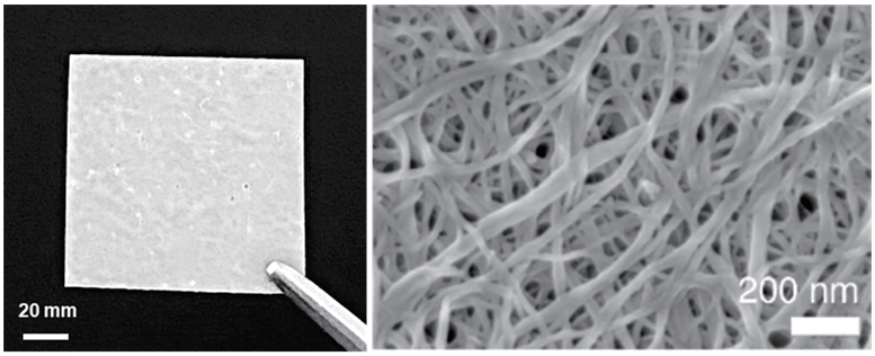
195　がん微小環境における革新的エクソソーム不均一性解析	横井　暁

【目的】本研究は、エクソソームを始めとした細胞外小胞（Extracellular Vesicle：EV）を対象とし、従来の技術では EV の回収が困難であった極めて微量な体液から、特殊なマテリアルシート（EV シート）を用いて回収・解析する新たな手法を開発することを目的とする。EV が生理活性をもった分子を搭載し細胞間を水平移動することで、細胞間相互作用に関与することが 2007 年に報告されて以降、急速に研究が進み、現在では世界各地で EV の基礎的研究からトランスレーショナル研究まで盛んにおこなわれている。我々は、EV シートという新たしいマテリアルを用いてわずか 10 μ L の血清から、EV シートは効率的に EV を回収できる新たなツールを開発した。さらに、湿潤した臓器、とりわけ腹水からの回収も可能である。EV シートは、これまで単一の体液とされていた腹水 EV を、より解像度高く、位置情報という新しい観点からの Heterogeneity 解析を行えるという点において革新的手法である。本研究では、この生体内における体液の不均一性を、EV シートを用いることで明らかにし、がんの進展度に応じた挙動を体液が起こし得るのか、またその変化は癌悪性化においてどのような意義をもつか、さらにはその変化を標的として治療戦略の提唱を目指す。

【方法】EV シートを用いて、生体内 EV 解析を行った。人の体液、血清、腹水、唾液、尿を対象として、検討を行った。EV シート用いて補足・回収した EV は、電子顕微鏡撮影、EV タンパク質マーカー検討、ナノ粒子解析装置を用いて解析を行い、EV 関連核酸、主には miRNA を対象とするが、RNA は次世代シーケンサーを用いて解析を行った。対象疾患モデルとして卵巣がんを設定し、マウスでの検討も行った。

【結果】EV シートによって回収した EV から RNA を抽出し、Small RNA シーケンスを行ったところ、再現性よく miRNA プロファイルが取得できることが確認され、EV に関連しないフリーの miRNA は除去できていることも確認した。マウス微量腹水から回収した EV も解析可能であり、微量腹水中 EV には超早期でもがんのプロファイルを有した EV が確認できた。ヒト腫瘍組織からの回収にも成功し、これまで解析できなかった腫瘍表面のエクソソーム中の分子プロファイルが解析可能となった。現在、生体内からの直接採取による検討を行っている。

