

がんの悪性化因子としての内皮間葉移行（EndMT）の分子機序の解明

## 《研究の概要》

がん微小環境は細胞をはじめとして、腫瘍血管やがん関連線維芽細胞（cancer associated fibroblast: CAF）などの様々な種類の間質細胞から構成され、その性質は構成細胞が産生する様々なサイトカインによるネットワークにより規定される。特にがん細胞や炎症細胞が産生する TGF- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$ ）は、がん細胞の上皮間葉移行（EMT: epithelial-to-mesenchymal transition）を誘導することで、がん細胞の浸潤・転移を引き起こすことが知られている。また、近年、がんの悪性を促すことが示されている CAF の形成機序として血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化転換する内皮間葉移行（EndMT: endothelial-to-mesenchymal transition）という現象が報告された。福原、渡部、吉松はこれまで TGF- $\beta$  シグナルにより血管内皮細胞が間葉系細胞の性質を獲得することを報告してきた。一方、高橋らは、加齢の過程で生体内に蓄積する老化細胞が、がんの発症や悪性化に関与する炎症性蛋白質（SASP 因子: Senescence-associated secretory phenotype 因子）を高発現する分子機構を報告してきた。しかし、EndMT を介して生成した間葉系細胞がどのような表面抗原を発現しているか、TGF- $\beta$  による EndMT の誘導がどのように制御されるか、そして SASP 因子は EndMT の誘導に関与しているかについては未解明な部分が多く残されていた。そこで本研究においては「がん微小環境において分泌される TGF- $\beta$  などのサイトカインや細胞老化に関与する SASP 因子が腫瘍血管内皮細胞の EndMT を誘導して、がんの悪性化因子である CAF の生成に重要な役割を果たす」という仮説に基づいて、がんの新たな治療標的である EndMT の誘導を調節する因子の同定を試みた。

本研究の成果として、EndMT の誘導に伴って発現が変動する新規細胞表面マーカーとして CD321 を同定した。CD321 蛋白質は、腫瘍組織の特性であり EndMT を誘導する低酸素状態において細胞内に内在化するという興味深い性質を有することが明らかとなった。また、腫瘍組織において豊富に存在する TGF- $\beta$  による EndMT の誘導が、腫瘍血管内皮細胞において発現する FGF2（fibroblast growth factor2）により抑制されることを見出した。FGF2 シグナルは Elk1 転写因子を活性化することで、TGF- $\beta$  による発現が上昇する EndMT 誘導転写因子 MRTF-A の作用を阻害することが明らかとなった。さらに、老化細胞が分泌するエクソソームは、がん細胞の増殖性を亢進させる SASP 因子として機能することを見出した。老化細胞由来のエクソソームは EMT を誘導する Ephrin-A2 を多く含むことから、EndMT の誘導に関与することが示唆された。

CAF の 30~40% が血管内皮細胞由来であるという報告もあり、がんをがん細胞のみならず、間質も標的として多角的に攻略するために、本研究で得られた EndMT の分子機序の解明は重要な意義を持つ。また、EndMT は心疾患や糖尿病に伴う組織の線維化にも重要な役割を果たしており、本研究で得られた成果が関連疾患の新規治療法の開発につながることが期待される。

福原 武志 順天堂大学医学部 研究の統括と遂行  
神経学 准教授  
旧所属 順天堂大学大学院医学部研究科  
(~2016年9月) 神経難病治療開発講座 准教授  
旧所属 東京薬科大学生命科学部  
(~2015年12月) 腫瘍医科学 助教

## 研究報告

### I 研究目的

がん微小環境における細胞間相互作用を明らかにすることは、がん治療における新たな分子標的の同定に重要である。がん間質の中でも血管内皮細胞は腫瘍の増大に大きな役割を果たすことがよく知られているが、近年がん転移や薬剤透過性による薬剤抵抗性にも関与することも明らかとなっている。特に腫瘍血管の分子特性についてその一部が明らかにされ、がん悪性化に関わるとして知られる上皮間葉転換と同様に、TGF- $\beta$  シグナルにより内皮間葉転換 (EndMT: Endothelial to Mesenchymal Transition) を生じることが明らかとなり、血管脆弱性やそれにともなうがん細胞の転移を惹起すると考えられている。

本研究では、血管内皮細胞が TGF- $\beta$  刺激により EndMT を惹起する *in vitro* 細胞モデルを利用して、EndMT の前後で発現変動する細胞表面分子を同定することを目指した。細胞表面マーカーを認識する複数の抗体を作成することで、EndMT の細胞系譜や分化段階を分子的に明らかにすることが可能となる。そこで細胞表面分子に特化した包括的な解析は未だないことに着目し、モデル血管内皮細胞および EndMT 誘導細胞を免疫原としたモノクローナル抗体ライブラリーを用いてディファレンシャルスクリーニングにより有益な抗体を探索することとした。

