

●エクソソームへのEGFおよびサポリンの共内包化は癌細胞に対する細胞毒性を増強する

Co-encapsulation of EGF and saporin in exosomes enhances cytotoxicity against cancer cells

小林 菜穂子、吉田 徹彦

Nahoko Kobayashi, Tetsuhiko Yoshida

Keywords : exosome, cancer cells, saporin, EGF (epidermal growth factor)

1 緒言

脂質小胞のエクソソーム（約30~100 nm）は、生体を構成するほとんどの細胞から分泌され、周辺細胞によって取り込まれる。エクソソームにはmiRNAや生理活性タンパク質など細胞機能を制御する分子が内包されており、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を持つ。一方、エクソソームの細胞内取り込みにおいて、受容体を介したクラスリン依存的エンドサイトーシス、およびアクチン細胞骨格依存的に細胞外の栄養素を取り込むマクロピノサイトーシスの関与が報告されているが、詳細な機序に関していまだに解明されていない。

我々は、先の研究において、マクロピノサイトーシス誘導受容体EGFR (epidermal growth factor receptor) をそのリガンドであるEGF (epidermal growth factor) の投与により活性化させることで、癌細胞によるエクソソームの取り込み効率が増強されることを見出している。また、マクロピノサイトーシス誘起を利用して、抗癌活性を有するサポリンを内包させたエクソソームにより効果的に癌細胞死を誘導することに成功している¹⁾。

本稿においては、マクロピノサイトーシス誘導受容体を活性化させるEGFを、抗癌活性タンパク質サポリンと共にエクソソーム内に共内包化させて抗癌活性を評価した。その結果、驚くべきことに、エクソソームへのEGFとサポリンとの共内包化は、癌細胞であるA431細胞（ヒト上皮様細胞癌由来）に対する細胞毒性を顕著に増強することを見出した。

2 結果

組織や細胞の修復にとって特定の場所へのEGF送達は、様々な細胞機能を制御および作動させる細胞増殖因子療法として非常に重要な技術である^{2,3)}。Marquezらは、損傷したラット歯槽骨の骨治癒過程においてEGFを内包化したリポソームを与えることで損傷からのより迅速な回復がもたらされたことから、EGF送達にリポソームを利用することができると報告した⁴⁾。EGFはエンドサイトーシスを介して細胞内へ取り込まれた後、エキソサイトーシスによってリサイクル

される⁵⁾。それ故、EGF内包化リポソームが細胞内に取り込まれた後、リポソームからEGFを放出し、エキソサイトーシスによって細胞から分泌されたEGFが細胞膜上のEGFRを活性化すると考えられる。我々は、エクソソームに内包化されたEGFが細胞内へ取り込まれた後エキソサイトーシスによって細胞外へ放出され、その後リサイクルされたEGFはEGFRの活性化を導くことでマクロピノサイトーシス経路を促進し、それによって細胞によるエクソソーム取り込みが増強されると仮説を立て、検証した。

