

称号及び氏名 博士(理学) 竹中 智哉

学位授与の日付 平成 30 年 9 月 25 日

論 文 名 抗がん剤 gefitinib による EGFR 変異非小細胞肺がんでのエクソソーム移行及びミトコンドリア機能への影響評価

論文審査委員 主査 中瀬 生彦
副査 原 正之
副査 藤井 郁雄
副査 佐藤 孝哉

学位論文要旨

「抗がん剤 gefitinib による EGFR 変異非小細胞肺がんでのエクソソーム移行及びミトコンドリア機能への影響評価」

理学系研究科 生物科学専攻 細胞機能制御化学研究室
博士後期課程 3年 竹中智哉

1. 背景

近年、生体内で細胞間コミュニケーションに寄与するエクソソームが大きく注目されている。エクソソームは生体を構成するほとんど全ての細胞から分泌される約 30~200 nm の小胞で、microRNA 等の細胞機能を制御する生理活性物質が内包されている。このようなエクソソームによる細胞間コミュニケーションは、特にがんの分野で盛んに研究されており、がんの悪性化や転移にもエクソソームが大きく関与していることが数多く報告されている。また、エクソソームは分泌元の細胞の情報を保持しているため、体液中に存在するエクソソーム内包分子を調べることで、がんを含む疾患診断を行う研究が進められている。さらに、エクソソームは細胞毒性が低く免疫原性にもならないという特性から、薬物送達のキャリアーとして活用する技術開発や、間葉系幹細胞等から分泌されるエクソソームそのものを医薬品として様々な組織障害を治療するという研究も注目されている。

エクソソームの細胞間コミュニケーションにおいて、エクソソーム内の核酸分子やタンパク質が到達先の細胞中で機能を発揮するためには、これらの分子が細胞質内に届けられる必要がある。エクソソームの細胞内移行経路としては、ファゴサイトーシス・エンドサイトーシス・膜融合などの報告があるが、詳細なメカニズムは未だに解明されていない部分が多い。そのような中、我々の研究チームでは近年、エクソソームの細胞内移行において、エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスが重要な経路であることを発見した。マクロピノサイトーシスは、がん受容体の上皮成長因子受容体 (EGFR) 等の活性化やがんの悪性化に関わる Ras 変異体の発現によって生じる。クラスリン依存性などのエンドサイトーシスでは、細胞内に取り込まれる分子の上限サイズは 120 nm 程度である一方、マクロピノサイトーシスは 1 μm 以上の大きさを細胞外物質を取込むことが可能な経路であり、エクソソームの大きさを考慮すると、エクソソームの取り込み経路としてはマクロピノサイトーシスが有利であると考えられる。

エクソソームは、がんの悪性化や転移に深く関わっていることが明らかとなってきたが、がん治療に用いられる抗がん剤がエクソソームの細胞間コミュニ

ケーションにどのような影響を及ぼしているかについてはこれまで評価されていない。EGFR のチロシンキナーゼを阻害する抗がん剤ゲフィチニブにより、マクロピノサイトーシスが抑制される可能性があり、ひいてはエクソソームによる細胞間コミュニケーションに影響を与えることも考えられる。そこで本研究では、ゲフィチニブ感受性である EGFR 変異陽性の肺がん細胞において、ゲフィチニブによるエクソソームの細胞内取り込みへの影響を評価した。また、一般的な人工キャリアーであるリポソームと比較することで、がん細胞への薬物送達キャリアーとしてのエクソソームの可能性も併せて評価した。さらに、上記の研究を進める中で、ゲフィチニブ処理によりミトコンドリア機能に影響を及ぼすという新たな知見が得られたため、こちらについても詳細な検討を行った。

