

〈一般研究課題〉 がん由来エクソソーム上の糖鎖が制御する
正常細胞の悪性形質の解析
助成研究者 中部大学 大海 雄介



がん由来エクソソーム上の糖鎖が制御する 正常細胞の悪性形質の解析

大海 雄介
(中部大学)

Analysis of malignant phenotypes in normal cells regulated by glycans on cancer-derived exosomes

Yuhsuke Ohmi
(Chubu University)

Abstract :

Cancer-derived extracellular vesicles (EVs) are known to play a crucial role in the formation of the tumor microenvironment and in cancer progression. However, the functions of glycolipids present on their membranes remain largely unexplored. Among these, gangliosides, glycosphingolipids containing sialic acid, are known to participate in various cellular functions at the plasma membrane. Despite this, their roles on EVs remain poorly understood. In this study, we isolated EVs from glioma cell lines engineered to overexpress the gangliosides GD3 and GD2 (GT cells), as well as from control cells (CV cells), and analyzed their effects on normal brain cells, specifically astrocytes. Our results showed that EVs derived from GT cells (GT-EVs) expressed GD3 and GD2 on their surface and were efficiently taken up by astrocytes. Moreover, gangliosides present on EVs were transferred to astrocytes. Treatment with GT-EVs significantly enhanced the motility of astrocytes, suggesting that gangliosides may contribute to the malignant transformation of normal cells within the tumor microenvironment. Additionally, mass spectrometry analysis identified several membrane proteins enriched in GT-EVs, including ICAM-1, a molecule associated with malignant traits. These findings suggest that gangliosides present on cancer-derived EVs, may represent a novel mechanism by which malignancy-associated properties are conferred upon normal cells. This mechanism could serve as a foundation for developing new therapeutic

1. はじめに

シアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドは、脊椎動物のほとんどすべての細胞に存在し、主に細胞膜上に局在する。ガングリオシドは、セラミド、グルコース、ガラクトースからなるラクトシルセラミドに、酸性糖であるシアル酸が結合した酸性スフィンゴ糖脂質である(図1)。結合する糖の種類により多様なガングリオシドが形成され、細胞種ごとに発現パターンが異なる。我々は、これまで、GM1、GD1a、GD1b、GT1bといった複雑な構造を持つガングリオシドは、神経組織に豊富に発現し、神経の維持や修復に重要な機能を果たすことを明らかにしてきた[1]。一方、構造が比較的単純なGD3やGD2は、特定のがん細胞に特異的に発現し、がん関連抗原として同定されている[2-5]。我々は、がん細胞の膜上には、GD3やGD2が特徴的に発現すること、さらには、これらは受容体機能を調節することで、下流のシグナル伝達を活性化させ、細胞の増殖、浸潤、接着、移動などの悪性形質を亢進することを報告してきた[6-8]。また、神経膠腫(グリオーマ)は、脳細胞の中でも最も一般的な原発性脳腫瘍であり、グリア細胞に由来する。グリオーマも他のがん細胞と同様にGD3およびGD2を発現することが示されており、これが強い浸潤性と増殖能に関与している[9,10]。これらの悪性形質により、がん細胞は周囲の正常な脳組織へと不均一に拡散し、外科的に完全に切除することが極めて難しい。その結果、しばしば再発を繰り返し、予後も不良となる[11,12]。

