

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18236

研究課題名(和文)エクソソーム分析から解く子宮内膜症の特異的バイオマーカーの探索と治療介入への応用

研究課題名(英文)Exploration of specific biomarkers for endometriosis revealed by exosome analysis and application to therapeutic intervention

研究代表者

古形 祐平 (KOGATA, Yuhei)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80829953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症は過度の月経痛や不妊など様々な症状を引き起こす疾患だが、小さい病変は発見しづらく早期診断が難しい。そこでエクソソームという細胞からの分泌物に着目した。エクソソームには細胞からの情報が含まれており、それを内膜症の診断に役立てようという研究である。子宮内膜症病変や正常卵巣からエクソソームを抽出し、その中に含まれるmiRNA(遺伝子の発現を抑制するRNA)を解析すると、内膜症病変で1種類、正常卵巣で3種類のmiRNAが多く発現していた。正常卵巣には、そのmiRNAのターゲットとなる特異的な遺伝子を4種類同定した。その遺伝子の内膜症での発現有無を評価し、治療への応用を検討していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から放出されるエクソソームにはその細胞の情報が含まれているため、それを解析することが疾患の早期発見につながる可能性が注目されている。これまでエクソソームの研究報告は尿や血液からの抽出が主流だったが、本研究では病巣の組織から直接抽出することでより多くの特異的なエクソソームの抽出が期待できる。本研究を通して子宮内膜症に特徴的な物質が明らかになれば、これまで手術でしか確認しえなかった初期病変も血液中のエクソソームを用いた診断が可能になり、早期治療介入が可能になると同時に、関連する不妊症や卵巣癌の発生母地の減少に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis is a disease that causes various symptoms such as excessive menstrual pain and infertility, but small lesions are difficult to detect and early diagnosis is difficult. Therefore, we focused on secretions from cells called exosomes. Exosomes contain information from cells, which the researchers hope will help diagnose endometriosis. Extracting exosomes from endometriotic lesions and normal ovaries and analyzing the miRNAs (RNAs that suppress gene expression) contained in them revealed that 1 type of miRNA was found in endometriotic lesions and 3 types in normal ovaries. was manifesting. In normal ovaries, we identified four specific genes that are targeted by their miRNAs. We would like to evaluate whether the gene is expressed in endometriosis and consider its application to treatment.

研究分野：産婦人科学関連

キーワード：子宮内膜症 エクソソーム miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### 子宮内膜症と不妊症の関係

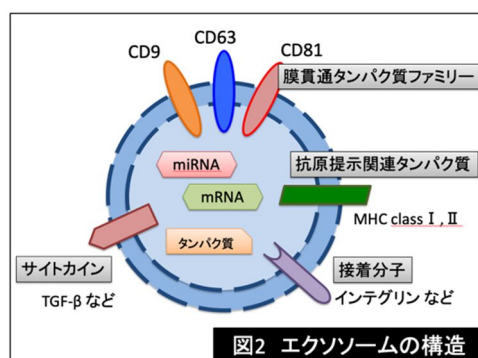
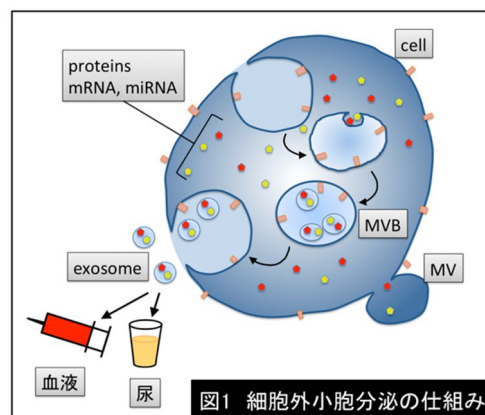
妊娠可能年齢における子宮内膜症罹患率は0.5～5%とされているが、子宮内膜症患者における不妊症発症は30～50%と高率であり、子宮内膜症と不妊症は密に関係していると考えられている。原因として、内膜症病変による卵巣や卵管周囲の癒着が不妊に影響すると考えられているが、子宮内膜症を有する不妊症例に対する薬物療法や手術療法が有効であるとする十分なエビデンスは示されていない。それ故に不妊の原因となる子宮内膜症へ進行する前に、初期病変からの治療介入が重要と考える。

