

乳癌悪性化に関わるHER2陽性エクソソームの選択的除去技術の開発

Selective removal technology of HER2-positive exosomes involved in breast cancer malignant transformation

鳥取大学 農学部 生命環境農学科 生体制御化学分野 准教授 岩崎 崇

要 約

エクソソームは細胞から分泌される粒径約50~100nmの膜小胞であり、さまざまな疾患の原因物質であるとされている。特にがん細胞から分泌されるエクソソームはがん細胞の浸潤・転移を促進させている。乳がんの中でも悪性が高いとされている Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 陽性乳がん細胞から分泌される「HER2陽性エクソソーム」は、周囲のがん細胞の悪性化に関わる主要な病原性因子であり、抗体医薬ハーセプチンの薬効を阻害していることが問題視されている。一方で、当研究室で発見された細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン（H16ペプチド）はさまざまな物質を細胞内のリソソームまで輸送する能力を有している。そこで本研究では、H16ペプチドを用いて血中からHER2陽性エクソソームを選択的に除去する技術基盤の開発を試みた。本研究では、H16ペプチドをHER2陽性エクソソームに選択的に修飾して、細胞内リソソームへ輸送するために、抗HER2抗体由来の単鎖低分子抗体である Nanobody (Nb) を利用した。H16ペプチドを修飾したNb (Nb-H16) を遺伝子工学的に調製し、HER2陽性乳がん細胞 (SKBR3細胞) から分泌されたHER2陽性エクソソームとNb-H16の選択的結合を確認した。また、Nb-H16によって細胞内へ輸送されたHER2陽性エクソソームは、リソソームに集積した後で分解されることを明らかにした。さらに、Nb-H16によってHER2陽性エクソソームが選択的に除去されることで、抗体医薬ハーセプチンの薬効が改善することを確認した。以上の結果より、HER2陽性エクソソームを選択的に除去（分解誘導）する技術の開発に成功した。

緒 言

1-1. エクソソームと乳がん

現在、エクソソーム（細胞から分泌される粒径約50~100nmの膜小胞）と疾患は密接に関係していることが明らかになっている。特にエクソソームが大きく関与している疾患として、乳がんが挙げられる。細胞表面に Human Epidermal Growth Factor Receptor Type2 (HER2) を高発現しているHER2陽性乳がんは生存率が低いことが知られており、HER2陽性乳がんに対する治療薬として、HER2を標的とした抗体医薬（抗HER2抗体：ハーセプチン）が使用されている。しかし近年、乳がん細胞から分泌されるHER2陽性エクソソームが、抗体医薬と結合することでその薬効を弱めていること¹や、周囲の乳がん細胞の浸潤・転移を活性化すること²が報告されている。乳がん細胞から分泌されるHER2陽性エクソ

ソームは、乳がんの難治性・悪化に関与している重要な原因物質である。そこで本研究では、HER2陽性エクソソームを標的としたエクソソームの選択的除去技術の開発を目指した。

1-2. エクソソームの選択的除去技術を実現するための戦略

本研究ではHER2陽性エクソソームの選択的除去技術を実現するために、我々が独自に開発した細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン（H16ペプチド）」を利用した。H16ペプチドはヒスチジン16残基からなる細胞膜透過ペプチドであり、非常に高い細胞膜透過を示すと同時に、高い血中安定性を示す^{3,4}。また、H16ペプチドは高分子リポソーム（粒径約100nmの膜小胞）を細胞内のリソソームに輸送する能力を有している⁵。すなわち、H16ペプチドは膜小胞をリ

ソソーム内に輸送できる有力な分子輸送キャリアーである。

そこで本研究では、HER2陽性エクソソームの選択的除去技術を開発するために、H16ペプチドをリソソーム輸送キャリアーとして利用した。本研究では、HER2に選択的に結合する抗HER2抗体にH16ペプチドを融合した抗体を作製し、HER2陽性エクソソームに対してH16ペプチドを修飾することで、HER2陽性エクソソームをリソソームで選択的に分解する手法を考案し、実証を試みた。

