

血液中を循環するがん由来エクソソームの病態生理学的な機能解析

山本雄介

国立がん研究センター研究所 病態情報学ユニット

【研究の背景】

細胞が分泌する細胞外小胞『エクソソーム』によって、細胞同士で様々な情報を交換することは、細胞間コミュニケーションにおいて重要な要素として知られている (Valadi H et al. 2007, Nat Cell Biol; Kosaka N et al. 2016, JCI)。エクソソームは、ほとんど全ての細胞から分泌される 50-150 nm の脂質二重膜に包まれた小胞である。内包物として DNA、RNA、タンパク質などを含み、これらが情報素子となることで、細胞間情報伝達が実現されている。エクソソームの分泌量は正常細胞と比較してがん細胞で多いことが知られており、がん細胞が出すエクソソームはがんの発生、浸潤、転移など様々な段階に影響を与えるとされている。近年、エクソソームの分泌に関わる分子メカニズムは広く研究され、がん細胞において活性化しているシグナル経路がエクソソームの分泌に関わっていることも明らかになってきた (Kilinc S et al. 2021, Dev Cell)。

申請者らはこれまでに、がん特異的なエクソソーム分泌の鍵となる遺伝子としてセリン代謝酵素である Phosphoserine Aminotransferase 1 (PSAT1) を同定している。PSAT1 は多くの種類のがん細胞において高発現しており、さらに分泌するエクソソーム量が PSAT1 の発現量に比例して増加することを明らかにした。PSAT1 の強制発現により分泌量が増加したエクソソームは、破骨細胞を活性化する働きがあり、溶骨性の骨転移を有意に引き起こすことを発見した。つまり、エクソソームが破骨細胞を活性化させ、転移巣である骨組織をリプログラミングし、がん細胞が転移しやすい環境を作り出していたのである。

一方で、がん細胞が分泌するエクソソームが、がん微小環境を制御することで自身の生存や転移に有利に働くことは知られているが、それらを支持するデータの多くは生体外の細胞培養実験や超速心法等によって回収されたエクソソームの過剰投与実験によって導き出されていることが多く、生理的な濃度で血液中を循環するがん由来エクソソームの生体内での実際の機能は十分理解されていない。したがって、本研究では、PSAT1 の遺伝子操作によって、エクソソームの分泌量を変化させたがん細胞を用いることで、原発腫瘍から分泌し、血液中を循環するエクソソームが生体全体に与える影響ならびに、高頻度に転移する骨/肺組織への影響・微小環境のリプログラミング効果について明らかにする。

【目 的】

がん細胞が分泌するエクソソームががん微小環境を制御することは、がんの生存に有利に働くと考えられている。しかしながら、この知見の多くは細胞培養や過剰量のエクソソーム投与実験に基づいたものである。有効な実験モデルの不足から、生理的な濃度のエクソソームの生体内での機能については十分理解されていない。そこで、本研究課題では、独自のエクソソーム分泌量の変化モデルを用いて、血液中を循環するエクソソームが生体内の器官や正常細胞に与える影響についてがん細胞の転移の観点からリプログラミング効果について明らかにする。

【方 法】

・血液中を循環するエクソソームの転移巣への影響の評価

原発腫瘍から分泌され血液中を循環したエクソソームが、転移先に与える影響を検証するために PSAT1 強制発現によるエクソソーム高分泌がん細胞を用いた移植実験を行う。エクソソーム高分泌がん細胞と対照群の親株細胞を免疫不全マウスに移植し、破骨細胞の活性化を検証する。評価方法は、TRAP (Tartrateresistant acid phosphatase) 染色を用いる。

•がん細胞から分泌され、血液中を循環するエクソソームの影響の評価

がん細胞から分泌されるエクソソームの病態生理的な効果を検証するために、PSAT1 遺伝子の抑制細胞株を作製し、対照群との比較実験を行う。遺伝子操作を行うことでがん細胞が分泌するエクソソーム量を低下させ、がん細胞特異的なエクソソーム分泌が生体に与える影響を評価する。

