

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640091

研究課題名(和文)腫瘍特異的エクソソームをダイレクトに検出するシステムの開発

研究課題名(英文)Establishment of system for direct detection of exosome

研究代表者

田原 栄俊(Tahara, Hidetoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：00271065

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)：細胞のフローサイトメーターとしてソニーが開発したSP6800の改良を行い、細胞外小胞であるエクソソームを検出するシステムの構築を目指した。機器のノイズとエクソソームシグナルを区別する為、細胞膜を染色するCellview試薬で染色することで、エクソソームとノイズの区別をすることができた。またAlexa488ラベルCD9およびAlexa647ラベルCD63で共染色した結果、エクソソームはヘテロな集団であることが明らかになった。また、膵がん細胞株の転移と共に増加するエクソソームタンパク質についても検出を試み、癌特異的なエクソソームをダイレクトに検出できる可能性が示せた。

研究成果の概要(英文)：Exosome is extracellular nano-vesicles secreted from different type of cells. However, there is no significant flow-based instrument to detect exosome because of high background noise under 500nm size detection by current flow cytometers. To overcome this problem, we used a spectral cell analyzer, SP6800 (Sony corporation) which adopts a new method to measure the full spectrum of fluorescence with a high degree of accuracy. We purified exosome and stained with Cellview reagent, and significant and specific population is detected very small size population, which is distinguished from noise population. We also found that Alexa488 labeled CD9 and Alexa647 labeled CD63 were presented in purified exosomes, but exosomes are heterogeneous population. We also tried to detect cancer specific exosome derived from pancreatic cancer, and the spectral cell analyzer SP6800 can be used to detect exosome particle directly.

研究分野：細胞分子生物

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、細胞から分泌される 50nm くらいの細胞外小胞でがんのバイオマーカーとして注目されている。エクソソームの内部にはマイクロ RNA が含まれており、その発現によるがんの早期診断や予後診断マーカー開発の研究が進んでいる。血漿や唾液など体液中のエクソソームについてその中に含まれるマイクロ RNA の解析をすることで主にがん診断などに用いられている。一方で、このような体液中には他の組織由来のエクソソームも含まれることから、がん細胞特異的なエクソソームを検出することが困難であることが、がん診断に用いる場合の感度や精度の上で問題となっている。他方、様々な細胞から分泌されるエクソソームは、膜に発現するタンパク質が大きく異なることが世界中の研究の成果として明らかになっており、ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) のデータベースに蓄積されており、エクソソームの膜タンパク質の違いを用いたがん診断にも注目が集まっている。これまで研究代表者は、様々な研究分野の研究者や産業界の研究者と日本 RNAi 研究会(研究代表者が会長就任)の活動などを通じて産学官のコミュニケーションをとり新しいイノベーションのシーズ開発を行ってきた。その中で、ソニーが持つ *Blu-Ray™* 技術を応用してつくられた世界で初めてのフローセル内を流れる粒子の高速計測機器をもちいた共同研究を実施してきた。本研究では、この技術をエクソソームの検出に用いてがん診断に応用できるものを開発することを最大の目的とする。

2. 研究の目的

がん細胞などから分泌される細胞外小胞であるエクソソームは、がん特異的なバイオマーカーとして注目されている。しかし、エクソソームはウイルス様の小さな大きさであるために、エクソソームの分泌量や性状の解析は非常に困難である。そこで、本研究では、まだ誰も成功していない**エクソソームをリアルタイムにダイレクトに検出するシステム**を構築し、ダイレクトに検出したエクソソームをもちいたがん診断システムを構築することを目的とする。

さらに、エクソソームと同時に、その中にあるマイクロ RNA を蛍光プローブで同時に検出する技術を開発し、血清などの体液を用いたがん診断に応用することも目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3つの研究計画により段階的な技術開発を行う。

1. エクソソーム粒子をフローセル中で直接検出する技術の開発
2. 検出できたフローセル中のエクソソームをがん細胞に特異的なエクソソーム膜タンパク質の抗体で検出できる技術の開発
3. がん細胞特異的なエクソソーム検出と同

時にエクソソーム中にあるマイクロ RNA を蛍光プローブで同時検出する技術の開発

何れの研究計画においても、エクソソームの特異性は、CD9、CD63 などの既存のエクソソームマーカーを用いて確認しながら注意深く検証する。

4. 研究成果

エクソソームは、細胞外小胞の一つであり、細胞同士のコミュニケーションツールとして機能している。エクソソームは、100nm の非常に小さい顆粒のため、その検出が非常に難しいことが問題である。特に、フローサイトメーターでは、検出可能な粒子径を下回っており、1粒子で検出することは困難であった。ソニーが開発した SP6800 を用いて機器の最適化と解析を行い、1粒子でのエクソソームの検出が可能になった。CD9 などのマーカーも検出でき、今後がん特異的なマーカーと組み合わせ、1粒子レベルでエクソソームが検出できる可能性が考えられた。

