細胞を含めた様々な固形癌の細胞上清から単離したエクソソームの検出法については、これまでの研究成果から、ROR1 陽性癌細胞から得られたエクソソームを検出することができ、ROR1 の発現が著しく低下している癌細胞や、不死化ではあるが、正常なヒトの末梢気道上皮の細胞から得られたエクソソームでは検出されないことから、非常に検出感度が高く、特異性を有した検出法を構築することが出来た。また、これまでの検討から、ROR1 発現系の同所移植系ではあるが、マウスの血清より精製したエクソソームを用いて、ROR1 陽性のエクソソームを検出することに成功している。この検出法により、正常細胞由来のエクソソームには反応せず、癌細胞由来のエクソソームのみを捕捉することが可能となり、将来的には、被検体から採取した僅かな生体サンプルから、被検体に癌の疑いがあるか否か、簡便、容易に(短時間で)、且つ、低侵襲的に確認することができる可能性が想定される。しかしながら、上述のプロセスまで到達させるためには、開発した「癌診断検出キット」の検出感度を向上させるために、さらなる改良が必

ず必要となってくる。例えば、現在、本検出系は、プレート底面にテトラスパンニン蛋白質に対する抗 CD9 や CD63、CD81 抗体を固相化し、エクソソームが含まれる血液などの試料を反応させ、そして定常部にビオチンを付加させた抗 ROR1 抗体を用い、検出を行っているが、最近の予備的検討結果から、抗 ROR1 抗体を固相化し、さらにビオチンを付加させた抗 ROR1 抗体で検出する方がさらに検出感度が向上することを見出している。どのような抗体の組み合わせが最適であるのか、サンプルから得られたエクソソームを可溶化した方が良いのか、あるいは、検出時のエクソソームの状態についても検討する必要がある。これまでの研究結果からは、エクソソームの単離方法について、免疫沈降法、粒子サイズによる分画法、カラムへのエクソソームの吸着法と比べて、超遠心による方法が最も効率が良く、単離後のエクソソーム画分は、なるべく速やかに解析に用いることが重要であることが判明した。しかしながら、将来的な癌診断法を念頭に置いた場合、超遠心法以外の方法を選択する必要がある、どの方法が本検出系に適しているのか、どの程度不純物を除いた形で検出できるかが鍵となり、今後、さらなる検証が必要となる。

4. 自己評価

本研究が採択される数か月前に、文部科学省の卓越研究員事業によって、名古屋大学から熊本大学に異動し、独立准教授として研究室を主宰する研究室責任者となったため、研究を進めるための実験台や設備機器、実験器具、試薬等に加え、研究資金がほとんど無かったことから、本研究の採択によって、安定かつ自立した研究環境の下で本研究を遂行することが可能となった。また、本研究を加速する上で必要不可欠な技術補佐員の雇用や、研究を遂行する上で必要となる消耗品や研究機器としての蛍光顕微鏡などの導入などについて、全研究期間を通じて、研究計画に沿って、適切に使用することが出来たことから、問題なく研究費を執行することが出来た。次に、研究プロセスに関しては、研究開始時点では、どのように研究が進んでいくのか、見通しがつかない状況であったが、研究総括や領域アドバイザーの先生方からの助言や、研究遂行にあたって研究支援者であった、順天堂大学の藤本豊士博士、愛知県がんセンターの高橋隆博士のご支援もあり、研究を軌道に乗せることが出来た。このことから、研究代表者、研究支援者、技術補佐員からなる研究実施体制がしっかりしていたことも、本研究を進める上で重要な一因であったと認識している。また、1年に2回の領域会議の度に、研究総括や領域アドバイザーの先生方からのコメントやアドバイスは研究を進める上で、研究の指針となり、非常に助けになった。また、さきがけ研究者同士のコミュニケーションも研究を遂行する上で、モチベーションを向上させ、研究の推進力になっていたと思われる。しかしながら、私自身、本研究を通じて、さきがけ研究者間、あるいは CREST 研究者間での、新たな共同研究に至った研究テーマが無かったため、改善点としては、もっと積極的に共同研究に繋がるような関係性を構築するべきであったと考えており、反省すべき点である。

次に、研究内容については、本研究遂行にあたり、当初の研究計画に沿って、研究は遂行でき、目標としたマイルストーンをおおむね達成できたと考えられる。当初の目標では、常識に囚われず、これまで誰も明らかにしていない、新しい内因性微粒子のダイナミクス制御機構の解明を目指したものとなっており、非常に大胆かつ大きな挑戦であったが、これまでの研究成果から、まだ理解されていない部分や検証を重ねる必要はもちろんあるが、肺腺癌細胞において ROR1 分子は MVB に存在し、ESCRT 構成因子である HRS と STAM1 のスキャフォールドタンパク質として働き、両者のタンパク質の安定化に寄与し、特に HRS についてはライソソームによって分解

されないように安定化に働き、MVB 形成の成熟化に関わることで、ROR1 陽性のエクソソームの細胞外への放出に関与することが判明した。このことから、ROR1 が内因性微粒子としての一部のエクソソームの生成過程に関与する可能性を示すことができた。今後、本研究で明らかとなったエクソソーム生成の分子機構が癌としての形質獲得や発生・進展に関わるということが明らかとなった際には、ROR1 と HRS、あるいは、ROR1 と STAM1 のタンパク質間相互作用を阻害する低分子化合物の探索・同定を進めることで、エクソソーム放出阻害剤としての癌治療薬開発の創薬に発展する可能性が考えられる。そうなれば、新しい治療薬の開発につながり、社会実装に大きく直結すると考えられる。次に、もう一つの目標である、エクソソームの性状解析に伴う検出法の構築についても、臨床検体を使った解析まで進めることが叶わなかったが、本研究期間の終盤で、これまでの科学的知見に基づいた「癌診断検出キット」を作製することが出来た。細胞培養上清やマウス血清に含まれる ROR1 陽性エクソソームを従来のタンパク質検出法(ウェスタンブロットング法など)より単純な手順、かつ約 10 分の 1 の時間で、さらに、100 μ L という少量のサンプル量で検出できる手法の開発に成功した。現在、製薬企業と協議を行っており、ROR1 陽性エクソソームを検出するという、全く新しい視点からの体外診断用医薬品として、コンパニオン診断や早期発見を可能とする診断法の開発を目指しており、早期診断法の開発に端緒を開くことができれば、その健康・生命の面での貢献はもちろんのこと、経済的なインパクトも極めて大きいと期待され、将来的な社会実装に大きくつながると考えられる。また、本研究全体を通じて研究の進め方については、現状を踏まえて今後の計画を見据えた上で、さらに積極的かつ大胆に物事を進めることができれば、さらに研究の加速度は向上していたのではないかと考える。

また、最終年度には、新型コロナウイルスの感染拡大に伴い、研究時間の短縮や技術補佐員の出勤制限、購入物の納品遅延、共同研究先や受託機関との送付・受け取りの遅延、共同研究施設や動物実験施設への立ち入り制限、など、本研究を遂行するにあたり、大きな影響を受けることとなった。このような状況下で、一応、研究を遂行することはできたが、自分自身がやりたい事や進めたい実験を中断せざるを得ず、様々なことを断念しなくてはならなかったことは悔やまれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表
該当なし(今後投稿予定)。

(2) 特許出願
該当なし(今後特許申請予定)。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・ 山口知也
肺腺がんにおける細胞外小胞の形成および分泌メカニズム
第 42 回日本分子生物学会年会、Workshop
福岡、2019 年 12 月