

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

高純度エクソソーム精製法による新規腫瘍マーカーの同定

業務主任者 華山 力成 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任准教授

研究要旨

エクソソームは主に免疫細胞や腫瘍細胞から放出される直径 30-100nm の分泌型膜小胞で、分泌細胞特異的な蛋白質や mRNA、non-coding RNA などを内包化している。近年、これらのエクソソーム構成因子が腫瘍細胞のバイオマーカーとして有用である可能性が報告されており、癌の早期診断や治療効果の判定、予後の予測などとの相関性が活発に研究されている。しかし、従来のエクソソーム精製法では、夾雑物の混入による純度の低下や、煩雑な操作により回収量が不安定であること、また高価な超遠心機が必要で多検体の測定が不可能などといった問題が存在する。

そこで我々は、エクソソームの受容体である Tim4 蛋白質と磁気ビーズを用いたアフィニティー精製法によりエクソソームを簡易かつ高純度に精製する方法の確立を目指す。これまでに、Tim4 の細胞外領域にヒト免疫グロブリンの Fc 領域を結合させた Tim4-Fc 蛋白質をビオチン標識し、ストレプトアビジン結合磁気ビーズと結合させることで Tim4-Fc 磁気ビーズを作製した。Tim4 はエクソソーム膜上のリン脂質ホスファチジルセリン (PS) とカルシウム依存的に結合することから、キレート剤である EDTA を含む溶出バッファーを用いることで抗体蛋白やビーズを含まない高純度なエクソソームを効率よく精製可能である。実際、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて、マウス腹腔マクロファージからエクソソームを精製し、超遠心法やポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により精製したエクソソームと比較したところ、我々の方法では夾雑蛋白質の大部分が取り除かれ、100 倍以上高純度なエクソソームが精製されていることが明らかとなった。そこで平成 26 年度には、電子顕微鏡や微粒子測定装置を用いてより詳細に解析を進めることで Tim4-Fc 磁気ビーズにより精製したエクソソームの純度の評価を行い、本法の有用性を確立する。平成 27 年度には、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて実際に人の血液や尿などからエクソソームの精製を試み、効率の良い精製条件の確立を目指す。平成 28 年度には大阪大学医学部附属病院と共同で、インフォームドコンセントのもと、癌患者の血液から腫瘍由来エクソソームを本法で高純度に精製し、エクソソームの蛋白質や RNA の構成を健常人と比較解析することにより、新規腫瘍マーカーの同定を目指す。

A．研究目的

腫瘍マーカーは癌細胞の増大とともに増加する生体内抗原で、癌の発生や進行、治療効果の評価などに広く用いられている。主に血液中に遊離してくる蛋白質を抗体で検出する検査法であるが、単独の腫瘍マーカーで癌の存在を診断できるものは少なく、現時点で有用ではあるが確実な方法ではない。その理由として、腫瘍マーカーとして用いられている蛋白質は、健常人であっても血液中に存在しており、高い特異性と感受性をもつ腫瘍マーカーの同定が期待されている。近年、エクソソームと呼ばれる分泌型膜小胞が、主に免疫細胞や腫瘍細胞から放出され、その生理機能が研究されるとともに、新たなバイオマーカーとして注目を集めている。例えばメラノーマ細胞が放出するエクソソームには TYRP2、VLA-4、MET などの蛋白質が高濃度に含まれており、転移能や進行を予測できるマーカーとして可能性が報告されている(Nat Med. 18:881-891(2012))。またエクソソームには分泌細胞由来の mRNA や non-coding RNA が多く含まれており、これらが新たなマーカーとして疾患との相関性と特異性が広く研究されている(Biochim Biophys Acta.

1806(2):200-207(2010))。しかし、従来のエクソソーム精製法では、主に超遠心法や PEG 沈殿法による濃縮が行われており、非常に多くの夾雑物が混入する為、エクソソームの純度がとても低い。このような純度でバイオマーカーとして用いるのは困難であり、エクソソームを高純度で精製する方法の開発が期待されている。

我々は最近、Tim4 という膜蛋白質がエクソソームの特異的な受容体であることを見出した。Tim4 は細胞外領域の IgV ドメインを介して、エクソソーム膜上の膜リン脂質ホスファチジルセリンとカルシウム依存的に強力に結合するが、カルシウムを EDTA でキレートすることにより、遊離させることが可能である。そこで本研究では、Tim4 の細胞外領域にヒト免疫グロブリンの Fc 領域を結合させた Tim4-Fc 蛋白質と磁気ビーズを用いてエクソソームを精製する方法の有用性を評価し(H26 年度)、人の血液や尿から高効率に精製する方法を確立し

