

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22806

研究課題名（和文）臨床応用へ向けたがん由来細胞外小胞の多様性および特異性の解明

研究課題名（英文）Investigation of cancer extracellular vesicles for their revealing heterogeneity

研究代表者

横井 暁 (Yokoi, Akira)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30737135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣がん患者体液を用いて細胞外小胞（EV）抽出を行い、そのプロファイルをタンパク質および核酸（DNA, miRNA）、両方向より行った。卵巣癌特異的タンパク質を同定し、論文作成中、および特許出願中である。また、卵巣がんにおける治療薬奏効率にかかわるDNAプロファイルも同定し、今後特許出願、論文作成を予定している。シーケンスおよびプロテオミクスの結果から、EVの中でもサイズの大きいもの小さいもので異なった特性を有していることが示され、体液診断としての標的としては、サイズの小さいsmall EVを解析対象とすることが妥当であること、また生物学的機能の違いが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソーム研究は、世界的にみて、現在最も注目を集めている研究分野の一つであり、世界中で多くの研究者が未だ明らかにされていないエクソソームの機能を明らかにしたいと熱を帯びている。本研究において主に対象とする卵巣がんは、極めて悪性度の高いがんであり、患者予後が悪く、サブタイプ等の多様性から、臨床に還元できる研究成果が得られにくいがん種である。しかし、その反面、臨床応用を目指した基礎的研究を行う意義は高いと言える。本研究により同定した卵巣がんにおけるEVの特性は、需要の極めて高い、エクソソーム研究、卵巣がん研究の双方の発展に寄与する極めて重要な位置づけとなる。

研究成果の概要（英文）：Extracellular vesicles (EVs) were extracted from bio-fluids of ovarian cancer patient and fresh tumor tissue and profiled for both protein and nucleic acids (DNA, miRNA). Ovarian cancer-specific proteins have been identified and are in the process of being published and patent pending. We have also identified DNA profiles associated with response rates to therapeutic drugs in ovarian cancer patients, and we will submit a patent application and prepare the manuscript. The data from sequencing and LC-MS/MS indicated that EVs of different targets sizes have different characteristics, and that it is appropriate to analyze small EVs as targets for body fluid diagnostics, and that they have different biological functions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が放出する老廃物として 1983 年に同定されていたエクソソームに対する認識が明確に変化したのは、2007 年の Valadi らの報告 (Nature Cell Biology 2007 他) の、エクソソームが生理活性をもった分子を搭載し細胞間を水平移動することで、細胞間相互作用に関与する可能性が示唆された発見に端を発した。以後急速に研究が進み、現在では世界各地で EV の基礎的研究からトランスレーショナル研究まで盛んにおこなわれている。エクソソームをはじめとした EV は極めて多様性に富んでおり、放出形態からエクソソーム、Microvesicles, Oncosome, Apoptotic body などに分類されるが、実際に EV を抽出する場面ではそれぞれを厳密に分離することは極めて困難である。また最近国際エクソソーム学会 (International Society of Extracellular Vesicles: ISEV)、Small-EV (エクソソームを含む)、Large-EV といった小胞径をベースとした表現を行うことや、特定条件により分離した EV を特定の名称で呼ぶことなど、その定義に関する刷新を行っている (Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018), Journal of Extracellular Vesicles. 2018)。以上の背景から、EV のサイズや条件など、検討しなくてはならない事項は多岐に渡り、その重要性が高まっている。

## 2. 研究の目的

本研究は、未だ明らかにされていないがん細胞由来細胞外小胞の多様性と、臨床応用へ向けた特性を明らかにすることを目的とする。予後不良の卵巣がんを対象とし、血液、腹水、腫瘍組織等を用いて、EV 抽出方法の検討、EV 表面タンパク質のプロテオーム解析、EV 関連核酸 (RNA および DNA) の次世代シーケンスによる解析等を行うことで、臨床検体ベースの取り扱いの最適化、および特異マーカーの同定を行う。