方法

2-1. H16ペプチド修飾抗HER2抗体の作製

本研究では、抗HER2抗体として、抗HER2抗体由来の単鎖低分子抗体であるNanobody (Nb) を使用した。NbのC末端に細胞膜透過性を有するH16ペプチドと、非膜透過性のFLAGペプチドをそれぞれ融合したNb-H16およびNb-FLAGを設計し、発現プラスミドを構築した(図1A)。Nb-H16およびNb-FLAGの発現に際しては、大腸菌SHuffle®T7 Express lysY Competent *E. coli* (New England BioLabs) をホストとして使用した。組換えタンパク質として発現したNb-H16およびNb-FLAGは、His trap FF crude (Cytiva) またはDDDDK-tagged Protein PURIFICATION GEL (MBL) を用いたアフィニティー精製により精製・調製した。

2-2. 供試細胞

本研究ではHER2陰性エクソソームを分泌するHER2陰性ヒト乳がん細胞MCF-7 (RCB1904: 理研より購入) と、HER2陽性エクソソームを分泌するHER2陽性ヒト乳がん細胞SKBR3 (ATCC HTB-30: ATCCより購入) を供試細胞として使用した。MCF-7細胞およびSKBR3細胞は、それぞれMEM培地およびMcCoy's 5A培地を使用した。各培地は、ウシ胎児血清 (FBS) 10%、Penicillin100units/mL、Streptomycin100 μ g/mL、AmphotericinB250 μ g/mL、ピルビン酸ナトリウム1mM、非必須アミノ酸0.1mMを含有する状態で使用した。37°C、5.0%CO₂条件下で培養した。

2-3. mCherry修飾HER2陰性／陽性エクソソームの調製と定量

蛍光修飾エクソソームをヒト培養細胞で発現させ

るために、エクソソーム膜表面に豊富に存在するCD9 (Tetraspanin) に、赤色蛍光タンパク質mCherryを融合したCD9-mCherry発現プラスミド (Addgene #55013) を使用した。MCF-7細胞およびSKBR3細胞にCD9-mCherry発現プラスミドをトランスフェクションし、48h後の培養上清から、エクソソーム回収試薬ExoQuick-TC (System Bioscience) を用いてmCherry修飾HER2陰性／陽性エクソソームを得た。これらのmCherry修飾したエクソソーム量については、蛍光プレートリーダーInfinite Pro200 (Tecan) にて定量した。

2-4. エクソソームの細胞内輸送の評価

24well plate (TrueLine) またはガラスボトムシャーレAdvanced TC (Greiner) に、HER2陽性ヒト乳がん細胞SKBR3を1.0 \times 10⁵cells/wellまたは1.0 \times 10⁴cells/wellとなるように播種した。24hインキュベーション後、Nb-H16またはNb-FLAGとmCherry修飾HER2陰性／陽性エクソソームの混合液を細胞に添加し、さらに24hインキュベーションした。その後、緩衝液でSKBR3細胞を洗浄した。フローサイトメーター測定の場合は、0.05%トリプシン処理により剥離した細胞をフローサイトメーターBD FACScant II (日本ベクトン・ディッキンソン社) を用いて細胞内の蛍光量を測定した。また蛍光顕微鏡観察の場合は、Hoechst 33342 (富士フイルム和光純薬) とLysoTracker™ Green DND-99 (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いて核とリソソームを蛍光染色し、蛍光顕微鏡BZ-X810 (キーエンス) で観察した。

2-5. 細胞生存率の測定

96well plate (TrueLine) にHER2陽性ヒト乳がん細胞SKBR3を1.0 \times 10⁴cells/wellとなるように播種した。Nb-H16またはNb-FLAGを添加して12h前処理した後、抗体医薬ハーセプチンをSKBR3細胞に添加し、24hインキュベーションした。Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を1/10量添加し、3hインキュベーションした。その後、プレートリーダーInfinite Pro 200 (Tecan) にて450nmの吸光度を測定することで、抗体医薬ハーセプチンの薬効を評価した。