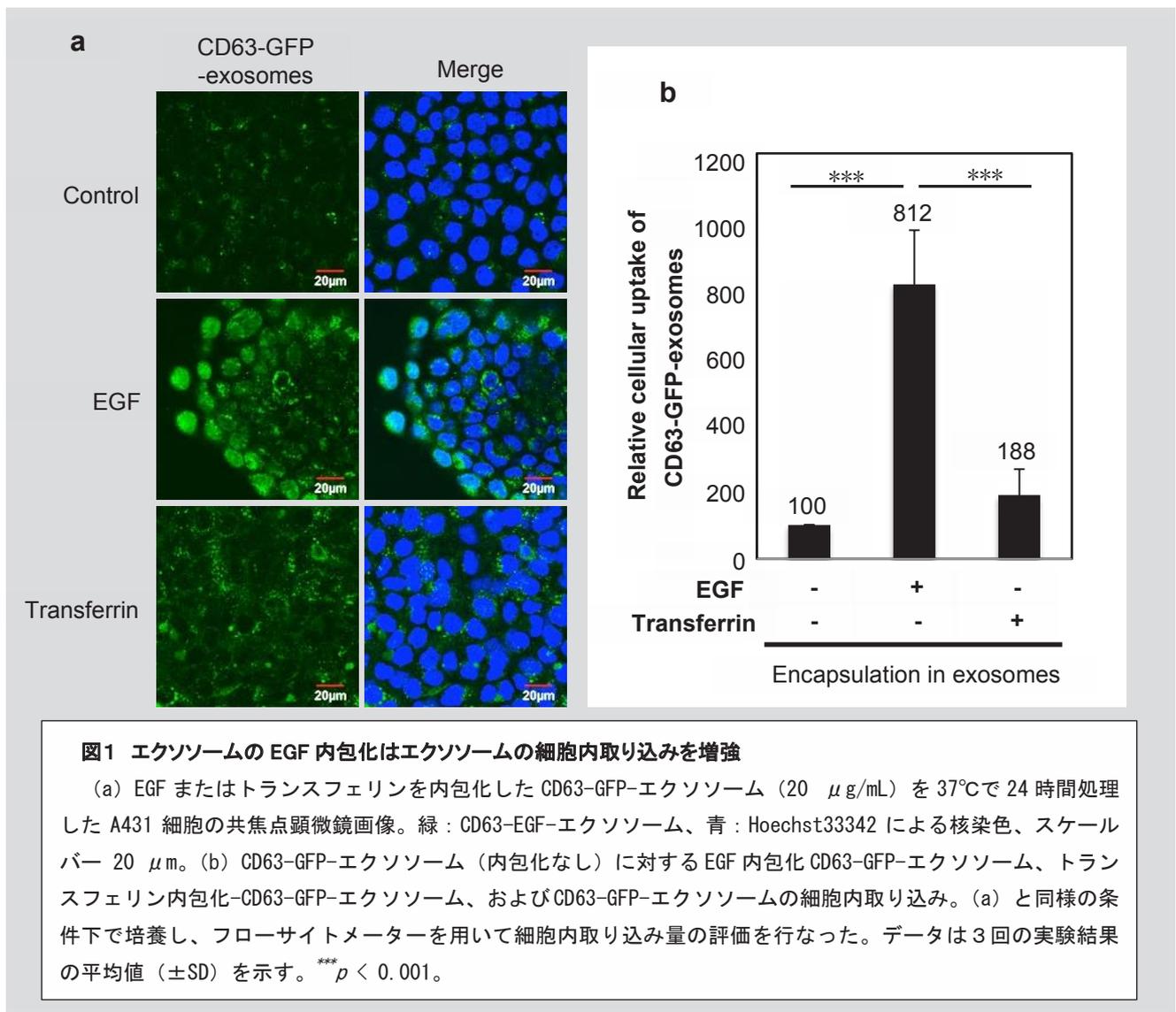
まず、エクソソームの細胞内取り込みをトレースするために、GFP（蛍光タンパク質）を融合したCD63タンパク質を膜上に有するエクソソームを安定発現するHeLa細胞（ヒト子宮頸癌）を作製し、GFP融合CD63発現エクソソーム（CD63-GFP-exosomes）を回収した。その後、エレクトロポレーション法を用いてEGFをCD63-GFP-exosomesに内包化し、A431細胞に対するEGF内包化エクソソームの細胞内取り込みを評価した。また、同様の方法を用いて、クラスリン介在性のエンドサイトーシスを利用しFe（III）の細胞内取り込みを誘導することで知られるトランスフェリンをCD63-GFP-exosomesに内包化し、トランスフェリン内包化エクソソームのA431細胞に対する細胞内取り込みを比較評価した。

2.1 EGF内包化はエクソソームの細胞内取り込み効力を向上する

図1は、EGFを内包化したCD63-GFP発現エクソソーム（EGF-CD63-GFP-exosomes）またはトランスフェリンを内包化したCD63-GFP発現エクソソーム（Transferrin-CD63-GFP-exosomes）各々20 μg/mLを37°Cで24時間処理したA431細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像を示している。細胞内に内在するEGF-CD63-GFP-exosomesおよびTransferrin-CD63-GFP-exosomesの最大蛍光強度を、内包化していないCD63-GFP-

東亜合成株式会社 先端科学研究所

Institute for Advanced Sciences, Toagosei Co., Ltd.



exosomes (コントロール) と比較観察した (図 1 a)。その結果、EGF-CD63-GFP-exosomes および Transferrin-CD63-GFP-exosomes はコントロールに比べて優位に細胞内へ取り込まれており、EGF-CD63-GFP-exosomes は細胞内において特に高い蛍光シグナルが見られた。更に、フローサイトメーターを用いて各エクソソームの細胞内取り込み量を評価したところ、EGF-CD63-GFP-exosomes で処理した細胞はコントロールに対して約 8 倍の細胞内取り込み量であることが示された。一方で、トランスフェリン内包化はエクソソームの細胞内取り込みを僅かに増加させた (図 1 b)。以上の結果により、EGF 内包化がエクソソームの細胞内取り込みを増強することが明らかとなった。EGF 内包化はエクソソームの細胞内取り込みに著しく高い影響を与えることから、このシンプルな技術はターゲットとする細胞によるエクソソーム取り込みを活性化するために大変有効であることが示唆された。