### 子宮内膜症からの卵巣癌発生

近年、子宮内膜症性嚢胞の約0.72%に卵巣癌が含まれ、また子宮内膜症患者の卵巣癌罹患率は非内膜症患者の2～3倍であると報告された。また卵巣癌の中でも、特に類内膜癌、明細胞癌の約15～50%に子宮内膜症が関連しているとも報告され、卵巣癌と子宮内膜症は密に関係していると考えられる (Herrerros Villanueva M, et al. Clinica Chimica Acta 2019; 493: 63-72.)。このことから、子宮内膜症の早期治療介入は卵巣癌の発生母地となりうる病巣を減少させ、必然的に卵巣癌の罹患数減少につながる重要なポイントであると考えられる。

### 本研究テーマにおける背景と着目点

全身のあらゆる細胞は、細胞間コミュニケーションの手段として細胞外小胞 (extracellular vesicles; EV) と呼ばれる小胞を放出していることが近年明らかになった。その生成経路により約40～100 nm のエクソソーム (exosomes)と約100 nm～1 μm の微小小胞体 (microvesicles; MV) に区分される (図1) (Raposo G, et al. The Journal of Cell Biology 2013; 200: 373-383.)。エクソソームは多胞性エンドソーム (multivesicular body; MVB) を経由して分泌された物質で、内部にタンパク質や mRNA、miRNA を豊富に含んでおり (図2)、腫瘍細胞やその腫瘍微小環境内の細胞では、腫瘍増大や転移に関与していることも報告されている (Rak J, et al. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2010; 36: 888-906.)。さらに血液、尿、腹水など様々な体液内にもエクソソームが存在していることが確認され、リキッドバイオプシーなどへの活用方法が非常に注目されている。



近年、主に悪性腫瘍における早期発見ツールとしてのバイオマーカーや、ドラッグデリバリーシステムとして治療への応用の研究が進められている。良性腫瘍である子宮内膜症も同様に、子宮内膜症細胞から分泌されるエクソソームが子宮内膜症の早期発見に利用できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

近年、悪性腫瘍の転移を起こす機序の解明や、エクソソームを標的とした治療、エクソソームに含まれる miRNA のバイオマーカーとしての利用など、様々な可能性が注目されてきている。これまでエクソソームの研究報告は尿や血清からの抽出が主流だったが、本研究では病巣の組織から直接抽出することでより多くの特異的なエクソソームの抽出が期待でき、次世代シーケンサーを用いることで網羅的な解析が期待できる。本研究を通して子宮内膜症に特異的なバイオマーカーが明らかになれば、これまで手術でしか確認しえなかった初期病変も血液中のエクソソームを用いた診断が可能になり、初期病変に対する早期治療介入が可能になる。それは子宮内膜症の治療のみならず、それに関連する不妊症や卵巣癌の発生源の減少に繋がることは、非常にマーカーとしての意義は大きいと言える。

### 3. 研究の方法

#### 研究方法

令和2年度から令和3年度

#### 子宮内膜症病変、子宮内膜症性嚢胞の内容液、正常卵巣からエクソソームを抽出する

子宮内膜症に対し外科的切除を行った症例を使用し、切除組織培養分泌エクソソーム (tissue-exudative exosome, Te-EV) の抽出と分析を行う。摘出した子宮内膜症組織 (卵巣の内膜症病変、腹膜病変)、正常卵巣組織、正常腹膜組織を、FBS free 培養液中で 3 時間放置し培養液を回収する。回収した培養液を超遠心分離 (2,000xg, 10min → フィルターで不要物質を濾過 → 10,000xg, 70min) し、ペレットダウン法でエクソソームを抽出する。エクソソームが抽出されていることを、Western blotting によるエクソソームの膜貫通タンパク質ファミリー (CD63, CD81, CD9) の発現や、電子顕微鏡によるエクソソームの描出、ナノサイトによるエクソソームの粒子数や粒子径の測定により確認する。

#### 子宮内膜症病変以外に含まれているエクソソームの抽出と確認

子宮内膜症患者から採取した内膜症病変以外の試料 (子宮内膜組織、血清、尿、子宮頸管粘液) に含まれているエクソソームを抽出する。と同様に、子宮内膜組織は超遠心法のペレットダウン法で抽出を行う。また血清や尿、頸管粘液といった体液由来の試料に対しては、目的とするエクソソーム以外のタンパク質などの混在物を減少させるため、超遠心法のスクロースクッション法によりエクソソームの抽出を行う。そして 同様に、Western blotting、電子顕微鏡、ナノサイトを用いてエクソソームの抽出を確認する。