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 9 件)

1. Obayashi, M., M. Yoshida, T. Tsunematsu, I. Ogawa, T. Sasahira, H. Kuniyasu, I. Imoto, Y. Abiko, D. Xu, S. Fukunaga, H. Tahara, Y. Kudo, T. Nagao and T. Takata, microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer, *Oncotarget*, 査読有, 2016 Feb 16;7(7):8223-39, 10.18632/oncotarget.697
2. Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, Tahara H, Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y, A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-peptide, *FEBS Lett*, 査読有, 2015 Jan 2;589(1):84-8, 10.1016/j.febslet.2014.11.027.
3. Shimamoto A, Yokote K, Tahara H, Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming, *Front Genet*, 査読有, 2015 Jan 29;6:10, 10.3389/fgene.2015.00010.
4. Nezu T, Hosomi N, Takahashi T, Anno K, Aoki S, Shimamoto A, Maruyama H, Hayashi T, Matsumoto M, Tahara H, Telomere G-tail Length is a Promising Biomarker Related to White Matter Lesions and Endothelial Dysfunction in Patients With Cardiovascular Risk: A Cross-sectional Study, *EBioMedicine*, 査読有, 2015 May 30;2(8):958-65, 10.1016/j.ebiom.2015.05.025.

5. Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Shimamoto A, Tahara H, Ito E, Kojima S, Kurumizaka H, Ogawa S, Takata M, Yabe H, Yabe M, Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia, *Am J Hum Genet*, 査読有, 2015 Jun 4;96(6):1001-7, 10.1016/j.ajhg.2015.04.022
6. T. Miyagi, B. Shiotani, R. Miyoshi, T. Yamamoto, T. Oka, K. Umezawa, T. Ochiya, M. Takano, H. Tahara, DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins, *Cancer science*, 査読有, 105 (2014) 870-874. 10.1111/cas.12420.
7. Toru Hosoi, Yuki Inoue, Kanako Nakatsu, Naomi Matsushima, Noriko Kiyose, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Koichiro Ozawa, TERT attenuated ER stress-induced cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 447, Issue 2, 査読有, 2 May 2014, Pages 378-382, 10.1016/j.bbrc.2014.04.034.
8. S. Hirashio, A. Nakashima, S. Doi, K. Anno, E. Aoki, A. Shimamoto, N. Yorioka, N. Kohno, T. Masaki, H. Tahara, Telomeric G-Tail Length and Hospitalization for Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients, *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 査読有, 2014 Dec 5;9(12):2117-22, 10.2215/CJN.10010913.
9. K. Yuyama, H. Sun, S. Sakai, S. Mitsutake, M. Okada, H. Tahara, J. Furukawa, N. Fujitani, Y. Shinohara, Y. Igarashi, Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice, *The Journal of biological chemistry* 289, 査読有 (2014), 24488-24498, 10.1074/jbc.M114.577213

〔学会発表〕(計 49 件)

1. 田原 栄俊, マイクロ RNA を用いた抗がん剤の開発とコンパニオン診断, 最新癌治療セミナー2016, 2016年3月24日, 広仁会館, 広島県広島市
2. Hidetoshi Tahara, Non-coding RNAs Senescence-associated EVs from fibroblasts act as tumor suppressor at the tumor microenvironment, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2016/2/18, Hyatt Regency Maui, Maui, USA
3. 高木 翔太, 福永 早央里, 山本 祐樹, 木根原 匡希, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 新規老化誘導 microRNA はヒト膵癌細胞株の細胞死を誘導する, *BMB2015*, 2015/12/2, 神戸ポートアイランド, 兵庫

