

エクソソームに内包される マイクロRNAによる疾患診断

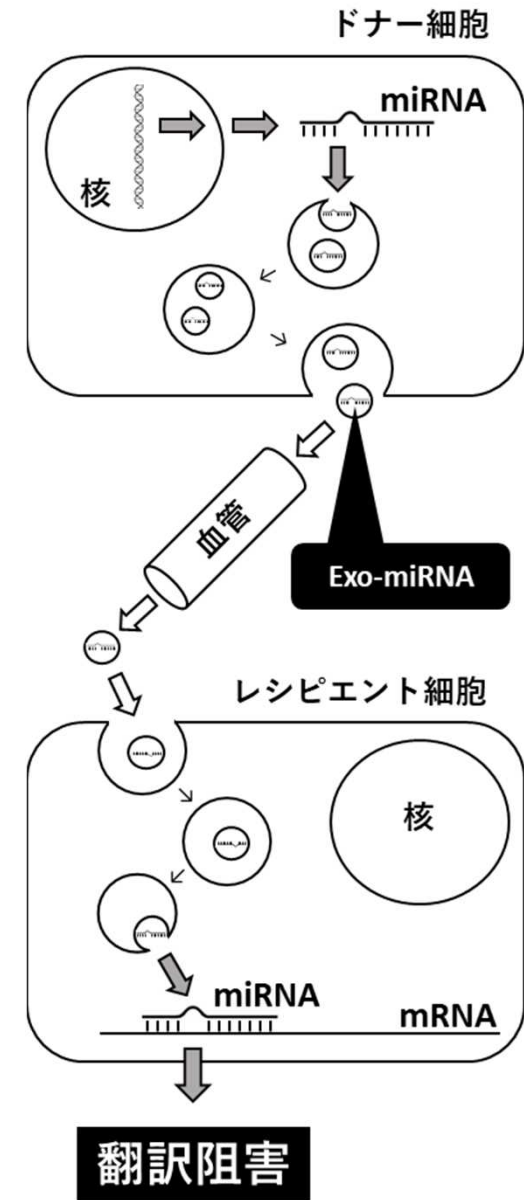
産業医科大学 産業生態科学研究所 呼吸病態学
准教授 和泉 弘人

2019年11月28日

※未公開特許情報を含んだ発表ですので、当日の発表内容の一部を削除しています。

エクソソーム (Exosome) とは

- 脂質二重膜をもつ直径50-150nm（ウイルスの大きさに相当）の膜小胞である
- あらゆる細胞から分泌され、様々な体液（血液、唾液、尿、関節液、腹水、胸水など）で確認されている
- 内部にタンパク質や核酸（DNA, mRNA, miRNA）などの情報伝達物質を含んでいる
- ドナー細胞から分泌されたエクソソームは血流などを介して別の細胞（レシピエント細胞）に取り込まれ、情報伝達物質をレシピエント細胞に送り込む
- 情報伝達物質を取り込んだレシピエント細胞は各物質に反応して細胞の形質（機能的変化や生理的変化）を変えることが知られている



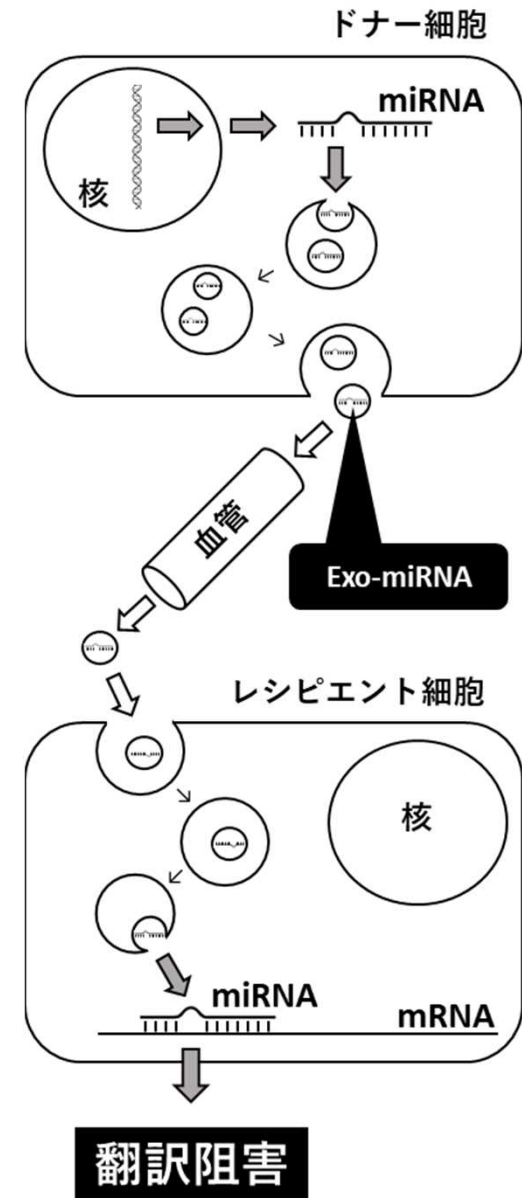
エクソソーム (Exosome) とは

- 2007年にはエクソソーム中のRNA (mRNA, microRNA)の存在が明らかとなった

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 2007; 9:654-9

- 2010年にはmicroRNA (miRNA)がエクソソームを介して細胞間を移動し、機能することが証明された

Zhang Y, Liu D, Chen X et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. Mol Cell 2010; 39: 133-44.



