

新規腫瘍標的化技術開発を目指したエクソソームのがん細胞指向性解析

2015 年度

戸田 侑紀

論文目録

1. 学位論文の基礎となる報文の著者名、題目、印刷・公表の方法、その時期および該当する章・節
 - 1) Yuki Toda, Kazuyuki Takata, Yuko Nakagawa, Hikaru Kawakami, Shusuke Fujioka, Kazuya Kobayashi, Yasunao Hattori, Yoshihisa Kitamura, Kenichi Akaji, and Eishi Ashihara : Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **456**, 768–773 (2015). [全章]
2. 参考論文の著者名、題目、印刷・公表の方法およびその時期
 - 1) Taku Yoshiya, Ayano Higa, Naoko Abe, Fukue Fukao, Tomomi Kuruma, Yuki Toda, Youhei Sohma, and Yoshiaki Kiso : Click peptide concept: *O*-Acyl isopeptide of islet amyloid polypeptide as a nonaggregative precursor molecule. *ChemBioChem*, **12**, 1216–1222 (2011).

課程博士学位論文 内容の要旨

氏名 (英字名): 戸田侑紀 (Yuki Toda)

学位論文題目: 新規腫瘍標的化技術開発を目指したエクソソームのがん細胞指向性解析

1. はじめに

薬剤を標的部位へ効率よく送達させる drug delivery system (DDS) の開発は、がん化学療法における副作用リスクを減らす上で、必須の課題である。しかし既存の DDS の有効性は、腫瘍血管の構造やがん細胞表面抗原の発現パターンに強く依存する。よってがんの多様性という観点から、DDS の治療適応は未だ限定的であり、それを拡充するための新たな腫瘍標的化技術の開発が必要である。

エクソソームは、細胞から分泌されるナノサイズの小胞 (EV) の一つである (図 1)。エクソソームの膜表面に局在する分子は、その受容体を持つ細胞にリガンドとして刺激を与え、また内部に含まれる RNA やタンパク質は、エクソソームが取り込まれた後に細胞内で機能する。このように多様な性質を有することから、エクソソームの生命現象に対する幅広い関与が近年明らかになりつつある。

申請者は、未解明な部分が多いエクソソームの細胞間コミュニケーションについて科学的理解を進めることで、腫瘍標的化のための新たな概念を提示できないかと考えた。そして、「エクソソームの効率的な情報伝達において一定の指向性が働いている」という仮説を立て、その実証と現象メカニズムの解明に取り組んだ。

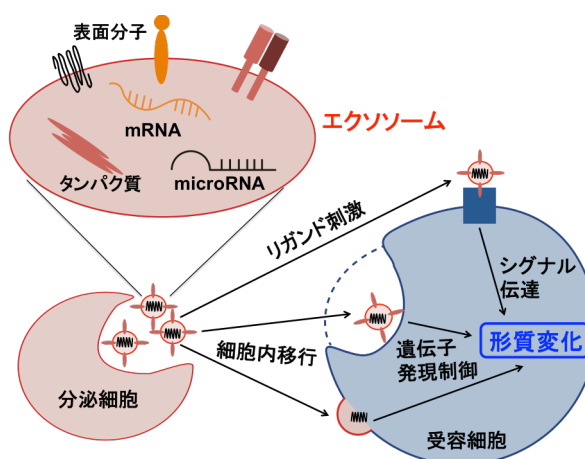


図 1. エクソソームによる細胞間情報伝達

2. エクソソームの単離と同定

細胞はサイズや機能の異なる EV を種々分泌しており、EV 研究において対象とする小胞の単離や同定は重要である。申請者は、エクソソームの回収に頻用される超遠心法により、glioblastoma 細胞株 (U251-MG: U251) 由来エクソソームの単離を行った。しかし遠心後の沈殿物において、大小異なる様々な粒子 (U251_{EV}) の存在が共焦点レーザー顕微鏡により確認された。そのため密度勾配沈降平衡法を追加して行い、それによりエクソソームと同密度の画分を得た。ウェスタンブロッティング、原子間力顕微鏡 (AFM) および動的光散乱法により、同画分には、エクソソームマーカータンパク質 (CD63) を発現する、100 nm をピークとした単一粒子集団が含まれることを確認し、本粒子群をエクソソーム (U251_{exo}) として同定した (図 2)。

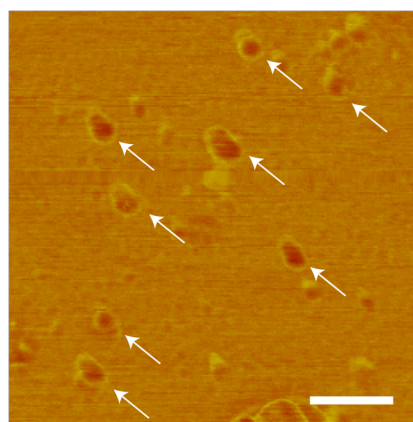


図 2. AFM による U251_{exo} の形態観察 (bar = 0.2 μm)

3. エクソソームのがん細胞指向性についての解析

U251_{exo}を親細胞および同じ発生母地組織である astrocyte に処置し、12 時間後にその取り込み量を評価した。共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターによる解析から、蛍光標識された U251_{exo} に由来する緑色蛍光強度が、astrocyte に比べて U251 で有意に高く、取り込まれたエクソソームの量が多いことが示唆された。また、本エクソソームのがん細胞内への効率的な移行は、分泌元の細胞だけではなく、乳がんや繊維芽肉腫といった他のがん種の細胞株においても確認された。

一方で、本現象ががん細胞の高いエンドサイトーシス能に依存したものである可能性も考えられる。そこで、U251 が非特異的にエクソソームを効率的に取り込んでいるかどうかを astrocyte 由来エクソソーム (Ast_{exo}) を用いて調べた。その結果、がん細胞への高い移行が見られた U251_{exo} と同じタンパク質量の Ast_{exo} を与えたものでは、エクソソーム由来の緑色蛍光がほとんど観察されなかった。よって、U251 は自身の分泌するエクソソームを他細胞種由来のものと区別して取り込んでおり (図 3)、U251_{exo} と Ast_{exo} の構成分子の違いが各々の指向性に寄与していることが示唆された。

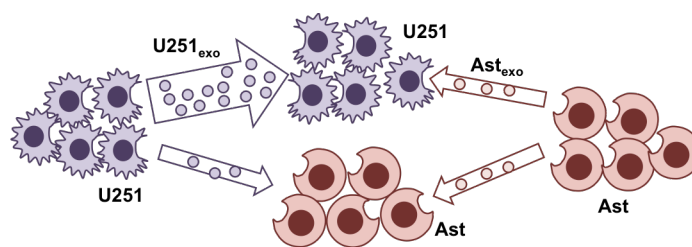


図 3. U251_{exo} のがん細胞指向性

4. エクソソームのがん細胞指向性に寄与する因子の探索

エクソソームを治療応用するにあたって、その複雑な構成成分と多様な生理活性は、投与安全性を確保する上で障害となりえる。よって、指向性に必須の因子のみで最適化されたものが、腫瘍標的化技術として望ましい (図 4)。そこで、

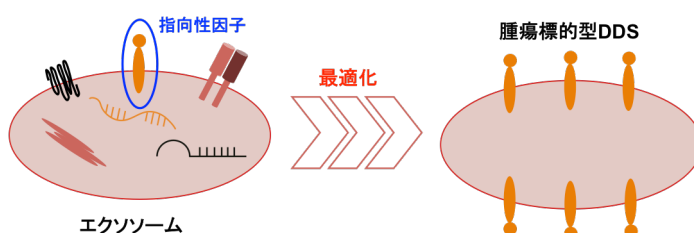


図 4. エクソソーム膜の再構成による標的型 DDS への最適化

で、これまでに確認された U251_{exo} のがん細胞指向性に関与する因子の特定を試みた。

まず、種々の酵素を用いて、U251_{exo} 表面に存在するタンパク質性リガンドを脱落させたが、親がん細胞への高い移行は維持された。よって、本エクソソームの指向性におけるタンパク質性リガンドの関与は少ないことが示唆された。

エクソソームの脂質組成は分泌した細胞の状態に影響され、一部変化することが知られている。そこで申請者は、「U251 が自身のエクソソームの特異的な脂質組成を認識し、効率的に取り込んでいる」という仮説の基、U251_{exo} と Ast_{exo} の脂質組成比較を試みた。しかし、エクソソームのみに純化したものでは解析に十分な脂質量を得られず、超遠心のみ行った粗サンプル (U251_{EV} および Ast_{EV}) を代わりに用いた。薄層クロマトグラフィー分析の結果、U251_{EV} の脂質クラス比は Ast_{EV} に対して、phosphatidylethanolamine で高く sphingomyelin で低いことが示されたが、本組成と U251_{exo} の指向性との因果関係はわかっていない。

最後に、U251_{exo} の親細胞への取り込み経路を各種エンドサイトーシス阻害実験により調べた。その結果、受容細胞の固定化やアクチン重合の阻害により本エクソソームの取り込みが阻害されたことから、U251_{exo} は主にエンドサイトーシスによって分泌元細胞へ移行していることが示唆された。

目次

理論の部

略語表	1
緒言	3
第一章 エクソソームの単離と同定	
1. エクソソームの定義	5
2. 超遠心法による細胞外小胞の回収	6
3. 密度勾配沈降平衡法を用いたエクソソームの純化	8
4. 原子間力顕微鏡によるエクソソームの形態学的解析	10
5. 第一章の小活	11
第二章 エクソソームのがん細胞指向性についての解析	
1. エクソソームの細胞指向性	12
2. Glioblastoma 由来エクソソームの細胞内移行	13
3. 正常細胞由来エクソソームの移行性との比較解析	16
4. 他のがん種への移行性評価	17
5. 第二章の小活	17
第三章 エクソソームのがん細胞指向性に寄与する因子の探索	
1. エクソソームの投与安全性	18
2. エクソソームの取り込み経路	19
3. エクソソーム膜表面タンパク質性リガンドの関連性	22
4. エクソソームの脂質組成比較解析	25
5. 第三章の小活	28
結語	29

実験の部

使用機器について	30
第一章に関する実験	31
第二章に関する実験	33
第三章に関する実験	37
謝辞	42
参考文献	43

理論の部

略語表

AEBF: 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AFM: atomic force microscope
ATP: adenosine triphosphate
ATP1A1: sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
BMP: bis(monoacylglyceryl)phosphate
BSA: bovine serum albumin
Chol: cholesterol
DC: dendritic cell
DDS: drug delivery system
DLS: dynamic light scattering
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: dimethyl sulfoxide
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR: epidermal growth factor receptor
EGFRvIII: EGFR variant III
EMEM: Eagle's minimum essential medium
ESCRT: endosomal sorting complexes required for transport
EV: extracellular vesicle
FBS: fetal bovine serum
FRET: fluorescence resonance energy transfer
GBM: glioblastoma
GM3: monosialodihexosylganglioside
HCl: hydrochloric acid
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMGB1: high-mobility group protein 1
HRP: horseradish peroxidase
ILV: intraluminal vesicle
LC: liquid chromatography
LSM: laser scanning microscope
MBV: multivesicular body
MDA: MDA-MB-231
miRNA: micro RNA
mRNA: messenger RNA
MS: mass spectrometry
NHS: *N*-hydroxysuccinimide
PBS: phosphate buffer saline
PC: phosphatidylcholine
PE: phosphatidylethanolamine

PFA: paraformaldehyde
PI: phosphatidylinositol
PS: phosphatidylserine
RISC: RNA-induced silencing complex
RNA: ribonucleic acid
SM: sphingomyelin
SNARE: soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TLC: thin-layer chromatography
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSG101: tumor susceptibility gene 101
18:0 SM: N-(octadecanoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholine
16:0-20:4 PC: 1-O-hexadecyl-2-eicosatetraenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
16:0-20:4 PE: 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine
16:0-18:1 PS: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine

緒言

がん化学療法に伴う全身性の副作用は、がん細胞に発現豊富なタンパク質を標的とする分子標的治療薬の台頭や治療補助薬の開発により軽減されてきているが、未だ完全に避けられるものではない。それゆえ、このような副作用リスクの高い薬物を標的部位へと安全かつ効率的に送達させるdrug delivery system (DDS) の開発研究がこれまで盛んに行われてきた。Polyethylene glycolの表面修飾により血中滞留性を高め、血管透過性の亢進した腫瘍組織に受動集積させる技術はすでに確立され、臨床において一定の治療成果を上げている。しかし、腫瘍血管の構造や特性はがん種により様々であり、全ての腫瘍に適応可能ではない。¹ また、がん細胞の表面抗原を認識する抗体²やペプチド³をキャリア表面に修飾し、腫瘍選択性をもたせる手法も盛んに取り入れられているが、未だ実用化には至っていない。⁴ したがって、治療適応を拡充するための新たな腫瘍標的化技術の開発が必要である。

生体内における細胞間の情報伝達とそのメカニズムに注目することは、新しい薬物送達技術を創造する上で有用な知見をもたらす可能性がある。近年、サイトカインやホルモンといった単一のタンパク質分子に加えて、多様な生理活性分子を含んだ小胞 (extracellular vesicle: EV) が多くの細胞で分泌され、細胞間情報伝達の一部を担うことがわかってきた。エンドソーム由来のEVであるエクソソームは、その膜表面に発現する分子を介して、対応する受容体を持つ細胞に外部から作用する (図 1)。⁵ また内包されるmicro RNA (miRNA) などは、エクソソームを取り込んだ細胞内において機能する⁶。エクソソームは、これら細胞内外での複雑な作用機序を経て、悪性腫瘍⁷やアルツハイマー病⁸といった各疾患における病態の形成や維持に関与する。このような背景から、疾患関連エクソソームの診断用バイオマーカーへの応用が期待されている。⁹

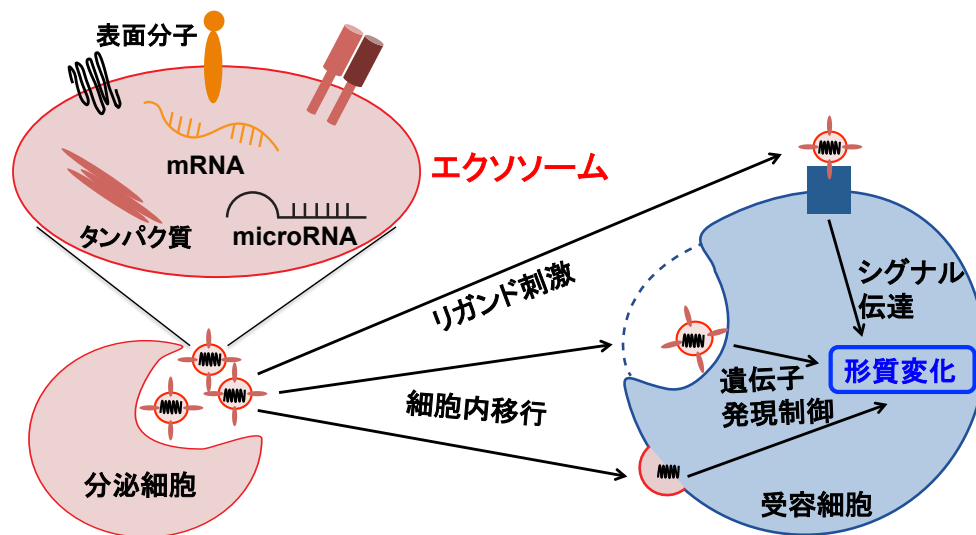


図 1. エクソソームの細胞間情報伝達

一方で「細胞間の物質輸送体」としての観点から、薬物導入したエクソソームをDDSとして利用する試みも世界的に行われている。エクソソームの生体内における高い安定性は、DDS応用の上で一つと利点と考えられる。¹⁰ また、有効な生理活性をもつエクソソームを用いることで、導入薬物との相乗効果が期待できる。これらの利点に加えて、エクソソームによる腫瘍選択的な薬物送達が可能になれば、既存治療を大きく上回る効果が期待できる。Ohnoらはepidermal growth factor receptor (EGFR) に親和性を示すGE11ペプチドを発現させた改変エクソソームを用いて、内包したmiRNAを腫瘍内へ効率的に送達させた。¹¹ しかし、その標的化能は用いたリガンドに依存するため、革新的な標的化技術には繋がらない。一方、生体内における高度な情報伝達顆粒であるエクソソームにおいて、先天的ながん細胞指向性をもつかどうかについて詳細に論じられたものはほとんど見受けられない。

悪性度の高さで知られるglioblastoma (GBM) は、エクソソームを介してAnnexin A2やEGFRなどの腫瘍関連タンパク質を周囲の正常血管内皮細胞へ導入し、腫瘍の増殖、浸潤や血管新生を促す。¹² また低酸素環境や放射線暴露などに応答して、GBMから分泌されるエクソソームの生物活性が変化することもわかっている。^{13,14} 一方GBM由来エクソソームが、「特定の細胞に対して指向性を有するのだろうか」や「どのような分子メカニズムで細胞内へ移行するのか」について詳しく述べられた論文は少ない。Svenssonらは、ヒト由来GBM株 (U87-MG) から分泌されるエクソソームが、がん細胞のみならず種々の正常細胞にも取り込まれることを報告しており、本エクソソームの指向性を否定している。¹⁵ しかし同論文内において、親がん細胞へのエクソソームの取り込み量が、同じヒト由来の正常血管内皮細胞へのそれに対して多い傾向が見られた。よって、GBM由来エクソソームの細胞内への取り込み量は、受容細胞間で異なる可能性が考えられる。

以上の背景より著者は、未解明な部分が残るGBM由来エクソソームの細胞間コミュニケーションを研究対象とし、そのメカニズムを明らかにすることで腫瘍標的化のための新たな概念を提示できないかと考えた。そして、「GBM由来エクソソームの効率的な細胞間コミュニケーションに一定の指向性が働いている」という仮説 (図 2) を立て、その実証に取り組んだ。本論文ではその取り組みにおける、GBM由来エクソソーム (U251_{exo}) の単離と同定 (第1章)、がん細胞指向性の解析 (第2章)、および指向性因子の探索 (第3章) について論じた。

