

卵巣がん体液中細胞外小顆粒エクソソームの臨床応用を目指した基盤研究

名古屋大学高等研究院/医学部附属病院

産科婦人科 助教 横井暁

国立がん研究センター研究所

細胞情報学分野 主任研究員 山本 雄介

国立がん研究センター研究所

細胞情報学分野 外来研究院 吉田 康将

東京医科大学医学総合研究所

分子細胞治療研究部門 特任講師 吉岡 雄介

国立がん研究センター中央病院

婦人腫瘍科 科長 加藤 友康

1. 研究の背景・目的

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)、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、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おり、安定したプラットフォームの整備の重要性を喚起している (Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018, Journal of Extracellular Vesicles. 2018)。このように、EV 研究はその定義や取扱いが未だ議論的になるほど発展途上であり、現在もそのアップデートが進んでいる。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、詳細な機能解析や、

臨床応用のために、より詳細に EV を検討することの重要性が高まっている。臨床応用を想定した EV の研究はここ 5-10 年で大きく進歩はしているものの、抽出方法の最適化やより特異性の高いマーカー分子と検出方法など未だ多く課題が残されている中で、本研究により明らかにされる、がん患者体液由来、がん細胞由来の細胞外小胞顆粒の詳細な情報と、最適化される EV 解析方法は国際的にも必要度の高い意義の大きい知見となる。

本研究では、がん由来の EV に焦点をあて、今後急速に進むと予想される EV の臨床応用の基盤となるような特性を理解することを目的とする。申請者がこれまで明らかにしてきた EV の知見（**5. 文献参照**）を最大限活用するため、また、予後不良であり臨床的課題も多く残されている卵巣がんを主な対象として研究を行う。がん患者体液、腫瘍組織、さらには卵巣がん細胞培養上清から EV の抽出・解析を行うが、エクソソームを含む Small-EV と Large-EV とを正確に分離し抽出を行い、かつ、Small-EV に関しては複数の抽出方法を用いて、純度高くかつ再現性の高い最適な EV 単離方法を同定する。また網羅解析を利用し、卵巣がん特異的な EV マーカーの同定を行い、同マーカーを EV サブタイプごとに分析する。ナノ粒子解析装置や電子顕微鏡観察を含む詳細な検討を行う。その後、患者体液中での時系列的変化や臨床的アウトカムとの相関も検討する。本研究は、これまで明らかにされなかった EV の基礎特性を明らかにし、かつ、臨床応用を想定した詳細な検討を行う。

2. 研究の対象ならびに方法

本年度は、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、スタート時は EV と相性のよいマイクロ RNA の解析から行う。より安定的な結果が得られた後はより新規性高く挑戦的な DNA の解析も予定している。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い、より純度の高い抽出方法の同定を行う。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い、すでにその単離には成功している。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、その抽出方法と並行して検討し、選択された候補マーカー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、候補の絞込みを行う。すなわち、初年度で臨床検体からの EV 解析のプラットフォームの最適化と有望分子の同定まで、最も重要な検討を行う。次年度では、より多くの患者由来サンプルを用いて、候補マーカーのさらに詳細な検討を行う。

卵巣がんは多くのサブタイプに分類されるがん種であることから、サブタイプごとの解析、また化学療法や分子治療薬を使用した症例における薬剤奏効率による検討なども行う。卵巣がんにおいては現在DNA修復の機能異常を標的とした新規薬剤PARP阻害剤の使用が注目されており、当院でも同薬剤を使用しているため、使用の前後、奏功の程度、維持療法中の変化など、包括的に検証を行う。また、同一患者での時間軸的変動性や、同一サンプル間でのデータの安定性の検証も行う。本研究によって得られる候補分子はがんの悪性化に関わる重要な機能を有している可能性も高いと予想されるため、随時その機能解析実験も予定する。また申請者の研究グループでは複数の卵巣がんPDXモデルを有しており、同モデルを用いた検討も行う。EVの抽出に関しては東京医科大学落谷グループの吉岡研究員と、網羅解析データの検討は、国立がん研究センター研究所の山本、吉田研究員と、臨床検体検証解析の際は国立がん研究センター中央病院加藤友康科長と、それぞれ共同研究を行う。また、本研究は、名古屋大学医学部ヒトゲノム・バイオ先端観察研究専門審査委員会の承認を得ている（【難治性婦人科悪性腫瘍の包括的オミックス解析に基づく新規テーラーメイド治療の創出を目指した基盤的研究】、承認番号 2017-0497）。承認を得た研究計画書、説明書および同意書に基づき、適切な説明を行った上でインフォームド・コンセントを得ている。その他、当該施設における生命倫理に関する指針・内規を遵守する。ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針（厚労省）、疫学研究に関する倫理指針（文科省・厚労省）、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文科省・厚労省・経産省）などの指針および法令等を遵守する。また、各施設は各施設の倫理審査委員会承認の下研究を遂行している。

