

氏 名 (生年月日) と だ ゆう き 戸 田 侑 紀 (1987 年 4 月 2 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 第 159 号

学位授与の日付 2016 年 3 月 19 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

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

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 赤 路 健 一

(副査) 教 授 斎 藤 博 幸

(副査) 教 授 安 井 裕 之

論文内容の要旨

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。

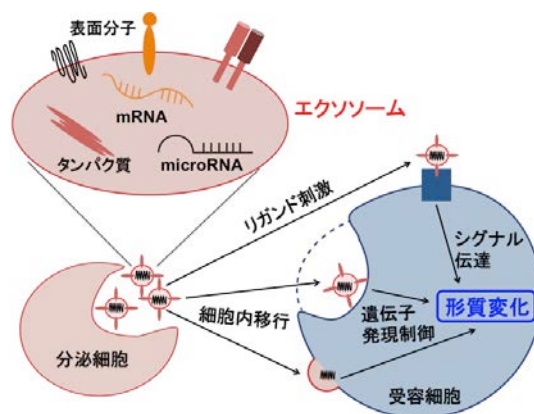


図 1. エクソソームによる細胞間情報伝達

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。

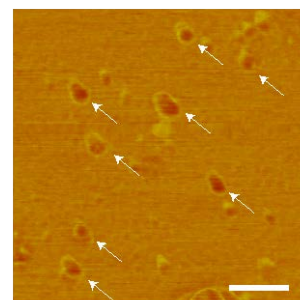


図 2. AFM による $U251_{EV}$ の形態観察

(bar = 0.2 μ m)

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)。

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。

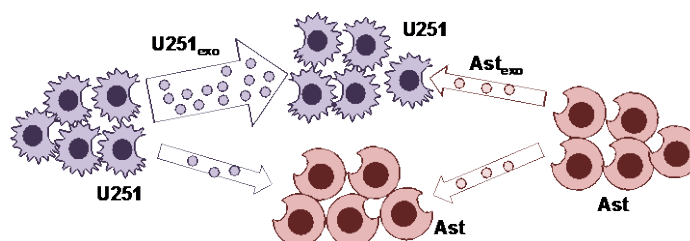


図 3. U251_{exo} のがん細胞指向性

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、これまでに

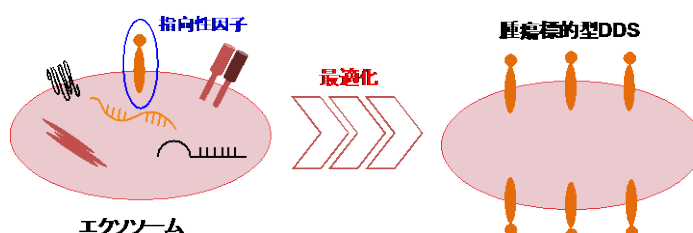


図 4. エクソソーム膜の再構成による標的型 DDS への最適化

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。

審査の結果の要旨

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、細胞間情報伝達に利用される。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「エクソソームの情報伝達には一定の指向性が働いている」という仮説のもと、その実証と現象メカニズムの解明に取り組んだ。

1. エクソソームの単離と同定

申請者は、glioblastoma (膠芽腫) 細胞株 (U251-MG: U251) 由来エクソソーム単離法を検討した。その結果、エクソソームの回収に汎用される超遠心法を密度勾配沈降平衡法と組み合わせることで、①高い純度を持つ粒子群が得られること、②ウェスタンブロッティング・原子間力顕微鏡 (AFM) ・動的光散乱法などによる分析結果によって得られた粒子群が 100 nm をピークとしたエクソソーム集団であること、を明らかにし、同粒子群をエクソソーム (U251_{exo}) と同定した。

2. エクソソームのがん細胞指向性についての解析

ついで、得られた U251_{exo}をその分泌元である glioblastoma U251 細胞および発生母地正常組織である astrocyte に処置し、両細胞におけるエクソソーム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結果から、蛍光標識 U251_{exo}に由来する蛍光強度が astrocyte に比べ U251 で有意に高いことを確認した。また、U251_{exo}のがん細胞内への移行は、膠芽腫のみならず乳がんや繊維芽肉腫細胞株でも確認された。

さらに、U251 細胞が非特異的にエクソソームを取り込んでいる可能性を正常細胞である astrocyte 由来エクソソーム (Ast_{exo}) を用いて調べた。その結果、U251_{exo}と同じタンパク質量の Ast_{exo}を与えてもエクソソーム由来の蛍光がほとんど観察されなかった。このことから、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、U251_{exo}と Ast_{exo}の構成分子の違いが細胞指向性に関与していることが示唆された。

3. エクソソームのがん細胞指向性に寄与する因子の探索

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行った。まず、タンパク質分解酵素を用いて 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。このことから、U251_{exo}のがん細胞指向性にはタンパク質性リガンドの関与が少ないことが示唆された。ついで、U251_{exo}と Ast_{exo}の脂質組成比較を行った。解析に十分な脂質量を得るため超遠心のみ行った粗サンプル (U251_{EV}および Ast_{EV}) を用いて薄層クロマトグラフィー分析を行った。その結果、U251_{EV}の脂質クラス比は Ast_{EV}に対して、phosphatidylethanolamine が高く sphingomyelin が低いことが分かった。さらに申請者は、これらの成分解析とあわせ U251_{exo}の親細胞への取り込み経路について検討した。その結果、エンドサイトーシスに関わる受容細胞の固定化やアクチン重合の阻害によって U251_{exo}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がん細胞に移行していることが強く示唆された。

以上、本論文により、がん細胞由来エクソソームの分泌元がん細胞に対する高い親和性とその指向性因子に関する新たな知見が得られた。これらの知見は、抗がん薬剤を標的部位へ送達させる新たな drug delivery system (DDS) 開発につながる有益な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。