結果

3-1. Nb-H16およびNb-FLAGの調製と機能評価

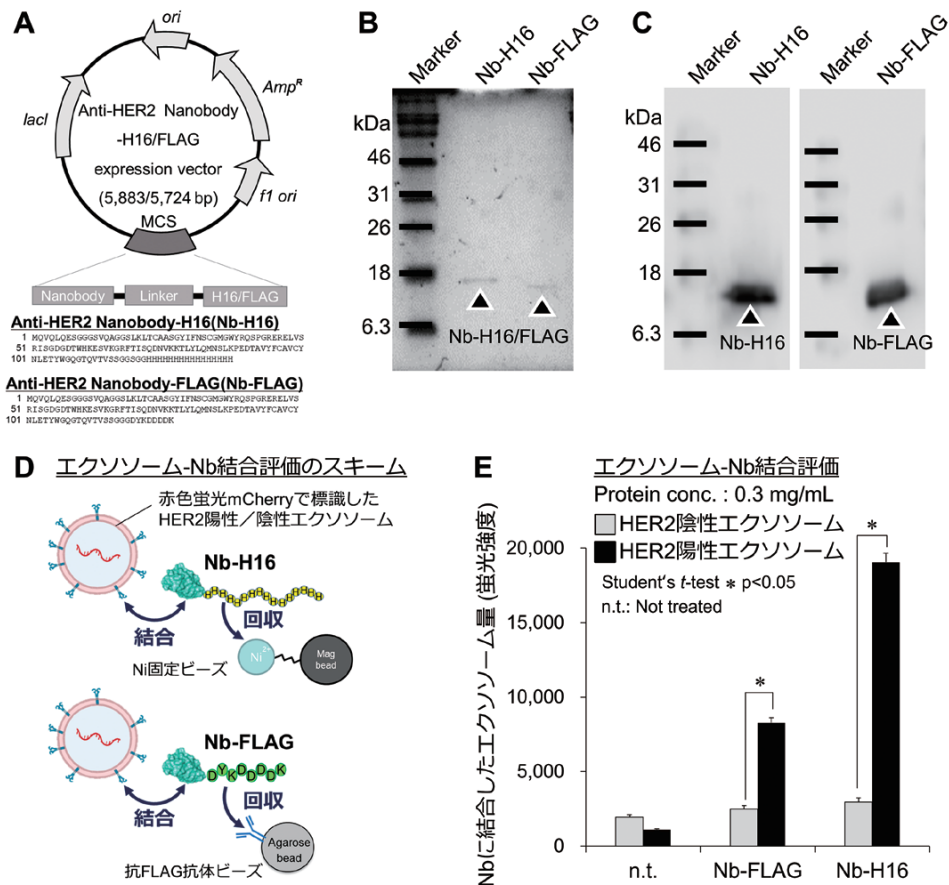


図1. (A)Nb-H16およびNb-FLAG発現プラスミドのコンストラクション、(B)(C)アフィニティー精製したNb-H16およびNb-FLAGのSDS-PAGEならびにウエスタンブロットティングの泳動写真、(D)Nb-H16およびNb-FLAGとHER2陰性/陽性エクソソームの結合評価のスキーム、(E)Nb-H16およびNb-FLAGとHER2陰性/陽性エクソソームの結合量を示す

大腸菌 SHuffle® T7 Express lysY Competent *E. coli* を用いた発現系と、アフィニティー精製により、Nb-H16およびNb-FLAGを高純度で精製した(図1B, C)。さらに、アフィニティー精製ビーズを用いた評価系(図1D)により、HER2陽性エクソソームと選択的に結合することを確認した(図1E)。

3-2. Nb-H16によるHER2陽性エクソソームの細胞内輸送

Nb-H16はHER2陽性エクソソームを選択的に細胞内へ輸送し、培養上清中のHER2陽性エクソソームを選択的に除去することが確認された(図2A)。さらに、Nb-H16によって細胞内輸送されたHER2陽性エクソソームは、細胞内のリソソームに集積することが確認された(図2B)。

