

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06575

研究課題名（和文）癌組織放出細胞外小胞を標的とした抗体による創薬を目指した基盤研究

研究課題名（英文）Development of humanized anti-Te-EVs antibody for novel cancer therapy

研究代表者

神宮司 健太郎（Jingushi, Kentaro）

大阪大学・大学院薬学研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：80707571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本検討により、一部ではあるが抗腫瘍抗体が抗腫瘍活性を有することを見出した。そして抗腫瘍抗体が認識するProtein Xを同定することに成功した。さらに、Protein X陽性EVが大腸癌におけるバイオマーカーとなる可能性を見出した。今後、癌におけるProtein X陽性EVの病的意義を明らかにしていくとともに、簡便なProtein X陽性EV検出法の確立を目指していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の確定診断法としては大腸内視鏡検査が一般的であるが、侵襲性が高く合併症のリスクも有し、また医療経済的にも高価で医療従事者側の負担も高い検査法である。本研究で見出したProtein X陽性EVの簡易的な検出が可能となれば、非侵襲性に血液から検査が可能となる。これまでに癌細胞が放出するEVは癌の進展、転移において重要な働きを持つことが報告されている。したがって、一部ではあるが癌EV抗体による抗腫瘍作用を見出したことから、癌EVを標的とした創薬への可能性が示された点で意義がある。

研究成果の概要（英文）：Through this study, we found that anti-cancer EV antibodies have anti-tumor activity and that Protein X recognized by anti-cancer EV antibodies may be a biomarker in colorectal cancer. In the future, we will clarify the pathological significance of Protein X-positive EVs in cancer and establish a simple method for detecting Protein X-positive EVs.

研究分野：細胞外小胞

キーワード：癌 細胞外小胞 癌EV抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌における細胞外小胞研究の問題点

癌細胞を含む様々な細胞が細胞外小胞(EVs: extracellular vesicles)を放出することが報告されている。これまで主にモノクローナルな細胞集団である癌細胞株の培養上清より回収した EVs を用いた研究が行われてきたが、大腸癌を含む様々な癌組織はヘテロな癌細胞集団であると考えられており、**癌細胞株由来 EVs では癌組織から発生している情報の一端しか捉えることが出来ていない**。また、癌組織における癌細胞は様々な細胞間相互作用、液性因子などの暴露を受けている。その為、それら環境因子の暴露を受けていない**癌細胞株由来 EVs では、患者体内癌組織で放出される EVs を反映出来ていないことが危惧される**。

(2) 創薬ターゲットとしての癌細胞放出 EVs

詳細は不明であるが、癌細胞由来 EVs がリンパ球や樹状細胞などの免疫細胞に取り込まれることでその活性や増殖を抑制することが報告されており、癌細胞 EVs による免疫回避機構が注目されている。しかしながら、患者癌組織中の癌細胞由来

EVs が上記作用を有しているのか、また同一患者正常細胞がそのような性質を有していないのかどうかは明らかとなっていない。このように癌細胞が放出する EVs は非常に魅力的な創薬ターゲットであるが、ペアとなる正常細胞との比較解析が一般的になされておらず、**癌細胞特異的 EVs を標的とした創薬はなされていない**。その為、同一患者組織より正常細胞 EVs と癌細胞 EVs をペアで回収する方法が必要である。

(3) 術後切除組織浸出細胞外小胞 (Te-EVs: tissue-exudative EVs)

申請者は、術後腎癌組織検体を培養し、その上澄みを超遠心することにより、腎癌組織から直接放出された EVs (Te-EVs: Tissue-exudative EVs)を回収することに成功している(Jingushi et al, Int. J. Cancer: 142,

2018)。癌細胞株 EVs と異なり、Te-EVs は実際の癌組織環境を反映したヘテロな癌細胞集団から放出された EVs といえる。また、同様の方法を用いて大腸癌をはじめとして様々な癌腫より、正常組織及び癌組織からの Te-EVs 回収に成功している(図 1)。Te-EVs を用いることで、実際の癌組織で放出された癌細胞 EVs の生理機能、性状を解析できるだけでなく、正常組織より放出された EVs と比較することが可能である。**癌組織のみから放出される癌細胞 EVs 特異的な性質を明らかにすることができ、癌細胞 EVs を標的とし**

