

ミニレビュー

癌細胞における糖脂質と癌細胞由来エクソソームの作用機序

大海 雄介

中部大学生命健康科学部臨床工学科

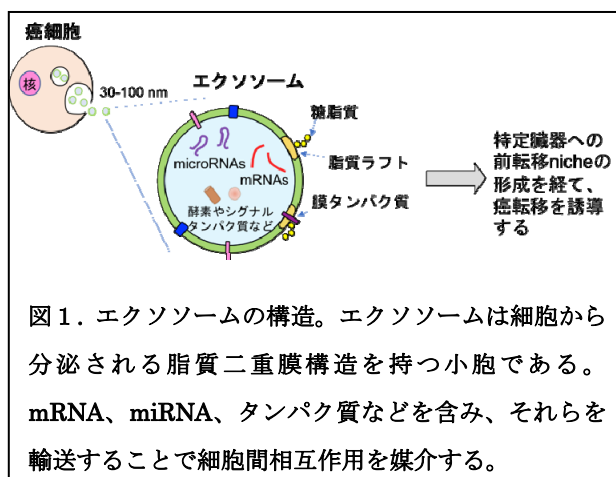
要 旨

エクソソームとは、細胞のエンドソームで形成される脂質二重膜から成る小ベシクルで、種々の細胞成分を含み、これらを伝達することで細胞形質の制御、癌転移の促進に働くことが続々と報告されている。近年では、癌細胞をはじめ種々の細胞から分泌されるエクソソームが細胞間情報伝達に重要な役割を果たすことがわかってきた。とくに、エクソソームの発現するインテグリンが癌細胞の転移に強く関与することがわかってきた。一方、シアル酸を含む糖脂質、ガングリオシドは様々な癌細胞に特徴的に発現して、癌関連糖脂質として癌マーカーとなる。私たちは糖転移酵素遺伝子の人為的操作に基づく糖鎖改変癌細胞により、糖脂質の機能と作用機構を明らかにしてきた。その結果、ガングリオシドが癌細胞の脂質ラフトを介したシグナル伝達によって細胞増殖、浸潤、転移等の悪性形質増強に働くことが示された。脂質ラフトとは、細胞膜上でコレステロールやガングリオシドを含むスフィンゴ脂質が集積したマイクロドメインであり、様々なシグナル伝達分子が会合して、細胞のシグナル調節上重要な役割を担っている。本稿では、エクソソームとガングリオシドが癌細胞でどのように機能しているかにつき最近の知見を踏まえ報告し、ガングリオシドの機能におけるエクソソームの意義を探り考察した。

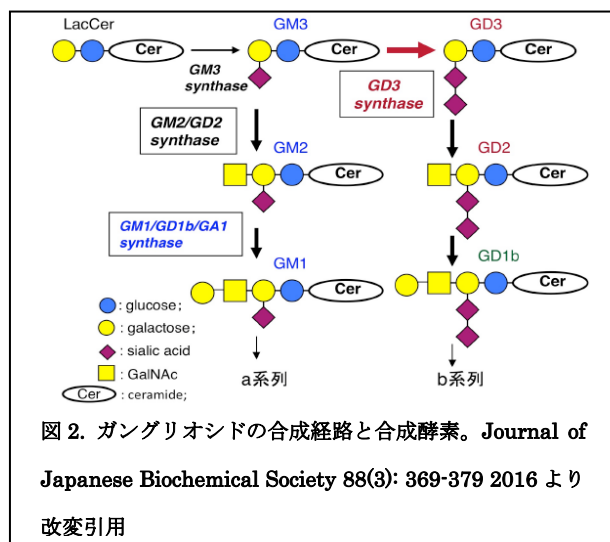
1. はじめに

近年、癌細胞をはじめ種々の細胞から分泌される細胞外小胞、エクソソームが細胞間情報伝達に重要な役割を果たすことがわかってきた。エクソソームとは、細胞のエンドソームで形成される脂質二重膜から成る小ベシクルで、種々の細胞成分を含むが、とくに microRNA を輸送することで、細胞形質の制御、癌転移の促進に働くことが続々と報告されている(1)。

