

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12566

研究課題名(和文) がんの早期診断に向けた分泌膜小胞の新規精製法の開発

研究課題名(英文) Development of new purification method of extracellular vesicles for cancer diagnostics

研究代表者

鎌田 春彦 (Kamada, Haruhiko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：00324509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液を利用したがんの診断法に換わる新たな診断技術の開発に向けて、がん細胞から能動的に分泌される小胞を効率良く精製し、それらを解析対象とする技術を開発した。開発した本技術によって、分泌膜小胞にあるタンパク質を見出すとともに、新しい精製カラムを利用した分泌膜小胞の精製法が確立でき、今後のがんの診断に利用出来る可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：New purification method of extracellular vesicle that derived from cancer cells was developed for the development of new diagnostic technique without using the human blood. We have identified the new biomarker proteins expressed on the extracellular vesicles and have created new monolith column for the purification of extracellular vesicles. These result indicated that this method is useful for collect the extracellular vesicles and will expect to utilize for development for new diagnostic method for cancer patients.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：分泌膜小胞 バイオマーカー エクソソーム アフィニティ精製カラム

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上の発現膜タンパク質は、その性質上、近接した細胞にのみ作用し、遠隔にある組織や臓器・細胞へは作用し得ないと考えられてきた。しかし最近の研究から、細胞の膜成分を含んだ脂質二重膜として血液や尿に分泌されている「分泌膜小胞」が、遠隔臓器や細胞に対して作用を示すこと明らかになりつつある。また、この分泌膜小胞は、生理的にも分泌されていることが知られているが、疾患の発症や悪化、治癒に伴って、血液中の分泌膜小胞の存在量や発現タンパク質の種類・量も変化することも、明らかになりつつある。従って、この分泌膜小胞を疾患のバイオマーカーとして利用しようとする試みが注目されており、その検出・精製法の早期の開発が求められている。

これまで我々は、

肺がん由来培養細胞から分泌された膜小胞上には、分子標的薬のターゲットとして広く知られている上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) が多く発現していること

上記肺がん担癌マウスモデルにおいて、がん組織由来の分泌膜小胞は血液中に放出され、膜小胞上に発現している EGFR を ELISA などで検出・測定可能であること

を明らかとしている (Pharmazie, 2013)。

さらに申請者らは、上記の分泌膜小胞のプロテオーム解析を行った結果、

分泌膜小胞上に、これまでに報告されていない新しい診断バイオマーカー候補となる分子の同定

に成功している。すなわち、分泌膜小胞は、疾患細胞を血液等に分泌され、その解析が将来的な新規バイオマーカーの開発に大きく役立つ可能性が明らかになった。さらに、血液中の分泌膜小胞は、がん細胞の細胞膜を含むことから、血中に存在するがん組織の一部として見なすことが可能であり、分泌膜小胞の検出は、「血液からのがん組織バイオプシー」とも言うべき診断が可能になるという点で、低侵襲な診断を可能とする解析対象として注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、後述する我々の先行研究を活用し、疾患の簡便な診断を可能とする分泌膜小胞の生体試料中からの新規性製法の確立に向けた基礎的検討を行うことを目的とする。上記の先行研究にて開発してきた、がん細胞由来の分泌膜小胞の検出法を有効活用し、がん細胞由来分泌膜小胞に発現するタンパク質を認識・捕捉する抗体などのアフィニティー分子を利用して、生体試料由来の分泌膜小胞を精製するため、

分泌膜小胞の精製技術の確立とその評価

分泌膜小胞を効率良く捕捉可能な抗原の同定

抗体などのタンパク質を担持可能な新

規モノリスカラムの作製  
を行った。

## 3. 研究の方法

<細胞培養>

ヒト肺がん細胞株として H460 細胞、および H2228 細胞を細胞株として利用した。10% FCS (Biowest) と 1% 抗生物質カクテル (ナカライテスク) を含有した DMEM (Wako) を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

ヒト肺由来オルガノイドは、大阪府立成人病センター研究所の井上正宏先生に供与いただき、下記の方法で培養したものを実験に供した。腫瘍組織をメスで 1 mm 角に切断し、Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) (ナカライテスク) で 2 回洗浄した。0.26 U/ml Liberase DH (Roche) で懸濁し、37 °C で、1 ~ 2 時間インキュベートした。消化物を 500 μm、250 μm、100 μm、40 μm のフィルターに順次通し、その都度 HBSS で洗浄した。100 μm と 40 μm のフィルター上に残った組織片を遠心後、10 μM Y-27632 含有 Stempro (Invitrogen) に懸濁し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

