

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32650
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K17104
研究課題名(和文) エクソソーム表面のタンパクに基づく分離法の開発

研究課題名(英文) Development of capture of Exosome by protein

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) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療において良好な治療成績をえるためには早期診断が鍵となる。近年、がん細胞の放出するエクソソームと呼ばれる小胞が、がんの悪性化とかがわっていることが判明した。エクソソームは全身の体液中に含まれているため回収が容易なため、実用性はたかい。本研究では、エクソソームもちいたがん診断法の開発を目標としている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は、自身の遺伝情報をふくむエクソソームとよばれる小胞を体液中に放出する。体液中を循環したエクソソームは、他の細胞へ遺伝情報を伝達して性質をかえる。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がさまざまな疾患と関連している。がん分野においては、エクソソームを利用してがん細胞が転移のしやすい環境をつくりだしている。本研究では、がん細胞由来のエクソソームを利用した診断法の開発を目標としている。

研究成果の概要(英文)： Early diagnosis is the key to obtaining good treatment results in cancer treatment. Recently, it has been revealed that vesicles called exosomes released by cancer cells are involved in malignant transformation of cancer. Since exosomes are contained in body fluids throughout the body, it is easy to collect them, which makes them impractical. This research aims to develop a cancer diagnostic method using exosomes.

研究分野：歯学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 バイオマーカー ペプチド がん リキッドバイオプシー 診断 親和性界面

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、医療分野においては低侵襲かつ正確な診断法の開発がすすめられている。診断のタイミングが早ければ、良好な治療結果をえられる可能性が高くなる。とくに、がん治療においては、早期発見が鍵となる。

がん分野においては、組織を採取しておこなう診断法が主流である。組織生検は、精度がたかいものからだへの侵襲もおおきいことが欠点としてあげられる。また、採取するタイミングにおいてもがんが疑われてからおこなうため、ステージが進行してしまっていることも多い。また、部位においては事前の組織採取が困難なこともある。そこで、組織生検にかわって注目を集めているのが液性診断である。

液性診断とは、組織を採取することなく体液から疾患の診断をおこなうことをいう。利点としては、組織生検と比較して低侵襲となるために患者が検査を受けやすくなると考えられる。また、検体の採取が容易となるために、検体をとり扱える人員も増える。その結果、低侵襲で早期の診断が可能となる。

しかしながら、体液を検体とする場合には解決すべき課題が存在する。それは、体液中にはターゲット以外にもおおくの成分がふくまれている点である。そのため、どの成分がバイオマーカーとして適切かを慎重にみきわめる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、『エクソソーム』をもちいた液性診断法の開発を目的としている。エクソソームとは、細胞が放出する小胞であり全身のあらゆる体液中に含まれる。以前より、エクソソームの存在自体は知られていたが、細胞が不要な成分を排出するためのごみ袋のような役割と考えられていた。しかしながら、細胞同士がエクソソームを介してコミュニケーションをとっていることが判明して以来注目を集めるようになった。興味深いことに、エクソソームは放出する細胞の遺伝情報を保持したまま体液中を循環する。そして別の細胞にとりこまれると、その遺伝情報を伝達して細胞の性質をかえる。がんにおいては、他の細胞の性質をかえることでがん細胞が転移のしやすい環境をつくりだすことがわかっている。すなわち、体液中よりがん細胞が放出したエクソソームを回収することができれば組織を採取することなく診断をおこなうことができると考えられる。

エクソソームの研究は世界中で活発におこなわれているが、その歴史は浅くコンセンサスは得られていない。その一つの要因としては、エクソソームの回収方法についてさまざまな提案がされている点が指摘できる。そこで本研究ではまずエクソソーム自体を高純度に回収してから、性質を徹底的にしらべることとした。そのうえで、がん細胞が放出したエクソソームを分離することを目標に設定した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞上清よりエクソソームを分離

エクソソームの分離については、研究機関によりさまざまな方法が提案されている。そのなかでもゴールドスタンダードと位置づけられているのは、密度勾配遠心法による分離である。エクソソームは、直径が 100 nm ほどの極めて小さな小胞であるため低速遠心では沈殿せず超遠心にかかる必要がある。しかし、超遠心後の沈殿物にはエクソソーム以外にも多くの成分がふくまれている。そこで、さらに沈殿物を密度勾配で分画することにより高純度のエクソソームを分離することが可能となる。まずは、培養細胞上清で密度勾配遠心法のプロトコルを確立することを目指した。