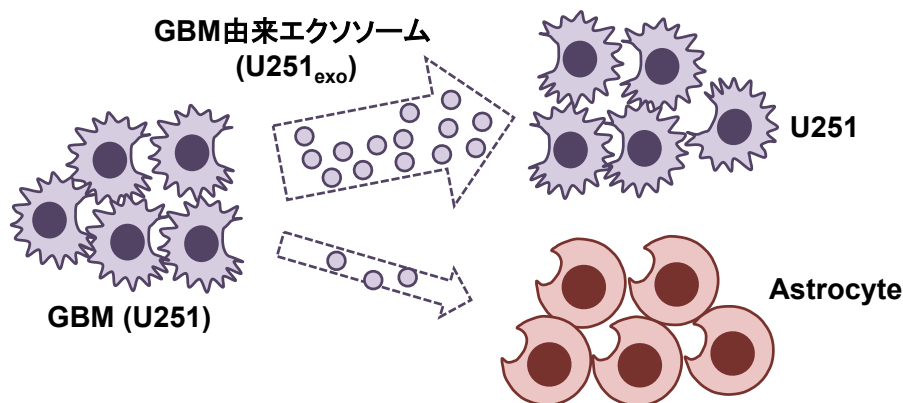


図 2. GBM由来エクソソームのがん細胞指向性仮説

第1章 エクソソームの単離と同定

1. エクソソームの定義

EVは細胞が分泌する全ての小胞の総称であり、粒子径、密度、発現タンパク質の違いによって名称や定義がさらに細分化されている(図3)。その中で、エクソソームは最もよく扱われているEVの一種である。Multivesicular body (MBV) は膜内の出芽により形成されるintraluminal vesicle (ILV) を含んだエンドソームであり、細胞形質膜と融合することで内包するILVをエクソソームとして細胞外に放出する。よって、エクソソームの膜はエンドソームのそれに由来し、tetraspaninsやtumor susceptibility gene 101 (TSG101) といったエンドソームに局在するタンパク質がエクソソームのマーカーとして使用される。対照的に、細胞膜から直接出芽するmicrovesiclesやapoptotic vesiclesなどは、エクソソームよりもサイズが大きく、上記タンパク質を含まない。このようにして各EVが複雑に定義されているが、国際的なコンセンサスを得たものは現在のところない。また、エクソソームの単離については、様々な方法論やキットがこれまでに開発されているが、いずれも一長一短である。超遠心法は、EVを単離する上で標準的に用いられているが、超遠心機が必要な上、操作が煩雑である。一方、高分子ポリマーなどをEVに結合させ、通常遠心で簡便に回収できるキットが販売されているが、ポリマー除去が単離後困難であるため、EVの性状解析を目的とした研究には不向きである。また、エクソソーム表面抗原を標的とした免疫沈降法による単離も報告されているが、抗原発現パターンは一様ではないため、対象試料により回収率が異なる可能性がある。以上より、EV研究において対象とする小胞の単離には研究目的に応じた方法を用い、同定には定義される複数の規定項目にしたがって慎重に行うべきであると考えられる。本研究の目的はエクソソームの細胞指向性についての解析であり、単離時の修飾物が指向性に影響を与える可能性を考え、超遠心法を選択した。

	Exosomes	Microvesicles	Ectosomes	Membrane particles	Exosome-like vesicles	Apoptotic vesicles
Size	50–100 nm	100–1000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Density	1.13–1.19 g/ml	–	–	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
Protein markers	Tetraspanins, TSG101	Integrins, selectins	CR1	CD133	TNFR1	Histones

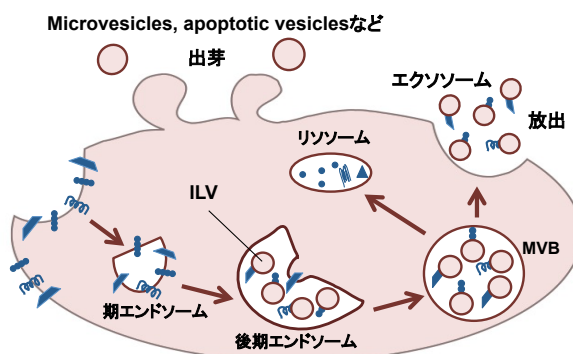


図 3. EVの分類とエクソソームの形成過程 CR1: complement component receptor 1 TNFR1: tumor necrosis factor receptor 1 表は文献17より改変

2. 超遠心法による細胞外小胞の回収

超遠心法は、培養細胞から分泌されるEVを単離する上で標準的に用いられる。ヒト由来GBM株(U251)の培養上清には、死細胞やdebrisも含まれるため、それらを2,000 gおよび10,000 gの低速遠心により除去した。次いで、100,000 gの超遠心を行った後、この沈殿物をphosphate buffer saline (PSB) で数回、同遠心条件で洗浄し、U251_{EV}として回収した(図4)。

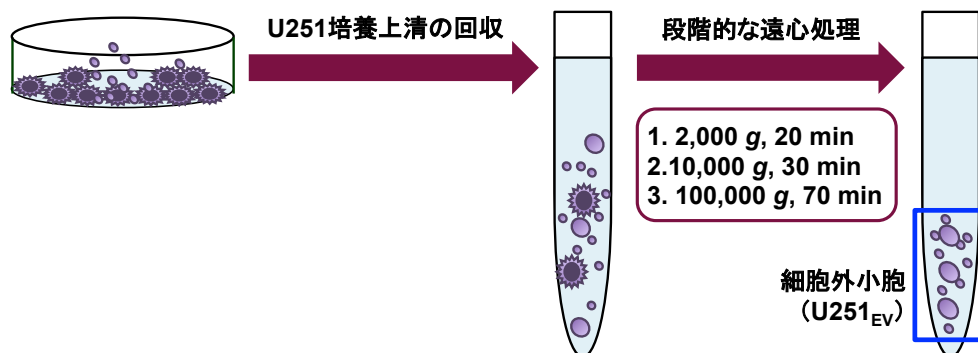


図4. 超遠心法によるEVの回収手順 70–80%コンフルエントになっている細胞の培養上清を2,000 gおよび10,000 gの遠心で死細胞などを除去した後、100,000 gの超遠心によりEVを沈殿物として得る。

エクソソームのマーカータンパク質であるCD63とTSG101が、100,000 gの沈殿物に含まれていることをウェスタンブロッティングにより確認した(図5A)。細胞内の物質輸送に関わるCD63は、tetraspaninsの一つで、エクソソームや後期エンドソームに豊富に存在している。¹⁶ またTSG101は、ILV形成過程に働くendosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) 複合体に含まれるタンパク質であり、エンドソーム内への出芽に必要な膜の変形に関与する。¹⁷ 次に、100,000 gの沈殿物に含まれている粒子の形をPKH26で蛍光標識し、laser scanning microscope (LSM) で解析した。 α -Helix構造のペプチド残基を含むPKHは膜に挿入されやすく、生体膜の標識化に使用される。蛍光標識したU251_{EV}の形状をLSMで解析したところ、直径50–1000 nmの大小様々な粒子が観察された(図5B)。これらの結果は、直径100 nmのエクソソームよりも大きなmicrovesiclesやapoptotic vesiclesといった他のEVが混在していることを示唆している。つまり、超遠心だけではエクソソームを純度良く単離できないことが明らかになった。

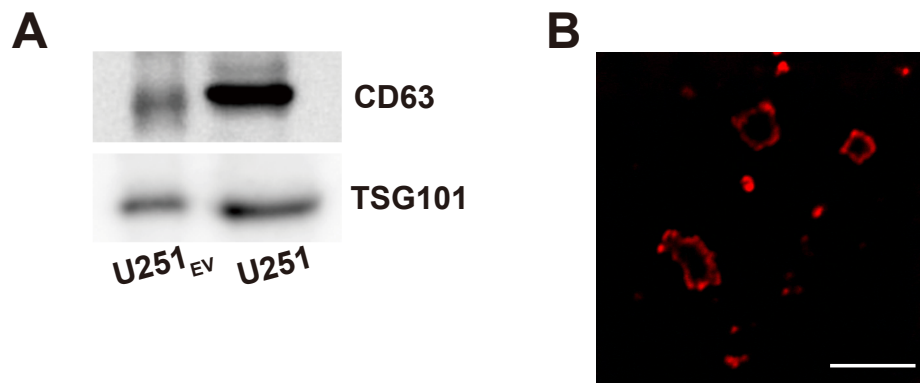


図 5. 超遠心画分におけるEVの同定 (A) 超遠心により得たU251_{EV}とU251の細胞ライセートにおけるCD63、TSG101の発現をウェスタブロットティングにより解析した。(B) U251_{EV}をPKH26で蛍光標識しLSMで観察した (bar: 2 μm)。*Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (許可取得済み)

3. 密度勾配沈降平衡法を用いたエクソソームの純化

著者は各ベシクルの密度の違いに着目し、超遠心に加えて密度勾配沈降平衡法を施すことで、エクソソームを高純度に精製できるのではないかと考えた。超遠心で濃縮したU251_{EV}を高濃度sucrose溶液で懸濁し遠心チューブ底面に設置後、その上に濃度の異なるsucrose溶液を順次重層することで密度が1.03–1.32 g/mLの段階的な濃度勾配を作製した。それを超遠心した後、密度ごとに分画した (図 6)。

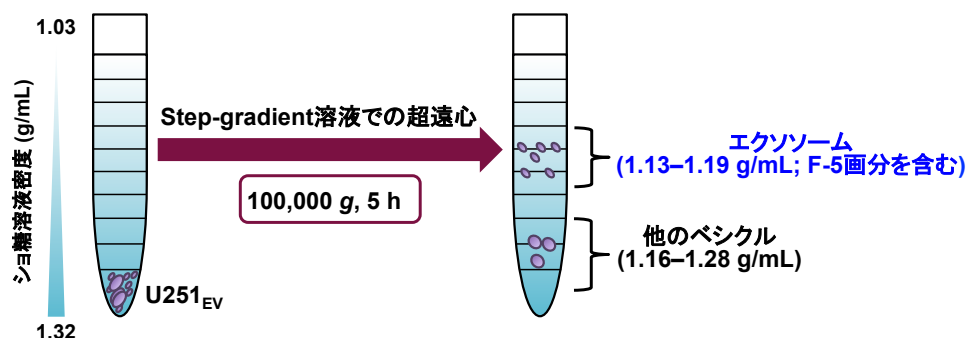


図 6. 密度勾配沈降平衡法によるエクソソームの精製 2.5 M sucrose-20 mM

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 溶液に懸濁したU251_{EV}の上に2.25 M、2 M、1.75 M、1.5 M、1.25 M、1 M、0.75 M、0.5 M、0.25 Mのsucrose-HEPES溶液を等量に重層し、超遠心することで各ベシクルを密度ごとに分離する。

それぞれの画分に対しウェスタンブロッティングを行ったところ、エクソソームと定義される密度 (1.13–1.19 g/mL) の範囲内、特に1.16 g/mLの画分中 (F-5) にCD63が顕著に含まれていた (図 7A)。次いで、本画分の粒度分布を動的光散乱法 (dynamic light scattering: DLS) により確認したところ、直径100 nm付近を最頻値とする単一の粒子集団であることが示された (図 7B)。これらの結果から、超遠心法と密度勾配沈降平衡法を組み合わせることで、粒子径 (50–100 nm)、密度 (1.13–1.19 g/mL)、発現タンパク質 (CD63) の規定全てを満たしたエクソソーム (U251_{exo}) を単離することができたと考えられる。

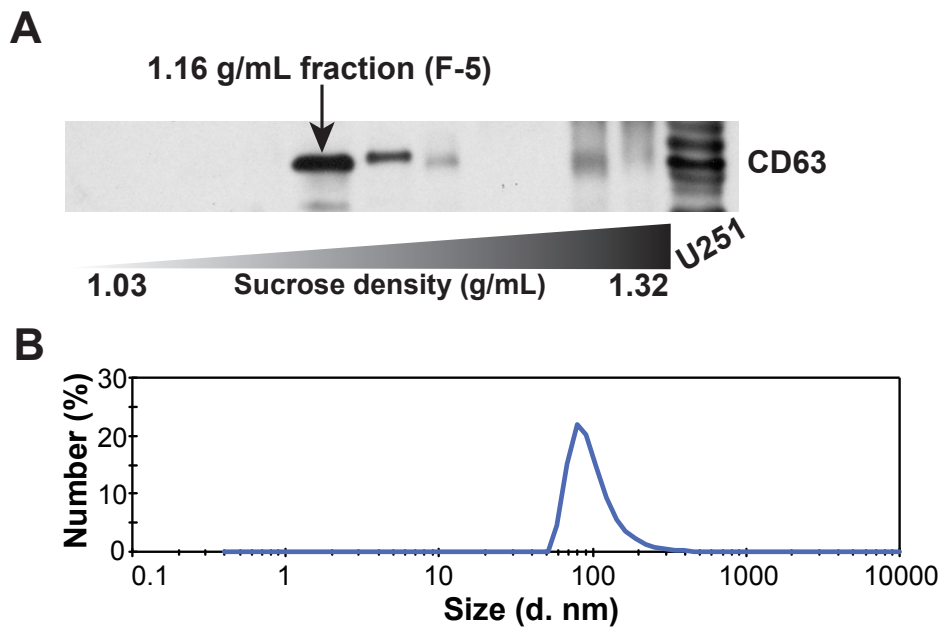


図7. U251_{exo}の同定 (A) 密度勾配沈降平衡法の後に行われる各フラクションにおけるCD63の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。(B) F-5画分の粒度分布をDLSにより解析した。分析温度: 4°C *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

4. 原子間力顕微鏡によるエクソソームの形態学的解析

U251_{exo}を蛍光標識し、その形態確認をLSMにより試みた。その結果、F-5画分の解析で得られた粒子像のほとんどが200 nm以上であり、先の動的光散乱法により得た粒度分布と異なる結果となった (図 8A)。この原因の一つとして、LSMの検出限界径が200 nmとエクソソームのサイズを上回っていたため、¹⁸ 結果としてハレーションによる膨張した像のみが得られたのではないかと考察した。一般的には、電子顕微鏡を用いてエクソソームの存在や形態を肉眼的に確認するが、サンプルの固定および真空条件下での測定が必要な場合もあり、本来の形を反映した結果を得ることができるか疑問が残る。実際、電子染色や脱水を行ったサンプルにおいてアーチファクトが見られたという報告もある。¹⁹ 原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) は、微小な針 (探針) で試料を微かになぞりながら探針-試料間に働く原子間力や電位を検出し、画像化する走査型顕微鏡の一つである。また固定や染色が不要で大気中で測定できることから、生体成分を本来の形状を維持したまま解析することが可能である。さらにその分解能は透過型電子顕微鏡に匹敵することから、エクソソーム表面の三次元凸凹形状や物性を詳細に知ることができる。Sharmaらは、唾液中に含まれるエクソソームの形状や膜物性が健常者とがん患者で異なることをAFMによる解析で示した。²⁰

以上の背景より、F-5画分をAFMで測定し、U251_{exo}の形状確認を試みた。大気中での測定を行い、高さ像、それらを電位差に変換することで分解能を上げた電位差像、さらにサンプルと針の間に働く相互作用を加味した位相差像を得た。これらの画像から、直径100 nmの円形または杯形の像が観察され、U251_{exo}の形態を明らかにした (図 8B)。なお、粒子同士が凝集している様子が所々見られたため、LSM解析で見られた比較的大きな粒子像は、これら凝集物である可能性が示唆された。

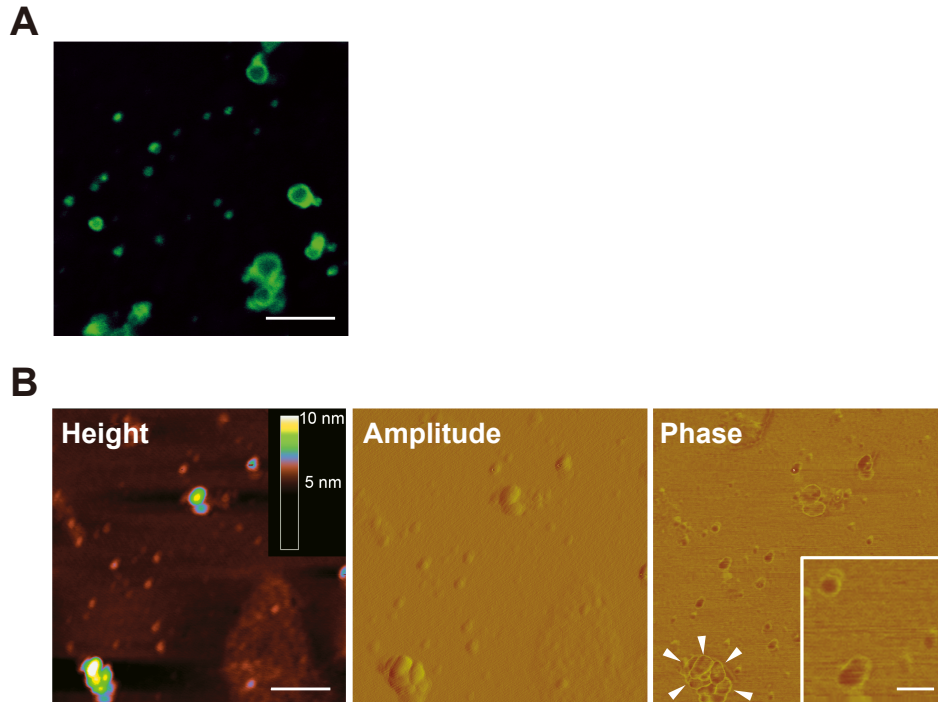


図 8. $U251_{exo}$ の形態観察 (A) $U251_{exo}$ をPKH67で蛍光標識しLSMで観察した (bar: 4 μ m)。(B) $U251_{exo}$ をAFMにより大気中で観察した (左から高さ像、電位差像、位相差像); 矢印: 凝集しているエクソソーム; inset: 円形または杯形のエクソソーム (bar: 100 nm) *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (許可取得済み)

