

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「細胞外小胞の形成・分泌とその異質性
を生み出す分子機構の解明 ～人工細胞外小胞
への展開」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2024年03月

研究代表者：福田 光則
(東北大学 大学院生命科学研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

エクソソームは細胞内膜系に由来する細胞外小胞の一種で、新たな細胞間コミュニケーションの手段として注目を集めている。近年、サイズや組成の異なるエクソソームが報告されているものの、その『**異質性 (heterogeneity)**』(あるいは多様性)を生み出す仕組みはこれまでほとんど解明されていなかった。その最大の理由として、エクソソームがどこで生まれ(形成)、どこへ運ばれ(輸送)、どこから、どのようにして放出されるのか(分泌)といった基本的な仕組みそのものが十分に解明されていない点が挙げられる。従来の研究の多くは、培養液中に放出された後のエクソソームに焦点が当てられていたため、これらの疑問に答えるのは容易ではなかった。そこで本研究では、物理的に隔てられた**二種類の異なる細胞膜(頂端膜と側底膜)を持つ『上皮細胞』をモデル系**に用いて、異なる細胞膜から放出される組成の異なるエクソソームの形成・輸送・分泌の分子機構の違いの解明に取り組んだ。これまでの研究で、「**福田**」グループでは、頂端膜と側底膜から放出されるエクソソームを別個に解析する手法を確立し、それらの**蛋白質組成(マーカー分子)**が実際に大きく異なること、また両者の形成機構が全く異なることを見出した。すなわち、GPCR5C 陽性で CD63 を豊富に含む頂端膜エクソソームと GPCR5C 陰性で CD9 や CD81 を豊富に含む側底膜エクソソームの形成は、それぞれ ALIX–Syntenin1–Syndecan1 複合体(ALIX などの ESCRT 因子の解析については、「**森田**」グループと連携)と中性スフィンゴミエリナーゼ 2 (nSMase2)を介したセラミド代謝により別個に制御されていることが明らかになった(EMBO Rep., 2021)。二種類のエクソソームは、元となる多胞体のレベルで別個に頂端膜と側底膜へと輸送されると想定されたことから、小胞輸送の中心的制御因子である低分子量 G 蛋白質 Rab に着目し、独自に開発した Rab の発現プラスミドやノックアウト細胞株などのツールを駆使して(J. Cell Biol., 2019)、網羅的な局在スクリーニング及び機能解析を行った。その結果、頂端膜エクソソームの分泌には Rab27 と Rab37 が特異的且つほぼ独立に関与し、側底膜エクソソームの分泌には Rab39(ヒトでは Rab39A/B の二種類が存在)とそのエフェクター分子 UACA (Rab39–UACA–BORC 複合体)が特異的に関与することを初めて突き止めた(Cell Rep., 2022)。特に、Rab37 や Rab39 はこれまでエクソソーム分泌への関与が全く報告されておらず、非上皮系の HeLa 細胞などでも機能する新規のエクソソーム制御因子であることが明らかになった。Rab27、Rab37、Rab39 は上皮組織に特異的に発現するものではないことから、これらの Rab による異なる多胞体の輸送制御が、多くの細胞でエクソソームの異質性を生み出すことに貢献している可能性が十分に考えられる。また、Rab39B については、ヒト遺伝子のミスセンス変異によりパーキンソン病などの神経変性疾患が発症することが知られている。これらの変異を導入した Rab39B では、エクソソーム分泌能が低下していたことから、Rab39B を介したエクソソーム分泌が正常な神経機能にも重要である可能性が示唆された。

上記の Rab によって輸送された多胞体は、最終的に頂端膜や側底膜と融合することによりエクソソーム分泌が起こることから、この融合機構の解明を目指して、1 年間研究期間を延長し、膜融合に関わる SNARE 複合体の機構解析を行った。その結果、頂端膜側では VAMP5–SNAP47–STX1 複合体が特異的に、側底膜側では VAMP5–SNAP47–STX1/4 の 2 種類の複合体が機能することを初めて見出した(Cell Struct. Funct., 2023)。これらの SNARE 複合体は HeLa 細胞でも独立に機能しており、多胞体と細胞膜の融合レベルでも多様なエクソソームが産生されることが明らかになった。

