

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Identification of novel tumor markers by using an isolation method of highly purified exosomes

研究開発担当者 (日本語) 医薬保健研究域医学系 教授 華山 力成  
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Medicine, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Professor, Rikinari Hanayama

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

エクソソームは免疫細胞や腫瘍細胞など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結合させ、その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を開発した。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夾雑物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、ヒト白血病細胞株からエクソソームを精製し、従来法である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 (Scientific Reports. 6:33935 (2016))。また、この成果を元に特

許出願を行った（特願 2014-246876, PCT/JP2015/083505）。

次に、Tim4-Fc 磁気ビーズを用いて実際に生体試料からエクソソームが高純度に精製可能であるかを検討した。人の血液や尿からエクソソームの精製を行い、精製条件の最適化を行ったところ、高純度かつ高効率にエクソソームを回収できる条件が確立できた。これらの成果を用いた高純度エクソソーム精製キットが、純国産試薬として和光純薬工業株式会社から販売開始され、国内外で好評を得ている。今後、エクソソーム精製法のスタンダードとなることが期待されている。

更に、高純度エクソソーム精製法を用いて新規腫瘍マーカーを同定する為、大阪大学病院泌尿器科と共同で、尿路上皮癌患者と健常人の尿サンプルの解析を行った。得られたエクソソームから miRNA を抽出し、高発現している miRNA を検索したところ、5 つの miRNA が癌患者の尿エクソソームで高発現していることが確認できた。次に 60 名の尿中エクソソームで検証コホートを行い、5 つの miRNA の中から miR-21-5p が尿路上皮癌の最も良い腫瘍マーカーとなり得ることを突き止めた (Oncotarget. 14969 (2017))。特に miR-21-5p は、尿細胞診で検出できない癌の発見にも有用であることが示された。今後、尿のみならず血液や髄液からこの精製法を用いてエクソソームを精製することにより、新規の腫瘍マーカーや、様々な疾患バイオマーカーが同定できると期待している。更に、臨床検査の現場で用いることにより、エクソソームが新たな検査項目として普及すると期待される。

一方、生体内で少量しか存在しない癌細胞由来のエクソソームは、多量にある健常細胞由来のエクソソームに隠れてしまう為、高感度の早期診断が困難である。そこで、1細胞を捕捉できるエクソソーム解析用マイクロ流体チップを開発し、このチップを用いて1細胞由来のエクソソームを Tim4 で補足することに成功した。今後、この技術を発展させることにより、1細胞由来エクソソームを用いた革新的早期診断法の開発が可能になると期待している。

Exosomes are small membrane vesicles with a diameter of 30 to 100 nm released from immune cells and tumor cells, enclosing cell-specific proteins, mRNA, non-coding RNA. In recent years, the possibility that these exosomal components are useful as biomarkers of tumor cells has been reported, and correlation with early diagnosis of cancer, determination of therapeutic effect, prediction of prognosis has been actively studied. However, in the conventional purification method, the purity of exosomes is lowered due to the contamination of unrelated proteins. In particular, when ultracentrifugation is used for purification of exosomes, the recovery amount is unstable due to a complicated operation. In addition, an expensive ultracentrifuge is necessary and it is impossible to deal with a large number of specimens.

Therefore, we developed a novel method by conjugating exosome-receptor Tim4 protein to magnetic beads and purify exosomes with simple and high purity by affinity purification method using the beads. Tim 4 binds phosphatidylserine (PS) on the exosome membrane in a calcium-dependent manner. Therefore, by using an elution buffer containing EDTA as a chelating agent, high-purity exosomes containing no contaminants can be efficiently released from the beads. In fact, when exosomes were purified from human leukemia cell lines using Tim4-Fc magnetic beads and compared with exosomes purified by the conventional ultracentrifugation method or polyethylene glycol (PEG) precipitation method, it was found that most of the contamination was removed and exosomes with a purity higher than 100 times higher were purified (Scientific Reports. 6: 33935 (2016)). Based on this result, a patent application was filed (Patent Application No. 2014-246876, PCT / JP2015 / 083505).

Next, it was examined whether exosomes can be purified from biological samples using Tim4-Fc magnetic beads. Exosomes were purified from human blood and urine, and the purification conditions were optimized. As a result, it was possible to establish conditions for high-purity and high-efficiency recovery of exosomes. A high purity exosome purification kit using these results was launched by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. as a domestic reagent, and it has been well received both domestically and abroad. It is expected to become the standard of exosome purification method in the future.

In order to identify novel tumor markers using this method, urine samples from urothelial carcinoma patients and healthy volunteers were analyzed in collaboration with Department of Urology, Osaka University Hospital. When miRNA was extracted from the exosomes and highly expressed miRNA was searched, it was confirmed that 5 miRNAs are highly expressed in urine exosomes of cancer patients. Next, verification cohort was performed with 60 urinary exosomes, and we found that miR-21-5p can be the best tumor marker for urothelial carcinoma out of 5 miRNAs (Oncotarget. 14969 (2017)). In particular, miR-21-5p was shown to be useful for the discovery of cancer which cannot be detected by urinary cytology. We expect to identify novel tumor markers and various disease biomarkers by purifying exosomes not only from urine but also from blood and spinal fluid using this purification method. Furthermore, by using it at the site of clinical examination, exosome is expected to be used as a new examination item.

On the other hand, exosomes derived from cancer cells that are present only in a small amount in vivo are hidden by exosomes derived from a large amount of healthy cells, so that it is difficult to diagnose early with high sensitivity. Therefore, we developed microfluidic chip for exosome analysis capable of capturing one cell and succeeded in capturing exosomes derived from one cell with Tim4 using this chip. By developing this technology, we expect to develop an innovative early diagnosis method using exosomes derived from single cell.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 3件）

1. 華山力成. 免疫系におけるエクソソームの役割. 和光純薬時報. 2016, 84(1), 1-4
2. Nakai Y, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N, Naruse K, Sadamura Y, Hanayama R. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. Sci Rep. 2016, 6, 33935
3. 華山力成. エクソソームによる免疫機能の制御機構. Labcab. 2017, 18, 5-7
4. Matsuzaki K, Fujita K, Jingushi K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Ueda Y, Tanigawa G, Yoshioka I, Ueda K, Hanayama R, Uemura M, Miyagawa Y, Tsujikawa K, Nonomura N. MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. Oncotarget. 2017, 14969
5. 華山力成. エクソソーム：エクソソームを介した神経突起剪定の制御機構. 脳内環境辞典. 2017, 32-33
6. Yoshida T, Ishidome T, Hanayama R. High purity isolation and sensitive quantification of extracellular vesicles using affinity to TIM4. Curr Protoc Cell Biol. 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Regulation of glial functions by neuronal exosomes and its disorder, 口頭, 華山力成, 第 3 回 日本細胞外小胞学会, 2016/9/1, 国内
2. 神経由来エクソソームによるグリア細胞の機能制御とその病態, 口頭, 華山力成, 第 89 回 日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内
3. 自己炎症疾患の発症機序とエクソソームの役割, 口頭, 華山力成, 第 52 回 インスリン研究会, 2017/2/4, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

希望なし