

## 研究終了報告書

### 「脳選択的にターゲットする疾患関連エクソソームの解析」

研究期間：2019年4月～2022年3月

研究者：星野 歩子

#### 1. 研究のねらい

がん細胞は臓器特異的な転移を行う。我々は、がん細胞由来エクソソームががん細胞到達前に未来転移先へ分布し、前転移ニッチの形成に関わり得ることを肺および肝臓への転移機構において報告した。また、がん細胞由来エクソソームの膜上に存在しているインテグリンのパターンがエクソソームの臓器特異的分布を規定していることを見出した。さらにこのインテグリンパターンに依存してエクソソームが未来転移先にて前転移ニッチを形成し、臓器特異的転移を引き起こすことを報告した(Hoshino et al., *Nature* 2015)。本研究では、乳がん由来の脳特異的に分布するエクソソームの発現分子解析を行い、脳への分布後エクソソームがいかなる機構で、エクソソームに含まれるどの分子に依存して、前転移ニッチを形成するのかを解明することを第1の目的とする。次に、我々は40種類以上のがん細胞由来エクソソームの網羅的プロテオミクス解析を行っており、そこで全てのがん細胞由来エクソソームにおいて、インテグリン  $\beta 1$  の存在が認められることを見出した。このことから、エクソソーム上のインテグリン  $\beta 1$  には「一般的に」がん細胞の進展・促進に関わる機構がある可能性が考えられる。そこで、本研究ではエクソソーム上のインテグリン  $\beta 1$  ががん進展にどのような役割を持つのかについて検証することを第2の目的とする。さらに、エクソソームによる脳への臓器特異的分布はがん以外の疾病でも確認できている。自閉症患者の血漿由来エクソソームは(脳転移性がん細胞エクソソーム同様)マウス静脈へ投与後には脳血管関門(Blood-brain barrier)を通過し、脳へ特異的分布が見られた。そこで、本研究ではさらに、自閉症サンプル由来エクソソームの脳への影響について、がん由来エクソソームとの比較をしながら、脳内のどの細胞へ優先的に取り込まれるのか、そして脳内環境でどのような変化が見られ、それがマウスの行動様式に影響を与えうるのかについて検討することを第3の目的とする。今回脳内分布が共通するがん自閉症における脳内環境の比較を行うことで疾病別の相違を調べられその違いが病態を規定する機構である可能性を検討することは意義が大きい。将来的には両方に共通する機構にも着目し、脳内変化を他段階で起きるものとし共通の影響をターゲットとした治療開発に繋がる研究へも展開したい。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、脳転移および自閉スペクトラム症、という脳をターゲットとする疾患におけるエクソソーム解析を行った。我々はこれまでに、肺や肝臓においてがん細胞が産生するエクソソームが転移促進的な環境の構築に寄与することを見出してきた。さきがけ研究として、脳関門を通過する脳転移性がん細胞由来エクソソームは、脳内の血管内皮細胞へ取り込まれがん細胞の生着及び増殖に寄与する環境構築に関わることを見出し報告した(Rodrigues\*,

Hoshino\* et al., *Nature Cell Biology* 2019)。さらに、がんの有無の判断、もしくはがん種の同定に末梢血中エクソソームのタンパク質組成が有用であることを明らかにし報告した (Hoshino et al., *Cell* 2020)。この検討の中で、がん患者に共通するエクソソームマーカーについても調べ、その結果、がん患者として診断するに至る最も有用なエクソソーム分子は免疫グロブリン関連の分子であることが分かった。次に、自閉スペクトラム症 (ASD) におけるエクソソーム解析を行い、今後診断マーカーとして使用できる可能性などについて検討を行った。

## (2) 詳細

### ● エクソソームによる脳特異的転移機構の解明

脳転移性がん細胞由来のエクソソームも、肺や肝臓転移同様に未来転移先である脳へがん細胞より先に分布し、転移促進的な環境を作るのかどうかについて検討を行った。また、その場合、転移促進的な微小環境とはどのようなものか、そしてエクソソームに含まれるどの分子がその機構に関わるのかを明らかにすることを目指した。まず、我々は、脳転移性がん細胞が産生するエクソソームが脳の血管内皮細胞へ取り込まれ、脳内の血管透過性を上昇させていることを見出した(図1)。次に、脳転移性がん細胞由来エクソソームががん細胞の転移機構に寄与するかどうかを検討した結果、肺や骨転移性がん細胞由来エクソソームと比べると、脳転移性がん細胞由来エクソソーム添加群での

