

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
病態情報学ユニット ユニット長 山本 雄介
名古屋大学医学系研究科
特任助教 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 祐亮
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

エクソソームは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。エクソソームは細胞が放出する老廃物として 1983 年に同定されていたが、2007 年の Valadi らの報告 (Nature Cell Biology 2007 他) により、エクソソームが miRNA などの核酸を内包し、輸送するその重要な意義について報告されて以降、細胞生物学の一分野として焦点が当たることとなった。それ以後急速に研究が進み、現在では世界各地でエクソソームに関する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細胞外小胞 (Extracellular vesicle: 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) では、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、特定の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の

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

昨年度に引きつづき、本年度も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、両方向より行った。論文公表前のため詳細の説明は控えるが、核酸についてはsmall RNAシーケンスを100検体以上、プロテオミクスについては30検体以上、解析を行い、それぞれ臨床的に有用なマーカーの同定を行い、特許の出願を行った。抽出方法も種々の方法を検討しており、用途に合わせた手法の同定を行っている。DNAの解析も開始しており、臨床薬剤の感受性に相関する可能性を示唆するデータを得ている。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、そのプロファイルの違いについて一定の傾向性を明らかにしている。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ユニット長と、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

助成機関を通して、婦人科癌における細胞外小胞解析、また、治療戦略創生に関する検討を継続した。中でも、がん患者体液由来細胞外小胞の多様性に応じた抽出プラットフォームの最適化や、がん細胞由来特異細胞外小胞の同定を主に行った。その結果、卵巣癌の最新の治療薬である PARP 阻害剤の奏功性を予測する EV 上の DNA 情報を同定した(特許出願、論文準備中)。リキッドバイオプシーの標的としての体液中 DNA は以前よりセルフリー DNA として研究されてきたが、その特異性の低さや、必要サンプル量の多さから臨床応用へは至っていない。本研究成果は EV 上の DNA という新しい対象に対して、新しい価値を見出した検討である。引き続き、成果報告へ向けて尽力する。また、本研究では、卵巣癌特異的 EV 膜タンパク質の同定にも成功した(特許出願、論文投稿中)。疾患特異的 EV 膜タンパク質は、EV を様々な用途で利用する際に極めて重要となるが、卵巣癌における特性の高い膜タンパク質はこれまで同定されてこなかった。本研究において、卵巣癌に特性の高い 3 分子を同定し、その臨床的価値を示した。どちらの検討も、EV では新しい側面であり、今後臨床応用も期待される成果である。同時に、EV 中の小核酸などの検討も行い、論文報告を行った。また、絨毛癌の新規治療戦略創生や、子宮頸がんに関する研究など、助成期間で、婦人科悪性腫瘍にかかわる様々な研究を遂行した。本報告書は公開予定文書であり、論文報告前のため、詳細は上記に留める。

4. 考察

3 年間の支援を通して、研究環境の整備、シーズの創出(特許出願 3 件)、論文報告、および現在投稿中の成果など、研究を展開することができた。AMED, JSPS, JST といった大型研究費も獲得し、研究を軌道に乗せることができた。本研究課題の遂行にあたり、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.
 5. Yukari Nagao, **Akira Yokoi(責任著者)**, Kosuke Yoshida, Masanori Sumi, Masato Yoshihara, Satoshi Tamauchi, Yoshiki Ikeda, Nobuhisa Yoshikawa, Kimihiro Nishino, Kaoru Niimi, Hiroaki Kajiyama. Clinical effects of cervical conization with positive margins in cervical cancer. *Scientific reports* 11(1) 23288-23288 2021.12.2
 6. Kosuke Yoshida, **Akira Yokoi(責任著者)**, Juntaro Matsuzaki, Tomoyasu Kato, Takahiro Ochiya, Hiroaki Kajiyama, Yusuke Yamamoto. Extracellular microRNA profiling for prognostic prediction in patients with high - grade serous ovarian carcinoma *Cancer Science* 112(12) 4977-4986 2021.12
 7. Kosuke Yoshida, **Akira Yokoi(責任著者)**, Tomofumi Yamamoto, Yusuke Hayashi, Jun Nakayama, Tsuyoshi Yokoi, Hiroshi Yoshida, Tomoyasu Kato, Hiroaki Kajiyama, Yusuke Yamamoto. Aberrant activation of cell cycle-related kinases and the

