

がん細胞に由来するエクソソームの単離手法の確立

《研究の概要》

がん細胞に由来するエクソソームの単離手法の確立をめざし、(1) 材料表面に EpCAM に対する親和性を賦与できるコート剤、EpiVeta を開発し、EpCAM 陽性エクソソームを材料表面に捕捉する技術を開発し、(2) 粘性の高い体液（唾液）から、密度にしたがってエクソソームをサブクラスに分画するプロトコルを完成した。エクソソームは、細胞から体液中に放出される小さな小胞で、放出する親細胞由来の miRNA やタンパク質などを運ぶことから、がんの診断、治療、予防などでの利用研究に注目が集まっている。しかしながら、体液中には疾患細胞（がん細胞）由来のエクソソームのみではなく、正常細胞由来のエクソソームも多量に存在しており、これらを混合状態で解析するのではなく、がん細胞由来のエクソソームに焦点をあてて診断情報を引き出す技術の確立が求められている。ここでは、がんなどの上皮細胞には発現しており、血球細胞には発現していない EpCAM 分子に焦点をあて、EpCAM 陽性のエクソソームに特異的に親和性を与えるコート剤の開発を進めた。既に EpCAM に特異的に結合するペプチドアプタマーである Ep114 を取得していたので、これを細胞やタンパク質などの非特異的吸着を抑える目的で使用されている MPC (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) 重合体と、適当なリンカーを介して複合体化した。得られたコート剤 EpiVeta を無機材料表面にコートすることで、EpCAM 陰性のエクソソームの吸着は抑制し、EpCAM 陽性のエクソソームを捕捉するプログラマブルバイオ界面を完成させた。

親和性界面のアプローチとは別に、エクソソームを密度によりサブクラスに分ける方法も、エクソソームから得られる疾患情報量を最大化するひとつの方法である。採取に侵襲性の少ない、唾液からのエクソソームの単離と密度によるサブクラス化は、唾液の持つ特徴的な粘性のため、これまでは実現されていなかった。そこで、粘性を除去するために超音波処理、フィルトレーションなどのいろいろな前処理方法を検討し、また、密度勾配を形成するメディアに関しても最適の材料を選択し、最終的に、唾液検体から密度勾配超遠心法でエクソソームを分画するプロトコルを完成した。パイロットテストとして、8人の健常人唾液からエクソソームを分画し、各種エクソソームマーカー、miRNA などの定量化ができることを示した。エクソソームは、その大きさが 100nm 前後と言った、従来の生物学での測定機器（光学顕微鏡やフローサイトメトリー）では捉えることが難しい大きさをもっているために、その実体ははっきりとわからない。今回の研究で進めたように、いろいろなアプローチで、混合エクソソームをサブクラスエクソソームへと整理していき、診断情報の引き出しを最大化していく作業が、エクソソーム医療の実現には必要不可欠である。

芝 清隆

公益財団法人がん研究会

研究の統括

がん研究所蛋白創製研究部 部長

伊藤 正紀

東京慈恵会医科大学

エクソソームの生化学的解析

悪性腫瘍治療研究部 講師

研究報告

I 研究目的

「エクソソーム (エキソソーム、Exosome)」は細胞が細胞外に放出する小胞の俗称である。類似の小胞が、マイクロ小胞、マイクロ粒子、ナノ小胞、オンコスーム、アポトーシス小体、カルディオソーム、エクトソーム、エクソ小胞、プラズマ膜由来小胞、プロスタソーム、ラソソーム、等々いろいろな研究者からいろいろな定義で報告されている。これらの各種小胞が同一のものなのか、あるいは、異なるものなのかは今後の研究をまたなければならないが、国際細胞外小胞学会 (ISEV) は、これらを包括して「細胞外小胞 (Extracellular Vesicles, EVs)」と呼ぶことを推奨している。しかしながら、いまだに Exosome という表現を利用する研究論文が多いことから、ここではエクソソームを細胞外小胞と同義に使っている。

エクソソームは、上に述べたように、細胞から細胞外に放出された膜小胞である。細胞から放出されたエクソソームは、血液、尿、唾液、乳腺分泌物、精液、羊水、腹水、胸水、髄液、気管支肺胞洗浄液、房水、息などありとあらゆる体液に含まれているとされている。しかも、その量は相当なものであると考えられている (大ざっぱには、体液 1ml に 10 の 10 乗オーダーのエクソソーム粒子が存在しているといった感じ)。また、エクソソームは単なる脂質二重膜の袋だけではない。その中には、それを放出した細胞由来の miRNA、mRNA、lncRNA、タンパク質、代謝小分子化合物などが含まれているとされているし、脂質二重膜にはやはり、親細胞由来のタンパク質、糖タンパク質、糖脂質などが含まれている。エクソソームが染色体 DNA を含むかどうかについては、議論が続いているが、エクソソーム粗分画には明らかに染色体全域をカバーするように DNA 断片が含まれているようである。