•がん由来エクソソーム投与によるがん微小環境リプログラミング効果の検証

がん細胞はエクソソーム以外にもサイトカインやケモカインなどの分泌因子を細胞外へ放出している。そのため、上記の解析がエクソソームの効果によるものではなく、PSAT1 によって誘導された分泌因子の影響が考えられる。その可能性を排除するため、エクソソーム高分泌がん細胞と親株細胞から単離したエクソソームを血中に投与し、骨組織に与える影響を評価する。

【結 果】

•血液中を循環するエクソソームの転移巣への影響

がん細胞が分泌するエクソソームが、がん微小環境に与える影響を検証するために、乳がんの骨転移モデルを用いた解析を行った。

in vitro の解析によって、骨転移性の乳がん細胞株 (MCF7-BM02) が、破骨細胞の分化を誘導することはすでに確認済みであり、同様の効果が in vivo においても生じるかを検証した。マウスの尾動脈から乳がん細胞を移植し、骨転移を起こす実験を行った。4 週間後に骨切片を作製し、H&E 染色と TRAP 染色を実施した (図 1)。図 1B に示すように、PSAT1 を強制発現させ、エクソソームの分泌量を増加させた乳がん細胞においては、TRAP 陽性の割合が対照群より顕著に増加し、骨組織内の破骨細胞の分化が進んでいることが観察された。つまり、骨転移性の乳がん細胞に由来するエクソソームの量が増加することで、がん微小環境内に存在する破骨細胞に大きな影響を与えることが確認できた。

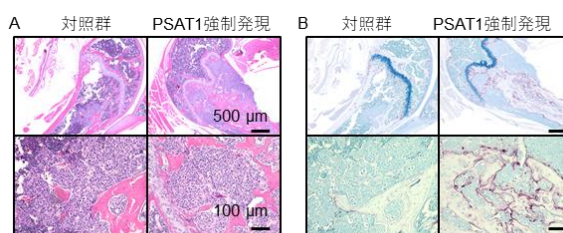


図1. がん特異的なエクソソームが破骨細胞に与える影響
A. H&E染色、B. TRAP染色

•原発巣から分泌され、血液中を循環するエクソソームの影響の評価

次に、PSAT1 の遺伝子発現の抑制が、がん細胞の転移の抑制になるか否かの検証を行った。PSAT1 遺伝子の抑制ががん細胞の増殖自体に影響を与えないことは、in vitro の解析ですでに確認済みである。shRNA によって、PSAT1 を抑制した骨転移性の乳がん細胞をマウスの尾動脈から移植し、in vivo imaging system (IVIS) で経過観察した (図 2)。対照群と比較して、PSAT1 を抑制し、エクソソームの分泌量を低下させた細胞株では、転移の割合が有意に低下していることが確認できた。また PSAT1 の過剰発現によるエクソソーム量の増加ならびに転移の増加だけでなく、エクソソームの分泌量を生理的な範囲で低下させたモデルにおいても、骨転移の抑制が確認できた。

