

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：83802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22575

研究課題名（和文）細胞外小胞の不均質性を可視化するデジタルMSイメージング

研究課題名（英文）Digital MS imaging to visualize heterogeneity of extracellular vesicles

研究代表者

畠山 慶一（Hatakeyama, Keiichi）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員

研究者番号：20564157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：エクソソームをはじめとした細胞外小胞ががん領域で重要視されているが、細胞外小胞内容物の不均質性については未知の部分が多い。そこで本研究では、単一がん細胞由来の細胞外小胞に含まれる分子群の可視化に向けたプラットフォームの構築を目指した。

1細胞から分泌タンパク質を捉えるために必要な基盤技術の構築を目指し、共同研究先の農工大学と安定的な分子固定化方法を確立した。さらに、バイオインフォマティクスを応用した解析手法も取り入れた探索アプローチを実施し、単一がん細胞由来の分子の同定を図った。同一細胞株レベルで細胞周期とは無関係に発現パターンが異なる分泌タンパク質を分泌する細胞集団を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞外小胞内容物の不均質性に注目し、同一細胞株レベルで細胞周期とは無関係に発現パターンが異なる分泌タンパク質を分泌する細胞集団を同定したことに学術的意義を有する。

またこの研究過程で構築したプラットフォームは、他の分泌たんぱく質の検出への応用も可能であり有用性が高い。さらに、バイオインフォマティクスを利用した解析手法は他研究の推進にも役に立ち、その技術は共同研究先の学生の教育にも利用されたため一定の社会的意義も有すると判断した。

研究成果の概要（英文）：Extracellular vesicles, including exosomes, are of great importance in the field of cancer, but much remains unknown about the heterogeneity of extracellular vesicle contents.

Therefore, the aim of this study was to establish a platform for the visualisation of molecules contained in extracellular vesicles derived from a single cancer cell.

We aimed to establish the basic technology required to capture secretory proteins from a single cell, which led to the establishment of a stable molecular immobilisation method with our collaborator, the University of Agriculture and Technology. We also took a discovery approach using bioinformatics-based analysis methods to identify molecules derived from a single cancer cell. We identified a cell population that secretes a protein with a different expression pattern independent of the cell cycle at the level of the same cell line.

研究分野：がんゲノム

キーワード：単一細胞解析 分泌たんぱく質

1. 研究開始当初の背景

エクソソームをはじめとした細胞外小胞が、がん領域で重要視されるようになり、その小胞に含まれる核酸やタンパク質の解析が盛んに行われている。しかしながら、がん細胞の不均質性が議論されているにも関わらず、細胞外小胞内容物の不均質性については未知の部分が多い。これは、単一細胞の分泌物を捕捉・可視化できる手法が確立していないことが大きい。単一細胞由来のエクソソームを含む細胞外小胞を解析できれば、細胞外小胞の不均質性についての新たな知見が得られるばかりでなく、細胞外小胞を利用した新規腫瘍マーカー探索に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、単一がん細胞由来の細胞外小胞に含まれる分子群の可視化に向けたプラットフォームの構築を目指す。

3. 研究の方法

3. (1) 分泌たんぱく質検出用固定化基板の構築

単一細胞由来の細胞外小胞を可視化するためには、2つの要素技術の開発が不可欠である。単一細胞から分泌された分子を確実に捕捉できるデバイスの開発と、捕捉された分子群を可視化するプラットフォームの構築である。主に前者を研究分担者が、後者を研究代表者が担当する。

はじめに、研究分担者は微細構造上へ抗体の固定化方法の最適化を行う。基本的には、研究分担者が開発したデバイス(Maeda Y. et al. *Proc Chemical Sensor Symposium*. 2015)を細胞外小胞検出用に最適化する。

3. (2) 単一細胞遺伝子発現解析による候補モデル遺伝子の探索

はじめに大腸がん細胞株(SW480/SW620)の細胞上清に対して質量分析計を用いたショットガンプロテオミクスを実施し、分泌たんぱく質の同定を行った。

次に大腸がん細胞株(SW480/SW620)を用いて、候補モデル遺伝子を探索するために単一細胞遺伝子発現解析を実施した。具体的には、C1 (Standard Biotech)を利用して単一細胞からRNAを抽出、次世代シーケンサライブラリーを作成し、RNA-seq (Illumina)により遺伝子発現解析を行った。ここで候補モデル遺伝子とは、分泌たんぱく質をエンコードする遺伝子を指す。ショットガンプロテオミクスと単一細胞解析とを組み合わせて、不均質に細胞から分泌している分子を推定した。