エクソソーム様の粒子の発見は、20 世紀の前半にまでさかのぼることができる。「エクソソーム」という言葉自体が造語されたのは、1979 年と 1987 年の 2 回である。それぞれ異なる研究者が、異なる定義で細胞から放出される小胞をエクソソームと呼ぶことを提唱しており、このことが現在の名称を巡る混乱の一因にもなっている。いずれにせよ 20 世紀においては、エクソソームにはそれほど科学的な注目は集まっていたわけではなく、細胞がいなくなったタンパク質などを排出する、「お掃除システム」のようなものではないかと考えられていた。

ところが、2007 年に、スウェーデンの Lotvall らが、当時注目を集めていた血中循環 miRNA が、どうもエクソソームによって運ばれているらしいといった研究成果を報告する。このあたりから、どうもエクソソームは、単純に不要な生体高分子を捨てる装置として機能しているだけではなく、積極的に細胞間のコミュニケーションに使われているのではないかといった報告が出はじめ、にわかにエクソソーム研究が活気づくことになる。現在では、エクソソームを介した細胞間コミュニケーションが、正常細胞の分化、がん細胞

の転移、がん細胞の薬剤耐性獲得、いろいろな神経疾患や免疫疾患の発症や進展に関わる可能性を示す研究報告が相次いでいる。細胞から体液中に放出されたエクソソームが他の細胞に取り込まれて、エクソソームのもつ、核酸分子やタンパク質、脂質、その他のシグナルを受け取り、それに対応した生物機能を発揮する、というのがエクソソームを介した細胞間のコミュニケーションである。これまで独立性が高いと考えられていた細胞が、実はエクソソームを介して、限りなくつながっている、といった新しい生物観を、エクソソームは提供してくれている。さらには、生物種を越えたエクソソームを介した細胞間コミュニケーションも起こっていると考えられていることから、地球上の生物全てが、エクソソームを介してつながっているといった考え方もできる。

このように、基礎生物学的にも、教科書の新しい章を作るような勢いで発展するエクソソーム研究であるが、応用分野での展開も著しい。がん疾患だけに話題を絞っても、「がんの予防」「がんの診断」「がんの治療」の全ての面においてエクソソームの利用が考えられている。がんの進展にエクソソームがどうからんでいるのかは、現在まさに進行中の研究課題であるので、その詳細が明らかにされるにつれて、明らかにされた分子機構に基づいたエクソソーム予防・診断・治療法が開発されるであろう。その詳細がまだ十分に明らかにされていない現段階においても、エクソソームのがん予防・診断・治療への利用は十分に可能である。例えば、既にバクテリアが放出するエクソソームをワクチンとして利用されつつあることから考えると、エクソソームを利用した「がん予防」の新しい方法が生まれることが期待できる。また、エクソソームを、核酸医薬などを能動的に送達するナノキャリアとして用いようとする研究も盛んにおこなわれており、さらにアフエレーシス療法的な利用法を含めた「エクソソーム治療」の開発も活発に進められている。

そして「がん診断」分野である。おりしも、がんゲノム研究の成果として、現在次々と分子標的医薬が開発されつつある。これらの新し世代の抗がん剤は、がん細胞への特異性が高く、副作用が少ないといった大きな利点の裏返しとして、治療に際して正確にその抗がん剤が効果のあるがん種であるかどうかを見極めなければならない。がんは、その進展にともない、また治療に反応して体内でどんどん進化することが分かっているので、これらのがんの変化に即時的に対応した治療法の変更も必要となる。従来のがん組織を直接採取する生検法では、侵襲性が高いために、検査が頻回となると患者への負担が大きくなりすぎる。また、そもそも、膵臓がんなど、生検そのものが極めて難しいがん種も多い。このような背景のもとに、血液などの体液を用いた間接的な生検である「リキッド・バイオプシー」に期待が高まっている。従来は体液診断では特定生体高分子の生化学的、免疫学的検査から診断情報を得るが、これらに加えて「循環腫瘍細胞 (CTC)」「エクソソーム」「循環無細胞 DNA(cfDNA)」から診断情報を得ようとするのが、現在がんのリキッド・バイオプシーの研究開発での重点領域である。体液中のエクソソームから診断情報を引き出す場合には、「含まれる miRNA の種類と量」「含まれる lncRNA の種類と量」「mRNA の配列情報」「DNA の配列情報」「脂質二重膜に構成脂質の種類」「低分子化合物の種類と量」に加えて「エクソソームの数」「エクソソームの大きさの分布」「エクソソームの密度」など、いろいろな可能性が考えられる。この中でも特に、核酸がからんだ解析は、いろいろな定量化法が既に確立されているために、わが国のみならず、欧米においても集中的に研究が進んでいる。すなわち、例えば血漿や血清中に含まれるエクソソーム由来の miRNA