一方、シアル酸を含む糖脂質、ガングリオシドは脊椎動物の神経組織に多く発現する(図 2)と共に、様々な癌細胞に特徴的に発現して、癌関連糖脂質として癌マ



カーとなる。私たちは糖転移酵素遺伝子欠損マウスの系統的な樹立と糖鎖改変細胞により、糖脂質の機能と作用機構を明らかにしてきた(2,3)。その結果、糖脂質が癌細胞の細胞増殖、浸潤、転移等の悪性形質増強に働くことが示された。重要な点は、細胞膜において糖脂質の多くがコレステロールやスフィンゴミエリンに富む脂質ラフトに局在し、同じ膜上の膜分子と会合して複合体を形成することにより、受容体/シグナル分子の局在とシグナルの制御に働くことである。



本稿では、エクソソームの基本的な機構から、これまでに報告されているがんにおける作用機序を報告する。また、細胞膜上に発現するガングリオシドの基本メカニズムを説明し、ガングリオシドによるエクソソームの制御やその作用機序について、新たな提案をしたい。

2. エクソソームと癌

エクソソームは、細胞内の小胞から作成され、細胞外に分泌される。エクソソームは初め、細胞膜上の受容体を取り込み、エンドサイトーシスによって、初期エンドソームを形成し、後期エンドソームにて、腔内膜小胞(エクソソーム)を形成する。その際に、種々の細胞成分(タンパク質、mRNA, miRNA など)を小胞に内包する。次に、多数の腔内膜小胞を多数含む多胞性エンドソームが細胞膜と融合することで、細胞外に放出される。これらのエクソソームは、組織液や血液内に放出され体液中に拡散される。エクソソームは癌細胞を含む種々の細胞から産生され、生体組織に様々な影響を及ぼすことがわかってきた。

癌転移には、転移先の臓器の特異性が存在する。特に、癌は肺、肝臓、骨、脳へと転移しやすい。このような症例から、癌の転移は、偶発的な事象によって生じるのではなく、癌細胞の種類により、転移先が決定されることが示唆される。しかし、転移先の臓器がどのように決定されるのかは、不明な点が多かった。そのような中、エクソソーム中のインテグリンが癌の転移先の education を行

い、癌に特徴的な転移臓器の決定に関わることが報告された(1)。Hoshino らは、臓器特異的に転移する癌由来のエクソソームに対し、プロテオミクス解析を行ったところ、臓器特異的に転移する癌由来のエクソソーム上には特定のインテグリンが発現していることを明らかにした。さらに、臓器特異性に対するインテグリンの発現分布の詳細を解析した結果、肺に特異的に転移する癌由来のエクソソームにはインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ が発現し、肝転移を起こす癌では $\alpha v \beta 5$ 、脳転移を起こす癌では、 $\alpha v \beta 3$ が発現することが明らかになった。これらのインテグリンが臓器特異性の原因であることを示すために、肺転移性乳癌細胞のインテグリン $\beta 4$ をノックダウンしたのち、この細胞からエクソソームを回収し、マウスに投与すると、エクソソームの肺への取り込みが低下した。また逆に、インテグリン $\beta 4$ を強制発現させた骨転移性乳癌細胞から産生されたエクソソームは骨には集積せず、肺に取り込まれることがわかった。これらの結果により、エクソソームに発現するインテグリンがエクソソームの動的制御を担う分子の一つであることが示唆された。さらに、肺転移性乳癌由来のエクソソームをマウスに前投与したのち、骨転移性乳癌を尾静脈、または心注射すると、本来骨に転移する乳癌細胞が肺に転移することが示された。これは、エクソソーム自身が、転移先の組織を転移に適した環境に education し、癌細胞の転移を誘導することを示唆している(図3)。

