

令和元年6月11日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11524

研究課題名(和文) 唾液エクソソームを用いた唾液腺腫瘍の遺伝子変異多様性解析と悪性度診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Analysis of Genetic Diversity and Mutations and Method for Diagnosing Malignancy of Salivary Gland Tumor using Salivary Exosomes

研究代表者

國分 克寿 (Kokubun, Katsutoshi)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90535808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌細胞のエクソソーム内に含まれるdsDNAの性質を検索した。エクソソームは超遠心法を用い精製し、FACSとWestern blottingにてエクソソームマーカーの発現を確認した。エクソソームからDNAを抽出し、BioanalyzerにてDNAのサイズを確認した。TEM観察を行なった結果、エクソソーム内にdsDNAの発現が確認できた。エクソソーム内のdsDNAを解析した結果、親細胞が持つ腫瘍特異的な遺伝子変異を反映していることが分かった。また、whole exome sequenceを施行した結果、親細胞のDNAとエクソソーム内のDNAが合致していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、癌細胞由来のエクソソームを解析することで、癌細胞の遺伝子情報を得ることができ、診断やその後の治療方針に大変有効な情報を得ることができるとわかった。これにより、血液や唾液といった患者の体液中のエクソソームを解析するだけで、癌の遺伝子情報を踏まえた診断が可能となることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study explored the nature of dsDNA contained in the exosomes of cancer cells. Ultracentrifugation was used to purify the exosomes, and the expression of the exosome markers was confirmed by FACS and Western blot analysis. DNA was extracted from the exosomes, and the size of the DNA was evaluated by Bioanalyzer. TEM observation confirmed the expression of dsDNA in the exosomes. Analysis of dsDNA in the exosome revealed that it reflects a tumor specific gene mutation possessed by the parent cell. In addition, whole exome sequencing indicated that the DNA of the parent cell matches the DNA in the exosomes.

研究分野：臨床検査病理学

キーワード：エクソソーム バイオマーカー DNA 腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移癌の診断の場合、全身疾患としての性質を持つことと、頻繁に生検を行う必要性があることから、血液などの体液を用いた「リキッド・バイオプシー」が適していると考えられている。既に、乳癌などの予後診断に、血液中に循環する腫瘍細胞 (CTC) の「数」を診断に用いる方法が FDA の認可を受けている。患者血中で捕捉した CTC を、ゲノム解析などで詳細に分析することで、より正確に転移がんの性質を知ることができるだろうと期待されているが、「数」を数えるだけの FDA 認可の診断法すら、コスト的に日本の医療保険制度に受け入れられていない。

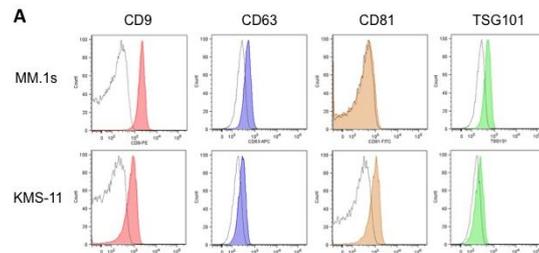
エクソソームは細胞の放出する直径 100nm 程度の分泌小胞で、それが含む miRNA やタンパク質が親細胞の性質を反映しているために、「リキッド・バイオプシー」の切り札として大きな期待が集まっている。しかも「10ml 中に数個」といった CTC と異なり、血液中には 1010 個/ml オーダーで含まれているとされており、診断デバイス開発も容易である。

2. 研究の目的

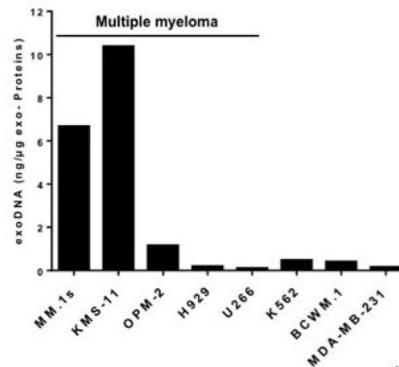
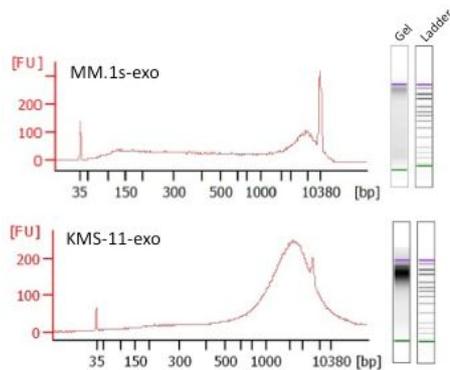
本研究では、がん細胞の特徴が、細胞から放出されるエクソソームに反映されることを利用し、血中エクソソームを利用したがん診断システムの構築を目指す。具体的には、エクソソームに発現している dsDNA(double-strand DNA)を利用して、がん細胞の特徴を評価する。