5. 第一章の小活

細胞培養上清中に含まれるエクソソームの単離を超遠心法で試みたが、大小様々な粒子が混在したものが得られた。そのため、密度勾配平衡沈降法を追加して行い、エクソソームと同一密度のF-5画分を採取した。また、エクソソームとして規定されるマーカータンパク質、サイズ、密度の全三項目が同画分に含まれる粒子群で満たされていることをウェスタンブロッティング、DLS、AFMで確認した。これより、高純度のエクソソームを細胞指向性やその関連因子探索のための解析実験に使用するための基盤を確立した。

第二章 エクソソームのがん細胞指向性についての解析

1. エクソソームの細胞指向性

一般的に、自然分泌されたエクソソームが特定の細胞に対して指向性を有するかどうかについて、研究者間でのコンセンサスは現時点で得られていない。それは、エクソソームの調製法やドナー/レシピエント細胞の種類などが論文間で異なり、結果として指向性を示す場合²¹と示さない場合^{15,22}を単純に比較することができないまま、現在に至っているからである。さらにエクソソームの生体内挙動については、イメージング技術が途上のため広く行われておらず、組織特異性を含めて包括的に検証された研究はほとんどない。

著者は、GBM株の一つであるU87-MGより分泌されるエクソソームの細胞移行解析を行った論文¹⁵に注目した。論文内では、同エクソソームが親がん細胞により多く移行する傾向が示されていた。論文著者らはその結果に対して、「U87由来エクソソームが細胞種を問わず移行した」と解釈し、その細胞指向性を否定した。しかし、有意差検定の実施の有無については記載されておらず、エクソソームの細胞間の移行量が異なっていたかどうかを本結果から判断するのは困難である。さらに、彼らが細胞移行解析に用いたエクソソームは、培養上清から超遠心法のみで回収された約200 nmの粒子であるため、使用サンプル中のエクソソームの純度には疑問が残る。本研究においても、超遠心法のみで得られた沈殿物には様々なベシクルの存在を確認している (図 5)。

これらの先行研究から著者は、第一章で正確に単離・同定されたGBM由来エクソソーム (U251_{exo}) を用いてその細胞移行量を適切に解析・評価することで、がん細胞指向性の有無を明らかにすることにした。

2. Glioblastoma由来エクソソームの移行

GBM由来エクソソームにがん細胞指向性があるかどうかを検証するために、がん細胞および正常細胞への移行量を比較した。第一章で記した方法により精製したU251_{exo}をPKH67で蛍光標識した後、各濃度のものを親がん細胞であるU251および同じ発生母地組織であるastrocyteに処置した(図9)。処置したエクソソームの濃度は、エクソソーム単離元のドナー細胞数と本実験で処置した細胞数(LSMを用いた実験では50,000 cells、後述のフローサイトメーターを用いた実験では50,000 cells)の相対比で表した。

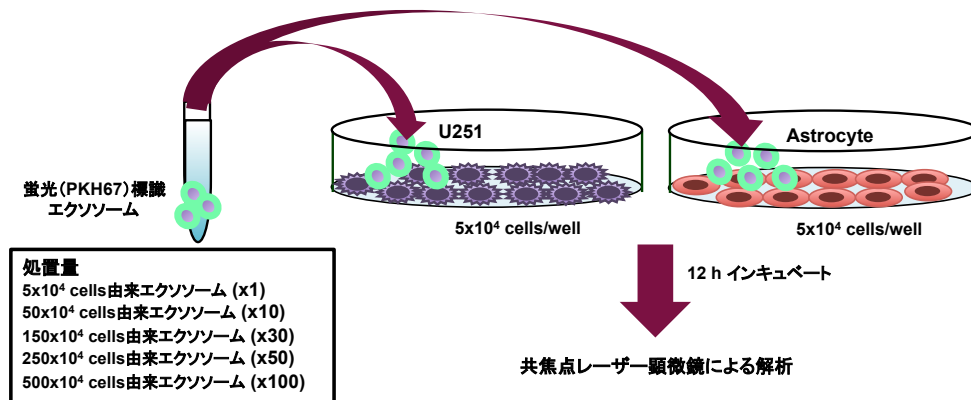


図9. エクソソームの細胞指向性解析手順 レシピエント細胞数に対して1、10、30、50、100倍の細胞数から回収したU251_{exo}を蛍光標識後、U251およびastrocyteに処置し、12時間インキュベートした。

処置12時間後の細胞の様子をLSMで観察したところ、U251における緑色蛍光強度はエクソソームの処置濃度に依存して顕著に増加していた(図10)。一方、astrocyteにおける蛍光強度の増加は比較的緩やかであった。レシピエント細胞数に対して10–50倍の細胞数から回収されるU251_{exo}を処置したところ、U251/astrocyte間で有意な取り込み量の差が生じることが、画像解析により明らかとなった。しかし、100倍の細胞数から精製したものを処置した場合では、両細胞への取り込みに有意な差は見られなかった。この原因の一つとして、高用量のエクソソームの暴露によってその取り込みがインキュベート時間内に飽和したことが考えられる。

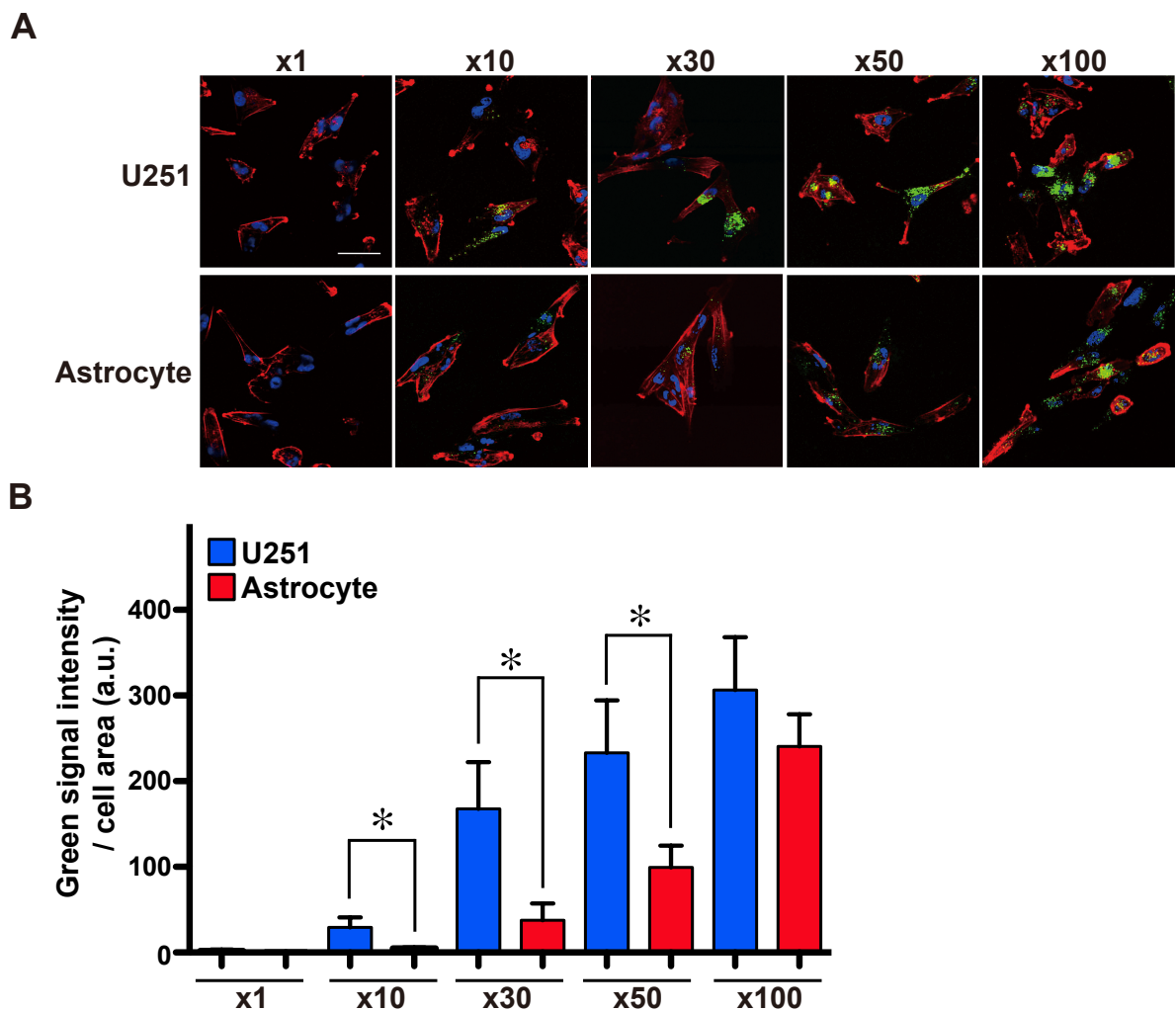


図 10. U251_{exo}の親がん細胞への効率的な取り込み (A) U251_{exo}を12時間インキュベートした細胞を固定・染色 (細胞骨格アクチンタンパク質と核) し、LSMで解析した (bar: 50 μ m)。(B) 単位細胞面積あたりのエクソソーム由来緑色蛍光強度を画像解析により求めた (平均値 \pm 標準偏差; 各群あたりのサンプル数: 30 cells)。有意差検定: Student's *t* test * $P < 0.05$ a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

また二次元画像では、エクソソーム由来の緑色蛍光が細胞表面に接着しているのか、あるいは細胞内に確実に移行しているのかを判断することが困難である。そこでエクソソームの細胞内局在の詳細を調べるために、Z-stack機能を用いた三次元画像の取得を試みた。エクソソームの移行量に有意差が生じた処置群 (x30) において、任意の視野で焦点位置を変えて連続的に撮影を行った。得られた画像はそれぞれ重ね合わせを行い、三次元画像として再構築した (図 11)。この画像から、緑色蛍光が細胞内の核近傍に集まっていることがわかり、処置されたエクソソームが細胞内へ移行していることが明らかとなった。

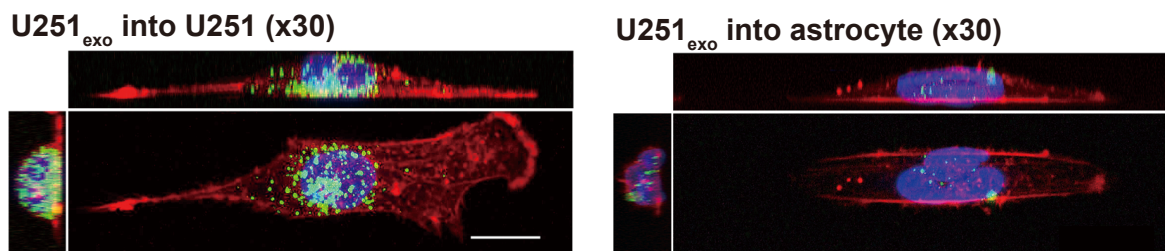


図 11. Z-stack機能によるU251_{exo}の細胞内移行の確認 焦点面をずらしながら連続的に撮影した画像を重ね合わせた (bar: 20 μ m)。 *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より転載 (許可取得済み)

次に、上記のLSMで観察された「U251_{exo}が特定の濃度において、astrocyteに比して親がん細胞へ効率的に移行する」という現象について、より定量的な評価系で再現性を確認するために、フローサイトメーターを用いた解析を行った。解析に必要な細胞数を確保するために、実験スケール (レシピエント細胞数などの培養スケール) をLSM実験時の10倍にして行った。処置して12時間後の細胞を回収し解析したところ、1倍, 10倍, 30倍のいずれの処置量においてもがん細胞のヒストグラムが正常細胞のそれよりも右にずれていることが、各ヒストグラムの中央値を比較することにより明らかとなった (図 12)。このずれは、エクソソームの処置量にしたがって大きくなり、30倍の細胞数から回収されるU251_{exo}を処置した場合には、中央値で約2倍程度の差ががん/正常細胞間で見られた。以上の結果より、U251_{exo}は正常細胞に比べて、親がん細胞へ効率的に移行することが定量的に示された。

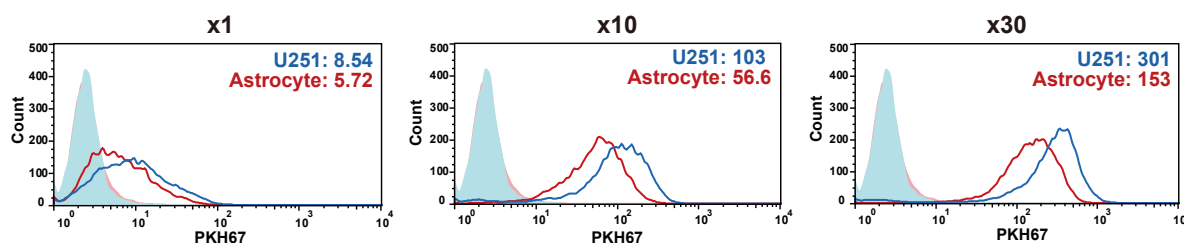


図 12. フローサイトメーターによるU251_{exo}の細胞内移行量の解析 レシピエント細胞数に対して1、10、30倍の細胞数から回収したU251_{exo}を蛍光標識し、U251およびastrocyteに処置した。12時間インキュベートした後に回収した細胞のうち、任意の10,000個における単位細胞当たりの蛍光強度を解析し、ヒストグラムとして表した。図内右上の数字は、各ヒストグラムにおける中央値である。 *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

3. 正常細胞由来エクソソームの移行性との比較解析

一方で、「U251_{exo}が親がん細胞へ効率的に移行する」という現象が、U251/astrocyte間におけるエンドサイトーシス活性の違いに起因している可能性も考えられる。すなわち、これまでに得られた指向性を示唆する実験結果が、がん細胞の高いエンドサイトーシス活性によってU251_{exo}が非特異的に取り込まれることによって生じた可能性である。実際、Fengらの報告では、白血病細胞株 (K562やMT-4) 由来エクソソームの取り込み効率とレシピエント細胞のエンドサイトーシス活性との関連性を示している。²³ よって、本現象がU251_{exo}に起因したものであるかどうか検討する必要がある。そこで、今回使用したU251が非特異的にエクソソームを効率的に取り込んでいるかどうかを確認するために、astrocyte由来エクソソーム (Ast_{exo}) の取り込みを調べた。レシピエント細胞数に対して30倍の細胞数から回収されるU251_{exo}を処置した際、U251への効率的な移行が見られたことから、それと同量のAst_{exo}を処置した際のがん/正常細胞の取り込み量を評価することにした。しかし、エクソソームの分泌量は細胞種間で異なる可能性もあったため、処置量をタンパク質濃度で揃えることにした。それらを各細胞に処置した結果、Ast_{exo}の細胞内移行はU251/astrocyteで共に見られず、細胞間で取り込み量に有意な差はなかった (図 13)。よって、この現象はがん細胞の恒常的な高い貪食活性によるものではなく、自身の分泌するエクソソームに起因する、何らかの認識メカニズムを介した効率的な取り込みと考えられる。すなわち、本現象はU251_{exo}のがん細胞指向性によるものであることが実証された。また、U251は自身の分泌するエクソソームを他細胞種由来のものと区別して取り込んでいることから、自身とAst_{exo}の構成分子の違いが各々の指向性に寄与している可能性が考えられる。

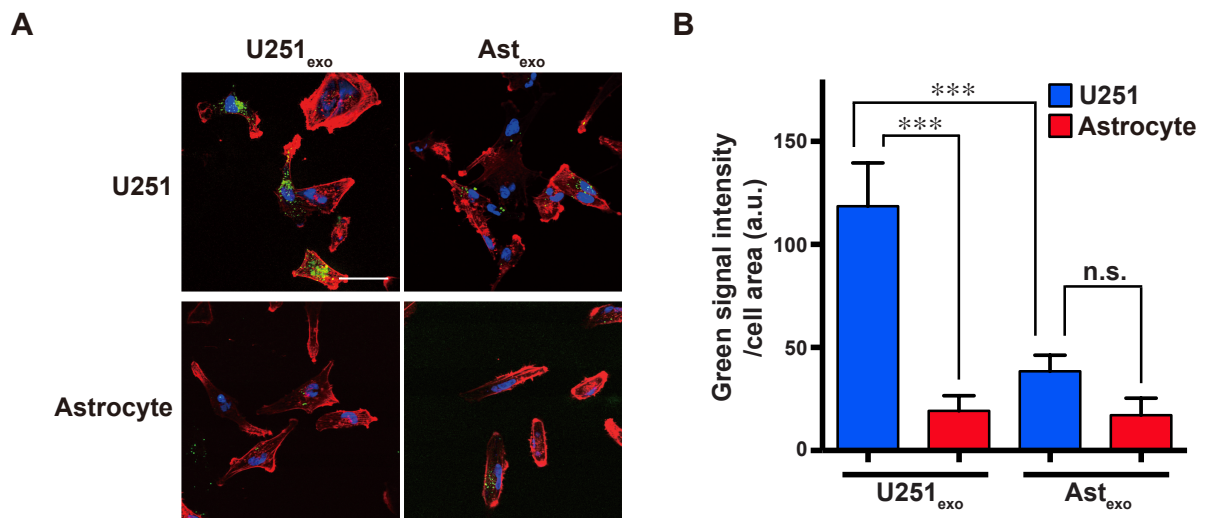


図 13. Ast_{exo}の細胞指向性解析 (A) 同一タンパク質量のU251_{exo}またはAst_{exo}を処置し、12時間インキュベートした細胞をLSMで解析した (bar: 50 μ m)。 (B) 単位細胞面積あたりのエクソソーム由来緑色蛍光強度を画像解析により求めた (平均値 \pm 標準偏差; 各群あたりのサンプル数: 30 cells)。有意差検定: one-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn test ***P<0.001 n.s.: not significant (P \geq 0.05) a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

4. 他のがん種への移行性評価

U251_{exo}が由来細胞であるGBM以外のがん種においても効率的な移行が見られるかを他の細胞株を用いて検討した。乳がん細胞株のMDA-MB-231 (MDA)、およびfibrosarcoma株のHT-1080の2種にU251_{exo}を処置したところ、MDAにはastrocyteに比べて有意な取り込み量の差がみられた。また、HT-1080においても細胞内に緑色蛍光が観察され、U251_{exo}を取り込んでいることが示唆された。よって、U251_{exo}の高いがん細胞移行性は分泌元のGBM細胞のみならず、他のがん種においても見られ、そのメカニズムを応用したDDSは多様ながん種で適用できる可能性が示された。