エクソソームを使った診断

- **タンパク質**

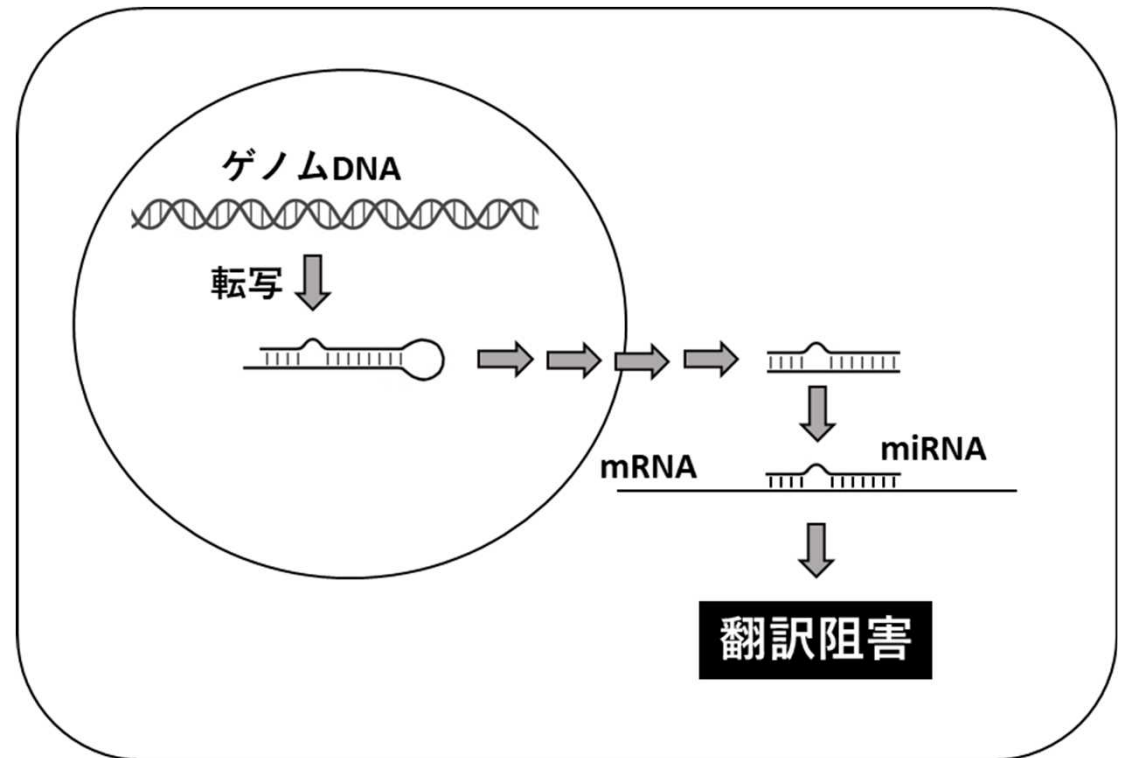
がん細胞が分泌するエクソソームに特異的に発現している膜タンパクを使って特定のエクソソームの存在を確認することで診断する試みがある

- **核酸 ; 特にmicroRNA (miRNA)**

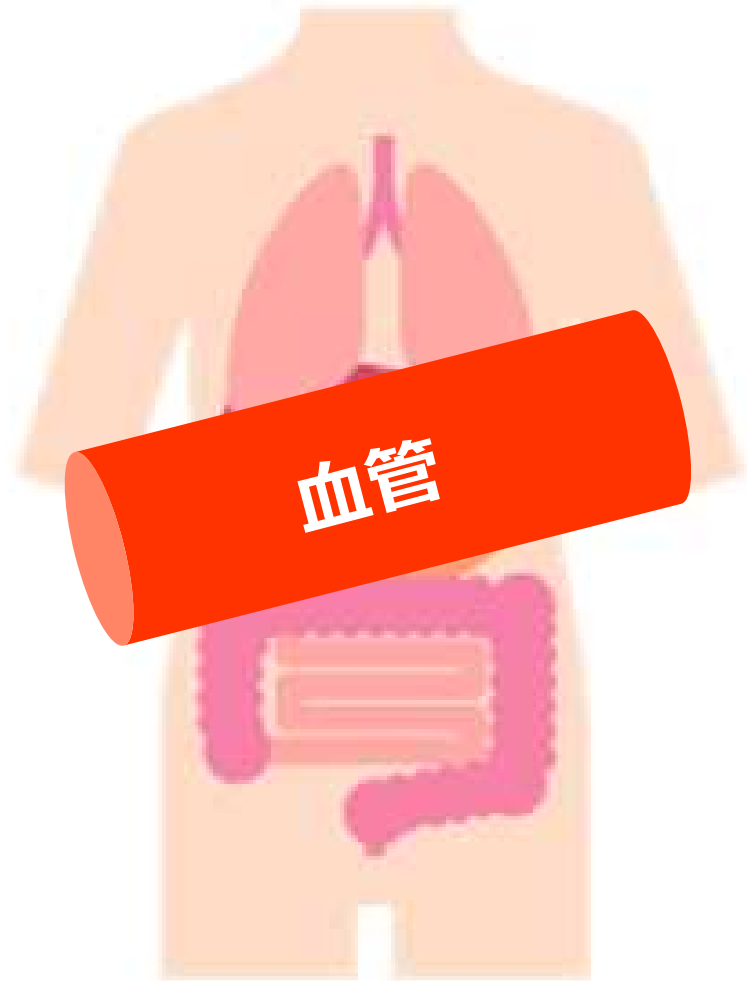
エクソソームを単離して、情報伝達物質の違いで診断する試みがある

microRNA (miRNA)とは

- 21～23塩基長からなる小さな一本鎖RNAである
- RNAがゲノムから転写されたのち、複数のタンパク質の作用とRNAの切断により完成形になる
- アミノ酸翻訳領域をもたないnon-coding RNAに属するが、その機能は配列を認識してmRNA（coding RNA）に結合し、翻訳を阻害することで特定のタンパク質の発現を抑制する
- これにより、細胞や個体の形質が変化（機能的変化や生理的变化）する可能性がある
- ヒトでは2,500種類以上のmiRNAが同定されている



エクソソームを使った診断



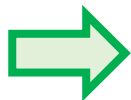
血液内を流れているもの

- 各種細胞 (赤血球、白血球など)
- アポトーシス小胞
- マイクロベシクル
- エクソソーム → 単離する必要がある
- タンパク質
- 脂質
- 核酸 (DNA, RNA)

