2023 年度 一般財団法人杉山産業化学研究所研究助成　報告書

京都大学大学院生命科学研究科
南 璡旼

【研究題目】

がん微小環境のリモデリングを介した放射線治療抵抗性の分子メカニズムの解明

【はじめに】

細胞は脂質やタンパク質等の物質を運搬する小胞輸送機構により、様々な因子を細胞外に分泌する。これまでに、放射線などの刺激に応答して、がん細胞が分泌因子の発現と分泌を亢進し、細胞外コミュニケーションを介してがん細胞の生存・浸潤・転移に有利なように微小環境をリモデリングすることを報告してきた。国内外の研究でも、がんの悪性化や治療抵抗性において、細胞を取り巻くがん微小環境のリモデリングが深く関わっていることが報告されてきている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは解明されてない。このことが、がん完治を妨げる障壁の一つとなっているため、がん微小環境のリモデリングを誘導するメカニズムの全容解明が期待される。本研究では、がん細胞により分泌される因子を介した周辺細胞とのコミュニケーションを理解するため、分泌因子の一つとして細胞外小胞に着目し、細胞外小胞システムの構築を目指した。

【方法と結果】

がん微小環境のリモデリングには、細胞から放出される様々な分泌因子を介した細胞外コミュニケーションが深く関与する。細胞外コミュニケーションをモニターするため、分泌因子の一つである細胞外小胞（EV: extracellular vesicle）の新しいシステムを構築することを試みた。その最初のアプローチとして、Perfringolysin O 由来のコレステロールに結合する D4 ドメインを用いて、目的とするタンパク質 （POI: protein of interest）を細胞外小胞の膜に集積させた（図１）。

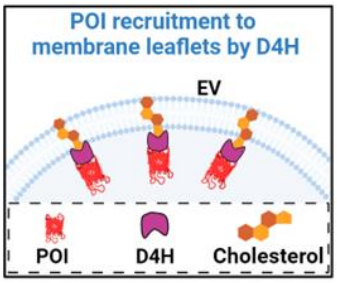

図 1. D4-EV のモデル

1. D4 ドメインによる POI の EV への集積

D4H（D434S 変異を含む D4 ドメイン）を用いて、POI を EV の膜に集積させるプラットフォームの確立を試みた。POI のモデルとして、赤色蛍光タンパク質（RFP：red fluorescent protein）を D4H に融合させた。一過性トランスフェクションにより、TagRFP-D4H を４種類の細胞株（HEK-293T, U87MG, MDA-MB-231, SNU-449）で発現させたのち、EV を単離し、TagRFP-D4H の EV への集積をウェスタンブロットにより検討した。

TagRFP-D4H が各細胞株の EV に存在することを確認できた（図 2）。

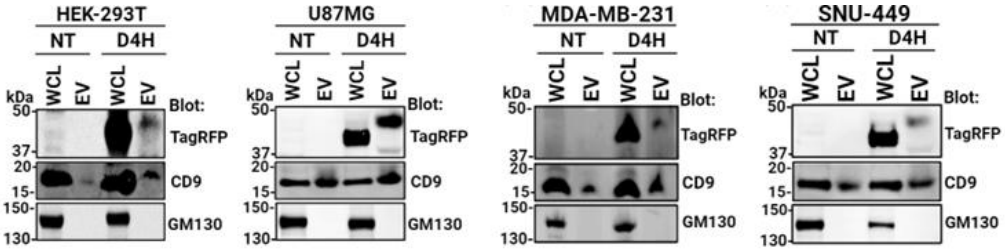

図 2. EV における RFP-D4 の確認

2. D4-EV の細胞内への取り込みと EV の内容物の放出

ドナー細胞から分泌される EV は、レシピエント細胞の細胞内に取り込まれる。がん細胞から分泌される D4-EV がレシピエント細胞（MDA-MB-231）に取り込まれることを確認する実験を行った。単離した D4-EV をレシピエント細胞と培養したのち、初期エンドソームのマーカータンパク質（EEA1, Rab5）と一緒に免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、D4-EV による赤色蛍光がレシピエント細胞のエンドソームに蓄積していることを確認できた。さらに、D4-EV がレシピエント細胞内に取り込まれたのち、EV 内の POI が細胞内で放出されるかを検証した。NanoKAZ/Nano Luc luciferase の発光システムを用いた実験結果から、EV の内容物である POI が、レシピエント細胞内で放出されることが示唆された。

【まとめ】

本研究では、がん微小環境のリモデリングを制御する細胞外コミュニケーションを明らかにするためのアプローチとして、細胞外小胞（D4-EV）の新しいシステムを構築した。今後、本研究により確立された D4-EV システムは、細胞間コミュニケーションの解析に幅広く応用することができる。さらに、様々な POI タンパク質を融合させた D4-EV を活用することで、分泌因子による細胞外コミュニケーションを介したがん微小環境のリモデリングおよび治療耐性のメカニズム解明が期待される。

【論文発表】

Opadele AE, Nishioka S, Wu PH, Le QT, Shirato H, Nam JM*, Onodera Y*. The lipid-binding D4 domain of perfringolysin O facilitates the active loading of exogenous cargo into extracellular vesicles. ***FEBS Letters***. 2024 Feb;598(4):446-456.

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多くのご支援をいただきました杉山産業化学研究所ならびに関係のみなさまに心よりお礼を申し上げます。