3-3. Nb-H16によるHER2陽性エクソソームのリソソーム分解誘導

Nb-H16によって細胞内輸送されたHER2陽性エクソソーム量は、経時的に減少することが確認された(図3A)。蛍光顕微鏡観察からも、Nb-H16によってリソソームに輸送されたHER2陽性エクソソーム量が経時的に分解されていることが確認された(図3B)。

3-4. Nb-H16による抗体医薬の薬効改善

HER2陽性乳がん細胞にNb-H16を前処理することで、HER2陽性エクソソームを選択的に除去し、その後で抗体医薬ハーセプチンの薬効改善を評価した(図4A)。その結果、10~100 μ g/mLのNb-H16で前処理を行った場合、抗体医薬ハーセプチンの薬効改善が確認された(図4B)。

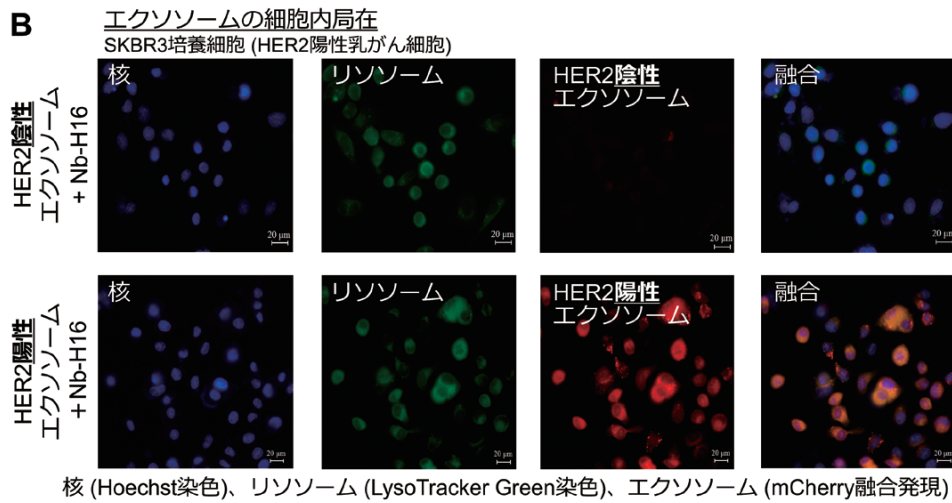
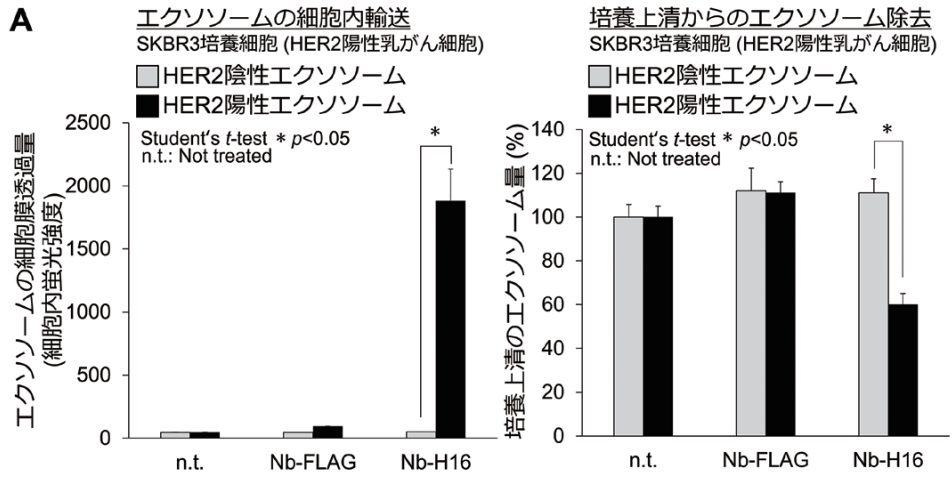


