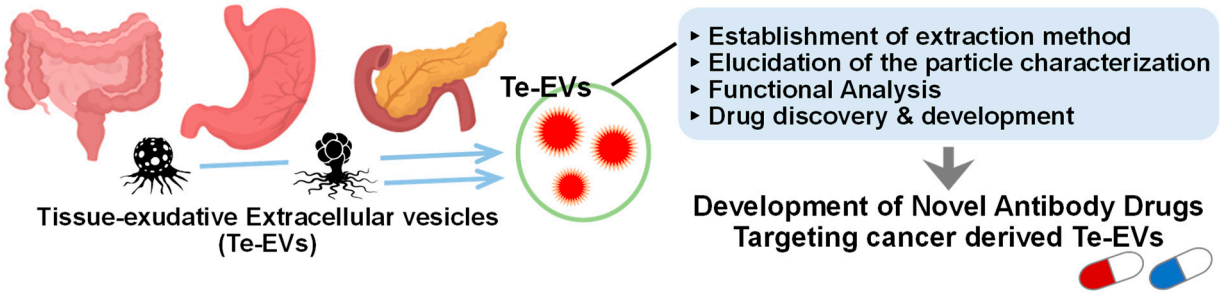
186　消化器癌組織由来細胞外小胞を標的とする新規創薬開発	谷口　高平

【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。これの小胞は、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



186. 消化器癌組織由来細胞外小胞を標的とする新規創薬開発

谷口　高平

大阪医科薬科大学 研究支援センター トランスレーショナルリサーチ部門

Key words：細胞外小胞，Extracellular vesicles，エクソソーム，マイクロベジクル，microRNA

緒　言

癌細胞が周囲に放出する小胞物質として、エクソソームやマイクロベジクルが知られているが、完全に分別することは難しく、両者をまとめ細胞外小胞（Extracellular vesicles：EVs）として扱われている。EVs 中には様々な情報伝達物質が含まれており、癌細胞が細胞間のコミュニケーションツールとして利用するとされている。我々も早期から EVs に着目し研究を進めてきた。近年は、胃癌患者の胃液 EVs に着目し研究を実施するなど、特に、ヒト試料中の EVs に研究の焦点を当ててきた［1］。この背景には、現在の EVs に関する研究の大きな課題として「多くの実験が細胞株を用いた実験であり、真に臨床を反映しているか疑問である」ということが挙げられる。時を同じくして、共同研究者の研究室から、腎細胞癌の組織由来 EVs（Tissue-exudative EVs：Te-EVs）に関する研究成果が報告された［2］。そこで、この新しい Te-EVs を抽出する手法を取り入れ、消化器癌手術で得られる手術標本から Te-EVs を抽出し、その形態学的特徴および機能を見出し、癌の発育・進展に関する病態を解明することを第一の目標に設定し研究を開始した。また、EVs 中に内包される代表的な遺伝子産物として microRNA（miRNA）が知られており、新規バイオマーカーとして活用することが期待されている。本研究では、miRNA の発現解析に加え、癌部由来 Te-EVs に特異的に発現する分子を同定し、癌部由来 Te-EVs を標的とした創薬開発に展開させることを研究成果の臨床導出の目標として設定し、既存の研究と差別化を図ることを念頭に研究を進める方針とした。

方法および結果

1.　Te-EVs の抽出方法

手術検体の辺縁部の組織を迅速に一部切除し、培養液（D-MEM／high glucose）に、エクソソームを除去したウシ胎児血清を添加し、約 3 時間インキュベートした後に、超遠心法により十分な Te-EVs を回収することができた（図 1）。