(赤字にはmicroRNAが含まれている)

エクソソーム解析の流れ（概略）

Step 1
試料採取



Step 2
エクソソーム
の単離



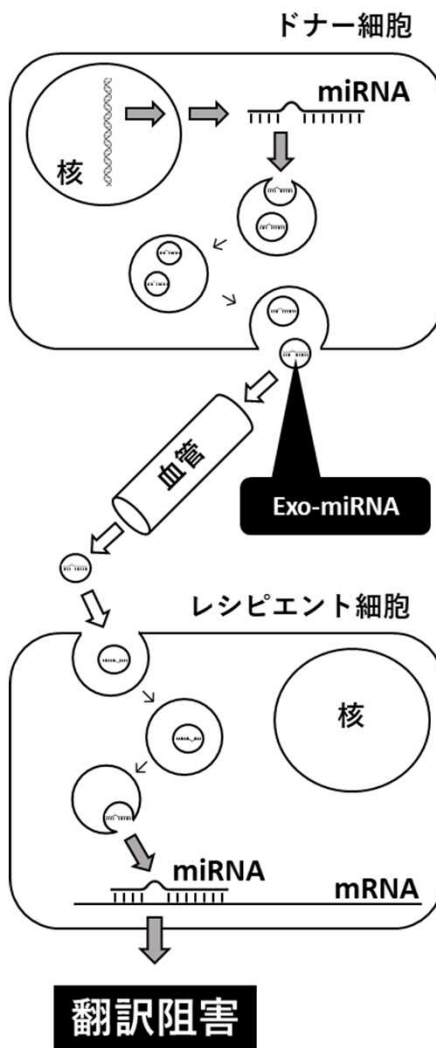
Step 3
RNAの精製
タンパク質の精製



Step 4
解析



- 血液
- 唾液
- 尿
- 腹水
- 胸水
- 細胞培養液



- 核酸解析
リアルタイムPCR
マイクロアレイ
次世代シーケンサー など
- タンパク解析
ウエスタンブロット
LC/MS解析 など



除去する必要があるもの

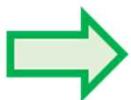
- 各種細胞（赤血球、白血球など）； 10 μm
- アポトーシス小胞； 1 - 4 μm
- マイクロベシクル； 0.1 - 1 μm

主なエクソソームの単離方法（キット化されている）

- 超遠心法
- ポリマー沈殿法
- アフィニティを利用した分離法
- サイズ排除クロマトグラフィーによる精製
- その他

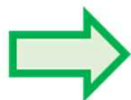
Step 1

試料採取



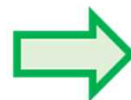
Step 2

エクソソーム
の単離



Step 3

RNAの精製
タンパク質の精製



Step 4

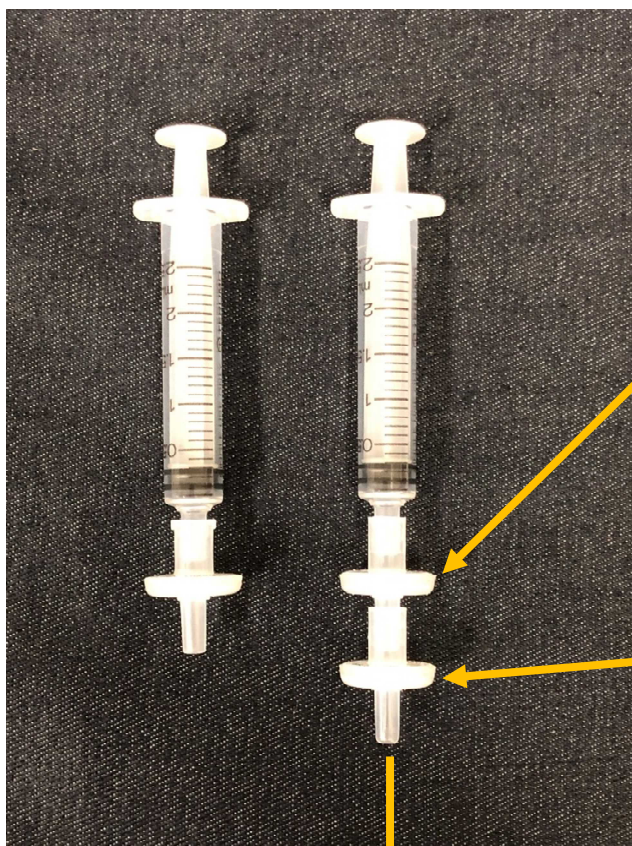
解析

エクソソーム; 50 - 150 nm

除去する必要があるもの

- 各種細胞 (赤血球、白血球など) ; 10 μm
- アポトーシス小胞; 1 - 4 μm
- マイクロベシクル; 0.1 - 1 μm

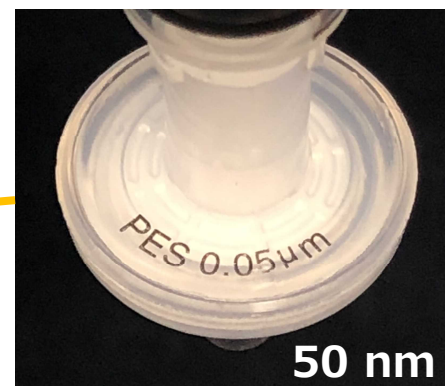
フィルター法 (サイズを利用した単離)



