

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06663

研究課題名(和文) がん診断法への応用を企図した細胞外小胞上に発現する分子会合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular complexes expressed in extracellular vesicles for cancer diagnosis

研究代表者

小谷 典弘 (Kotani, Norihiro)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90342782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、マウス肺がん細胞から血中に分泌される細胞外分泌小胞(Extracellular Vesicle:以下 EV)がCHL1分子を発現していることを見出し、肺がん腫瘍マーカー候補になる可能性を示唆した。さらに、より高精度な腫瘍マーカーの確立を目指し、がんEVを2つ以上のタンパク質抗原で「定義」する精度向上法を着想した。

本研究では、Proximity labelingの1手法で研究代表者らが開発した「EMARS」と呼称される方法を応用し、EV上のCHL1と会合する分子群を標識・同定した結果、CHL1とcaspase14が両方発現する血清EVが肺がん患者で上昇することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中のEVは採血などの低侵襲な医療行為で採取することが可能であり、本研究成果により、EVを使用したより高精度・高感度な腫瘍マーカーが開発されることで、血液検査等の日常の健康診断レベルでがん診断ができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We found that Extracellular Vesicles (hereinafter referred to as EVs) secreted into the blood from mouse lung cancer cells express CHL1 molecules, suggesting that CHL1 expressed in EVs may be candidates for lung cancer tumor markers. With the aim of establishing more accurate tumor markers, we have had an idea to "define" cancer EVs using expressed two or more protein antigens.

In this study, we applied one of a Proximity labeling strategy called "EMARS" to label and identify a group of molecules that associate with CHL1 in EVs. We then found that serum EVs from lung cancer patients were highly expressed both CHL1 and caspase14.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：Proximity Labeling Extracellular Vesicles EMARS

## 1. 研究開始当初の背景

1972年、Singer と Nicolson は動物細胞膜が脂質二重層から成り、その上には各種受容体など細胞機能にとって重要な役割を果たしている細胞膜上分子が多数存在すること、同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに運動していることを提唱した。1990年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり、特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で会合し形成される「細胞膜上分子会合体」の存在が実証され、細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた。このような学術的な背景の中、研究代表者は全く新規で実用的な細胞膜上分子会合体解析法を開発した

(Kotani N. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*、特許第 4929462 号)。本法は Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) と名付けたラジカル反応を利用して行われる解析法であり、EMARS 法と呼称している(右記説明図参照)。本解析法は現在国内外で用いられている既存法にない

特色(生理的条件下において、簡便に会合体形成した細胞膜上分子群を生化学的に解析できる)があり、生化学や細胞生物学を中心とした様々な分野の発展に寄与できると考えている。

研究代表者らは、この EMARS 法を用いてがん細胞膜上の分子会合体について研究してきたが、同時に

- (1) 細胞膜だけでなく、exosome に代表される細胞外小胞 (EV) の脂質膜上にも分子会合体が形成されているのではないかと考えた。
- (2) それらは、分泌元の細胞の細胞膜上に発現している分子会合体の構成を反映しているのではないかと考えた。

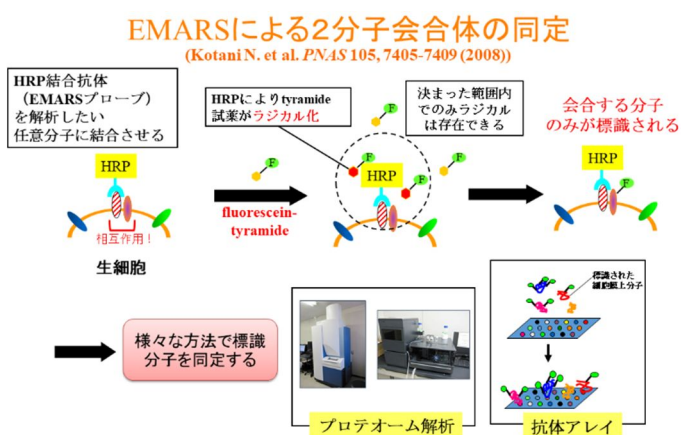
と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の背景を基に以下の(1)および(2)の研究項目を実施し、最終的に血清 EV 上の分子会合体情報をがん診断に利用できるか検討することを目的とする。

- (1) 肺がんモデルマウスおよび野生型マウスの血清 EV を精製し、EV 上の分子会合体を EMARS 法で解析・比較することで、肺がん細胞から分泌される EV 上の特異的な分子会合体を同定する。また、これら会合体を簡便に測定できる方法 (ELISA 等) の基盤技術を開発する。
- (2) ヒト肺がん患者、健常人、その他の肺疾患患者から採取した血清を使用し、マウス血清を使用した実験と同様に肺がん患者血清 EV に特異的な分子会合体があるか検討する。