3. 研究の方法, 4. 研究成果

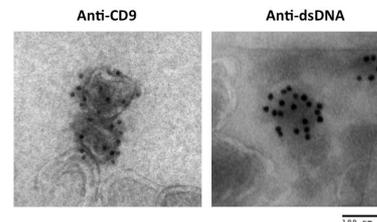
本研究ではエクソソーム内に dsDNA が含まれており、それらが親細胞の性質を反映していると仮定し、研究を始めた。癌細胞株、特に多発性骨髄腫のエクソソームを超速心法を用い精製した。エクソソームの確認のため、FACS にてエクソソームマーカーである CD9、CD63、CD81、TSG101 の発現を確認した (右図)。



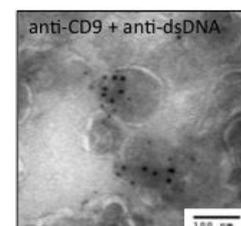
精製したエクソソームから QIAamp DNA micro kit を用い、DNA を抽出した。抽出した DNA のサイズを確認するため、Bioanalyzer にて測定を行なった (左下図)。この結果より、抽出した DNA のサイズは 10kb 以上であり、genomicDNA であることが示唆された。次に、この抽出した DNA における dsDNA の濃度を PicoGreen を用いて測定した (右下図)。種々の癌細胞株 (多発性骨髄腫、白血病細胞、乳癌細胞) 由来のエクソソームにおいて dsDNA が確認され、癌細胞株によって内包される dsDNA 量が異なることが分かった。また、多発性骨髄腫の細胞株の一部では dsDNA 量が多いことが分かった。



この dsDNA がエクソソームに内包されていることを確認するため、電子顕微鏡による観察を行なった。本実験では多発性骨髄腫由来のエクソソームを用い、Anti-CD9 (エクソソームマーカー)、Anti-dsDNA antibody を一次抗体として用いた (右図)。



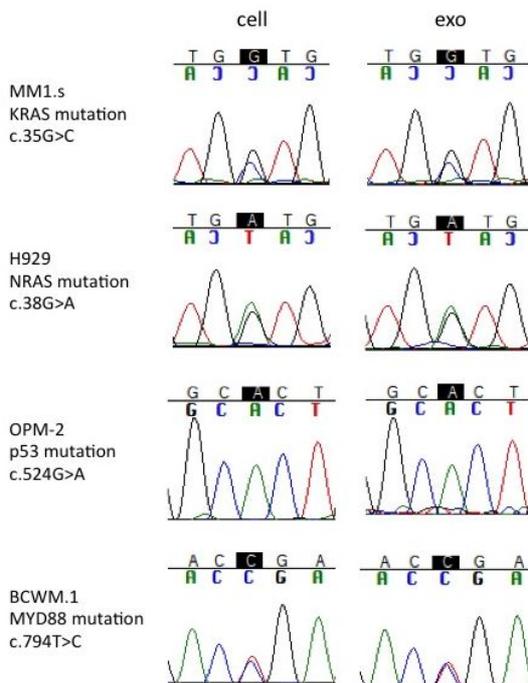
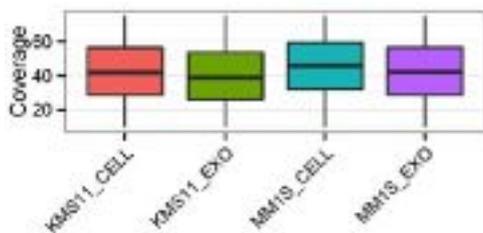
CD9 陽性の直径 100nm 程度の小胞 (エクソソーム) が認められ、エクソソーム内に dsDNA の存在が確認出来た。また、Anti-CD9 と Anti-dsDNA の二重染色を行ない、TEM 観察を行なった所、エクソソーム内に CD9 と dsDNA の共発現が観察された (右図)。以上の結果から、エクソソーム内に dsDNA が内包されていることが確認された。



