

研究終了報告書

「エクソソームの量と質を制御するメカニズムの解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：小根山 千歳

1. 研究のねらい

細胞から分泌される細胞外小胞の一種であるエクソソームは、内部に様々な分子を内包し、それが他細胞へ送達されることで、細胞間コミュニケーションを担うと考えられている。また、がん化など、細胞の状態変化に応じてエクソソームの分泌が増加し、その内包分子も変化することから、体液中のエクソソームを利用した疾病診断、いわゆるリキッドバイオプシーの実用化研究が注目されている。しかし、そもそもなぜ特定の条件でエクソソームの「量」が変化するのか、またその「質」すなわち内包分子がどのように選択されるのか、といった基礎的な理解が不十分な状況であった。そこで本研究では、以下に示すアプローチにより、エクソソームの「量」と「質」を制御する分子機構を解明することを狙った。

(1)エクソソーム分泌量を簡便・高精度に定量化できる細胞系の構築：微細膜小胞であるエクソソームを分析する手法は限られている。本研究では発光タンパク質を利用して、分泌エクソソームを簡便かつ高精度に定量化できる細胞系を開発し、従来のエクソソーム研究のボトルネックを解決することを目指した。

(2)エクソソーム形成と内包分子の積み込みに関わる分子の同定と機能解析：エクソソーム産生を制御する分子メカニズムには不明な点が多い。先述のエクソソーム発光検出系を用いることで、エクソソーム産生に関わる分子を探索同定することを試みた。特に、細胞の形質転換に伴うエクソソーム分泌量変化に関わる細胞内シグナル伝達を精査し、エクソソーム産生を制御する分子メカニズムの解明を目指した。

(3)エクソソーム形成における脂質ナドメインの役割解明：エクソソームの生成には、シグナル分子の局在・機能制御に重要である脂質ラフトが関与している可能性がある。ラフトの量的・質的变化がエクソソームに及ぼす影響を解析し、細胞内シグナル分子の局在変化とエクソソーム産生制御の関係を解明することを目指した。

また、これらを通じたエクソソーム産生制御の分子メカニズム解明と解析技術開発を通じて、従来困難であった生体レベルに近いエクソソーム動態および作用評価や、がんの増殖及び転移に対する新規治療標的の提案などを実現し、「エクソソーム生物学・医学」における研究の高度化と応用展開の基盤構築に貢献することを期待した。

2. 研究成果

(1)概要

エクソソームの産生制御メカニズム研究を加速するため、エクソソームマーカー CD9/CD63/CD81 と高輝度発光タンパク質 NanoLuc との融合タンパク質を発現するエクソソーム定量細胞系を確立した。これらの細胞では、培養液中の発光量とエクソソーム数が比例し、エクソソーム産生を効率的に計測できることを示した。この細胞をマウス皮下に移植する

ことで、分泌エクソソームの生体内動態を生理的に近い条件下で長期間追跡できる実験系 (ex vivo) を構築した。また本系を改良し、BRET による赤色発光を利用してエクソソームの非侵襲的な in vivo イメージングに成功した。

上記の実験系を活用し、エクソソーム分泌機構を解析した。エンドソーム膜上に局在したチロシンキナーゼ Src が、ESCRT 関連蛋白質 Alix と特異的に相互作用することで、エクソソームの元となる腔内小胞 ILV の形成を促すメカニズムを明らかにした。また、Src ファミリーキナーゼ間でのエクソソーム分泌亢進作用の違いを見出し、それがキナーゼの脂質ラフトへの親和性と関連していることを明らかにした。これに関連して、膜融合時に機能している SNARE タンパク質が、Src の細胞内局在とエクソソーム分泌に関わることを見出した。

さらに、MEK/ERK 活性化とエクソソーム分泌が相関していることを見出した。そのメカニズムとして、MEK が活性化するとエンドソーム分解過程に関与する複数の遺伝子群の発現が低下し、エンドソームの分解が抑制されることを明らかにした。一方、MEK の活性化を抑制すると、エンドソーム分解の亢進と共にエクソソーム分泌が抑制された。がんでは、Ras/Raf 変異による MEK/ERK 活性化がしばしば認められるが、MEK の活性化はエンドソーム分解系を抑制し、過剰となった後期エンドソームが、がんにおけるエクソソーム分泌の亢進の一因であると示唆された。さらにがん細胞において MEK を阻害してこの過程を抑制すると、がん形質も大幅に抑制された。ある種のがん細胞では、この機構を通じて不要物質の排出を促進し、がん化で破綻している細胞内物質の恒常性維持機構を補完していると考えられる。

