

1. 研究概要

研究論文名： Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes (上皮成長因子受容体の活性化、及び、Ras 変異体発現によるマクロピノサイトーシス誘導と、細胞分泌エクソソームの癌細胞への取込み増強機序)

著者： 中瀬生彦^{1*}、ベイリー小林菜穂子^{2,3}、中瀬朋夏⁴、吉田徹彦^{2,3*} (¹大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター、²慶應義塾大学先導研究センター、³東亜合成株式会社先端科学研究所、⁴武庫川女子大学薬学部)

公表雑誌： Scientific Reports (Nature Publishing Group の科学論文雑誌)

公表日時： 日本時間 2015 年 6 月 3 日(水)18 時 (英国時間 2015 年 6 月 3 日 10 時)

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小胞（100 ナノメートル程度）で、血液や尿、唾液等に大量に含まれています。このエクソソーム内には、マイクロ RNA 等の細胞機能を制御する分子が内包されており、細胞間情報伝達への寄与が知られています。がんのみならず、様々な疾患の進展においてこのエクソソームによる細胞間の情報伝達が重要な役割をしていることが報告されていますが、細胞自体のエクソソーム取込み制御の仕組みにはまだ不明な点が多く、細胞間コミュニケーションや疾患プロセスの理解において、これらの機構解明が必要不可欠な状況です。

これまでの研究では、エクソソームの膜タンパク質を中心に細胞移行の仕組みを解明する手法がほとんどでしたが、我々の研究グループでは、新たに受入側のがん細胞の視点からその仕組みの解明を行いました。その結果、**がん細胞が細胞外から栄養源を取り込む経路である「マクロピノサイトーシス」への経路誘導によって、エクソソームの取込みを増強する移行の仕組みを発見しました。**また、がんの悪性化に関わる Ras タンパク質変異体が発現するがん細胞においても、マクロピノサイトーシス誘導によるエクソソームの積極的な移行も明らかになりました。**さらに本機構を逆に、エクソソームに抗がん性タンパク質を人工的に内包させることで、がん細胞の死滅を促進させることにも成功しました。**

本研究結果は、これまで詳細が明らかにされていなかったがん細胞におけるエクソソーム取込み増強や細胞間情報伝達制御の機構理解に役立ち、またエクソソームの積極的ながん取込み経路を利用した薬物送達応用など、疾患診断や治療技術開発への貢献が期待されます。

■背景

細胞分泌小胞「エクソソーム」は生体内で細胞間コミュニケーションに関わり、特にがん腫においても細胞間での情報伝達に重要な役割をしていることから、最近大きく注目されています。このエクソソームには、**マイクロ RNA (※3)**等の細胞機能を制御する分子が内包されており、分泌されたエクソソームを他の細胞が受け取ることで、細胞機能が制御されるといった細胞間情報伝達に

寄与していることが知られています。がんにおいては、例えばがん細胞の浸潤促進や、がん周辺細胞の細胞死を誘導するようなマイクロ RNA が内包されたエクソソームの分泌が知られていたり、またエクソソームの内包マイクロ RNA を調べることで、そのエクソソームを分泌したがん細胞の特定を行うといった研究も進められています。

さらに薬学・医学的な観点からも、エクソソームは、①そのもの自体が**免疫原性(※4)**にならない、②細胞毒性が無い、③エクソソーム内に活性物質を内包(エレクトロポレーション等を利用)、④膜タンパク質の構築が容易、⑤患者から容易に大量の採取が可能といったことから、**薬物運搬体として優位性が極めて高いと考えられ、次世代の薬物送達ツールとしても大きな期待が寄せられています。**一方でエクソソームの細胞内移行の仕組みに関しては、**エンドサイトーシス(※5)**が関与することが報告されていますが、詳細な仕組みに関してはいまだ説明されていません。また、がんのみならず様々な疾患において、エクソソームによる細胞間の情報伝達が疾患の進展に重要な役割をしていることが報告されていますが、細胞自体のエクソソーム取込み制御の仕組みは不明な点が多く、細胞間コミュニケーションや疾患プロセスの理解において、これらの機構解明が必要不可欠です。