2.2 エクソソームへのEGFとサポリンの共内包化は、サポリンの細胞毒性を増強する

EGF 内包化の技術を応用し、エクソソームを介して抗癌活性タンパク質サポリンの細胞内送達を行い、癌細胞に与える影響を解析した。その結果を図 2 に示している。EGF 存在下または非存在下でエレクトロポレーションを行い、サポリンおよび EGF を共内包するエクソソーム (saporin-EGF-exosomes)、およびサポリンのみ内包するエクソソーム (saporin-exosomes) を作製した。図 2 a は、saporin-exosome または saporin-EGF-exosomes (0.4, 4, 20 μg/mL) を 10% FBS 含有培地に添加し 37°C で 72 時間処理した A431 細胞の顕微鏡画像を示している。驚くべきことに、saporin-EGF-exosomes は、低濃度 (0.4 μg/mL) で有意なレベルの細胞死をもたらした (図 1 a)。一方、saporin-exosomes は 0.4 μg/mL および 4 μg/mL において、A431 細胞の形態学変化を誘導することなく、高濃度 (20 μg/mL) において A431 細胞の細胞増殖を抑制した (図 1 a)。また、同様の培養条件で WST-1 アッセイを行い、細胞生存率を評価した。その結果、saporin-EGF-exosomes は、低濃度 (0.4 μg/mL) において A431 細胞の生存率を抑制したことから、EGF およびサポリンの共内包化

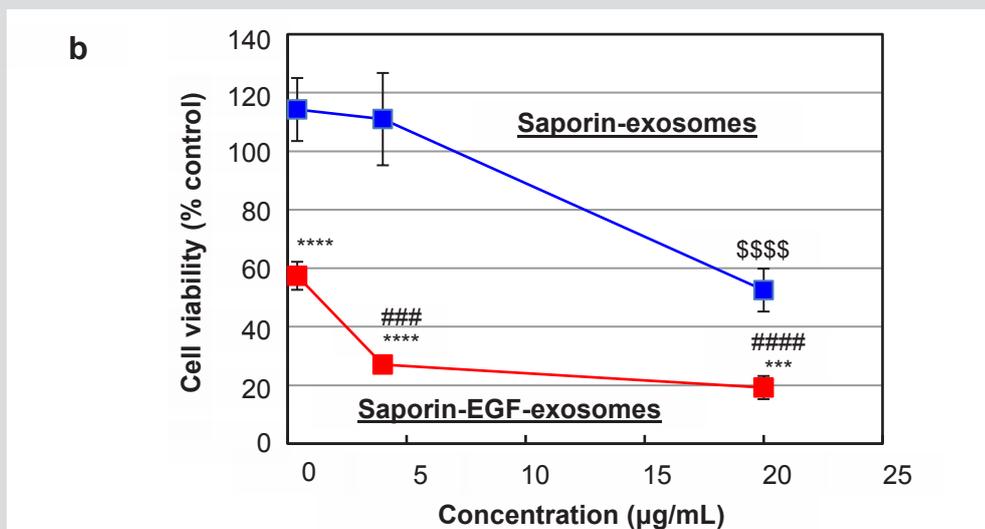
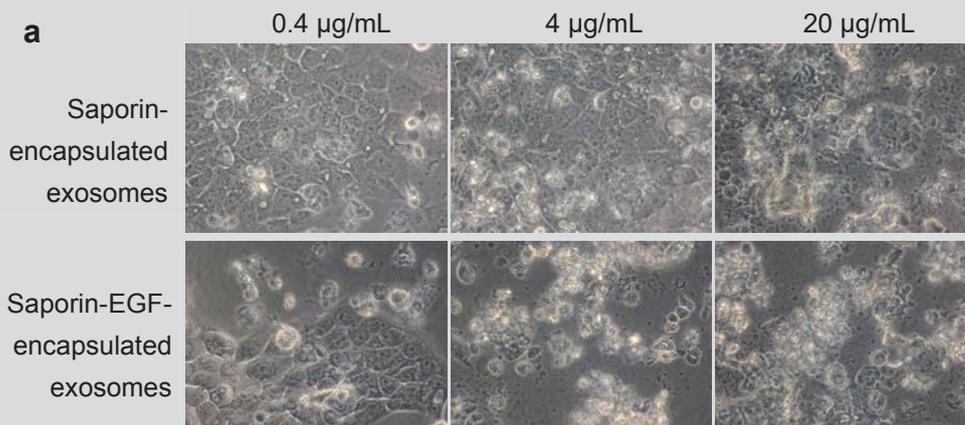