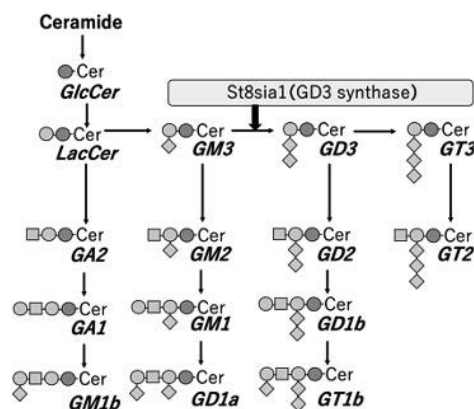


図1. ガングリオシド合成経路. GD3/GD2はがん細胞に特徴的に発現し、悪性形質の亢進に関与する。

一方、がん細胞は周囲の組織と複雑に相互作用しながら、がん微小環境を形成し、自らの悪性形質をさらに促進させることが知られている。特に、がん細胞から分泌されるエクソソーム (EVs: Extracellular Vesicles) は、周辺の細胞との情報伝達の媒介として重要な役割を果たし、腫瘍促進的な環境の構築に寄与している。EVsとは、エンドソーム経路で形成される脂質二重膜から成る約40~160 nmの小胞であり、分泌する細胞のDNA、mRNA、マイクロRNA、脂質、細胞質タンパク質、膜タンパク質などを内包し、細胞間相互作用において重要な役割を果たしていることが報告されている[13]。特に、腫瘍由来EVs上のインテグリンにより、臓器特異的な細胞と相互作用し、前転移ニッチ形成を制御することで、臓器特異的な転移を誘導することが報告されている[14]。このように、EVsに含まれる様々な分子は、役割が厳密に解析され、その治療への応用が議論されてい

る。

しかし、EVsにおけるガングリオシドの存在と意義については、ほとんど報告されていない。そして、EVs上に発現するガングリオシドが、がん微小環境にある正常細胞に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では、ガングリオシドGD3/GD2を強制的発現したグリオーマ細胞株(GT株)とそのコントロール細胞株(CV株)から産生されるEVsが、正常脳細胞であるアストロサイトに対し、どのように作用し、がん微小環境の形成に関与するのかを検討する。これによって、がん細胞由来EVsにおけるガングリオシドの機能を明らかにする。

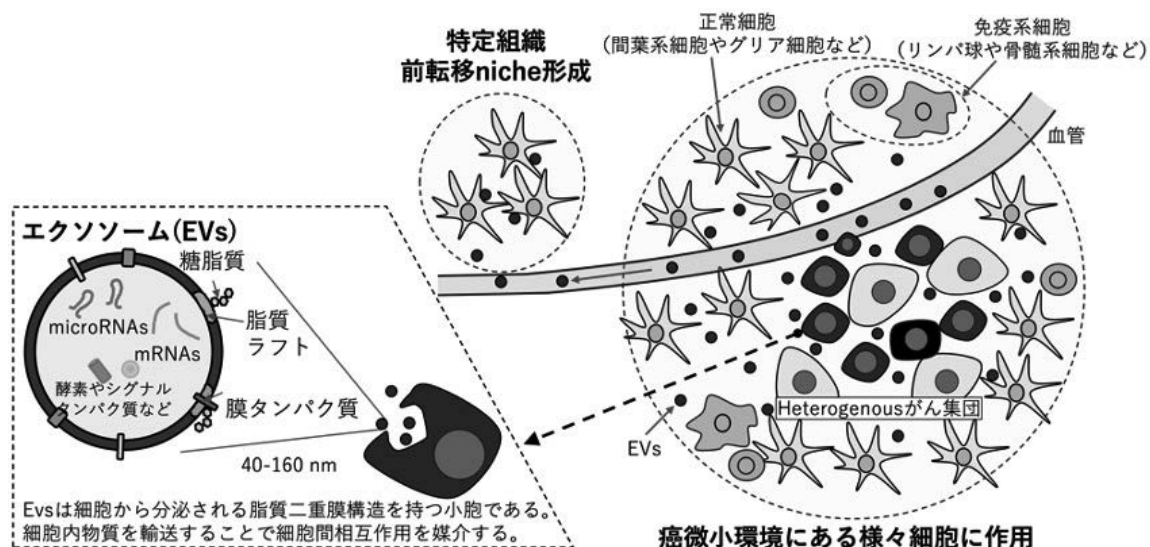


図2. がん由来EVsの構造と作用メカニズム. がん由来EVsはがん微小環境にある様々細胞に作用(がん浸潤の亢進や免疫細胞の抑制など)し、がんの進展を促す。また、特定組織、臓器への前転移nicheの形成を経て、がん浸潤、転移を誘導する。

