

論文の内容の要旨

論文題目 : Study on extracellular vesicles-mediated regulation of the physical barriers

(細胞外小胞による生体バリアの制御に関する研究)

氏名 : 富永 直臣

はじめに

中枢神経系である脳へがん細胞が転移した場合、予後が極めて悪い。しかし、その転移メカニズムは不明な点が多いため、治療薬の開発が困難な状況にある。現在、脳転移メカニズムは、がん細胞が血流によって脳血管に到達すると、接着・浸潤し、脳実質へ到達した後、増殖を開始すると考えられている。しかし脳血管では、血液脳関門 (Blood-Brain Barrier : BBB) が生体バリアとなって、物質や細胞の侵入を防いでいる。これまで Vascular endothelial growth factor (VEGF) が BBB を通過するために重要な因子として報告されていたが、十分に説明することができなかった。今回、私たちは、乳がん細胞から分泌されるエクソソームが BBB の通過に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

エクソソームと Extracellular Vesicles (EVs)

エクソソームとは、細胞から分泌される 50-150nm 程度の小胞である。このエクソソーム内には、様々なタンパク質、mRNA、マイクロ RNA などの機能分子が内包されている。エクソソームが、細胞から分泌されると近傍細胞または遠隔細胞に取込まれ、その機能分子を伝達する細胞間コミュニケーションツールとして用いられている。近年、がん悪性化との関連が多く報告されている。2013 年以降、エクソソームの国際学会 (International Society of Extracellular Vesicles : ISEV) で、その回収方法の性質から、” Exosomes ” の名称を “Extracellular Vesicles” へ統一するという動向になっている。

血液脳関門 (Blood-Brain Barrier)

ヒトの脳血管は、脳全体を約 600-700km に渡って走行しており、脳内への栄養供給、老廃物の運搬などを行う重要な器官である。この脳血管は、内皮細胞・ペリサイト・アストロサイト、またその周囲に存在する神経細胞やミクログリアによって構成されている。この複数の細胞で構成される脳血管は、BBB と呼ばれる特徴的な構造を持っている。類似構造は、精巣や網膜にも存在することが知られている。BBB は、脳血管を構成する内皮細胞が作る極めて密な構造で、通常 0.4kDa 以上の物質は自由に通過することができない。さらに、ナトリウムイオン (Na⁺) や塩化物イオン (Cl⁻) などの小さなイオンまでもが、内皮細胞に発現するトランスポーターによって、脳実質への透過が厳密に制限されている。血管の透過性は、径内皮電気抵抗値と呼ばれる電気抵抗値を用いて評価するが、通常の血

管では $2-20\Omega \cdot \text{cm}^2$ であるのに対し、脳血管の径内皮電気抵抗値は $\geq 1000\Omega \cdot \text{cm}^2$ と極めて密な構造を持っていることが分かる。このように BBB の主な役割は、中枢神経系への栄養物質の取り込みや老廃物の排出などの流れを厳密に制御することにある。さらに、このような生体バリアが存在することで、血液を流れる病原体やその他の毒性物質の中枢神経系への影響を防ぐことができている。BBB と類似の構造は、網膜や精巣にも存在することが知られている。

BBB の本体は、内皮細胞間に作られる密着結合 (Tight Junctions) と呼ばれる構造である。密着結合は、Claudin-3, 5, 12, Occludin, Zonula Occludin(ZO)-1, 2, 3、またそれらを裏打ちするアクチン線維によって構成されている。これまでの研究で、BBB の形成には内皮細胞とペリサイトやアストロサイトとの相互作用によって誘導されることが知られている。特に、胚発生期にはペリサイトによって、血管の透過性や免疫細胞の浸潤を促進する分子の発現を抑制することが明らかとなっており、BBB 形成にペリサイトなど周辺細胞との相互作用が重要であることが報告されている。

乳がん脳転移細胞株の樹立

脳転移メカニズムを明らかにするために、高率に脳転移する乳がん細胞株を樹立した。乳がん細胞株である MDA-MB-231-D3H2LN をマウスの左心室に投与し、約 30 日間観察を続ける。その後、脳を取り出し脳転移した細胞を回収・培養を行った。この細胞をマウスへ再度移植し、高率に脳転移する細胞株を樹立した。

in vitro BBB モデル

これまでの研究では、BBB のモデルに脳血管内皮細胞の単層培養が使用されており、十分に脳血管を模倣できてはいなかった。しかし、BBB の形成にはその周辺細胞であるペリサイトやアストロサイトとの相互作用が極めて重要であることが報告されている。今回用いた in vitro BBB モデルは、脳血管内皮細胞に加えペリサイトとアストロサイトの三種類の細胞を共培養したものである。BBB が形成されている指標として、径内皮電気抵抗値 (TEER) が用いられるが、in vitro BBB モデルでは最大 $869.55\Omega \cdot \text{cm}^2$ を計測できている。このように、3 種の細胞を共培養したモデルは、生体の脳血管構造及び BBB を再現できていると考えられる。