図2 サポリン-EGF 内包化エクソソームの細胞毒性の効果

(a) サポリン内包化、又はサポリン-EGF 内包化エクソソーム (0.4、4、20 $\mu\text{g/mL}$) を10% FBS 含有培地に添加し、37°Cで72時間処理したA431細胞の顕微鏡画像。(b) WST-1アッセイによる細胞生存率の評価。サポリン内包化エクソソーム (青)、サポリン-EGF 内包化エクソソーム (赤) (0.4、4、20 $\mu\text{g/mL}$)。 (a)と同様の条件下で培養し、データは4回の実験結果の平均値 ($\pm\text{SD}$)を示す。*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 対サポリン内包化エクソソーム。**** $p < 0.0001$ 対0.4 $\mu\text{g/mL}$ サポリン内包化エクソソーム、### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ 対0.4 $\mu\text{g/mL}$ サポリン-EGF 内包化エクソソーム。

は、内包化したサポリンの細胞毒性を効果的に増強することが示された (図2b)。以上の結果は、図1で示したEGF内包化がエクソソームの細胞内取り込みを促進するという知見をサポートするものである。また、このシンプルな技術は、標的細胞内へ生体機能分子などの治療用分子を送達するために、非常に有効な方法であると考えられる。

3 実験方法

3.1 細胞培養

ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞は理化学研究所バイオリソース研究センター (Tsukuba, Ibaraki)、ヒト上皮様細胞癌由来A431細胞はAmerica Type Culture Collection (ATCC、Manassas, VA, USA) から入手した。培地は、HeLa細胞の培

養には、10% 熱非働化ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS ; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 含有minimum essential medium α (αMEM ; Gibco, Life Technologies) を、A431細胞の培養には、10% FBS含有minimum essential medium (MEM; Gibco, Life Technologies) を用いた。各々の細胞は、100 mm-ディッシュ上で37°C、5% CO_2 環境下で培養した。

3.2 緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein, GFP) 融合CD63を安定発現するHeLa細胞の作製

Tetraspanin CD63は膜貫通タンパク質の一つであり、エクソソーム膜のマーカータンパク質として知られている。エクソソームの局在をトレースすることを目的に、CD63-GFPを有

するエクソソーム (CD63-GFP-exosomes) を得るため、GFP融合CD63タンパク質を安定発現するHeLa細胞を作製した。HeLa細胞 (4.7×10^4 cells) を24穴プレート (Iwaki, AGC, Tokyo) に播種し、1日培養した。その後、10% FBS含有 α MEM培地 (200 μ L) にて、リポフェクタミンLTX試薬 (2 μ L) およびPLUS試薬 (1 μ L; Invitrogen, Life Technologies) を用いて、CD63-GFPプラスミド (pCT-CD63-GFP, pCMV, Cyto-Tracer, System Biosciences, Mountain View, CA, USA; 800 ng) をトランスフェクションした。細胞は、ピューロマイシン (3 μ g/mL; LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA) 処理によりCD63-GFPを安定発現するHeLa細胞株を選抜した。

3.3 共焦点レーザー顕微鏡

細胞 (2×10^5 cells, 2 mL) を35-mm ガラスベースディッシュ (Iwaki) へ播種し、37°Cおよび5% CO₂環境下で24時間培養した。細胞が底面へ接着した後増殖培地で洗浄 (1 mL, 3回) し、ヒトEGF (Sigma-Aldrich; 200 μ L/well) の存在下または非存在下においてエクソソーム試料で処理した。細胞は、Hoechst 33342 (Invitrogen; 5 μ g/mL) を37°Cで15分処理し、洗浄した。細胞を新鮮な増殖培地にて洗浄 (1 mL, 3回) し、細胞を固定化することなくV1200共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo) を用いて40 \times 対物レンズにて観察した。