### II 研究計画及び材料と方法

1. 機能性抗体の探索：血管内皮細胞 (MS1) は TGF- $\beta$  処理によって間葉系細胞へ分化させた細胞 (EndMT-MS1) に誘導可能である (Mihi *et al.*, J Biochem, 2012)。EndMT にともない細胞形態は敷石状から紡錘形へ変化し、間葉系細胞マーカーである PIE-1 や SMA の発現が確認された。MS1 または EndMT-MS1 細胞を Swiss Rat に複数回腹腔免疫し、その脾臓をミエローマ NS0<sup>be12</sup> 細胞 (Ray and Diamond, PNAS, 1994) と細胞融合を行い HAT 選抜した。ハイブリドーマの培養上清を用いて (1) flowcytometry 解析および (2) DT3C イムノトキシンアッセイ (後述) により選抜を行うとともに限界希釈を行い、ハイブリドーマをクローン化した。
2. 抗体スクリーニング：イムノトキシンアッセイは、ハイブリドーマ培養上清に含まれる抗体と毒素の免疫複合体によるイムノトキシンを *in vitro* で形成させ標的細胞への薬物送達能を指標に抗体を選抜する方法である。イムノトキシンアッセイでは抗原抗体からなる免疫複合体が細胞内に内在化される活性を、殺細胞率として選抜することが可能となった (Yamaguchi *et al.*, BBRC, 2015)。この選抜プローブ DT3C は、受容体結合ドメインを欠損した改変型ジフテリア毒素と抗体 Fc 結合ドメインを遺伝子工学的に融合した組換え蛋白質として調製可能である。作動原理としては、抗体抗原ならびに DT3C か

らなる複合体が細胞内へ（例えばエンドサイトーシスにより）内在化され、さらに translocation domain を介して DT 触媒ドメインが移行すると、触媒ドメインが翻訳因子 EF-2 を ADP リボシル化して不活化する。これにより細胞死が誘導される。

3. 抗原の決定：有望と見られる抗体を用いて細胞の蛋白質抽出液から抗原候補を免疫沈降する。事前に Sulfo-NHS-Biotin 試薬による細胞表面の蛋白質をビオチン化しておく、少ない蛋白質量で高感度に抗原候補を HRP 架橋したストレプトアビジンで標識することでイムブロットティングにより検出することが可能である。また分子量あるいはバンドパターンから、抗原を大まかに区分することが可能であり効率よく異なる抗原を認識する抗体を解析することが可能である。検出されたバンドをトリプシン消化した後 LC-MS/MS によってペプチド配列を決定し、データベースから候補蛋白質を決定した。確認のために当該抗原候補の cDNA を CHO 細胞に発現させ、抗体反応性を検討することで、抗原の確証を得た。

### III 研究成果

モノクローナル抗体を産生する約 120 種類のハイブリドーマを樹立した。これらを抗体ライブラリーとし、様々な状態にある血管内皮細胞に対してフローサイトメトリー解析とイムノトキシンアッセイにより類似の作用機序を持つと考えられる抗体群をクラスターリング解析により分別した。Sulfo-NHS-Biotin と免疫沈降を組み合わせる抗原候補を明らかにし、4 種類の抗体について抗原を同定した。なお、イムノトキシン活性を有しているがビオチン化された蛋白質のバンドがみられない抗体については、界面活性剤の変更あるいは糖鎖をビオチン化するなどして抗原の同定を進めている。90G4 抗体は様々な血管内皮細胞に反応し、またイムノトキシン活性を有する。90G4 抗体は CD321 を認識し、同じファミリーに属する CD322 や CD323 を認識しなかった（図 1）。