(2) ヒトの全唾液よりエクソソームを分離

細胞培養上清における精製条件が唾液に応用できるか検証した。唾液を検体として扱えれば採取も簡単でありその実用性はたかい。しかしながら、ヒトの唾液中にはエクソソーム以外にも多種多量の成分がふくまれているため、分離する前の処理が重要であると考えた。

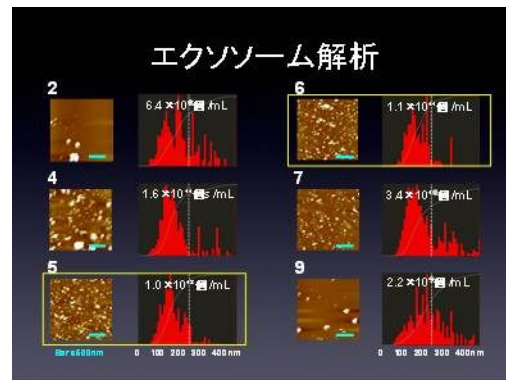
(3) 培養したがん細胞が放出するエクソソームを分離

エクソソーム表面は、放出した細胞と同じ性質であることが知られている。そこで、がん細胞の表面で発現が亢進する『EpCAM』分子を指標としてエクソソームを分離できるのではと考えた。これまで、EpCAM分子に結合するコート材の合成に成功している。そこで、コート材を塗布した表面におけるEpCAMを強く発現しているエクソソームの捕捉を目標とした。

4. 研究成果

(1) 培養細胞上清よりエクソソームを分離

細胞培養上清から、密度勾配遠心により高純度のエクソソームを分離する条件を確立した。超遠心法で得られた沈殿物をエクソソームと解釈している報告も多くあるが、これにはエクソソーム以外の成分も多く含まれる。これをさらに密度ごとに細かく分画することで、純度のたかいエクソソームを回収することに成功した。これにより、診断の精度が向上することが期待できる。エクソソームの性質解析について、定量には暗視野レーザー顕微鏡や原子間力顕微鏡を使用した。性質解析には、ウェスタンブロッティングや共焦点顕微鏡を使用した。その結果、既報のとおり密度 1.1 g/mL 付近でエクソソームが回収された。また、エクソソームで発現しているタンパクについても、放出した親細胞の情報を反映していることが確認できた。

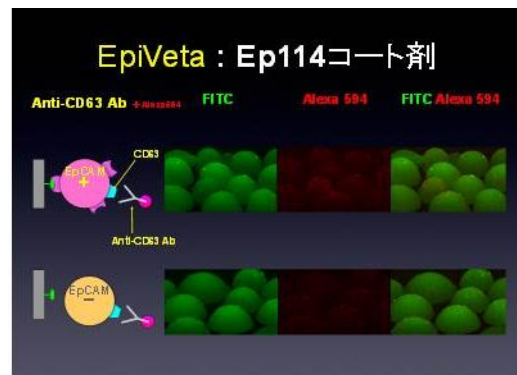


(2) ヒトの全唾液よりエクソソームを分離

全唾液には、バクテリアや細胞の小片などおおくの夾雑物がふくまれるため、フィルターを使用して大まかな濾過をおこなった。さらに、唾液特有のムチンによるたかい粘性には音波処理を施して対応した。前処理をおこなった後に培養細胞上清のプロトコールをおこなうことで、純度のたかい唾液由来エクソソームの回収に成功した。密度や粒子の大きさについては、培養細胞上清由来のエクソソームと近似していることが判明した。性質についても、CD9やCD63などエクソソーム特有のタンパクは共通していた。

(3) 培養したがん細胞が放出するエクソソームを分離

がんの悪性化にともない、がん細胞の表面ではEpCAM分子の発現が亢進する。まずは、がん細胞が放出したエクソソームにおいてもEpCAM分子を強く発現していることを確認した。その結果、がん細胞由来のエクソソームにおいてもEpCAM分子のみならず親細胞の遺伝情報を保持していることが判明した。続いて、EpCAM分子に結合するコート材をさまざまな材料にコーティングして、エクソソームとの相互作用を観察した。基盤によってコーティングの相性が異なり、それぞれの至適条件があった。そのうえで、平面上でのEpCAM陽性エクソソームとコート材の結合に成功した。今後は、この技術を分離カラムに応用することを目標としている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitsutaka Yoshida, Kazuhiro Hibino, Satoshi Yamamoto, Sachiko Matsumura, Yasutomo Yajima, and Kiyotaka Shiba	4. 巻 Mar;115(3)
2. 論文標題 Preferential capture of EpCAM-expressing extracellular vesicles on solid surfaces coated with an aptamer-conjugated zwitterionic polymer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 536-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.26489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

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