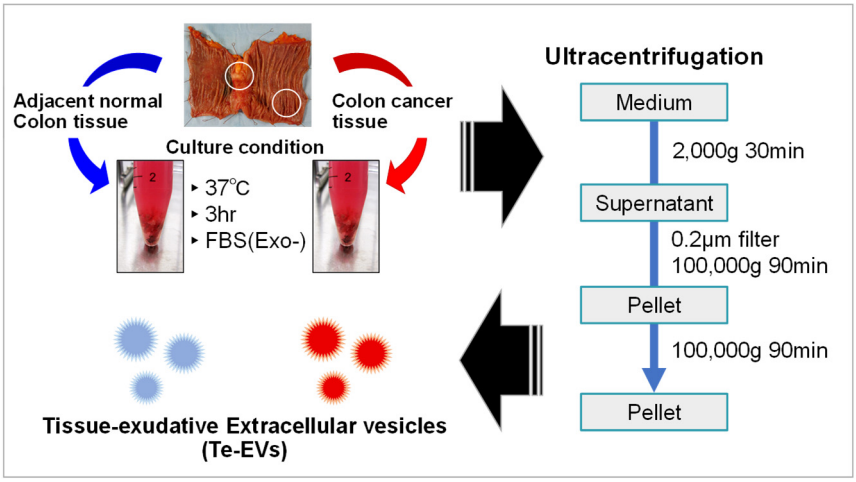


図 1.　組織由来細胞外小胞の抽出方法の概略図

2. 粒度分布の解析

Nano Sight を用いて粒度分布を解析したところ、約 120 nm 付近にピークが同定された。全体としては、癌部、非癌部由来 Te-EVs に粒子径の差は認めなかった（図 2）。

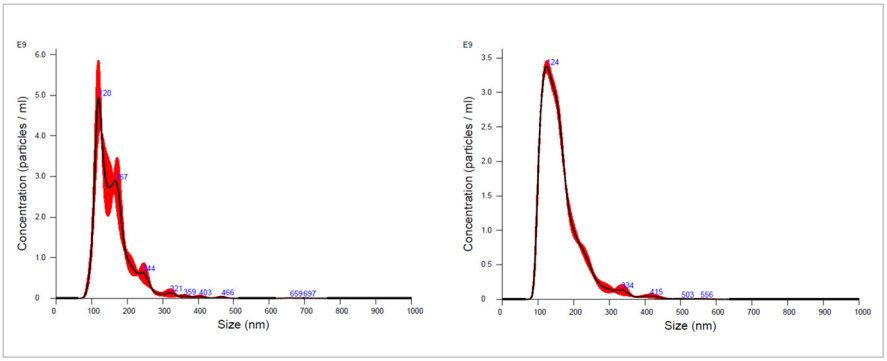


図 2. Nano Sight による Te-EVs の粒度分布解析

左は非癌部由来 Te-EVs、右は癌部由来 Te-EVs の結果を示す。

3. 電子顕微鏡による Te-EVs の観察

先ず、SEM を用いて Te-EVs の観察を試みた。ポリエチレンビーズに接着させた Te-EVs が観察された。粒子径は Nano Sight の結果に類似していた（図 3a）。次に、TEM による観察を実施した。ネガティブ染色では大小様々な Te-EVs が観察され、一部、羽状構造を有する EVs が存在した。粒子径は Nano Sight の粒度分布の範囲内に概ね一致していた（図 3b）。

4. 電子顕微鏡による手術切片組織の観察

これまでに観察された Te-EVs が組織内にも存在するかを TEM で観察したところ、同様の羽状構造を有する小胞が観察された。興味深いことに、粗面小胞体や Golgi 体近傍に小胞が存在し、一部の小胞は Multivesicular body（MVB）を有していなかった（図 3c）。