2. 試料および実験方法

2.1 初代培養アストロサイトの単離

C57BL/6系統の野生型マウスまたは、ガングリオシド欠損マウス(8週齢以上)を交配し、生後0-1日目の仔マウスからアストロサイトを採取した。脳を摘出後、髄膜除去・濾過・洗浄・遠心を経て細胞を回収し、10%FCS・グルコース・インスリン含有DMEM-low glucoseで12日間培養した。ミクログリア除去のため振盪・トリプシン処理・接着選択を行い、さらに7日間培養後、凍結保存した。全ての動物実験は中部大学動物実験委員会の承認(承認番号: 202310018)を得て実施した。

2.2 EVsの回収

ヒトグリオーマ細胞株U251 MGにGD3合成酵素 cDNAを導入したGD3/GD2発現グリオーマ細胞株(GT株)[15]、及び、コントロール細胞株(CV株)を 2×10^6 個/15 cmディッシュで播種し、10%FCS含有DMEMで 37°C ・5% CO_2 条件下に24時間培養した。その後、PBSで3回洗浄し、ITS-Premix含有DMEMに置換して72時間培養した。回収した上清は500 gで遠心して細胞残渣を除去し、さらに20,000 gで遠心後、0.22 μm フィルターで濾過した。次に175,000 gで超遠心(4 $^\circ\text{C}$ 、84分)を行い、得られたペレットをPBSで洗浄・再度超遠心した。最終的にPBS 150 μL でEVsを懸濁し、エクソソーム用チューブに回収してBCA法でタンパク定量を行い、使用まで4 $^\circ\text{C}$ で保存した。

2.3 細胞に対するフローサイトメトリー

GT細胞株およびCV細胞株を培養後、トリプシン処理して単離し、抗ガングリオシド抗体(抗GD3抗体(R24)、抗GD2抗体(220-51))とFITC標識二次抗体(Fluorescein-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 抗体(Proteintech社))で染色した。染色細胞は、フローサイトメトリー (BD Accuri™ C6)で測定した。

2.4 EVsに対するフローサイトメトリー

PS Capture™キット (FUJIFILM社)を用いて、EVsをTim4磁気ビーズで捕捉し、抗ガングリオシド抗体(抗GD3抗体(R24)、抗GD2抗体(220-51))およびFITC標識二次抗体(Fluorescein-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 抗体(Proteintech社))で染色した。染色したEVsは、フローサイトメトリー (BD Accuri™ C6)で測定した。

2.5 EVsの細胞取り込み測定

ExoSparklerキット (同仁科学研究所)を用いてEVsの脂質膜を染色し、アストロサイトへの取り込みをフローサイトメトリーで評価した。EVsを染色後、初代培養アストロサイトに添加し、5分培養したのち、細胞を回収・洗浄し、フローサイトメトリー (BD Accuri™ C6)で蛍光強度を測定した。

2.6 EVs由来ガングリオシドのアストロサイトへの移行評価

ガングリオシド欠損マウス由来アストロサイトに、CV-EVsまたはGT-EVs(10 µg/mL)を添加し、30分インキュベート後、トリプシン処理・洗浄を行った。細胞をR24抗体およびFITC標識二次抗体で染色し、EVs上のGD3がアストロサイトに移行するかを、蛍光顕微鏡下で観察した。

2.7 EVsのLC-MS解析

前述の超遠心法で単離したEVsを凍結乾燥し、PTS法 [16] に従って消化・脱塩を行った。得られたペプチドは、ナノフロー逆相液体クロマトグラフィーとQ-Exactive Orbitrap質量分析計 (Thermo Fisher Scientific)を用いてLC-MS/MS解析を行った [17]。得られたRawデータは、SEQUEST検索エンジンを用いてProteome Discoverer v2.4 (Thermo Fisher Scientific)により、Homo sapiensとcRAPのコンタミネーションデータベースに対して直接解析した。