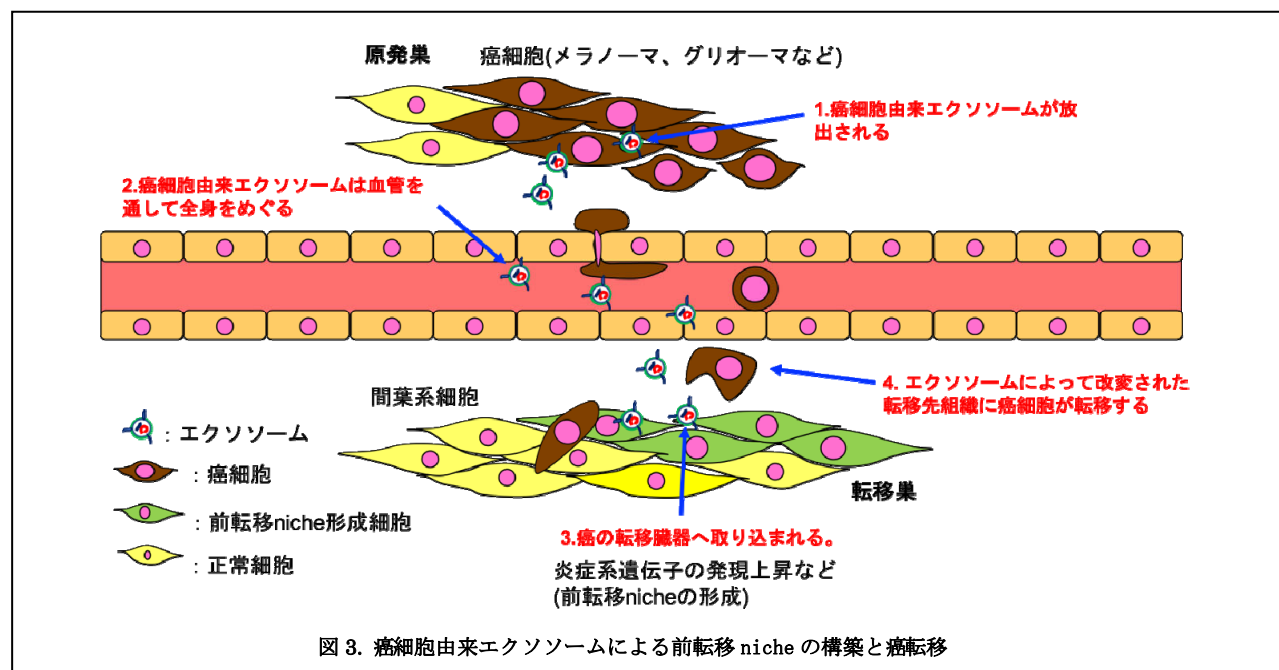


図3. 癌細胞由来エクソソームによる前転移 niche の構築と癌転移

3. ガングリオシドと癌

糖脂質は、スフィンゴシンと脂肪酸が結合したセラミドに、多岐にわたる糖が結合することで合成される。酸性スフィンゴ糖脂質の一群であるガングリオシドは、ラクトシルセラミドを基本骨格にもち、そこに酸性糖であるシアル酸を含む糖が付加する。図2にガングリオシドの合成経路を示す。ガングリオシドの糖付加は、糖転移酵素によって行われるが、これまでに、様々な研究室で、ガングリオシドを合成する糖転移酵素遺伝子群が同定された。我々はこれまでに、主にガラクトースにGalNAcを付加し、複合型ガングリオシドを合成するGM2/GD2合成酵素遺伝子(2)と、シアル酸にa2,8結合でシアル酸を付加し、GD3を合成するGD3合成酵素遺伝子(3)を単離し操作することで、ガングリオシドの発現を改変し、癌細胞におけるガングリオシドの機能を明らかにしてきた。

