

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640097

研究課題名(和文)がん細胞由来エキソソームを特異的に識別する核酸アプタマーの単離とその診断への応用

研究課題名(英文)Identification of nucleic acid aptamers which specifically recognize cancer-derived exosomes and its application for diagnostics

研究代表者

宮岸 真(Miyagishi, Makoto)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：30323538

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):エキソソームは細胞が放出する30nm-100nmの小胞であり、細胞由来のmiRNAやmRNAを含んでいることから、癌や様々な疾患の診断への臨床応用に期待が集まっている。本研究課題では、肺癌細胞、大腸癌細胞、乳がん細胞を用い、カウンターセレクト法により、それぞれの癌細胞由来のエキソソームを識別する核酸アプタマーの取得を目的とした研究を行った。ニトロセルロースフィルターを用いたセクション法に換えて、効率を上げるためにエキソソームを認識する抗CD68抗体磁気ビーズを用いたセクション法の検討を行い、数種類の大腸癌由来エキソソームを認識するアプタマーを取得することができた。

研究成果の概要(英文):Exosomes are cell-secreting lipid vesicles with a diameter of 30-100 nm, which include information (microRNAs and mRNAs) related to their cells/tissues of origin. It is thus to be expected its application to disease diagnostics for cancers and various diseases. In the present study, we attempted to identify aptamers which could distinguish exosomes derived from different cancer cell lines (lung cancer cells, colon cancer cells, and breast cancer cells) by means of counter SELEX method. However we failed in several attempts to obtain aptamers using the conventional nitrocellulose filter selection method. Therefore, to improve efficiency, we utilized anti-CD68-magnetic beads to capture exosomes as the selection procedure. As a result, we finally identify some aptamers for colon cancer-derived exosomes.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：核酸アプタマー エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

2007年に血中にあるエキソソームに microRNA が含まれていることが明らかにされてから、このエキソソームに含まれる microRNA を診断に応用しようという研究が数多く行われている。胃がんや肺がん、すい臓がんで血中のある種類の microRNA との相関が 2011 年頃から数多く報告されている。また、様々な疾患の患者の血中の microRNA を包括的に解析し、疾患と microRNA との関連についても Nature Method 誌に報告されている。(Toward the blood-borne miRNome of human diseases Nature Method, 8, 841-843, 2011) 一方で、血中のエキソソームの由来の 80%以上は血球細胞であり、正確な診断を行うためには、エキソソームをその由来によって分別する技術の開発が極めて重要になってきている。

これを可能にする方法として、我々は、先ず最初のステップとして、エキソソーム(全ての由来)を認識する核酸アプタマーの取得を試みてきた。そして、最近、293T 由来のエキソソームを認識する核酸アプタマーの単離に成功した。このアプタマーは HeLa 細胞由来のエキソソームにも結合し、エキソソームを由来に寄らず認識すると考えられる。本研究課題では、この手法とカウンターセレクト法を組み合わせ、癌由来エキソソーム特異的なアプタマーの取得を目指す。

2. 研究の目的

エキソソームは細胞が放出する約 30nm-100nm の小胞であり、細胞由来の miRNA や mRNA を含んでいることから、がんや様々な疾患の診断への臨床応用に期待が集まっている。申請者らは、最近、エキソソームを認識する核酸アプタマーの取得に成功した。本研究課題では、この研究成果をさらに進展させ、複数のがん細胞由来のエキソソームを識別できる核酸アプタマーの取得を行いたい。具体的ながん細胞としては、肺がん細胞、大腸がん細胞、乳がん細胞を用い、カウンターセレクト法により、それぞれのがん細胞由来のエキソソームを識別する核酸アプタマーを取得する。さらに、得られたそれぞれのエキソソームを認識する複数の核酸アプタマーを用いて、様々ながん細胞に対しても、識別能の解析を行い、核酸を用いた新しいがん診断法として基礎技術を開発する。

3. 研究の方法

エキソソームの精製

肺がん細胞は A549 を、乳がん細胞は MCF-7 を大腸がん細胞は HCT116 細胞株を用いる。それぞれ 10 cm シャーレ 10 枚撒き、80%コンフルエント時に無血清培地に置換し、2日間培養する。培養上清を回収し、0.22 μm のフィルターでろ過することにより、残存物および、200nm 以上の小胞を除去する。その後、100kDa の限外ろ過フィルターで 3 回洗

浄することにより、100kDa (約 10nm 以下) の物質を除去した。その後、Total Exosome Isolation (from cell culture media)(ThermoFisher 社)を用いて、さらに能収縮した。

SELEX 法によるアプタマーの単離

濃縮したエキソソームサンプルと、55 塩基のランダム領域を持った核酸配列から転写した RNA ライブラリー(2' F 修飾した C、U を含む)あるいは DNA ライブラリーを結合させ、ニトロセルロースフィルターでトラップさせ洗浄することにより、結合する核酸 RNA のセレクションを行った。結合した RNA を回収液(7M 尿素、10mM EDTA)で加熱することにより溶出し、フェノークロロホルム抽出および、エタール沈殿により精製を行う。その後、逆転写酵素を用いて、DNA に逆転写を行い(RNA ライブラリーの場合)その後、PCR で増幅した。さらに、RNA ライブラリーの場合には、2' F 修飾した CTP、UTP を含む転写キットを用いて、RNA に変換する。その RNA を変性ゲルで分離精製し、RNA を回収し、次のラウンドに進んだ。また、DNA ライブラリーの場合にはビオチン化したプライマーを用いた PCR により、増幅し、その後、ストレプトアビジン磁気ビーズによりシングルストランドのライブラリーを作製し、次のラウンドに進んだ。以上の工程を 3 - 10 回繰り返し、エキソソームに対する核酸アプタマーを濃縮し、次世代シーケンサーにより、大規模配列解析を行った。