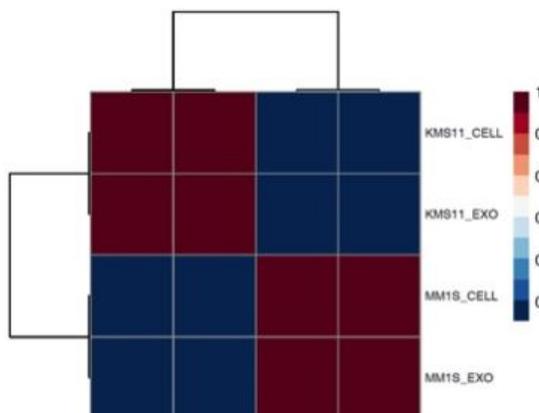
そこで次に、エクソソーム内の dsDNA (exoDNA) が母細胞の DNA の性質を反映しているかどうかを調べるため、腫瘍特異的な遺伝子変異を Sanger Sequence を用いて調べた (右図)。

これらの結果より、KRAS、NRAS、TP53、MYD88 といった様々な親細胞が持つ腫瘍特異的な遺伝子変異を、エクソソームが反映していることが分かった。

そこで次に、親細胞が持つ遺伝子変異を exoDNA がどの程度反映しているかを確認するため、次世代シーケンサーを用いた whole exome sequence (WES) を施行した。WES の解析結果、exoDNA とその由来する細胞の DNA は共に十分な coverage ならびにリード数を示し、数値も類似していた (下図)。



また、WES における SNP 解析の結果、exoDNA とその由来する細胞とで mutation の種類に高度な類似性が認められ (下図)、細胞と exoDNA では 99%以上同じ genotype を持つことが分かった (右表)。



以上のことから exoDNA の WES 解析が可能であり、exoDNA がその由来する細胞の DNA の情報、特に遺伝子変異のほぼ全てを反映することが分かった。

現在は患者サンプルを用いて、エクソソームの解析を進めている。

	Total	InExo (#)	Share (#)	InExo (%)	Share (%)
chr1	27450	24572	24247	89.52%	98.68%
chr2	17609	15990	15874	90.81%	99.27%
chr3	15735	14085	14013	89.51%	99.49%
chr4	11504	10472	10408	91.03%	99.39%
chr5	11773	10775	10733	91.52%	99.61%
chr6	14974	13305	13218	88.85%	99.35%
chr7	16281	14184	14005	87.12%	98.74%
chr8	8989	8272	8251	92.02%	99.75%
chr9	10734	9463	9364	88.16%	98.95%
chr10	10558	9489	9400	89.87%	99.06%
chr11	14777	13315	13171	90.11%	98.92%
chr12	13582	11961	11899	88.07%	99.48%
chr13	4412	4024	4012	91.21%	99.70%
chr14	7430	6195	6140	83.38%	99.11%
chr15	9734	8712	8615	89.50%	98.89%
chr16	9268	7956	7798	85.84%	98.01%
chr17	12798	11113	10988	86.83%	98.88%
chr18	4080	3655	3638	89.58%	99.53%
chr19	15588	13729	13622	88.07%	99.22%
chr20	6763	6013	5964	88.91%	99.19%
chr21	4087	3644	3576	89.16%	98.13%
chr22	6661	5859	5818	87.96%	99.30%
chrX	4239	3655	3627	86.22%	99.23%
chrY	60	52	40	86.67%	76.92%