これまでの研究では、エクソソームの膜タンパク質を中心に細胞移行の仕組みを解明する手法がほとんどでしたが、我々の研究グループでは、新たに受入側のがん細胞の視点からの仕組み解明を行いました。その結果、細胞外の栄養源の取込みに関わる、アクチン骨格依存的な「マクロピノサイトーシス」の経路誘導が、エクソソームの細胞内移行へ大きく影響することを発見しました(6p 図1)。

■研究手法

本研究では、ヒト子宮頸がん由来細胞から分泌されるエクソソームを採取し、がん受容体活性化によるマクロピノサイトーシス誘導や、K-Ras 変異体発現がん細胞において、エクソソームの細胞内への移行性に関する検討を行いました。またエレクトロポレーション装置を用いて、採取したエクソソームに抗がん活性タンパク質(詳しくは下記の“2. 研究成果”に記載)を人工的に内包させ、がん細胞内への導入効率や、抗がん活性に関して評価を行いました。

2. 研究成果

がん細胞膜に存在する受容体を介した物質取込み経路、つまりエンドサイトーシスは、通常約 120 ナノメートル程度の大きさで分子を細胞内へ取り込む経路です。一方で、アクチン細胞骨格に依存的に特殊な膜構造(ラメリポディア(葉状仮足)構造)を形成することで細胞外の栄養源を取り込む「マクロピノサイトーシス」経路は、約 1 マイクロメートルもの大きさで細胞外物質を取り込むことが知られています。我々の研究グループは、約 100 ナノメートルの大きさをもつエクソソームは、エンドサイトーシスと比較してマクロピノサイトーシス経路の場合において細胞内移行効率が高くなることを予測し、また、がん腫の細胞膜に高発現している受容体の活性化がマクロピノサイトーシス経路を誘起するケースが多く、この移行経路が活性化される場合、エクソソームのがん細胞取込み効率が上昇することを仮説として研究を続けました。その結果、がんの細胞膜に高い発現性が認められる上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor, EGFR)を介したマクロピノサイトーシス誘導と、エクソソームの取込み効率への影響を調べ、EGF リガンドで EGFR を活性化させ

た場合、エクソソームのがん細胞取込み量が有意に上昇することを見出しました。例えば類表皮がん細胞では、EGFR 活性化によってエクソソームの取込み量は約 43 倍（96 時間条件）も上昇することが示されました（p6 図 1）。またがんの悪性化にも関わる K-Ras 変異体の細胞内発現は、マクロピノサイトーシスを誘導することで細胞外の栄養源を効率的に取込むことが知られています。本研究では、K-Ras 変異体を発現し、マクロピノサイトーシスを効率的に誘導する膵臓がん由来の MIA PaCa-2 細胞を用いてエクソソームの細胞内取込み量を検討した結果、野生型 K-Ras を発現する膵臓がん由来の BxPC-3 細胞と比較して、約 14 倍（24 時間条件）もエクソソームの移行性が高いことを明らかにしました（p6 図 2）。さらに、抗がん活性タンパク質であるサポリンをエレクトロポレーションで人工的に内包させたエクソソームを用いた場合、EGFR 活性化でマクロピノサイトーシスを誘起させることで、類表皮がん細胞において効果的に抗がん活性を誘導させることにも成功しました。

以上、本研究によって、マクロピノサイトーシス経路誘導により、エクソソームのがん細胞取込み効率が増強されることを新たに発見しました。本研究結果は、これまで詳細が明らかにされていなかったがん細胞におけるエクソソーム取込み増強や細胞間情報伝達制御の機構理解に役立ち、またエクソソームの積極的ながん取込み経路を利用した薬物送達応用など、疾患診断や治療技術開発への貢献が期待されます。

なお、本研究は、細胞ペプチド工学・細胞内輸送を専門とする中瀬生彦 テニユア・トラック講師（大阪府立大学 ナノ科学・材料研究センター）と、膜受容体・細胞応答を専門とする吉田徹彦 訪問教授、ベイリー小林菜穂子 訪問講師（慶應義塾大学先端研究センター、東亜合成株式会社先端科学研究所）、抗がん剤送達を専門とする中瀬朋夏 准教授（武庫川女子大学薬学部）の共同研究により実施したものです。

3. 今後への期待

本研究では、がん腫の細胞外の栄養源を取込むマクロピノサイトーシス経路誘導により、エクソソームのがん細胞取込み効率が増強されることを新たに発見しました。この知見は、これまで不明の部分が多いがん細胞におけるエクソソーム取込み制御や細胞間情報伝達の機構理解に大きく役立つと考えられます。

