

がんエクソソームの機能および体内動態における糖鎖の作動原理の解明

原田陽一郎

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 システム血栓制御学講座

【研究の背景】

癌細胞はエクソソームと呼ばれるサイズや積み荷が不均一な小胞を分泌し、癌自身や近傍の細胞、さらに血流を介した遠隔臓器とのコミュニケーションにより、癌転移の環境を整える。全ての細胞表面はアスパラギン結合型糖鎖(N 型糖鎖)で覆われており、細胞と細胞との間の相互作用や受容体の機能を調節する。癌エクソソームの表面も N 型糖鎖で覆われているが、その生理機能は全く不明である。また、癌エクソソームは不均一であるが、その不均一性が生まれる機序とその病理学的意義は不明である。

【目 的】

本研究では、癌エクソソームの機能および体内動態における N 型糖鎖の作動原理の解明、および癌エクソソームの不均一性を生み出す機構とその意義の解明を目的とする。

【方 法】

本研究では、悪性黒色腫(メラノーマ)のモデルとして確立されているマウスメラノーマ B16-F10 細胞株から分泌されるエクソソームを超遠心法により調製した。まず、このメラノーマエクソソームに発現する主要な N 型糖鎖構造とその担体タンパク質を各種機器分析により解析した。次に、メラノーマエクソソームに発現する N 型糖鎖の機能を *in vitro* およびマウスメラノーマ腫瘍モデルを用いた *in vivo* の両面から解析した。

【結 果】

(*In vitro*)

まず N 型糖鎖の構造解析の結果から、メラノーマエクソソームに発現する主要な糖鎖はシアル酸を末端に持つことがわかった。次に、これらシアロ糖鎖の担体タンパク質を同定するため、シアル酸結合レクチンを用いて糖タンパク質を濃縮し、プロテオミクス解析を行った結果、複数の膜タンパク質が同定された。これらの中には、“eat me signal”として機能するホスファチジルセリン結合タンパク質 Mfge8、メラニン合成酵素 (tyrosinase, tyrosinase-related protein 1, L-dopachrome tautomerase) およびタンパク質分解酵素 Adam10 が含まれていた。また、メラノーマエクソソームにおける前転移ニッチの形成に重要な受容体型チロシキナーゼ Met もシアロ糖鎖によって修飾されていることがわかった。さらに、Adam10 や Met は、それぞれ機能的な成熟型と、大部分の機能ドメインを欠損した断片型としてエクソソーム中に存在した。

メラノーマエクソソームの不均一性を検証するため、ショ糖密度勾配超遠心法によってエクソソームを分離後、上で同定したシアロ糖タンパク質とエクソソームのマーカー分子の分布を解析した。その結果、メラノーマエクソソームは比重の低い小胞と、高い小胞の 2 種類が存在し、それらにはそれぞれ固有の積み荷タンパク質が発現していた。この結果から、メラノーマエクソソームは、少なくとも 2 種類の物理学的性質の異なる小胞の集団であることが明らかとなり、これらの膜の性質が異なることが示唆された。

膜の性質は、その脂質組成によって大きく影響される。これまでに、エクソソームにはセラミドやコレステロールといった脂質が濃縮されていることが知られている^{1, 2)}。これらの脂質成分は、細胞膜に形成されるマイクロドメインにも濃縮される³⁾。生

化学的には、マイクロドメインは Triton X-100 のような非イオン性界面活性剤に不溶性を示す。この性質を利用し、メラノーマエクソソームがマイクロドメイン様の小胞であるかどうかを検証した。その結果、メラノーマエクソソームは Triton X-100 に可溶性(非マイクロドメイン様)と不溶性(マイクロドメイン様)の小胞から構成されること、また、それぞれの小胞には特有の積み荷タンパク質が発現することがわかった。興味深いことに、メラノーマエクソソームの機能に重要な Met はマイクロドメイン様の小胞に局限して選別されていたが、その選別にはコレステロールが必須であった。また、非マイクロドメイン様の小胞にはメラニン合成酵素が濃縮されていた。Met は細胞膜に発現する受容体で、エンドサイトーシスを受ける⁴⁾。一方、メラニン合成酵素はゴルジ体-エンドソーム経路を介してメラノソームに運ばれる⁵⁾。以上の結果から、メラノーマエクソソームは非マイクロドメイン様およびマイクロドメイン様の小胞の集団であり、それらの膜の起源が異なる可能性が示された。