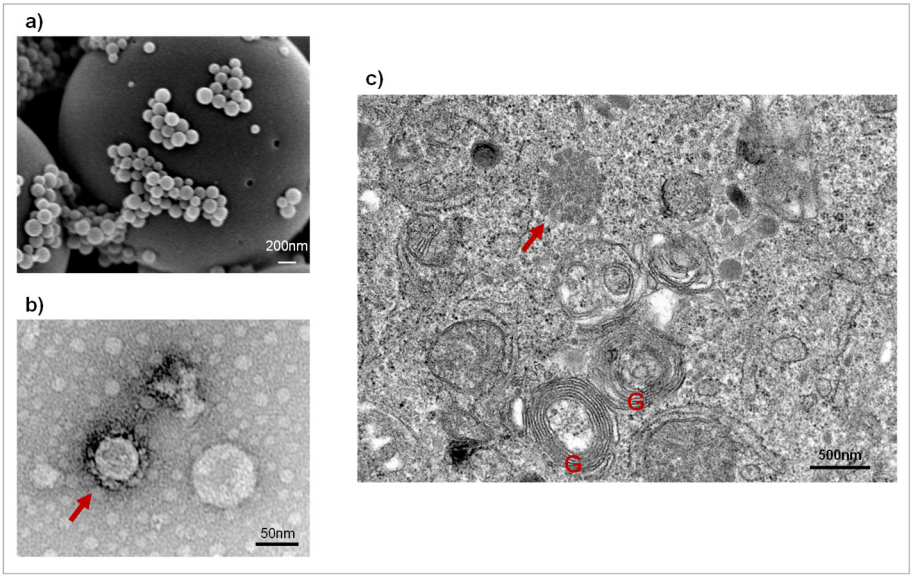


図 3. 電子顕微鏡による Te-EVs の観察

a） SEM による Te-EVs の観察。

b） TEM による Te-EVs の観察、羽状構造を有する EVs が観察された（赤矢）。

c） TEM による手術切片組織の観察、G：ゴルジ体、赤矢印：MVB を有さない EVs。

5. EVs マーカーの発現解析

エクソソームマーカー抗体がスポットされたメンブレンでマーカーのアレイ解析を実施したが、Te-EVs に対するスポットを同定することは出来なかった。そこで、いくつかの EVs マーカーに対して個別にウェスタンブロッティング法で発現を解析したところ、CD9 の発現が比較的容易に観察された。また、大腸癌由来 EVs に発現の高進が報告されていた CD147［3］は癌部由来 Te-EVs に発現が顕著な傾向にあった（図 4）。

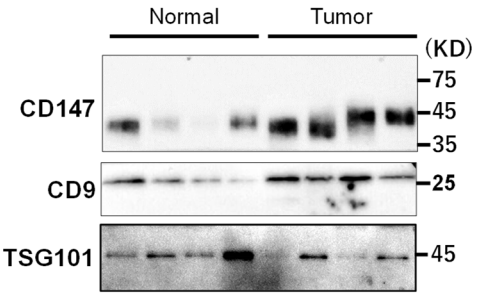


図 4. EVs のマーカーの発現解析

テトラスパニンを中心とした EVs マーカー分子の発現を認めた。

6. Te-EVs の粒子径別の解析

ここまでの結果で大小様々な粒子径の Te-EVs が観察されたこと、EVs の研究では取り分け小さい粒子径（エクソソーム）の研究が盛んであり、大きい粒子径の EVs の研究が進んでいないことを考慮し、Te-EVs の回収を 10,000 g、100,000 g の 2 段階で実施し、Small Te-EVs および、Large Te-EVs に大別した上で特徴を探索した。組織重量あたりに放出される Te-EVs の粒子数を比較したところ、Large Te-EVs では特に、癌部由来 Te-EVs の方が粒子数の多い傾向にあった（図 5a）。また粒子径は、癌部由来 Te-EVs に大きい傾向を認めた（図 5b）。