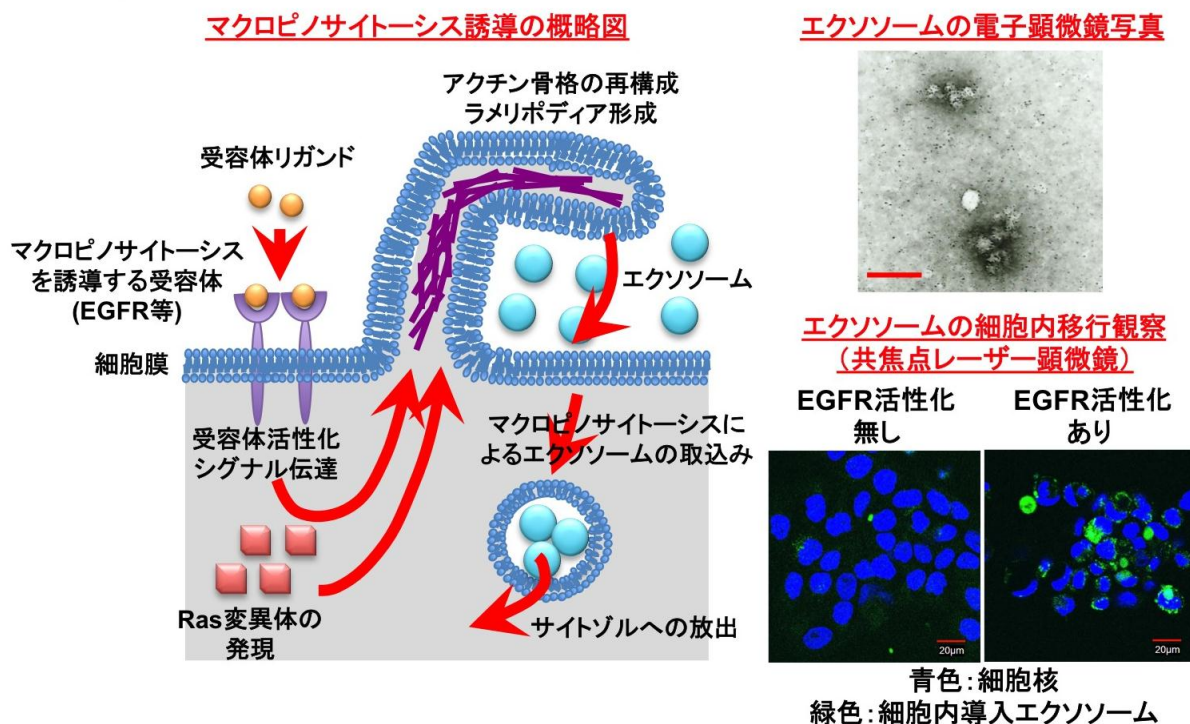
がんの進展にエクソソームが関与していることは既に知られており、例えばエクソソームに内包されたマイクロ RNA ががんの浸潤やがん周辺の細胞死を誘導するといった細胞間コミュニケーションにおいて、医学的な観点からの機構理解に貢献でき、さらには逆に細胞間コミュニケーションの機構制御を行うことで、がんの進展の制御にも繋がる可能性があります。また上記の通り、薬学的な観点からエクソソームは薬物運搬体としての優位性が極めて高く、がん疾患診断や治療に役立つ機能性分子をエクソソームに内包させることで、がん細胞内可視化や機能制御といった医学・薬学応用に繋がるのが大きく期待されます。

4. 研究助成資金等

本研究は、文部科学省 若手研究者の自立的な研究環境整備促進「地域の大学からナノ科学・材料人材育成拠点」プログラム（大阪府立大学）、その他の支援を受けて得られた研究成果です。