#### 抽出したエクソソームに含まれるmiRNAの同定、解析

で抽出したエクソソーム内に含まれる miRNA を miRNA isolation kit で単離し、次世代シーケンサーで網羅的に解析を行う (図 3)。子宮内膜症病変、正常卵巣組織

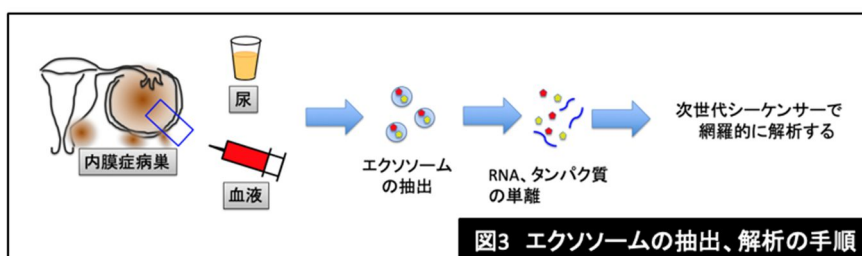


図3 エクソソームの抽出、解析の手順

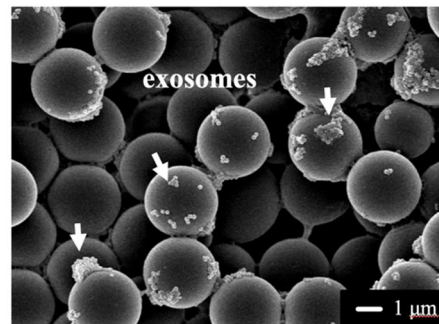
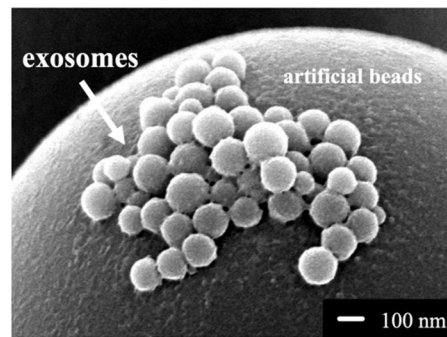
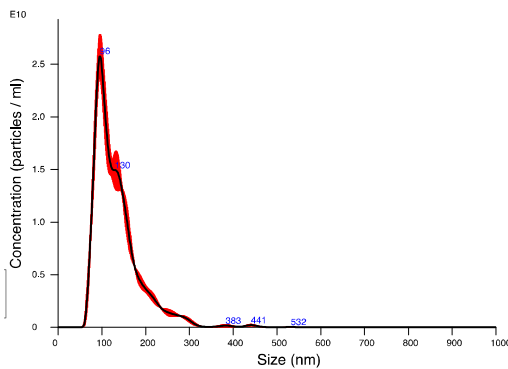
から抽出したエクソソームに含まれる miRNA を比較し、子宮内膜症病変に特異的な可能性のある miRNA を特定する。その miRNA が正常子宮内膜組織から放出されるエクソソームに含まれているか、また血清、尿、子宮頸管粘液内のエクソソームにも含まれているかを検証する。また各検体における特定 miRNA の含有量と、子宮内膜症の臨床所見（手術所見で子宮内膜症の進行度を評価する ASRM score、月経困難症の疼痛スコア、腫瘍の大きさ等）、手術前後での miRNA 量の変化を比較し、相関の有無を検証する。

### 特定したmiRNAが子宮内膜症の病状に及ぼす影響

子宮内膜症に特異的に発生すると考えられた miRNA が、実際に子宮内膜症の病状の進行に影響を及ぼしているかを *in vitro* で検証する。不死化子宮内膜症上皮細胞株 (EMOsis-CC/TERT) を用いて、Pre-miRNA (miRNA precursor) 及び miRNA inhibitor を用いて過剰発現、機能阻害させ、不死化子宮内膜症上皮細胞の増殖能や浸潤能を検証する。