<培養上清および培養上清由来分泌膜小胞の調製>

各細胞を継代培養し、コンフルエント状態になったものを PBS で洗浄し、抗生物質を含まない無血清培地で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 72 時間培養した。培養後、それぞれ培養上清を回収し、がん細胞由来の分泌膜小胞の回収法として、超遠心法 (UC 法)、ExoQuick-TC (System Biosciences) (EQ 法)、Total exosome isolation Kit (Thermo fisher) (TI 法)、EV second (ジーエルサイエンス) (EV 法) の 4 つの方法を選択し、各回収法による分泌膜小胞の回収量に関して検討した。遠心法に関して、200 g で 5 分遠心分離し、細胞を除去した。次に、上清を 16,000 g で 20 分間遠心分離し、細胞デブリスを除去した。さらに、上清を 0.22 μm のフィルター (ADVANTEC) でろ過し、その溶液を 140,000 g で 70 分遠心分離した。最後に PBS を加えて、140,000 g で 70 分遠心分離することで洗浄し、得られたペレットを分泌膜小胞分画として、50-100 μl の PBS で回収した。また、他の精製法に関しては、製造元のプロトコールに従って分泌膜小胞を回収した。

<分泌膜小胞の粒子径の測定>

分泌膜小胞の粒子径は動的光散乱法で測定した。PBS で 1 μg/ml に調整した分泌膜小胞を 1.6 ml キュベットに 1 ml 添加し、Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) にて測定した。

<分泌膜小胞の電子顕微鏡観察>

フォルムバール膜を張った銅メッシュグリッドにカーボン蒸着 (30 × 3 回蒸着) した。

親水化処理した後、サンプルを 5  $\mu$ l 載せ 15 ~ 20 分吸着した。2%酢酸ウラン溶液を添加し、濾紙で余分な溶液を除去した。乾燥させたサンプルを透過型電子顕微鏡により観察した。

#### < 分泌膜小胞のタンパク質定量 >

PBS(pH 7.4)に懸濁した分泌膜小胞溶液は Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific)で測定した。

#### < 分泌膜小胞のプロテオーム解析 >

各分泌膜小胞 1  $\mu$ g を 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)100  $\mu$ l に希釈し、20 ng のトリプシンを添加後、37  $^{\circ}$ C で 16 時間反応させることで、タンパク質を消化した。ペプチド抽出液は減圧遠心器によって濃縮し、OMIX チップを用いて精製してサンプル溶液とした。質量分析には Q-Exactive(Thermo Scientific)を用いた。

#### < タンパク質の担持が可能なセルロースベースモノリスカラムの作製 >

酢酸セルロースを DMSO と水の混合溶媒に加熱下に溶解させ、冷却することで相分離を誘起し、モノリスを得た。メタノールに溶媒置換後、水酸化ナトリウムを用いて加水分解することでセルロースモノリスに変換した。

#### 4. 研究成果

肺がんの検査・診断のためのバイオマーカータンパク質となり得る分泌膜小胞膜タンパク質を見出すため、我々はヒト肺がん細胞株(H460 および H2228)、ならびに肺由来 Cancer tissue originate spheroid から分泌膜小胞を調製し、その基礎物性を評価した。各回収法の原理と回収されたタンパク質量を指標とした分泌膜小胞の回収量に関して Table 1 にまとめた。肺がん細胞株である H460 細胞由来の分泌膜小胞の回収量では、EV 法が最も高い回収量及び回収効率を示した。また、各方法の中では、UC 法が最も回収効率が低く、また操作時間も長いことから、効率的にも悪いことが明らかになった。図 1 に回収された分泌膜小胞の電子顕微鏡像を示した。回収された分泌膜小胞のサイズにややばらつきがあるものの、脂質二重膜と考えられる粒子が観察された。また、様々な分泌膜小胞の回収法を比較解析した結果、UC 法によって回収された分泌膜小胞から最も高いマーカー分子が同定され、割合が高かった EV 法では予想されたよりも低い検出効率であった。また、他の分泌膜小胞マーカーを検出した場合でも、各マーカーの検出される量にはばらつきがあることから、回収される分泌膜小胞は、回収法によって違いが見られる可能性がある。最も汎用的に利用されている超遠心法により、各細胞から分泌膜小胞を回収し、粒子径を動的光散乱法により解析した。その結果、各細胞から分泌された分泌膜小胞の粒子径はこれまで報告のある細胞と同様、おお

よそ 100 nm 程度の粒子径を持っていた。また、その形態を電子顕微鏡法にて観察したところ、これまでに報告されている分泌膜小胞と同様、円形の粒子であることが確認された (Fig.1)。

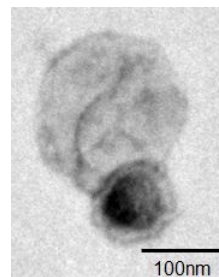


Fig.1 H460 由来分泌膜小胞の電子顕微鏡像

これまでに行われている分泌膜小胞のプロテオーム解析では分泌膜小胞に含まれる全タンパク質が対象となっている。そのため、網羅的に同定される反面、脂質膜内部に豊富に存在するハウスキーピングタンパク質も数多く同定されてしまうため、バリデーションすべき候補数が多くなってしまいうという問題点も有していた。従って、患者由来の血液試料を用い、今まで以上に(分泌膜小胞を使うだけでも前述のように効率的であるが)、効率良く病態に関連する膜タンパク質を分泌膜小胞より探索・同定できるようにすることが一つの鍵となってくる。そこで我々は、分泌膜小胞上の膜タンパク質を効率良く同定するためのタンパク質消化法として、トリプシンで分泌膜小胞上の膜タンパク質を膜外から直接消化する方法を実施した。