ガングリオシドは細胞膜上に発現し、特に、脂質ラフトと呼ばれる膜ミクロドメインに局在する。脂質ラフトとは、細胞膜上でコレステロールやスフィンゴ脂質が集積したミクロドメインであり、様々なシグナル伝達分子が会合し、細胞のシグナル調節上重要な役割を担っている(図4)。ガングリオシドは脂質ラフトの主要構成分子であり、脂質ラフトマーカーでもある(4,5)。

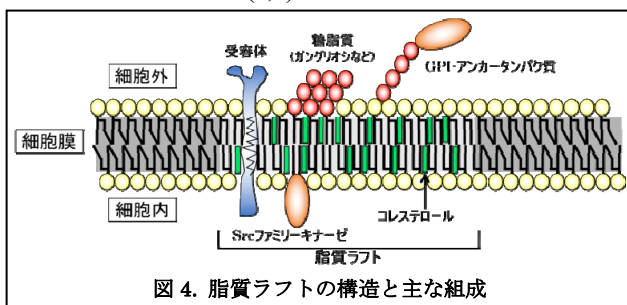


図4. 脂質ラフトの構造と主な組成

ガングリオシドの一つであるGD3は、様々な細胞で、細胞の増殖に関与することが報告されている(6-9)。メラノサイトが癌化した悪性黒色腫メラノーマは、悪性度が高く、発見が遅れた場合は転移巣を形成していることが多いため、予後が不良である。癌化の際に、ガングリオシドは、GM3からGD3にシフトし、さらに、転移巣の癌細胞にはGD3から合成されるGD2が発現していることが報告されている(図2)(10, 11)。また、小細胞性肺癌においてもGD2が発現し、脳腫瘍であるグリオーマにおいてもGD3やGD2の発現が認められる。これらの癌細胞に発現す

るガングリオシドの特徴は、正常細胞では発現していない糖鎖構造が発現してくることである。このことは、ガングリオシドが、癌細胞におけるマーカーになりうることを示唆している。

また、癌細胞に発現するガングリオシドは、癌形質に深く関与していることが明らかになってきた。これまでに我々は、種々のガングリオシドを発現するメラノーマ細胞株を作成し、メラノーマの悪性形質にガングリオシドがどのように関与するかにつき解析した。その結果、GD2発現メラノーマ細胞は、GD3発現メラノーマ細胞と同様の増殖能を有する一方、浸潤能はGM3発現メラノーマ細胞と同様に低レベルであった。一方、細胞外マトリックスであるI型コラーゲンへの接着性を検討した結果、GD2発現メラノーマ細胞では他のガングリオシド発現メラノーマ細胞に比べ、著明な接着性の亢進が示された(11)。この結果から示唆される、各ガングリオシドによるメラノーマの病態制御モデルを図5に示す。初期のメラノーマは原発巣でGD3を発現し、増殖を繰り返す、さらにGD3の関与により浸潤能を獲得する。GD3発現細胞が遠隔臓器へ転移すると、GD3を基に出現したGD2高発現細胞が、その組織への高い接着能により転移巣を形成し、増殖を繰り返す。これは、臨床標本で見られる転移巣のGD2高発現の結果に一致する。我々は、各種ガング