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Kokubun K, Matsumura S, Yudasaka M, Iijima S, Shiba K.
Immobilization of a carbon nanomaterial-based localized drug-release system using a bispecific material-binding peptide.
Int J Nanomedicine. 13:1643-1652, 2018.
2. Bouyssou JM, Liu CJ, Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Aljawai Y, Manier S, Yosef A, Sacco A, Kokubun K, Tsukamoto S, Perilla Glen A, Huynh D, Castillo JJ, Treon SP, Leblond V, Hermine O, Roccaro AM, Ghobrial IM, Capelletti M.
Profiling of circulating exosomal miRNAs in patients with Waldenström Macroglobulinemia.
PLoS One. 13(10):e0204589, 2018.
3. Tsukamoto S, Løvendorf MB, Park J, Salem KZ, Reagan MR, Manier S, Zavidij O, Rahmat M, Huynh D, Takagi S, Kawano Y, Kokubun K, Thru CA, Nagano K, Petri A, Roccaro AM, Capelletti M, Baron R, Kauppinen S, Ghobrial IM.
Inhibition of microRNA-138 enhances bone formation in multiple myeloma bone marrow niche.
Leukemia. 32(8):1739-1750, 2018.
4. Kawano Y, Zavidij O, Park J, Moschetta M, Kokubun K, Mouhieddine TH, Manier S, Mishima Y, Murakami N, Bustoros M, Pistofidis RS, Reidy M, Shen YJ, Rahmat M, Lukyanchikov P, Karreci ES, Tsukamoto S, Shi J, Takagi S, Huynh D, Sacco A, Tai YT, Chesi M, Bergsagel PL, Roccaro AM, Azzi J, Ghobrial IM.
Blocking IFNAR1 inhibits multiple myeloma-driven Treg expansion and immunosuppression.
J Clin Invest. 128(6):2487-2499, 2018.
5. Takagi S, Tsukamoto S, Park J, Johnson KE, Kawano Y, Moschetta M, Liu CJ, Mishima Y, Kokubun K, Manier S, Salem KZ, Huynh D, Sacco A, Forward J, Roccaro AM, Battinelli EM, Ghobrial IM.
Platelets Enhance Multiple Myeloma Progression via IL-1 Upregulation.
Clin Cancer Res. 24(10):2430-2439, 2018.
6. Kokubun K, Matsuzaka K, Akashi Y, Sumi M, Nakajima K, Murakami S, Narita M, Shibahara T, Inoue T.
Congenital Epulis: Report of a Case and Review of the Literature
Bull Tokyo Dent Coll, 59(2):127-132, 2018
7. 中島 啓, 矢野 尚, 國分克寿, 橋本和彦, 関根理予, 柴原孝彦, 松坂賢一, 井上 孝
鑑別に苦慮したまれな臼後腺原発の腺様嚢胞癌の1例
歯科学報, 118(1): 25-29, 2018
8. 明石 良彦, 鷺見 正美, 井上 健児, 中島 啓, 國分 克寿, 橋本 和彦, 村上 聡, 松坂 賢一, 井上 孝
開業医・病院歯科における組織診の統計的研究
日口腔検査会誌, 9(1): 28-33, 2017
9. 鷺見 正美, 松坂 賢一, 明石 良彦, Ser-od Tungalag, Akram AL-Wahabi, 井上 健児, 中島 啓, 國分 克寿, 橋本 和彦, 村上 聡, 井上 孝
開業医・病院歯科における口腔細胞診の統計的研究
日本口腔検査学会雑誌, 9(1): 22-27, 2017
10. Matsuzaka K, Hashimoto K, Nakajima K, Horikawa T, Kokubun K, Yano H, Sakamoto M, Murakami S, Yakushiji T, Kasahara K, Katakura A, Shibahara T, Hashimoto, S; Inoue, T
Morphological analysis of relationship between oral cytology and biopsy in diagnoses of leukoplakia or oral lichen planus
日口腔検査会誌, 8(1): 22-28, 2016

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 中條貴俊、明石良彦、根本 淳、小谷地雅秀、中島 啓、國分克寿、橋本和彦、菅原圭亮、松坂賢一、井上 孝
上顎洞に発生した ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫の一例
第 29 回日本臨床口腔病理学会・第 11 回日本口腔検査学会総会共催学術大会、2018
2. 中島 啓, 中條 貴俊, 鷺見 正美, 明石 良彦, 國分 克寿, 橋本 和彦, 佐々木 文, 富田 茂樹, 松坂 賢一, 井上 孝
顎骨内のリンパ増殖性病変が診断の契機となった IgG4 関連疾患の一例
第 107 回日本病理学会総会、2018
3. 金内 洋光, 小林 史卓, 遠藤 多加史, 外村 岳央, 明石 良彦, 鷺見 正美, 根本 淳, 中條 貴俊, 矢野 尚, 中島 啓, 國分 克寿, 村上 聡, 松坂 賢一, 井上 孝
ラット唾液腺創傷部に入れたマトリゲルの影響 in vivo から in vitro での検討
第 305 回東京歯科大学学会(例会)、2018