の解析から、薬剤反応性や、さらにはがんの早期発見を実現しようというわけである。

このように世界的規模で精力的に開発研究が進む「エクソソーム医療」であるが、まだまだ解決すべき基本的な問題が残っている。冒頭にも述べたように、エクソソームという言葉が意味する範囲に対する研究者間でのコンセンサスがとれておらず、それぞれの研究者が独自の定義でエクソソームを分離しているために、それぞれ同じ対象をみているのかどうか不明である。多くの場合は、血漿や血清の低速遠心上清分画を超遠心した後に得られる沈殿物を「エクソソーム」とみなして研究が進められる。しかしながら、そのような超遠心沈殿分画には、エクソソーム以外にも多くのいろいろな生体高分子が含まれており、観察される生物機能が、果たしてエクソソームに由来するものなのか、エクソソーム以外に由来するのかも曖昧な場合が多い。また、超遠心沈殿分画には、いろいろな大きさの小胞が含まれている。これらを全てエクソソームと呼ぶべきなのか、あるいは、例えば、何らかの特徴で「マイクロ小胞とエクソソーム」などといった具合に、サブクラスに分けた方が望ましいのか、あるいはそもそも分けられるのか、についてのコンセンサスはまだ得られていない。

そもそもエクソソームは全ての細胞から放出されているわけであるから、体液中には疾患細胞（がん細胞）由来のエクソソームのみではなく、正常細胞由来のエクソソームも多量に存在するはずである。これらを混合状態で解析するのではなく、がん細胞由来のエクソソームに焦点をあてて診断情報を引き出す技術があるにこしたことはない。究極的には、エクソソームを一粒子単位で解析して、診断情報をパッケージで取得することだが、これが実現するにはまだしばらく時間がかかると思われる。まずは、混合エクソソームの中から、がんに関連したエクソソーム亜集団を濃縮する方法を確立するのが、エクソソーム診断の社会実装への第一歩であると考え、本研究を開始するに至った。

II 研究計画および材料と方法

研究計画：混合エクソソームの中から、がんに関連したエクソソームに焦点をあてる戦略としては、EpCAM 分子に着目した。EpCAM 分子は、上皮性細胞のマーカーとして知られている。血球細胞には発現していないために、基本的には血液細胞には EpCAM 陽性の細胞は存在しないはずである。ところが、上皮細胞の悪性腫瘍であるがん細胞は、多くの場合、上皮マーカーである EpCAM の発現を保持している。したがって、血球を流れる EpCAM 陽性の細胞は、がんに関連した細胞である可能性が高く、これをベースとして血中の EpCAM 陽性の細胞数（正確には、EpCAM 陽性、サイトケラチン陽性、CD45 陰性）で予後診断をおこなうのが、CTC 診断で唯一 FDA 認可されている Cell Search 法である。EpCAM は膜タンパク質であるために、EpCAM 陽性の細胞から放出されるエクソソームの表面にも、EpCAM 分子が存在すると考えてよい。したがって、血中のエクソソーム混合体から、EpCAM 陽性のものだけを濃縮すれば、がんに関連した細胞から発信される診断情報を効率よく引き出せるはずである。「がん細胞に由来するエクソソームの単離手法の確立」の1つの目標として設定したのが、この EpCAM 陽性のエクソソームを濃縮するデバイスの開発である。このため、これまでの研究で開発してきた「プログラマブルバイオ界面」の技術を使い、EpCAM 陽性エクソソームに親和性のもつ材料表面を作製す