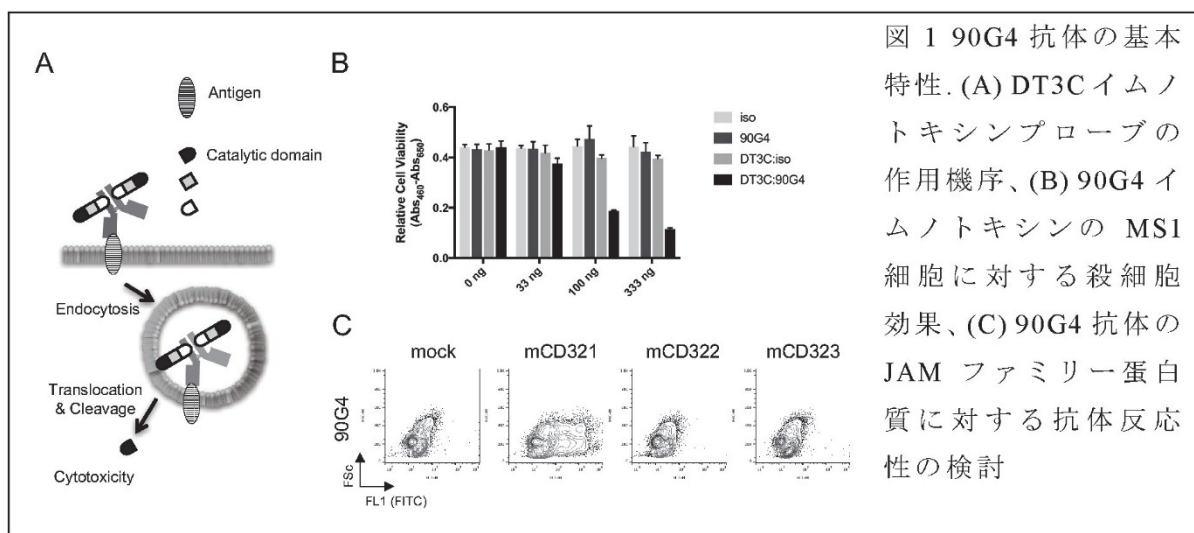


図 1 90G4 抗体の基本特性. (A) DT3C イムノトキシンプローブの作用機序、(B) 90G4 イムノトキシンの MS1 細胞に対する殺細胞効果、(C) 90G4 抗体の JAM ファミリー蛋白質に対する抗体反応性の検討

ライブイメージング解析から、90G4 イムノトキシンは接着時や遊走する内皮細胞に殺細胞効果を示すこと、また低酸素培養条件に曝露されるとタイトジャンクションから細胞内へ CD321 分子が顕著に内在化される結果を得た（図 2）。そのほかに樹立した抗体は、EndMT 前後で同程度に発現する CD34、または EndMT 後に消失する CD141 を認識することを明らかにした。

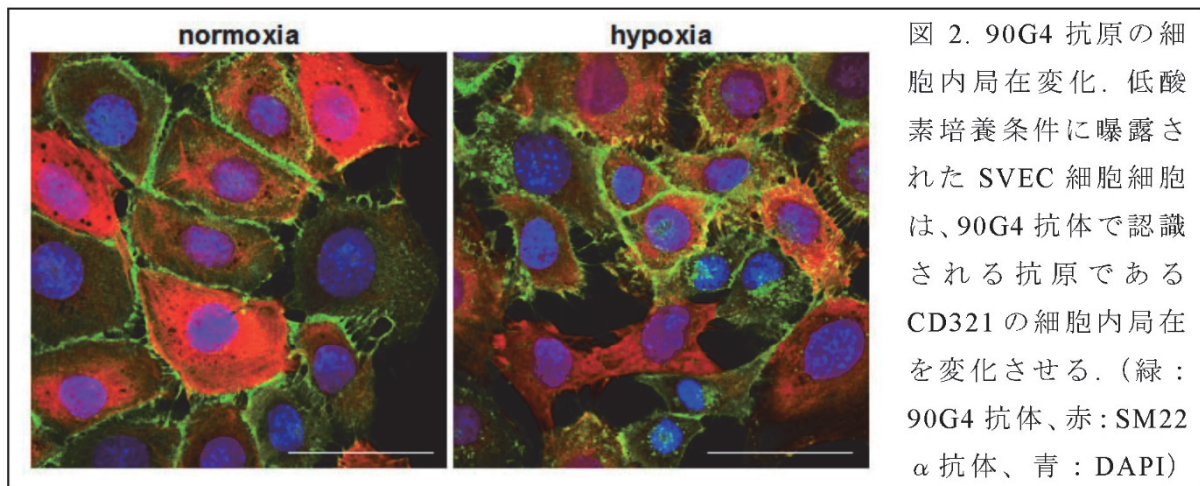


図 2. 90G4 抗原の細胞内局在変化. 低酸素培養条件に曝露された SVEC 細胞細胞は、90G4 抗体で認識される抗原である CD321 の細胞内局在を変化させる. (緑: 90G4 抗体、赤: SM22 $\alpha$  抗体、青: DAPI)

#### IV 考察

CD321 はタイトジャンクションに局在する蛋白質として知られるだけでなく、炎症や本研究で明らかとなった低酸素曝露などにより局在が変動する。また抹消血液内の免疫系細胞が組織内浸潤する最終段階に作用する分子としても知られている。腫瘍血管では炎症や血管新生が亢進していることから、CD321 は標的とした新しい分子標的となる可能性がある。特に本研究では、内在化活性を有する抗体を取得したことから抗腫瘍効果を導く薬物の送達を担うプラットフォームとしての活用が期待される。また、本研究で得られた複数の抗体を活用して様々な組織由来の血管内皮細胞株において発現レベルを確認している。将来的には、多種類の抗体を用いた多次元 FACS を行うことで、様々な病態モデルにおける内皮細胞の細胞表面分子の発現変動や、例えば EndMT 過程の多段階に渡ると想像される分子メカニズムを明らかにできるのではないかと考えられる。