以上の成果は、生体内エクソソームの動態および作用評価や、新規分子標的の探索にあたり有用な知見となることが期待できる。

(2) 詳細

研究テーマ 1「エクソソーム分泌量を簡便・高精度に定量化できる細胞系の構築」

エクソソーム分泌を簡便・高精度に計測することを目指し、エクソソームマーカー CD9/CD63/CD81 と高輝度発光タンパク質 NanoLuc との融合タンパク質を発現する細胞株を作製した。これらの発光量とナノトラック法により測定したエクソソーム数との相関、および検出感度について明らかにした。また、より自然で汎用的なエクソソーム検出細胞として、エクソソームマーカーの各遺伝子座に、NanoLuc 遺伝子をノックインした細胞を作製し、内在レベルの発現が認められた細胞クローンについて、培養液中の発光量とエクソソーム数が良く相関することを明らかにした(図 1)。これらの細胞をマウスに移植し、エクソソームが特異的に集積した細胞種を同定すると共にエクソソームを取り込んだ組織のシグナル変化を解析することが可能となった(論文 1)。

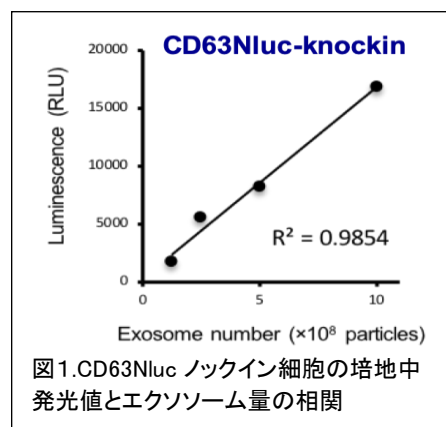


図1. CD63NanoLuc ノックイン細胞の培地中発光値とエクソソーム量の相関

さらに、エクソソームの in vivo イメージングが可能な発光酵素・基質を検討し、BRET により赤色発光する Antares2 を用いた系を開発した。Antares 標識エクソソーム分泌細胞を移植し、生理的状态に近い条件下で非侵襲的に解析したところ、血中におけるエクソソーム由来の発

光は移植後2週間で検出することができ、4週間後では組織に集積したエクソソームの発光が検出された(図2)。このエクソソーム in vivo 検出細胞を用い、がん特異的なエクソソームの分泌亢進を担う分子の作用を検証することを試みた。細胞移植後に、Src チロシンキナーゼの選択的阻害剤 dasatinib を腹腔内投与し、エクソソームの集積を解析したところ、移植した腫瘍細胞の体積には変化がみられない低濃度の dasatinib 投与によって顕著な生体内のエクソソームの集積の減少が認められた(図3)。この結果から、Src が in vivo におけるがん特異的なエクソソームの分泌亢進に重要であることが確認された(論文 3)。以上により、目標としたエクソソーム量を定量化できる細胞系は構築でき、さらに今後の応用に繋がる成果が得られた。

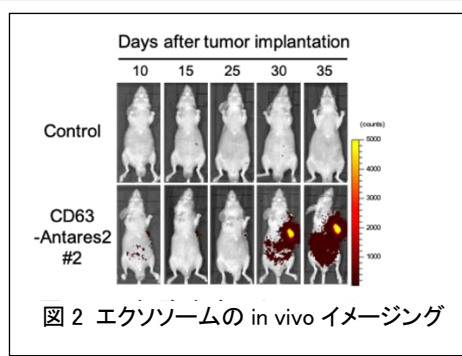


図2 エクソソームの in vivo イメージング

研究テーマ 2「エクソソーム形成と内包分子の積み込みに関わる分子の同定と機能解析」

上述の発光エクソソーム分泌細胞を用い、エクソソーム分泌に関わる細胞内機構を解析した。チロシンキナーゼ Src がエンドソーム膜上に局在し、ESCRT 関連蛋白質 Alix のプロリンリッチ領域と特異的に相互作用することで、エクソソームの元となる腔内小胞 ILV の形成を促し、Src 自体が内包されるメカニズムを明らかにした(図4)(論文2)。