4. 遠藤 多加史, 小林 史卓, 金内 洋光, 外村 岳央, 明石 良彦, 鷺見 正美, 根本 淳, 中條 貴俊, 中島 啓, 矢野 尚, 國分 克寿, 村上 聡, 松坂 賢一, 井上 孝
FGF7 はラット唾液腺創傷治癒における幹細胞の細胞増殖と分化を促進させる
第 305 回東京歯科大学学会 (例会), 2018
5. 明石 良彦, 鷺見 正美, 根本 淳, 中島 啓, 國分 克寿, 村上 聡, 松坂 賢一, 井上 孝
下顎に生じた ameloblastic carcinoma-secondary type、intraosseous の一例について
第 106 回日本病理学会総会、2017
6. 中島 啓, 泉 浩, 橋本 和彦, 中村 博, 鳥山 茜, 佐伯 春美, 國分 克寿, 松坂 賢一, 富田 茂樹, 井上 孝
耳下腺に発生した癌肉腫と診断した一例
第 106 回日本病理学会総会、2017
7. 橋本 菜央, 高橋 由子, 山田 玲菜, 山本 圭, 徳山 彰秀, 明石 良彦, 鷺見 正美, 中島 啓, 國分 克寿, 村上 聡, 松坂 賢一, 井上 孝
ヒトリンパ腫モデルマウスの作製
第 303 回東京歯科大学学会 (例会), 2017
8. 中島 啓, 矢野 尚, 明石 良彦, 鷺見 正美, 國分 克寿, 橋本 和彦, 関根 理予, 柴原 孝彦, 松坂 賢一, 橋本 貞充, 井上 孝
臼後部に発生した腫瘤を腺様嚢胞癌と診断した一例
第 303 回東京歯科大学学会 (例会), 2017
9. 鷺見正美、明石良彦、中島 啓、國分克寿、矢野 尚、辛 麻由、鈴木英子、大野啓介、高野 正行、音成実佳、後藤多津子、松坂賢一、井上 孝
右側下顎頭部に発生した動脈瘤様骨嚢胞の一例
第 10 回日本口腔検査学会総会・学術大会、2017
10. 直野 公一, 中島 啓, 國分 克寿, 村上 聡, 井上 健児, 戸木田 玲子, Ser-Od Tungalag, Al-Wahabi Akram, 松坂 賢一, 井上 孝
マラッセの上皮遺残細胞による iPS 細胞の骨性細胞への分化誘導の可能性について
第 301 回東京歯科大学学会 (例会)
11. 明石 良彦, 鷺見 正美, 中島 啓, 國分 克寿, 村上 聡, 薬師寺 孝, 柴原 孝彦, 橋本 貞充, 松坂 賢一, 井上 孝
下顎前歯舌側歯肉に発生した周辺性エナメル上皮腫の一例
第 27 回臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016
12. 鷺見 正美, 明石 良彦, 中島 啓, 國分 克寿, 村上 聡, 薬師寺 孝, 柴原 孝彦, 橋本 和彦, 松坂 賢一, 井上 孝
若年者の下顎歯肉に原発し診断に苦慮した基底細胞癌の一例
第 27 回臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016
13. 鷺見正美、松坂賢一、明石良彦、Tungalag Ser-od、AL-Wahabi Akram、井上健児、中島 啓、國分克寿、橋本和彦、村上 聡、井上 孝
開業医における細胞診の活用と今後の展望
第 9 回日本口腔検査学会総会・学術大会、2016
14. 井上健児、松坂賢一、村上 聡、國分克寿、中島 啓、Tungalag Ser-od、AL-Wahabi Akram、明石良彦、鷺見正、美井上 孝
iPS 細胞分化誘導技術を応用した歯牙形成障害関連遺伝子の病態解析検査
第 9 回日本口腔検査学会総会・学術大会、2016
15. 明石良彦、鷺見正美、井上健児、中島 啓、國分克寿、橋本和彦、村上 聡、松坂賢一、井上 孝
一般開業医における病理組織検査の動向-東京歯科大学 千葉病院受託検体について-
第 9 回日本口腔検査学会総会・学術大会、2016
16. Bouyssou JMC, Aljawai Y, Yosef A, Manier S, Rawal R, Kokubun K, Glen AP, Sacco A, Castillo JJ, Treon SP, Roccaro AM, Capelletti M, Hermine O, Ghobrial IM.
Profiling of Circulating Exosomes in Patients with Waldenström Macroglobulinemia
58th ASH Annual Meeting and Exposition, 2016
17. Tsukamoto S, Salem K, Manier S, Reagan MR, Huynh D, Perilla-Glen A, Sacco A, Zavidij O, Rahmat M, Takagi S, Kawano Y, Kokubun K, Thru CA, Petri A, Dorfman DM, Roccaro AM, Capelletti M, Kauppinen S, Ghobrial IM.
MicroRNA-138 Regulates Osteogenic Differentiation and Its Inhibition Presents a Novel Therapeutic Line to Prevent Bone Lytic Lesions in Multiple Myeloma
58th ASH Annual Meeting and Exposition, 2016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。