

【目的】細胞外小胞 (Extracellular vesicles : EVs) は、癌細胞が放出し、癌周囲の線維化や血管新生、転移など、癌微小環境を調節するモジュールとして注目されている。しかし、多くの実験が培養細胞を主としており、臨床の状態を反映しているか疑問の余地がある。そこで本研究では、新たな概念として、手術検体から組織由来 EVs (Tissue-exudative EVs : Te-EVs) を抽出し、形態や機能を解析することで Te-EVs を介した癌の病態や進展機構を解明することを第一の目標に設定した。更に、Te-EVs 中で特異的に発現する分子を同定し、EVs を標的とした創薬開発に向けた基盤を構築することを第二の目標とした。

【方法】より効率的な抽出方法の確立や、多数の予備検討を可能にするために、当施設で試料を豊富に採取することができる大腸癌を研究の対象疾患に設定した。Te-EVs の抽出方法をより最適にするための条件を検討し、抽出方法を決定した。また、内包されている遺伝子産物の機能解析に進む前段階として Nano Sight を用いた粒度分布解析や、透過電子顕微鏡 (TEM) 走査電子顕微鏡 (SEM) を用いた微細構造の観察を実施し、Te-EVs の形態学的特徴を追求した。これらの形態学的観察で得られた Te-EVs の由来器官を探索するために手術切片組織を、TEM を用いて観察した。さらに、既知の EVs マーカーの発現をウェスタンブロッティング法で検討した。さらに、Te-EVs を 10,000 g、100,000 g の 2 段階で回収し、各々、Small Te-EVs、Large Te-EVs として大別し、癌部、非癌部の比較および、内包される遺伝子産物に関して RNAseq を実施し、miRNA を中心とした RNA の発現解析および機能解析を実施した。また、抗体ファージライブラリーを活用したバイオパンニングを実施し、大腸癌由来 Te-EVs を特徴的に認識する抗体の同定を試みた。

【結果】組織採取後に EVs 回収用の FBS を添加し、37℃で 3 時間培養することで Te-EVs の回収量がより増加した。粒度分布は 120 nm 付近にピークがあり、全体としては、癌部・非癌部由来 Te-EVs 間で大きな粒子径の差を認めなかった。SEM でも主として同様のサイズの粒子が観察された。一方、TEM では大きさや形状に様々な種類の小胞が顕著に観察された。高倍率の観察では、一部に羽状構造を有する Te-EVs が観察された。また、手術切片組織内にも形態の酷似した小胞が観察された。この小胞は、粗面小胞体や Golgi 体近傍に観察される傾向にあった。EVs マーカーの発現解析では、テトラスパンニンとして CD9 の発現が比較的容易に同定された。既報で大腸癌由来 EVs に発現していた CD147 も腫瘍由来 Te-EVs に高発現している傾向であった。Small、Large Te-EVs に大別した解析では、Te-EVs の粒子数は癌部由来 Te-EVs に多い傾向を認めた。含有されている small RNA の濃度は癌部由来 Te-EVs に多い傾向にあった。RNAseq の解析では、癌部、非癌部由来 Te-EVs で発現傾向に明らかな差異を認めた。癌部由来 Te-EVs で特異的に含有量が増加する miRNA を探索し、Small、Large 何れでも癌部由来 Te-EVs で発現量の多い miRNA を 6 種同定した。この内、大腸癌細胞株由来の EVs にも発現しており癌部由来 Large Te-EVs で変化率の大きい miR-20a-5p に関して機能解析を進めた。癌部由来 Large Te-EVs 中の miR-20a-5p の発現量は、病期の進行に沿って増加する傾向を認めた。バイオパンニングからは、大腸癌部由来 Te-EVs を特異的に認識する一本鎖抗体が同定された。

本研究の概念図