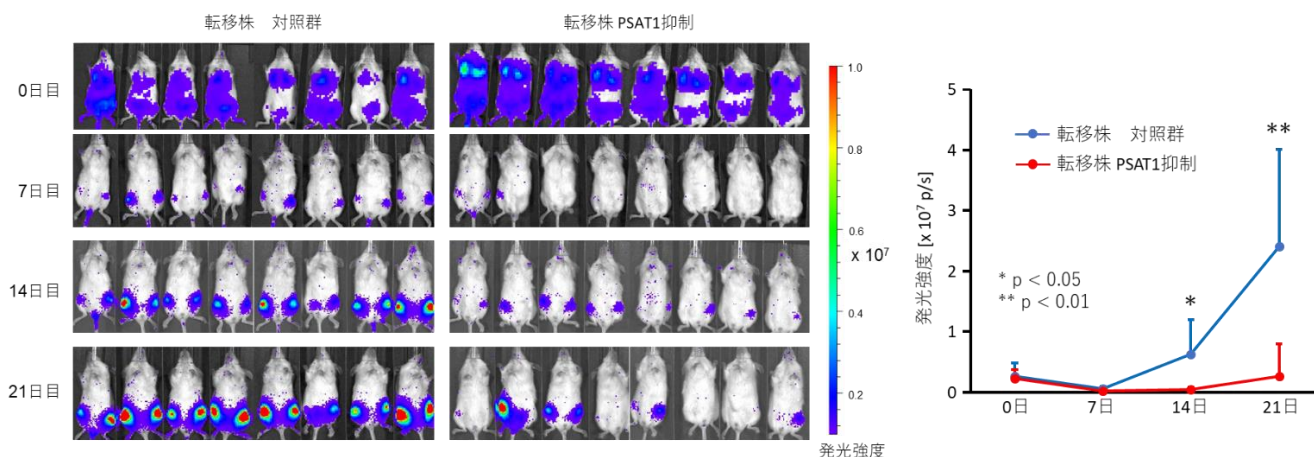


図2. PSAT1遺伝子抑制によるエクソソームの病態生理学的意義の評価

・がん由来エクソソーム投与によるがん微小環境リプログラミング効果の検証

PSAT1 遺伝子操作によって、エクソソーム分泌量が変化することは確認済みであるが、それ以外のサイトカインや増殖因子の関与は否定することができない。そこで、PSAT1 を強制発現させた細胞からエクソソームを超速心法によって精製し、それらの投与実験を行った。がん細胞（骨転移能の低い MCF7 親株）を移植後に、1, 4, 8, 11 日の 4 回にわたり、エクソソームを静脈から投与し骨転移の割合を IVIS で経過観察した(図 3)。その結果、がん細胞移植後 28 日目において、エクソソーム投与群の複数の個体において、骨転移が誘導されていることは確認されたが、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

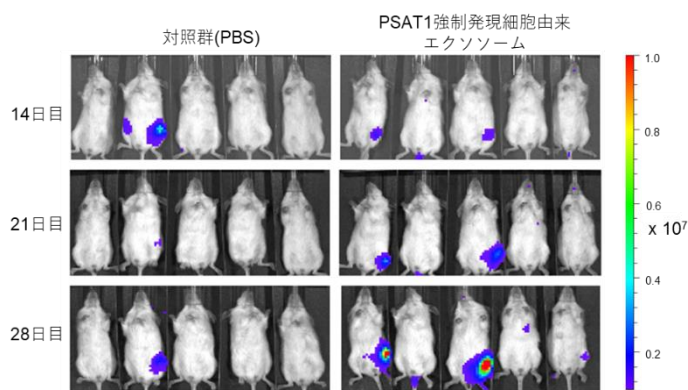


図3. エクソソーム投与ががん転移に与える影響

静脈からのエクソソーム投与であったため、十分な量のエクソソームが投与できなかった可能性や、超速心法によって精製されたエクソソームを用いたため、無傷の状態のエクソソームが十分に確保できていなかった可能性の影響があると考えられた。

【考 察】

本研究において、細胞外小胞エクソソームの生体内での分泌量を操作することによって、がん細胞の転移の動態が変化することを明らかにした。つまり、がん細胞は周囲のがん微小環境に存在する細胞とエクソソームを介して、細胞間コミュニケーションを実際に行っており、その抑制はがんの進展の抑制につながることを明らかにした。したがって本研究で明らかになったがん細胞特異的なエクソソーム分泌機構の解明は、新たながん治療への基盤になると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

がん細胞特異的なエクソソームの分泌量の低下が、がんの悪性度の低下につながった。したがって、低分子化合物や遺伝子発現制御を行うことで、がん細胞のエクソソーム分泌機構を抑制することが新たな治療方法の開発になる可能性が高いと言える。これらの成果は、2024年8月に Cell Reports 誌に掲載された (Cell Rep. 2024, 43(8):114517.山本責任著者)

【参考・引用文献】

- Kilinc S et al. Oncogene-regulated release of extracellular vesicles. Dev Cell. 56(13):1989–2006.e6. (2021)
- Kosaka N et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. J Clin Invest. 126(4):1163–72. (2016)
- Yamamoto T et al. Aberrant regulation of serine metabolism drives extracellular vesicle release and cancer progression. Cell Rep. 43(8):114517. (2024)
- Valadi H et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 9(6):654–9. (2007)