る研究を計画した。

がん細胞に由来するエクソソームの単離手法の確立のもう1つのアプローチとしては、唾液からのエクソソームの単離プロトコールの確立と、その密度によるサブクラス分類である。唾液の採取は血液に比べてさらに侵襲性が低いため、唾液エクソソームから十分な診断情報が引き出せるなら、極めて患者への負担が少ない診断法となる。唾液には、血漿成分がかなり含まれていることが分かっているので、唾液から頭頸部以外の疾患関連細胞由来のエクソソームを回収する可能性もあり、極めて魅力的な診断対象である。しかしながら、唾液には多糖に由来する独特の粘性が存在し、また、 α -アミラーゼやシスタチン、ヒスタチンなどの一部のタンパク質が多量に含まれているなどの問題があり、これまで、唾液を材料としたエクソソーム解析は、詳細な報告がなかった。唾液由来のエクソソーム解析が広くおこなわれるように、唾液からのエクソソームの分離プロトコールを開発し、さらに、密度によるサブクラス分けを可能とする実験条件を確立することを、本研究の第2の目的とした。

材料と方法：モデルエクソソームは、がん由来の培養細胞株から分離した。用いた細胞株は、EpCAM 陽性細胞である HT-29、MCF-7、HCT-15、H1650 で、EpCAM 陰性細胞は Hs578T、HeLa である。細胞はプラスチックシャーレ、あるいは大量培養装置 (BelloCell) で培養した。エクソソームの回収前には、48 時間、牛胎仔血清なしの状態 で培養した (牛胎仔血清に牛のエクソソームが多量に含まれるため)。細胞株によっては、牛胎仔血清なしの状態での培養が不可能な場合がある。この場合には、血清を超速心にかけることにより、予め牛のエクソソームを除去した血清を用いた。

唾液エクソソームは、がん研究会医学系研究倫理審査委員会の承認のもと、健常者より採取した唾液をソースとして下に示すような方法で分離した。

細胞培養上清を 8,900 g 10 分で低速遠心にかけることにより、細胞などを沈殿させた。0.22 μm フィルターでフィルタリング後の上清を 30,700 rpm、70 分の条件で超速心することで、エクソソーム粗分画を得た。得られたエクソソーム粗分画は、24,700rpm 20 時間の条件で平衡密度勾配法により密度によるさらなる分画をおこなった。

エクソソームの濃度は、ナノ粒子トラッキング法で測定した (NanoSight)。エクソソームの形態は、原子間力顕微鏡 (AFM) でおこなった。マイカ上にエクソソームを吸着させ、水中での観察と共に、乾燥状態での観察もおこなった。

エクソソームがもつタンパク質の解析は、ウェスタンブロッティング法でおこなった。次の分子に対する抗体を用いた。CD9、CD63、アクチン、 α -アミラーゼ、CD13、EpCAM、Alix、Hsp70、Hsp90、Muc1、Muc9、Plectin、TfR、Tsg101。

エクソソームが含む miRNA 定量化は、エクソソームが含む小 RNA を MiRCURY RNA Isolation Kit で精製後、cDNA に逆転写し、63 種の miRNA に関して、TaqMan 法を用いてリアルタイム PCR 定量をおこなった。測定は BioMark HD と 48.48 Dynamic Array Kit (Fluidigm) を用いた。

EpCAM に対するペプチドアプタマー Ep114 は固相法により合成した。MPC ポリマーとのコンジュゲートのために、ペプチドには予め propargyl を導入した。

MPC ポリマーは、日油株式会社の Lipidure を用いた。ポリマーとペプチドの結合の

ために、Quanta biodesign 社のポリエチレングリコールを用いた。これは片末端にアザイド基を、他の末端にアミン基を有する。

まず最初に、Lipidure ポリマーに対し、過剰量のリンカーと縮合剤を加え、ペプチドをエステル結合で MPC ポリマーのカルボキシル基に結合させた。メタノール溶液を外液として透析をおこなった後に、続いて過剰量(5~10 当量)のペプチドを加え、続いて、大過剰(100 当量)のアスコルビン酸ナトリウム水溶液(0.5M)と硫酸銅 5 水和物水溶液(0.5M)を加えた後、マイクロウェーブで 50℃で 30 分間加熱した。続いて、EDTA 水溶液を加えて反応を停止させた後、透析を十分におこない、Ep114 の固相化剤である「エピベタ (EpiVeta)」を得た。