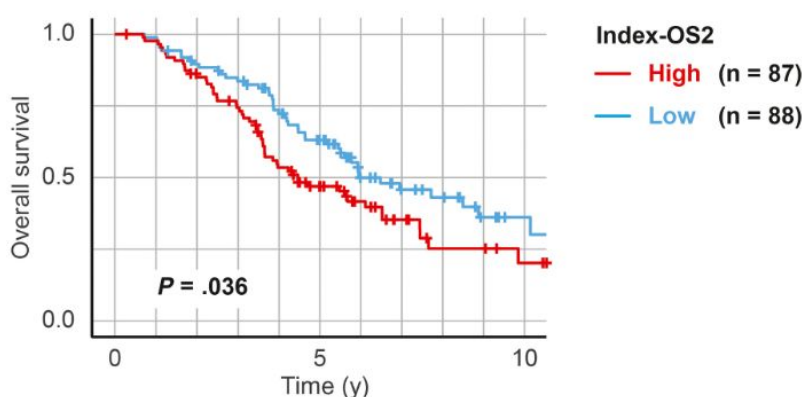
## 3. 研究の方法

卵巣がん患者体液および新鮮腫瘍組織を用いて EV 抽出を行い、そのプロファイルをタンパク質および核酸、両方向より行う。核酸においては、EV と相性のよいマイクロ RNA の解析より行う。より安定的な結果が得られた後は mRNA や DNA の解析も行う。EV 抽出は超遠心法、密度勾配法、次世代型ポリマー沈殿法、サイズ排除クロマトグラフィー法といった方法を併用して行う。また、エクソソームを始めとしたいわゆる Small-EV のみではなく、サイズの大きい Large-EV の回収も同一検体より行う。また、腫瘍組織からも ex vivo 培養法を用いて EV 回収を行い、直接腫瘍由来 EV と腫瘍自体の分子プロファイルも同時に比較検討を行う。このように多層的な情報から、EV マーカーとしてより信頼性の高い特異マーカー (タンパク質もしくは miRNA) の同定を行い、選択された候補をウエスタンブロッティング法や ELISA 法、定量 PCR などで検証し、候補を絞り込む。

## 4. 研究成果

当初の予定通り、種々の体液を対象として解析を行った。体液中マイクロ RNA シーケンスの解析では、先行研究である血中マイクロ RNA バイオマーカー研究では、がんの診断に関する解析を行ったが (Yokoi A, et. al., Nat Commun. 2018) 予後情報に関する検討は行っていなかったため、卵巣がんの中でも大部分を占めるサブタイプである高異型度漿液性がんに絞り、解析を行った。その結果、治療前の血中のマイクロ RNA 情報によってその後の患者予後が予測できる可能性が示唆された (図)。本研究は Cancer Sciences 誌に発表し (Yoshida K, Yokoi A, et. al., Cancer Science. 2021) 米国特許出願も行った (US Application No. 63318105)。現在は、高異型度漿液性がんの次に患者数が多い、明細胞がんにて、同様の解析を試みている。

(A)  $\text{Index-OS2} = 0.148 \times (\text{miR-187-5p}) + 0.273 \times (\text{miR-6870-5p}) + 0.186 \times (\text{miR-6870-5p})$



(B)  $\text{Index-PFS2} = 0.031 \times (\text{miR-187-5p}) + 0.231 \times (\text{miR-6870-5p}) + 0.351 \times (\text{miR-6727-5p})$

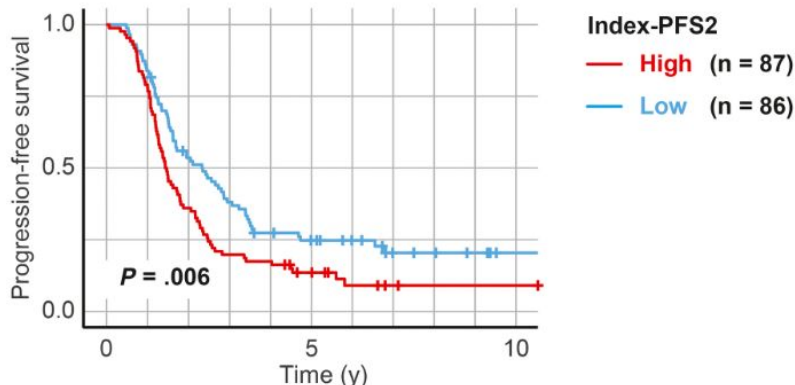


図 血中マイクロ RNA による予後予測

エクソソームが搭載する DNA に関しては、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業の支援も受けつつ、卵巣がん患者体液中エクソソームの DNA 解析を進めている。全ゲノムシーケンスや SNP アレイ、PCR 法で解析を行っており、現在治療薬奏功に関する新たな知見を得たため特許出願、および、論文投稿準備中である。

