

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03538

研究課題名(和文) 大きな細胞外小胞に焦点をあてたがん診断情報の取得

研究課題名(英文) Maximizing the cancer diagnostic information contained in large extracellular vesicles

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・特任研究員

研究者番号：40196415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞(EV)は、がん細胞・正常細胞などのあらゆる細胞から放出される脂質二重膜で被われた小胞の集団である。本研究では、特にがん細胞から盛んに放出されているとの報告のある、「大きな」クラスのEVに焦点をあて、これまでその方法が確立されていなかった、大きなEVをサブクラスに分ける新方法を開発した。低速・短時間でのEVの密度勾配遠心による分離に続いて、非階層的データクラスタリング分析法で移動パターンから大きなEVを3つのグループに分類した。各グループはそれぞれ特徴的な生物機能関連タンパク質を含み、EVを診断・治療に用いる際のガイドとなる重要な知見を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞(EV)は、あらゆる細胞から放出される小胞の集団である。その大きさなどの物理化学的性質、内包する生体高分子の違い、そして想定される生成経路の違いがEVの多様性を生み出している。現在、診断や治療を目的としたEVの利用開発研究が盛んに進められているが、その前提として、多様なEV集団がどのようなサブクラスに分類できるのかを明らかにしておく必要がある。本研究では、特にがん細胞から盛んに放出されているとの報告のある、「大きな」クラスのEVに焦点をあて、これをさらにサブクラスに分ける方法の開発に成功し、大きなEVを診断・治療に利用する際のガイドとなる重要な知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) are heterogeneous entities, encased in a lipid bilayer, that are released from various cell types, including cancerous and normal cells. This study primarily targets the 'large' class of EVs, which are notably released from cancer cells, and introduces a new methodology for subclassifying these large EVs - a technique previously unestablished. This method first segregates large EVs via low-speed, brief-duration density gradient centrifugation, then sorts them into three subclasses based on the movement patterns of encapsulated proteins through non-hierarchical data clustering analysis. Each subclass contains proteins associated with distinctive biological functions, yielding key insights that could inform the diagnostic and therapeutic utilization of EVs.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞外小胞 液性診断 エクソソーム large EVs 遠心分離

1. 研究開始当初の背景

「細胞外小胞=EV」は、細胞が複数の生成経路で細胞外に放出する多様性をもつ小胞の集団を表している。ほとんど全ての細胞がEVを放出しており、EVは正常な細胞や臓器の分化・発生のみならず、がんを含めた様々な疾患の発症や進行に深く関与しているとする報告が相次いでいる(総説として例えば文献1)。したがって、体液中のEVを診断情報のソースとして、あるいは、EVそのものを治療薬として使おうとする「EV医療」とも呼ぶべき新しい医学分野が生まれつつあるといってもよい。このように診断・治療に関して高い潜在性をもつEVであるが、EVを生成する経路がいくつあるのか、異なる経路で生成されたEVが、機能的、性質的に違いがあるのか、放出後のEVを、生成経路、あるいは、機能に準じてサブクラス化するにはどうすればよいのか?といったEVの基本的な側面に対する知見はまだ不十分である。研究代表者は、多様な集団であるEVを分化、すなわちサブクラス化する方法について、2010年頃から研究を続けてきた。既に、「小さな細胞外小胞=小さなEV」について、標準的な平衡密度勾配遠心により、複数のサブクラスにさらに分けることができ、脂質の含有種類などに違いがあることを示した(文献2)。さらに、長時間の両方向での平衡密度勾配遠心といった非標準的な方法で小さなEVを密度分離する際の、検体間での密度パターンの違いを利用した分化法といった独自の手法も解析し、既存の方法では得られない分化情報を得ることに成功してきた(文献3)。これらはいずれも「小さな」細胞外小胞を対象とした研究であるが、研究を進める過程で、「大きな」細胞外小胞にも焦点を当てるべきだと考えるに至った。既に、EV研究報告の中には、オンコソームなど大きなEVが重要な生物機能を持つとの報告もあり、また、研究代表者のグループも、本研究を開始する頃には、口腔内扁平上皮がん患者の唾液が含むEVを、小さなEVから大きなEVまで、バイアスをかけることなく調べてみると、大きな細胞外小胞分画にも、特徴的な分子プロファイルの変化が検出されることが分かっていた(文献4)。しかしながら、研究開始当時、小さなEVに関しては、我々の成果を含め、いくつかの、「小さなEVをさらにサブクラス化」する方法が開発されていたが、大きなEVに関しては、このような手法は存在しなかった。そこで、大きなEVの研究を推進する基盤となる、大きなEVに特化した分化法の開発を開始した。