分泌膜小胞に着目したバイオマーカータンパク質探索の有用性について検討する一環として、がん細胞そのものの膜タンパク質と分泌膜小胞のプロテオームを比較解析した。ヒト肺がん組織オルガノイドの培養上清由来のタンパク質と、培養上清から精製した分泌膜小胞由来タンパク質をそれぞれ調製し、質量分析により同定した。相対的にタンパク質量を反映し、質量分析において汎用される peptide score を指標に、3 種類のオルガノイドから産生された分泌膜小胞に共通して発現が上昇しているタンパク質を 12 種類同定した。(Table 1)

発現上昇が認められたタンパク質のうち、最も変化が大きかったタンパク質は Claudin-4 であり、オルガノイド上のタンパク質発現量と比較して 3 倍以上の発現量変化が認められた。また、1.5 倍以上の発現量変化が認められるタンパク質 12 種類のうち、Claudin family に含まれるタンパク質が 3 種類 (Claudin-4, -12, -6) 同定されている。これらの Claudin family のタンパク質は、複数膜貫通型のタンパク質であり、細胞間接着に関わる Tight Junction の形成に深く関わる分子であることが知られている。従って、これらの分泌膜小胞の細胞からの遊離には、これら細胞間接着に関わる分子が何らかの作用を持っていることが示唆される。また、

これらの Claudin family の一部は、分泌膜小胞の一種であるエクソソームのマーカ分子として知られるテトラスパニンと類似した構造を有することが明らかになっており、これらとの関連も重要視される。

Table 1 3種類のオルガノイド由来分泌膜小胞の全てで発現が上昇していたタンパク質リスト

	LC1	LC2	LC3	
O14493	5.656	3.941	3.170	Claudin-4
Q01650	5.577	2.206	2.199	Large neutral amino acids transporter small subunit 1
P01650	4.545	1.677	2.339	Interleukin-4 receptor subunit alpha
Q9C085	3.258	2.063	3.607	Palmitoyltransferase ZDHHC5
O60487	2.746	2.554	1.536	Myelin protein zero-like protein 2
P56749	2.310	1.789	2.001	Claudin-12
P56747	2.104	3.260	3.675	Claudin-6
P48029	2.081	1.594	3.063	Sodium- and chloride-dependent creatine transporter 1
E9PRJ3	1.984	1.733	2.429	Tetraspanin (Fragment)
Q9Y6M5	1.941	1.956	3.326	Zinc transporter 1
Q12846	1.663	1.873	1.820	Syntaxin-4
P05023	1.593	1.552	1.845	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1

同定されたタンパク質は、肺がんのバイオマーカーとして血液から検出可能なマーカー分子として利用出来る可能性があることから、これらの分泌膜小胞を効率的に回収可能なカラムの作製を目指して、タンパク質との非特異的な相互作用が少ないと考えられるセルロースベースのモノリスカラムの作製を行った。

セルロースは溶解性が低いため、有機溶媒への溶解性に優れた酢酸セルロースを用い、適切な溶媒を選択して熱誘起相分離法により酢酸セルロースモノリスを作製した。セルロース主鎖の加水分解を抑え、側鎖のみを加水分解する条件として、メタノール中でアルカリ加水分解することで耐溶性に優れたセルロースモノリスに変換した。酢酸セルロースの濃度がモノリスの形成に与える影響について調べたところ、56~200 mg/mL の場合にモノリスが得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. 鎌田 春彦, 機能性サイトカイン変異体の創製による次世代バイオ医薬品の開発, 薬学雑誌, 査読無, 135, 843-849, 2015.
2. Ando D., Kamada H., Inoue M., Taki S., Furuya T., Abe Y., Nagano K., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Generation of a selective TNFR2-specific murine assays system., Pharmazie., 査読有, 71(5):235-237. 2016.

[学会発表](計3件)

1. Haruhiko Kamada, Phage display as a powerful tool for drug discovery, ETH seminar (招待講演), 2015年6月5日, ETH Zurich, Switzerland.
2. 鎌田春彦, 井上雅己, 阿部康弘, 角田慎一, ヒト TNFR2 指向性アゴニストを用いた新規 TNFR2 シグナル関連分子の同定, 日本プロテオーム学会 2015 年会, 2015年7月23日, くまもと森都心プラザ, 熊本.
3. 大須賀 絵理, 東阪 和馬, 笠原 淳平, 豊田 麻人, 鎌田春彦, 前田 真貴子, 長野 一也, 藤尾 慈, 坂田 泰史, 堤康央: 心不全に対する新規診断法の開発に向けたバイオマーカーの探索., 日本薬学会第137年会, 2017年3月24日, 仙台国際センター, 仙台(宮城).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等:

<http://www.nibiohn.go.jp/bio-r/index.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鎌田 春彦 (KAMADA HARUHIKO)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号: 00324509

##### (2) 研究分担者

宇山 浩 (UYAMA HIROSHI)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号: 70203594