

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2021  
課題番号：20K18580  
研究課題名（和文）がんの悪性化とかかわるエクソソームの分離法開発

研究課題名（英文）Development of capture of malignant Exosome

**研究代表者**

吉田 光孝 (Yoshida, Mitsutaka)

東京歯科大学・歯学部・臨床講師

研究者番号：20755029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：エクソソームは、細胞が放出する小胞である。全身の体液に含まれているため、バイオマーカーとして注目されている。がん細胞は、転移にさきだち悪性のエクソソームを多量に放出する。そこで、本研究では悪性のエクソソームを分離することを目標とした。  
まずは、悪性のエクソソームと反応するコート剤を開発した。そして、これを塗布したシリカゲルがカラムのなかでも反応することを確認した。この技術は、がんのみならず様々な医療分野への応用が期待できる。

**研究成果の学術的意義や社会的意義**

さまざまな疾患において、『早期発見』は予後をおおきく左右する。とくに、がんの分野では発見時期が生存率と直結するため、研究が活発にすすめられている。  
近年、細胞が放出する『エクソソーム』がバイオマーカーとして注目を集めている。エクソソームは、全身の体液中に存在するため、回収が容易である。しかしながら、体液中にはさまざまな細胞由来のエクソソームが混合している。そこで、診断へ応用するにはターゲットとなるエクソソームの分離が必須となる。本研究では、エクソソーム表面のたんぱくを利用して悪性のエクソソームを分離した。エクソソームの性質は疾患ごとに異なるため、本研究の技術応用は可能であり、その意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Exosomes are vesicles released by cells. Because it is contained in body fluids throughout the body, it is attracting attention as a biomarker. Cancer cells release large amounts of malignant exosomes prior to metastasis. Therefore, in this study, we aimed to isolate malignant exosomes.

First, we developed a coating agent that reacts with malignant exosomes. Then, it was confirmed that the silica gel applied to this reacted in the column. This technology is expected to be applied not only to cancer but also to various medical fields.

研究分野：口腔インプラント学

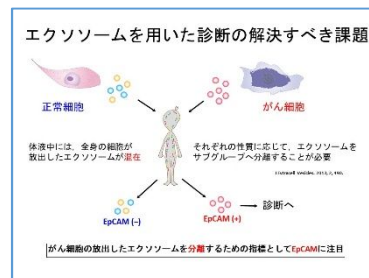
キーワード：エクソソーム がん バイオマーカー 人工ペプチド 分離カラム

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、さまざまな種類の小胞を体液中へ放出する。これまで、エクソソームとよばれる小胞は、細胞が不要物を排出するためのごみ袋として考えられてきた。しかしながら、昨今の研究からエクソソームが親細胞の遺伝情報を運ぶことが判明した。この、エクソソームを介した細胞間のコミュニケーションは、さまざまな生理現象と関連している。そのため、医療分野ではあらたなバイオマーカーとして注目を集めている。

エクソソームは、あらゆる細胞が放出し全身の体液中に含まれるため、採取が容易で検体として有利である。ところが、診断へ応用するには解決すべき課題が存在する。それは、体液中のエクソソームはさまざまな細胞由来の混合状態で存在する点である。そこで、標的となるエクソソームを分離する技術が求められる。

エクソソームの分離は密度を利用する方法がゴールドスタンダードとされている。これにより、高純度のエクソソームを回収できることは検証、確認済みである。そして現在、エクソソーム表面のたんぱくを利用した分離法の開発を模索している。



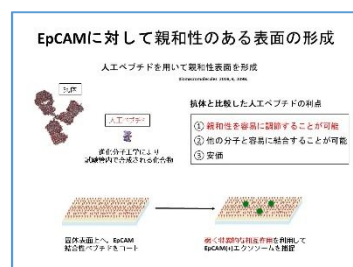
### 2. 研究の目的

がんの治療成績は、疾患の発見時期に依存するところが大きい。そのため、がんの早期発見は最重要課題であり、急務である。本研究では、早期発見を実現するためのバイオマーカーとしてエクソソームに注目した。