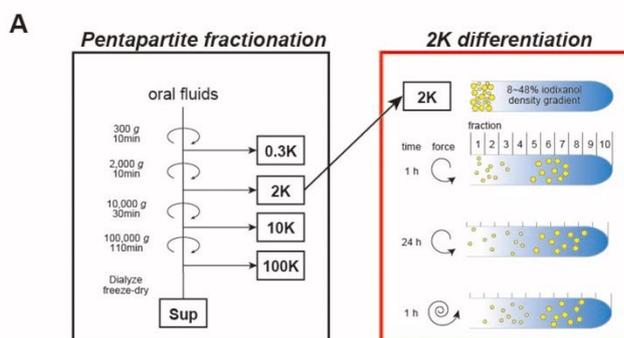
2. 研究の目的

本研究では、大きな細胞外小胞から効率よく診断情報を引き出すために、ヒトの口腔液(唾液)を材料とし、大きな細胞外小胞を分化(=分離・識別すること)し、サブクラスを定義する実験方法の確立を目指した。ここでいう大きな細胞外小胞は、全細胞外小胞分画を差分遠心法で5つの分画(0.3K、2K、10K、150K(文献4))に分けた時の「2K」分画とした。

3. 研究の方法

大きさの多様性が激しい「大きな」細胞外小胞を、何らかの物理化学的性質で展開することが、大きな細胞外小胞解析の最初のステップと考え、次のように戦略を立てた。まず、小さな細胞外小胞の分化で用いられる、等密度勾配超遠心法(等比重密度勾配超遠心法)は、粒子の直径多様性が高く、球形に近似できない「大きな」細胞外小胞には適用困難と判断し、最初に、ヒト口腔液の2K分画が含む様々な細胞外小胞を、広く展開できる遠心条件を探索した。