各種材料表面にエピベタを、いろいろな濃度でコートした。コート法としては浸漬法とスピンコーターの二種類をおこなった。

Ep114 が材料表面にうまく提示されているかどうかの評価は、Ep114 に対するウサギ抗体の表面への反応性で評価した。具体的には、抗 Ep114 抗体を反応させた後に、ペルオキシダーゼのついた抗ウサギ抗体を反応させ、ECL で発光後、富士フイルム社のタイフーンで材料表面の発光を視覚化した。

エピベタをコートしたポリスチレン表面への EpCAM 陽性エクソソームの吸着は AFM で評価した。

III 研究成果

プログラムバイオ界面を用いた EpCAM 陽性エクソソームの捕捉：ペプチドアプタマーである Ep114 は、上皮性マーカーである Ep114 に特異的に結合するペプチドで、人工進化系を用いて取得されたものである。卵巣がん患者の腹水から粗精製されたエクソソームに EpCAM マーカーが存在するとする報告は既にあったが、実際、EpCAM 陽性のがん細胞から放出されるエクソソームを密度勾配遠心法で高純度に精製したものからも、EpCAM 分子の存在が確認された。全てではないものの、多くのがん組織は EpCAM 陽性であることから、CTC と同じように、エクソソームに関しても、EpCAM 分子に注目することで、がん由来のエクソソームを効率よく濃縮できる可能性が示された。本研究では、EpCAM に対するペプチド・アプタマーの特異的な結合能力を利用して、EpCAM 陽性エクソソームを捕捉するシステムの開発を狙った。その第 1 段階としては、EpCAM 陽性エクソソームに親和性をもつ、材料表面を実現することにあった。

想定されるエクソソームのサブクラスの濃縮装置の形態は、ビーズを用いる方法や管路系を用いる方法などが考えられる。またそれらデバイスの素材に関しては、ポリスチレン、PDMS といった高分子重合体系から、シリコンまで、いろいろな可能性がある。それぞれの素材の化学的な表面組成を利用したペプチドアプタマーの固相法も考えられるが、より汎用的な利用をめざす場合には、いろいろな材料表面に、同一のプロトコールで親和性界面を実現できる方法が好ましい。また、多くの無機材料の表面は、非特異的に生体高分子を吸着する性質をもつために、この非特異的な吸着を何らかの方法で抑制する必要もある。

MPC (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) 重合体は、リン脂質を模した高分子重合体で、医療用デバイスのコーティング剤としてすでに医療利用されている両

性イオン性ポリマーである。正確には、MPC ブロックと疎水性ブロックのランダム共重合体で、疎水性ブロックで材料表面に物理吸着し、MPC ブロックを表面に出すことで、細胞やタンパク質などの非特異的吸着を抑える。MPC 重合体で非特異的吸着を抑えた状態で、さらにペプチドアプタマーを表面に提示させること、すなわち、ペプチドと MPC ポリマーの共重合体を作製することで、EpCAM 分子に親和性をもった材料表面を実現させるのが、本研究のデザインである。予測不可能な可能性としては、コンジュゲートしたペプチドがコートされたポリマーのポリマー層に埋め込まれてしまう可能性や、EpCAM 分子のペプチド結合ポケットに物理的に到達できないという可能性である。

そのため、MPC 重合体とペプチド Ep114 の結合に際しては、いろいろな長さのリンカーを挿入することにした。リンカーが長くなるにつれて、MPC ポリマーとペプチドとの結合効率そのものも落ちてくる。ペプチドがどのような密度で、材料表面に提示されるのがベストなのかも、予測不可能な点なので、評価ポイントを、「材料表面をコート後に、Ep114 ペプチドを認識する抗体がアクセスできる」といった機能に設定して、最適の組み合わせをスクリーニングした。その結果、ポリエチレングリコール 7 ユニットのリンカーを用いることで、もっともよい結果が得られたので、これを「EpiVeta」として、EpCAM に対する親和性を与えるコート剤として完成させた。

次に、EpiVeta を用いて EpCAM に対する親和性を賦与した材料表面が、実際に EpCAM 陽性エクソソームに対する親和性を示すかどうかを調べた。この目的のために、医療デバイスでしばしば利用されるポリスチレンの表面に EpiVeta をコートし、コントロールのペプチドをもたない MPC ポリマーをコートした表面、および、何もコートしていない