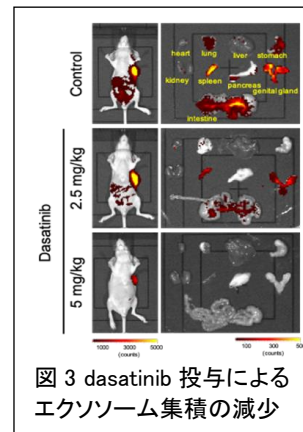


図3 dasatinib 投与によるエクソソーム集積の減少

また、各種シグナル阻害剤のエクソソーム分泌に対する作用を解析し、MEK/ERK 経路の活性化とエクソソーム分泌が相関していることを見出した。MEK が活性化するとエンドソーム分解過程に関与する複数の遺伝子群の発現が低下し、エンドソーム分解過程が抑制されていた。一方、MEK の活性化を抑制すると、エンドソーム分解の亢進と共にエクソソーム分泌が抑制された。このことから、MEK の活性化に伴うエンドソーム分解系の抑制によって過剰となった後期エンドソームは、細胞膜と融合してエクソソーム分泌へと導かれるといえる(図5)。さらに大腸がん細胞において MEK を阻害してこの過程を抑制すると、細胞増殖も大幅に抑制された。つまり、この機構は、不要物質の排出を促進することにより、がん化に伴い破綻している細胞内物質の恒常性維持機構を補完して、がん細胞の増殖に寄与していると考えられる

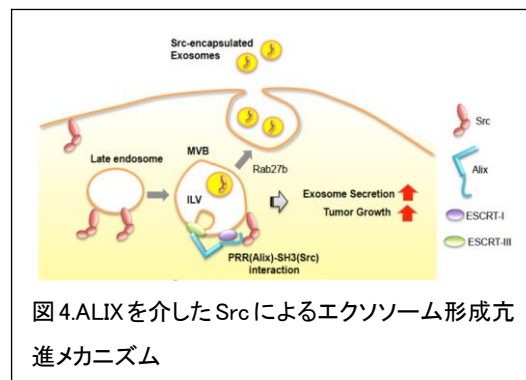


図4.Alixを介したSrcによるエクソソーム形成亢進メカニズム

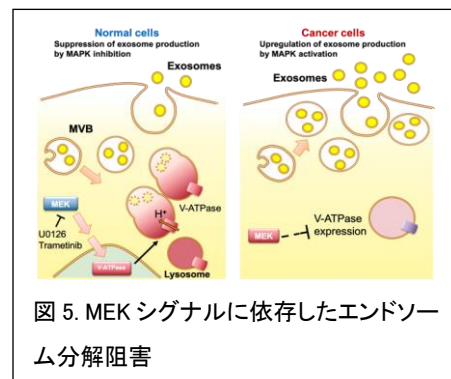


図5. MEK シグナルに依存したエンドソーム分解阻害

(投稿中)。これらの研究により、目標としていたエクソソーム形成に関わる分子機構における多くの知見が得られ、将来の創薬研究等にもつながる成果が得られた。

研究テーマ 3「エクソソーム形成における脂質ナドメインの役割解明」

Src シグナル依存的なエクソソーム分泌において、Src ファミリーキナーゼ間でその作用が異なっており、それが脂質ラフトへの局在性の違いによることを見出した。ラフト局在するアダプター分子の発現等により、ラフト領域の量的・質的変化を惹起して、間接的に Src ファミリーキナーゼのラフト局在を変化させた場合も、同様の傾向を認めた。また、膜融合に関わることが知られている SNARE タンパク質が、Src の細胞内局在とエクソソーム分泌を変化させることを見出した(投稿準備中)。以上より、目標としていたエクソソーム形成における脂質ナドメインの役割について、新規な知見が得られた。

3. 今後の展開

本研究で明らかにした Src および MEK/ERK 経路によるエクソソーム分泌制御機構については、今後その周辺や、より詳細な分子機構を解明していきたいと考えている。Src については、Alix との相互作用を介して ILV の形成に関与していることを示したが、脂質ラフトへの局在性に関する検討からは、エンドソームの形成や膜融合への関与も示唆されており、その詳細を解析している。MEK/ERK 経路については、エンドソーム分解系の活性化につながる転写因子群の作用を明らかにしつつある。さらに、これらのシグナル経路とエクソソーム内包分子との関わりや、がんで活性化している他のシグナル経路との関連についても、現在解析を進めている。