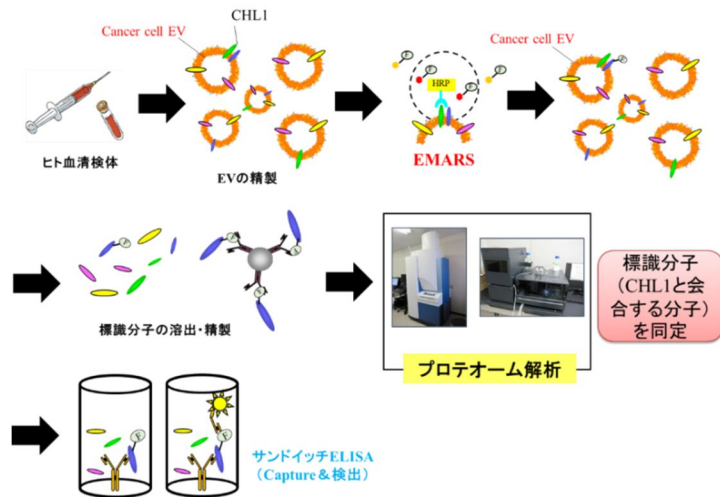
また、研究期間中に新型コロナウイルスのパンデミックが起こったため、EV と性質が似ているウイルス粒子について、SARS-CoV-2 を例にとり、そのウイルス受容体や感染因子に関する研究を、上記 EV と同様の研究手法 (EMARS 法を利用) を用いて実施することも急遽目的とした。



### 3. 研究の方法

#### 【血清 EV 上の分子会合体情報をがん診断に応用する研究】

分子会合体抗原は2つの分子の組み合わせで1つの抗原になるため、がん細胞標的抗原として精度が通常の1分子抗原よりも向上すると考えられている。研究方法の概要を右図に示す。



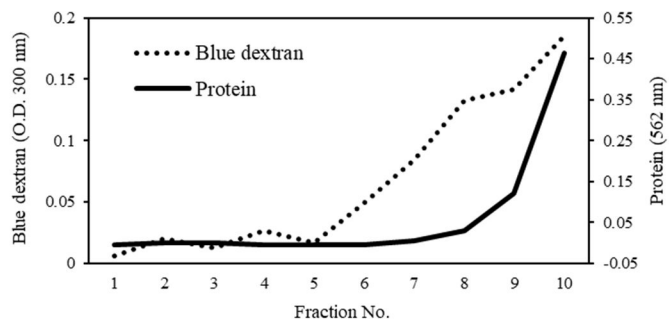
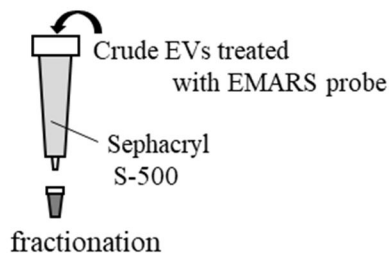
#### (1) 血清 EV の精製と EMARS

各血清に Exoquick 試薬を添加し、4 で 30 分間静置する。

15,000rpm で 10 分間遠心して、沈殿部分 (EV を含む) を 100 $\mu$ l の PBS で懸濁する。

CHL1 の会合体を調べる場合には、HRP 標識 anti-CHL1 antibody を入れる。

懸濁した EV 溶液 (Crude EV) を Sephacryl S-500 ゲルろ過樹脂 (2ml) に添加し、100 $\mu$ l の PBS を 1fraction として溶出する (下図参照)。



回収した精製 EV 画分 (fra6-8) を Nanocep 30K フィルターユニットで濃縮する。

濃縮した画分に EMARS 試薬 (Fluorescein tyramide) を加え、室温で 10 分間静置する。

anti-fluorescein 抗体結合 Sepharose 樹脂で fluorescein 標識された肺がん EV 抗原群を精製する。

#### (2) EV 抗原群のショットガン解析

NP-40 溶解緩衝液 1mL で上記 (1) の樹脂の wash を 5 回繰り返す。

MPEX PTS Reagent for MS (GL Science) を加え、95 5 分間加熱して抗原を溶出する。

上清に 10mM DTT/ 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 100mM IAA/ 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加える。

質量分析用トリプシン液 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l) を 1 $\mu$ l/tube 加え、37 で一晩処理する。