図2. (A)Nb-H16によるHER2陽性エクソソームの細胞内輸送と培養上清からの除去量、(B)Nb-H16によって細胞内輸送されたHER2陽性エクソソームの細胞内局在を示す

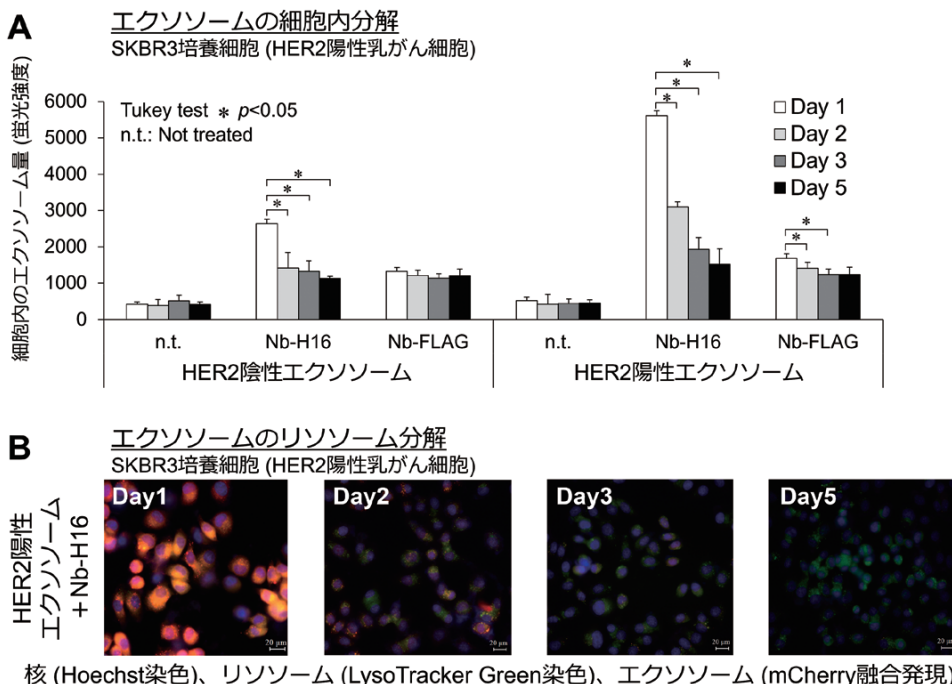
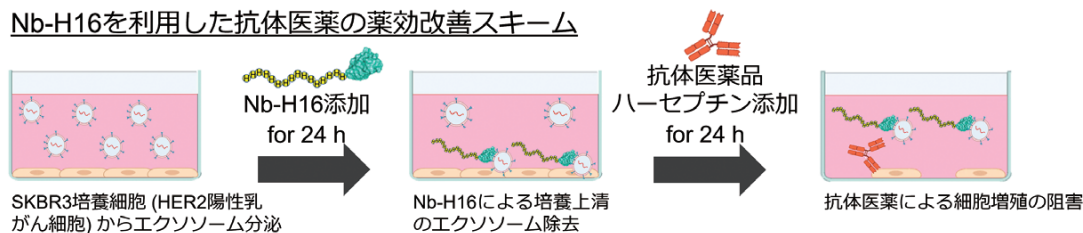


図3. (A)Nb-H16によって細胞内輸送されたHER2陽性エクソソームの経時的減少、ならびに (B) 経時的なリソソーム分解を示す

A Nb-H16を利用した抗体医薬の薬効改善スキーム



B Nb-H16による抗体医薬の薬効改善の評価

SKBR3培養細胞 (HER2陽性乳がん細胞)