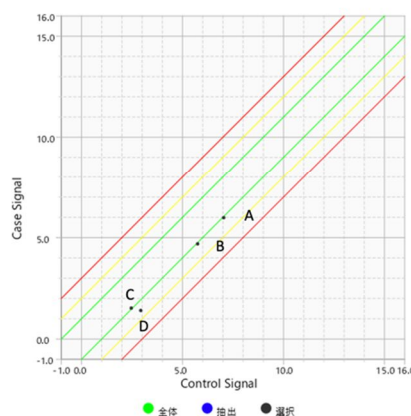
## 4. 研究成果

(1) NanoSight、走査型電子顕微鏡を用いて、Te-EV が回収できていることを確認した。

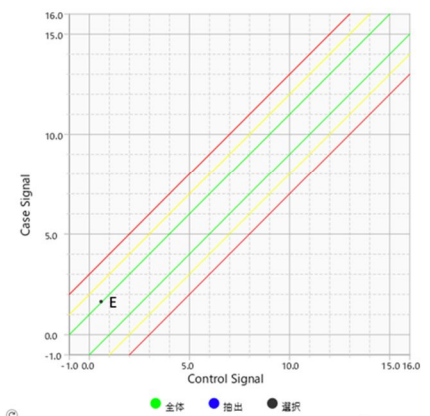


(2) 正常卵巢組織と囊腫壁から回収した Te-EVs はほとんど差を認めなかったが、一部有意差を認めた。

囊腫由来Te-EVsよりも正常卵巢由来Te-EVsで多く発現



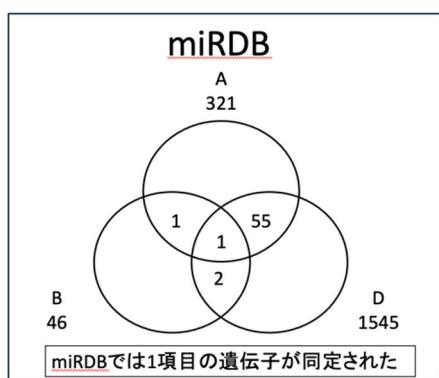
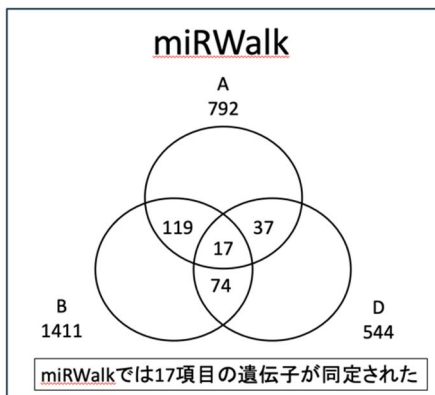
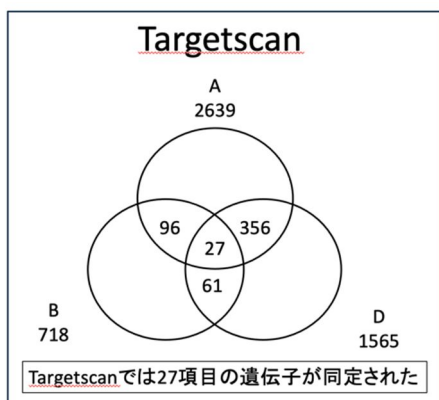
正常卵巢由来Te-EVsよりも囊腫由来Te-EVsで多く発現



(3) 有意差を認めた miRNA のターゲットとなる遺伝子を、Targetscan, miRWalk, miRDB を用いて検索した。

正常卵巣よりも嚢腫壁で有意に多く発現した microRNA は 1 種類であった ( $p < 0.05$ )。

嚢腫壁よりも正常卵巣で有意に多く発現した microRNA は 3 種類であった ( $p < 0.05$ )。



A ; hsa-miR-660-5p

B ; hsa-miR-339-3p

D ; hsa-miR-30b-5p

各々の遺伝子を THE HUMAN PROTEIN ATLAS を用いて、正常卵巣に特異的な ADAM12、NAV3、HOXD11、RIMBP2 の 4 つの遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小西博巳
2. 発表標題 切除組織培養分泌エクソソームを用いた子宮内膜症の診断および妊孕性改善にむけた治療戦略
3. 学会等名 第65回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------