50 nmより小さいものは流れ出る



220 nmより大きな
粒子は除かれる



エクソソームはここ
で捕捉される

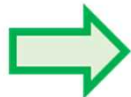
Step 1

試料採取



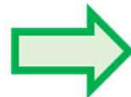
Step 2

エクソソーム
の単離



Step 3

RNAの精製
タンパク質の精製



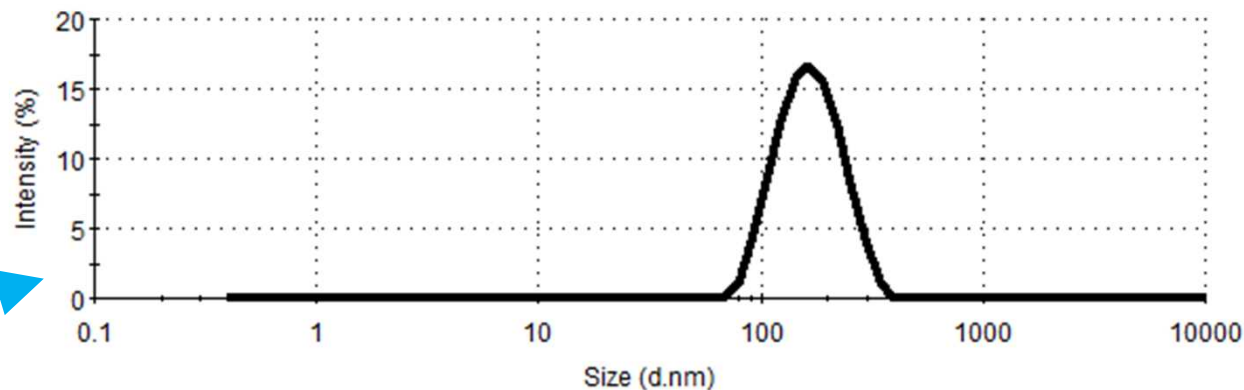
Step 4

解析

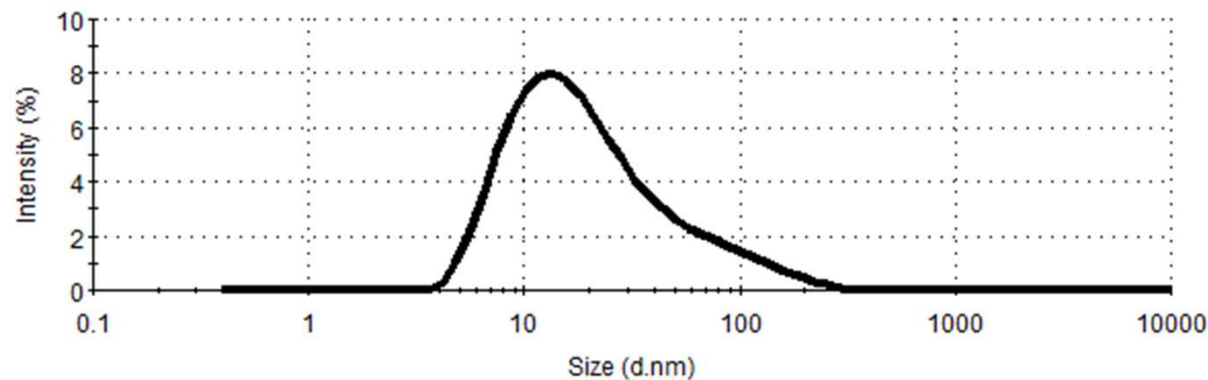
フィルター法（サイズを利用した単離）

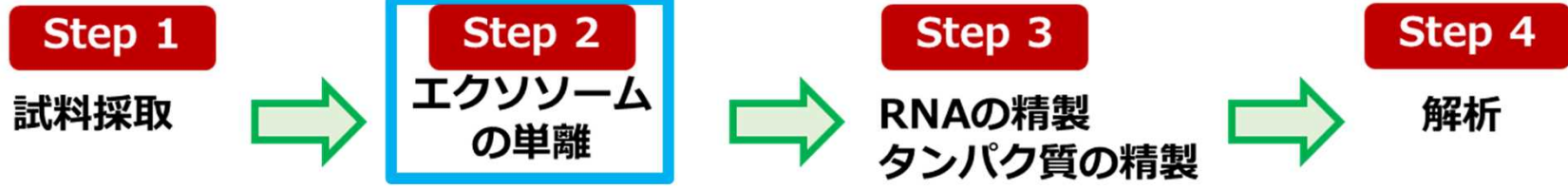
ウシ胎児血清（FBS : Fetal Bovine Serum）からExosomeを単離してみた

DLS (Dynamic Light Scattering) - 動的光散乱法による解析



DLS





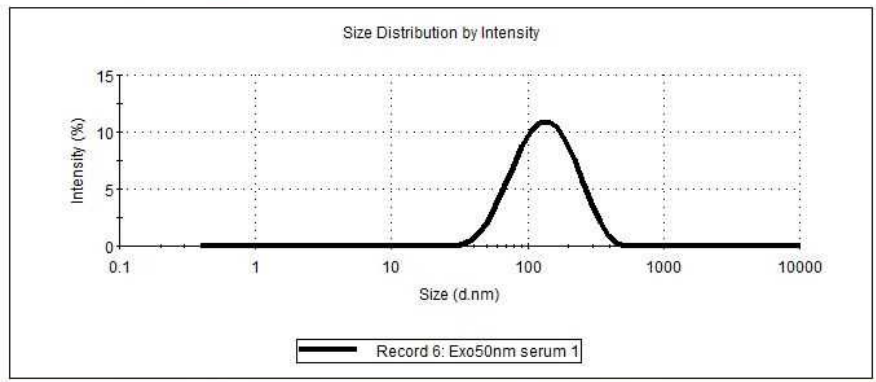
フィルター法（サイズを利用した単離）

ヒト血清からExosomeを単離してみた

DLS (Dynamic Light Scattering) - 動的光散乱法による解析



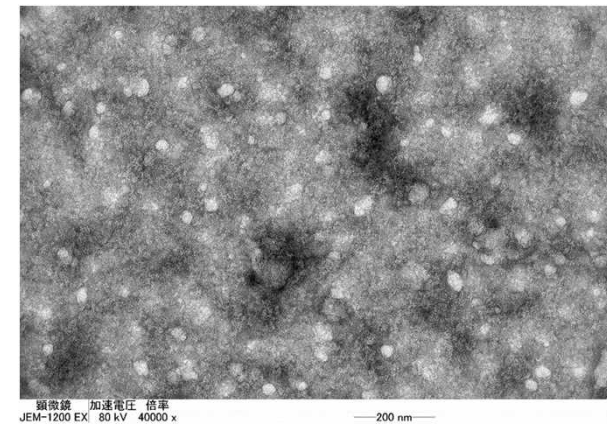
	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm):	112.6		
Pdi:	0.240		
Intercept:	0.935		
Result quality:	Good		
Peak 1:	148.6	100.0	73.75
Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Peak 3:	0.000	0.0	0.000