3. (3) 基板上でのイメージングプラットフォームの構築

3. (2)で同定された候補モデル遺伝子がエンコードする分泌たんぱく質のペプチドを合成した。このペプチドはトリプシン消化でできるペプチド断片と同一配列とした。この合成ペプチドを用いて、MSイメージングの検出限界を推定した。

さらに別のアプローチとして、コラーゲン膜に候補モデル遺伝子がエンコードする分泌たんぱく質に特異的な抗体を固定化し、サンドイッチ免疫アッセイを用いて蛍光による可視化も試みた。

4. 研究成果

4. (1) 微細構造への抗体固定化方法の最適化

分泌たんぱく質を確実に捕捉するために、微細構造上へ高密度の抗体固定手法の最適化を行った。1 µg/ml の濃度のたんぱく質を捕捉し、サンドイッチ免疫アッセイを

がん細胞分泌タンパク質濃度

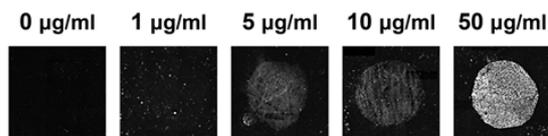
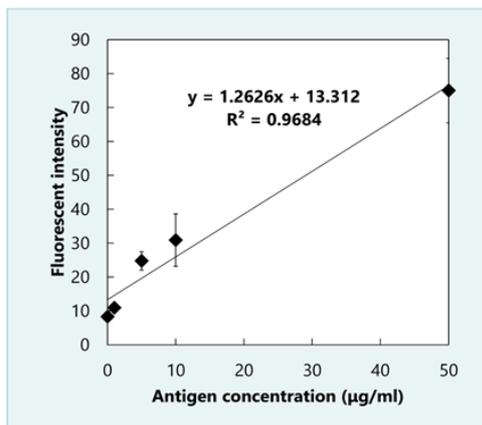


図 1. サンドイッチ免疫アッセイを用いた微細構造上に捕捉されたたんぱく質の可視化.



用いて蛍光で可視化できる系を構築することができた(図 1)。この結果から、分泌たんぱく質を捕捉するために十分な抗体を固定化できたと結論付けた。

4. (2) 候補モデル遺伝子の探索

質量分析計を用いたショットガンプロテオミクスにより、SW480 と SW620 の細胞上清中に含まれるたんぱく質の同定を試みた。このショットガンプロテオミクスは、たんぱく質の存在量については半定量的な評価になるため、得られた値を四分位に分けて評価した(図 2A)。SW480 の上清で多く検出されるたんぱく質から分泌たんぱく質と非分泌性のたんぱく質とに分けると、SW480 に特異的に同定されたたんぱく質群(SW480-specific)では、分泌たんぱく質と定義されたたんぱく質が有意に多く同定された(図 2B)。

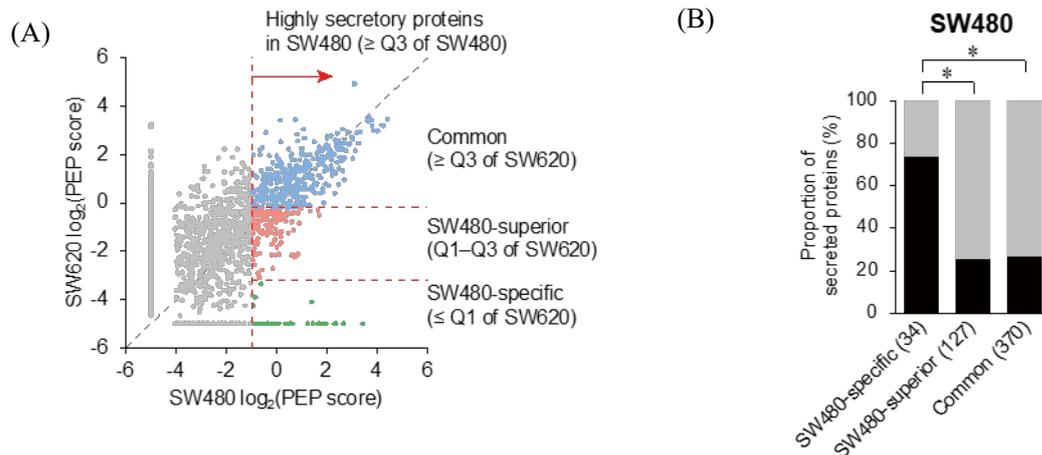


図 2. 大腸がん細胞株(SW480/SW620)における細胞上清中のショットガンプロテオミクスによるたんぱく質の同定. (A) 同定されたたんぱく質の半定量値(PEP score)の分布. 四分位に分けて、SW480 の上清に特異的なたんぱく質を抽出. (B) 各区分における、分泌たんぱく質の存在比. 黒色、分泌たんぱく質; 灰色、非分泌たんぱく質. * $p < 0.05$