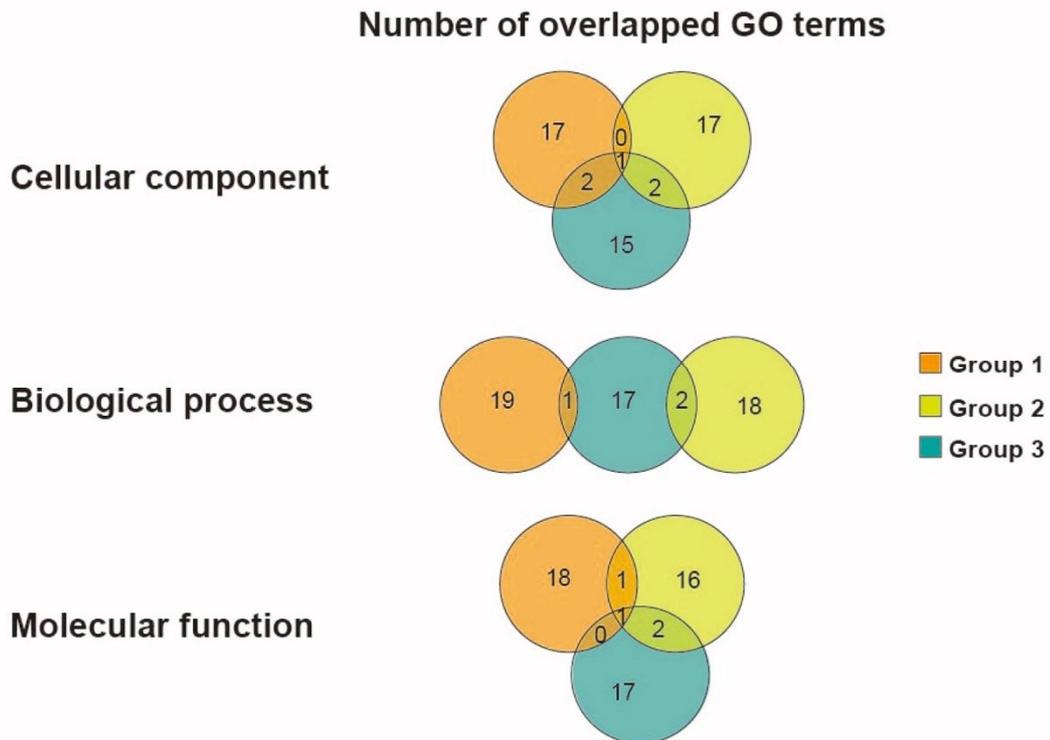
次に、上で確立した遠心条件で展開した2K分画を10のサブ分画として回収し、それぞれが含むタンパク質、小さなRNAを、それぞれを質量分析法、次世代シーケンシング法にて網羅的に解析し、何らかの生物学的特性を反映した展開が行われているかどうかを吟味した。



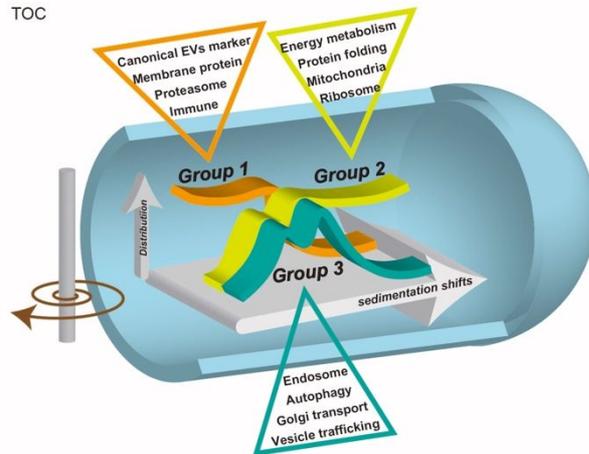
4. 研究成果

大きな細胞外小胞を含むヒト体液分画は、粒子の粒径に関しては分布が広い、すなわち、小さなEVから大きなEVまでの多様性に富んだEVが含まれていることが、電子顕微鏡観察から分かっていた(文献4)。この粒径の多様性を十分に引き出す密度勾配遠心分離条件を検討し、大きなEVを含む2K分画に含まれる様々な大きさのEVを、主にその粒径により展開できる条件、すなわち、8-48%のiodixanol密度勾配中を、2,000 x gで1時間、チューブの上部から下部に向かって沈降させる条件を見いだした。