3. 研究結果

本年度は細胞外小胞に含まれるマイクロRNAの機能解析、および臨床的有用性を主軸においた研究を論文発表として行うことができた。論文4では、卵巣がんの中でも、予後の悪く日本人に多い、明細胞腺癌に対し、その薬物耐性機構の解明を行った。X染色体上のchrXq27.3 miRNA clusterが重要な役割を持つことを示した。また同miRNAクラスターの機能に関する報告は乏しく、国際誌に総説として、その機能をまとめた内容を発表した（論文2）。名古屋大学産婦人科にて以前、臨床試験を行った、免疫ワクチン療法の効果の予測コンパニオンバイオマーカー開発を行ったのが、文献3の研究である。卵巣明細胞がん患者におけるグリピカン3免疫ワクチン療法の治療効果を治療前の血清中の、細胞外小胞に含まれるマイクロRNAの解析により明らかにした。また、これまでの経験を踏まえて（5. 文献参照）、がん生物学における細胞外小胞、エクソソームの機能を国際誌に総説として

報告した(文献1)。上記項目2の研究方法に関しても、現在解析中で、数々のデータを得ているが、本報告書は公開予定文書であり、論文報告前のため、詳細は控える。サブタイプごとの、多様なEVの解析を進めている。また、これまでのがん研究に対する評価を受け、2020年の日本癌学会奨励賞を受賞した。同学会で受賞講演と、2つの招待講演を行った。また、名古屋大学における、令和2年度の石田賞、赤崎賞を受賞した。

4. 考察

本年度は、本研究助成金の元、研究を開始し、研究環境を整備することができた。AMED, JSPS, JST といった大型の研究費も獲得し、名古屋大学医学部内に自身の研究室を設営、稼働させた。エクソソーム、EVの研究も順調に開始し、今後数年でいくつかの成果へつながるだろうデータを得ている。研究の開始にあたり助成をして頂いた本助成は自身にとって大変重要なものとなったため、深く感謝したい。

5. 文献

1. Ma S, McGuire MH, Mangala LS, Lee S, Stur E, Hu W, Bayraktar E, Villar-Prados A, Ivan C, Wu SY, **Yokoi A**, Dasari SK, Jennings NB, Liu J, Lopez-Berestein G, Ram P, Sood AK. Gain-of-function p53 protein transferred via small extracellular vesicles promotes conversion of fibroblasts to a cancer-associated phenotype. *Cell Rep.* 2021 Feb 9;34(6):108726. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108726.
2. Yoshida K, **Yokoi A**, Kato T, Ochiya T, Yamamoto Y. The clinical impact of intra- and extracellular miRNAs in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2020 Oct;111(10):3435-3444. doi: 10.1111/cas.14599. Epub 2020 Aug 27.
3. **Yokoi A**, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Tate K, Yoneoka Y, Shimizu H, Uehara T, Ishikawa M, Takizawa S, Aoki Y, Kato K, Kato T, Ochiya T. Serum microRNA profile enables preoperative diagnosis of uterine leiomyosarcoma. *Cancer Sci.* 2019 Dec;110(12):3718-3726. doi: 10.1111/cas.14215. Epub 2019 Nov 16.
4. Yoshida K, **Yokoi A**, Kagawa T, Oda S, Hattori S, Tamauchi S, Ikeda Y, Yoshikawa N, Nishino K, Utsumi F, Niimi K, Suzuki S, Shibata K, Kajiyama H, Yokoi T, Kikkawa F. Unique miRNA profiling of squamous cell carcinoma arising from ovarian mature teratoma: comprehensive miRNA sequence analysis of its molecular background. *Carcinogenesis.* 2019 Dec 31;40(12):1435-1444. doi: 10.1093/carcin/bgz135.
5. **Yokoi A**, Matsuzaki J, Yamamoto Y, Yoneoka Y, Takahashi K, Shimizu H, Uehara T,

- Ishikawa M, Ikeda SI, Sonoda T, Kawauchi J, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Sakamoto H, Kato K, Kato T, Ochiya T. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat Commun.* 2018 Oct 17;9(1):4319. doi: 10.1038/s41467-018-06434-4.
6. **Yokoi A**, Yoshioka Y, Hirakawa A, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Niimi K, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. A combination of circulating miRNAs for the early detection of ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017 Sep 6;8(52):89811-89823. doi: 10.18632/oncotarget.20688. eCollection 2017 Oct 27.
 7. **Yokoi A**, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun.* 2017 Mar 6;8:14470. doi: 10.1038/ncomms14470.
 8. **Yokoi A**, Yoshioka Y, Ochiya T. Towards the realization of clinical extracellular vesicle diagnostics: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(12):1555-66. doi: 10.1586/14737159.2015.1104249.
6. 論文発表 (すべて査読有)
1. **Yokoi A**, Ochiya T. Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2021 Mar 31:S1044-579X(21)00082-1. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.03.032.
 2. Yoshida K, **Yokoi A**, Yamamoto Y, Kajiyama H. ChrXq27.3 miRNA cluster functions in cancer development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 Mar 25;40(1):112. doi: 10.1186/s13046-021-01910-0.
 3. Ukai M, **Yokoi A**, Yoshida K, Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T, Kajiyama H. Extracellular miRNAs as Predictive Biomarkers for Glypican-3-Derived Peptide Vaccine Therapy Response in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 1;13(3):550. doi: 10.3390/cancers13030550.
 4. Yoshida K, **Yokoi A**, Sugiyama M, Oda S, Kitami K, Tamauchi S, Ikeda Y, Yoshikawa N, Nishino K, Niimi K, Suzuki S, Kikkawa F, Yokoi T, Kajiyama H. Expression of the chrXq27.3 miRNA cluster in recurrent ovarian clear cell carcinoma and its impact on cisplatin resistance. *Oncogene.* 2021 Feb;40(7):1255-1268. doi: 10.1038/s41388-020-01595-3.