#### V 研究成果の発表

1. **Fukuhara T**, KIM J, Hokaiwado S, Nawa M, Okamoto H, Kogiso T, Watabe T, Hattori N.  
A novel immunotoxin reveals a new role of CD321 in endothelial cells. (revised)
2. Muguruma k, Yakushiji F, Kawamata R, Akiyama D, Arima R, Shirasaka T, Kikkawa Y, Taguchi A, Takayama K, **Fukuhara T**, Watabe T, Ito Y, Hayashi Y, Novel Hybrid Compound of a Plinabulin Prodrug with an IgG Binding Peptide for Generating a Tumor Selective Noncovalent-Type Antibody-Drug Conjugate. *Bioconjugate Chemistry*. 27:1606-1613, 2016.
3. Shibata T, Uchida H, Shiroyama T, Okubo Y, Suzuki T, Ikeda H, Yamaguchi M, Miyagawa Y, **Fukuhara T** Cohen JB, Glorioso JC, Watabe T, Hamada H, Tahara H. Development of an oncolytic HSV vector fully retargeted specifically to cellular EpCAM for virus entry and cell-to-cell spread. *Gene Therapy*. 23(6) : 479-88. 2016.

渡部 徹郎 東京医科歯科大学歯学部 研究の遂行  
硬組織病態生化学 教授  
旧所属 東京薬科大学生命科学部  
腫瘍医科学 教授  
吉松 康裕 東京医科歯科大学歯学部 研究の遂行  
分子細胞機能学分野 助教  
旧所属 東京薬科大学生命科学部  
腫瘍医科学 助教

## 研究報告

### I 研究目的

がん微小環境の間質におけるがん関連線維芽細胞(CAF:cancer-associated fibroblasts)はがん細胞の悪性を促すことが示されているが、最近 CAF の形成機序として血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化転換する内皮間葉移行 (EndMT: endothelial-to-mesenchymal transition) という現象が報告された。我々はこれまで TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) シグナルにより血管内皮細胞が間葉系細胞の性質を獲得することを報告してきた (Kokubo *et al.*, J Cell Sci, 2008, Mihira *et al.*, J Biochem, 2012)。しかし、どのような分子機序で EndMT が誘導されるかについては未解明な部分が多く残されている。特に、がん微小環境に豊富に存在する TGF $\beta$  が EndMT を継続して誘導すると、血管内皮細胞の数が減少し、がん細胞の増殖に必須な腫瘍血管が消失してしまうのではないかと考えられる。以上の背景から本研究においては「腫瘍血管内皮細胞が自己分泌する因子が TGF- $\beta$  による EndMT の誘導に拮抗することで、がん微小環境における血管の恒常性を維持する」という仮説に基づいて、EndMT の誘導を調節する因子を同定し、その分子機序を明らかにすることを目的とした。

がんを悪性化する CAF の 30~40% が血管内皮細胞由来であるという報告もあり、がんを間質からも多角的に攻略するためには、新たな治療標的である EndMT の分子機序の解明は急務である。また、EndMT は心疾患や糖尿病に伴う組織の線維化にも重要な役割を果たしており、これらの疾患の患者数の多さを考えると本研究の意義は大きい。