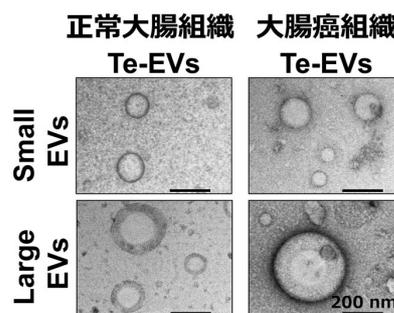


図 1 正常大腸組織、大腸癌組織より回収した Te-EVs の電子顕微鏡像

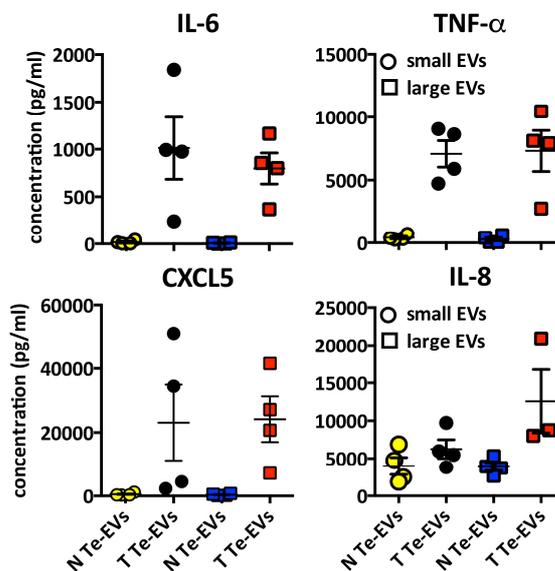


図 2 大腸癌 Te-EVs を単球に作用させた際の ELISA 結果 N: 正常大腸組織 Te-EVs、T: 大腸癌組織 Te-EVs

た創薬に繋がることを期待される。

(4) 大腸癌 Te-EVs による免疫細胞の攪乱

大腸癌組織及びペアとなる正常大腸組織より回収した Te-EVs を末梢血単核細胞に作用させた結果、単球及び NK 細胞がその多くを取り込んでいることが明らかとなった。

表現型解析の結果、大腸癌 Te-EVs のみが単球において、大腸癌進展に重要であることが報告されている IL-8 や CXCL5 などのケモカインを始め、腫瘍促進性に寄与する炎症性サイトカインである IL-6 や TNF- α の放出促進作用を有することが明らかとなった(図 2)。また、大腸癌 Te-EVs が NK 細胞の細胞傷害活性を著しく低下させることも見出している。一方で、正常大腸組織 Te-EVs では、このような表現型の変化はみられなかった。このように、正常大腸組織が放出する Te-EVs にはない、大腸癌 Te-EVs 特徴的な免疫細胞を介した癌微小環境構築作用の一端が明らかになってきている。

(5) 大腸癌 Te-EVs 特異的に結合する抗体の取得

抗体ファージライブラリーより複数の大腸癌 Te-EVs に対するモノクローナル抗体を作成した。得られた抗体が正常大腸組織 Te-EVs には反応せずに、大腸癌 Te-EVs にのみ反応することが確認できている(図 3)。

以上の結果より、抗癌 EVs 抗体を活用した、新たな機序による腫瘍免疫誘導に繋がる EVs 創薬が期待できる。

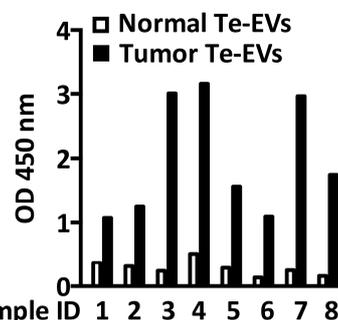


図 3 抗大腸癌 EVs 抗体を用いた大腸癌 Te-EVs の ELISA 結果

2. 研究の目的

(1) 癌組織放出細胞外小胞を標的とした抗体による抗腫瘍作用の評価、(2) 抗癌 EV 抗体による癌診断能の評価

3. 研究の方法

取得した抗癌 EV 抗体が癌 EV による腫瘍促進作用をブロックできるのかを検証する。

実験(1) 抗癌 EV 抗体を用いた大腸癌 Te-EVs による NK 細胞への作用遮断検証

NK 細胞株に大腸癌 Te-EVs と共に同抗体を作用させた後に、大腸癌細胞株と共培養し、NK 細胞による細胞傷害活性に与える影響を検討する。

実験(2) 抗癌 EV 抗体認識抗原の同定

大腸癌 Te-EVs 検体からタンパク質ライゼートを回収し、抗癌 EV 抗体による免疫沈降後、銀染色を行う。コントロール IgG では検出されず、抗癌 EV 抗体でのみ検出されたバンドを切り出し、質量分析による抗原同定を試みる。

実験(3) 大腸癌患者血清を用いた EVs の FCM 解析

大腸癌患者血清を用いて、抗癌 EV 抗体を用いた FCM 解析を行う。

4. 研究成果

抗癌 EV 抗体を用いた大腸癌 Te-EVs による NK 細胞への作用遮断検証

大腸癌細胞株 HT29 細胞と NK 細胞を共培養すると、HT29 細胞の生存割合が 3 割まで減少したが、HT29 細胞 EV の添加によって NK 細胞による細胞傷害活性が減弱した。さらに、抗癌 EV 抗体は NK 細胞に対する HT29 細胞 EV の作用を抑制した(図 4)。