微量体液からのエクソソーム回収のためのEVシート



1 cm角EVシートの写真　　EVシートの繊維（電顕像）

195. がん微小環境における革新的エクソソーム不均一性解析

横井　暁

名古屋大学 医学部附属病院 産科婦人科

Key words：エクソソーム，細胞外小胞，Extracellular Vesicle，EV シート，卵巣がん

緒　言

エクソソームを始めとした細胞外小胞（Extracellular Vesicle：EV）が生理活性をもった分子を搭載し細胞間を水平移動することで、細胞間相互作用に関与することが 2007 年に報告されて以降、急速に研究が進み、現在では世界各地で EV の基礎的研究からトランスレーショナル研究まで盛んにおこなわれている。著者は、がん生物学、とりわけ卵巣がんにおける EV 研究に継続的に行ってきた。卵巣がん細胞が放出する EV が、腹水中に存在し､腹膜を構成する中皮細胞をアポトーシスへ誘導することで､腹膜播種性転移促進にかかわるという機能を、世界に先駆け明らかにした［1］。また、EV 関連 miRNA を早期診断バイオマーカーとして利用する試み［2］、さらには EV に存在する DNA の生合成機構、およびその特性、さらに臨床的利用価値の研究など［3］、EV に搭載される種々の核酸を対象に、がん生物学における EV の意義の理解を目指して一貫して解析を続けてきた。腹膜播種をきたすがん患者は腹水を貯留し、腹水中の EV は癌由来のプロファイルを有していることを、著者は明らかにしてきたが、腹水を貯留しないがん患者や、良性腫瘍患者では、腹水を得ることは不可能であった。ましてや、非担癌マウスでは、腹水はほぼ存在せず、腹水中 EV の回収は不可能であった。こういった微量腹水 EV 中の疾患関連プロファイル変化はこれまで明らかにされなかった。

我々は最近、新素材によってつくられた特殊なマテリアルシート（EV シート）を開発し、EV シートを用いることにより、微量体液から EV を回収できることを見出した。本研究は、エクソソームを始めとした EV を対象とし、従来の技術では EV の回収が困難であった極めて微量な体液から、EV シートを用いて回収・解析する新たな手法を開発することを目的とする。また、本手法を用いることで、これまで EV の由来体液として血液や腹水といった単一の体液とされてきた概念から、腫瘍表面や臓側腹膜、壁側腹膜や横隔膜などといった、採取部位による EV のもつ分子プロファイルの違いを明らかにすることが可能となる。本研究では、生体内の位置情報という新しい観点からの EV 不均一性解析を行うことにより、卵巣がんにおける新たな進展メカニズムを明らかにし、臨床応用を想定した新しい知見を明らかにする。

方法および結果

1. EV シートによるエクソソーム回収

始めに EV シートのエクソソーム回収について確認した。ヒト血清 10 μL を EV シートに投与し、ファイバー内にエクソソームが回収されていることを､微粒子解析装置ナノサイトによって確認した（図 1､左図､右上図）。エクソソームの粒子数は、がん患者と非がん患者で差はなかった。次に EV シートによって回収した血清由来エクソソームから RNA を抽出し Small RNA シーケンスを行ったところ、再現性よく miRNA プロファイルが取得できることを確認した（図 1、右下図）。これらのデータから、EV シートを用いることにより、微量の体液であろうと、効率的に EV の回収、解析を行えることが見いだされた。