ポリスチレンを準備し、これらに EpCAM 陽性、EpCAM 陰性のエクソソームを加え、洗浄後に結合したエクソソームの数を、AFM を用いて定量化してみた。その結果、非コートの表面には、EpCAM 陽性、EpCAM 陰性の両方のエクソソームが多く結合するのに対して、ペプチドをもたない MPC ポリマーをコートした表面では、これらのエクソソームの非特異的な吸着が大幅に抑制され、細胞やタンパク質の吸着抑制剤として使われている MPC ポリマーが、エクソソームの非特異的吸着剤としても優れた特性をもつことが分かった。さらに、EpiVeta をコートした表面へのエクソソームの吸着を評価したところ、EpCAM 陽性のエクソソームは、EpiVeta コート表面に多く結合するのに対して、EpCAM 陰性のエクソソームに吸着は、やはり大幅に抑制されていた。以上の結果は、当初の予定通り、MPC にペプチドアプタマーを結合させることで、非特異的な吸着を抑えた状態で、特定分子だけに親和性を与えるといった「プログラマブルバイオ界面」の概念証明実験を示すことができたことになる。

各種デバイス表面

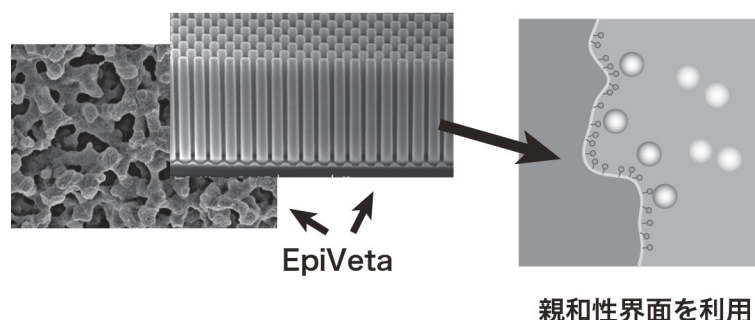


図 エクソソーム表面マーカーに特異的に結合するペプチド・アプタマーと MPC コート剤とのコンジュゲートで、いろいろな材料表面に特異的な親和性を賦与する「EpiVeta」コート剤。抗体ではなく「プログラマブル・バイオ界面」技術を用いることで競争力のある診断デバイスを開発していく。

唾液エクソソームの精製プロトコールの構築：高純度のエクソソームの調製は、エクソソーム診断の探索開発研究段階においては、極めて重要な作業ステップとなる。現状でのエクソソーム精製のゴールドスタンダードは、密度勾配超遠心法である。これは、膜小胞が他の生体高分子に比べて密度が小さいことを利用して、エクソソームを精製する方法である。具体的には、蔗糖などの密度勾配をチューブに形成し、このチューブのトップ、あるいはボトムに試料を挿入し、長時間超遠心にかけることで、エクソソームを、それ自身の密度と一致する場所へと移動させる。血清や血漿由来のエクソソームを高純度に濃縮する場合にしばしば用いられる方法である。また、この方法では、密度の異なるエクソソーム分画が得られること、すなわち、密度の違いによるエクソソームのサブクラス化が可能であることが複数の研究室から報告されており、このサブクラス化が、親細胞の違いや、あるいは、放出機構の違いを反映している可能性があることから、注目されている。

唾液は特有の高い粘性があり、また α アミラーゼ、ヒスタチン、スタテリンといった唾液特有のタンパク質が多量に含まれているといった特殊な体液である。最初に、標準的なプロトコールで唾液から密度勾配超遠心法でエクソソームの分離を試みたが、エクソソーム粗分画の成分が、ほとんどチューブ内を移動しないという現象を観察した。おそらく、ムチンなどの多糖の存在が、密度勾配超遠心法を難しくさせていると考えられるので、超音波処理、フィルトレーションなどのいろいろな前処理方法を検討して、この問題の解決を図った。さらに、密度勾配を形成するメディアについても、蔗糖以外の他のメディアも比較し、最終的に、唾液検体から密度勾配超遠心法でエクソソームを分画するプロトコールを完成した。パイロットテストとして、8人の健常人唾液からエクソソームを分画し、各種エクソソームマーカー、miRNAなどの定量化ができることを示した。

IV 考察

エクソソームは、その大きさが100nm前後と言った、従来の生物学での測定機器（光学顕微鏡やフローサイトメトリー）では捉えることが難しい大きさをもっているために、その実体ははっきりとわからないとされている。実際には、体液中には大きさ数十nmから、数 μ mまでのいろいろな大きさの粒子が混在しており、どこからどこまでをエクソソームとみなすべきなのか、それぞれ違った分子機構で細胞から放出されたものなのか、どのタイプの小胞から診断情報がもっとも効率的に引き出せるのか、などといった基本的な問題はまだまだ解決されていない。ヘテロなエクソソームを整理していくには、「大きさ」「密度」「表面マーカー」「その他の性質」など、いろいろな可能性が考えられる。最終的にどの方法によるサブクラス化が、もっとも効率よく診断情報の最大化に貢献するのかは、今後の展開をまたなければならず、現在は、いろいろな可能性を追究する探索的なフェイズにある。