2. 実験方法と結果および考察

2.1. EGFR 変異非小細胞肺がんにおけるゲフィチニブによるミトコンドリア生理活性への影響評価

ゲフィチニブによるエクソソームの細胞内取り込みへの影響の評価に際し、がん細胞が死滅しない程度の薬剤濃度を調べる必要があるため、ゲフィチニブ高感受性の非小細胞肺がん細胞株 HCC827 に様々な細胞数・薬剤濃度で薬剤添加し、WST-1 アッセイ、および顕微鏡による細胞数の直接計測を行った。WST-1 アッセイでは、生細胞中のコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素 (STR : succinate-tetrazolium reductase) によるテトラゾリウム塩 (WST-1) のホルマザン色素への変換反応を定量化する。HCC827 において細胞数が少ない場合 (3,000 cells/well) は、ゲフィチニブ濃度の上昇に伴いホルマザン色素の生成量は低下したが、細胞数が多い場合 (12,000 cells/well) はゲフィチニブ添加時にホルマザン色素の生成量が顕著に増大した (Figure 1)。一方、生細胞数の直接計測の場合は、いずれの細胞数の条件においてもゲフィチニブ濃度の上昇に伴い減少した。三次元細胞培養においても、細胞塊の形成によってゲフィチニブ処理による WST-1 還元反応の上昇が確認された。さらに HCC827 細胞 (高細胞数) のミトコンドリア膜電位がゲフィチニブ処理によって上昇することを JC-1 アッセイで確認した。一方で、EGFR 野生型でゲフィチニブ抵抗性の非小細胞肺がん細胞株 A549 の場合は、WST-1 及び JC-1 の何れにおいても影響が認められなかった。加えて HCC827 においてゲフィチニブと同時に抗がん剤ドキソルビシンを処理した場合、抗癌剤の相加効果が認められなかった。これらの結果より、高細胞数の非小細胞肺癌においてゲフィチニブによる STR 活性およびミトコンドリア機能上昇と抗がん活性への影響が初めて示された。

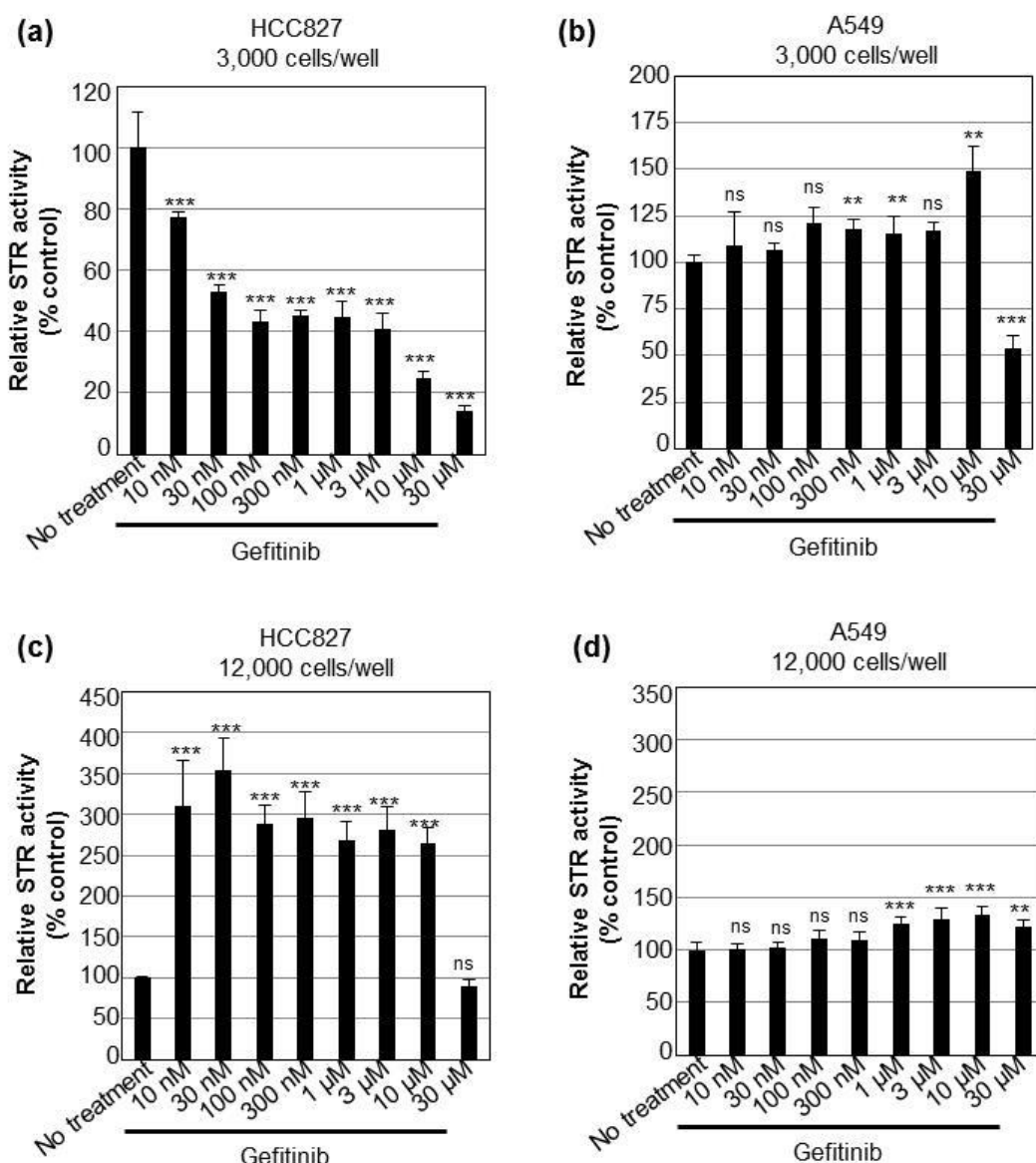


Figure 1. Effects of gefitinib treatment on the biological activity of STR

(a-d) HCC827 (3,000 cells/well: a, 12,000 cells/well: c) and A549 (3,000 cells/well: b, 12,000 cells/well: d) cells were treated with gefitinib (0~30 μM) for 72 h at 37°C prior to 2D WST-1 assay. The data are the averages (±SD) of four experiments. **p<0.01 between no treatment and each sample concentration. ***p<0.001 between no treatment and each sample concentration.