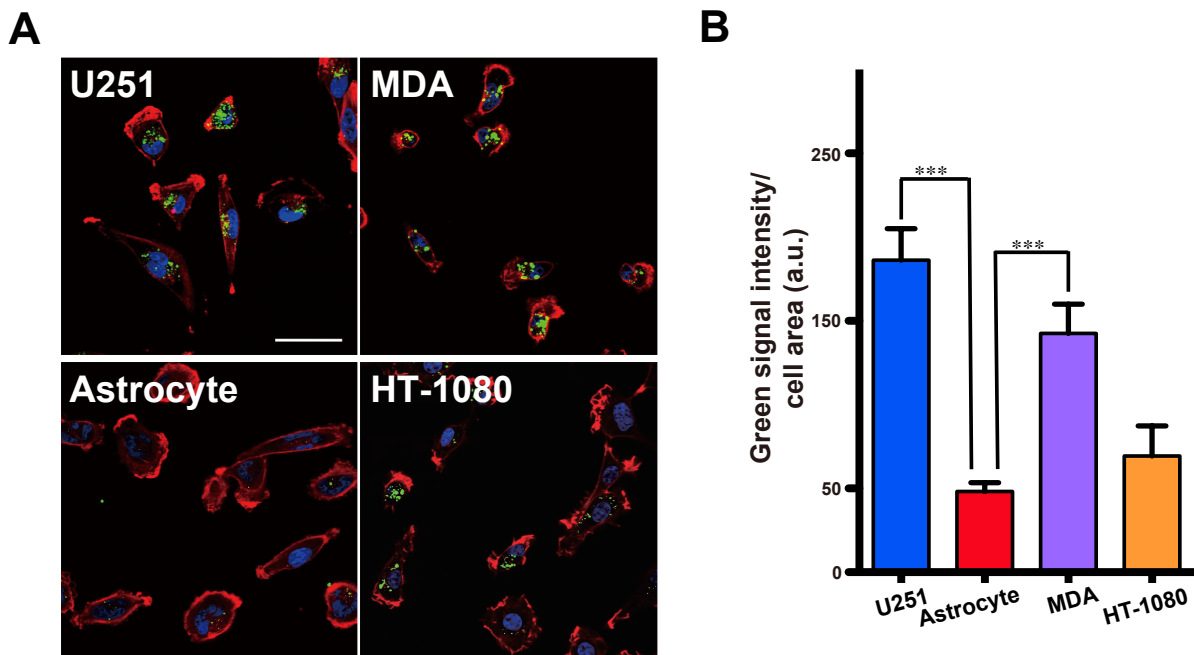


図 14. U251_{exo}の他のがん細胞への移行 (A) U251、astrocyte、MDA (乳がん)、HT-1080 (fibrosarcoma) にU251_{exo}を処置し、12時間インキュベートした細胞をLSMで解析した (bar: 50 μ m)。 (B) 単位細胞面積あたりのエクソソーム由来緑色蛍光強度を画像解析により求めた (平均値 \pm 標準偏差; 各群あたりのサンプル数: 30 cells)。有意差検定: one-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn test *** $P < 0.001$ a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

5. 第二章の小活

第一章で示した方法で得た高純度のU251_{exo}のがん細胞指向性を検証した。LSMやフローサイトメーターの結果より、「U251_{exo}が正常細胞であるastrocyteに比べて、親がん細胞に効率的に取り込まれる」という現象を確認した。またそれががん細胞の恒常的な高い貪食活性による可能性を否定することで、本エクソソームのがん細胞指向性を実証した。U251_{exo}は乳がんやfibrosarcomaといった他のがん細胞株にも移行した。

第三章 エクソソームのがん細胞指向性に寄与する因子の探索

1. エクソソームの投与安全性

エクソソームの治療応用へ向けですでにいくつかの臨床試験が行われており、治療有効性と使用安全性についての検証が進んでいる。²⁴ その中で、体外にて抗原刺激を与えたmelanoma患者由来の樹状細胞 (dendritic cell: DC) からエクソソームを単離し、腫瘍免疫の誘導を目的として再度患者に投与した例がある。そこでは、頻回投与されたエクソソームに対する重篤な免疫反応による有害事象は最大21ヶ月間見られなかったと報告している。²⁵ この他にもいくつかのエクソソームについては、基礎研究および臨床研究の中でその同家移植の安全性が確認されている。²⁶⁻²⁸ したがって、患者個々の検体を治療に用いる個別化医療の枠組みにおいて、エクソソームの生理機能を直接治療に利用することは可能かもしれない。しかし、単離したエクソソームに薬物導入のような人為的操作を加えて利用する場合においては、製造過程を含めた安全性について再検証する必要がある。

一方で従来の生物学的製剤のように、医薬品として製造されるエクソソームの品質管理については、いくつかの課題が残る。エクソソームの内包物や機能は、分泌元の細胞の種類や培養条件によって大きく変わる。例えば、未熟なDCに由来するエクソソームは免疫の活性化を誘導しないが²⁶、成熟したDCが分泌するエクソソームは免疫応答し、ワクチンとして有用である。²⁹ よって、一定の治療効果が保証されたエクソソームを調製するには、供給元細胞の品質を一定に保つ必要があり、そのためのコストは大きいと考えられる。さらに、単一の細胞群に由来するエクソソームでさえ、その生物活性は多岐にわたる。マウス心筋細胞由来エクソソームを同種の繊維芽細胞に作用させた場合、161種の遺伝子発現に影響を与えることが報告されている。³⁰ よって、エクソソーム一粒子の構成成分とその機能について全てを把握することは、現状において困難である。

以上のことから、エクソソームをヒトに直接投与することにおける有害事象リスクの管理は、大きな課題の一つである。著者は、多様な分子構成物であるエクソソームを直接DDSとして使うのではなく、がん細胞指向性を示す複雑なメカニズムの一部を利用しようと考えた。すなわち、指向性を生み出す分子群の同定と機序の解明を行い、それに基づいた標的化技術が組み込まれた人工膜を作製することで、安全性リスクの管理が可能な新規標的型DDS医薬品の開発に繋がると考えた (図 15)。そこで、U251_{exo}のがん細胞指向性に寄与する因子の探索を行った。

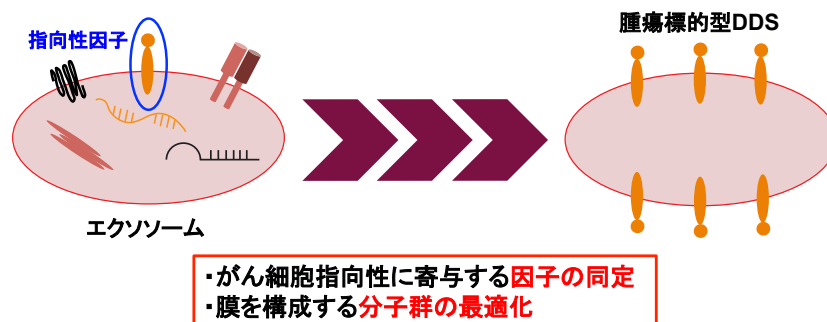


図 15. エクソソームのDDS実用化に向けての課題

2. エクソソームの取り込み経路

ほとんどのエクソソームは標的細胞近傍に到達後、エンドソームの中にベシクルの状態のまま取り込まれ (エンドサイトーシス)、比較的速やかに細胞内へ移行する。³¹⁻²³ これを確認する手法として、4°C条件下での実験によるエネルギー依存性の有無³²、アクチン重合阻害剤処置実験³¹などが挙げられる。そこで、U251_{exo}の親がん細胞への取り込みが、エンドサイトーシスを介したものであるかを調べるために、cytochalasin D処置下でのエクソソームの取り込み量を解析した。本薬物はFアクチンを脱重合させ、エンドサイトーシスを阻害することで知られている。³³ 10 μMのcytochalasin Dとエクソソームを同時に処置し、3時間後の細胞の様子をLSMで解析したところ、薬物処置群ではエクソソーム由来の緑色蛍光が細胞内にほとんど見られなかった。よって、エクソソームの取り込みが本薬物によって阻害されていることが示唆された (図 16)。

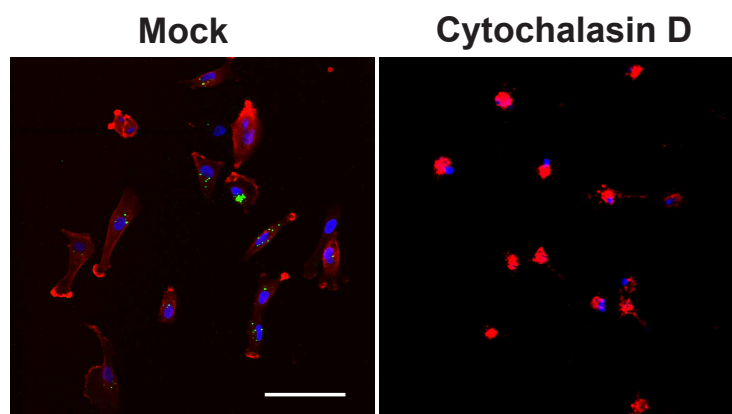


図 16. Cytochalasin D存在下におけるU251_{exo}の細胞内移行量の評価 10 μMのcytochalasin DをU251_{exo}と共に処置し、3時間インキュベートしたU251をLSMにより観察した (bar: 100 μm)。Mock: dimethyl sulfoxide (DMSO) をcytochalasin Dの代わりとして用いた。

同時に、細胞の形態を観察したところ、cytochalasin Dの処置によって細胞骨格が円形に変化していた。この形態変化がcytochalasin Dの細胞毒性による可能性を考え、前処置による穏和な阻害条件でエクソソームの取り込みの変化を改めて確認することにした。10 μMの薬物をU251に処置して30分後、エクソソームを含む新しい培地と交換し3時間インキュベートした。その結果、薬物処置群でのエクソソーム取り込み量は、DMSO処置群と比較して有意に減少した (図 17)。なお、3時間インキュベート後の生細胞数をtrypan blue染色法により求め、薬物処置の有無によってそれらが変わらないことを確かめた。よって、cytochalasin Dの細胞毒性が発現しない条件においても、エクソソームの取り込みが薬物処置により抑えられることが示唆された (図 18)。

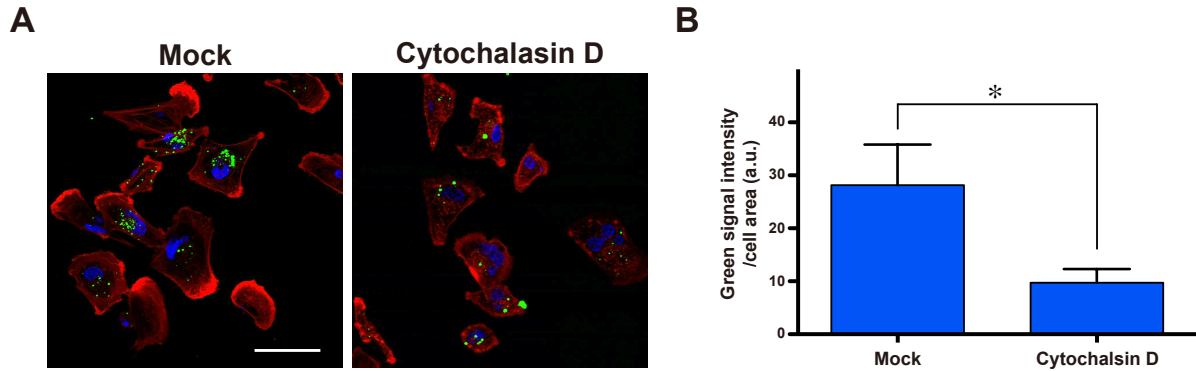


図 17. Cytochalasin Dを前処置した細胞でのU251_{exo}の取り込み量の評価 (A) 10 μ Mのcytochalasin DをU251に30分間暴露させた後、U251_{exo}を含む培地と交換し、3時間インキュベートしたものをLSMにより観察した (bar: 100 μ m)。Mock: DMSOをcytochalasin Dの代わりとして用いた。(B) 単位細胞面積あたりのエクソソーム由来緑色蛍光強度を画像解析により求めた (平均値 \pm 標準偏差; 各群あたりのサンプル数: 30 cells)。有意差検定: Student's *t* test *P<0.05 a.u.: arbitrary unit

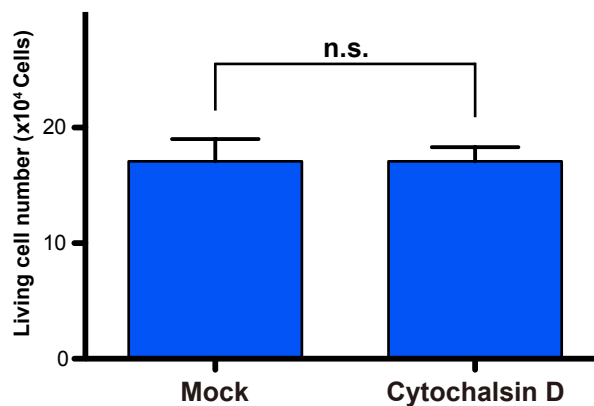


図 18. Cytochalasin Dの細胞毒性評価 10 μ Mのcytochalasin DをU251に30分間暴露させた後、通常培地に交換し、3時間インキュベートした。回収した細胞において、trypan blue陰性である細胞を生細胞としてその数を計測した (平均値 \pm 標準偏差; 各群当たりのサンプル数: 3)。n.s.: not significant Mock: DMSOをcytochalasin Dの代わりとして用いた。

以上より、U251_{exo}の主たる取り込み経路はエンドサイトーシスであり、細胞骨格の正常な働きにしたがって能動的に親がん細胞へ取り込まれることがわかった。一方で、cytochalasin Dの処置によって、エクソソームの取り込みは完全に抑制されておらず、複数の経路を介したエクソソームの取り込みが示唆された。また、エンドサイトーシスは細胞内取り込みにおいてエンドソームが関わる全てを指し、³⁴ 取り込む物質の種類やその機構の違いによってマクロピノサイトーシス、³⁵ ファゴサイトーシス、²³ クラスリン依存性エンドサイトーシス³⁶などに分類される。よって、本エクソソームの取り込み経

路がいずれに当てはまるかについては、経路選択的阻害剤を用いて³⁷、今後検証していくべきであると考えられる。

エクソソームを取り込む別の経路として、細胞形質膜との直接的な膜融合が挙げられる。ウイルスの細胞侵入などで見られる膜融合は、二つの膜同士が接近し外葉膜から融合し始める(半融合)。その後内葉膜も融合し、最終的に孔形成が生じる³⁸。これまでの研究により、soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) やRabなどのタンパク質³⁹や、phosphatidylethanolamine (PE) 含有量などの脂質組成⁴⁰が一連の膜融合過程に関与することがわかっている。

また、膜融合は細胞表面上での形質膜のみならず、細胞内のエンドソーム膜でも起こりえる。⁴¹ よって、エンドサイトーシスにより取り込まれたエクソソームも、その後膜融合により、内包する生理活性分子を細胞質内に遊離・機能させることが可能であると考えられる。また遊離したmiRNAは、RNA-induced silencing complex (RISC) 上において標的messenger RNA (mRNA) と複合体を形成し、その発現および機能を制御する。⁴² このようなRNA干渉の中心的役割を果たすRISCは、RNAの代謝の場として知られるP-bodyに含まれており、さらにそれがMVB近傍に存在することが明らかとなった。⁴³ 以上のことからRISCのアクセスを考慮すると、エンドソーム膜での融合を意図したキャリアの設計が、核酸医薬の効率的送達を目指す上で望ましいと考えられる。

3. エクソソーム膜表面タンパク質性リガンドの関連性

エクソソーム/細胞間との膜上相互作用は、いずれの取り込み経路においても初期に起こる共通のイベントである。その中で、ベシクル膜表面に発現しているタンパク質性リガンドと受容細胞上のレセプターとの相互作用がエクソソームの取り込みに重要であることが示されている。DC由来エクソソームの骨髄細胞への移行においては、接着因子 (CD11a, CD54) やtetraspanin (CD9, CD81) といったエクソソーム側の因子と、細胞側のintegrin $\alpha_v\beta_3$ の双方の関連が報告されている。⁴⁴ またRGDペプチドを共存させると、本エクソソームと競合しその取り込みが減少する一方、oligodendrocyte由来エクソソームのmicrogliaへの取り込みは変化しないことが示された。³⁵ これらのことから、エクソソームの内化メカニズムはその分泌元や取り込む細胞の種類により様々であることが示唆される。エクソソームの取り込みに寄与する細胞表面のタンパク質として、proteoglycan³²やlectin⁴⁵なども他に報告されている。また、reticulocyteから分泌されるエクソソームにおいて、その表面に発現するgalectin-5がmacrophageによって認識されることで、取り込まれることが報じられている。⁴⁶ 一方、分泌元の膵臓がん細胞株 (SOJ-6) に対しアポトーシス誘導を起こすエクソソームにおいては、trypsin処置したものでも細胞死が見られたことから、エクソソーム表面のタンパク質性リガンドに起因しない作用が示された。⁴⁷

本研究では、U251_{exo}表面に存在するタンパク質性リガンドがその指向性に寄与する主要因子であるかをプロテアーゼ処置実験により調べた。すなわち、trypsinを用いてエクソソームの膜構造を維持させながらその表面リガンドのみを脱落させ、astrocyteに対するU251への相対的な取り込み効率に影響が生じるかを検証した。0.25% trypsin- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液中で5分間、37°Cでインキュベートしたエクソソームを処置したところ、astrocyteに対するU251の効率的な取り込みは維持され、U251への移行量についても酵素処置の有無によって変化しなかった (図 19)。また、本処理条件において、実際に表面リガンドが脱落しているかどうかをウェスタンブロッティングにより確認した。酵素を処置した後のエクソソームにNHS (N-hydroxysuccinimide) -biotinを与え、表面に露出しているタンパク質のみをbiotin化させた。biotin化した表面タンパク質はhorseradish peroxidase (HRP) -streptavidinにより特異的に検出した。断片化の確認には、ベシクルを高濃度を含みウェスタンブロッティングでの検出がU251_{exo}よりも容易であるU251_{EV}をサンプルとして用いた。プロテアーゼを処置したものでは、コントロールと比較して検出されるバンドが全体的に低分子側へシフトしており、エクソソーム表面タンパク質の断片化が見られた (図 20)。