本研究では、1つには上皮性マーカーであるEpCAM分子に注目し、EpCAMを発現するエクソソームを捕捉する方法を開発した。特定マーカーに注目して選別する方法は、抗体分子を用いるのが1つの方法であるが、エクソソームが治療方面でも利用されていくことを考えると、「連続的にサブクラス化」できるデバイスの開発が必要とされる。そのような連続分離デバイスは、マイクロ流路系や中空糸繊維の形式を取ると考えられるので、

これらデバイスの表面に、簡単な操作で EpCAM に対する親和性を賦与できるコート剤の開発を進めた。既に取得している EpCAM に親和性をもつペプチドアプタマーを利用し、非特異的吸着抑制コート剤である MPC ポリマーと組み合わせる事で、EpCAM 陽性エクソソームに選択的な親和性を賦与できるコート剤、「EpiVeta」を開発することに成功した。今後、この EpiVeta を用い、マイクロ流路系やビーズ、中空糸膜などに EpCAM 親和性を与え、EpCAM 陽性エクソソームを濃縮するデバイスを開発する方向へと進んでいかなければならない。また、がん患者検体を用いながら、「EpCAM 陽性エクソソーム」に注目することで、診断情報を最大化できることを示していかなければならない。

われわれグループを含め、いくつかのグループは、密度の違いによるエクソソームのサブクラス化が、その生成機構をなんらかの形で反映している可能性に興味をもっている。すなわち、特定の密度のエクソソームのサブクラスに焦点をあてることで、疾患エクソソームの情報を最大化できるのではないかと考えている。エクソソームを得るソースとしては、血液以外にも、唾液や尿が考えられ、侵襲性の観点からは後者の方が患者への負担が少ない。本研究では、これまで難しいとされていた、唾液からの密度の違いによるエクソソームのサブクラス化を可能とするプロトコルが完成された。また健常人検体を用いた段階なので、どのサブクラスからがんに関連した情報が引き出せるのかは、現在計画の中の、口腔がん患者から採取した唾液の解析から明らかとなっていく。