がん細胞が放出する大量のエクソソームは、体液中を循環して他の細胞に取り込まれる。そして、取り込んだ細胞の性質を変えることで、転移のしやすい環境をつくりだす。つまり、体液中よりがん細胞由来のエクソソームを回収する意義は大きい。

これまで、エクソソームを性質ごとに分離する場合には抗体が用いられてきた。エクソソームは、表面のたんぱくと抗体のつよい結合力により捕捉される。しかしながら、抗体と結合したエクソソームを診断に応用するためには、解決すべき課題が存在する。それは、両者の結合力が強いために、抗体と分離するには酸や熱処理などの厳しい条件が必要な点である。この処理により、エクソソーム自体の性質が変化してしまうことが懸念される。

エクソソームを自然な状態で診断するためにはマイルドな条件での回収が求められる。そこで、ペプチドアプタマーに注目した。ペプチドアプタマーは、設計・合成を自由におこなえることが最大の利点である。エクソソーム表面のたんぱくに対する結合力は、細かく調整が可能となる。また、大量合成が可能のために安価である点も臨床においての優位性がたかい。これまで、がん細胞由来のエクソソーム表面ではEpCAM分子の発現が亢進していることを確認した。そして、この性質を利用して平面上でエクソソームを捕捉することに成功した。本研究では、この技術をさらに発展させて分離カラムへ応用することを目指した。



### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞上清より高純度のエクソソームを精製

エクソソーム表面におけるEpCAM分子の発現がそれぞれ陽性・陰性の株を大量に培養する。そして、これまでに確立したプロトコル(密度勾配超遠心法)で、培養細胞上清より高純度のエクソソームを精製する。



#### (2) EpCAM陽性エクソソームを基盤上で捕捉

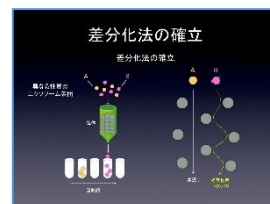
これまでに開発したEpCAM分子と親和性を有するコート剤を基盤平面上に塗布する。そして、エクソソーム表面のEpCAM分子をターゲットとして捕捉する。重要なのは、コート剤に抗体でなくペプチドアプタマーを使用する点である。そのため、捕捉後のエクソソームは、コート剤からマイルドな条件で分離可能となる。ただし、相互の結合力が弱すぎても捕捉効率が悪いために、条件の至適化が求められる。

#### (3) 分離カラムに充填する最適な材料(担体)の検証

担体として、一般的に用いられているシリカゲルやポリスチレンなどについて複数の種類・粒子径を検証する。本研究では、直径100nm程のエクソソームをターゲットとしているために表面の凹凸が大きいと、エクソソームが粗面に引っかかってしまう。しかしながら、表面が滑沢な球体では結合力が強力でない親和性を利用した吸着は得られない。本研究の要点(弱い結合力を利用したエクソソームの捕捉)からも、材料の選定は慎重におこなうべきである。

#### (4) エクソソーム分離カラムの作製

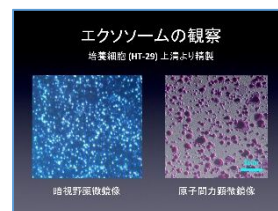
コート剤を塗布した担体をカラムに充填する。そして EpCAM 陽性・陰性株由来のエクソソームを同時に流す。陰性株由来のエクソソームは担体と反応することなく素通りするため、早い段階で回収される。これに対して、陽性株は担体と反応しながらカラムを通過するために、回収までに時間を要する。この回収までにかかる時間差を利用してエクソソームを性質ごとに分離できると考えた。