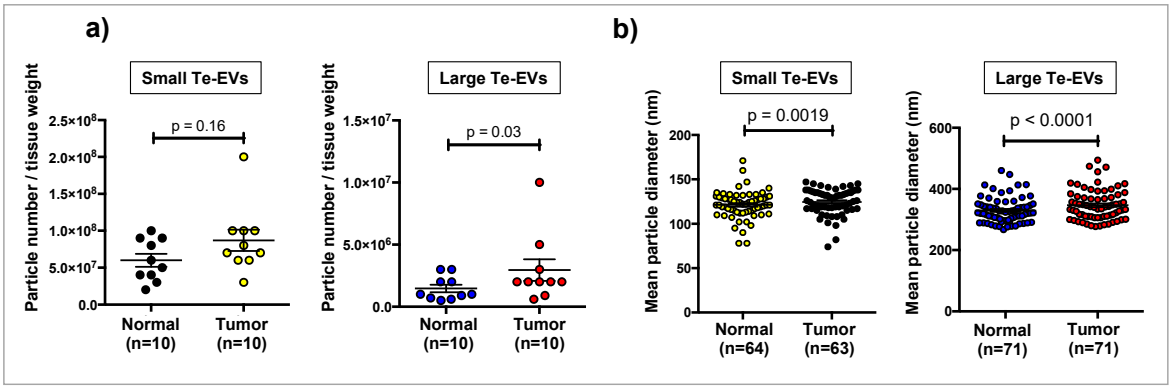


図 5. 粒子を大別し実施した Te-EVs 粒子の特徴

a）組織重量で補正した際の粒子数の比較。

b）Small, Large に大別した際の平均粒子径の比較。

Data are means ±S.E.M. *P* value calculated by Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

7. Te-EVs に内包される RNA に関する解析

次に Te-EVs に内包される遺伝子産物（RNA）に対する検討を行った。癌部、非癌部由来の Te-EVs 中に含有される RNA の濃度を比較したところ、Small、Large Te-EVs 共に癌部由来 Te-EVs 中の RNA 濃度が高いことが示された。RNA seq 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。次に、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 Te-EVs 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、特に癌部由来 Te-EVs（Large）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 の発現量を、RT-PCR で癌の病期別に検討したところ病期の進行に沿って発現量が増加する傾向を認めた（図 6a）。

8. Te-EVs に内包される RNA に関する解析

最後に、大腸癌組織 Te-EVs を特徴的に認識する抗体を同定するために、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（図 6b）。