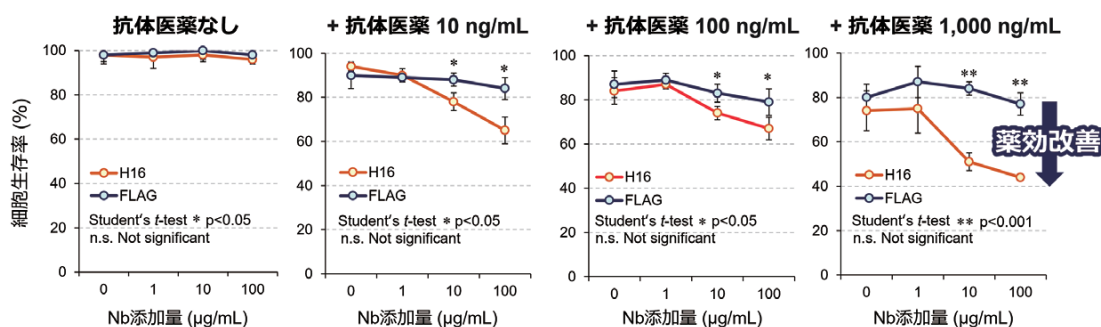


図4. (A)Nb-H16を利用した抗体医薬の薬効改善の検証スキーム、ならびに (B)Nb-H16による抗体医薬の薬効改善の実証を示す

考察

本研究では、Nb-H16を利用したエクソソーム除去技術を開発し、*in vitro*試験系においてHER2陽性エクソソームの選択的除去に成功した。*in vivo*においても同様の実証をすることができれば、HER2陽性乳がんに対する抗体医薬の薬効改善ならびに、HER2陽性乳がんの悪化阻止への応用展開が期待される。

また、本研究ではHER2を標的とするNb-H16を利用してHER2陽性エクソソームの選択的除去を実証したが、今後はNb (抗体) 部位を変更することで、HER2以外の分子を表出したエクソソームの除去が可能になる。冒頭でも述べたように、エクソソームと疾患は密接に関係していることが明らかになっており、がんに限らず、アルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病といった幅広い疾患の悪性化因子としてエクソソームは注目されている。Nb-H16を利用したエクソソームの選択的除去技術により、こ

のような疾患に関連するエクソソームを選択的に生体内で除去することができれば、新たな治療戦略の扉を開くことができると考えている。

参考文献

1. Ciravolo, V., Huber, V., Ghedini, G.C., et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J. Cell. Physiol.* 2012, 227, 658-667.
2. Wang, T., Gilkes, D.M., Takano, N., et al. Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, 111, E3234-E3242.
3. 特許第6202707号：新規細胞膜透過ペプチド
4. Iwasaki, T., Tokuda, Y., Kotake, A., et al. Cellular uptake and *in vivo* distribution of polyhistidine peptides. *J. Control. Release* 2015, 210, 115-124.
5. Hayashi, T., Shinagawa, M., Kawano, T., Iwasaki, T. Drug delivery using polyhistidine peptide-modified liposomes that target endogenous lysosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 501, 648-653.

Abstract

Exosomes are closely associated with various diseases. Especially, HER2-positive exosomes secreted from HER2-positive breast cancer cells are problematic pathogenic factors that impair the antibody drugs and promote the metastasis of surrounding cancer cells. Selective removal of HER2-positive exosomes from the blood effectively solves this problem. Polyhistidine peptide (H16 peptide), a new cell-penetrating peptide developed in our previous study, shows high cellular uptake and effectively transports various molecules to lysosomes. Here, we attempted to develop an exosome-knockdown method to transport HER2-positive exosomes to intracellular lysosomes selectively using H16 peptide-modified antibodies and induce lysosomal degradation.

To develop the exosome-knockdown method, we used H16 peptide-fused anti-HER2 nanobody (Nb-H16) as a specific carrier for HER2-positive exosomes to lysosomes. The Nb-H16 selectively bound to HER2-positive exosomes and transported extracellular HER2-positive exosomes into human breast cancer SKBR3 cells. The Nb-H16 also selectively reduced the amounts of HER2-positive exosomes in the culture medium. Furthermore, extracellular HER2-positive exosomes were transported to intracellular lysosomes and degraded by Nb-H16. Finally, Nb-H16 restored the medicinal effects of the antibody drug. Based on these results, we have successfully established the exosome-knockdown method using H16 peptide.