「**小根山**」グループでは、CD9 や CD63 などのテトラスパンインが形成機構の異なる別種のエクソソームに選択的に積み込まれることに着目し(「**福田**」グループにより解明)、エクソソームの異質性を制御するシグナル伝達機構の解明に取り組んだ。各種 NanoLuc 標識テトラスパンイン発現細胞(Methods Mol. Biol., 2022)に約 400 種類の薬剤を添加し、細胞外小胞の分泌への影響を検討した結果、それぞれのテトラスパンイン発現細胞で分泌への影響は大きく異なっており、各テトラスパンインを含む小胞で分泌の制御機構が異なることが明らかになった。

「**森田**」グループでは、エクソソーム形成に関与する ESCRT 因子の同定に加え、エクソソーム

ムの形成を司る分子機構とフェリチンなどの自己集合型微粒子(あるいはウイルス粒子の構造蛋白質)を応用した新たな**人工被膜小胞の開発**にも取り組み、モデル抗原やウイルスに対するワクチン抗原を取り込ませた被膜小胞の作製に成功した。「田中」グループでは、「森田・福田」両グループと連携し、人工微粒子や上皮細胞由来のエクソソームの免疫細胞を用いた機能評価系の構築を行い、実際に抗原を取り込ませた被膜小胞を樹状細胞に取り込ませることで、細胞傷害性 T 細胞を介した細胞性免疫を誘導できることを明らかにした(*Vaccine*, 2021)。この人工被膜小胞の技術を用いることで、効果的に細胞傷害性 T 細胞を活性化することが可能であることから、新たなワクチン抗原送達システムの確立につながるものと期待される。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. Rab ノックアウト細胞株を用いた可溶性蛋白質の分泌に必須の因子・Rab6 の同定(*J. Cell Biol.*, 2019)

概要: 低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーは小胞輸送のマスター制御因子で、哺乳動物には約 60 種類の異なる分子が存在する。本研究では、全ての Rab のノックアウト細胞株のコレクションを世界に先駆けて作製し、Rab6 が基底膜成分を含む可溶性蛋白質の分泌全般に必須であることを見出した。作製したノックアウト細胞株は、古典的な分泌経路のみならず、エクソソーム分泌を含む様々な小胞輸送経路の解析にも有用であり、既に国内外の多くの研究者に活用されており、当該研究分野の発展に大いに貢献している。

2. 異質性を示す頂端膜と側底膜エクソソームの形成を制御する異なる仕組みの解明(*EMBO Rep.*, 2021)

概要: 本研究では、上皮細胞の頂端膜と側底膜エクソソームの蛋白質組成が異なる(『異質性』を示す)ことを明らかにし、それぞれのエクソソーム形成には異なる仕組みが関与することを初めて突き止めた。すなわち、上皮細胞においては、ALIX 依存的な内腔小胞の形成(頂端膜エクソソーム)とスフィンゴミエリナーゼ/セラミド代謝依存的な内腔小胞の形成(側底膜エクソソーム)が多胞体レベルで別個に制御されることを示唆するものであり、インパクトの高い発見と考えられる。

3. 頂端膜と側底膜エクソソームの元となる多胞体の輸送を制御する異なる仕組みの解明(*Cell Rep.*, 2022)

概要: 本研究では、上皮細胞の頂端膜と側底膜エクソソームの元となる多胞体の細胞膜への輸送に異なるセットの Rab 分子(Rab27/37 と Rab39)が関与することを明らかにし、特に側底膜エクソソームの分泌には Rab39-UACA-BORC 複合体が機能することを初めて突き止めた。これらの Rab 分子は非上皮系の HeLa 細胞などでも一般的に機能していることから、複数の Rab による多胞体の輸送制御がエクソソームの異質性を生み出す仕組みの一端を担っていることが明らかになった。

4. 多胞体と頂端膜や側底膜との融合を制御する異なる仕組みの解明(*Cell Struct. Funct.*, 2023)