4. 研究成果

(1)エキソソームの精製法の検討

まず、培地から濃い濃度で純度の高いエキソソームを調整する方法の検討を行った。評価法としては、図 1 のようなドットプロット法、図 2 のような FACS を用いた方法を使用した。ドットプロット法では、抗 CD63 抗体、抗 CD9 抗体を用い、FACS では抗 CD9 抗体磁気ビーズを用いてトラップし、抗 CD81 抗体を用いて検出するという方法を取った。

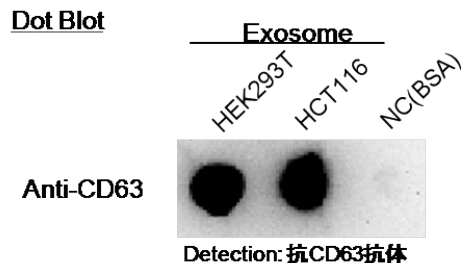


図 1 エキソソームのドットプロット法による検出

これらの実験による評価の結果、100kDa の限外ろ過による精製の後に、Total Exosome Isolation (ThermoFisher 社)のキットで再濃

縮かけると、純度と高い濃度のエクソソームサンプルが得られることが分かった。

FACS

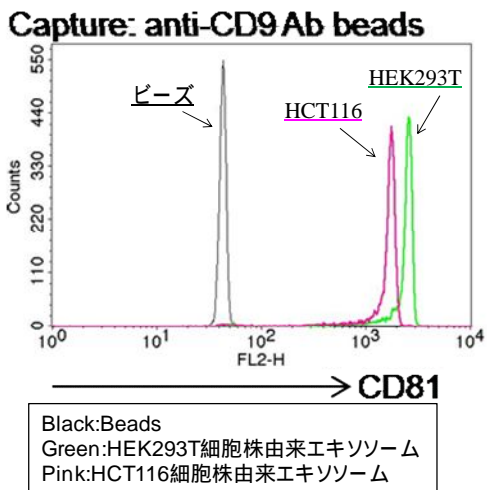


図2 FACSによるエクソソームの解析

(2)カウンターセレクト法の条件検討

本研究課題では、数種類の癌細胞由来のそれぞれに特異的なアプタマー取得をカウンターセレクト法により取得することを目指している。そこで、既に報告のあるEGF受容体のアプタマーを用いてカウンターセレクト法の条件の検討を行った。このEGF受容体アプタマーは、EGF受容体発現線維芽細胞を用いた実験から、EGF受容体特異的に結合することが分かっている。(図3)また、EGF受容体線維芽細胞由来のエクソソームに含まれたEGF受容体も特異的に認識することが判明している。

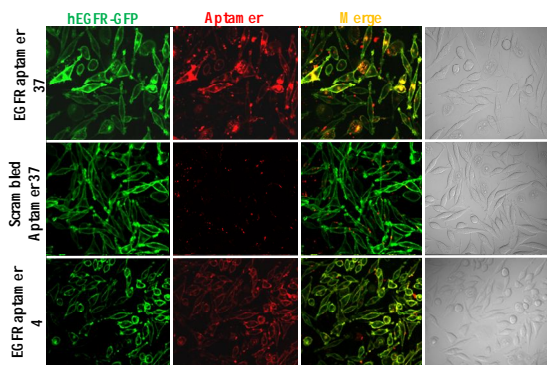


図3 EGF受容体アプタマーのEGF受容体発現細胞に対する結合実験

そこで、EGF受容体発現線維芽細胞から調整したエクソソームと線維芽細胞から調整したエクソソームを用いて、部分的にランダム化したEGF受容体アプタマーライブラリーからEGF受容体アプタマーのみを濃縮できるか否かについて検討した。様々な条件でカウンターセレクトを行い、次世代シーケンサーによる解析を行ったが、効率的にEGF受

容体アプタマーのみを濃縮する条件を見出すことはできなかった。

(3)エクソソームに対するアプタマーの取得
カウンターセレクト法の条件が決まらなかったことから、セレクトではカウンターセレクトを行わず、それぞれの癌細胞由来のエクソソームを用いてアプタマーを取得した後に、特異性を調べることにした。調整したそれぞれのエクソソームを用いて、ニトロセルロースフィルターによるセレクト法により、アプタマーの取得を試みた。しかし、数回の異なる条件のセレクトにおいて、エクソソームに対して十分な親和性を有するアプタマーを取得することができなかった。

そこで、HCT116細胞由来のエクソソームに絞り、エクソソームの純度をさらに上げてセレクト実験を行うことにした。また、RNAライブラリーだけでなく、DNAライブラリーを用いたセレクトも同時に行うことにした。

エクソソームの純度を上げる方法としては、ニトロセルロース法によるセレクト法に換えて、抗CD63抗体磁気ビーズを用いてエクソソームをトラップし、そのままセレクトに用いることにした。

その結果、最終的に、エクソソームに対して十分な結合を有する複数のDNA/RNAのアプタマーを取得することができた。今後、それぞれのエクソソームに対する特異性、Kd等の生化学的な性質について調べて行く予定である。

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1件)

猪股梨華、Zhao Jing、宮岸 真、核酸アプタマーを用いたエクソソーム精製法の検討、LS-BT合成研究発表会、2016年2月1日、つくば

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮岸 真（MIYAGISHI, Makoto）
産業技術総合研究所・バイオメディカル研
究部門・分子複合医薬研究グループ・グル
ープ長
研究者番号：30323538