**平均直径
112.6 nm**



透過型電子顕微鏡 1200EX



Step 1

試料採取

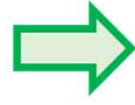


Step 2
エクソソーム
の単離



Step 3

RNAの精製
タンパク質の精製



Step 4

解析

フィルター法（サイズを利用した単離）



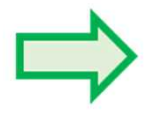
50 nmフィルター内の
・ RNAはISOGENなど
・ タンパク質はCHAPSなど
の溶解液を使って溶出することが
可能である

Step 1

試料採取

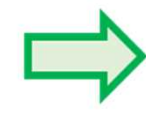


Step 2
エクソソーム
の単離



Step 3

RNAの精製
タンパク質の精製

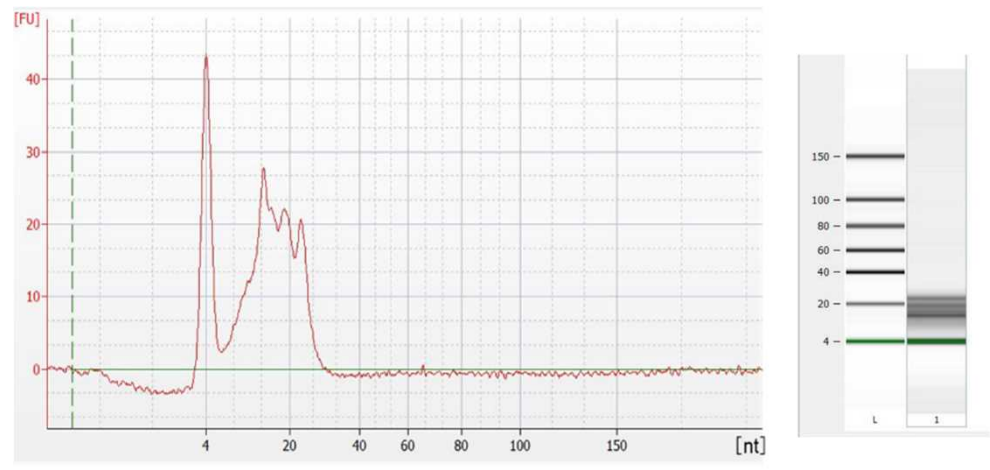


Step 4

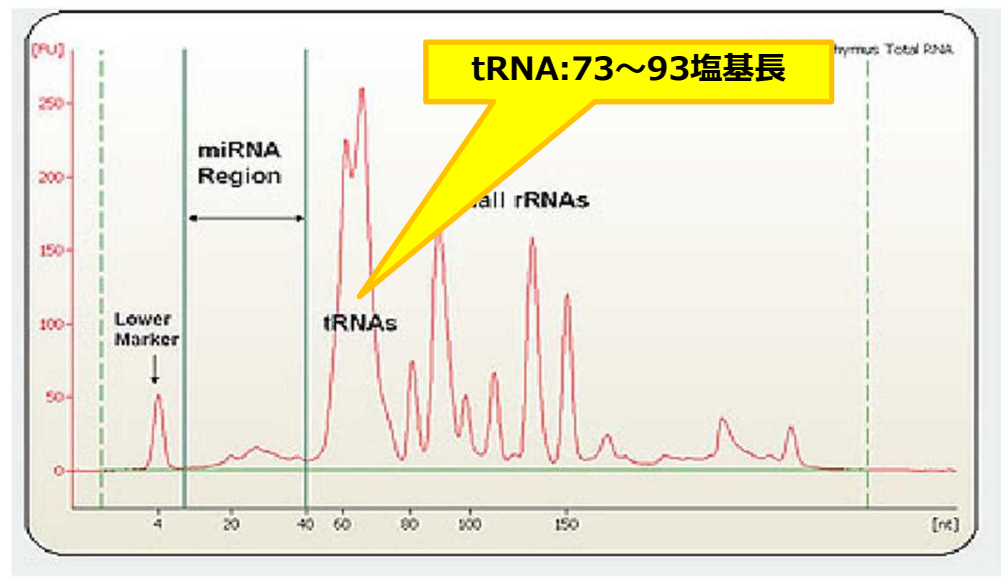
解析

フィルター法（サイズを利用した単離）

培養細胞(MeT-5A cells)のExosomeからRNAを精製してみた



Agilent 2100 バイオアナライザ



https://www.researchgate.net/post/It_s_miRNA_present_on_the_sample2



発表者の個人的意見

方法	正確	簡単	単離後の機能解析	安価
超遠心法	× 夾雑物が多く精製度が悪い	× 超遠心機が必要 大量では難	▲ そのまま投与できる ダメージが大きい	▲
ポリマー沈殿法	× 夾雑物が多く精製度が悪い	▲ 試料によって溶液 を選択	▲ 試薬のコンタミがある	▲
アフィニティ法	▲ タンパク質の特異性に 依存	▲ 大量では難	▲ 試薬のコンタミがある	▲
クロマト法	▲ ダメージが少ない	▲ 大量では難	▲ そのまま投与できる	▲
フィルター法	▲ マイクロベジクルのコン タミは否定できない ダメージは不明	● 大量も可能	▲ そのまま投与できるが 回収量に不満がある	●

従来技術とその問題点

Exosomal microRNA (Exo-miRNA)の解析例 (その1)