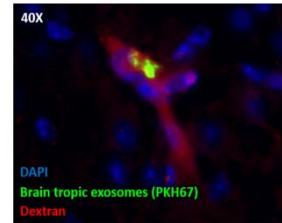


図1 エクソソーム(緑)を取り込んだ付近において脳内の血管透過性が上昇(赤)しているのが観察された。

み、脳内環境下でのがん細胞の増殖および浸潤能の上昇が確認された(図2)。脳転移性がん細胞由来エクソソームに含まれるどの分子が脳内環境変化をもたらすのかを明らかにするために、網羅的プロテオミクス解析を行った。その結果、CEMIP というヒアルロン酸結合タンパク質が脳転移性がん細胞由来エクソソームで有意に高く、脳内微小環境、特に血管内皮細胞の形質を変化させ、がん細胞が生着および増殖しやすい環境が整えられることが分かった(図3)。この効果は in vitro および in vivo で確認でき、さらにヒトの検体において原発巣での CEMIP 発現量が高いほど脳転移のリスクが高くなることも分かった。以上より、脳

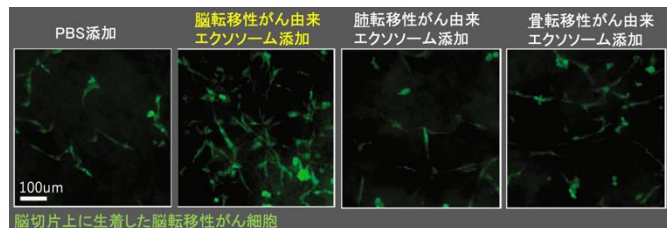


図2 脳転移性がん細胞由来エクソソーム添加でのみ、がん細胞(緑)の生着および増殖が観察された。

転移においてもがん細胞が産生するエクソソームが、転移促進的な役割を果たすという新たな脳転移のメカニズムを

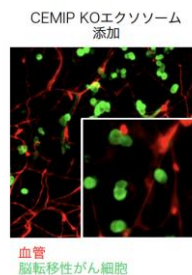
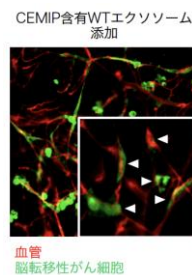


図3 CEMIP 陽性の脳転移性がん細胞エクソソームを添加後、がん細胞(緑)の脳内への生着および増殖を検討。CEMIP 含有エクソソーム添加後では血管内皮細胞(赤)へがん細胞(緑)が巻きつく様に生着していることがわかる(左)が、CEMIP を含まない脳転移性がん細胞由来エクソソームではその効果はみられない(右)。

解明して共筆頭著者として報告した(Rodrigues\*, Hoshino\* et al., *Nature Cell Biology* 2019)。

• 末梢血中エクソソームを用いたバイオマーカーの解析

ITGβ1を含むがんにおける共通のエクソソームマーカーの解析もさきがけ研究と関連するプロジェクトとして走らせていた。まず、我々が超遠心により回収しているエクソソームに共通するマーカーを明らかにするために、426 のヒト由来サンプルを用いた分析で、様々な組織(血漿、血清、手術組織等)からのエクソソーム全てに共通する「エクソソームマーカー」候補を解明した。既存のエクソソームマーカーの中ではヒトサンプルにおいて CD9 が最も検出率が高く有用であることが示唆された。次に、まだエクソソームマーカーとして当該分野において利用されていない新たな13個の候補分子を見出した。マーカーとして利用するためにはエクソソームの膜上に該当する分子があることを確認する必要があり、さきが

けのサポートにより購入した ExoView を使用したデータにより新たな2つの分子がエクソソームの膜上にあり、マーカー候補となることを論文として報告することができた(図4)。

次に、エクソソーム含有タンパク質によりがんと非がんを分ける

ことができるかどうか検討した。また、がん患者における共通のマーカーがどのようなものなのかについても解析を行った。様々なステージの16種類のがん(乳がん、肺がん、膵臓がんなど成人のがんと、骨肉腫、神経芽細胞腫などの小児がん)の患者の血漿由来エクソソームのプロテオミクス解析と健常人のものを元に、機械学習を用いてエクソソーム含有タンパク質の種類によって高精度でがんの有無を判定することができることを見出した(図5)。さらに、がんの有無だけでなく、がん種の同定もがん患者のステージに依存せず行えることを発見した(図6)。これらの、がん種特定