- potential therapeutic impact of PLK1 or CHEK1 inhibition in uterine leiomyosarcoma. *Clinical cancer research* 2022. 3. 18
8. Xuboya Chang, Satoshi Tamauchi, Kosuke Yoshida, Masato Yoshihara, Akira Yokoi, Yusuke Shimizu, Yoshiki Ikeda, Nobuhisa Yoshikawa, Tohru Kiyono, Yusuke Yamamoto, Hiroaki Kajiyama. Downregulating vaccinia-related kinase 1 by luteolin suppresses ovarian cancer cell proliferation by activating the p53 signaling pathway. *Gynecologic oncology* 173 31-40 2023年4月17日
 9. Eri Asano-Inami, Akira Yokoi (責任著者), Mai Sugiyama, Toshinori Hyodo, Tomonari Hamaguchi, Hiroaki Kajiyama. The association of UBAP2L and G3BP1 mediated by small nucleolar RNA is essential for stress granule formation. *Communications biology* 6(1) 415-415 2023年4月14日
 10. Xinxin Lin, Nobuhisa Yoshikawa, Wenting Liu, Tetsuya Matsukawa, Kae Nakamura, Masato Yoshihara, Yoshihiro Koya, Mai Sugiyama, Satoshi Tamauchi, Yoshiki Ikeda, Akira Yokoi, Yusuke Shimizu, Hiroaki Kajiyama. DDIT4 Facilitates Lymph Node Metastasis via the Activation of NF- κ B Pathway and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 2023年4月4日
 11. Kosuke Yoshida, Akira Yokoi (責任著者), Masami Kitagawa, Mai Sugiyama, Tomofumi Yamamoto, Jun Nakayama, Hiroshi Yoshida, Tomoyasu Kato, Hiroaki Kajiyama, Yusuke Yamamoto. Downregulation of miR-10b-5p facilitates the proliferation of uterine leiomyosarcoma cells: A microRNA sequencing-based approach. *Oncology Reports* 49(5) 2023年3月13日
 12. Yukari Nagao, Akira Yokoi (責任著者), Kosuke Yoshida, Mai Sugiyama, Eri Watanabe, Kae Nakamura, Masami Kitagawa, Eri Asano-Inami, Yoshihiro Koya, Masato Yoshihara, Satoshi Tamauchi, Yusuke Shimizu, Yoshiki Ikeda, Nobuhisa Yoshikawa, Tomoyasu Kato, Yusuke Yamamoto, Hiroaki Kajiyama. Novel therapeutic strategies targeting UCP2 in uterine leiomyosarcoma. *Pharmacological research* 189 106693-106693 2023年2月9日
 13. Kazuhiro Suzuki, Akira Yokoi (責任著者), Kosuke Yoshida, Tomoyasu Kato, Takahiro Ochiya, Yusuke Yamamoto, Hiroaki Kajiyama. Preoperative serum microRNAs as

- potential prognostic biomarkers in ovarian clear cell carcinoma. Journal of gynecologic oncology 2022年12月23日
14. Eri Watanabe, Akira Yokoi(責任著者), Kosuke Yoshida, Mai Sugiyama, Masami Kitagawa, Kimihiro Nishino, Eiko Yamamoto, Kaoru Niimi, Yusuke Yamamoto, Hiroaki Kajiyama. Drug library screening identifies histone deacetylase inhibition as a novel therapeutic strategy for choriocarcinoma. Cancer medicine 2022年9月15日
15. Kazuhisa Kitami, Masato Yoshihara, Satoshi Tamauchi, Mai Sugiyama, Yoshihiro Koya, Yoshihiko Yamakita, Hiroki Fujimoto, Shohei Iyoshi, Kaname Uno, Kazumasa Mogi, Yoshiki Ikeda, Akira Yokoi, Nobuhisa Yoshikawa, Kimihiro Nishino, Kaoru Niimi, Akihiro Nawa, Atsushi Enomoto, Hiroaki Kajiyama. Peritoneal Restoration by Repurposing Vitamin D Inhibits Ovarian Cancer Dissemination via Blockade of the TGF- β 1/Thrombospondin-1 Axis. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology 109 70-90 2022年3月23日
16. Yoshiki Ikeda, Masato Yoshihara, Nobuhisa Yoshikawa, Akira Yokoi, Satoshi Tamauchi, Kimihiro Nishino, Kaoru Niimi, Hiroaki Kajiyama. Is adjuvant chemotherapy necessary for young women with early-stage epithelial ovarian cancer who have undergone fertility-sparing surgery?: a multicenter retrospective analysis. BMC women's health 22(1) 80-80 2022年3月21日