悪性胸膜中皮腫の診断法

目的：

- 悪性胸膜中皮腫はアスベスト（石綿）曝露が発症の原因と考えられている
- 悪性胸膜中皮腫は極めて悪性度が高いにもかかわらず初発症状に乏しいことが多い
- 多く、進行して症状が発現することが多い
- 外科的治療は容易ではなく、たとえ切除ができて術後のQOLが低下することや再発率が必ずしも低くはないことが問題となっている
- 早期発見のための**診断マーカー**の開発が求められている

従来の方法：

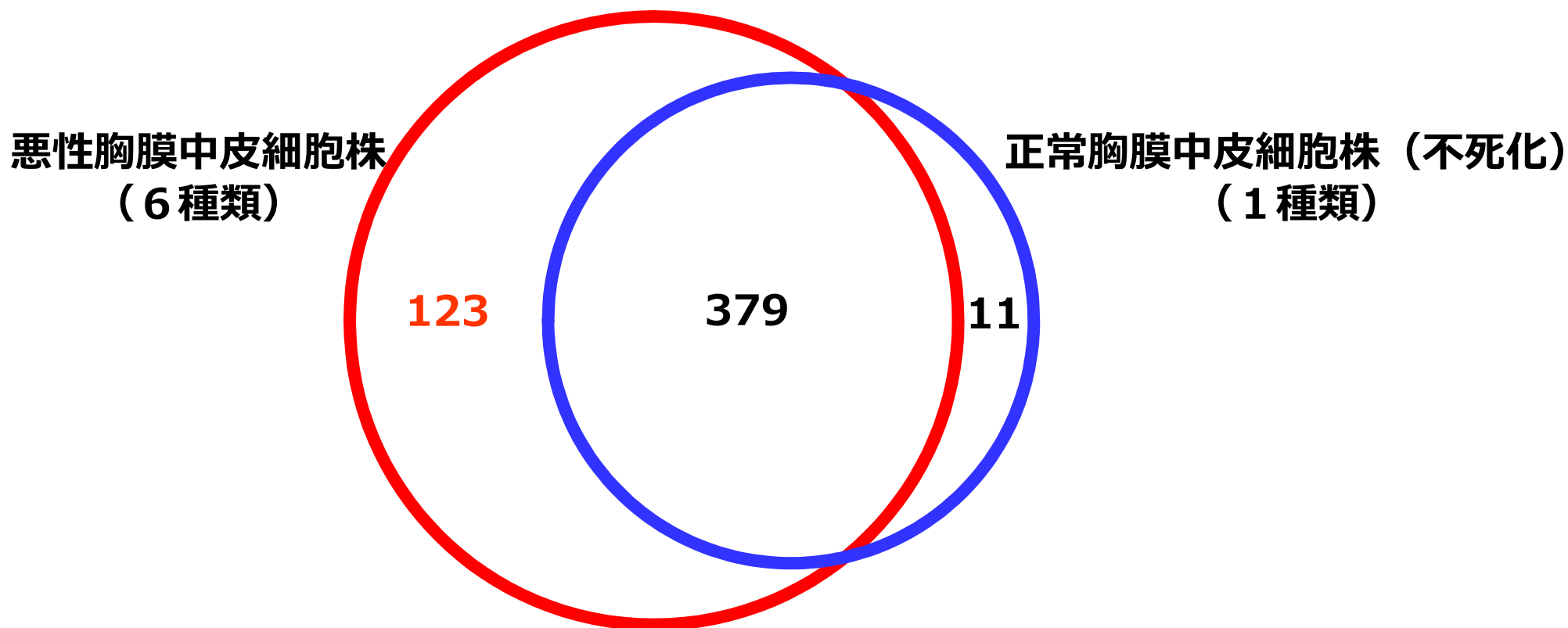
侵襲性の低い胸水の検査では診断は容易でない

- 細胞診では腫瘍が検出されないことがある
- 胸水の**ヒアルロン酸**や**CYFRA**(シフラ;サイトケラチン19フラグメント)が検査に用いられているが、特異性は高くない

最終的に侵襲性の高い胸膜生検を行うことが必要である

新技術の特徴・従来技術との比較

Exosomal microRNA (Exo-miRNA)の解析例（その1）



6種類の悪性胸膜中皮腫細胞株のすべてに発現を認め、正常胸膜中皮細胞株に発現を認めなかったExo-miRNAは123種類

⇒悪性胸膜中皮腫の診断（血液・胸水）に使用できる可能性がある

従来技術とその問題点

Exosomal microRNA (Exo-miRNA)の解析例（その2）

うつ病の診断法

目的：

- わが国では100万人のうつ病患者が医療機関を受診している
- その診断において客観的な評価方法がない
- **診断マーカー**の開発が求められている

従来の方法：

- うつ病の診断基準は、特定の症状がどの程度続いているかに基づいており、部分的に患者の主観的評価が含まれる
- うつ病を客観的に評価する方法としてゲノム情報、脳画像情報など様々な方法が提案されているがいずれも感度・特異度が低く、実臨床に応用されていない

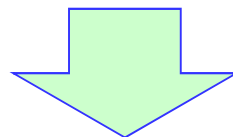
新技術の特徴・従来技術との比較

Exosomal microRNA (Exo-miRNA)の解析例（その2）

方法：健常者（13名）とうつ病患者（13名）の血液内Exo-miRNAの発現プロファイルを比較する

	条件	microRNAの数	
		うつ病患者	健常者
1	13名全員に値が存在する	447	719
2	13名全員に値が存在しない	822	610
3	1と2以外	1296	1236