2.8 移動能の評価

小孔付きチャンバーを用いて、EVs添加によるアストロサイトの移動能を評価した。細胞をチャンバーに播種後、EVs(25 µg/mL)と共に24時間培養し、上部の細胞を除去後、ギムザ染色を行った。フィルターをスライドに移して、移動した細胞数を測定した。

3. 実験結果

3.1 EVs上のガングリオシド

GD3/GD2が発現するヒトグリオーマ細胞株 (GT株) と、そのコントロール株であるヒトグリオー

マ細胞株(CV株)から、それぞれEVs(GT-EV、または、CV-EV)を回収し、EVs上のガングリオシドを染色し、ガングリオシドが発現するかを検討した。その結果、GT-EVには、GD3、GD2が発現し、CV-EVには、GD3、GD2の発現は認められなかった(図3)。これは、EVs上には、細胞由来のガングリオシドが発現することを示している。

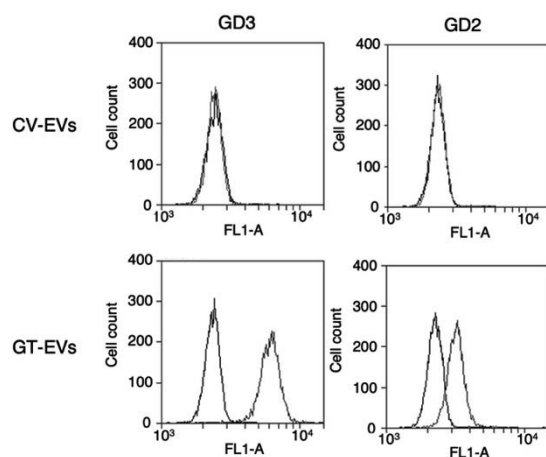


図3. EVに発現するガングリオシドの検出.CV-EVsとGT-EVs上に発現するガングリオシドを検出した。ヒストグラムはx軸にFITC強度(FL1-A)、y軸にイベント数を表示し、ネガティブコントロール(黒線)を基準に、GD2およびGD3(グレー線)を示している。

3.2 アストロサイトへのEVsの取り込みとガングリオシドの移行

グリオーマ由来EVsがアストロサイトに取り込まれるかを検討するため、蛍光標識したEVsを、アストロサイトに添加した後、フローサイトメトリーにより細胞内の蛍光強度を解析した。その結果、GT-EVs及び、CV-EVsは、いずれも同様にアストロサイトに取り込まれ、ガングリオシドの有無による取り込み量の差は、認められなかった(図4A)。これにより、グリオーマ由来EVsは、ガングリオシドの発現に関係なくアストロサイトに効率よく取り込まれることが示唆された。また、ガングリオシドを欠損するマウス由来アストロサイトにEVsを投与し、EVs上のガングリオシドが細胞に転移するかを検討したところ、GT-EVsを添加したアストロサイトでは、本来発現して

