

がんエクソソーム集団内の 多様性を制御するメカニズムの探索

愛知県がんセンター研究所

腫瘍制御学分野、技師 青木 玲奈

愛知県がんセンター研究所

腫瘍制御学分野、分野長 小根山 千歳

1. 研究の背景・目的

エクソソームは、細胞間コミュニケーションツールとしての働きが明らかにされて以来、多くの注目を集めている。特にがん細胞由来のがんエクソソームは、正常細胞と比較して有意に産出量が多く、がん免疫の抑制、腫瘍微小環境の構築や転移ニッチ形成を促して、がんの悪性化を促進する。一方、がんエクソソームの分泌抑制は、がんの進行・転移を抑制する（文献1）。しかし正常細胞もエクソソームを分泌して、細胞間相互作用に利用していることから、エクソソームを標的としたがん治療を行うためには、がん特異的なエクソソーム分泌機構を明らかにし、それを制御する必要がある。代表的なエクソソーム表面マーカーのテトラスパニンファミリー分子 CD63・CD9・CD81 で標識されるエクソソーム集団は、それぞれ異なる分子を内包し、異なる機能を持つと考えられる。特に CD9 と CD81 は、がんの発生やがん転移で発現量が変化することが様々な癌種で知られているため、がんエクソソーム集団内の異なるマーカーで標識されるエクソソーム分泌を精密に制御することは、がん治療に繋がると期待される。しかしエクソソーム集団内において、標識マーカーが異なるエクソソームへの積み込み・産生・分泌の制御機構は全く明らかにされていない。所属研究室で開発された高感度かつハイスループットなエクソソーム定量系（文献2）を応用した本研究計画は、阻害剤との組み合わせでエクソソーム集団内の多様性を生む機構の解明に繋がることが期待できる。また本研究は、がん特異的に制御されるエクソソーム集団内で多様性を生み出す制御経路を特定し、そこから新たながん治療薬の創出を目指す。

2. 研究の対象ならびに方法

エクソソーム定量測定細胞と測定方法

EV 産生量が多いヒト大腸がん細胞株を選択し、所属研究室で樹立済みの CD63・CD9・CD81 融合型 NanoLuc (Nluc) を導入した HT29 細胞を採用した。Nluc は深海エビ

由来のルシフェラーゼの改変型で、改良型発光基質のフリマジンの組み合わせで高輝度・高安定性を示すレポーターとして利用される。この Nluc 融合型のテトラスパニン¹は、エンドサイトーシスで細胞内部に取り込まれ、腔内膜小胞（将来のエクソソーム）を含む多胞性エンドソーム (MVB) 内部に包埋される。最終的に MVB が細胞膜表面と融合すると Nluc で標識されたエクソソームとして細胞外の培養液中に放出される。そのためテトラスパニン Nluc で標識され、かつ細胞外に分泌されたエクソソームの量をルシフェラーゼ活性により発光値で算出が可能になる。Nluc 標識エクソソーム由来の発光測定には、発光基質に Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega) を、発光測定装置に Nivo マルチモードプレートリーダー (ParkerElmer) を用いた。

既存エクソソーム経路での測定系の評価

エクソソーム分泌を亢進させる既知の阻害剤 (Bafilomycin A1) を用いて、本研究の Nluc 発光定量系のデータと既存の報告が合致するかという点で測定系を評価した。

標準阻害剤ライブラリーでのスクリーニング法

約 400 阻害剤の標的既知の標準阻害剤キット（先端モデル動物支援プラットフォーム分子プロファイリング支援活動）の提供を受けてスクリーニングを行った。96 ウェルプレートに細胞を播種して 48 時間後に阻害剤（溶媒 DMSO）を添加し、22~24 時間後に培養上清を回収した。回収した培養上清は、スイングバスケット型のローターを用いて 2000G で 10 分間遠心して上澄みを回収し、細胞死骸やアポトーシス小体などの除去を行った。続いて上澄みに含まれる標識エクソソーム由来の発光を 1) に記載した方法で 384 プレートを用いて測定した。コントロール DMSO と比較して発光強度が増減したものを候補阻害剤として選択した。また阻害剤添加による細胞数の増減がエクソソーム産生量へ影響することを排除するために、培養上清を除いた後にデッシュ上に残った培養細胞をクリスタルバイオレットで染色して Nluc 発光値の細胞数補正に用いた。

3. 研究結果

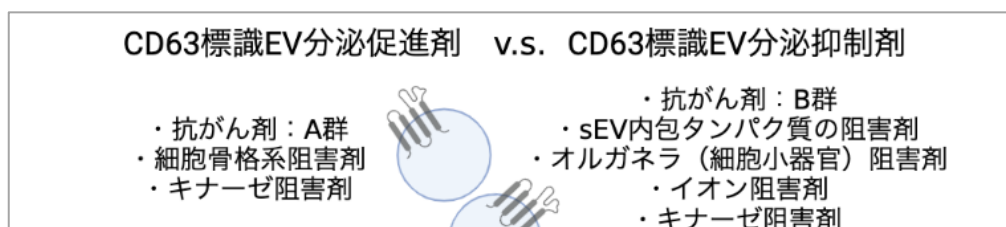
1) スクリーニング系の改良と既存エクソソーム経路でのエクソソーム測定系の評価

スクリーニング開始にあたり、所属研究室にて開発された 24 ウェル細胞播種~96 ウェル発光測定のスケールでの EV 阻害剤スクリーニング法（文献 2）を改良した。本研究ではハイスループット性を高めるために、96 ウェルの細胞播種~384 ウェル発光測定に系をスケールダウンさせた。また阻害剤が細胞に与える影響を排除する目的で、自身の発表論文（文献 3）で用いたハイスループット性に優れたクリスタルバイオレット染色法を導入