県神戸市

4. 木根原 匡希, 蔵元 達谷, 山本 佑樹, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, Histone variant H3.3 depletion induces cellular senescence in human diploid fibroblasts, *BMB2015*, 2015/12/2, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
5. 山本 佑樹, 高木 翔太, 福永 早央里, 木根原 匡希, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 細胞老化誘導 miRNA の網羅的探索, *BMB2015*, 2015/12/2, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
6. 矢野 公義, 福永 早央里, 高木 翔太, 塩谷 文章, 木根原 匡希, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, Depletion of PRPF19 regulates cell fate between cellular senescence and cell death, *BMB2015*, 2015/12/3, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
7. 福永 早央里, 山本 佑樹, 木根原 匡希, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 膵臓がんの抑制と悪性化に関わる miR-486 の機能, *BMB2015*, 2015/12/3, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
8. 嶋本 顕, 加藤 尚也, 横手 幸太郎, 田原 栄俊, 疾患特異的多能性幹細胞を用いた早老症ウェルナー症候群の早期老化発症機序の解明, *BMB2015*, 2015/12/2, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
9. 田原 栄俊, マイクロ RNA・エクソソームを用いた膵がんバイオマーカー, *BMB2015*, 2015/12/1, 神戸ポートアイランド, 兵庫県神戸市
10. 田原 栄俊, がん微小環境における細胞外小胞エクソソームの機能, 癌と骨病変研究会, 2015/11/13, 千代田放送会館, 東京都
11. 田原 栄俊, マイクロ RNA による疾患予防と超早期判断, 情報計算化学生物学会, 2015/11/5, グランフロント大阪, 大阪府大阪市
12. 城間喜智, 村岡賢, 嶋本顕, 田原 栄俊, 新規標的分子としてのがん促進的な転写因子の探索, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/10, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市
13. 矢野公義, 福永早央里, 塩谷文章, 木根原 匡希, 村岡賢, 嶋本顕, 田原 栄俊, PRPF19 をノックダウンしたことによる細胞老化誘導と細胞死誘導の制御機構の解明, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/10, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市
14. 山本佑樹, 福永早央里, 木根原匡希, 村岡賢, 嶋本顕, 田原 栄俊, 正常細胞における新規老化関連 microRNA の同定, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/10, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市
15. 福永 早央里, 山本 佑樹, 木根原 匡希, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 膵臓がんにおける miR-486 の機能の解明, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015/10/10, 名古屋

- 屋国際会議場,愛知県名古屋市
16. 田原 栄俊, エクソソーム研究の最前線-その基礎から臨床応用まで, 第 34 回日本認知症学会学術集会, 2015/10/2, リンクステーションホール青森・ホテル青森, 青森県青森市
 17. 田原 栄俊, テロメア・マイクロ RNA を用いた体液診断, JASIS2015, 2015/9/4, 幕張メッセ, 千葉県幕張市
 18. 岡田恵, 村岡賢, 寺西茂之, 佐古直紀, 木根原匡希, 嶋本顕, 田原栄俊, 細胞老化における細胞外小胞分泌の生物学的 意義の探索, 第 7 回日本 RNAi 研究会, 2015/8/27, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 19. 佐古直紀, 村岡賢, 木根原匡希, 岡田恵, 嶋本顕, 田原栄俊, 正常細胞由来細胞外小胞は細胞老化機構を制御している, 第7回日本 RNAi 研究会, 2015/8/27, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 20. 矢野公義, 福永早央里, 高木翔太, 塩谷文章, 木根原匡希, 村岡賢, 嶋本顕, 田原栄俊, PRPF19 siRNA を用いた抗腫瘍効果の機構解明, 第 7 回日本 RNAi 研究会, 2015/8/27, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 21. 高木翔太, 福永早央里, 山本佑樹, 木根原匡希, 村岡賢, 嶋本顕, 田原 栄俊, 新規老化誘導マイクロ RNA による膵癌細胞株の増殖抑制, 第 7 回日本 RNAi 研究会, 2015/8/27, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 22. 福永早央里, 山本佑樹, 木根原匡希, 村岡賢, 嶋本顕, 田原栄俊, 新規核酸医薬としての miR-486 の可能性, 第 7 回日本 RNAi 研究会, 2015/8/27, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 23. 村岡 賢, 田原 栄俊, プロテオミクスにおけるファージディスプレイ技術の役割, 日本プロテオーム学会 2015 年会, 2015/7/23, くまもと森都心プラザ, 熊本県熊本市
 24. 田原 栄俊, 膵がんを標的とした体液診断・治療薬の開発, 第 19 回日本分子標的治療学会学術集会, 2015/6/11, 松山全日空ホテル, 愛媛県松山市
 25. 福永 早央里, 山本 佑樹, 木根原 匡希, 村岡 賢, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 老化関連 microRNA による膵臓がん抑制メカニズムの解析, 日本組織培養学会第 88 回大会, 2015/5/26, 広島大学広仁会館, 広島県広島市
 26. 山本 佑樹, 福永早央里, 高木翔太, 木根原匡希, 村岡賢, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原 栄俊, 細胞老化を誘導する microRNA の網羅的スクリーニングとその機能解析, 日本組織培養学会第 88 回大会, 2015/5/26, 広島大学広仁会館, 広島県広島市
 27. 村岡賢, 久米秀明, 橋口一成, 足立淳, 朝長毅, 松原久裕, 木根原匡希, 嶋本顕, 田原栄俊, スキルス胃癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析, 日本組織培養学会第 88 回大会, 2015/5/26, 広島大学広仁会館, 広島県広島市
 28. 木根原 匡希, 田原 栄俊, 古江-楠田 美保, PKC と ERK 経路の二重阻害によるヒト多能性幹細胞の安定維持培養, 日本組織培養学会第 88 回大会, 2015/5/26, 広島大学広仁会館, 広島県広島市
 29. Hidetoshi Tahara, Senescence-associated EVs act as tumor suppressors in the tumor microenvironment, International Society for Extracellular Vesicles 2015, 2015/4/25, Bethesda north marriott hotel, WashingtonDC, USA
 30. 田原 栄俊, マイクロ RNA を用いたバイオマーカーおよび核酸医薬の開発, 第 59 回分子病態医学セミナー, 2015/4/3, 愛媛大学, 愛媛県松山市
 31. 田原 栄俊, テロメア・マイクロ RNA を用いた疾患の予防と早期診断, 第 40 回日本脳卒中学会総会, 2015/3/27, リーガロイヤルホテル広島, 広島県広島市
 32. 田原 栄俊, microRNA が切り拓く創薬研究の新展開について, 日本薬学会第 135 年会, 2015/3/27, 神戸学院大学, 兵庫県神戸市
 33. 田原 栄俊, マイクロ RNA・細胞外小胞がもたらす脳神経内科の未来, 第 13 回脳神経内科ジョイントミーティング, 2015/3/3, リーガロイヤルホテル広島, 広島県広島市
 34. 山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, microRNA による細胞老化誘導機構の解明, 第 37 回日本分子生物学会, 2014/11/26, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市
 35. 福永早央里, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 老化を調節する microRNA の膵臓がん細胞における機能解析, 第 37 回日本分子生物学会, 2014/11/26, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市
 36. 二瀬 由宇, 岡本 沙矢香, 竹田育子, 高橋哲也, 松本 昌泰, 田原 栄俊, アルツハイマー患者における血漿中マイクロ RNA の解析と診断への応用, 第 37 回日本分子生物学会, 2014/11/26, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市
 37. 田原 栄俊, DNA とタンパク質の相互作用を検出する新規テクノロジー; DSE-FRET assay, BioJAPAN 2014, 2014/10/16, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市
 38. 田原 栄俊, 老化誘導型核酸医薬の開発, 新適塾「未来創薬への誘い」第 28 回会合, 2014/10/6, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪府大阪市
 39. 山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 細胞老化を誘導する microRNA の網羅的