概要: エクソソームを分泌するためには、細胞膜まで輸送された多胞体が頂端膜や側底膜と融合することが不可欠である。本研究では、この膜融合に関わる SNARE 複合体の機構解析を行い、頂端膜側では VAMP5-SNAP47-STX1 複合体が特異的に、側底膜側では VAMP5-SNAP47-STX1/4 の 2 種類の複合体が機能することを初めて突き止めた。これらの複合体は HeLa 細胞でも独立に機能しており、融合のレベルでも多様な機構が存在することが明らかになった(1 年追加支援時の成果)。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. Rab ノックアウト細胞株を用いた小胞輸送機構の解明とその制御に向けた薬剤スクリーニングへの応用

概要: 本研究で作製した Rab ノックアウト細胞株の中には、コラーゲンなど生理学的に重要な分子の細胞外への放出に異常を示すものがあり、今後、これらの分子の放出に関する詳細な分子基盤が明らかになれば、薬剤スクリーニングなどによる人為的な分泌(放出)制御にも発展する可能性を秘めている。ノックアウト細胞株などのツールは理化学研究所バイオリソース研究センターより既に公開中で、今後、様々な小胞輸送経路の解析に用いられると想定されることから、科学技術の発展にも貢献するものと期待される。

2. ウイルス抗原を取り込ませた細胞外微粒子の作製と微粒子ワクチンへの応用 (*Vaccine*, 2021)

概要: セルフアセンブリー型人工微粒子はウイルス粒子様構造を有するため、粘膜免疫や細胞性免疫を誘導できるワクチンキャリアとして有用である。本研究では、ヒトパルボウイルス B19 エピトープを提示した人工微粒子を作製し、効果的に抗ウイルス免疫を誘導できることを証明した。また、ESCRT 経路を利用し細胞から出芽させることで、効果的に細胞傷害性 T 細胞を活性化することができる人工被膜小胞を介した新たなワクチン抗原送達システムを開発した。

3. がん進展を阻止するエクソソーム阻害剤探索への応用 (*Sci. Rep.*, 2022)

概要: エクソソーム分泌の阻害は、がん微小環境や前転移ニッチの構築を阻害し、がんの浸潤転移の抑制につながる。本研究で開発してきた NanoLuc 標識テトラスペニン発現細胞を用い、ミトコンドリア阻害剤として知られていた asteltoxin がリソソーム活性化を介した新規機構でエクソソーム分泌阻害能を有することを見出した。今後、本系を効率的なエクソソーム分泌促進/阻害剤スクリーニングに応用することで、新たな作用機序を有するがん治療薬の創出に貢献するものと期待される。

< 代表的な論文 >

1. Yuta Homma, Riko Kinoshita, Yoshihiko Kuchitsu, Paulina S. Wawro, Soujiro Marubashi, Mai E. Oguchi, Morie Ishida, Naonobu Fujita and Mitsunori Fukuda, “Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells” *Journal of Cell Biology*, vol. 218, No. 6, pp.2035-2050, 2019

概要: 本論文では、様々な小胞輸送経路への Rab の関与を明らかにするため、その網羅的解析ツールとして、上皮細胞由来の MDCK 細胞を用いて Rab のノックアウト細胞株のコレクションを初めて作製した。ノックアウト細胞の表現型の解析から、Rab6 が可溶性蛋白質の分泌全般に必須であるのに対し、膜蛋白質の輸送への関与は限定的であることが明らかになった。すなわち、膜蛋白質の輸送には可溶性蛋白質の輸送とは異なる仕組みの存在が示唆され、ゴルジ体での蛋白質の選別機構に一石を投じる発見である。

2. Takahide Matsui, Futaba Osaki, Shu Hiragi, Yuriko Sakamaki and Mitsunori Fukuda, “ALIX and ceramide differentially control polarized exosome release from epithelial cells” *EMBO Reports*, vol. 22, No. 5, pp.e51475, 2021