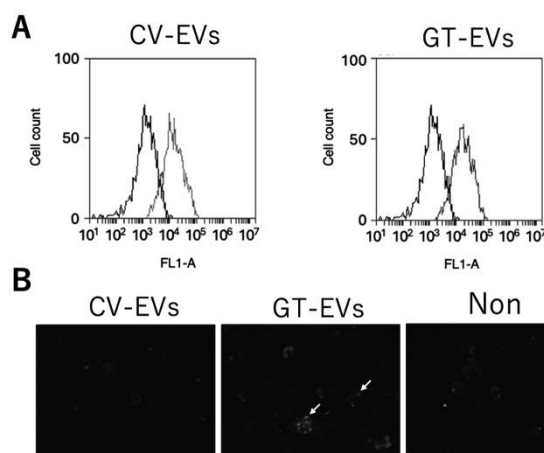


図4. EVsの細胞取り込みの検討.A.CV-EVsとGT-EVsを蛍光染色し、アストロサイトに添加後、フローサイトメトリーでアストロサイトの蛍光レベルを測定した。未処理のアストロサイト(黒線)を基準に、蛍光ラベル化EVsを添加したアストロサイト(グレー線)を示している。B. CV-EVsとGT-EVsを添加したガングリオシド欠損アストロサイトを抗GD3抗体染色した。GT-EVs添加したアストロサイトは、GD3が染色される(白矢印)。

いないGD3が局所的に観察され、EVs由来のガングリオシドが受け手細胞に伝達される可能性が示された(図4B)。これらの結果は、がん細胞由来EVsがアストロサイトに取り込まれ、EVs表面に存在するガングリオシドを標的細胞上に呈示し得ることを示唆している。ただし、本実験は条件検討の段階であり、今後さらに詳細な解析が必要である。

3.3 EVs膜上タンパク質のMS解析

GT-EVsとCV-EVs膜上にどのような膜タンパク質が局在するかを検討するため、EVsのMS解析を行なった結果、さまざまな膜タンパク質が検出され、その中でもインテグリン関連タンパク質が認められた。また、GT-EVsとCV-EVsのMS解析の結果を比較すると、GT-EVsで多く発現が認められるタンパク質も同定された(図5)。今後は、これらのタンパク質が、標的細胞に作用する時の重要な因子になるかを検討する予定である。

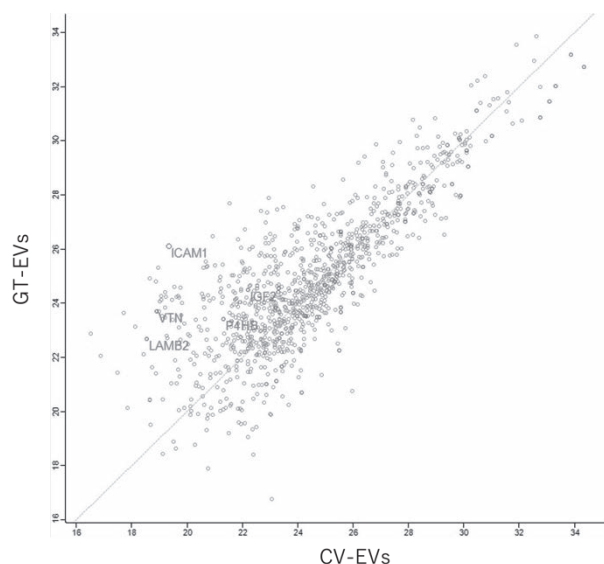


図5. MS解析によるCV-EVsとGT-EVs間の膜タンパク質の相対割合

3.4 EVsによるアストロサイトの移動能の評価

GT-EVsとCV-EVsによるアストロサイトの移動能への影響を明らかにするため、8 μ m孔のチャンバー上にアストロサイトを播種し、EVsを添加した後、チャンバーの下に浸潤したアストロサイトを測定し、移動能の検討を行なった。その結果、EV未添加群に比べ、EVsを添加すると、アストロサイトの移動能が亢進し、さらに、GT-EV添加群は、CV-EV添加群比べ、さらに移動能が亢進することが明らかになった。

4. まとめ

本研究により、グリオーマ細胞は細胞膜上に発現するGD3およびGD2を、EVs上にも発現することが明らかになった(図3)。さらに、これらのEVsは標的細胞であるアストロサイトに取り込まれ、本来は発現しないガングリオシドを標的細胞上に発現させることが、予備的実験ながら示された(図4)。