Human microRNA chip; 2,565 probes

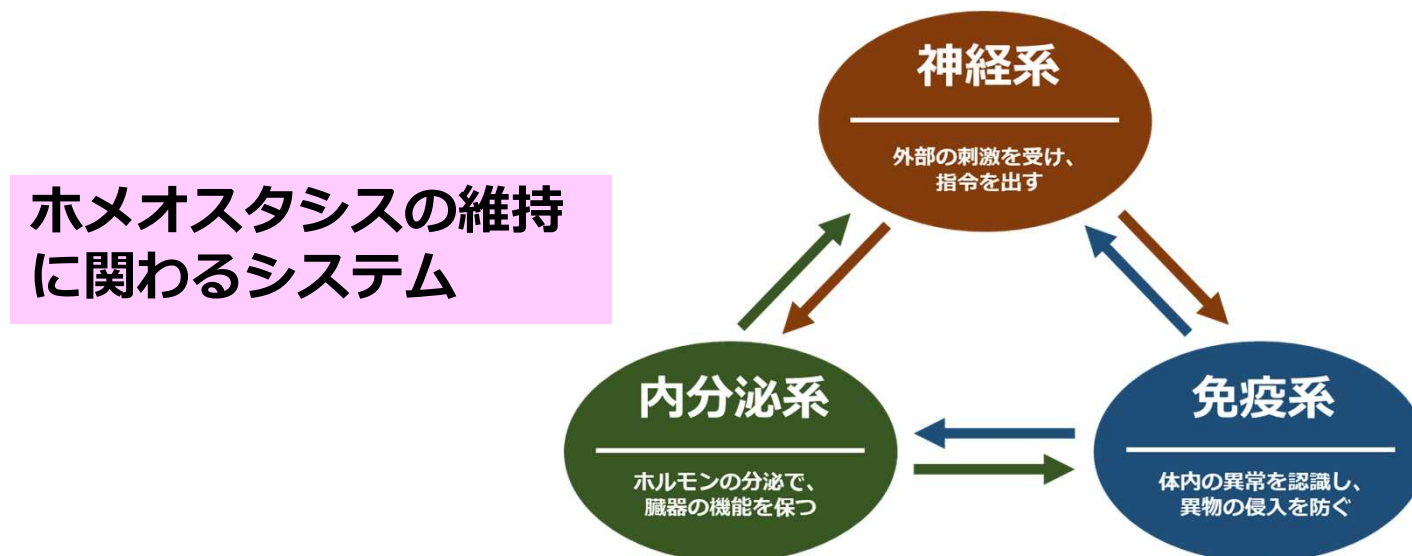


7種類のExo-miRNAの発現量を調べることでうつ病の診断が可能であると考えられた

想定される用途

ヒトの体は、外部の刺激を受け指令を出す**神経系**、ホルモンの分泌で臓器の機能を保つ**内分泌系**、体内の異常を認識し異物の侵入を防ぐ**免疫系**が協調して心身を健康に保つ仕組み（ホメオスタシス）が維持される

エクソソームはホメオスタシスの維持に関与していることが想定されていることから、今後**様々な疾患の診断**にエクソソーム内のmicroRNAが利用される可能性がある⇒**診断マーカー**になり得る



実用化に向けた課題

エクソソームの単離は、一般的に

- 様々な方法がある
- ステップが多く、時間がかかる方法が多い
- 分離法によっては壊れる可能性がある
- 結合させる物質や溶出液が残ることがある

エクソソームの精製において

- 大量の試料を使用
 - 不純物がなく、ダメージの少ない精製
- これらを満たす技術の開発が求められる

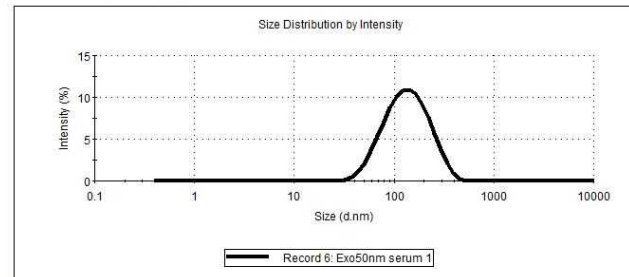
企業への期待

現在の方法では、シリンジフィルターからの回収率が低い

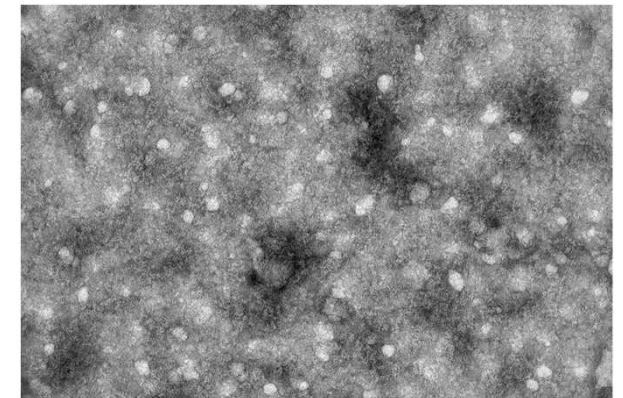


DLS (動的光散乱法)

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 112.6	Peak 1: 148.6	100.0	73.75
Pdl: 0.240	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.935	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			



TEM (透過型電子顕微鏡)