2.2. EGFR 変異非小細胞肺癌におけるゲフィチニブによるエクソソーム取り込みへの影響評価

細胞生存に影響がないことが確認されたゲフィチニブ 10 nM を処理した場合における、マクロピノサイトーシス活性への影響を評価した。マクロピノサイ

トーススマーカーである FITC 標識デキストラン (70 kDa) の HCC827 への細胞内取り込み量をフローサイトメトリーにて評価したところ、ゲフィチニブ添加時に取り込み量が減少した。次に、蛍光ラベル化したエクソソームおよびリポソームの細胞内取り込みへの影響を評価したところ、ゲフィチニブ添加によりリポソームの取り込みは減少した。それに対して、驚くべきことにエクソソームの取り込み量はゲフィチニブ添加により増大した (**Figure 2**)。また、エクソソーム、およびリポソームにドキソルビシンを内包し、HCC827 に対する細胞毒性を評価したところ、細胞内取り込み評価の結果と一致して、エクソソームではゲフィチニブ添加時に細胞生存率が低下した。いずれの評価においても、A549 ではゲフィチニブによる影響は認められなかった。最後に、これらの現象のメカニズム解明のためトリプシンによりエクソソームの膜タンパクを消化したところ、エクソソームの細胞内取り込みはトリプシン未処理群と同様、ゲフィチニブ添加により向上した。この結果から、ゲフィチニブによるエクソソームの細胞内取り込み向上には、エクソソーム膜におけるタンパク質以外の構成成分である脂質または糖鎖が寄与していることが示唆されたが、詳細な原因究明にはさらなる検討が必要である。

以上の結果から、エクソソームには特有の細胞内移行機序が存在することが示唆された。また、ゲフィチニブ併用時のがん治療において、エクソソームが薬物送達キャリアーとして大きな可能性を秘めていることが改めて示された。

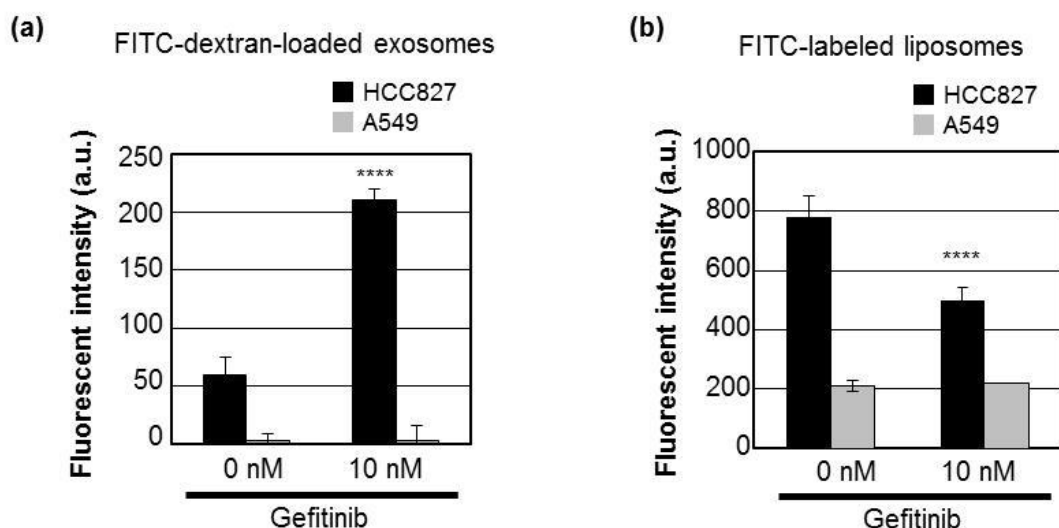


Figure 2. Effects of gefitinib treatment on cellular uptake of exosomes and liposomes.

(a, b) Relative cellular uptake of FITC-dextran-loaded exosomes (a) and FITC-labeled liposomes (b) in HCC827 and A549 cells in the presence or absence of gefitinib (10

nM) for 24 h at 37 °C using a flow cytometer. The data are the averages (\pm SD) of three experiments.