Met を含む受容体型チロシンキナーゼは、未知の機構によって恒常的にシェディングを受け、機能を失った断片型タンパク質が生成されることが知られている⁶⁾。メラノーマエクソソームには、成熟型と断片型 Met の両方が観察されるが、メラノーマ細胞中には断片型 Met は検出されない。このことから、エクソソームは、シェディングを受けて機能を失った Met を効率的に細胞外に排出する機構の1つである可能性が示された。本研究では Adam10 がメラノーマエクソソームに発現することを明らかにしているが、このプロテアーゼは Met 抗体によって誘導される Met のシェディングの原因酵素として同定されている^{7,8)}。既報の通り、メラノーマ細胞の Adam10 を特異的な阻害剤で阻害しても、細胞に発現する Met の量は変化が見られなかった。一方、この阻害剤処理によって、メラノーマエクソソームに発現する Met が増加した。このことから、Adam10 はエクソソームに選別される運命にある Met の恒常的なシェディングに関与することがわかった。また、Adam10 阻害剤処理は、断片型 Met の量を大きくは減少させなかった。このことから、メラノーマ細胞中では、Adam10 非依存的な Met のシェディング機構が存在することが示された。

N 型糖鎖修飾は、タンパク質にプロテアーゼ抵抗性を付与することが知られている⁹⁾。本研究で、メラノーマエクソソームの N 型糖鎖構造解析の結果から、多くの固形癌に特徴的な β 1,6-*N*-acetylglucosamine 分岐を持った糖鎖が高発現していること、さらに Met がこの分岐型糖鎖によって修飾されていることが明らかになった。この糖鎖の分岐構造は、メラノーマ細胞で過剰発現されている Mgat5 糖転移酵素によって形成される。そこで、メラノーマエクソソームにおけるこの糖鎖修飾の機能を明らかにするため、メラノーマ細胞の Mgat5 を発現抑制した。その結果、メラノーマ細胞とエクソソームに発現する成熟型 Met の量が減少するとともに、シェディングを受けた断片型 Met の量が増加した。この結果から、Mgat5 の発現抑制は、Met のシェディングを亢進させることが明らかになった。この Mgat5 の発現抑制によって引き起こされるシェディングは、Adam10 非依存的であった。以上の結果から、Mgat5 による糖鎖修飾は、Met をシェディングから保護する機能を持つことが明らかになった。

(*In vivo*)

メラノーマエクソソームの取り込みを *in vivo* で可視化するため、既報のマウスシステムを導入した¹⁰⁾。まず、Cre リコンビナーゼを発現するマウスメラノーマ B16-F10 細胞を樹立し、この細胞から分泌されるエクソソームに Cre の mRNA が含まれていることを RT-PCR で確認した。次に、Cre⁺ B16-F10 細胞をレポーターマウス (loxP-停止コドン-loxP-TdTomato 蛍光タンパク質遺伝子) の皮下に移植し、二週間後に腫瘍と各臓器においてメラノーマエクソソームを取り込んだ細胞を観察した。その結果、大部分の TdTomato 陽性の宿主細胞は、腫瘍内に検出された。次に、蛍光免疫細胞染色法によってエクソソームを取り込んだ宿主細胞を解析した結果、Cd45 陽性または陰性の細胞が混在していた。また、F4/80 陽性のマクロファージも存在した。一方、Sca1 や Tie2 などの前駆細胞マーカーで染色される TdTomato 陽性細胞は検出されなかった。