卵巣がん特異的タンパク質に関しては、ショットガンプロテオミクス、ウェスタンブロットティング法、ELISA 法、などを駆使して解析を行い、結果として、特異的膜タンパク質の同定を行った。特許は出願し、現在論文作成中である。

本研究を通して、EV の中でもサイズの大きいもの小さいもので異なった特性を有していることが示され、体液診断としての標的としては、サイズの小さい small EV を解析対象と

することが妥当であること、また生物学的機能の違いが明らかになった。これら知見は本研究の目的である、EV の多様性の理解を深める重要な知見と考える。引き続き成果の公表に向けて研究を継続する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yokoi Akira, Ochiya Takahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcancer.2021.03.032	査読の有無 有
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 Yoshida Kosuke, Yokoi Akira, Yamamoto Yusuke, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 40
2. 論文標題 ChrXq27.3 miRNA cluster functions in cancer development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-021-01910-0	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 Ma Shaolin, McGuire Michael H., Mangala Lingegowda S., Lee Sanghoon, Stur Elaine, Hu Wen, Bayraktar Emine, Villar-Prados Alejandro, Ivan Cristina, Wu Sherry Y., Yokoi Akira, Dasari Santosh K., Jennings Nicholas B., Liu Jinsong, Lopez-Berestein Gabriel, Ram Prahlad, Sood Anil K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Gain-of-function p53 protein transferred via small extracellular vesicles promotes conversion of fibroblasts to a cancer-associated phenotype	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108726 ~ 108726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108726	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
1. 著者名 Ukai Mayu, Yokoi Akira, Yoshida Kosuke, Suzuki Shiro, Shibata Kiyosumi, Kikkawa Fumitaka, Nakatsura Tetsuya, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Extracellular miRNAs as Predictive Biomarkers for Glypican-3-Derived Peptide Vaccine Therapy Response in Ovarian Clear Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 550 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13030550	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 Yoshida Kosuke, Yokoi Akira, Sugiyama Mai, Oda Shingo, Kitami Kazuhisa, Tamauchi Satoshi, Ikeda Yoshiki, Yoshikawa Nobuhisa, Nishino Kimihiro, Niimi Kaoru, Suzuki Shiro, Kikkawa Fumitaka, Yokoi Tsuyoshi, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Expression of the chrXq27.3 miRNA cluster in recurrent ovarian clear cell carcinoma and its impact on cisplatin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1255 ~ 1268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01595-3	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 Yoshida Kosuke, Yokoi Akira, Kato Tomoyasu, Ochiya Takahiro, Yamamoto Yusuke	4. 巻 111
2. 論文標題 The clinical impact of intra and extracellular miRNAs in ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3435 ~ 3444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14599	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 Yoshihara Masato, Kajiyama Hiroaki, Yokoi Akira, Sugiyama Mai, Koya Yoshihiro, Yamakita Yoshihiko, Liu Wenting, Nakamura Kae, Moriyama Yoshinori, Yasui Hiroaki, Suzuki Shiro, Yamamoto Yusuke, Ricciardelli Carmela, Nawa Akihiro, Shibata Kiyosumi, Kikkawa Fumitaka	4. 巻 146
2. 論文標題 Ovarian cancer associated mesothelial cells induce acquired platinum resistance in peritoneal metastasis via the FN1/Akt signaling pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2268 ~ 2280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32854	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5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 横井 暁
2. 発表標題 卵巣がんにおける核酸搭載細胞外小胞の機能解析と臨床応用
3. 学会等名 日本癌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井 暁
2. 発表標題 核由来DNA搭載エクソソームを用いた新規リキッドバイオプシー戦略
3. 学会等名 日本癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横井 暁
2. 発表標題 卵巣がんにおける核酸搭載細胞外小胞の包括的解析
3. 学会等名 日本癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 友康, 横井 暁, 松崎 潤太郎, 山本 雄介, 舘 慶生, 米岡 完, 清水 華子, 植原 貴史, 石川 光也, 滝澤 聡子, 青木 良晃, 加藤 健, 落谷 孝広
2. 発表標題 血液マイクロRNAによる子宮肉腫と変性筋腫の術前鑑別診断
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Yokoi, Alejandro Villar-Prados, Kajiya Hiroaki, Anil K Sood
2. 発表標題 Mechanisms of nuclear content loading to exosomes derived from high-grade serous ovarian cancer
3. 学会等名 婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------