4. 自己評価

本研究では、未知な点が多いエクソソームの量と質を制御するメカニズムの解明を目標に、新たなツール細胞の作成という技術的な達成に加え、特にがん細胞で特異的なエクソソーム分泌量の亢進メカニズム、およびシグナル分子の内包メカニズムについて新たな知見を得ることができた。全体的にはほぼ目標は達成できたと考えている。細胞系作成については in vivo 検出を可能にした点で、目標を超える成果であり、今後の応用展開も期待できる。またメカニズム解析については、エクソソーム量の制御メカニズムに関して多くの知見が得られ、今後のエクソソーム分泌阻害剤開発にもつながる成果であるといえる。一方、エクソソームの質すなわち内包分子に関しては、Src の内包とその意義についてある程度の知見が得られた。この点については、本研究で得られた知見を基にさらに詳細な研究が必要である。全体的には研究は円滑に進行させることができ、研究費は適切に執行された。今後の展開・波及効果として、既に共同研究を通じエクソソーム分泌阻害剤の探索を進めている。これまで見出されたエクソソーム分泌阻害剤は極めて限られており、本研究の成果を応用することで、この分野で界に先駆けて新たなエクソソーム制御手段を見出すことが期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:6件

1. Hikita T, Miyata M, Watanabe R, *Oneyama C. Sensitive and rapid quantification of exosomes by fusing luciferase to exosome marker proteins. <i>Scientific Reports</i> , 2018, 8(1), 14035
新たなエクソソームの定量解析法を開発した。エクソソームマーカーに高輝度発光蛋白質を導入した細胞系により、従来法より高感度・簡便にエクソソームを定量できることを示した。さらにこの発光エクソソーム分泌細胞内は、エクソソーム制御分子の探索や他細胞への取り込み、さらにマウスにおける長期体内動態の解析が可能であることを示した。
2. Hikita T, Kuwahara A, Watanabe R, Miyata M, *Oneyama C. Src in endosomal membranes promotes exosome secretion and tumor progression. <i>Scientific Reports</i> , 2019, 9(1): 3265
がん細胞におけるエクソソーム分泌制御機構の破綻を解析した。活性化したがん原遺伝子産物 Src がエンドソーム膜上に局在し、ESCRT 関連蛋白質 Alix と相互作用することで腔内小胞 ILV の形成を促し、エクソソーム分泌が亢進するメカニズムを明らかにした。さらにがん細胞におけるエクソソーム分泌亢進ががん形質の維持に寄与していることを明らかにした。
3. Hikita T, Miyata M, Watanabe R, *Oneyama C. In vivo imaging of long-term accumulation of cancer-derived exosomes using a BRET-based reporter. <i>Scientific Reports</i> , 2020, 10(1), 16616
1 の論文を発展させ、エクソソームの長期体内動態を経時的かつ非侵襲的に観察できる方法を開発した。BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)を用いることで、in vivo でがんエクソソーム動態を追跡し集積臓器や組織の同定が可能となった。Src 阻害剤 dasatinib 投与によるがんエクソソームの分泌及び集積抑制の可視化に成功した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のもも含む)

(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)

1. 小根山千歳、Src シグナルによるエクソソーム形成制御とがん形質発現、ConBio2017 シンポジウム、2017. 12. 7
2. 小根山千歳、Mechanisms underlying upregulation of exosomes in cancer cells、第 41 回日本分子生物学会シンポジウム、2018. 11. 29
3. 小根山千歳、エクソソーム定量解析法の開発とその応用、第 23 回日本がん分子標的治療学会ワークショップ、2019.6.13
4. 小根山千歳、Src によるエクソソーム形成分泌制御とがん進展、第 71 回日本細胞生物学会・第 19 回日本蛋白質科学会年会合同大会シンポジウム、2019.6.25(オーガナイザー)
5. 小根山千歳、がんにおけるエクソソームの分泌亢進メカニズム、第 72 回日本細胞生物

学会ワークショップ、2020.6.10(オーガナイザー)

6. 小根山千歳、がん細胞のエクソソームの分泌亢進機構とその意義、第 93 回生化学会シンポジウム、2020.9.15