さらに、MS解析によりGD3/GD2陽性EVsおよび陰性EVsに含まれる膜タンパク質を同定した

結果、両者に共通する膜タンパク質が多数検出された一方で、GD3/GD2陽性EVsに高発現するタンパク質も認められた。その中には、インテグリン関連分子であるICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) も含まれていた(図5)。ICAM-1は細胞間接着分子の一種で、免疫応答や細胞間相互作用において重要な役割を担い、がんの悪性形質の亢進にも関与することが報告されている[18]。このように、GD3/GD2陽性EVsは悪性形質に関連する膜タンパク質を含み、それが標的細胞に取り込まれることで、がん微小環境の形成やがん細胞の悪性化を促進している可能性がある。実際、GD3/GD2陽性EVsを添加したアストロサイトでは移動能の亢進が観察された。これは、脳腫瘍においてがん細胞が周囲の正常細胞を押し分け、増殖のスペースを確保する過程において、正常組織の構造的安定性を破壊する可能性を示唆している。

今後は、EVs上に共発現するタンパク質とガングリオシドとの相互作用を解析することで、ガングリオシドがEVsを介したがん微小環境形成にどのように関与しているかを明らかにし、GD3/GD2陽性EVsによるがんの悪性形質亢進の分子基盤を解明することを目指す。最終的には、これらの知見を基に、がんの悪性化を制御する新たな治療戦略の開発へとつなげたい。

参考文献

- [1] Ohmi. Y., et al. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106, 22405–10 (2009).
- [2] Ye. JN., et al. Enhanced expression of ganglioside GD3 in human and rat hepatocellular carcinoma cells and NIH 3T3 cells transfected with human tumor DNAs. *Cancer Res.*, 50, 7692–7702 (1990).
- [3] Furukawa. K., et al. Tumor necrosis factor enhances GD3 ganglioside expression in cultured human melanocytes. *Arch Biochem Biophys.*, 281, 70–75 (1990).
- [4] Fuentes. R., et al. Gangliosides: Glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Lung Cancer.*, 18, 21–33 (1997).
- [5] Merritt. WD., et al. Ganglioside expression in lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 47, 1724–30 (1987).
- [6] Hamamura. K., et al. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11041– 11046 (2005).
- [7] Ohmi. Y., et al. Differential roles of gangliosides in malignant properties of melanomas. *PLoS One.*, 13, e0206881 (2018).
- [8] Sarkar. TR., et al. GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Oncogene.*, 34, 2958–2967 (2015).
- [9] Ohkawa. Y., et al. Ganglioside GD3 Enhances Invasiveness of Gliomas by Forming a Complex with Platelet-derived Growth Factor Receptor and Yes Kinase. *J. Biol. Chem.*, 290, 16043–16058 (2015).
- [10] Fredman. P., et al. ganglioside antigens associated with human gliomas. *Neurol. Res.*, 8:

- 123–126 (1986).
- [11] van der Sanden B, et al. Glioma Recurrence following Surgery: Peritumoral or Perilesional? *Front Neurol*, 7, 52 (2016).
 - [12] Fuse. JT., et al. Targeting brain cancer: Advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer.*, 10, 319–331 (2010).
 - [13] Raghu. K., et al. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.*, 367 eaau6977 (2020).
 - [14] Hoshino. A., et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 527, 329–335 (2015).
 - [15] Iwasawa. T., et al. Enhancement of malignant properties of human glioma cells by ganglioside GD3/GD2. *Int. J. Oncol.*, 52, 1255–1266 (2018).
 - [16] Iwasaki. M., et al. Chemical cleavage-assisted tryptic digestion for membrane proteome analysis. *J. Proteome Res.* 8, 3169–3175 (2009).
 - [17] Sei. H., et al. Isocitrate dehydrogenase 1 upregulation in urinary extracellular vesicles from proximal tubules of type 2 diabetic rats. *FASEB J.* 38, e23688 (2024).
 - [18] Lim. EJ., et al. ICAM-1 promotes cancer progression by regulating SRC activity as an adapter protein in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 13,417 (2022).