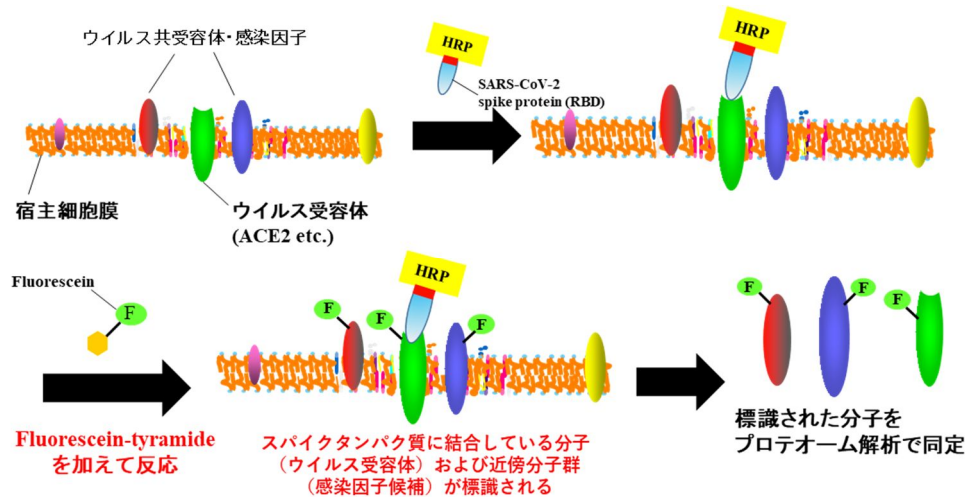
ペプチドを nano LC-ESI-MS/MS: LTQ Orbitrap にてショットガン解析し、EV 抗原群を同定する。

### ( 3 ) EV 抗原の ELISA 解析

3 . 研究の方法 ( 1 ) で標識された抗原群を、捕捉抗体である抗 caspase14 抗体でコーティングした 96well ELISA プレートに加え、caspase14 をプレートにトラップしたのちに、HRP 標識抗 fluorescein 抗体を添加し、HRP 発色により fluorescein 標識された caspase14 の量を定量する。

#### 【EMARS を用いたウイルス研究】

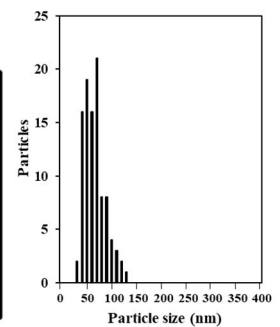
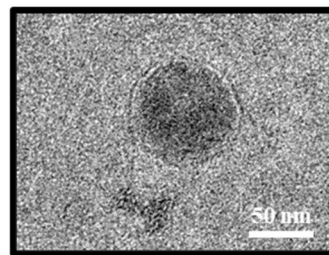
EMARS により、SARS-CoV-2 の受容体や感染因子を同定した ( 下図参照 ) 。



### 4 . 研究成果

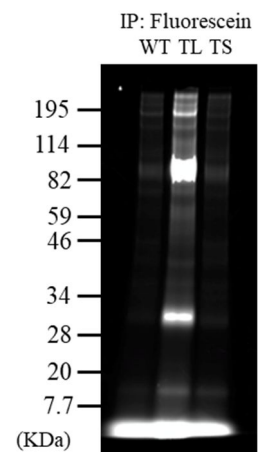
#### 【血清 EV 上の分子会合体情報をがん診断に応用する研究】

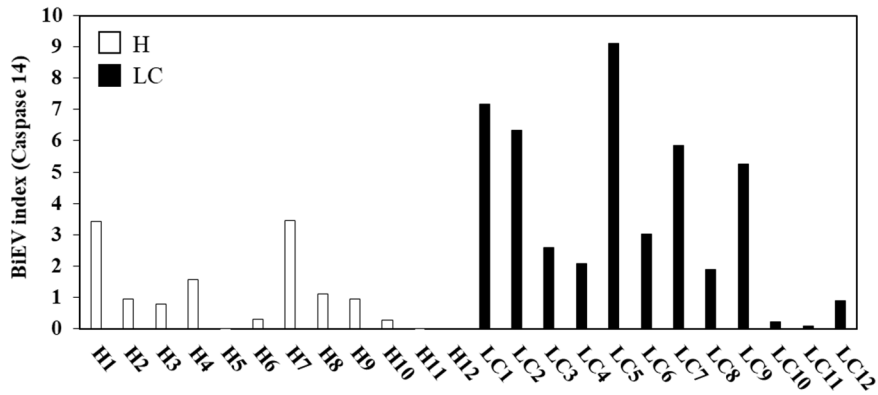
3 . 研究の方法 ( 1 ) で精製したマウス EV を電子顕微鏡で測定したところ、50-100 nm 程度の大きさの粒子が観察された ( 右図参照 ) 。従って、本法で EV が精製できたことが明らかになった。