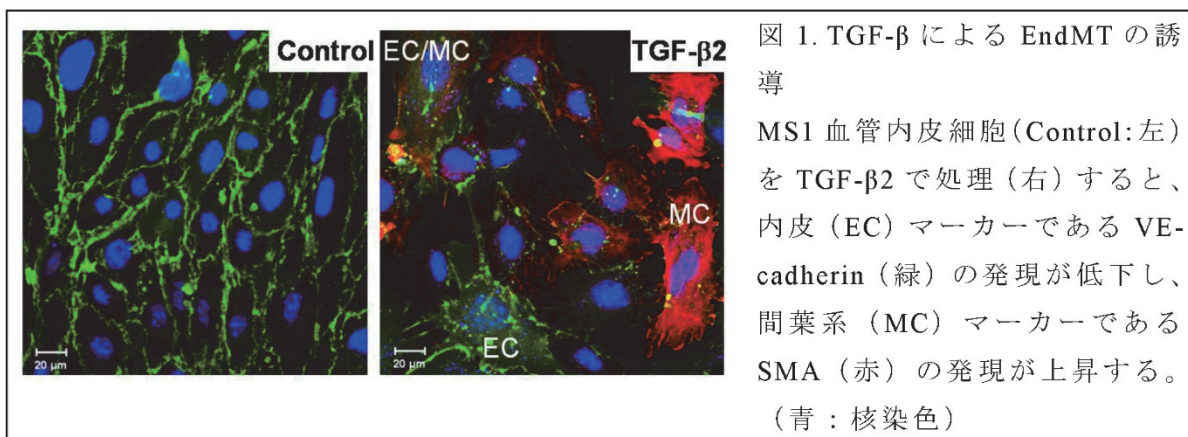
### II 研究計画及び材料と方法

膵臓由来の血管内皮細胞である MS1 を用いて TGF- $\beta$  による (間葉系細胞のマーカーである SMA の発現を指標とした) EndMT の誘導を制御する因子をスクリーニングした。得られた候補因子ならびに関連因子が、実際に腫瘍血管内皮細胞において発現しているかを検討するために、免疫不全マウスにヒト悪性黒色細胞 SM375 を移植して得られた腫瘍由来の腫瘍血管内皮細胞 (TECs: tumor endothelial cells) と腫瘍を持たない皮膚組織から得られた正常血管内皮細胞 (NECs: normal endothelial cells) を用いて検討を行った。さらに、得られた候補因子による細胞応答が、どのような機序によって TGF- $\beta$  による EndMT を制御しているかを検討した。最後に、候補因子の効果を個体レベルで検討するために、上記ヒト悪性黒色腫細胞 SM375 移植モデルを用いた。

### III 研究成果

#### 1. TGF- $\beta$ による EndMT の誘導を制御する因子の同定

MS1 血管内皮細胞に TGF- $\beta$  を添加して培養すると EndMT が誘導され、間葉系細胞マーカー SMA の発現が上昇する (図 1)。様々な成長因子ならびに阻害剤を用いて検討したところ、TGF- $\beta$  による SMA の発現上昇は線維芽細胞成長因子 (FGF2: fibroblast growth factor 2) により阻害されることが見出された (Akatsu *et al.*, submitted)。FGF2 は MEK (MAPK/ERK kinase) を介して細胞内シグナルを活性化するが、MEK 阻害剤を用いると TGF- $\beta$  による EndMT 誘導は亢進した。また、FGF2 リガンドならびに受容体 (FGFR1IIIc) の発現は腫瘍血管内皮細胞 (TEC) において高く、TGF- $\beta$  によりさらに上昇する。また、FGF2 に対する中和抗体により SMA 発現が上昇することから、内因性の FGF2/MEK シグナルが EndMT を抑制していることが示唆された。



#### 2. FGF2/MEK シグナルによる EndMT 抑制機構の解明

我々は、TGF- $\beta$  により内皮細胞において発現が上昇する MRTF-A 転写因子が SMA などの間葉系マーカー遺伝子のプロモーター上に結合する SRF 転写因子と相互作用することで遺伝子発現調節を行い、EndMT を誘導することを報告した (Mihira *et al.*, J Biochem, 2012)。この MRTF-A の作用は MEK シグナルにより活性化された ELK1 転写因子により阻害されるため、ELK1 の EndMT 誘導における役割を検討した。内皮細胞における内因性 ELK1 の発現を siRNA を用いて低下させたところ、SMA の発現が上昇した。また、内皮細胞において FGF2 シグナルを活性化すると ELK1 のリン酸化が上昇した。以上の結果から腫瘍血管内皮細胞において産生される FGF2 が受容体を介して ELK1 リン酸化を誘導し、染色体上で MRTF-A の SRF との相互作用に干渉することで EndMT の誘導を阻害することが示唆された。

#### 3. 悪性黒色腫移植モデルを用いた EndMT における MEK シグナルの役割の検討

これまで様々な種類の培養血管内皮細胞を用いて、FGF2/MEK シグナルが EndMT を抑制することを明らかにしてきたが、この現象を固体レベルで検証した。SM375 ヒト悪性黒色腫細胞を免疫不全マウスに移植して腫瘍を形成させる過程で、MEK 阻害剤を経口で投与した。得られた腫瘍組織を内皮マーカーならびに間葉系マーカーに対する抗体で染色して、共染色された細胞を EndMT の指標としたところ、MEK シグナルの抑制により腫瘍組織における EndMT が亢進することが示された。

#### IV 考察

以上の in vitro ならびに in vivo の解析の結果、がん微小環境における EndMT はがん細胞ならびに炎症細胞が産生する TGF- $\beta$  による促進効果と腫瘍血管内皮細胞が産生する FGF2 による抑制効果により制御されることが示唆された。(図 2)。EndMT が、がんなどの様々な疾患の悪化因子であることが報告されており、本研究の成果はそれらの疾患の新規治療法の開発につながる可能性がある。