上記の遠心条件で、大きな細胞外小胞を含む2K分画を、さらに10のサブ分画に分けた場合、近似的にはチューブのトップに近い分画(=分画1)には、小さな細胞外小胞が含まれ、中程度(分画5)には大きな細胞外小胞が含まれることになる。「大きな細胞外小胞分画=2K」に「小さな細胞外小胞」が含まれるのは、やや予想外の観察でもあるが、ヒト口腔液の全体像を調べた場合にも、CD9、CD63、CD81などの、いわゆる「小さな細胞外小胞マーカー」が「大きな細胞外小胞分画=2K」にも含まれていたことから(文献4)ある程度予想された結果でもある。可能性として、2K分画には、「小さな細胞外小胞を含んだ多胞小体」が含まれており、この多胞小体から、小さな細胞外小胞が調製過程で漏れ出し、これが観察されているのかもしれない。そこで、展開した2K分画を含む細胞外小胞を透過型電子顕微鏡で観察したところ、分画5には多胞小体様構造を持つ大きな細胞外小胞が観察できたことに加え、分画1と分画5の両方に多数の小さな細胞外小胞が観察された。さらに、CD9の分子量が高い派生物(CD9-d1)や、約150kDaの高分子量を持つCD81の派生物、CD81-HMWの分布を調べたところ、分画1にはCD9-d1とCD81が、分画5にはCD9、CD9-d1とCD81-HMWが検出されるといった複雑な分布を示した。このことは、多胞小体から漏れ出した小さな細胞外小胞を検出していたといったシンプルなシナリオではなく、より複雑な経路で生成された細胞外小胞が2K分画に含まれている可能性を示唆している。分画5に存在する小さな細胞外小胞は、おそらく大きな細胞外小胞(あるいは他の分子)と結合した状態で遠心されていると考えるのが妥当だと結論した。



この結果は、本手法で展開したタンパク質マーカーの解析には、「移動のパターン」を重視した解析が重要であることを示している。事実、10個に分けた各分画の質量分析の結果を、従来のクラスタリング法で解析してみたが、明確なクラスタリング結果は得られなかった。そこでここでは、パターン解析にしばしば利用される、非階層的データクラスタリング分析法、TimeSeriesKMeans 分析を用いることにした。最初に、シルエット分析から、3つのグループに分けることが妥当であると判断し、それぞれが 833、978、2162 のタンパク質で構成される「グループ 1」、「グループ 2」、「グループ 3」に分けた。分布の特徴は、グループ 1 に属するタンパク質は主に分画 1-5 に存在した。すなわち、これらは低い沈降速度を有している。一方、グループ 2 のタンパク質の移動パターンは、グループ 1 のそれと相補的な関係にあった。グループ 3 として分類されたタンパク質は、分画 3 と 5 で双極的なピークを持っていた。この低速度・短時間の勾配遠心分離と非階層的データクラスタリング分析の組み合わせを、沈降パターンによる細胞外小胞の差別化 (ESP) と名付けた。



ESP により分けられる「グループ 1」、「グループ 2」、「グループ 3」が、何らかの生物学的意味を持つことを確認するために、それぞれのグループが含むタンパク質の特徴を調査した。グループ 1 はテトラスパニン、CD9、63、81 などのしばしば小型 EV マーカーとして言及されるタンパク質が含まれ、また、他のグループに比べて細胞質や核内に局在するタンパク質が少なかった。機能的には免疫グロブリン他、HLA-Is や HLA-I による抗原ペプチドの提示に関与する 20S プロテアソームタンパク質が含まれるのが特徴となる。

グループ 2 および 3 では、タンパク質合成およびエネルギー代謝に関するタンパク質が豊富で、それには細胞質リボソームタンパク質、ミトコンドリアリボソームタンパク質、ヒートショック 70 kDa タンパク質ファミリー、電子伝達系、クエン酸回路、およびグリコール系などがある。タンパク質合成およびエネルギー代謝に関するタンパク質は、ややグループ 2 に多いが、いくつかはグループ 3 に存在していた。これは、グループ 2 と 3 が移動パターンベースの分析により十分に分離できていない可能性を示唆したが、以下のような観察から、やはりグループ 2 と 3 は異なるサブファミリーを捉えていると考えられる。すなわち、Rab ファミリータンパク質、SNAREs ファミリータンパク質、キネシンファミリータンパク質、アダプターファミリータンパク質など、小胞トラフィッキングに関連するタンパク質ファミリーはすべてグループ 3 に濃縮されていた。また、コアオートファジーシステムに分類されるタンパク質もグループ 3 に分類されていた。従って、低速度・短時間の密度勾配遠心分離後の移動パターンに基づいて分類されたグループ 1、2、および 3 は、以下の特性によって特徴付けられていると結論した。すなわち、グループ 1 は免疫関連タンパク質が豊富で、小型 EV とテトラスパニンおよびインテグリン (EV マーカー) を共有している。グループ 2 はタンパク質合成とエネルギー代謝のタンパク質によって特徴付けられている。グループ 3 はこれらのタンパク質をいくつか有しているものの、最も顕著な特徴は、小胞トラフィッキング関連およびオートファジー関連タンパク質の濃縮となる。