やがんの有無を分けるために用いることができるエクソソーム含有タンパク質パネルには、がん細胞が直接産生するエクソソームだけでなく、その他の“正常細胞”から得られるメッセージが有力であることが明らかになった。つまり、がん患者の血液には、がんの進行度合いに関係なくがん種別に体内で変化が起きておりそれを反映した十分な量のバイオマーカーが存在していることになる。以上の内容を筆頭兼責任著者として報告した(Hoshino et al.,

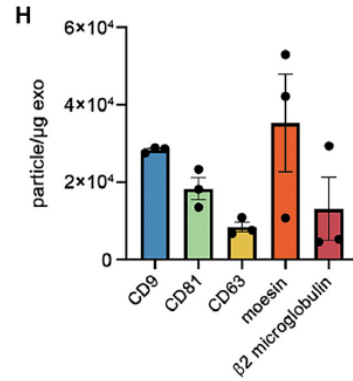


図4 ExoViewを用いた解析結果。通常エクソソームマーカーと言われる分子以外にも moesin, β2 microglobulin は多くのエクソソーム共通のマーカーとなりうる。

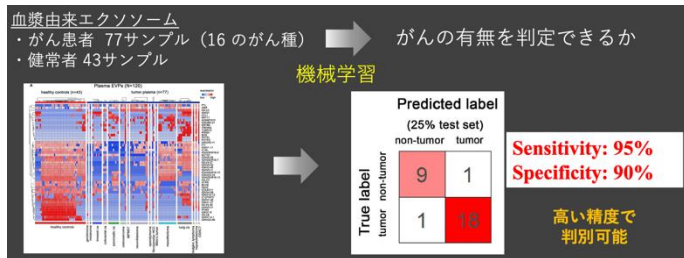


図5 ヒト血漿由来エクソソームのプロテオミクス解析によりがん患者と健常者を高精度で判別できることが分かった。

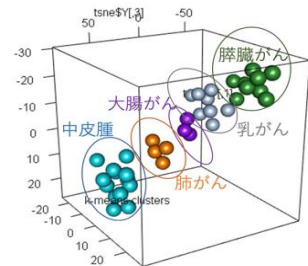


図6 がん患者血中エクソソームのプロテオミクス解析により、患者のステージに依存せずに、がん種別にクラスタリングすることが確認された。

Cell 2020)。今後、より高精度かつ超遠心を用いないでがんを判別できるキットの作製を目指す。

### 3. 今後の展開

がんの診断パネルキットの開発、そしてエクソソーム並びにエクソソームにより引き起こされた微小環境をターゲットとした転移抑制的な治療開発を目指す。

### 4. 自己評価

- 研究目的の達成状況

申請書に記載した実験予定事項はすべて行った。がんにおけるエクソソーム解析については技術論文も含め3報の論文を報告できた。また、現在もう一報投稿予定の論文もあり、全体として満足のいく進み具合だった。

- 研究の進め方

研究費の執行状況も予定通り行えた。また、スタートアップなど、さきがけの追加支援により、研究を滞りなく遂行することができた。さきがけ研究期間中に独立研究室を運営することになり、それに伴い人件費が必要となったりした時期もあったが、実験が止まる様な影響はなく研究遂行できた。さきがけ研究の仲間にも恵まれ、多くの研究者との共同研究が進んでいる。

- 研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果

がんの転移はがん細胞が到達してからではなく、エクソソームにより未来転移先が耕された状態から始まっている、とすれば、転移抑制的な治療が可能だと考えられる。どこからが転移なのか、という我々の概念が変われば、現状の医療体制を大きく変える治療方法の開発が可能だと考えている。これに伴い、今後も我々は転移抑制的な治療法の具体的な分子機構を解明し、エクソソームをターゲットとした治療だけでなく、エクソソームが引き金となった変化に対する治療法についても検討を続ける。がん患者の死亡理由の9割は転移によると言われている現状の中で、将来的にはがん転移が起きる前に、転移抑制的な治療法の開発を目指す。また、現在がん患者の3%が、原発不明がんの患者であると言われている。末梢血由来エクソソームの解析により、がん種の同定ができることを利用した診断キットの開発にも注力していきたい。将来的には、幅広いがんのマーカーとして健康診断などにも入れられる様な研究に発展させたい。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Rodrigues G\*, **Hoshino A\***, Matei IR, Scandariato I, Kenific CM, Kim HS, Casanova-Salas I, Dai D, Badwe CR, Gril B, Mark MT, Dill BD, Molina H, Benito-Martin A, Bojmar L, Offer K, LaPlant Q, Ararso Y, Buehring W, Wang H, Juan X, Liu Y, Sabari JK, Shin SJ, Narula N, Rajasekhar VK, Zhang H, Costa-Silva B,