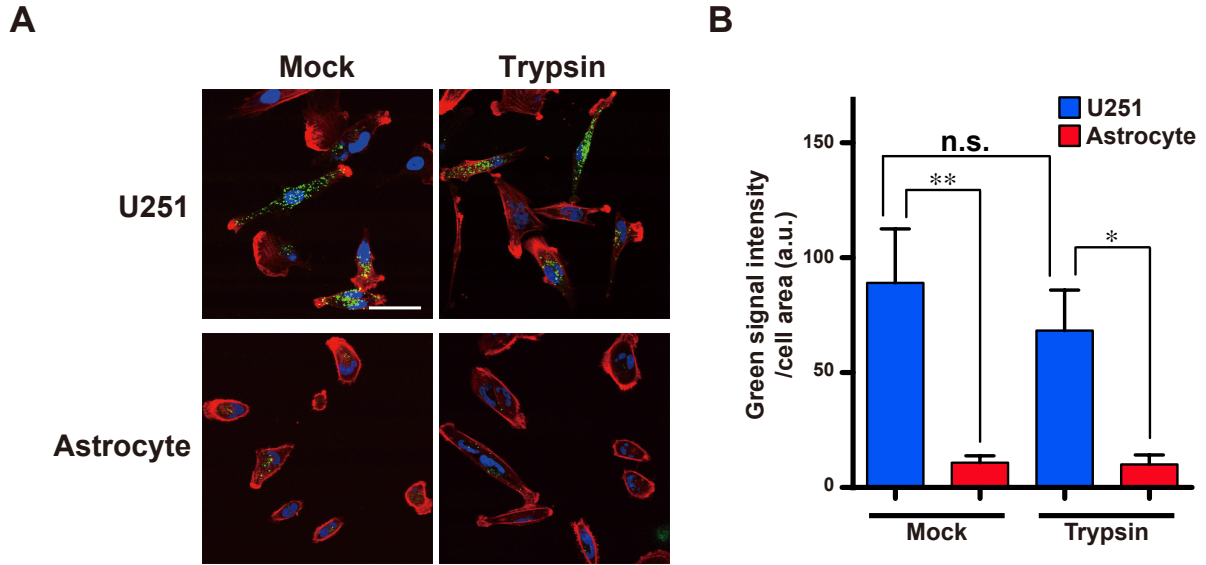


図 19. Trypsinを処置したU251_{exo}の細胞指向性解析 (A) 0.25% trypsin-EDTA溶液中で5分間、37°CでインキュベートしたU251_{exo}を処置し、12時間インキュベートした細胞をLSMで解析した (bar: 50 μ m)。Mock: PBSをtrypsin-EDTA溶液の代わりとして用いた (B) 単位細胞面積あたりのエクソソーム由来緑色蛍光強度を画像解析により求めた (平均値 \pm 標準偏差; 各群あたりのサンプル数: 30 cells)。有意差検定: one-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn test) **P<0.01 *P<0.05 n.s.: not significant (P \geq 0.05) a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

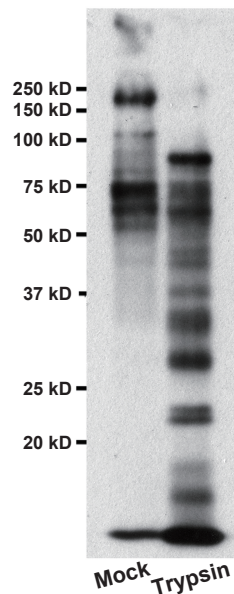


図 20. Trypsinによるエクソソーム表面タンパク質の断片化 0.25% trypsin-EDTA溶液中でインキュベートしたU251_{EV}にNHS-biotinを加え、表面タンパク質をビオチン化した。Mock: PBSをtrypsin-EDTA溶液の代わりとして用いた 検出: HRP-streptavidin *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より転載 (許可取得済み)

Trypsinはlysineやarginineといった塩基性アミノ酸のC端を認識してタンパク質を切断するため、⁴⁸ 基質特異性が比較的高い。一方、proteinase Kはleucineやphenylalanineといった疎水性アミノ酸などを幅広く認識する。⁴⁹ そこで、同プロテアーゼを処置すればより広範囲にエクソソーム表面のタンパク質を脱落させることができるのではないかと考え、それによる指向性への影響を調べた。100 µg/ml proteinase Kで30分間、37°Cで処置したエクソソームをU251およびastrocyteに処置したところ、非処置群と同様にU251/astrocyte間で有意な取り込み量の差が見られた。また、U251への取り込み量もプロテアーゼ処置の有無で大きく変わらなかった (図 21)。

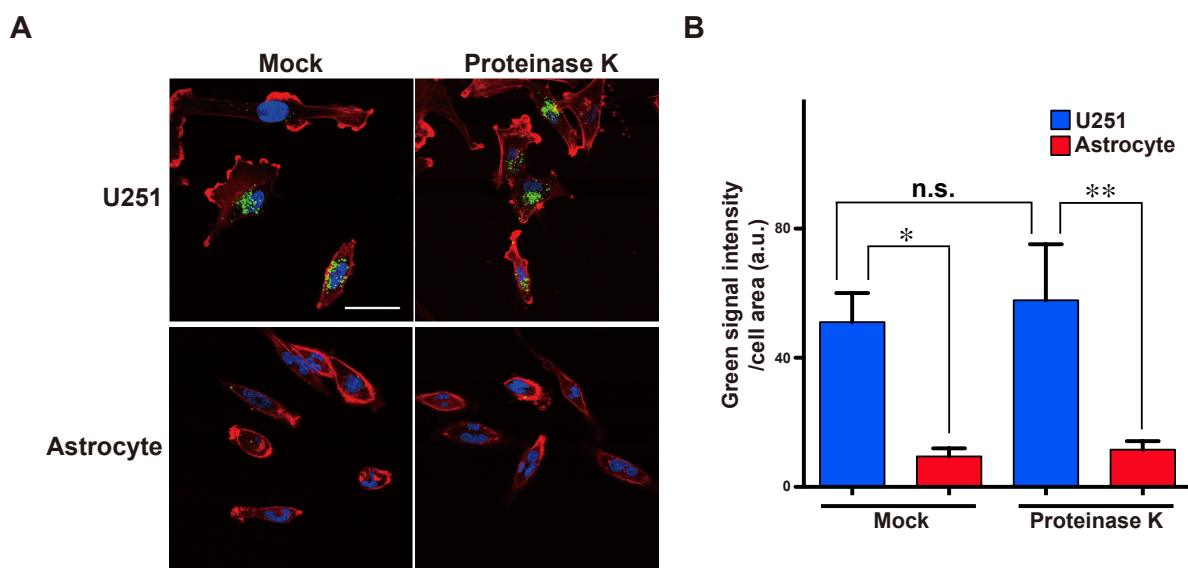


図 21. Proteinase K を処置した U251_{exo} の細胞指向性解析 (A) 100 µg/ml proteinase K (tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloric acid: Tris-HCl 溶液中) で 30 分間、37°C でインキュベートした U251_{exo} を U251 および astrocyte に処置し、12 時間インキュベートした細胞を LSM で解析した (bar: 50 µm)。Mock: proteinase K を含まない Tris-HCl 溶液 (B) 単位細胞面積あたりのエクソソーム由来緑色蛍光強度を画像解析により求めた (平均値±標準偏差; 各群あたりのサンプル数: 30 cells)。有意差検定: one-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn test **P<0.01 *P<0.05 n.s.: not significant (P≥0.05) a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768 より一部改変 (転載許可取得済み)

以上のプロテアーゼを用いた実験の結果から、U251_{exo} のがん細胞指向性に自身の表面のタンパク質性リガンドは大きく関与していないことが示唆された。

4. エクソソームの脂質組成比較解析

エクソソームの脂質組成は由来細胞のそれとは少し異なっており、cholesterol (Chol)やいくつかのリン脂質 (sphingomyelin: SM; phosphatidylserine: PS; phosphatidylinositol: PI) 、⁵⁰ およびスフィンゴ糖脂質⁵¹が豊富である。またポリグリセロリン脂質の一つであるbis(monoacylglyceryl)phosphate (BMP) は、細胞内においてMBVやリソソームに局限しており、ILVの形成に深く関与している。^{52,53} しかしエクソソーム中の脂質組成比としては、由来細胞と同程度である。⁵⁴

エクソソームの細胞内取り込みにおける脂質の関与についてはいくつか報告されている。その一つは、エクソソーム表面のPSを介した細胞認識である。⁵⁵ PSは通常flippaseにより細胞膜の内葉に留まっているが、アポトーシス誘導の際は細胞表面へ露出される。macrophageなどの貪食細胞は、発現するlactadherinを介してPSを特異的に認識し、アポトーシス細胞を速やかに除去する。⁵⁶ EGFR variant III (EGFRvIII) 強制発現細胞株 (U373vIII) から正常発現細胞株 (U373) へのエクソソームを介したEGFRvIIIの導入については、Annexin VのPS特異的な結合により抑制されるため、PSの非対称な分布とそれを介したエクソソーム-細胞間の認識が想定される⁵⁵。なおPSと同様に、細胞膜の内葉に局限するPEはエクソソーム膜の外葉にも分布していることが報告されており、⁵⁴ 組成比のみならず膜中における各脂質分子の配向も細胞膜とは異なっていることが推察される。

Paroliniらは、酸性培地および中性培地で培養したmelanoma細胞株から分泌されるエクソソーム (exoMell_{ac}, exoMell) の脂質組成を比較した。⁵⁷ exoMell_{ac}の脂質組成は、exoMellに対して相対的にSMとmonosialodihexosylganglioside (GM3) が多い一方、PEが少なかった。これにより膜の流動性が高まり、結果として親がん細胞への取り込み量は増加すると論じている。

このように、細胞は周囲の環境に応じてエクソソームの脂質組成を変え、その移行を制御している可能性が示唆された。これを踏まえ著者は、タンパク質性リガンドに依存しないU251_{exo}のがん細胞指向性という現象を、「特異的な脂質組成を認識したU251による効率的な取り込み」と着想した。そこでまず、その仮説を証明するにあたって、U251に効率的に取り込まれるU251_{exo}とあまり取り込まれないAst_{exo}の両者間において脂質組成の違いがあるかどうかをはじめに検証した。

エクソソームの脂質組成解析において、リン脂質の親水部分の化学構造で種別されるクラス比だけでなく、疎水部分の脂肪酸の組み合わせを踏まえた詳細な分子構成比を明らかにすることを目指した。本目標を達成するためには、高い分離能と検出能を有するliquid chromatography (LC) / mass spectrometry (MS) による網羅的なリピドミクスを行う必要がある⁵⁸と考え、それに取り組んだ。その結果、一部の脂質クラスについては分析条件を確立させ、サンプルに含まれる数種のリン脂質分子の同定に成功した。しかし、脂質データベースを用いない手動での同定は大変煩雑であったため、リピドミクス解析を中断した。

そこで次に、thin-layer chromatography (TLC) による脂質組成解析を試みた。TLCは比較的簡便で安価に行うことができる一方、分離能や検出能はLC/MSよりも遥かに劣る。よって、TLC分析により脂肪酸の種類を見分けながら、各脂質分子を同定・定量することは原理上不可能であり、各脂質クラス比のみを解析することにした。また一度の精製で得られるU251_{exo}の全量を展開した際、不明瞭なスポ

ットのみが検出され、結果として十分に解析できなかつた。そこで、ベシクルを高濃度を含み検出がより容易なU251_{EV}およびAst_{EV}を解析サンプルとして用いることとした。脂質成分の抽出には、一般的手法として知られるBligh-Dyer法⁵⁹を用いた。本法により得た同一細胞数由来のU251_{EV}およびAst_{EV}の脂質成分をTLC板にスポットし、Yaoらが報告した展開方法⁶⁰を応用して分離を行った。分離した各脂質クラスのスポットは、ヨウ素蒸気により検出した。

その結果、U251_{EV}の脂質組成はAst_{EV}に比べ、PEの割合が高くSMの割合が低いことがわかつた (図22)。このことは、がん/正常細胞間において分泌されるEVの脂質組成が一部異なることを示唆している。しかし、これらの差異がU251_{exo}の指向性に関与しているかについては、本結果から考察することが困難である。Smythらは、前立腺がん細胞株 (PC3) 由来エクソソームの脂質成分から再構成したリポソーム (Exo Extract Liposomes) が、コントロールリポソームに比べて有意に分泌元細胞へ導入されやすいことを報告しており、U251_{exo}についても同様の手法により脂質組成と指向性との関連を明らかにできると考えられる。すなわち、U251_{exo}から抽出した脂質成分でリポソームを作製し、それがastrocyteに比べてU251に有意に取り込まれるかどうかを今後評価していく必要がある。

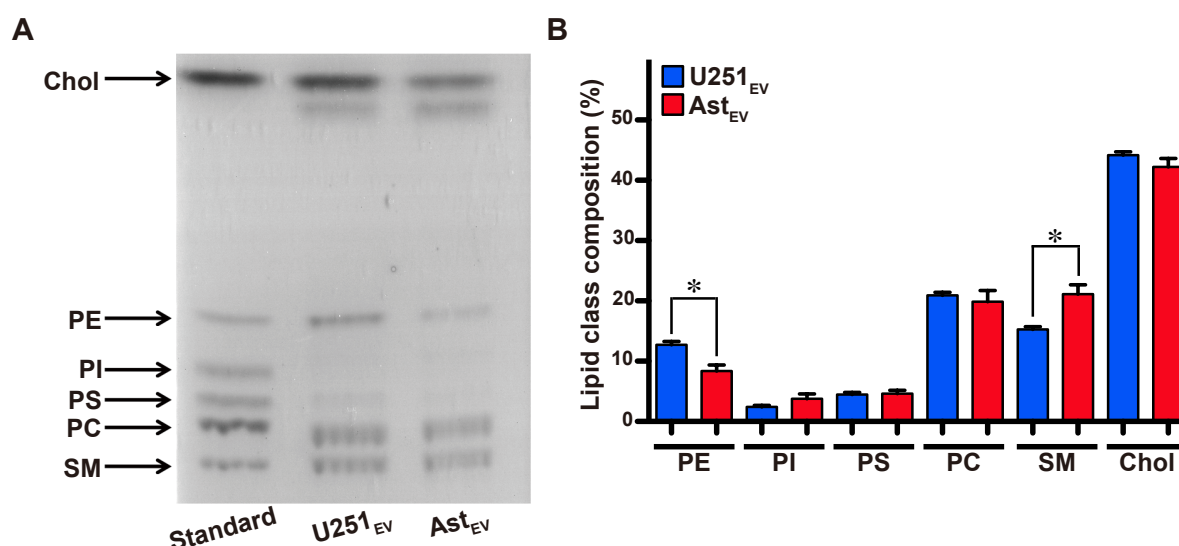


図 22. エクソソームの脂質組成比較 (A) 同一細胞数から得たU251_{EV}とAst_{EV}の脂質抽出物においてTLC分析を行った。Standard: 市販の脂質標品を数種混合させて用いた。検出: ヨウ素 (B) 各脂質クラスの相対割合を画像解析により求めた (平均値±標準偏差; サンプル数: 3)。有意差検定: Student's *t* test *P<0.05 a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

エクソソームの脂質組成が分泌元細胞によって一部異なるのに対し、取り込み側の細胞においても種類により異なるかどうか調べた。Dounce型ホモジナイザーにより、細胞を低浸透圧条件下で穏和に破碎した後、4°Cで段階的に遠心処理 (1,000 g, 7分; 2,000 g, 30分; 5,000 g, 30分; 12,000 g, 70分) するこ

とで、形質膜を他のオルガネラと分離した。核マーカーとして用いた high-mobility group protein 1 (HMGB1)⁶¹ のバンドは 1,000 g 画分、ミトコンドリアマーカーとして用いた cytochrome C⁶² のバンドは、1,000 g および 2,000 g の画分にそれぞれ検出された (図 23)。一方、形質膜マーカーである sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (ATP1A1) のバンドは 2,000–12,000 g の画分に見られ、12,000 g において最も濃いものであった。これらの結果から、形質膜が高い純度と収量で得られる 12,000 g の画分を解析に使用することにした。本画分の脂質成分は Bligh-Dyer 法により抽出した。

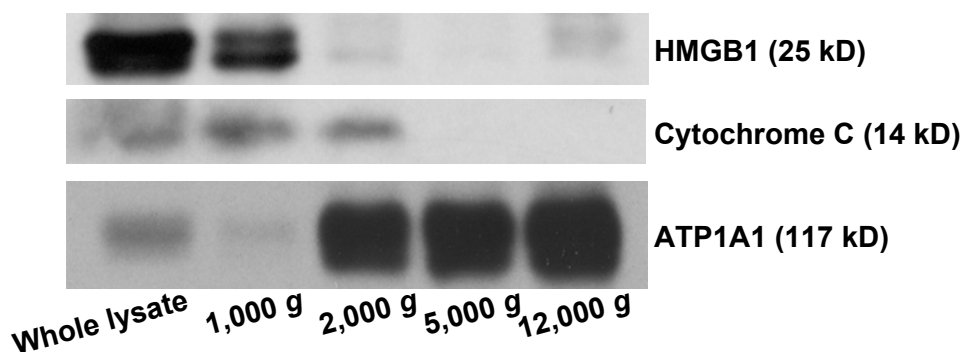


図 23. 形質膜の単離と同定 破砕したU251 (whole lysate) を段階的に遠心し、各画分 (1,000 g、2,000 g、5,000 g、12,000 g) を得、ウェスタンブロッティングに供した。HMGB1: 核マーカー Cytochrome C: ミトコンドリアマーカー ATP101: 形質膜マーカー

TLC分析の結果、U251の形質膜はastrocyteのそれに比べ、PEを有意に多く含んだものであることがわかった (図 24)。この傾向は U251_{EV}/Ast_{EV} 間でも見られており、エクソソームの脂質組成に親細胞のそれが一部反映されていると考えられる。