精製した肺がんマウスの血清 EV サンプル ( WT : 野生型マウス、TL : 腫瘍の大きい肺がんマウス、TS : 腫瘍の小さい肺がんマウス ) を使用して、方法 ( 2 ) の EMARS を行い、標識された会合体分子群を電気泳動で解析したところ、いくつかの標識分子が検出された ( 右図参照 ) 。

次に、肺がん患者や健常人の血清 EV を同じ方法で標識し、同様の標識分子を得ることができた。そこで、「( 2 ) EV 抗原群のショットガン解析」で示した方法で各標識分子を同定したところ、CHL1-caspase14 会合体 ( BiEV と呼称 ) を発現した EV が肺がん患者に増えている可能性が示唆された。そこで、「( 3 ) EV 抗原の ELISA 解析」でこの会合体を発現する血清 EV の量を肺がん患者や健常人で定量測定したところ、確かに肺がん患者に有意に多く存在していることが分かった ( 次ページ図参照 : ; H : 健常人血清 EV ; 12 例、LC : 肺がん患者血清 ; EV12 例 ) 。

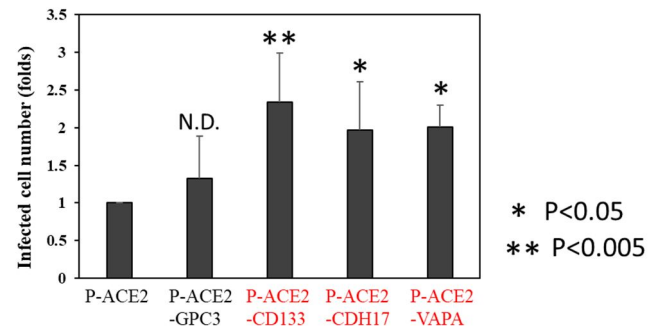




さらに、EV 上の CHL1 抗原の単独測定よりも CHL1-caspase14 BiEV 測定の方が肺がんの識別精度が高いことが分かった。この結果については、2020 年 5 月に肺がん腫瘍マーカーの 1 つとして、特許申請を実施し（細胞外小胞におけるタンパク質複合体解析に基づく肺がんの検査法：特願 2020-092609）、論文発表済みである（Kotani N. et al. *J. Proteome Res.*, 20(7), 3519-3531 2021）。

#### 【EMARS を用いたウイルス研究】

EMARS を用い SARS-CoV-2 の受容体や感染因子を標識した（上記研究の方法参照）。それらをショットガン解析した結果、GPC3、CD133、CDH17、VAPA などの SARS-CoV-2 の受容体や感染因子候補を同定した。これらについて、遺伝子操作で過剰発現させた宿主細胞を作製し、SARS-CoV-2 偽型ウイルスの感染実験を行ったところ、3 つの候補分



子発現宿主細胞については、通常の宿主細胞と比べて感染率の上昇がみられた（上図参照）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotani N, Araki T, Miyagawa-Yamaguchi A, Amimoto T, Nakano M, Honke K.	4. 巻 679
2. 論文標題 Proximity Labeling and Proteomics: Get to Know Neighbors.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 131-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2022.07.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotani N, Nakano T, Kuwahara R.	4. 巻 298
2. 論文標題 Host cell membrane proteins located near SARS-CoV-2 spike protein attachment sites are identified using proximity labeling and proteomic analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 102500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaneda H, Ida Y, Kuwahara R, Sato I, Nakano T, Tokuda H, Sato T, Murakoshi T, Honke K, Kotani N.	4. 巻 20
2. 論文標題 Proximity Proteomics Has Potential for Extracellular Vesicle Identification.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Proteome Res.	6. 最初と最後の頁 3519-3531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jproteome.1c00149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小谷 典弘, 山口 亜利沙, 本家 孝一
2. 発表標題 糖鎖研究から始まった「近接プロテオミクス」の発展とその展望
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷典弘, 本家孝一
2. 発表標題 新規腫瘍抗原としての腫瘍細胞膜上分子会合体
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷 典弘, 柴原 隆亮, 中野 貴成
2. 発表標題 Proximity proteomicsを用いたパンデミックウイルス(共)受容体候補スクリーニング法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷典弘, 山下主税
2. 発表標題 Proximity labelingによるウイルス受容体および宿主細胞膜感染因子の生理的同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 新規肺がんマーカー	発明者 小谷 典弘	権利者 埼玉医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-080878	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 膜構造体、及び膜構造体の製造方法	発明者 小谷 典弘	権利者 埼玉医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2023-188268	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	富田 昌弘  (Tomita Masahiro)  (20183494)	三重大学・工学研究科・特任教授(研究担当)    (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------