(H27 年度)、実際に癌患者と健常人のエクソソームを本法で精製し比較することで、特異性と感受性の高い腫瘍マーカーの同定を目指す(H28 年度)。

B．研究方法

私達は Tim4-Fc と磁気ビーズを用いたアフィニティー精製により、高純度なエクソソームを効率よく回収する方法を開発した。実際、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて、マウス腹腔マクロファージからエクソソームを精製し、超遠心法や PEG 沈殿法により精製したエクソソームと比較したところ、我々の方法では夾雑蛋白質の大部分が取り除かれ、100 倍以上高純度なエクソソームが精製されていた。そこで本研究では以下の方法により、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いたエクソソーム精製の有用性と精製条件を確立し、実際に癌患者と健常人の血液からエクソソームを回収して比較解析することにより、特異性と感受性の高い新規腫瘍マーカーの同定を目指す。

[平成 26 年度] Tim4-Fc 磁気ビーズを用いたエクソソーム精製法の有用性の評価

エクソソーム精製法の比較の為、各方法で精製したエクソソームを SDS-PAGE に供し、Oriole 試薬による全蛋白質染色と、エクソソーム特異的マーカーである flotillin-2 の抗体を用いたウェスタンブロットティングを行い、純度の評価を行った。その結果、超遠心分離法や PEG 沈殿法によって精製したエクソソームには多くの夾雑物が含まれていたのに対し、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて精製したエクソソームでは夾雑物が 100 分の 1 以下に減少していることが確認された。そこで、透過型電子顕微鏡を用いてネガティブ染色による観察を行うことで、Tim4-Fc 磁気ビーズ、超遠心法、PEG 沈殿法でそれぞれ精製したエクソソームの形状や大きさ、純度を比較し評価を行う。すなわち、直径 100nm 以下の粒子径のそろった

エクソソームが得られているのか、物理的な力により凝集したエクソソームになっていないか、エクソソーム以外の粒子が混在していないかなどを確認する。また、微粒子測定装置である NanoSight LM10 を用いて、精製したエクソソームの粒子径と濃度を測定する。測定結果より収量、平均粒子径および粒子径分布を算出し、精製エクソソームの評価を行う。

(倫理面への配慮)

実験マウスを用いた実験を行うにあたっては、「動物の愛護および管理に関する法律」「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」など、関連法規・指針に従った必要な措置を講じ、大阪大学動物実験規程を遵守して、動物愛護上の観点に十分配慮した環境で行う。

C . 研究結果

エクソソーム精製法の比較の為、我々の開発した Tim4-Fc 磁気ビーズ法と超遠心法、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法をそれぞれ用いて、ヒト白血球細胞株 K562 細胞からエクソソームを精製し純度を比較した。各方法で精製したエクソソームを SDS-PAGE に供し、Oriole 試薬による全蛋白質染色と、エクソソーム特異的マーカーである flotillin-2 の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、純度の評価を行った。その結果、超遠心分離法や PEG 沈殿法によって精製したエクソソームには多くの夾雑物が含まれていたのに対し、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて精製したエクソソームでは夾雑物が 100 分の 1 以下に減少していることが確認された。次に、透過型電子顕微鏡を用いてネガティブ染色による観察を行うことで、Tim4-Fc 磁気ビーズ法、超遠心法、PEG 沈殿法でそれぞれ精製したエクソソームの

形状や大きさ、純度を比較し評価を行ったところ、Tim4-Fc 磁気ビーズ法では、直径 100nm 以下の粒子径のそろったエクソソームが得られており、超遠心法と違い物理的な力により凝集したエクソソームにならず、PEG 沈殿法と違いエクソソーム以外の粒子が全く混在していないことを確認した。また、精製したエクソソーム上の蛋白質をショットガン質量分析で同定したところ、Tim4-Fc 磁気ビーズ法では 457 種の蛋白質が同定可能であったのに対し、超遠心法、PEG 沈殿法ではそれぞれ 90 種、39 種の蛋白質しか同定できず、Tim4-Fc 磁気ビーズ法の有用性が示された。

D . 考察

今回我々の開発した方法は、エクソソームの精製法として期待以上の効果があることが明らかとなった。よって今後の研究としては、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて人のサンプルからエクソソームを精製する条件を確立するとともに、癌の早期診断に応用する為、1 細胞からのエクソソーム精製法を開発する。最終的には実際に癌患者と健常人の血液からエクソソームを回収して比較解析することにより、特異性と感受性の高い新規腫瘍マーカーの同定を目指す。

E . 結論

私達は Tim4-Fc と磁気ビーズを用いたアフニティー精製により、高純度なエクソソームを効率よく回収する方法を開発した。実際、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて、ヒト白血球細胞株 K562 細胞からエクソソームを精製し、従来の方法と比較したところ、我々の方法では夾雑蛋白質の大部分が取り除かれ、100 倍以上高純度なエクソソームが精製されていた。

F．健康危険情報

特記すべきことはなし。

G．研究発表

1．論文発表

該当なし

2．学会発表

該当なし

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

[出願中] 発明者 華山力成

特許出願人 国立大学法人 大阪大学

特願 2014-246876 「T i m 4 担体及び当該担体を用いた細胞外膜小胞の取得方法」

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

該当なし