抗癌 EV 抗体認識抗原の同定

コントロール IgG あるいは抗癌 EV 抗体による癌組織 EV の免疫沈降を行い、EV タンパク質ライセートを取得した。得られた EV タンパク質ライセートを SDS-PAGE で展開し、銀染色を行なった。抗癌 EV 抗体のみで得られたバンドを質量分析に供し(図 5)、抗癌 EV 抗体の抗原候補タンパク質(Protein X)を明らかにすることが出来た(図 6)。Protein X に対する抗体を用いて大腸癌 Te-EVs 検体における Protein X 発現量をウェスタンブロットにより検出を行なった。その結果、抗癌 EV 抗体と同様に大腸癌 Te-EVs 特徴的に Protein X が検出された(図 7)。

大腸癌患者血清を用いた EVs の FCM 解析

大腸癌患者血清(術前・術後 20 例)、健康人血清(15 例)を用いて Protein X 抗体による FCM 解析を行なった(図 8A)。その結果、健康人と比較して大腸癌患者では顕著に Protein X 陽性 EV の割合そして EV あたりの Protein X 存在量が高いことが明らかになった(図 8B、8C)。また、術前と比較して術後で顕著に Protein X 陽性 EV の割合そして EV あたりの Protein S 存在量が減少することを見出した。

本検討により、抗癌 EV 抗体が抗腫瘍活性を有すること、そして抗癌 EV 抗体が認識する Protein X が大腸癌におけるバイオマーカーとなる可能性を見出した。今後、癌における Protein X 陽性 EV の病的意義を明らかにしていくとともに、簡便な Protein X 陽性 EV 検出法の確立を目指していく。

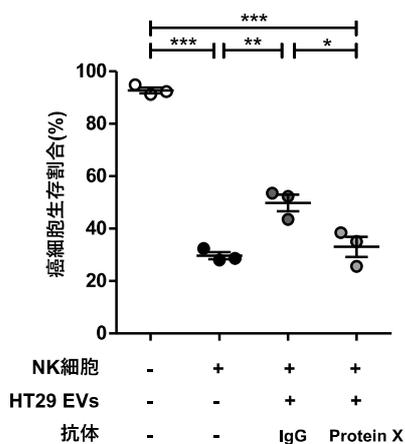


図 4 癌 EV による NK 細胞の細胞傷害活性低下作用は抗癌 EV 抗体により減弱する

蛍光標識した HT29 細胞と NK 細胞を共培養し、細胞傷害活性を評価した。癌 EV による NK 細胞の細胞傷害活性低下作用が抗癌 EV 抗体によって減弱した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, One-way ANOVA (Bonferroni 's test).

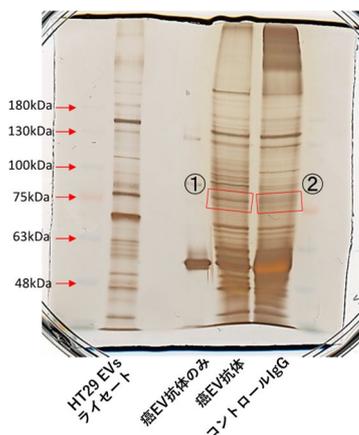


図 5 抗癌 EV 抗体による EV 抗原タンパク質の免疫沈降

HT29 細胞 EV から得たライセートに対して、抗癌 EV 抗体もしくはコントロール IgG により免疫沈降を行なった。免疫沈降後のサンプルを SDS-PAGE により展開し銀染色を行なった。サンプル間で異なっていたバンド部分を切り出し、質量分析によりタンパク質を同定した。その結果、では検出されず のみ検出された Protein X を見出した。

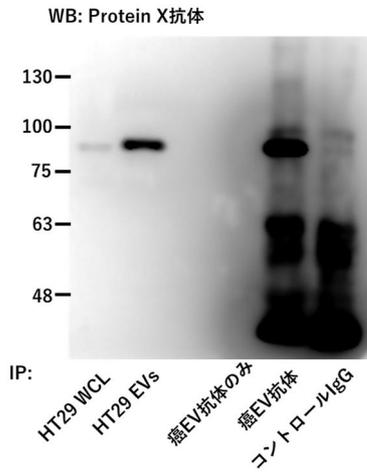


図6 Protein X抗体によるEV抗原タンパク質の免疫沈降
HT29細胞EVから得たライセートに対して、抗癌EV抗体もしくはコントロールIgGにより免疫沈降を行なった。免疫沈降後のサンプルをSDS-PAGEにより展開しProtein X抗体によるウェスタンブロットを行なった。