- スクリーニング, 平成 26 年度 がん若手研究者ワークショップ, 2014/9/3, 蓼科グランドホテル滝の湯, 長野県茅野市
40. 岡田 恵, 宗岡 美紗, 岡本 沙矢香, 二瀬由宇, 塩谷 文章, 嶋本 顕, 田原 栄俊, 細胞老化における細胞外小胞エクソソーム分泌の生物学的意義の探索, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 2014/8/29, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 41. 二瀬 由宇, 岡本 沙矢香, 竹田育子, 高橋哲也, 松本 昌泰, 田原 栄俊, アルツハイマー患者における血漿中マイクロ RNA の解析と診断への応用, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 2014/8/28, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 42. 品末 聡也, 岡田 恵, 宗岡 美紗, 植田俊樹, 佐古 直紀, 新田 尚, 田原 栄俊, スペクトル型フローサイトメーター SP6800 によるエクソソームの一粒子測定, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 2014/8/28, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 43. 山本佑樹, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 細胞老化を誘導する microRNA の網羅的スクリーニング, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 2014/8/28, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 44. 福永早央里, 塩谷文章, 嶋本顕, 田原栄俊, 老化を調節する microRNA による膵臓がん抑制機構の解析, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 2014/8/28, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 45. 志戸岡友希, 塩谷文章, 矢野公義, 嶋本彰, 田原栄俊, miR-27b の発現上昇に伴う標的遺伝子 PRPF19 の発現低下はヒト繊維芽細胞の細胞老化に関与する, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 2014/8/28, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 46. 田原 栄俊, Direct detection of extracellular vesicles and exRNA, 第 1 回日本細胞外小胞学会, 2014/8/28, グランドプリンスホテル広島, 広島県広島市
 47. 山本拓弥, 宮城徹, 塩谷文章, 梅澤一夫, 田原栄俊, NF B DSE-FRET assay を用いた NF B の DNA 結合阻害剤の探索, 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014/6/26, 仙台市情報・産業プラザ, 宮城県仙台市
 48. 塩谷文章, 田原栄俊, PRPF19 の発現抑制による細胞老化及び老化誘導型抗がん核酸医薬の可能性, 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014/6/26, 仙台市情報・産業プラザ, 宮城県仙台市
 49. Hidetoshi Tahara, Senescence-associated exosome, the mechanism of secretion and the function, KSEV2014 (Korean Society for Extracellular Vesicles), 2014/5/30, Ewha Campus Complex, Ewha Womans University, Seoul, Seoul,

Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院

(薬)・教授

研究者番号: 00271065