### 4. 研究成果

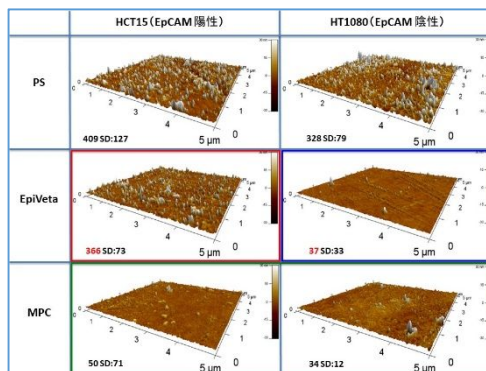
#### (1) 培養細胞上清より高純度のエクソソームを精製

EpCAM 陽性株 (HT-29, HCT-15)、陰性株 (HEK-293T, HT-1080)、合計4種類の細胞を大量培養した。エクソソームの精製については、さまざまな手法が検討されているが、超遠心法を繰り返すことで精製を完了とする機関が多い。しかしながら、体液中にはエクソソーム以外のナノ小胞も多く含まれるため、密度ごとに分画することで精度をあげることが望ましい。精製したエクソソームは、暗視野レーザー顕微鏡や原子間力顕微鏡をもちいて計測をおこなった。その結果、いずれの細胞株も密度 1.1 g/mL 付近で 100 nm 前後のエクソソームが回収された。また、ウェスタンブロットングや共焦点顕微鏡により表面のたんぱくを解析したところ、親細胞の性質が反映されていることを確認した。



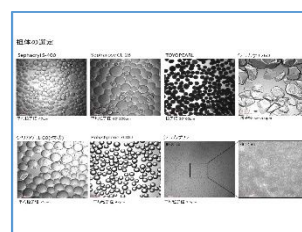
#### (2) EpCAM 陽性エクソソームを基盤上で捕捉

ポリスチレンのプレート上に EpCAM に対するコート剤を塗布した。コントロールはコート剤の構成成分でもあるリン脂質ポリマーとした。未処理の状態も含め、それぞれに、EpCAM 陽性株 (HCT15) 陰性株 (HT1080) 由来のエクソソームのものをのせて洗浄を繰り返した。定量解析は、SPIP イメージ解析ソフトウェアを使用した。その結果、コート剤と陽性株由来エクソソームの組み合わせで特異的な結合が確認された。その数は、陰性株の約10倍ほどであった。



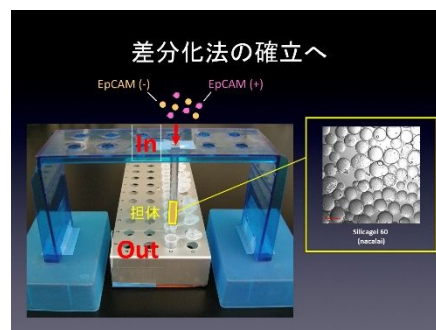
#### (3) 分離カラムに充填する最適な材料(担体)の検証

カラムに充填する最適な材料(担体)の検討をおこなった。担体として一般的に用いられているシリカゲルやポリスチレンについて、複数の種類・粒子径を検証した。粒子によってはコーティングの際に変形してしまうものもあり、条件の至適化に多くの時間を要した。その結果、シリカゲルが操作性や作業効率を考えたうえで最適であることが判明した。



#### (4) エクソソーム分離カラムの作製

充填するシリカゲルの表面には EpCAM 親和性コート剤、コントロールにはリン脂質ポリマーを塗布した。それぞれのシリカゲルをカラムに充填して、精製したエクソソームを流した。ここでのエクソソームはそれぞれ EpCAM 陽性・陰性株に由来する。その結果 EpCAM コート剤と EpCAM 陽性のエクソソームの組み合わせのみ、相互作用を確認することができた。他の組み合わせでは、シリカゲルとエクソソーム表面は反応せず、回収した液体からは填入量に近いエクソソームが観察された。これに対し、EpCAM 同士の組み合わせでは、エクソソームがカラムをゆっくりと通過するために、回収に時間を要した。また、回収量についてもコントロールと比較して少ない値となった。今後、EpCAM コート剤の親和性強度やシリカゲルの填入量、流速などをかえることで、様々な分離法が確立できると確信している。



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

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