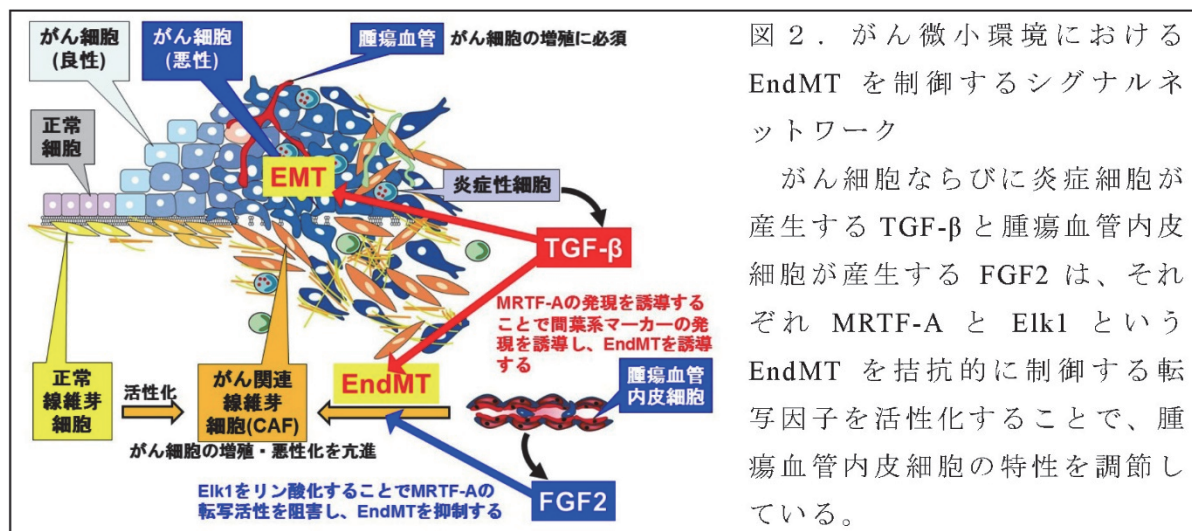


図 2. がん微小環境における EndMT を制御するシグナルネットワーク

がん細胞ならびに炎症細胞が産生する TGF- $\beta$  と腫瘍血管内皮細胞が産生する FGF2 は、それぞれ MRTF-A と Elk1 という EndMT を拮抗的に制御する転写因子を活性化することで、腫瘍血管内皮細胞の特性を調節している。

#### V 研究成果の発表

1. Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Takahashi N, Katsura A, Yoneyama K, Hida K, Suzuki HI, Miyazono K, Watabe T. Endogenous fibroblast growth factor signals in tumour endothelial cells inhibit transforming growth factor- $\beta$ -induced endothelial-to-mesenchymal transition via Elk1. (submitted)
2. Fukuhara T, KIM J, Hokaiwado S, Nawa M, Okamoto H, Kogiso T, Watabe T, Hattori N. A novel immunotoxin reveals a new role of CD321 in endothelial cells. (revised)
3. Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Tomizawa T, Takahashi K, Katsura a, Miyazono K, Watabe T. (2017) Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Cancer Science*. 108 : 151-155.
4. Katsura A, Suzuki HI, Ueno T, Mihira H, Yamazaki T, Yasuda T, Watabe T, Mano H, Yamada Y, Miyazono K. (2016) MicroRNA-31 is a positive modulator of endothelial-mesenchymal transition and associated secretory phenotype induced by TGF- $\beta$ . *Genes to Cells*. 21:99-116.
5. Miyazaki H, Yoshimatsu Y, Akatsu Y, Mishima K, Fukayama M, Watabe T, Miyazono K. (2014) Expression of platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  is maintained by Pprox1 in lymphatic endothelial cells and is required for tumor lymphangiogenesis. *Cancer Science*. 2014 105:1116-1123



高橋 暁子 (公財) がん研究会がん研究所  
細胞老化プロジェクト プロジェクトリーダー  
旧所属 (公財) がん研究会がん研究所  
がん生物部 主任研究員

## 研究報告

### I 研究目的

正常な体細胞が発がんの危険性のあるストレスを受けると、アポトーシス（細胞死）または細胞老化（不可逆的増殖停止）が誘導され、ストレスを受けた細胞の増殖が停止する (Takahashi *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2006)。近年、ヒトやマウスの前がん病変部や良性腫瘍部には細胞老化を起こした細胞（老化細胞）が存在することが示され、細胞老化が生体内で悪性腫瘍の発生を抑制していることが明らかになってきた (Takeuchi *et al.*, *Cancer Res.*, 2010)。しかし、アポトーシスとは異なり細胞老化をおこしても細胞がすぐに死滅するわけではないので、老化細胞は細胞増殖を停止したまま長時間体内に存在していることが予測される。事実、高橋らは細胞老化誘導因子である p16<sup>INK4a</sup> を *in vivo* で可視化できるマウスを作製し継時的に観察したところ、加齢とともに老化細胞が体内に蓄積してゆくことを見出した (Yamakoshi & Takahashi *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2009)。