脳血管内皮細胞

特殊な生体バリアである BBB を形成する脳血管内皮細胞は、種によって発現する分子が大きく異なっている。例えば、ヒト脳血管内皮細胞とマウスやラットのそれを比較したところ、中性アミノ酸トランスポーターである LAT 1 や H⁺共輸送型モノカルボン酸トランスポーターである MCT1 などの発現量が 1/5~1/10 と低くなっている。一方で、ヒトとサルの脳血管内皮細胞を比較するとその差は大きくない。さらに、脳血管の透過性を示す径

内皮電気抵抗値もマウスやラットと比較して、ヒトやサルの方が高い値を示すことが知られている。このように、種によって性状の異なる脳血管内皮細胞は、よりヒトに近いサルの細胞を用いる事でヒトの脳血管を模倣できていると言える。

エクソソームによる BBB の破壊と転移促進

まず、がん細胞が分泌するエクソソームの脳血管への影響を確認した。通常、Claudin-5、Occludin、ZO-1 などの BBB を構成するタンパク質は膜に局在している。また膜タンパク質を裏打ちしているアクチン線維は細胞質内に繊維状に存在する。しかし、樹立した脳転移細胞株から回収したエクソソームを加えるとその局在が変化し、BBB が破壊されていることが観察された。さらに、*in vitro* BBB モデルにおける血管内から脳実質側へのがん細胞の浸潤能を低転移乳がん細胞株である MDA-MB-231-D3H1 を用いて確認したところ、樹立した脳転移細胞株から回収したエクソソームを添加した群で、脳実質への浸潤が促進された。

次に、マウスを用いて実験を行った。がん細胞から回収したエクソソームを蛍光色素 DiR で染色し、マウスに投与する。その後、脳血管の透過性を確認する Tracer-653 を投与した。その結果、樹立した脳転移細胞株のエクソソームで処理したマウスでは、脳へエクソソームが集積し、かつ脳血管の透過性が上昇していることが観察された。さらに、マウスにエクソソームを投与した後、親株である MDA-MB-231-D3H2LN 乳がん細胞株を移植したところ、樹立した脳転移細胞株のエクソソームを投与した群では、高率に脳転移することが観察された。これらの結果は、がん細胞が分泌するエクソソームが BBB を破壊し、脳転移を促進している可能性を示唆している。

BBB 破壊メカニズム

エクソソームによる BBB の破壊メカニズムを詳細に検討するために、エクソソームに多く含まれる機能分子の内、マイクロ RNA に注目した。網羅的解析の結果、マイクロ RNA181c が、樹立した脳転移細胞株に多く含まれていることが明らかになった。さらに、マイクロ RNA181c を *in vitro* BBB モデルの脳血管内皮細胞に形質導入し、mRNA 発現を網羅的に解析した結果、PDPK1 の発現が抑制されていることが明らかになった。PDPK1 は複合体を形成し、上述したアクチン線維を破壊するコフィリンのリン酸化を制御している。リン酸化されたコフィリンは、不活化される。つまり、エクソソームに含まれるマイクロ RNA181c が脳血管内皮細胞に取込まれると、コフィリンのリン酸化を担う PDPK1 の発現を抑制する。その結果、PDPK1 によるコフィリンのリン酸化が抑制され、アクチン線維を破壊する活性型コフィリンが増加し、アクチン線維が破壊される。裏打ちを失った BBB を構成する膜タンパク質は、膜局在を失い、BBB の破壊につながっていると考えられる。実際、ウェスタンブロッティング法でタンパク質の発現を確認したところ、その仮説を支持していた。

おわりに

本研究で樹立した脳転移細胞株から回収したエクソソームは、脳へ集積していることが確認されている。そのため、全身の血管で細胞間結合の破壊が起こっているのではなく、脳血管特異的に起こっていると考えられる。実際、脳血管以外の通常の血管は、細胞間結合が BBB と比較して弱く、血管によっては「有窓性」のものもある。そのような血管を持つ臓器への転移は、がん細胞自身の浸潤能などほかの因子によるメカニズムが重要であると考えられる。

上述したように、がん細胞が分泌したエクソソームには、組織特異性や指向性が存在すると考えられている。他のグループでも、細胞から分泌されるエクソソームが、脳・肺・筋・骨髄・リンパ節・腫瘍など、実に様々な臓器に取込まれることがマウスモデルで観察されている。しかし、そのメカニズムは依然として明らかになっていない。このメカニズムが明らかになれば、生体内に存在する天然の薬剤送達システムへの応用が期待される。