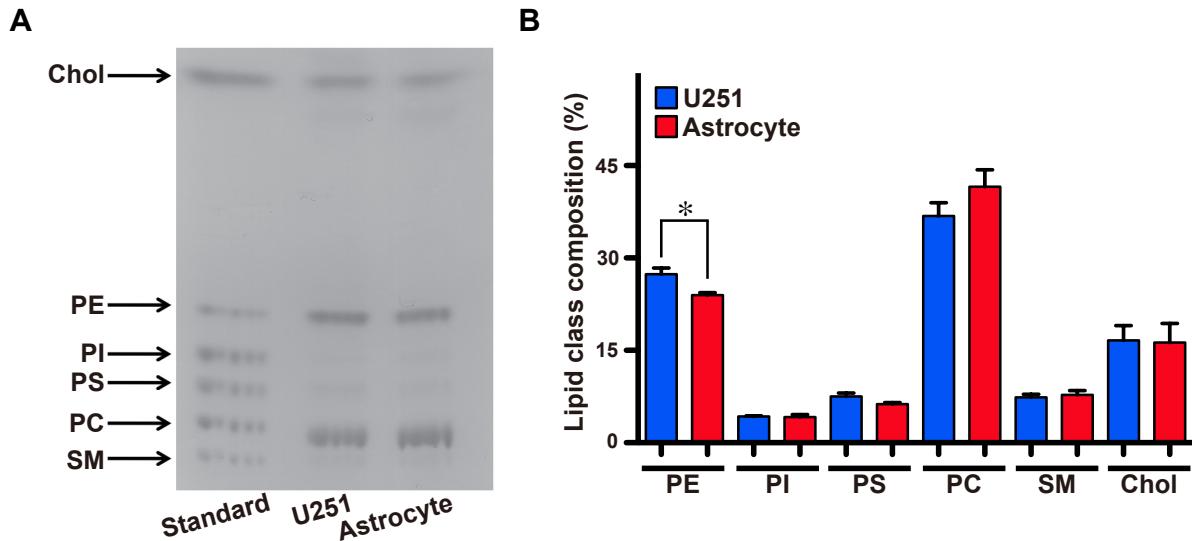


図 24. 形質膜の脂質組成比較 (A) U251およびastrocyteにおける形質膜 (20 μ g protein) から抽出した脂質において、TLC分析を行った。Standard: 市販の脂質標品を数種混合させて用いた。検出: ヨウ素 (B) 各脂質クラスの相対割合を画像解析により求めた (平均値 \pm 標準偏差; サンプル数: 3)。有意差検定: Student's *t* test * $P < 0.05$ a.u.: arbitrary unit *Biochem Biophys Res Commun.* **2015**, 456, 768より一部改変 (転載許可取得済み)

U251_{EV}およびU251は半融合を促進するコーン型脂質であるPEを共に多く含んでおり、Ast_{EV}やastrocyteに比べて相対的に融合しやすい組み合わせである可能性が考えられる。エクソソームの膜融合に関しては、fluorescence resonance energy transfer (FRET)^{57, 31}や二波長蛍光イメージングを用いて観察することが可能であり、今後の研究課題である。また、エクソソームにはSMやCholといった脂質ラフトを形成する成分が分泌元の細胞よりも多く含まれていることが一般的に知られており、U251_{EV}およびAst_{EV}の膜脂質組成においても、その傾向が見られた。Smythらの論文では、Exo Extract Liposomesの導入効率がPC3細胞の脂質成分で作製したリポソームのそれよりも高いことを示しており、²¹ 効率的な薬物送達が可能なるキャリアをデザインする上において、エクソソーム特有の脂質組成は重要な知見を与えると考えられる。

5. 第三章の小活

薬物によるアクチン重合処置下でのエクソソームの細胞移行解析から、U251_{exo}がエンドサイトーシスを介して親がん細胞へ取り込まれることが示された。また、種々のプロテアーゼを用いた表面タンパク質脱落エクソソームの解析から、U251_{exo}のがん細胞指向性における表面のタンパク質の寄与が少ないことが示唆された。U251への取り込みが異なるエクソソーム間での脂質組成比較解析によって、PEとSMの組成比の違いが認められたが、この差異と指向性との直接的な因果関係は明らかになっていない。

結語

生体内の細胞間情報伝達を担うエクソソームを用いて、腫瘍標的化技術の開発を目指し、以下の成果を得た。

- 1) 細胞培養上清中に含まれるエクソソームを、超遠心法と密度勾配平衡沈降法を組み合わせで単離した。また、複数の手法を用いてエクソソームの同定を行い、高い純度であることを確認した。
- 2) 高い純度のエクソソームを使用してその細胞移行性を解析し、U251_{exo}のがん細胞指向性を実証した。U251_{exo}は数種のがん細胞に対して移行した。
- 3) 指向性因子の探索を行った結果、U251_{exo}はエンドサイトーシスを介して親がん細胞へ効率的に取り込まれるが、それは自身の表面のタンパク質に依存しないものであった。脂質組成解析により、U251_{EV}はAst_{EV}に比べてPEが多くSMの少ない脂質組成であることが示された。

以上の結果から、U251から自然に分泌されるエクソソームは、タンパク質以外の表面分子によって親がん細胞に認識され、効率的に取り込まれること、さらにその脂質組成はU251に取り込まれないエクソソームと異なるものであることが示唆された。

一般的にエクソソームが潜在的に細胞指向性を有するかについて、統一の見解はまだ出されていない。世界中の研究者が様々な手法を用いてエクソソームの指向性に迫ろうとする中で、本研究は厳密に単離・同定されたエクソソームを解析に用いた数少ない研究の一つである。In vitro系で示された本指向性が、個体レベルにおいて組織特異性として再現されるのかについては、今後の課題である。

能動的な腫瘍ターゲティングには、抗体やペプチドリガンドといったタンパク質性の分子がこれまでに用いられてきたが、製造コストや品質管理の難しさが実用化への障害となっている。表面タンパク質に依存しない指向性を示すU251_{exo}は、タンパク質性分子を含まない腫瘍標的型DDSの開発を進める上で、重要な知見を与える有望な研究対象と考えられる。

実験の部

使用機器について

細胞培養を行うにあたり、インキュベーターにはHERAcell 150 (Thermo Eletron) を使用し、細胞の観察には倒立型光学顕微鏡 Eclipse TE300 Microscope (Nikon) を使用した。細胞継代時に用いる遠心分機にはhimac CF16RX (日立製作所) を使用し、ローターにはスウィングローター T5SS31 を使用した (1300 rpm, 20°C, 5分)。

培養上清中の死細胞の除去、脂質抽出、形質膜の単離の際は、微量高速冷却遠心機 MX-30において、アングルローター AR500-04またはAR015-24 (TOMY) を用いた。超遠心法には、大型のOptima L-100XPと卓上型のTL-100 (共にBECKMAN COULTER社製) を併用し、アングルローター Type 50.2 Ti、TLA-100.2、ならびにTLA-100.3 (全てBECKMAN COULTER社製) を、サンプル量に応じて使い分けた。また、密度勾配平衡沈降法での超遠心には、スウィングローター SW 55Ti (BECKMAN COULTER) を使用した。

タンパク質定量には、プレートリーダー Model 680 (Bio-Rad) により吸光度を測定した。ウェスタンブロットティングを行うにあたり、Mini PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad) の泳動槽を用い、PowerPac Basic (Bio-Rad) を電源装置として使用した。転写槽には MiniTrans-Blot[®] Cell (Bio-Rad) を使用した。凍結乾燥機には、FDU-1200 (EYELA) を用いた。

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM) には、Carl Zeiss社製のもの (LSM510) を用いた。原子間力顕微鏡 (AFM) には、Nanoscope IIIa (ヘッド: MultiMode head (Bruker AXS) 、スキャナー: Eシリーズピエゾセラミックスキャナー 6056E (Bruker AXS)) を使用した。カンチレバーには、OMCL-AC160TS-R3 (共振周波数: 300 kHz 、バネ定数: 26 N/m 、Olympus) を用いた。

動的光散乱法による粒度分布の解析には、ゼータサイザーナノZS (Malvern) を使用した。

フローサイトメーターにはFACS Caliber (BD Bioscience) を用いた。

第一章に関する実験

U251の培養

American Type Culture Collection (ATCC) より購入したものを、低glucoseのDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 和光純薬工業株式会社: Wako) を基礎とした培地で培養した。なお、効率的な細胞増殖やコンタミネーションによる細胞の死滅防止のため、基礎培地に対して10%非働化fetal bovine serum (FBS; Cell Culture Bioscience) と1% penicillin / streptomycin (Wako) を加えて培養を行った。非働化として、FBSを56°Cの水浴に30分間放置し、血清中の補体を失活させた。培養は、37°C・5%二酸化炭素濃度の環境に設定されたインキュベーター内で行った。

超遠心法によるU251_{EV}の回収

15 cmディッシュ (CORNING) にU251を100,000 cells/mLで22.5 mL蒔き、4日間培養した。この時、血清由来のエクソソームの混入を避けるため、あらかじめ超遠心処理 (100,000 g, 4°C, 70分) したFBSを含む培地 (EV精製用培地) を用いた。培養から4日後、任意のディッシュ2枚に接着している細胞数を確認し、培養上清に含まれるEVの由来細胞数を概算した。回収した培養上清は、4°C下で低速遠心 (2,000 g, 20分; 10,000 g, 30分) を行い、中に含まれる死細胞およびdebrisを取り除いた。続いて、超遠心 (100,000 g, 4°C, 70分) を行い、その沈殿物を得た。回収した培養上清が多い場合は、単回の超遠心のみでEVを十分に濃縮できないため、PBS (137 mM 塩化ナトリウム, 2.7 mM 塩化カリウム, 10 mMリン酸水素二ナトリウム, 1.76 mMリン酸二水素カリウム, pH 7.4) で沈殿物を洗い込みながら超遠心を数回繰り返した。最終的に、培地に含まれるphenol red由来の桃色が抜けたことを確認し、その沈殿物をPBS 0.1 mLで懸濁させたものをU251_{EV}として他の実験に用いた (保存: 4°C)。

密度勾配沈降平衡法によるエクソソームの単離

U251_{EV}を2.5 M sucrose (pH 7.4, 20 mM HEPES含有) 溶液0.5 mLで懸濁し、UCチューブ (BECKMAN COULTER) の底面に設置する。その上に、以下のsucrose溶液 (2.25 M, 2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M, 1 M, 0.75 M, 0.5 M, 0.25 M) を濃度の高いものから0.5 mLずつ重層し、超遠心した (100,000 g, 4°C, 5時間)。チューブの底に針で穴を開け、滴下溶液を0.5 mLずつ分画した。20 mM HEPES溶液 (pH 7.4) により各分画を希釈し、それを超遠心することでsucroseを除去した。最終的に、密度が1.16 g/mLの画分の沈殿物をPBS 0.1 mLで懸濁させ、U251_{exo}として用いた (保存: 4°C)。

タンパク質定量

PBSに懸濁した各サンプルを、Protease Inhibitor cocktail (SIGMA-ALDRICH: Sigma) 、フッ化ナトリウム (nacalai tesque: nacalai) 、およびバナデート (Merck) を添加したRIPAバッファー (Wako) で適宜希釈し、タンパク質を可溶化した。なお、RIPAバッファー溶液中のフッ化ナトリウムとバナデートの終濃度は、それぞれ40 mM、2 mMとした。96穴マイクロプレートに1ウェルあたりサンプルを10 μ L、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC) の発色試薬0.19 mLを入れ、37°Cで30分間インキュベートした時の吸光度を570 nmの検出波長で測定した。検出波長: 570 nm

ウェスタンブロッティングによるU251_{EV}のCD63およびTSG101発現の確認 (図 5A)

PBSに懸濁したU251_{EV}にSample Buffer Solution (Wako) および超純水を加え、タンパク質濃度が1 mg/mLとなるよう希釈し、これを5分間煮沸することでSDS-PAGE用サンプルとした。SDS-PAGEは、12.5% polyacrylamide gelを用いて泳動緩衝液 (15 mM Tris, 35 mM glycine, 0.015% SDS) 中で行った (150 V, 90分) 。電気泳動後、タンパク質を転写緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0.02% SDS) 中で、PVDF膜 (Millipore) に転写した (100 V, 90分) 。タンパク質の非特異的結合を防止するため、PVDF膜を5%スキムミルク (BD Bioscience) を含むTBS-Tween (20 mM Tris, 500 mM 塩化ナトリウム, 0.05% Tween 20, pH 8.0) 中で1時間反応させた。ブロッティング後、TBS-Tweenで希釈した抗CD63抗体 (santa cruz; sc-15363; 希釈倍率: 200倍) または抗TSG101抗体 (abcam: ab83; 希釈倍率: 1000倍) を一次抗体として反応させた (25°C, 1時間) 。2次抗体には、HRP標識抗ウサギIgG抗体 (GE Healthcare: GE) またはHRP標識抗マウスIgG抗体 (GE) をTBS-Tweenで1000倍に希釈したものをを用い (25°C, 30分) Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (GE) で検出した免疫反応性を、バンドとしてX線フィルム (Kodak) に感光させた。

LSMによるU251_{EV}の形状観察 (図 5B)

Poly-D-lysineが表面にコーティングされたディッシュ (Mat Teck) にPBSで懸濁したU251_{EV} 20 μ Lを添加し、氷上で20分間放置した。PBSで数回洗浄した後、4% paraformaldehyde (PFA) /PBS溶液に置換し、さらに氷上で20分間放置した。固定後PBSで数回洗浄し、PKH26 Fluorescent Cell Linker Kits (SIGMA-ALDRICH) の標識試薬0.5 mLを添加して、5分間インキュベートした。PBSで数回洗浄後、LSMで解析した (励起光: ヘリウム・ネオンレーザー 543 nm 検出波長: > 545 nm) 。

ウェスタンブロッティングによる密度勾配中でのCD63の局在確認 (図 7A)

U251_{EV}において密度勾配平衡沈降法を行った。各画分においてsucrose除去を行った後の100,000 g pellet に対してSample Buffer Solution 15 μ Lおよび超純水 15 μ Lを加えて、煮沸したものをSDS-PA用サンプルとし、そのCD63の発現量を解析した。

動的光散乱法によるU251_{exo}の粒度分布解析 (図 7B)

PBSに懸濁したU251_{exo} 40 μLを小容量プラスチックセルに入れ、系内が4°Cに達してから平衡時間120秒の後に測定を始めた。評価においては、粒子ブラウン運動の拡散速度を時間自己相関関数として、1回あたり10秒間散乱光強度のゆらぎを計測し(10-17回程度の)積算結果から拡散係数を得た。粒子径は、Stokes-Einstein方程式(式 1)を用いて拡散係数から算出した。

$$dH = (k \cdot T) / (3 \pi \cdot \eta \cdot D) \quad (\text{式 1})$$

dH: 流体力学的直径、k: ボルツマン定数、T: 温度、η: 溶媒の粘度、D: 拡散係数

LSMによるU251_{exo}の形状観察 (図 8A)

Poly-D-lysineが表面にコーティングされたガラスボトムカルチャーディッシュ(Mat Teck)にPBSで懸濁した密度が1.16 g/mLの画分 0.2 mLを添加し、1時間放置した。PBSで数回洗浄した後、4% PFA-PBS溶液に置換し、さらに20分間放置した。固定後PBSで数回洗浄し、PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits (SIGMA-ALDRICH)の標識試薬0.3 mLを添加して、5分間インキュベートした。PBSで数回洗浄後、LSMで解析した(励起光: アルゴンレーザー 488 nm 検出波長: 505-530 nm)。レンズは対物100倍(油浸用)を用いた。

AFMによるU251_{exo}の形状観察 (図 8B)

PBSに懸濁したU251_{exo} 10 μLを天然雲母板(Nilaco)の劈開面上にのせ、3分間室温で放置し、エクソソームを雲母板に吸着させた。得られた雲母板の表面を超純水(20 μL)で漱ぎ、サンプル溶液に由来する塩を洗浄したもので、測定を行った。測定には、カンチレバーのdrive amplitudeを自動で設定した後、大気中tapping modeで行った(2 x 2 μm; 走査速度: 0.5 Hz; 走査線: 512本)。レンズは対物100倍(油浸用)を用いた。

第二章に関する実験

U251の培養

American Type Culture Collection (ATCC)より購入したものを、低glucoseのDMEM(Wako)を基礎とした培地で培養した。なお、効率的な細胞増殖やコンタミネーションによる細胞の死滅防止のため、基礎培地に対して10%非働化FBS(Cell Culture Bioscience)と1% penicillin/streptomycin(Wako)を加えて培養を行った。非働化として、FBSを56°Cの水浴に30分間放置し、血清中の補体を失活させた。培養は、37°C・5%二酸化炭素濃度の環境に設定されたインキュベーター内で行った。

Astrocyteの培養

DS Pharma Biomedicalより購入したものを、10% FBSおよび1% penicillin/streptomycinを添加した高glucoseのDMEM (Wako) で培養した。

MDAの培養

ATCCより購入したものを、10% FBSおよび1% penicillin/streptomycinを添加した高glucoseのDMEM (ピルビン酸ナトリウム含有、nacalai) で培養した。

HT-1080の培養

ATCCより購入したものを、10% FBS、1% penicillin/streptomycin、ピルビン酸ナトリウム (Wako)、ならびに非必須アミノ酸 (Wako) を添加したEagle's minimum essential medium (EMEM; Wako) で培養した。