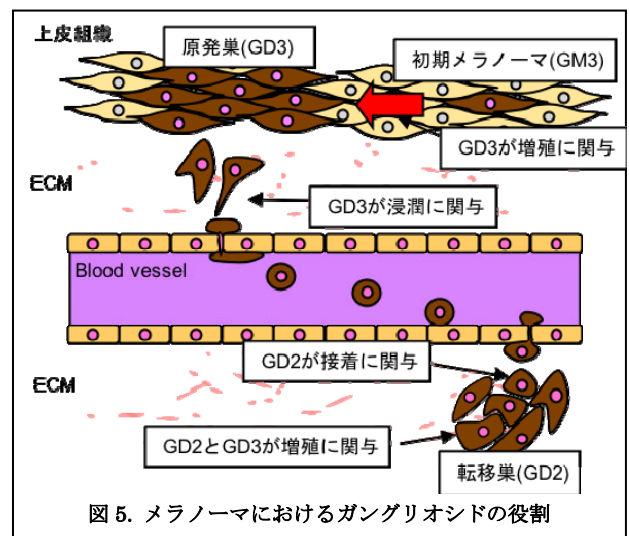


図5. メラノーマにおけるガングリオシドの役割

リオシド発現メラノーマの悪性形質がどのような機構で惹起されるのかを検討したところ、GD3発現メラノーマを牛胎児血清(FCS)で刺激すると、

GM3 発現メラノーマや GD2 発現メラノーマに比べ、細胞内シグナル伝達分子である Paxillin や p130Cas のリン酸化が亢進していることがわかった(7)。このシグナル伝達が、癌細胞の増殖性や浸潤性に関与していることが示された。また、興味深いことに、GD2 発現メラノーマでは Paxillin の Tyr181 のリン酸化が GM3 発現メラノーマ細胞よりもさらに減少した(11)。これらのシグナル伝達は、脂質ラフトを介して行われていることも明らかになった。

4. エクソソーム上のガングリオシドの役割

スフィンゴ糖脂質は、両親媒性の脂質ラフト局在分子であり、古くより細胞膜からの遊離と他細胞への再取込み・再発現が起こることが知られていた。よって、スフィンゴ糖脂質がエクソソームの膜にも存在して重要な機能を果たしていることが容易に想定される。実際、私たちの予備実験では、癌関連糖脂質を高発現する細胞由来のエクソソームが、培養液への添加によって細胞内のシグナル活性化を誘導することが分かった。よって、エクソソームにおける糖脂質の性状と機能に関して、とくに癌細胞と正常細胞を比較しながら系統的に解析し、これまで知られていない、エクソソームの形成と分泌のメカニズム、細胞への結合、取込みと再発現のプロセス、細胞形質とシグナルの制御機能に関する新規の情報が明らかになることが期待される。よってエクソソームがこれまで明らかにされてきたガングリオシドの機能のかなりの部分を担っていることを明らかにするとともに、治療の標的となりうるかを明らかにしたい。

引用文献

- (1) Hoshino A et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527, 329–335 (2015).
- (2) Nagata Y et al. Expression cloning of beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides. *J Biol Chem*. 267, 12082-12089 (1992).
- (3) Haraguchi M et al. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 10455-10459 (1994).
- (4) Simons K and Sampaio JL. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3, a004697 (2012).
- (5) Suzuki KGN et al. Unraveling of lipid raft organization in cell plasma membranes by single-molecule imaging of ganglioside probes. *Adv Exp Med Biol*. 1104, 41-58 (2018).
- (6) Fukumoto S et al. GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J Biol Chem*. Feb 25; 275(8):5832-8 (2000).
- (7) 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).
- (8) Ohkawa Y et al. Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with platelet-derived growth factor receptor α and Yes kinase. *J Biol Chem*. 290, 16043-16058 (2015).
- (9) Sarkar TR et al. Oncogene. GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. 2015 34, 2958-2967 (2000).
- (10) Hersey P et al. Expression of the gangliosides GM3, GD3 and GD2 in tissue sections of normal skin, naevi, primary and metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 41, 336-43 (1988).
- (11) Ohmi Y et al. Differential roles of gangliosides in malignant properties of melanomas. *Plos One*. 21, e0206881 (2018).

Title: Mechanism of cancer cell-derived
exosomes and glycolipids in cancers.

Author: Yuhsuke Ohmi

Address: Department of Clinical Engineering,
Chubu University College of Life and Health
Sciences, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

Keywords: Cancer, exosome, ganglioside