以上の結果は現在投稿中で、投稿原稿はプレプリントサーバーに掲載している(文献 5)。このようにして得られた大きな EV のサブクラス化に関する知見は、大きな EV を用いた診断・治療法の開発に際して、重要なガイドとなることが期待できる。

5. 文献

1. They et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7, 1535750 (2018).
2. Matsumura, S., Minamisawa, T., Suga, K., Kishita, H., Akagi, T., Ichiki, T., Ichikawa, Y. & Shiba, K. Subtypes of tumour cell-derived small extracellular vesicles having differently externalized phosphatidylserine. *J Extracell Vesicles* 8, 1579541 (2019).
3. Yamamoto, S., Okamura, K., Fujii, R., Kawano, T., Ueda, K., Yajima, Y. & Shiba, K. Specimen-specific drift of densities defines distinct subclasses of extracellular vesicles from human whole saliva. *PLoS One* 16, e0249526 (2021).
4. Hiraga, C., Yamamoto, S., Hashimoto, S., Kasahara, M., Minamisawa, T., Matsumura, S., Katakura, A., Yajima, Y., Nomura, T. & Shiba, K. Pentapartite fractionation of particles in oral fluids by differential centrifugation. *Sci Rep* 11, 3326 (2021).
5. Takamasa, K., Kohji, O., Hiroki, S., Koji, U., Nomura, T. & Kiyotaka, S. Differentiation of Large Extracellular Vesicles in Oral Fluid: Combined Protocol of Small Force Centrifugation and Pattern Analysis. *bioRxiv* 2023.04.29.537961 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 平賀智豊、野村武史、芝清隆	4. 巻 138
2. 論文標題 唾液とリキッドバイオプシー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 192-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraga Chiho, Yamamoto Satoshi, Hashimoto Sadamitsu, Kasahara Masataka, Minamisawa Tamiko, Matsumura Sachiko, Katakura Akira, Yajima Yasutomo, Nomura Takeshi, Shiba Kiyotaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Pentapartite fractionation of particles in oral fluids by differential centrifugation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82451-6	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 -

1. 著者名 Yamamoto Satoshi, Okamura Kohji, Fujii Risa, Kawano Takamasa, Ueda Koji, Yajima Yasutomo, Shiba Kiyotaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Specimen-specific drift of densities defines distinct subclasses of extracellular vesicles from human whole saliva	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0249526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0249526	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 河野孝育, 南澤宝美后, 芝 清隆
2. 発表標題 口腔液(唾液)が含む大きな細胞外小胞の性質解析
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyotaka Shiba
2. 発表標題 Large and small particles in oral fluid
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shirasaki Y, Suzuki N, Minamisawa T, Kojima R, Yamagishi M, Shiba K, Uemura S, Funatsu T
2. 発表標題 Live-cell imaging of release activity of extracellular vesicles
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ウェスタンプロッセッシング用増強剤	発明者 芝清隆、鈴木裕貴、 松田将、野田朋澄、 原田英治	権利者 公益財団法人が ん研究会、日油 株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2021-57457	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	大木 暁 (OHKI Akira) (50348546)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器化学療法科・医 長 (72602)	
研究分担者	杉山 裕子 (SUGIYAMA Yuko) (80322634)	公益財団法人がん研究会・有明病院 細胞診断部・部長 (72602)	

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			
米国	City University of New York			