単一細胞遺伝子発現解析を実施し、不均質にたんぱく質を分泌している可能性がある細胞集団を推定した(図 3A)。分泌たんぱく質をエンコードする遺伝子の発現に多様性が見られ、一部の細胞集団でのみ発現している遺伝子が多く観察された。それら遺伝子群の中に、転移と関係する上皮間葉転換(EMT)にかかわる分子(X)が見つかった(図 3B)。さらに興味深いことに、この遺伝子は細胞外小胞に関連する可能性のある分子であることが明らかになった。

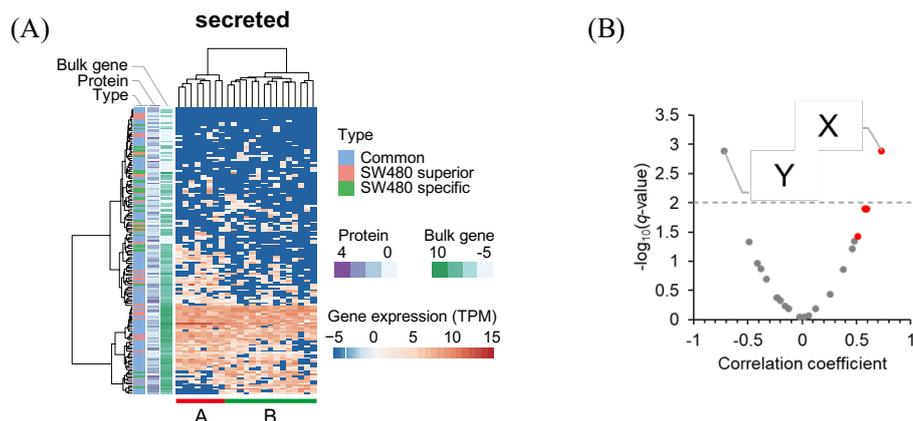


図 3. SW480 の単一細胞遺伝子発現解析. (A) 分泌たんぱく質をエンコードする遺伝子のクラスタリング解析. (B) 上皮間葉転換(EMT)の遺伝子発現と相関する分子の抽出. 知財の関係上、分子を X と Y で表記.

4. (3) 不均質に分泌するたんぱく質の可視化

分泌たんぱく質をイメージングするために、当初は MS イメージングを想定していたが、安定して分子を MS/MS として捉えることができなかった。そこで我々は、抗体固定化コーラーゲン膜を利用したイメージングプラットフォームを構築した。蛍光により一部の細胞で分泌たんぱく質 X が分泌していることが明らかになった(図 4)。細胞数と X に特異的な蛍光の観察から、8.9%の SW480 細胞株で細胞外小胞に関連する X が細

胞外に分泌していた。この結果は、細胞外小胞関連の分泌たんぱく質を分泌する細胞をデジタルにカウントできたことを示している。

以上をまとめると、当初の計画のイメージングとは異なる手法ではあるが、細胞外小胞関連の分泌たんぱく質を細胞ごとにデジタルにカウントすることができた。それ故、本研究の目的である単一がん細胞由来の細胞外小胞に関わる分子群の可視化に向けたプラットフォームの構築を達成できたと考える。

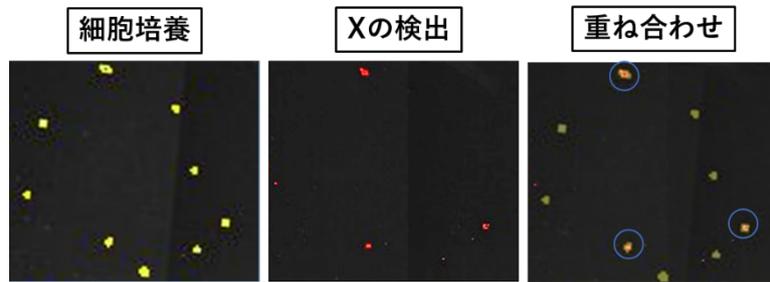


図 4. SW480 の単一細胞から不均質に分泌するたんぱく質 X の可視化. 細胞は疑似的に黄色で表示. X は図 3 のたんぱく質 X に対応. 青丸で囲まれた細胞が X を分泌している細胞を指す.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	前田 義昌 (Maeda Yoshiaki) (30711155)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教 (12605)	削除:2022年5月10日 事実発生日:2022年 2月1日 現所属研究機関:12102
研究分担者	吉野 知子 (Yoshino Tomoko) (30409750)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

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