

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2013～2014  
課題番号：25640082  
研究課題名(和文) EpCAM結合ペプチド提示金属内包フェリチンを用いたエクソソーム亜集団検出法  
  
研究課題名(英文) Differentiation of EpCAM positive exosome by using the ferritin particles displaying EpCAM-targeting peptide.  
  
研究代表者  
芝 清隆 (Shiba, Kiyotaka)  
  
公益財団法人がん研究会・その他部局等・その他  
  
研究者番号：40196415  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EpCAMに結合するペプチド・アプタマーEp114をウマ由来フェリチンL鎖遺伝子上流に融合し、Ep114ペプチドを提示するフェリチン組換え体を作製し、大腸菌を用いて精製する条件を確立した。得られたE改変フェリチンは、Ep114のもつEpCAM認識能力を失うことなくフェリチン分子上で発揮することを、ELISA実験で確認した。また、改変フェリチンの内部空間に、金属ナノドットを形成させた「金属内包標的化フェリチン」を調製する反応条件を確立した。

研究成果の概要(英文)：The peptide aptamer for EpCAM was fused at the N-terminal end of horse L-chain ferritin, to construct the modified ferritin that has the affinity for EpCAM protein. The ability of recognition for EpCAM of this engineered ferritin was confirmed by ELISA, and the conditions for the preparation of inorganic nano-dots containing ferritin were established.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム エキソソーム 細胞外分泌小胞 ナノ粒子 フェリチン EpCAM 悪性腫瘍 がん診断

## 1. 研究開始当初の背景

「エクソソーム」は、ほとんど全ての細胞が放出する、直径 100nm 前後の小胞体で、血液、唾液、尿、髄液、精液、骨髄液、腹水、胸水などのあらゆる体液に多量に存在する。放出細胞由来のタンパク質、microRNA、mRNA などその内部や表面にもっており、さらには、これらの生体情報分子は、エクソソームと取り込んだ、受け手細胞の中で機能を発現することが明らかにされている。エクソソームが、がん転移での「がん微小環境の形成」や、「免疫抑制状態の形成」などのいろいろな「生物現象」に深く関わっていることが分かってきており、これら知見をもとに、エクソソームを「診断」や「治療」に用いる研究が展開している。

このように、「エクソソーム」研究は、基礎・応用の両面で急速な進展を見せているが、未だに定量的な評価方法が確立していないという大きな問題を抱えている。これはその大きさが 100nm 前後と、生物分野においては扱いにくい大きさの範囲にあることが主な原因であるが、研究者は過去の研究で、ペプチド・アプタマーを提示した金属内包フェリチンを用いた種々の新技術を開発してきた。また、血中のがんマーカーや一部の悪性腫瘍でのがん幹細胞マーカーとして知られる「EpCAM」に強く結合するペプチド・アプタマー「Ep114」の取得に成功した。このような背景のもと、EpCAM 結合ペプチドを提示した金属内包フェリチンを用いて、エクソソーム集団の中から、EpCAM 発現エクソソームを特異的に金属ナノ粒子で標識し、これに伴うエクソソーム表面の電荷変位や光反射率の変化で、EpCAM 陽性亜集団を定量化するシステムの開発に挑戦した。他のグループ、またわれわれの研究からも、多くのがん細胞株から放出されるエクソソームに、EpCAM 分子が発現していることが確認されている。

## 2. 研究の目的

「EpCAM 結合ペプチド・アプタマーを提示した金属内包フェリチン」を利用し、EpCAM 発現エクソソーム表面へ金属ナノ粒子を結合させ、この結合に伴う表面の変化を利用したエクソソーム・サブクラスの定量化方法の開発を目的とした。

ヘテロな集団として存在するエクソソームは、その表面にそれぞれの放出細胞由来のユニークなタンパク質を発現している。したがって、エクソソーム集団をサブポピュレーションに分類していくには、これら表面マーカーを手掛かりに分類していくのが 1 つの方法である。

細胞の場合なら、表面マーカー特異的な抗体分子とフローサイトメトリーを組み合わ

せて分類していくのが定石だが、エクソソームの場合は、その大きさが 100nm と、細胞の大きさに比べて圧倒的に小さいために、現状のフローサイトメトリーでは、それぞれのエクソソームの性質解析を進めることは不可能である。抗体を固相化したビーズを用いた性質解析が提案されているが、これとて複数エクソソームをビーズに固相化してしまうために、定量化を放棄していることになる。将来的なエクソソームの「診断」「治療」への応用を考えると、エクソソームを 1 分子レベルで性質解析するシステムが開発されなければならない。

## 3. 研究の方法

EpCAM に結合するペプチド・アプタマー Ep114 をウマ由来フェリチン L 鎖遺伝子上流に融合し、Ep114 ペプチドを提示するフェリチン組換え体を作製し、大腸菌を用いて精製する。精製フェリチンの内部空間に、無機材料ナノドットを形成させ、この「金属内包標的化フェリチン」を EpCAM 発現培養細胞から調製した EpCAM 陽性エクソソームとインキュベーションさせ、それに伴うエクソソームの表面変化を、(1) 抵抗パルス変化の測定と (2) レーザー光による暗視野分散光の強度変化で観察し、EpCAM 陽性サブポピュレーションを定量化できる測定条件を探索する。

Ep114 ペプチドのウマ由来フェリチン L 鎖遺伝子上流の組み込みは、標準的な組換え実験手法でおこなった。得られた組換え体は、しかしながら、標準的なタンパク質精製条件では不溶化区分に回収されてしまった。そこで、精製時に用いるバッファーの種類と pH を組織的に変化させ、精製条件をスクリーニングすることで、十分な量の可溶性改変フェリチンを取得できる条件を見いだした。