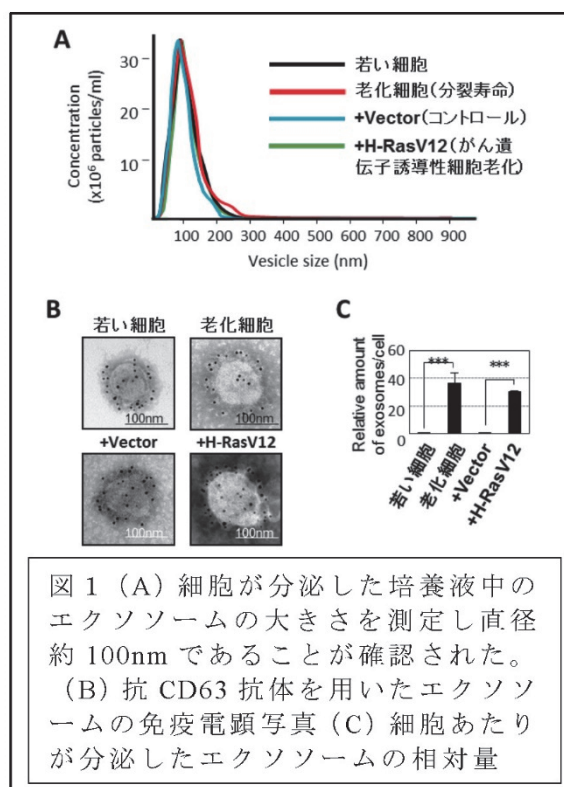
一方、加齢に伴って心血管疾患・がん・骨粗鬆症などの加齢性疾患の発症率は顕著に増加することから (sato *et al.*, *Nature Commun.*, 2015)、体内に蓄積した老化細胞の数と加齢性疾患発症率の上昇には正の相関関係が認められる。つまり、細胞老化にはがん抑制だけではなく、加齢性疾患の発症を促進する作用もある可能性が考えられる。そのメカニズムの一つとして、老化細胞が炎症性サイトカインやケモカイン、マトリクス分解酵素などの様々な炎症性蛋白質を高発現し周囲に分泌する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる現象をおこして、慢性炎症を起因すると発がんに関与することが指摘されている。高橋らはこれまで、SASP が起こる分子メカニズムの解析を行い、そのエビデネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにしてきた (Takahashi *et al.*, *Mol. Cell*, 2012)。また、がん微小環境にはがん細胞の生存や進展を支持する線維芽細胞 (CAFs : cancer-associated fibroblasts) が存在することが知られており、血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化する EndMT (endothelial-to-mesenchymal transition) や上皮間葉転換 (EMT : epithelial-to-mesenchymal transition) が CAFs の形成に関与するとされているがその分子機構ほとんど知られていない。実はがん微小環境中の CAFs では、細胞老化様の増殖停止や SASP 様の遺伝子発現の変化がおこっていることも示唆されており、CAFs が分泌する様々な SASP 因子が、がんの悪性化因子の一つである EndMT や EMT にも関与する可能性が考えられる。そこで私たちは、老化細胞から分泌される SASP 因子や細胞外分泌膜小胞のプロファイルを明らかにし、それらの中から EndMT の誘導を調節する候補分子を特定し、加齢に伴うがんの罹患率上昇に SASP を介した EndMT が関与している可能性について検討することを目的として研究を行った。本研究は、がん微小環境の成り立ちと特性を理解し、それを制御する方策の手掛かりを得るために行った。

## II 研究計画及び材料と方法

ヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, Hs68, IMR90) やヒト正常上皮細胞株 (RPE, NHEK, NHEM)、マウス線維芽細胞 (MEF) を継代培養するか、もしくはレトロウイルスによるがん遺伝子 (H-RasV12) の過剰発現や抗がん剤 (Doxorubicin 等) の投与による細胞老化を誘導した後に、あらかじめ血清中の分泌膜小胞成分を除去する前処理 (110,000xg、16 時間遠心) をした培地に交換し 48 時間培養する。その後培養上清を回収し超遠心処理を行い、老化細胞が分泌する因子について解析を行った。細胞外分泌膜小胞については、ナノ粒子解析システム (NanoSight) を用いた微粒子解析、エクソソームマーカー (抗 CD63 抗体) を使用した免疫電子顕微鏡観察、Western blotting と質量分析による蛋白プロファイルの解析を行った。また、細胞老化誘導前後の細胞のマイクロアレイ解析を行って EndMT 関連因子の遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。さらに、老化細胞が分泌する EndMT 関連因子が、がん細胞や正常細胞の増殖に与える影響を明らかにするために、老化細胞の培養上清中から回収した成分をがん細胞や正常細胞に添加した後に Realtime PCR を用いた mRNA の発現解析、Western blotting 法や免疫染色法による蛋白質の発現解析、細胞増殖解析等を行った。

