

令和 2 年 3 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2018

受付番号 201860606

氏 名 横 井 暁

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ヒューストン (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

エクソソーム標的治療戦略の開発

3. 派遣期間: 平成 30 年 4 月 6 日 ~ 令和 2 年 3 月 19 日

4. 受入機関名及び部局名

The University of Texas MD Anderson Cancer Center

Department of Gynecologic Oncology and Reproductive Medicine

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

自身は、産婦人科医師としての臨床経験から、卵巣がん患者の予後改善に繋がる基礎研究を行うことを目標としている。卵巣がん細胞は極めて容易に腹腔内へ転移を起こし、診断時多くの患者はすでに腹膜転移を伴った進行期の状態という、がんの中でも極めて予後の悪いがん種である。消化器がんでも問題となる腹膜播種性転移は、治療困難で長期生存を望めない病態であり、その進展メカニズムには不明な点が多く残されている。また、白金製剤を中心とした化学療法などの現在の標準的治療では、効果は限定的で、大幅な予後改善は期待できない。卵巣がん患者の予後改善には、より早期に卵巣がんを発見し、卵巣にがんが限局する初期の段階で根治治療を行うことが重要である。さらに、進行期患者の予後改善のためには、新規治療モデルに繋がるような腹膜播種のメカニズムを探索する研究が必要である。以上から、日本での博士課程における研究期間では、卵巣がんの重大な問題点である A. 腹膜播種性転移と、B. 早期診断の難しさに対し、解決の糸口となるような知見を求め研究を行った(Yokoi A et al. *Nature Communications*. 2017 and Yokoi A et al. *Nature Communications*. 2018)。

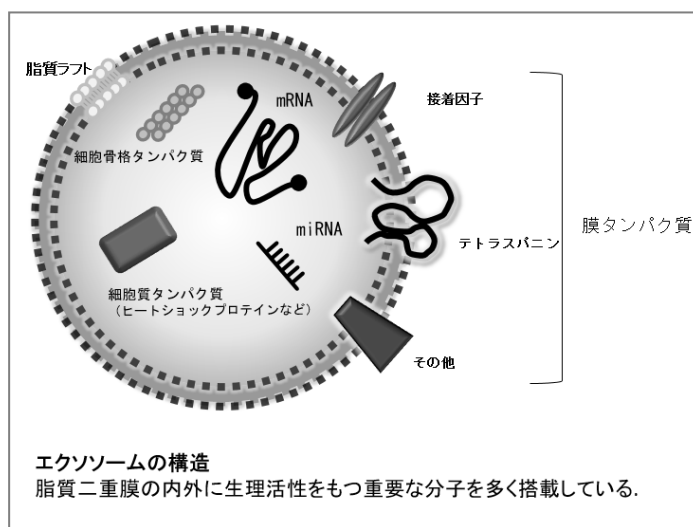
卵巣がんにおけるトランスレーショナル研究に主眼を置いた更なる研鑽を目指し、2018 年より留学を開始した。派遣先の研究室は、全米最大のがんセンターであるテキサス大学 MD アンダーソンがんセンター(MDA)に所属する婦人科生殖医学部門の Anil K Sood 教授の研究室である。Sood 教授は施設内で多くの共同研究を行っているが、特に、miRNA 研究の大家である George A Calin 教授や(Calin GA, et al., *Nature Reviews Cancer*, 2006)、ナノリポソームなどドラッグデリバリーシステムの研究者である Gabriel Lopez-Berestein 教授(Merritt WM, *New England Journal of Medicine*, 2008, Pecot CV, et al., *Nature Reviews Cancer*, 2011)との連携は強く、日常的に研究を共にしている。また MDA 外の全米の多くの研究機関とも共同研究を行っており、新たな仮説の証明のためには積極的に施設外の研究室、

企業とコラボレーションを行っている。派遣前、自身は、エクソソームというあらゆる生細胞が放出する脂質二重膜小胞を対象とした研究を行っており、その背景からこちらの研究室でも、卵巣がんの生物学に関連したエクソソームの研究を行った。PI の Sood 教授もエクソソーム研究に非常に力を入れはじめていたところであり、非常にスムーズに研究を開始することができた。現在では研究室に所属する約半数の研究員がエクソソームに関連した研究を行っている。自身は、在籍期間中、ラボのエクソソーム関連の機器や試薬の管理、エクソソームに関連した研究の相談役を務めた。