上述の *in vitro* の解析の通り、B16-F10 細胞に高発現している Mgat5 はメラノーマエクソソームの機能に重要である。そこで、Mgat5 の機能をアンタゴナイズする Mgat3 糖転移酵素¹¹⁾を過剰発現する Cre 陽性 B16-F10 細胞を樹立し、レポーターマウスの皮下に移植した。その結果、Mgat3 の発現に関わらず、腫瘍内に存在する TdTomato 陽性細胞の数や種類に大きな変化は観察されなかった。

【考 察】

以上の結果から、メラノーマ細胞から分泌されるエクソソームは、特有の糖タンパク質シグナチャーを有する非マイクロドメイン様およびマイクロドメイン様の小胞の集団であり、その形成には全く異なる膜ドメインが関与していた。これら 2 つの膜の

性質の違いは、それらの起源となる膜やその輸送経路を反映している可能性がある。この概念は、Met は細胞膜に発現する受容体でエンドサイトーシスを受けるが、メラニン合成酵素はゴルジ体-エンドソーム経路を介してメラノソームに運ばれるという事実によって裏付けられる。いずれにせよ、これら 2 つの輸送経路はエンドソームで交差するが、それぞれの積み荷タンパク質が互いに入り乱れることはない。このことから、膜ドメインの組織化が、エクソソームの形成に重要であることを示している。さらに、コレステロールは Met のマイクロドメイン様小胞への選別に重要である一方、N 型糖鎖修飾は Met をシェディングから保護し、その機能性を担保するのに必要であった。以上のメラノーマエクソソームの *in vitro* 解析から、膜の組織化と N 型糖鎖修飾は、互いに協調して、機能的に重要なメラノーマエクソソームの分泌を担保していることが明らかになった。

メラノーマエクソソームの *in vivo* 解析から、今回用いた実験系では N 型糖鎖修飾はエクソソームの取り込みには影響しないことが判明した。本研究では、Mgat5 が形成する分岐型糖鎖に着目してエクソソームの取り込みの解析を行ったが、糖鎖がエクソソームの取り込みに重要であることは知られており¹²⁾、今後、別の糖転移酵素や糖鎖構造に着目してエクソソームの取り込みを解析する必要があることがわかった。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、メラノーマ細胞が分泌するエクソソームの不均一性を徹底的に解析し、世界で初めてエクソソームの不均一性が生まれる機構を明らかにすることができた。メラノーマエクソソームは不均一でありながらも、個々の小胞には特定の膜タンパク質が発現しており、その発現パターンは膜の組織化とその輸送経路によって厳密に制御されていた。以上の発見は、これまで見過ごされていた癌エクソソームの微小不均一性の解明を加速するものであり、今後、特定のエクソソームにターゲットを絞った疾患バイオマーカーの探索や、新たな癌治療法の提案、創薬に貢献できると期待される。

【参考・引用文献】

1. C. Subra, K. Laulagnier, B. Perret, M. Record, Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* **89**, 205-212 (2007).
2. H. Kalra, G. P. Drummen, S. Mathivanan, Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* **17**, 170 (2016).
3. K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39 (2000).
4. L. K. Goh, A. Sorkin, Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a017459 (2013).
5. G. E. Costin, J. C. Valencia, W. D. Vieira, M. L. Lamoreux, V. J. Hearing, Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci* **116**, 3203-3212 (2003).
6. M. Prat *et al.*, C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **11**, 5954-5962 (1991).
7. F. Schelter *et al.*, A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J Biol Chem* **285**, 26335-26340 (2010).
8. L. Trusolino, A. Bertotti, P. M. Comoglio, MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 834-848 (2010).
9. P. Agrawal *et al.*, A Systems Biology Approach Identifies FUT8 as a Driver of Melanoma Metastasis. *Cancer Cell* **31**, 804-819 e807 (2017).
10. A. Zomer *et al.*, In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* **161**, 1046-1057 (2015).
11. M. Yoshimura, A. Nishikawa, Y. Ihara, S. Taniguchi, N. Taniguchi, Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8754-8758 (1995).
12. H. C. Christianson, K. J. Svensson, T. H. van Kuppevelt, J. P. Li, M. Belting, Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**,

17380-17385 (2013).