概要: 本論文では、上皮細胞の頂端膜と側底膜エクソソームを別個に回収する手法を確立し、プロテオーム解析により、両者が異質性を示すことを明らかにした。また、多胞体の内腔小胞形成への関与が示唆されている分子群の機能阻害により、それぞれのエクソソーム形成には独立した機構が存在することを初めて突き止めた。すなわち、頂端膜エクソソーム形成には ALIX-Syntaxin1-Syndecan1 複合体が、側底膜エクソソーム分泌にはスフィンゴミエリナーゼ (nSMase2) 依存的なセラミド代謝が必須であることが明らかになった。

3. Takahide Matsui, Yuriko Sakamaki, Shumpei Nakashima and Mitsunori Fukuda, “Rab39 and its effector UACA regulate basolateral exosome release from polarized epithelial cells” *Cell Reports*, vol. 39, No. 9, pp.110875, 2022

概要:本論文では、頂端膜側へ向かう多胞体の輸送に Rab27 と Rab37 が、側底膜側に向かう多胞体の輸送に Rab39-UACA-BORC 複合体が独立に機能することを初めて突き止めた。これらの Rab 分子は非上皮系の細胞でも機能していることから、複数の Rab による多胞体の輸送制御がエクソソームの異質性を生み出す仕組みの一端を担っているものと考えられる。また、Rab39B を介したエクソソーム分泌機構の破綻と神経変性疾患(パーキンソン病)の発症との関連性も示唆された。

4. Takahide Matsui, Yuriko Sakamaki, Shu Hiragi, and Mitsunori Fukuda, “VAMP5 and distinct sets of cognate Q-SNAREs mediate exosome release” *Cell Structure and Function*, vol. 48, No. 2, pp. 187-198, 2023

概要:本論文では、ヒトやマウスに存在する全ての SNARE 蛋白質を対象とした網羅的な局在スクリーニングや機能解析を行い、多胞体と細胞膜の融合に関わる SNARE 複合体の同定を行った。MDCK 細胞の頂端膜側では VAMP5-SNAP47-STX1 複合体が特異的に、側底膜側では VAMP5-SNAP47-STX1/4 の 2 種類の複合体が機能することを初めて突き止めた。また、これらの複合体は非上皮系の HeLa 細胞でも独立に機能しており、多胞体と細胞膜の融合レベルでも多様なエクソソームの産生に寄与することが明らかになった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「福田」グループ

研究代表者:福田 光則 (東北大学大学院生命科学研究科、教授)

研究項目

・上皮細胞を用いた細胞外小胞の輸送・分泌の分子機構とその異質性を生み出す仕組みの
解明:Rab 分子の網羅的機能解析

② 「森田」グループ

主たる共同研究者:森田 英嗣 (弘前大学農学生命科学部、准教授)

研究項目

・細胞外小胞の形成を制御する ESCRT 因子の同定と細胞外小胞の異質性を生み出す分子
機構の解明:人工細胞外小胞・粒子への応用

③ 「田中」グループ

主たる共同研究者:田中 伸幸 (宮城県立がんセンター研究所がん先進治療開発研究部、
部長)

研究項目

・ヘテロな細胞外小胞の機能的異質性の解析:人工細胞外小胞・粒子の機能評価系の構築

④ 「小根山」グループ

主たる共同研究者:小根山 千歳 (愛知県がんセンター研究所腫瘍制御学分野、分野長)

研究項目

・細胞外小胞の異質性を制御するシグナル経路の解明:SFK 依存的な細胞外小胞産生機構
の解析

※1 年追加支援時の体制

追加支援分については、上記①の「福田」グループのみで実施した。

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本 CREST 研究で作製した Rab ノックアウト細胞株やプラスミドなどのリソースは、理化学研究所バイオリソース研究センターより広く一般に公開され、既に提供を行っている。本リソースはエクソソームの研究以外にも様々な細胞内輸送研究に役立つことから、細胞外微粒子の領域内だけでなく、国内外の研究者との共同研究に発展しており、分野を超えた研究者間のネットワーク形成に貢献している。また、本研究で同定されたエクソソームの制御因子の薬剤による制御など応用面に興味を持つ製薬企業も存在し、一部の企業との共同研究も実施している。さらに、ワクチン製造会社と共に、本研究で作製している人工細胞外微粒子の粒子表面にウイルス抗原を提示させた新しいワクチンの開発も行っている。