エクソソームの単離

15 cmディッシュ (CORNING) に細胞を100,000 cells/mLで22.5 mL蒔き、4日間培養した。この時、血清由来のエクソソームの混入を避けるため、あらかじめ超遠心処理 (100,000 g, 4°C, 70分) したFBSを含む培地 (EV精製用培地) を用いた。培養から4日後、任意のディッシュ2枚に接着している細胞数を確認し、培養上清に含まれるEVの由来細胞数を概算した。回収した培養上清は、4°C下で低速遠心 (2,000 g, 20分; 10,000 g, 30分)を行い、中に含まれる死細胞およびdebrisを取り除いた。続いて、超遠心 (100,000 g, 4°C, 70分) を行い、その沈殿物を得た。回収した培養上清が多い場合は、単回の超遠心のみでEVを十分に濃縮できないため、PBSで沈殿物を洗い込みながら超遠心を数回繰り返した。最終的に、培地に含まれるphenol red由来の桃色が抜けたことを確認し、その沈殿物を2.5 M sucrose (pH 7.4, 20 mM HEPES含有) 溶液0.5 mLで懸濁し、UCチューブ (BECKMAN COULTER) の底面に設置した。その上に、以下のsucrose溶液 (2.25 M, 2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M, 1 M, 0.75 M, 0.5 M, 0.25 M) を濃度の高いものから0.5 mLずつ重層し、超遠心した (100,000 g, 4°C, 5時間)。チューブの底に針で穴を空け、滴下溶液を0.5 mLずつ分画した。20 mM HEPES溶液 (pH 7.4) により各分画を希釈し、それを超遠心することでsucroseを除去した。最終的に、沈殿物をPBS 0.1 mLで懸濁させたものをエクソソームとして用いた (保存: 4°C)。

タンパク質定量

PBSに懸濁した各サンプルを、Protease Inhibitor cocktail (Sigma)、フッ化ナトリウム (nacalai)、およびバナデート (Merck) を添加したRIPAバッファー (Wako) で適宜希釈し、タンパク質を可溶化した。なお、RIPAバッファー溶液中のフッ化ナトリウムおよびバナデートの終濃度は、それぞれ40 mM、2 mMとした。96穴マイクロプレートに1ウェルあたりサンプルを10 μ L、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC) の発色試薬190 μ Lを入れ、37°Cで30分間インキュベートした時の吸光度を570 nmの検出波長で測定した。

LSMによるU251_{exo}のU251およびastrocyteへの移行量評価 (図 10)

70,000,000 cellsの培養上清から精製したU251_{exo}にPKH67標識試薬0.3 mLを添加し、室温で10分間インキュベートした。2% bovine serum albumin (BSA) -PBS溶液0.5 mLを加えて余剰のPKHをクエンチし、超遠心により蛍光標識したエクソソームを沈殿物として得た (100,000 g, 4°C, 70分)。これをPBS 0.14 mLで懸濁することにより、10 μ Lあたりに含まれるエクソソームの分泌元細胞数を、受容細胞数に対して100倍に調製した (x100)。この溶液をさらにPBSを用いて規定の倍率に希釈し、種々の濃度のエクソソーム溶液に調製した (x1, x10, x30, x50)。ガラスボトムカルチャーディッシュにU251またはastrocyteを50,000 cells播種し、通常の培地2 mLで9時間培養した。細胞の接着を確認後、蛍光ラベルU251_{exo}溶液10 μ Lを添加した培地2 mLに置換した。12時間インキュベートした後、PBSで数回洗浄し、4% PFA-PBS溶液1 mLを加えて20分間室温で放置した。PBSで数回洗浄後、rhodamine-phalloidin (Life Technologies) 10 μ LおよびHoechst33258 (Life Technologies) 0.2 μ Lを添加したPBS溶液1 mLを加えて30分間室温で放置した。PBSで数回洗浄したものを、LSMで解析した。エクソソーム由来緑色蛍光は、アルゴンレーザー 488 nmで励起し、505–530 nmの波長範囲で検出した。Rhodamine-phalloidin由来赤色蛍光は、ヘリウム・ネオンレーザー 543 nmで励起し、545 nm以上の波長で検出した。Hoechst33258由来青色蛍光は、ダイオードレーザー 405 nmで励起し、420–480 nmの波長範囲で検出した。レンズは対物40倍 (水浸用) を用いた。任意の視野で撮影された画像において、画像解析を行った (ソフトウェア: WinRoof, MITANI CORPORATION)。Rhodamine-phalloidin由来赤色蛍光から細胞骨格を縁取り、その領域 (ROI) の面積 (A) とPKH67由来緑色蛍光強度の総和 (B) を求めた。B/Aで表される単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を、各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism, GraphPad Software) 上でStudent's t testを行った。

LSM Z-stack機能によるU251_{exo}の細胞内局在の確認 (図 11)

受容細胞数に対して30倍の細胞数から精製した蛍光標識U251_{exo}を処置したU251およびastrocyteの3D画像を撮影した。細胞の高さに合わせて対象の上下位置を指定し、ピンホール約130 μ mで連続的に20–30枚程度のスライス画像を撮影した。得られたスライス画像を重ね合わせ、X/Y/Z軸それぞれにおける三次元画像として再構成した (解析ソフトウェア: LSM Image Browser, Carl Zeiss)。

フローサイトメーターによるU251_{exo}のU251/astrocyteへの移行量評価 (図 12)

72,000,000 cellsの培養上清から精製したU251_{exo}をPKH67で蛍光標識し、最終的に0.1 mLあたりに含まれるエクソソームの分泌元細胞数が、受容細胞数に対して30倍になるようにPBSで調製した (x30)。この溶液をさらにPBSを用いて規定の倍率に希釈し、種々の濃度のエクソソーム溶液に調製した (x1, x10)。15 cm ディッシュにU251またはastrocyteを500,000 cells播種し、通常の培地20 mLで9時間培養した。細胞の接着を確認後、蛍光標識したU251_{exo}溶液またはPBS (ネガティブコントロール) を0.1 mL添加したEV精製用培地20 mLに置換した。12時間インキュベートした後、PBSで数回洗浄し、0.25% trypsin-EDTA溶液を加えて37°Cで5分間インキュベートした。ディッシュから剥がれた細胞を回収し、遠心 (1,300 rpm, 20°C, 5分) により沈殿物として得た。PBS 1 mLで細胞を懸濁したものを解析用サンプルとした。解析設定において、ネガティブコントロールをフローセルに流し、前方散乱光と側方散乱光の展開によりdebrisを除きながら細胞をゲートした (流速: low)。ゲート内における各細胞のエクソソーム由来蛍光をFL1 (蛍光波長: 530±15 nm) で検出し、ヒストグラムのピークトップが10⁰-10¹に収まるように感度を調整した (励起光: Arレーザー 488 nm)。本条件にて、任意の細胞10,000 cellsにおける各々のエクソソーム由来蛍光強度を解析し、ヒストグラムとして表した。

LSMによるAst_{exo}の細胞指向性解析 (図 13)

130 ng proteinのU251_{exo}およびAst_{exo}を蛍光標識し、U251およびastrocyte 50,000 cellsに処置した。この処置量は、受容細胞に対して10-30倍の細胞数から精製されるU251_{exo}とほぼ同等であり、U251への効率的な取り込みが再現性良く得られるものである。12時間インキュベート後の細胞について、LSMで解析を行った。画像解析より、単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でone-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn testを行った。

LSMによるU251_{exo}の他のがん種への移行量評価 (図 14)

受容細胞数に対して15倍の細胞数から精製した蛍光標識U251_{exo}を、U251、astrocyte、MDA、ならびにHT-1080に処置した。12時間インキュベート後の細胞について、LSMで解析を行った。画像解析より、単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でone-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn testを行った。

第三章に関する実験

U251の培養

American Type Culture Collection (ATCC)より購入したものを、低glucoseのDMEM (Wako) を基礎とした培地で培養した。なお、効率的な細胞増殖やコンタミネーションによる細胞の死滅防止のため、基礎培地に対して10%非働化FBS (Cell Culture Bioscience) と1% penicillin/streptomycin (Wako) を加えて培養を行った。非働化として、FBSを56°Cの水浴に30分間放置し、血清中の補体を失活させた。培養は、37°C・5%二酸化炭素濃度の環境に設定されたインキュベーター内で行った。

Astrocyteの培養

DS Pharma Biomedicalより購入したものを、10% FBSおよび1% penicillin/streptomycinを添加した高glucoseのDMEM (Wako) で培養した。

超遠心法によるU251_{EV}の回収

15 cmディッシュ (CORNING) にU251を100,000 cells/mLで22.5 mL蒔き、4日間培養した。この時、血清由来のエクソソームの混入を避けるため、あらかじめ超遠心処理 (100,000 g, 4°C, 70分) したFBSを含む培地 (EV精製用培地) を用いた。培養から4日後、任意のディッシュ2枚に接着している細胞数を確認し、培養上清に含まれるEVの由来細胞数を概算した。回収した培養上清は、4°C下で低速遠心 (2,000 g, 20分; 10,000 g, 30分) を行い、中に含まれる死細胞およびdebrisを取り除いた。続いて、超遠心 (100,000 g, 4°C, 70分) を行い、その沈殿物を得た。回収した培養上清が多い場合は、単回の超遠心のみでEVを十分に濃縮できないため、PBSで沈殿物を洗い込みながら超遠心を数回繰り返した。最終的に、培地に含まれるphenol red由来の桃色が抜けたことを確認し、その沈殿物をPBS 0.1 mLで懸濁させたものをU251_{EV}として他の実験に用いた (保存: 4°C)。

密度勾配沈降平衡法によるエクソソームの単離

U251_{EV}を2.5 M sucrose (pH 7.4, 20 mM HEPES含有) 溶液0.5 mLで懸濁し、UCチューブ (BECKMAN COULTER) の底面に設置する。その上に、以下のsucrose溶液 (2.25 M, 2 M, 1.75 M, 1.5 M, 1.25 M, 1 M, 0.75 M, 0.5 M, 0.25 M) を濃度の高いものから0.5 mLずつ重層し、超遠心した (100,000 g, 4°C, 5時間)。チューブの底に針で穴を開け、滴下溶液を0.5 mLずつ分画した。20 mM HEPES溶液 (pH 7.4) により各分画を希釈し、それを超遠心することでsucroseを除去した。最終的に、密度が1.16 g/mLの画分の沈殿物をPBS 0.1 mLで懸濁させ、U251_{exo}として用いた (保存: 4°C)。

形質膜の単離

15 cmディッシュ (CORNING) にU251またはastrocyteを100,000 cells/mLで22.5 mL蒔き、4日間培養した。ディッシュ内の85%程度が細胞で覆われていることを確認後、培地を捨て、PBSで数回洗浄した。PBS 5 mLをディッシュに加え、スクレーパーで細胞を剥がすことで、細胞懸濁液を得た。遠心により得た沈殿物に、0.25 M sucrose (pH 7.4, 20 mM HEPES含有) を1 mL加えて懸濁し、Dounce型ホモジナイザーで細胞を破碎した。光学顕微鏡を用いて、細胞が破碎されたかどうかを確認した後、4°Cで段階的な遠心処理 (1,000 g, 7分; 2,000 g, 30分; 5,000 g, 30分; 12,000 g, 70分) を行った。各段階で得られた沈殿物はPBS 0.2 mLで懸濁し、速やかにタンパク質定量、脂質抽出に移った。12,000 gの画分を形質膜サンプルとして他の実験に用いた。

タンパク質定量

PBSに懸濁した各サンプルを、Protease Inhibitor cocktail (Sigma)、フッ化ナトリウム (nacalai)、およびバナデート (Merck) を添加したRIPAバッファー (Wako) で適宜希釈し、タンパク質を可溶化した。なお、RIPAバッファー溶液中のフッ化ナトリウムとバナデートの終濃度は、それぞれ40 mM、2 mMとした。96穴マイクロプレートに1ウェルあたりサンプルを10 μ L、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC) の発色試薬0.19 mLを入れ、37°Cで30分間インキュベートした時の吸光度を570 nmの検出波長で測定した。

脂質抽出

PBSに懸濁した対象サンプルに0.1% acetic acid溶液を加えて0.5 mLとし、methanol 1.25 mLおよびchloroform 0.625 mLを添加し、ボルテックスを2分間行った。室温で10分間静置した後、chloroform 0.625 mLを添加し、ボルテックスを30秒間行った。さらに超純水0.625 mLを添加し、ボルテックスを30秒間行った後、遠心処理により(800 g, 4°C, 10分) 下層 (chloroform層) を回収した。回収溶液に対し、洗浄溶液 (水 : methanol : chloroform = 47:48:3) を1.25 mLさらに添加することで、夾雑物の除去を入念に行った。遠心後 (800 g, 4°C, 10分)、下層を回収したものを脂質抽出サンプルとして組成解析に用いた。

LSMによるcytochalasin D処置下におけるU251_{exo}の親がん細胞への移行量評価 (図 16)

U251が 50,000 cells蒔かれたガラスボトムカルチャーディッシュにおいて培地を吸引除去し、受容細胞数に対して30倍の細胞数から精製・蛍光標識したU251_{exo}および10 mM cytochalasin Dを含む培地 (終濃度: 10 mM)、またはU251_{exo}およびDMSO 20 μ Lを含む培地 (Mock)、それぞれ2 mLと交換した。Cytochalasin Dは、LC Laboratoriesより購入した粉末をDMSOで溶解して1 mM溶液とした。12時間インキュベートした後、PBSで数回洗浄し、4%PFA-PBS溶液1 mLを加えて20分間室温で放置した。PBSで数回洗浄後、rhodamine-phalloidin (Life Technologies) 10 μ LおよびHoechst33258 (Life Technologies) 0.2 μ L

を添加したPBS溶液1 mLを加えて30分間室温で放置した。PBSで数回洗浄したものを、LSMで解析した。エクソソーム由来緑色蛍光は、アルゴンレーザー 488 nmで励起し、505–530 nmの波長範囲で検出した。Rhodamine-phalloidin由来赤色蛍光は、ヘリウム・ネオンレーザー 543 nmで励起し、545 nm以上の波長で検出した。Hoechst33258由来青色蛍光は、ダイオードレーザー 405 nmで励起し、420–480 nmの波長範囲で検出した。レンズは対物40倍 (水浸用) を用いた。任意の視野で撮影された画像において、画像解析を行った (ソフトウェア: WinRoof, MITANI CORPORATION)。Rhodamine-phalloidin由来赤色蛍光から細胞骨格を縁取り、その領域 (ROI) の面積 (A) とPKH67由来緑色蛍光強度の総和 (B) を求めた。B/Aで表される単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を、各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism, GraphPad Software) 上でone-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn testを行った。

LSMによるcytochalasin D前処置したU251におけるU251_{exo}の取り込み評価 (図 17)

U251が 50,000 cells蒔かれたガラスボトムカルチャーディッシュにおいて培地を吸引除去し、10 mM cytochalasin Dを含む培地、またはDMSO 20 μ Lを含む培地 (Mock)、それぞれ2 mLと交換し、30分間インキュベートした。培地を吸引除去した後、受容細胞数に対して30倍の細胞数から精製・蛍光標識したU251_{exo}を含む培地 2 mLを添加し、さらに3時間インキュベートした。インキュベート後の細胞について、LSMで解析を行った。画像解析より、単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でStudent's t testを行った。

Cytochalasin D前処置における細胞毒性の評価 (図 18)

6 cmディッシュ (CORNING) にU251を100,000 cells/mLで3 mL蒔いたものを6枚用意し、9時間培養した。細胞の接着を確認後、3枚のディッシュに対して1 mM cytochalasin DをDMSO溶液として30 mL (終濃度: 0.1 mM) それぞれ添加した。残りの3枚のディッシュには、DMSO 30 μ L (Mock) を添加した。これらを30分間インキュベートした後、通常培地に交換しさらに3時間培養した。接着細胞を0.25% trypsin-EDTAで剥がして回収後、0.4% trypan blue (nacalai) で染色し、染色されない細胞を血球計算盤 (エルマ販売株式会社) で生細胞数として計測した。薬物処置群および非処置群それぞれにおいて、生細胞数の平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でStudent's t testを行った。

LSMによるtrypsin処置したU251_{exo}のU251およびastrocyteへの移行量評価 (図 19)

0.25% trypsin-EDTA 67 mLまたはPBS 67 mL (Mock) に、7,500,000 cellsのU251から単離したU251_{exo} をPBS溶液6.8 μ Lとして添加し、37°Cで5分間インキュベートした。0.33 mM MgCl₂および0.9 mM CaCl₂

を含むPBS 0.5 mLを加えて酵素反応を止め、超遠心によりエクソソームを濃縮した (100,000 g, 4°C, 70分)。エクソソームをPKH67標識しPBS 50 μ Lの懸濁液にすることで、10 μ Lあたりに含まれるエクソソームの分泌元細胞数が、受容細胞数に対して30倍とした (x30)。ガラスボトムカルチャーディッシュに播種されたU251またはastrocyte 50,000 cellsを、蛍光標識したU251_{exo}溶液10 μ Lが添加された培地2 mLで12時間インキュベートし、LSMで解析を行った。画像解析より、単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でStudent's t testを行った。

酵素処理によるエクソソーム表面タンパク質の断片化の確認 (図 20)

0.25% trypsin-EDTA 0.4 mLにU251_{EV} 20 μ g proteinをPBS溶液50 μ Lとして添加し、37°Cで5分間インキュベートした。0.33 mM MgCl₂および0.9 mM CaCl₂を含むPBS 0.5 mLを加えて酵素反応を止め、超遠心によりEVを濃縮した (100,000 g, 4°C, 70分)。PBS (pH 8) 0.2 mLに懸濁したEV溶液に50 mM NHS-Biotin溶液5 μ Lを添加し、室温で1時間反応させた。NHS-Biotin溶液は、粉末 (Sigma) をDMSOで溶解したものである。反応液をstreptavidin担持カラムHiTrap Streptavidin HP (GE) に添加し、室温で30分間インキュベートした後、遠心 (150 g, 4°C, 1分) により反応液を溶出した。溶出液として0.1 M glycine (pH 2.6) をカラムに0.2 mL添加し5分間放置した後、遠心 (150 g, 4°C, 1分) により溶出した。この溶出操作を再度行い、biotin化されたEVを精製した。また、精製溶液の体積が大きい結果、ウェスタンブロッティングのサンプルとしてはタンパク質濃度が低いことが予想されたため、凍結乾燥を行った。得られた個体にSample Buffer Solutionおよび超純水を加えて5分間煮沸することで、50 μ Lのサンプル溶液とした。SDS-PAGEは、12.5% polyacrylamide gelを用いて泳動緩衝液 (15 mM Tris, 35 mM glycine, 0.015% SDS) 中で行った (150 V, 90分)。電気泳動後、タンパク質を転写緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0.02% SDS) 中で、PVDF膜 (Millipore) に転写した (100 V, 90分)。タンパク質の非特異的結合を防止するため、PVDF膜を5%スキムミルク (BD) を含むTBS-Tween (20 mM Tris, 500 mM 塩化ナトリウム, 0.05 % Tween 20, pH 8.0) 中で1時間反応させた。ブロッキング後、TBS-Tweenで1000倍に希釈したHRP-streptavidin (TREVIGEN) を反応させ (25°C, 30分)、Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (GE) で検出した免疫反応性を、バンドとしてX線フィルム (Kodak) に感光させた。