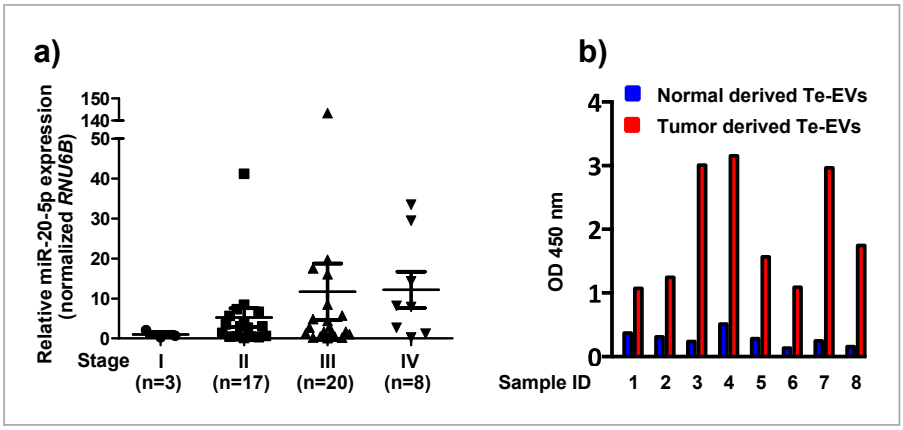


図 6. 着目した microRNA の発現解析および、同定した抗体に関する検証結果

a）miR-20a-5p の各病期の癌部由来 large Te-EVs 中の発現

b）同定した癌部由来 Te-EVs に特異的な抗体に対する Te-EVs の反応性

考　察

本研究では、EVs を実臨床の試料から抽出し、その特徴や機能を解析することに取り組んだ。EVs にはエクソソーム、微小小胞体だけでなく、アポトーシス小体も含まれることから、臨床試料の viability に特に気を配る必要性がある。今回の検討では、切除した組織に FBS を添加し、一定時間の培養を付加することによって解析に足りえる量の Te-EVs を回収することができた。しかし、手術により阻血状態に至っている試料であるため、実際にどのような EVs の区分を見ているのかという点に関しては慎重に研究を進める必要がある。EVs の研究では、とりわけ癌の微小環境や、転移性ニッチの形成能に対する EVs の役割を検討する研究が先行しているが、肉眼で見えない小胞を相手にしており、形態学的手法を駆使し、可視化して検証を進めることが重要である。その意味で、SEM, TEM といった実験手法が EVs の存在を実感する為に特に有用であると考えている。本検討では、組織内を TEM で改めて観察し、組織内に確かに、羽状構造を有する小胞が観察された。小胞は、粗面小胞体や Golgi 体近傍に存在しており、一部の小胞は MVB を有していなかった。このことから、全ての EVs が、エンドソームが内側にくびれ Intraluminal membrane vesicle を形成する過程を通過せず、MVB を経由しない EVs の存在が示唆されるが、全容を解明するには至っていない。Te-EVs を含め「EVs がどこからきて、どこへ行くのか」という問いに対しては更なる検証が必要である。

一方で、EVs が存在し細胞外へ放出されることはもはや明白であるため、その機能や、Te-EVs を臨床に応用する研究の取り組みは重要である。本研究では、エクソソームを中心とした Small Te-EVs の実験に加え、粒子径の大きな Te-EVs にも着目し研究を進めた。粒子数や、Te-EVs 中に含まれる RNA 量に関しては、非癌部に比べ、癌部由来 Te-EVs に多い傾向を認めたことや、RNA seq の結果から、癌部、非癌部で内包されている RNA 群に差異があることから、癌が生体内で EVs を巧みに利用し自己に有益な環境を創り出しているという想定には合致する傾向にあった。今回、我々が着目した miR-20a-5p に関しても、更に機能を追求していく価値を有した miRNA であると認識している。

最も重要なことは多くの EVs 及び Te-EVs の研究成果を臨床に還元することである。EVs を臨床に応用する取り組みでは、先ずは診断・予後予測・薬剤効果予測などのバイオマーカーに応用することが挙げられるだろう。今回の研究では、それに加え癌由来 Te-EVs 特異的な分子を同定し、それを治療標的とした創薬を開発することを最終の目標に据えている。癌の微小環境の構築や、転移性ニッチの形成など、手術や既存の薬物治療で克服が困難な癌の機能を、癌特異的 Te-EVs を制御することで克服できるかもしれない。今回の検討からも大腸癌部由来 Te-EVs を特異的に認識する一本鎖抗体を同定しており、この抗体を基軸に新たな抗体医薬の産出に向けた検討を行いたいと考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野の辻川和丈先生、神宮司健太郎先生、大阪大学免疫学フロンティア研究センターの奥崎大介先生、大阪医科薬科大学一般・消化器外科学教室の伊藤裕子先生、高野義章先生である。

文　献

1) Kagota S, Taniguchi K, Lee SW, Ito Y, Kuranaga Y, Hashiguchi Y, et al. Analysis of Extracellular Vesicles in Gastric Juice from Gastric Cancer Patients. Int J Mol Sci. 2019;20(4). Epub 2019/03/01. doi: 10.3390/ijms20040953. PubMed PMID: 30813244; PubMed Central PMCID: PMCPMC6412909.
2) Jingushi K, Uemura M, Ohnishi N, Nakata W, Fujita K, Naito T, et al. Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin. Int J Cancer. 2018;142(3):607-17. Epub 2017/10/05. doi: 10.1002/ijc.31080. PubMed PMID: 28975613.
3) Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun. 2014;5:3591. Epub 2014/04/09. doi: 10.1038/ncomms4591. PubMed PMID: 24710016; PubMed Central PMCID: PMCPMC3988821.