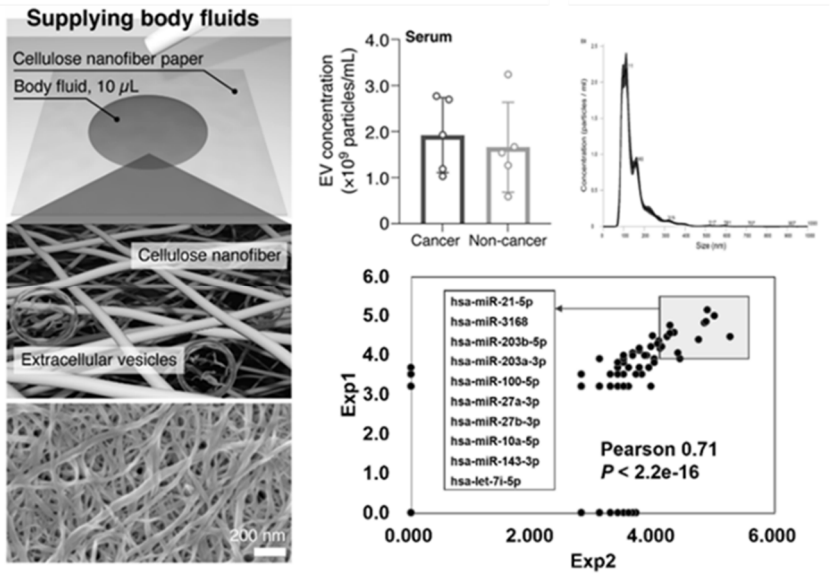


図 1. EV シートを用いた血清からの EV 回収

ファイバーにエクソソームが回収される概念図と電顕図（左図）、微粒子解析装置ナノサイトによるエクソソーム粒子数（右上図）、シーケンスによる small RNA シーケンス解析（右下図）（Pearson correlation coefficient analysis、未公開成果のため一部黒塗りとする）。

2. マウスモデルでの EV シート検討

さらに、微量の体液というコンセプトから、従来取得できなかったマウスの腹水中エクソソームを、湿潤したマウスの腹膜に貼付させることで、EV シートを用いることで回収できることを確認した（図 2）。同手法を EV アタッチ法とし、現在卵巣癌担癌マウスモデルを用いて検討中である。

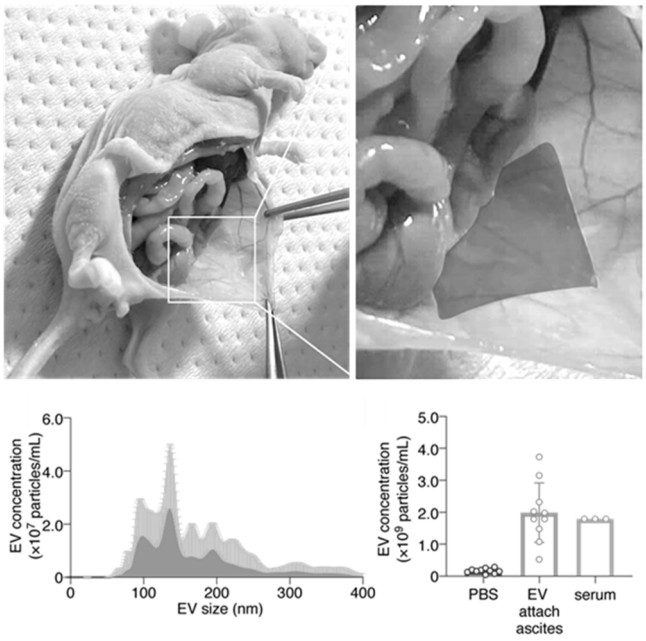


図 2. マウス微量腹水中エクソソームの回収

腹膜貼付時の写真（上図）、微粒子解析装置ナノサイトによる粒子分布（下左図）、粒子数（血清との比較）（下右図）。

3. 卵巣がん患者検体を用いた EV シートの検討

微量の体液からのエクソソーム回収というコンセプトにおいて、摘出して間もないヒト卵巣がん摘出腫瘍表面おいても、EV アタッチ法を用いてエクソソーム回収ができることを確認している（図 3）。その結果、腫瘍表面のエクソソームと周辺の腹水エクソソームの miRNA プロファイルが異なることが示された。現在我々は、現在臨床介入研究として施設内倫理委員会承認の下、がん患者生体内において、手術中に直接、EV アタッチ法によるエクソソーム回収を行っている。手術使用基準を満たすため、EV シートのエチレンオキサイドガス（EOG）滅菌検証しており、EOG ガス滅菌によって EV シートのエクソソーム回収性能に変化がないことを確認している。本手法は、これまで単一の体液、腹水 EV という概念からパラダイムシフトを起こしうる手法であり、位置情報という新しい観点からの Heterogeneity 解析を行えるという点において革新的手法と考えている。本研究では、この生体内における体液の不均一性を、EV シートを用いることで明らかにし、がんの進展度に応じた挙動を体液が起こし得るのか、またその変化は癌悪性化においてどのような意義をもつか、さらにはその変化を標的として治療戦略の提唱を目指す。