LSMによる proteinase K 処置した U251_{exo} の U251 および astrocyte への移行量評価 (図 21)

0.1 mg/mL proteinase K (pH 7.5, 50 mM Tris-HCl含有) または50 mM Tris-HCl (Mock) に、15,000,000 cells のU251から単離したU251_{exo} をPBS溶液18.1 μ Lとして添加し、37°Cで30分間インキュベートした。Proteinase KはMerckより購入した。50 mg/mL 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBF; Wako) をPBS 20 μ Lとして加えて酵素反応を止め、超遠心によりエクソソームを濃縮した (100,000 g, 4°C, 70分)。PKH67により蛍光標識したものをPBS 0.1 mLで懸濁し、10 μ Lあたりに含まれるエクソソームの分泌元細胞数が、受容細胞数に対して30倍とした (x30)。U251またはastrocyteが 50,000 cells蒔かれたガラスボトムカルチャーディッシュに、エクソソーム溶液10 μ Lを処置した。12時

間インキュベート後の細胞について、LSMで解析を行った。画像解析より、単位細胞面積あたりのエクソソーム由来蛍光強度を各群30 cellsずつ求め、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でone-way ANOVA with the Bonferroni/Dunn testを行った。

TLCでのEVの脂質組成解析 (図 22)

TLC板にはTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (5 x 10 cm; Merck) を使用し、分析前日においてmethyl acetate : 1-propanol : chloroform : methanol : 0.25%KCl aq. = 25 : 25 : 25 : 10 : 9 (展開溶媒A) でpre-developmentを行い、室温で放置した。分析当日において、底辺から1 cmの位置に30,000,000 cellsより回収したU251_{EV} およびAst_{EV}の脂質抽出サンプルをスポットした。Standardには、Avanti Polar Lipidsで購入した1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (16:0-20:4 PE) 、1-O-hexadecyl-2-eicosatetraenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0-20:4 PC) 、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (16:0-18:1 PS) 、Liver PI、cholesterol、N-(octadecanoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholine (18:0 SM) をモル比1 : 1 : 4 : 3 : 3 : 4となるようにchloroformで混和したものをを用いた。デシケーターで1時間乾燥させた後、展開溶媒Aで6.3 cm展開した。デシケーターで15分間乾燥させ、展開溶媒Aを完全に除去した後、hexane : diethyl ether : acetic acid = 75 : 23 : 2で最上まで展開した。デシケーターで15分間乾燥後、さらにhexaneで最上まで展開し、ヨウ素が入った瓶内で1時間放置した。発色したTLC板をスキャナーで画像化後、ImageJでスポットの濃淡を数値化し、各脂質クラスの存在比を求めた。本解析は少なくとも3回行い、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でStudent's t testを行った。

ウェスタンブロッティングによる形質膜単離・同定の確認 (図 23)

PBSに懸濁した各遠心画分にSample Buffer Solutionおよび超純水を加え、タンパク質濃度が1 mg/mLとなるよう希釈し、これを5分間煮沸することでSDS-PAGE用サンプルとした。SDS-PAGEは、5.6% polyacrylamide gel (for ATP1A1) またはAny kD™ ミニプロテイン® TGX™ プレキャストゲル (Bio-Rad) を用いた。一次抗体には、抗HMGB1抗体 (Sigma; H 9537) 、抗cytochrome C抗体 (Cell Signaling Technology; #4272) 、抗ATP1A1抗体 (abcam; ab7671) をそれぞれ1000倍に希釈して用いた。

TLCでの形質膜の脂質組成解析 (図 24)

20 µg proteinの形質膜の脂質抽出物を解析した。得られたスポットはその濃淡を数値化し、各脂質クラスの存在比を求めた。本解析は少なくとも3回行い、その平均をグラフとして表した (error bar: 標準偏差)。有意差検定として、統計解析ソフトウェア (Prism) 上でStudent's t testを行った。

謝辞

終わりに臨み、本研究および本論文の作成に際し、終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬品化学分野 赤路 健一 教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたって、全般にわたり御懇意なる御指導・御鞭撻を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 芦原 英司 教授に深く感謝致します。

本論文作成にあたり、多大なご助言を賜りました京都薬科大学 薬品物理化学分野 斎藤 博幸 教授、ならびに京都薬科大学 代謝分析学分野 安井 裕之 教授に深く感謝致します。

充実した大学院制度を整備し、日々叱咤激励を頂きました京都薬科大学 学長 乾 賢一 教授に深く感謝致します

本研究を進めるにあたって、多大な御指導と御助言を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 高田 和幸 助教 (現 准教授) に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたって、有益な御助言を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 北村 佳久 准教授 (現 立命館大学 薬効解析科学研究室 教授)、京都薬科大学 薬品化学分野 服部 恭尚 助教ならびに小林 数也 助教に深く感謝致します。

密度勾配沈降平衡法でのエクソソームの精製を行うにあたり、多大な御指導・御助言を賜りました京都薬科大学 学生実習支援センター 若槻 徹 講師に厚く御礼申し上げます。

原子間力顕微鏡での測定を行うにあたり、多大な御指導・御助言を賜りました京都薬科大学 薬品製造学分野 川島 浩之 博士 (現 大阪薬科大学 分子構造化学研究室 助手) に厚く御礼申し上げます。

本研究の実験を行うにあたって、多大な御協力を頂きました京都薬科大学 薬品化学分野 中川 由布子 氏、京都薬科大学 病態生理学分野 川上 光 氏、藤岡 周助 氏、佐藤 茉衣 氏、辰巳 宥衣 氏、渡辺 温子 氏、鶴飼 幸永佳 氏、ならびに京都薬科大学 薬品化学分野・病態生理学分野に在籍しておりました諸氏に感謝致します。

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員制度の助成の下に行いました。

最後に、常に私を支えて下さった家族に心より深く感謝致します。

引用文献

1. Bae, Y. H. Drug targeting and tumor heterogeneity. *J. Control. Release* **2009**, *133*, 2-3.
2. Cheng, W. W.; Allen, T. M. Targeted delivery of anti-CD19 liposomal doxorubicin in B-cell lymphoma: a comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv. *J. Control. Release* **2008**, *126*, 50-58.
3. Kim, S. H.; Jeong, J. H.; Lee, S. H.; Kim, S. W.; Park, T. G. LHRH receptor-mediated delivery of siRNA using polyelectrolyte complex micelles self-assembled from siRNA-PEG-LHRH conjugate and PEI. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2156-2162.
4. Peer, D.; Park, E. J.; Morishita, Y.; Carman, C. V.; Shimaoka, M. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science* **2008**, *319*, 627-630.
5. Webber, J.; Steadman, R.; Mason, M. D.; Tabi, Z.; Clayton, A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 9621-9630.
6. Ono, M.; Kosaka, N.; Tominaga, N.; Yoshioka, Y.; Takeshita, F.; Takahashi, R. U.; Yoshida, M.; Tsuda, H.; Tamura, K.; Ochiya, T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, ra63.
7. Peinado, H.; Aleckovic, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; Garcia-Santos, G.; Ghajar, C.; Nitadori-Hoshino, A.; Hoffman, C.; Badal, K.; Garcia, B. A.; Callahan, M. K.; Yuan, J.; Martins, V. R.; Skog, J.; Kaplan, R. N.; Brady, M. S.; Wolchok, J. D.; Chapman, P. B.; Kang, Y.; Bromberg, J.; Lyden, D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883-891.
8. Yuyama, K.; Sun, H.; Sakai, S.; Mitsutake, S.; Okada, M.; Tahara, H.; Furukawa, J.; Fujitani, N.; Shinohara, Y.; Igarashi, Y. Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 24488-24498.
9. Yoshioka, Y.; Kosaka, N.; Konishi, Y.; Ohta, H.; Okamoto, H.; Sonoda, H.; Nonaka, R.; Yamamoto, H.; Ishii, H.; Mori, M.; Furuta, K.; Nakajima, T.; Hayashi, H.; Sugisaki, H.; Higashimoto, H.; Kato, T.; Takeshita, F.; Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3591.
10. Wubbolts, R.; Leckie, R. S.; Veenhuizen, P. T.; Schwarzmann, G.; Mobius, W.; Hoernschemeyer, J.; Slot, J. W.; Geuze, H. J.; Stoorvogel, W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10963-10972.
11. Ohno, S.; Takanashi, M.; Sudo, K.; Ueda, S.; Ishikawa, A.; Matsuyama, N.; Fujita, K.; Mizutani, T.; Ohgi, T.; Ochiya, T.; Gotoh, N.; Kuroda, M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther.* **2013**, *21*, 185-191.
12. Godlewski, J.; Krichevsky, A. M.; Johnson, M. D.; Chiocca, E. A.; Bronisz, A. Belonging to a network--microRNAs, extracellular vesicles, and the glioblastoma microenvironment. *Neuro. Oncol.* **2015**, *17*, 652-662.
13. Kucharzewska, P.; Christianson, H. C.; Welch, J. E.; Svensson, K. J.; Fredlund, E.; Ringner, M.;

- Morgelin, M.; Bourseau-Guilmain, E.; Bengzon, J.; Belting, M. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 7312-7317.
14. Arscott, W. T.; Tandle, A. T.; Zhao, S.; Shabason, J. E.; Gordon, I. K.; Schlaff, C. D.; Zhang, G.; Tofilon, P. J.; Camphausen, K. A. Ionizing radiation and glioblastoma exosomes: implications in tumor biology and cell migration. *Transl. Oncol.* **2013**, *6*, 638-648.
 15. Svensson, K. J.; Christianson, H. C.; Wittrup, A.; Bourseau-Guilmain, E.; Lindqvist, E.; Svensson, L. M.; Morgelin, M.; Belting, M. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17713-17724.
 16. Pols, M. S.; Klumperman, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 1584-1592.
 17. Colombo, M.; Moita, C.; van Niel, G.; Kowal, J.; Vigneron, J.; Benaroch, P.; Manel, N.; Moita, L. F.; Thery, C.; Raposo, G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 5553-5565.
 18. Thery, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* **2011**, *3*, 15.
 19. Thery, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2006**, *Chapter 3*, Unit 3.22.
 20. Sharma, S.; Gillespie, B. M.; Palanisamy, V.; Gimzewski, J. K. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes. *Langmuir* **2011**, *27*, 14394-14400.
 21. Smyth, T. J.; Redzic, J. S.; Graner, M. W.; Anchordoquy, T. J. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 2954-2965.
 22. Zech, D.; Rana, S.; Buchler, M. W.; Zoller, M. Tumor-exosomes and leukocyte activation: an ambivalent crosstalk. *Cell Commun. Signal.* **2012**, *10*, 37.
 23. Feng, D.; Zhao, W. L.; Ye, Y. Y.; Bai, X. C.; Liu, R. Q.; Chang, L. F.; Zhou, Q.; Sui, S. F. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **2010**, *11*, 675-687.
 24. Mignot, G.; Roux, S.; Thery, C.; Segura, E.; Zitvogel, L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J. Cell Mol. Med.* **2006**, *10*, 376-388.
 25. Escudier, B.; Dorval, T.; Chaput, N.; Andre, F.; Caby, M. P.; Novault, S.; Flament, C.; Leboulaire, C.; Borg, C.; Amigorena, S.; Boccaccio, C.; Bonnerot, C.; Dhellin, O.; Movassagh, M.; Piperno, S.; Robert, C.; Serra, V.; Valente, N.; Le Pecq, J. B.; Spatz, A.; Lantz, O.; Tursz, T.; Angevin, E.; Zitvogel, L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* **2005**, *3*, 10.
 26. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Yin, H.; Betts, C.; Likhacheva, S.; Wood, M. J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 341-345.
 27. Morse, M. A.; Garst, J.; Osada, T.; Khan, S.; Hobeika, A.; Clay, T. M.; Valente, N.; Shreenivas, R.; Sutton, M. A.; Delcayre, A.; Hsu, D. H.; Le Pecq, J. B.; Lyerly, H. K. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* **2005**, *3*, 9.
 28. Dai, S.; Wei, D.; Wu, Z.; Zhou, X.; Wei, X.; Huang, H.; Li, G. Phase I clinical trial of autologous

- ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 782-790.
29. Qazi, K. R.; Gehrmann, U.; Domange Jordo, E.; Karlsson, M. C.; Gabrielsson, S. Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism. *Blood* **2009**, *113*, 2673-2683.
 30. Waldenstrom, A.; Genneback, N.; Hellman, U.; Ronquist, G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e34653.
 31. Montecalvo, A.; Larregina, A. T.; Shufesky, W. J.; Stolz, D. B.; Sullivan, M. L.; Karlsson, J. M.; Baty, C. J.; Gibson, G. A.; Erdos, G.; Wang, Z.; Milosevic, J.; Tkacheva, O. A.; Divito, S. J.; Jordan, R.; Lyons-Weiler, J.; Watkins, S. C.; Morelli, A. E. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **2012**, *119*, 756-766.
 32. Christianson, H. C.; Svensson, K. J.; van Kuppevelt, T. H.; Li, J. P.; Belting, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 17380-17385.
 33. Flanagan, M. D.; Lin, S. Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 835-838.
 34. Doherty, G. J.; McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857-902.
 35. Fitzner, D.; Schnaars, M.; van Rossum, D.; Krishnamoorthy, G.; Dibaj, P.; Bakhti, M.; Regen, T.; Hanisch, U. K.; Simons, M. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 447-458.
 36. Escrevente, C.; Keller, S.; Altevogt, P.; Costa, J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer* **2011**, *11*, 108.
 37. Mulcahy, L. A.; Pink, R. C.; Carter, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*,
 38. Chernomordik, L. V.; Melikyan, G. B.; Chizmadzhev, Y. A. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *906*, 309-352.
 39. Jahn, R.; Sudhof, T. C. Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 863-911.
 40. Xu, Y.; Zhang, F.; Su, Z.; McNew, J. A.; Shin, Y. K. Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 417-422.
 41. Jahn, R.; Lang, T.; Sudhof, T. C. Membrane fusion. *Cell* **2003**, *112*, 519-533.
 42. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **2004**, *431*, 350-355.
 43. Gibbins, D. J.; Ciaudo, C.; Erhardt, M.; Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell. Biol.* **2009**, *11*, 1143-1149.
 44. Morelli, A. E.; Larregina, A. T.; Shufesky, W. J.; Sullivan, M. L.; Stolz, D. B.; Papworth, G. D.; Zahorchak, A. F.; Logar, A. J.; Wang, Z.; Watkins, S. C.; Falo, L. D., Jr.; Thomson, A. W. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **2004**, *104*, 3257-3266.
 45. Hao, S.; Bai, O.; Li, F.; Yuan, J.; Laferte, S.; Xiang, J. Mature dendritic cells pulsed with exosomes stimulate efficient cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumour immunity. *Immunology* **2007**, *120*, 90-102.
 46. Barres, C.; Blanc, L.; Bette-Bobillo, P.; Andre, S.; Mamoun, R.; Gabius, H. J.; Vidal, M. Galectin-5 is

- bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* **2010**, *115*, 696-705.
47. Ristorcelli, E.; Beraud, E.; Verrando, P.; Villard, C.; Lafitte, D.; Sbarra, V.; Lombardo, D.; Verine, A. Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* **2008**, *22*, 3358-3369.
 48. Olsen, J. V.; Ong, S. E.; Mann, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell Proteomics.* **2004**, *3*, 608-614.
 49. Kraus, E.; Femfert, U. Proteinase K from the mold *Tritirachium album* Limber. Specificity and mode of action. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **1976**, *357*, 937-947.
 50. Record, M.; Carayon, K.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1841*, 108-120.
 51. Llorente, A.; Skotland, T.; Sylvanne, T.; Kauhanen, D.; Rog, T.; Orłowski, A.; Vattulainen, I.; Ekroos, K.; Sandvig, K. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1831*, 1302-1309.
 52. Falguières, T.; Luyet, P. P.; Bissig, C.; Scott, C. C.; Velluz, M. C.; Gruenberg, J. In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol. Biol. Cell.* **2008**, *19*, 4942-4955.
 53. Falguières, T.; Castle, D.; Gruenberg, J. Regulation of the MVB pathway by SCAMP3. *Traffic* **2012**, *13*, 131-142.
 54. Laulagnier, K.; Motta, C.; Hamdi, S.; Roy, S.; Fauvelle, F.; Pageaux, J. F.; Kobayashi, T.; Salles, J. P.; Perret, B.; Bonnerot, C.; Record, M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem. J.* **2004**, *380*, 161-171.
 55. Al-Nedawi, K.; Meehan, B.; Micallef, J.; Lhotak, V.; May, L.; Guha, A.; Rak, J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 619-624.
 56. Hanayama, R.; Tanaka, M.; Miwa, K.; Shinohara, A.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **2002**, *417*, 182-187.
 57. Parolini, I.; Federici, C.; Raggi, C.; Lugini, L.; Palleschi, S.; De Milito, A.; Coscia, C.; Iessi, E.; Logozzi, M.; Molinari, A.; Colone, M.; Tatti, M.; Sargiacomo, M.; Fais, S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34211-34222.
 58. Llorente, A.; Skotland, T.; Sylvanne, T.; Kauhanen, D.; Rog, T.; Orłowski, A.; Vattulainen, I.; Ekroos, K.; Sandvig, K. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1831*, 1302-1309.
 59. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911-917.
 60. Yao, J. K.; Rastetter, G. M. Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 111-116.
 61. Bianchi, M. E.; Agresti, A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 496-506.
 62. Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P. E.; Didelot, C.; Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c

release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1423-1433.