した。既存のエクソソーム制御試薬として報告されている阻害剤 (Bafilomycin A1) は、本研究手法においても顕著な CD63-Nluc 発光値の上昇を観察した。そのため本研究で採用した発光測定系は、操作性に優れスクリーニングに適していることを確認した。

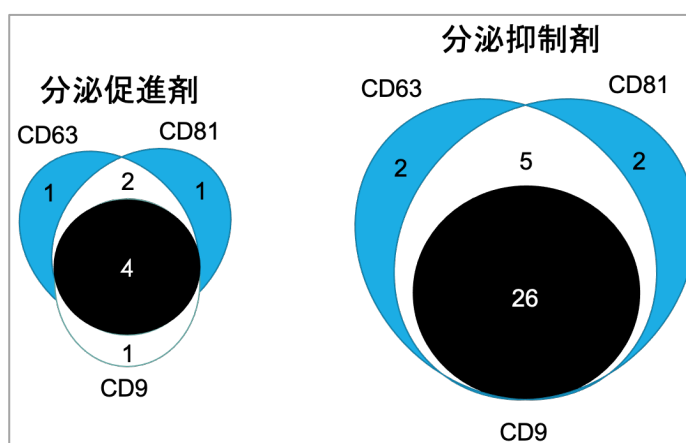
2) CD63 標識 EV の標準阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニング

Nluc 標識された CD63 発光定量細胞を用いて標準阻害剤キットのスクリーニングを行い、CD63 標識エクソソームの産生増加および抑制する阻害剤の探索を行った。培養上清を除いた細胞はクリスタルバイオレット染色で補正に用いた。その結果、下に示す阻害剤を見出した。また分泌を亢進する抗がん剤と抑制する抗がん剤を見出し、それらは異なる作用機序を持つ2群 (A と B) に分類されることを明らかにした。



3) CD9 および CD81 標識 EV の標準阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニング

続いて、Nluc 標識された CD9 発光定量細胞と CD81 発光定量細胞を用いて標準阻害剤キットのスクリーニングを行い、CD9 および CD81 標識エクソソーム量を制御する阻害剤の探索を行った。ただし2) の結果、クリスタルバイオレット染色による細胞数の補正の有無で結果に大きな差は出なかった。そこで迅速に研究を進めるために CD9/CD81 のスクリーニングにおいては敢えてクリスタルバイオレット染色による細胞数の補正は行わなかった。CD9/CD81 標識エクソソーム量を増減させた阻害剤は、2) でヒットした阻害剤とほぼ同じであった。しかし少数ながら、それぞれのテトラスパニンに指向性を示す阻害剤を明らかにした。



4. 考察

Nluc 標識エクソソームのスクリーニング結果から、エクソソーム分泌を正負に制御する

作用機序の異なる2群の抗がん剤を見出すことができた。これは抗がん剤の作用機序から、エクソソーム分泌に与える影響を推測できる可能性を示唆している。エクソソーム分泌は、がん免疫の抑制、腫瘍微小環境の構築や転移ニッチ形成を促して、がんの悪性を促進する。したがってがんの再発や治療抵抗性・予後に与える影響は、投与された抗がん剤によって左右されることを示唆している。本研究は投与する抗がん剤の選択を、エクソソームの基礎研究から臨床展開できるのではないかと期待される成果を示した。今後、様々ながん種による精査した検討が必要ではあるが、本研究成果はエクソソーム分泌という視点から、総合的に臨床上のメリットを高める抗がん剤の情報を付与しうるのではないかと期待を膨らませている。また本研究で明らかにしたテトラスパニンに指向性を示す阻害剤を用いて、さらに選択的なテトラスパニン分泌エクソソームの制御機構の解明を進めることも検討している。この研究の進展はエクソソーム集団内の多様性を生む基礎的な機構を明らかにする。またがん種に特異的なエクソソーム分泌制御をより精密に制御し、副作用などを抑えるエクソソーム関連抗がん剤として臨床展開されていくことが期待される。最後に、がんのエクソソーム分泌の阻害に興味注がれがちではあるが、エクソソーム分泌を促進させた阻害剤にもがん治療に貢献できる側面がある。間葉系幹細胞などの正常細胞由来のエクソソームは、ドラッグデリバリーのキャリア（運び屋）としての有用性が期待されて様々な研究が進められている（文献4）。したがって本研究対象にはがん細胞を用いたが、正常細胞のエクソソーム分泌量を高める試薬としての検証とその開発が今後の研究進展に見込まれる。

5. 文献

1. Kosaka N, Yoshioka Y. & Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest.* 126(4):1163-72.2016
2. Hikita T, Miyata M, Watanabe R, Oneyama C. Sensitive and rapid quantification of exosomes by fusing luciferase to exosome marker proteins. *Sci Rep.* 8(1):14035, 2018
3. Ito RE, Oneyama C. & Aoki K. Oncogenic mutation or overexpression of oncogenic KRAS or BRAF is not sufficient to confer oncogene addiction. *PLoS One.* 16(4):e0249388, 2021
4. Herrmann, I.K., Wood, M.J.A. & Fuhrmann, G. *Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. Nature Nanotechnology* 16, 748–759 (2021)

6. 論文発表 なし