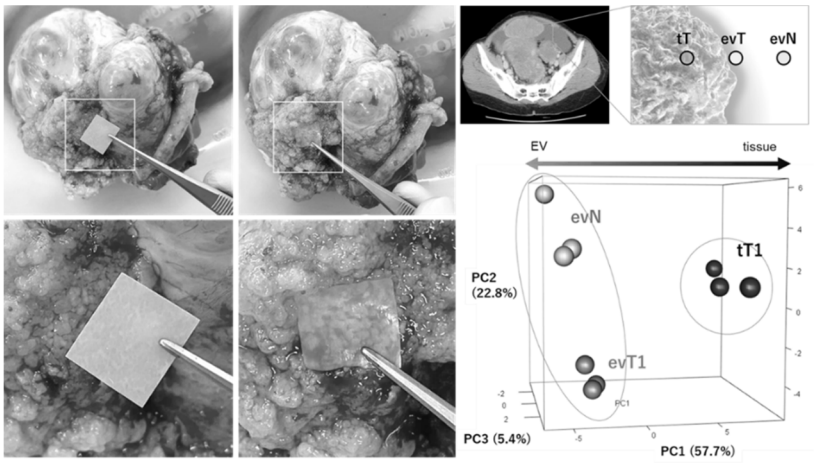


図 3. 卵巣がん患者検体を用いた EV シートの検討
手術摘出卵巣癌より腫瘍表面エクソソームの回収（左図）；腫瘍表面の EV（evT）、腫瘍組織内（tT）、周辺の腹水エクソソーム（evN）の miRNA プロファイル（右図）。

考　察

EV 研究は世界的にみて、現在最も注目を集めている研究分野の一つである。国際 EV 学会 International Society of Extracellular Vesicles（ISEV）の会員数は指数関数的に上昇しており、世界中で多くの研究者が未だ明らかにされていない EV の機能を明らかにしたいと熱を帯びていることがよくわかる。EV 研究の課題は ISEV が主導し JEV に Position paper として議論されるが、エクソソームの持つ未知の機能という一貫した課題に加え、エクソソームの回収方法の検証、さらに現在は EV の不均一性の理解も、重要な課題となっている。前項で述べたように EV シートは、これまで解析できなかったごく微量の体液を EV アタッチという手法によって回収し、さらに高い保存性を有し、その後の解析へと繋げることができるという全く新しいテクノロジーである。EV シートにより明らかになる知見は、これまで単一として捉えられてきた体液に位置情報という新しい観点からの Heterogeneity 解析を行えるという点で、EV 研究領域に大きなパラダイムシフトを起こし得ると考えられる。EV シートによる微量 EV 解析の実現が公表されれば、EV シートの特性から様々な分野で使用される可能性、さらに実臨応用を目指した検討も行われる。EV シートの特性は、①微量で解析できること、②高い保存性、③EV アタッチという解析手法の確立、の 3 つに集約されるがん領域だけを考えても、これまで病理組織でしか検証することのできなかった病変の進行の検出を、体液で行えるという可能性など様々な応用が示唆されるため

様々ながん種での検討が想定される。EV シート解析は様々な分野へ新しい解析手法として応用できる大きな発展性を有すると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院工学研究科安井隆雄先生である。また、本研究に携わったすべての方に深謝する。

文　献

1） Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. Nat Commun. 2017 Mar 6;8:14470. doi: 10.1038/ncomms14470. PMID: 28262727

2） Yokoi A, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yoneoka Y, Takahashi K, Shimizu H, Uehara T, Ishikawa M, Ikeda SI, Sonoda T, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Sakamoto H, Kato K, Kato T, Ochiya T. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. Nat Commun. 2018 Oct 17;9(1):4319. doi: 10.1038/s41467-018-06434-4.

3） Yokoi A, Villar-Prados A, Oliphint PA, Zhang J, Song X, De Hoff P, Morey R, Liu J, Roszik J, Clise-Dwyer K, Burks JK, O'Halloran TJ, Laurent LC, Sood AK. Mechanisms of nuclear content loading to exosomes. Sci Adv. 2019 Nov 20;5(11):eaax8849. doi: 10.1126/sciadv.aax8849. eCollection 2019 Nov. PMID: 31799396