研究期間において、研究室において自身が主導で行ったプロジェクトは主に2つあり、下記のその進捗・詳細を記述する。どちらの研究も過去に研究室に在籍した研究員から引き継ぎ、発展させた仕事であり、特に①のプロジェクトに関しては、前任との間に3か月のオーバーラップ期間があったため、スムーズに研究を開始することができた。

① エクソソーム内 DNA に関する研究

細胞外膜小胞の一つであるエクソソームは、エンドソームに由来する直径 100nm 前後の微細な小胞であり、がん細胞のみならず様々な細胞から分泌されていることが報告されている。さらに、これらエクソソームに内包される核酸やタンパク質などの分子が受け手となる細胞で機能することで、細胞間相互作用に関与することが近年注目を集めている。2007 年の、エクソソームによる生理活性物質の水平伝播の報告以降飛躍的に研究が進んでいる。



細胞外因子の中でエクソソームに着目する利点として、エクソソームが複合的な構造物であることであり、エクソソーム表面のタンパク質や、内部のタンパク質、さらには内部の核酸の生理機能に着目することが主である。実際に 2007 年のエクソソーム研究のマイルストーンとなった研究はエクソソーム内の mRNA が、受け手の細胞で翻訳されること示されたものである。その後、エクソソーム内の非翻訳性 RNA の一つである miRNA の研究も盛んにおこなわれるようになった。そのような背景の中、エクソソーム内に二本鎖 DNA が存在することも近年報告された。しかし、このエクソソーム関連 DNA (Exosomal DNA) に関して、いくつかのがん関連遺伝子変異が検出されるということ以外には、ほとんど何もわかっていない極めて研究が難しい領域とされてきた。

自身は卵巣がん細胞由来エクソソームを用いて、Exosomal DNA、広義に、核成分搭載エクソソーム (Nuclear derived exosome; nExo) についての研究を行った。研究目的は、nExo の基本的性質の理解、生合成機構の解明、さらには臨床応用の可能性について検討することであった。これまでの研究により明らかにしたことの詳細を下記に列挙する。同研究は主に University Texas Austin, University of California San Diego, MDA 内の複数の Core Facility との共同研究によって遂行した研究である。

- ① イメージングフローサイトメトリー法により、DNA 陽性エクソソームの割合を定量することを可能にし、その結果、がん細胞株由来のエクソソームには 10% 弱のエクソソームが DNA を搭載していることを明らかにした。一方で正常細胞由来のエクソソームには 1% 以下の極めて少量の DNA しか放出していないことが分かった。
- ② TCGA データベースによる Pan-Cancer 解析により、卵巣がんはゲノム不安定性の強いがん腫であることがわかり、DNA 不安定性の高いがん細胞はより多くの nExo を放出すると考えられた。
- ③ 遺伝子毒性のある薬剤の投与により nExo の分泌が促進されることが分かり、マウスの実験系でも同様の事象が確認できた。
- ④ nExo の生合成機構の一説を、蛍光免疫染色、およびライブセルイメージングにて明らかにした。

- ⑤ ヒト臨床サンプルを用いて Whole Genome Sequencing を行い体液中エクソソーム内の DNA の性質を評価した。その結果、卵巣がん患者腹水由来のエクソソームは卵巣腫瘍の Copy Number Variation をよく反映することがわかり、いくつかの DNA 修復関連遺伝子の変異を認めた。

上記研究内容は更なる解析を継続しつつも、一つの区切りとして研究内容をまとめており、下記学会にて発表を行った。

1. The annual meeting of American Association for Cancer Research (AACR2019)
Atlanta, Georgia
“A novel approach for liquid biopsy by using nExo”
Poster session (Late breaking)
April 2, 2019
2. The first MRS-ISEV joint meeting 2019
Nashville, Tennessee
“A novel approach for liquid biopsy by using nExo”
Oral session
August 2, 2019

同研究内容は 2019. 11 月に下記の通り論文発表を行った。

Akira Yokoi, Alejandro Villar-Prados, Paul Allen Oliphint, Jianhua Zhang, Xingzhi Song, Peter De Hoff, Robert Morey, Jinsong Liu, Jason Roszik, Karen Clise-Dwyer, Jared K. Burks, Theresa J. O'Halloran, Louise C. Laurent and Anil K. Sood. Mechanisms of Nuclear Content Loading to Exosomes. *Science Advances*. 2019. Nov 20;5(11):eaax8849. doi: 10.1126/sciadv.aax8849.