5. 参考図

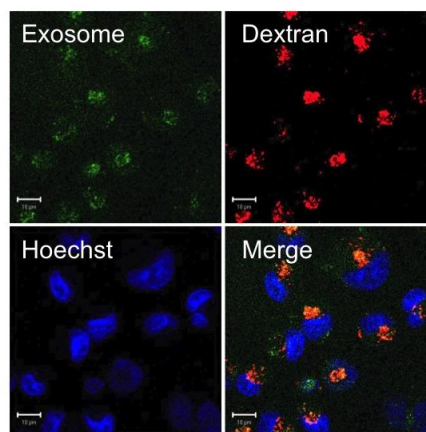
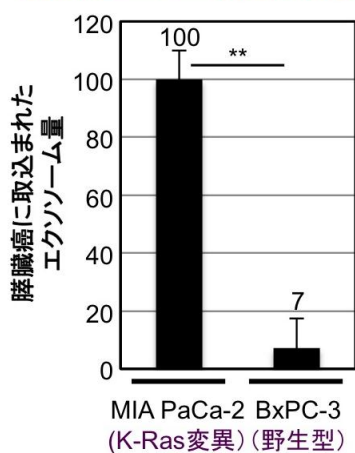
図1. 癌受容体(EGFR等)を活性化することでエクソソームの細胞内導入量が顕著に増大！！



マクロピノサイトーシスを誘導する癌受容体を活性化することで、数十倍もエクソソーム細胞内導入量が増大

図2. 癌悪性化に関わるRasタンパク質変異体の発現でエクソソームの細胞取込みが促進！！

エクソソームの細胞内移行 (フローサイトメータ(下図)と共焦点レーザー顕微鏡観察(右図))



緑色:細胞内導入エクソソーム
赤色:マクロピノサイトーシスマーカー
青色:細胞核

マクロピノサイトーシスを誘導するK-Ras発現型膵臓癌細胞が、エクソソームの細胞取込みを著しく増強

6. 用語解説

※1：細胞分泌小胞「エクソソーム」

生体を構成するほとんど全ての細胞から分泌する 100 ナノメートル程度の大きさをもつ小胞（しょうほう）。血液や尿、唾液等の体液に大量に含まれており、細胞間を行き来することで情報伝達を行っていることが知られています。また、患者から採取したエクソソームの内包物（マイクロ RNA 等）を調べることで、疾患診断に繋げる研究も進められており、現在大きく注目されています。

※2：マクロピノサイトーシス

細胞が細胞外の栄養を取り込む時に、約 1 マイクロメートルもの大きさで細胞外物質を取り込む経路です。細胞がアクチン骨格を利用して、細胞膜があたかも大きな波を打つような形状（ラメリポディア（葉状仮足）構造）をつくり、細胞外物質を細胞内に取り込みます。がん細胞において、がんの悪性化に関わる Ras 変異体が発現することで、マクロピノサイトーシスを効果的に誘導し、細胞外の栄養を効果的に取込むことで、がん細胞の増殖が促進することも最近発見されています。

※3：マイクロ RNA

20 から 25 塩基程度の RNA であり、遺伝子の発現調節に関与します。マイクロ RNA は、その標的となるメッセンジャーRNA に対して結合し、翻訳抑制を行うことでタンパク質の産生を抑制します。マイクロ RNA は、細胞増殖や発生、細胞分化、細胞死や代謝といった広い範囲での細胞機能に重要な役割を担うことが知られています。マイクロ RNA は、特定のがんにおいて特異的な発現様式を示し、疾患診断のバイオマーカーや予後マーカーとしての機能や、マイクロ RNA を用いた遺伝子治療の可能性が期待されています。

※4：免疫原性

生体内で抗原が抗体の産生や細胞性免疫を誘導する機能を免疫原性と呼びます。例えば、タンパク質治療薬等のバイオ医薬品が処方された結果、生体内で抗原として作用し、体内で抗体の産生が誘導される場合があります。その結果、処方された医薬品の治療効果の低下や、他の疾患の悪化が生じることがあります。

※5：エンドサイトーシス

細胞が細胞外の物質を取り込む作用過程の一つです。細胞外物質が細胞膜にある受容体に結合することで取り込み過程がはじまります。細胞内でクラスリンタンパク質による細胞膜のくぼみ形成が誘導され、最終的には細胞外物質を包んだ状態で小胞として細胞内へ取り込まれます。エンドサイトーシスは、通常約 120 ナノメートル程度の大きさで分子を細胞内へ取り込む経路として知られています。細胞内へ取り込まれた小胞はエンドソームと呼ばれ、初期エンドソームから後期エンドソームへと成熟していきます。