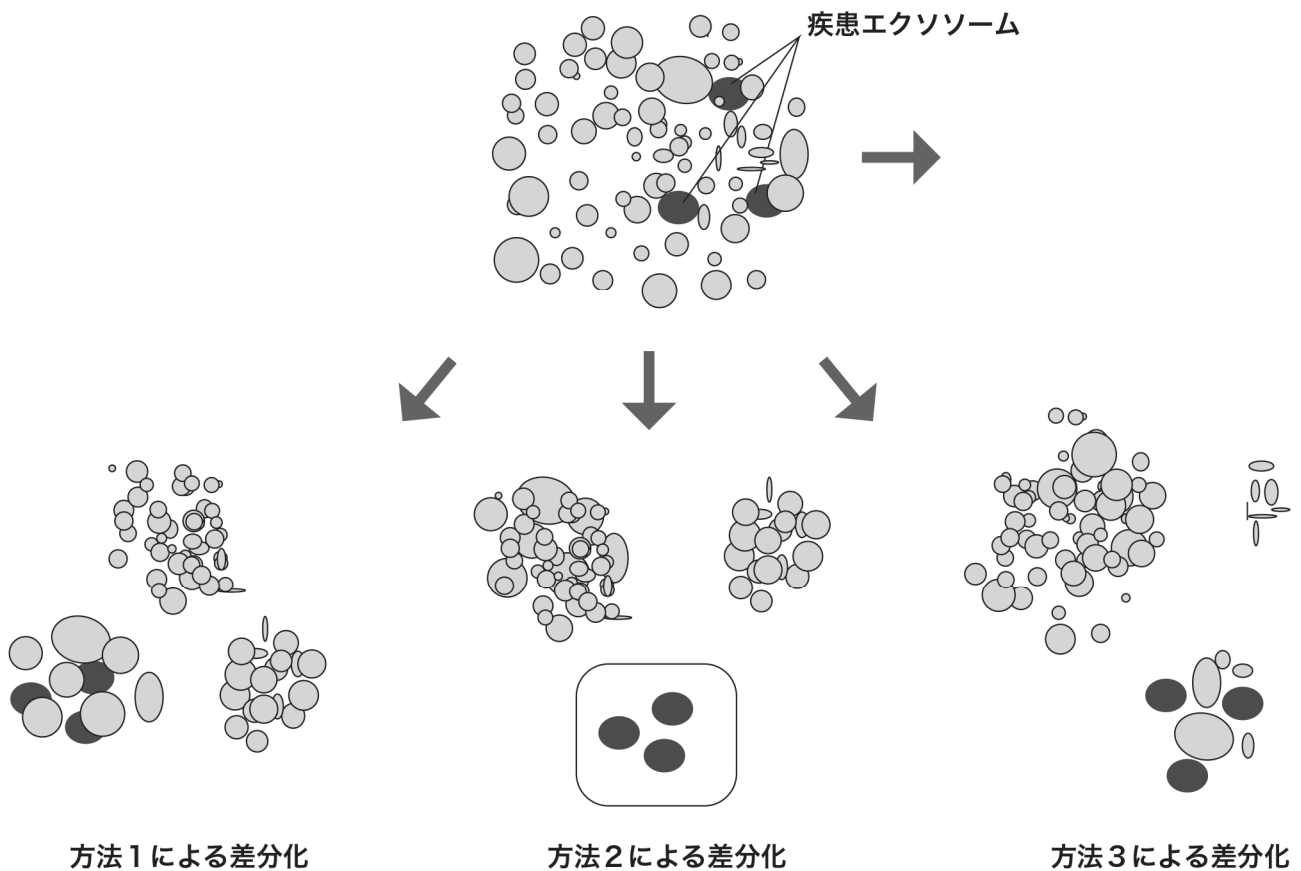


図 エクソソーム粗分画の中から、どのようにして疾患エクソソームをサブクラス化していくかは、そもそもエクソソームが「いくつかのサブクラスに分けられるのか」「どのようにしてそのサブクラスに分けられるのか」が分かっていない現状では、発見的にいくつかの差分化手法を開発しながら、開発していくことが必要となる。ここでは体液中に含まれる疾患エクソソームを「●」で示している。

V 研究成果の発表

1. **Yamamoto, S., Iwai, K., Minamisawa, T., Suga, K., Matsumura, S., Yajima, Y. & Shiba, K.** Elucidation of salivary exosome-carried biomolecules by long-time density gradient ultracentrifugation, **in preparation**.
2. **Yoshida, M., Iwai, K., Minamisawa, T., Suga, K., Matsumura, S., Yajima, Y. & Shiba, K.** Capturing EpCAM-positive exosomes on solid surface by peptide aptamer, **in preparation**.
3. **Iwai, K., Minamisawa, T., Suga, K., Yajima, Y. & Shiba, K.** Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations. **J Extracell Vesicles** 5, 30829 (2016).
4. **Yudasaka, M., Zhang, M., Matsumura, S., Yuge, R., Ichihashi, T., Irie, H., Shiba, K. & Iijima, S.** Not nanocarbon but dispersant induced abnormality in lysosome in macrophages in vivo. **Nanotechnology** 26, 195102 (2015).
5. **Sato, S., Ikemi, M., Kikuchi, T., Matsumura, S., Shiba, K. & Fujita, M.** Bridging Adhesion of a Protein onto an Inorganic Surface Using Self-Assembled Dual-Functionalized Spheres. **J Am Chem Soc** 137 (40), 12890-12896 (2015).
6. 芝清隆. 「エクソソームの分離・定量化」 膜 40, 242-247 (2015).
7. 芝清隆、吉成正雄、矢島安朝. 「唾液診断とエクソソーム」 歯界展望 124 (1), 152-156 (2014)
8. **Ito, M., Hayashi, K., Adachi, E., Minamisawa, T., Homma, S., Koido, S. & Shiba, K.** Combinatorial Contextualization of Peptidic Epitopes for Enhanced Cellular Immunity. **PLoS One** 9, e110425 (2014).
9. **Chowdhury, M.M., Danoy, M., Rahman, F., Shinohara, M., Kaneda, S., Shiba, K., Fujita, N., Fujii, T. & Sakai, Y.** Adhesion of pancreatic cancer cells in a liver-microvasculature mimicking coculture correlates with their propensity to form liver-specific metastasis in vivo. **Biomed Res Int** 2014, 241571 (2014).