顕微鏡 加速電圧 倍率
JEM-1200 EX 80 kV 40000 x

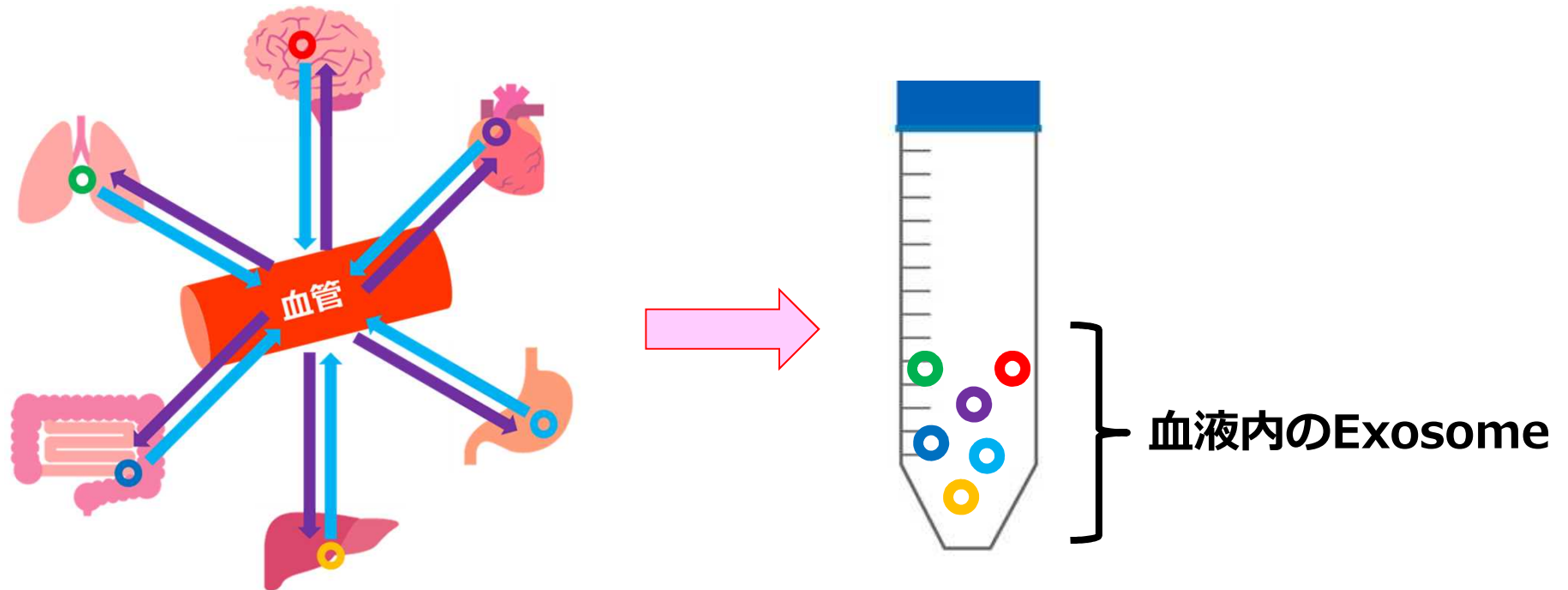
— 200 nm —

シリンジフィルターによるExosome捕捉の課題

- **自動化**
- 回収率を高めるための**フィルターの開発**

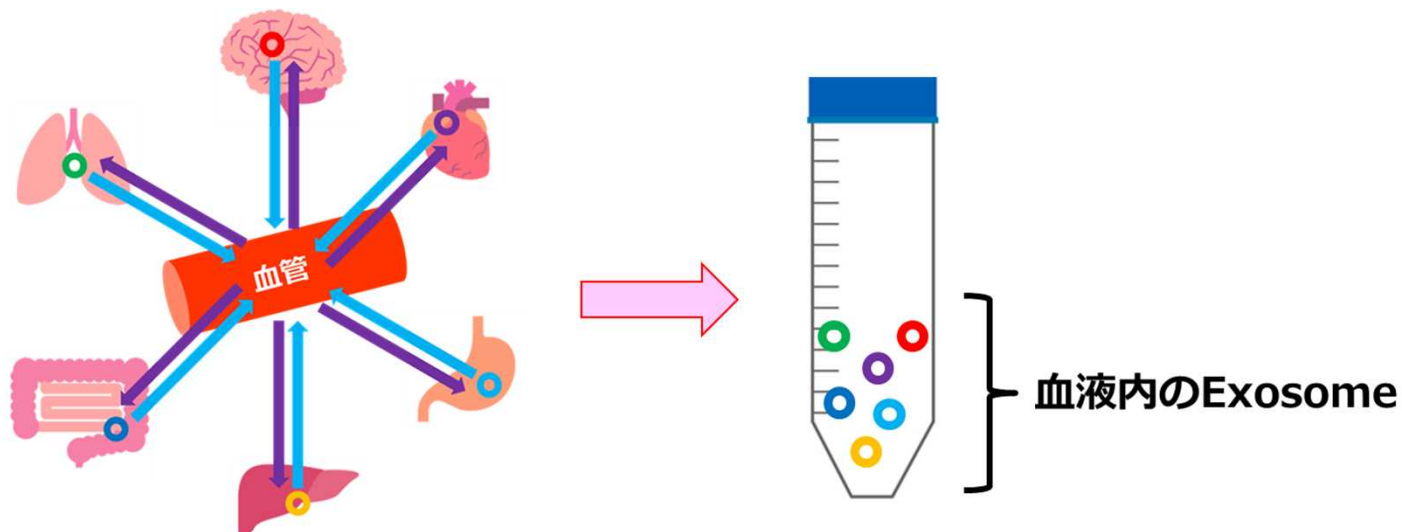
企業への期待

- 血液から単離したExosomeは様々な細胞から分泌された混合状態である
- 身体の状態を理解するには**総Exosome**の解析でよいかもしれない



企業への期待

- 各細胞・組織・臓器が分泌したExosomeがどのような情報を発信しているかを理解するにはそれぞれのエクソソームを単離することが必要になる
- ⇒ **細胞・組織特異的なエクソソーム**の単離が課題
- シリンジフィルターとアフィニティー法の組み合わせが有効であると考えている



まとめ

- Exo-miRNAは**疾患の診断に利用**できる可能性があり、多くの研究者が注目している
- Exosomeの単離には**確立された方法がない**ため有用なExo-miRNAが見いだせていない（疾患特異的なExo-miRNAは知的財産）
（非公開情報）同じ試料を異なる方法でExosomeを単離してRNAを精製した場合、バイオアナライザーによる波形の違いが明確で、Exo-miRNAの発現プロファイルも異なっていることが報告されている
- 細胞・組織特異的なExosomeを単離する**技術の向上（正確、簡単、安価）**はあらゆる疾患の診断に貢献できる可能性がある

お問い合わせ先

産業医科大学

産学連携・知的財産本部

橋本 正浩

T E L 093-603-1611 内線4679

F A X 093-691-7518

e-mail m-hashimoto@med.uoeh-u.ac.jp