3. 結論

本研究では、*EGFR* 変異陽性の肺がん細胞において、ゲフィチニブによるミトコンドリア生理活性への影響、およびエクソソームを介した細胞間コミュニケーションへの影響を評価した。*EGFR* 変異陽性の HCC827 を高密度で培養した場合、ゲフィチニブが STR 活性およびミトコンドリア膜電位を向上させ、抗がん剤ドキシルビシンとの併用時に相加効果を示さないことを発見した。また、HCC827 へのゲフィチニブ処理によりマクロピノサイトーシスが抑制される一方、エクソソームの細胞内取り込みが向上することを発見した。リポソームにおいてはゲフィチニブ処理により細胞内取り込みが低下したことから、エクソソーム特有の細胞内移行機序が存在することが示唆された。

これらの結果は、ゲフィチニブが *EGFR* 変異陽性の肺がん細胞に対してミトコンドリア保護剤として作用する可能性、またエクソソームの取り込み増加によるがん細胞の成長・悪性を促進させる可能性を示唆するものである。一方、ゲフィチニブとの併用時にエクソソームを薬物送達キャリアーとして利用することで、がん細胞への薬物送達量および細胞内での生理活性を向上できる可能性も示唆された。

4. 論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

1. Takenaka T, Katayama M, Sugiyama A, Hagiwara M, Fujii I, Takatani-Nakase T, Kobayashi SS and Nakase I: Gefitinib Enhances Mitochondrial Biological Functions in NSCLCs with EGFR Mutations at a High Cell Density. *Anticancer Res.* 37: 4779-4788 (2017)

2. Takenaka T, Nakai S, Katayama M, Hirano M, Ueno N, Noguchi K, Takatani-Nakase T, Fujii I, Kobayashi SS and Nakase I: Effects of gefitinib treatment on cellular uptake of extracellular vesicles in non-small cell lung cancer cells with *EGFR* mutations. (submitted and under review)

学位論文提出者氏名 竹中 智哉

学位論文題目

抗がん剤gefitinibによるEGFR変異非小細胞肺がんでのエクソソーム移行及びミトコンドリア機能への影響評価

学位論文審査結果の要旨

現在、臨床での肺がん治療において、抗がん剤 gefitinib（商品名：イレッサ）が治療薬として用いられている。しかし gefitinib での治療によって、急性肺障害・間質性肺炎等の副作用発症・悪化による死亡や、薬剤耐性が生じる事が多数報告され、社会問題となっている。一方でそれらの発症機序の詳細が解明されていない。竹中智哉氏は、新たにエクソソームでの細胞間コミュニケーションに着目し、 gefitinib による影響について研究を行った。エクソソームは細胞外分泌小胞であり、microRNA や酵素等の生理活性分子を内包することで細胞間コミュニケーションに寄与している。また、がんをはじめとした疾患進展にも影響を及ぼすことが知られ、エクソソームを介した細胞間コミュニケーションの理解は、細胞生物学的な新しい切り口からの疾患機序理解、及び、治療への応用に結びつくことが強く考えられる。竹中智哉氏の本学位論文において、エクソソームの非小細胞肺がん細胞への取り込みが gefitinib 処理によって増強することを世界で初めて明らかにし、さらに抗がん剤 doxorubicin をエクソソームに内包させることで、非小細胞肺がんを効果的に死滅させることに成功した。一方で、ドラッグデリバリーシステムでも広く応用されている人工脂質膜で調製されたリポソームの場合は、 gefitinib 処理によって肺がん細胞への移行が低下し、同様に doxorubicin をリポソームに内包させても、エクソソームの場合ほどの gefitinib による抗がん活性効果が確認されないといった興味深い結果が得られた。本結果は、非小細胞肺がんにおける gefitinib 処理によってエクソソームを介した細胞間コミュニケーションの促進が考えられ、また治療においても gefitinib を含む多剤処方においてエクソソームが効果的に使用できる可能性が示唆されるといった重要な知見であることが考えられる。さらに、 gefitinib 処理によって非小細胞肺がんの固形がんモデルにおいて、 gefitinib 処理によるミトコンドリア活性が著しく上昇するといった知見も新たに得られ、 gefitinib によるミトコンドリア保護機能が促進することが初めて示唆された。上記の通り、 gefitinib は機序が不明な非小細胞肺がんの耐性獲得や副作用が知られており、竹中智哉氏の本研究結果は、今後さらに分子間相互作用等の詳細機序を解明すべくものの、疾患進展の原因となり得る高いトリガー事象発見といった重要な基礎的知見と位置付けられる。以上より、学位論文審査において本論文内容は博士学位取得に十分に値すると考える。