## III 研究成果

老化細胞が分泌する SASP 因子の中で、EndMT に関与する因子を明らかにするために、細胞老化の誘導前後で培養液中に分泌された成分の解析を行ったところ、老化細胞では細胞外分泌膜小胞の 1 種であるエクソソームの分泌が顕著に亢進していることを見出した (図 1)。エクソソームは、後期エンドソームである多胞性エンドソーム (MVB: Multi vesicular body) を経由して細胞が分泌される直径 40~150nm 程度の細胞外膜小胞であり、蛋白質・脂質・核酸のような様々な細胞内分子がエクソソームに含まれて分泌されることが知られている。近年、分泌されたエクソソームが他の細胞に取り込まれることでシグナル伝達に働き、細胞間コミュニケーションに重要な機能を持つことが報告され注目を集めている (Tkach & They, Cell, 2016)。そこで、エクソソームに含まれる蛋白の質量分析を行った結果、特に老化細胞由来のエクソソームには Ephrin-A2 (EphA2) が多く含まれていることを見出した。EphA2 は受容型チロシンキナーゼと結合することで細胞内に MAP キナーゼシグナルを伝達し、がんの増殖促進因子として働くことが知られている (Murai *et al.*, J Cell Sei., 2003)。加えて、Ephrin 受容体シグナルは EMT に重要であることが報告されており、EndMT に関与し腫瘍の転移促進にも機能している可能性が示唆されている。そこで、老化細胞が分泌するエクソソームをがん細胞や正常細胞に投与して解析を行ったところ、老化細胞由来のエクソソームによってが

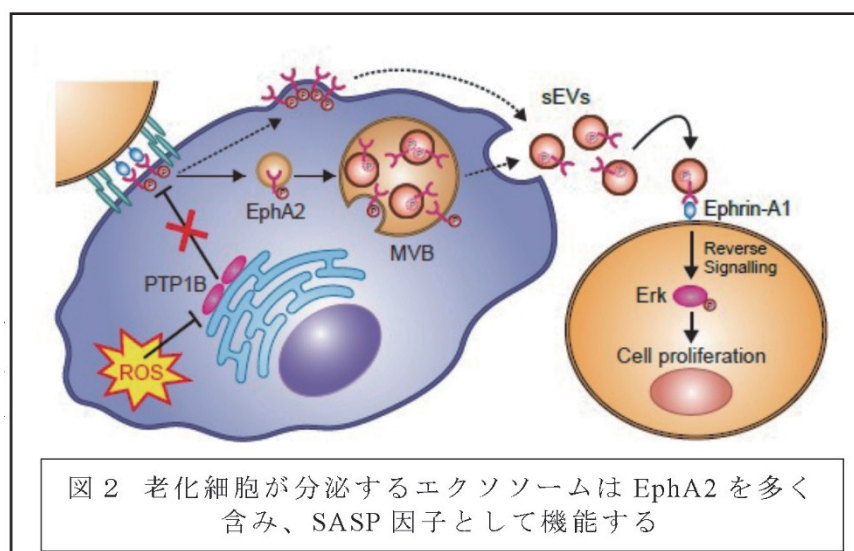


ん細胞の増殖性が亢進し、EMT を誘導することが明らかとなった。

#### IV 考察

本研究の結果から、老化細胞由来のエクソソームには EMT/EndMT 誘導因子である EphA2 蛋白が多く含まれていることが明らかとなったが、トランスクリプトーム解析の結果からは細胞老化誘導前後で EphA2 の遺伝子発現レベルには変化がなかった。つまり、細胞老化をおこすと EphA2 蛋白が選択的にエクソソームへと取り込まれていることが示唆されるが、エクソソームに内包される蛋白が選択される分子メカニズムはこれまで不明であった。しかし本研究の結果から、細胞老化によって細胞内で増加した活性酸素種が脱リン酸化酵素 PTP1B の機能を阻害するために、リン酸化された EphA2 が選択的にエクソソームへ取り込まれるという、エクソソームの積荷の選択性を決定するメカニズムを発見した (Takasugi *et al.*, Nature Commun., *in press*)。さらに、正常な細胞はエクソソームを介して細胞質内の有害な分子を除去することで、細胞の恒常性を保っていることを見出した (Takahashi *et al.*, Nature Commun., 2017)。本研究によって、老化細胞で分泌が亢進しているエクソソームには、がん細胞の増殖を促進し EMT を誘導することでがんの悪性進展に関わる SASP

因子としての機能があることが初めて明らかとなった (図 2)。今後は EphA2 を含むエクソソームがどのように血管内皮細胞にとりこまれて EndMT を誘導するのか、その詳細な分子機構を解析し、それを制御することで CAFs の産生を抑制する方法の開発が望まれる。



#### V 研究成果の発表

1. **\*Takahashi, A.**, Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C. and \*Hara, E.  
Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells.  
**Nature Communications**, 8: 15287 doi:10.1038/ncomms15287 (2017).  
(\*Takahashi and Hara are co-corresponding to this paper.)
2. Takasugi, M., Okada, R., **Takahashi, A.**, Chen, D., Watanabe, S., Hara, E.  
ROS-regulated cargo sorting renders senescent cell exosomes pro-proliferative.  
**Nature Communications**, *in press*.