3.4 フローサイトメトリー

細胞 (4.7×10^4 cells, 1 mL) を24穴プレート (Iwaki) へ播種し、37°Cおよび5% CO₂環境下で24時間培養した。細胞が底面へ接着した後、増殖培地で洗浄 (1 mL, 3回) し、エクソソーム試料で処理した。その後、PBSで洗浄 (200 μ L, 3回) し、トリプシン (0.1 g/L) - ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 0.11 mmol/L; Nacalai Tesque; 200 μ L/well) で37°C、10分間処理し、PBS (200 μ L) を加えて細胞を回収し、3,000 rpm (800 \times g)、4°Cで3分間遠心した。上清を取り除き、細胞をPBS (400 μ L) で洗浄した後、3,000 rpm (800 \times g)、4°Cで3分間遠心した。この洗浄作業を再度繰り返した後、細胞をPBS (400 μ L) に懸濁し、Guava EasyCyte (Merck Millipore, Billerica MA, USA) フローサイトメーター (488 nm laser excitation, 525 nm emission filter) を用いて、Forward scatterおよびSide scatterを基に生存細胞 (10,000 cells/sample) を検出し、解析した。

3.5 エクソソームへのタンパク質内包化

CD63-GFP-exosomes (25 μ g) とサポリン (50 μ g) をPBS

(100 μ L) 上で混合し、NEPA21 Type II (NEPA genes, Tokyo) を用いてエレクトロポレーション (1cm-エレクトロポレーションキュベット、室温、Poring pulse: twice pulse (5秒間)、transferpulse: five pulse (20 V, 50秒間)) を行い、エクソソームにサポリン (saporin from *Saponaria officinalis* seeds, Sigma-Aldrich) を導入した。内包されなかったタンパク質は、Amicon Ultra遠心フィルターによる遠心および洗浄 (100 K device, Merck Millipore; 500 μ L PBS, 18,000 \times g, 4°C, 10分間, 3回) をすることで除去した。サポリンおよびヒトEGFを内包化するには、エレクトロポレーションの前にサポリンおよびCD63-GFP-exosomesへEGF (25 μ g) を添加した。

3.6 細胞生存率(WST-1アッセイ)

4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1) アッセイ⁶⁾ を用いて細胞生存率を評価した。細胞 (1×10^4 cells, 100 μ L) を96穴プレート上で37°Cおよび5% CO₂環境下で24時間培養した後、エクソソーム試料 (50 μ L) で処理した。その後、各穴にWST-1試薬 (10 μ L) を添加し、37°Cで45分間インキュベートし、450 nm (A₄₅₀) および620 nm (A₆₂₀) における吸光度を測定し、A₄₅₀の測定値からA₆₂₀の測定値を差し引いて生存細胞数を算出した。

4 おわりに

我々の方法は、エクソソーム膜を人工的に改変することなく、EGFを共内包化させたエクソソームを用いて、細胞内へ治療用分子を効率よく送達することを可能にした。エクソソーム膜タンパク質および脂質の共有結合修飾 (例えば、化学リンカーとの結合など) はそれらの生物学的機能に影響を与える可能性がある。そのためエクソソームへのEGF内包化技術は、エクソソーム膜環境を維持するためにも有益な方法と考える。EGFとサポリンのエクソソームへの共内包化は、A431細胞に対する細胞毒性の顕著な増強を示した。エクソソームに生体機能分子などの治療用分子と共にEGFを共内包化させる本方法は、エクソソームの積極的な癌細胞取り込み経路を利用した薬物送達応用など、疾病診断や治療技術開発への貢献が期待される。

5 謝辞

本研究は、大阪府立大学大学院理学研究科中瀬生彦教授、武庫川女子大学薬学部中瀬朋夏教授との共同研究である。ここに感謝の意を表します。

6 参考文献

- 1) I. Nakase, N. B. Kobayashi, T. Nakatani-Nakase & T. Yoshida, *Scientific Reports*. **5**, 10300 (2015).
- 2) V. Luginbuehl, L. Meinel, H. P. Merkel & B. Gander, *Eur. J. Pharm. Biopharma*. **58**, 197 (2004).
- 3) J. B. Alves, C. L. Ferreira, A.F. Martins, G. A. Silva, G. D. Alves, T. P. Paulino, P. Ciancaglini, G. Jr. Thedei & M. H. Napimoga, et al., *Life Sci*. **85**, 693 (2009).
- 4) L. Marquez, F. A. Mauad de Abreu, C. L. Ferreira, G. D. Alves, M. N. Miziara, J. B. Alves, *Injury* **44**, 558 (2013).
- 5) A. Sorkin & J. E. Duex, *Curr. Protoc Cell Biol*. Chapter 15, Unit 15.14 (2010).
- 6) I. Nakase, S. Okumura, S. Katayama, H. Hirose S. Pujals, H. Yamaguchi, S. Arakawa, S. Shimizub & S. Futaki, *Chem. Commun*. **48**, 11097 (2012).