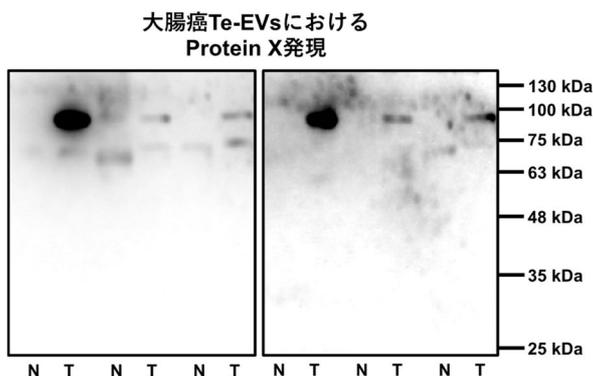


図7 Protein X抗体による大腸癌Te-EVsのウェスタンブロット
大腸癌Te-EVs、正常大腸Te-EVsから得たライセートをSDS-PAGEにより展開しProtein X抗体によりウェスタンブロットを行なった。N: 正常大腸Te-EVs、T: 大腸癌Te-EVs

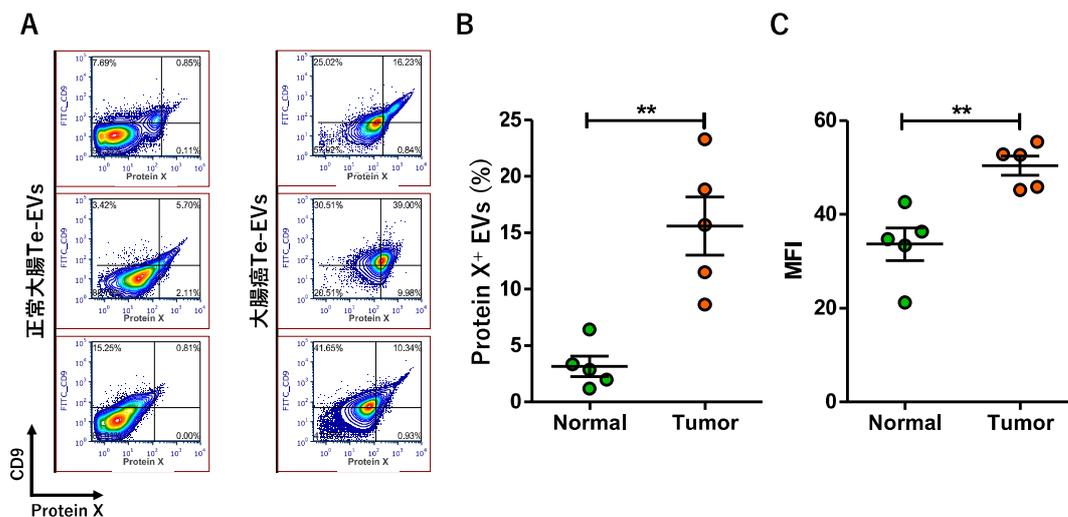


図8 Protein X抗体によるEV抗原タンパク質のFCM解析

(A) 大腸癌Te-EVs、正常大腸Te-EVsに対してEVマーカーであるCD9抗体、Protein X抗体を用いてFCM解析を行なった。各Te-EVsにおけるProtein X陽性EV割合(B)とEVあたりのProtein X存在量(C)。** $p < 0.01$, Mann-Whitney test. MFI: mean fluorescence intensity.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuya Monoe, Kentaro Jingushi, Yoshiaki Takano, Kohei Taniguchi, Kazumasa Komura, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 Colorectal cancer-derived Te-EVs function as tumor promoter by targeting monocytes via EVs-tRNA
3. 学会等名 ISEV2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 物江祐弥, 神宮司健太郎, 内藤拓也, 高野義章, 谷口高平, 小村和正, 長谷拓明, 辻川和丈
2. 発表標題 大腸癌放出細胞外小胞に内包されるsmall RNA は単球におけるToll-like Receptor 8を介して腫瘍促進的に働く
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 Yuya Monoe, Kentaro Jingushi, Yoshiaki Takano, Kohei Taniguchi, Komura Kazumasa, Hiroaki Hase, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 Colorectal cancer derived Te-EVs function as tumor promoter by targeting monocytes via EVs-RNA
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 細胞外小胞内RNA修飾による卵巣癌プラチナ製剤抵抗性を判別するための検査方法	発明者 神宮司健太郎、辻川和丈、宮本瞬輔、谷口高平、小村和正、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-147093	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がん検査方法及びがん治療剤	発明者 辻川和丈、神宮司健太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-107773	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔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
研究協力者	辻川 和丈 (Tsujikawa Kazutake)		
研究協力者	谷口 高平 (Taniguchi Kohei)		
研究協力者	高野 義章 (Takano Yoshiaki)		

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
---------	---------