さらに、本研究に関連して、DNA を搭載しているエクソソームに特定のタンパク質が共存していることを、Western Blotting 法やイメージングフローサイトメトリー法により明らかにし、その事象が卵巣がんの新たなバイオマーカーとして期待されることから、PI の Dr. Sood と共同開発者として、特許申請を行った。また、これらのことを題材に、今後の研究計画をまとめた内容を用いて、Award の応募を行い、下記の通り採択された。

Clovis Oncology Post-Doctoral Fellowship Award
The Foundation for Women's Cancer (FWC)
“Surveillance of response to PARP inhibitors using nuclear-derived exosomes”
April 9, 2019

同研究内容は 2019 年 4 月以降、自身の研究費の一部として使用し、ラボを離れる際に、同僚に引き継いだ。

また、臨床応用実現に向けて更なるアプローチを行うため、アメリカの国家プロジェクトの一つであるキャンサーmoonショット計画の MD アンダーソン内卵巣がん部門のチームに加わり、同プロジェクトのサンプルを用いた検討を計画立案、実行し、現在解析中である。

同研究は現在までに学会発表や論文発表、特許出願や Award の獲得など、着実に明確な成果に結び付いており、今後も研究動向に注視しつつ益々研究を発展させることが重要であると考えている。

② 漿液性卵巣がん初期病変 (serous tubal intraepithelial carcinoma; STIC) における癌悪性化機構へのエクソソームの関わり

卵巣がんは多種にわたる病理組織型から構成される、非常に多様ながん種である。その 9 割以上は上皮性腫瘍であり、その上皮性腫瘍の大部分を占めるのが漿液性卵巣がんである。近年の研究より、漿液性卵巣がんは卵巣本体より発生するのではなく卵管采上皮の前癌病変状態にある p53 過剰発現細胞 (p53signature) が serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC) と呼ばれる細胞へと変化し、STIC 細胞が卵巣へ移植されることで卵巣に発癌するとされている。積年の病理組織免疫染色による解析や、マイクロダイセクション法による遺伝子解析などにより、この「漿液性卵巣がん卵管上皮起源説」が支持されるようになり、現在では定説となっている。しかし、STIC となった病変がその後どのように卵巣がんとして進展してゆくのかは、現在のところは全く分かっていない。自身は、この STIC 細胞がその後の悪性化へエクソソームを利用していると仮説を立て、現在検証している。

具体的には、卵管上皮細胞 (fallopian tube epithelium) を不死化させた FTE 細胞と、その FTE 細胞に HRAS などの癌化遺伝子を導入した STIC 様細胞を、共同研究先の MDA 病理部門の Dr. Jinsong Liu より提供いただき、in vitro モデルとして、エクソソームの抽出を行い、様々な研究に用いている。エクソソームの受け手の細胞 (A 細胞) を仮定し、研究を行っており、A 細胞へのエクソソームの取り込みを高解像度画像解析にて、A 細胞へエクソソームを作用させた後の A 細胞内での遺伝子変化を RNA sequencing にて、また、A 細胞からの因子で STIC 細胞の浸潤能や転移能が上昇することなどの、研究を進めている。また、FTE 細胞と STIC 細胞由来のエクソソームの分子プロファイルを確認すべく、タンパク質量解析も行い、受け手の A 細胞の遺伝子変化プロファイルと合わせ、現在、in silico にて詳細な Pathway を検討中である。また、共同研究先である Pennsylvania 大学より STIC 病変のヒト組織を提供いただき、エクソソームマーカーの検討も行っている。さらには、in vivo での検証をすべく、共同研究先より、STIC 病変を誘導発生するとされる遺伝子改変マウスを提供いただき、検討を行った。

本プロジェクトは、卵巣がん領域では大変関心のありかつ未知な領域が多い分野であり、新規性の高いプロジェクトと考えている。現在論文投稿準備中である。