Rafii S, Rudin CM, Jones DR, Steeg PS, Peinado H, Ghajar CM, Bromberg J, Pisapia D, de Sousa M, Lyden D., ***Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis.***, Nature Cell Biology, 2019, 21(11):1403-1412

2015 年 Nature 誌にて報告した内容に続いて、脳転移においてもエクソソームが事前に脳へ取り込まれ転移促進的な環境を作り出すことを証明。エクソソーム上の CEMIP という分子が脳内の血管内皮細胞の形質変化をもたらしがん細胞の転移を助ける機構を報告した。

2. **Hoshino A**, Sang Kim H, Bojmar L, Ennu Gyan K, Cioffi M, Hernandez J, Zambirinis CP, Rodrigues G, Molina H, Heissel S, Tesic Mark M, Steiner L, Benito-Martin A, Lucotti S, Di Giannatale A, Offer K, Nakajima M, Williams C, Nogués L, Pelissier Vatter FA, Hashimoto A, Davies AE, Freitas D, Kenific C, Ararso Y, Buehring W, Lauritzen P, Ogitani Y, Sugiura K, Takahashi N, Aleckovic M, Bailey KA, Jolissant JS, Wang H, Harris A, Schaeffer LM, Posner Z, Balachandran VP, Khakoo Y, Raju P, Scherz A, Sagi I, Scherz-Shouval R, Yarden Y, Oren M, Petriccione M, De Braganca K, Donzelli M, Fischer C, Vitolano S, Wright G, Ganshaw L, Marrano M, Ahmed A, DeStefano J, Danzer E, Roehrl MH, Lacayo NJ, Vincent T, Weiser MR, Brady MS, Meyers P, Wexler LH, Ambati S, Chou AJ, Slotkin E, Modak S, Roberts S, Basu E, Diolaiti D, Krantz B, Cardoso F, Simpson AL, Berger M, Rudin CM, Simeone DM, Jain M, Ghajar CM, Batra SK, Stanger BZ, Bui J, Brown KA, Rajasekhar VK, Healey JH, de Sousa M, Kramer K, Sheth S, Baisch J, Pascual V, Heaton TE, La Quaglia MP, Pisapia DJ, Schwartz R, Zhang H, Liu Y, Shukla A, Sarte L, DeClerck Y, LaBarge M, Bissell MJ, Grandgenett P, Hollingsworth M, Bromberg J, Costa-Silva B, Peinado H, Kang Y, Garcia BA, O'Reilly E, Kelsen D, Trippett TM, Jones DR, Matei I, Jarnagin WR, Lyden D., ***Extracellular Vesicle and Particle biomarkers define multiple human cancers.***, Cell, 2020, 182(4):1044-1061 (First and Corresponding author).

400 種類以上の様々なソース由来エクソソームのプロテオミクス解析を行い、如何なるヒト組織由来のエクソソームにも共通するエクソソームマーカーの解明を行った。また、ヒト血漿中エクソソームを用いたがん・非がんを特定できるタンパク質パネルを報告。そして、ヒト血漿中エクソソームを用いてがん種特定が可能であることを証明した。

3. Bojmar L, Kim HS, Tobias GC, Pelissier Vatter FA, Lucotti S, Gyan KE, Kenific CM, Wan Z, Kim KA, Kim D, Hernandez J, Pascual V, Heaton TE, La Quaglia MP, Kelsen D, Trippett TM, Jones DR, Jarnagin WR, Matei IR, Zhang H, **Hoshino A**, Lyden D., ***Extracellular vesicle and particle isolation from human and murine cell lines, tissues, and bodily fluids.***, Star protocol, 2020, 2(1):100225.

上記論文 (Cell) の技術論文を責任著者として報告した。特に、様々なソースからエクソソームの単離する方法、そしてそのベーシックな解析方法について述べている。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

2020年 第2回 輝く女性研究者賞(科学技術振興機構理事長賞)

2021年 文部科学大臣表彰若手科学者賞

2021年 第11回(2021年)フロンティアサロン永瀬賞 最優秀賞

2022年 第18回(令和3(2021)年度)日本学術振興会賞

2021年 日本学術振興会二国間交流事業シンポジウム招待講演

2021年 第94回日本生化学会大会シンポジウム