いくつかのがん細胞株の EpCAM 発現量をウェスタンブロットティングで確認し、その中で、EpCAM を特に強く発現している HT-29 培養細胞の上清から、蔗糖密度勾配平衡超遠心法を用いてエクソソーム精製した。精製したエクソソームに EpCAM が発現していることをウェスタンブロットティングで確認した。コントロールサンプルとして EpCAM を発現していない Hs578T からエクソソームを精製した。

精製した改変フェリチンが、Ep114 由来の EpCAM 結合能力を保持していることを、Ep114 ペプチドに対する抗体と精製 EpCAM を利用した ELISA で評価した。

エクソソームの表面の電気的な性質を、エクソソームがナノポアをナノ粒子が通過する際に起こる抵抗パルス変化の観測でとらえることのできる、ナノ粒子に特化したコルターカウンターである、「qNano」を用いておこなった。

金属内包エクソソームのエクソソームへの結合により、エクソソームの屈折率の変化を、Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)法を原理とした「NanoSight」で評価した。

#### 4. 研究成果

フェリチンへのペプチドアプタマーの提示は、用いるアプタマー配列により、得られた融合タンパク質の性質が大きく変わることが過去の研究から明らかになっている。最悪の場合には、「発現しない」「可溶化しない」などのステップで研究が停滞してしまう場合がある。実際、本研究で「Ep114」ペプチドの場合、ウマ由来フェリチンL鎖のN末に融合させ、組換え体を、大腸菌を用いて発現・精製したところ、通常の前製プロトコルでは、十分な量が調製できないことが分かった。そこで、精製時に用いるバッファの種類や、pHなどを多条件検討し、十分な量の精製Ep114発現フェリチン分子が調製できる条件を見いだした。

次に、精製したフェリチンが、Ep114由来のEpCAM結合能力を保持していることを、Ep114ペプチドに対する抗体や精製EpCAMを利用しながら、ELISAで評価した。その結果、期待通りにEp114提示フェリチン分子は、EpCAMに対する親和性を賦与されていることが分かった。

フェリチン分子の内部空間には、水酸化鉄や金などの金属ナノ粒子を、試験管内のミネラル化反応で導入することができる。しかしながら、フェリチン表面の微細な改変が、この試験管内のミネラル化反応を邪魔する場合もある。今回のEp114提示フェリチン分子の場合は、この問題が発生することはなく、予定通り金属内包フェリチンを調製することができた。

エクソソーム亜集団の表面を何らかの分子で特異的に標識することで、その亜集団の物理化学的性質を大きく変化させることができる。これは例えば「表面電位」であったり、「反射率」などである。そこで、今回得られたEp114提示フェリチン分子と野生型フェリチン、および、EpCAM発現エクソソームとEpCAM陰性エクソソームを用いて、EpCAM陽性エクソソームの特異的な検出条件を探索した。

最初にエクソソームの表面の電気的な性質を、エクソソームがナノポアをナノ粒子が通過する際に起こる抵抗パルス変化の観測でとらえる可能性を追究した。この実験には、ナノ粒子に特化したコールターカウンターである、「qNano」を用いた。上記試料のいろいろな組合せから、EpCAM陽性エクソソームに特異的なシグナルを探索したが、研究期間中には見いだすことはできなかった。最も大きく変化することが予想されるのは、表面電位である。表面電位が測定できる「qNano」の開発が報告されていたが、残念ながら研究

期間中には市場に出回ることにはなかった。一方で、昨年より、共同研究で電気泳動ベースのエクソソーム表面電位の一粒子計測機器の開発を進めているので、今後はこの表面電位計と組み合わせることで、EpCAM陽性エクソソームの定量化をめざしていく。

医療分野での「診断」や「治療」にエクソソームを用いるには、大前提として、ヘテロ集団として存在しているエクソソームを、分類・分離していくことができないとしない。高感度の検出には、金属ナノドットなどの無機材料と工学測定機器との組合せが理想的ではあるが、無機材料の存在下で生体高分子の特異性をいかに出すかが大きな問題となる。申請者は、システムにおける特異的認識の問題を、ペプチド・アプタマーの「オルソゴナルティ」と「移植可能性」の2つのパラメータで整理することを提案してきた。ペプチド・アプタマーの特異性を十分に発揮するためには、フェリチンのような生体高分子で無機材料の表面を覆うことが必要であるとの結論に達し、「金属内包+ペプチド提示」フェリチンの応用による斬新的なナノファブ리케이션技術を開発してきた。本研究は、この延長上の研究で、既存の生物学的な測定手法では実現が難しい、エクソソームサブピュレーションの検出を、「EpCAM結合ペプチド・アプタマーを提示した金属内包フェリチン」を利用することで実現することをめざしたもので、将来的なエクソソームを用いた「診断」「治療」分野の基盤技術として広く使われる技術へと発展していく。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

芝 清隆、エクソソームの差別化による取得情報量の最大化、第1回日本細胞外小胞学会年会、平成26(2014)年8月26日、グランドプリンスホテル広島(広島市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: EpCAM に結合するペプチド  
発明者: 芝 清隆、國分克寿、菅加奈子  
権利者: 公益財団法人がん研究会  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2013/74655  
出願年月日: 2013年(平成25年)9月12日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝 清隆 (SHIBA, Kiyotaka)  
公益財団法人がん研究会・がん研究所蛋白創製研究部・部長  
研究者番号: 40196415

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者