

令和元年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11002

研究課題名(和文)腎癌組織培養由来エクソソームの網羅的タンパク質解析と新規血液バイオマーカーの同定

研究課題名(英文)Development of our novel method to analyze cancer-derived circulating exosomes

研究代表者

氏家 剛(Ujike, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00738875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌特異的細胞外小胞EVは血液バイオマーカーとして着目され、治療標的としても注目を浴びている。腎癌組織および正常腎組織それぞれを培養し、直接放出されるEVを超遠心法により抽出し、癌特異的EVに含まれるタンパクを質量分析により網羅的タンパク質解析した結果、癌部特異的に分泌される106タンパクの同定に成功した。同定したタンパク質の一部を腎癌患者血中エクソソームにおいて特異的に検出できることも確認された。我々が開発した手法によって、腎癌特異的タンパクを同定しまた、腎癌患者血中エクソソームにおいても特異的に検出されたことから血液バイオマーカーとしての臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

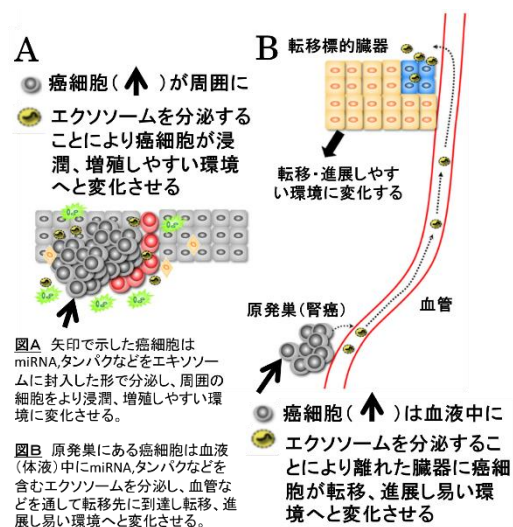
本研究において開発した手法は特許申請(バイオマーカー、疾患関連遺伝子の探索方法、及び腎がんマーカー：特願2018-547766)を行った。またその方法を用いて探索同定したタンパクは血液中にがん患者特異的に検出され、血液バイオマーカーとしての臨床応用を目指して研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated extracellular vesicles (EVs) are intimately involved in establishment of tumor microenvironment and the occurrence of metastasis. Hence we extracted EVs directly from surgically resected viable clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) tissues and adjacent normal renal tissues. We obtained EVs directly from fresh clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) clinical specimens by an ultracentrifuge method. Obtained tissue-exudative EVs (Te-EVs) were analyzed by LC/MS/MS analysis. Quantitative LC/MS analysis identified 3,871 tissue-exudative EV (Te-EV) proteins, among which 106 proteins were highly enriched in tumor Te-EVs. Importantly, several cancer-specific proteins were also significantly higher in serum EVs from ccRCC patients compared to those from healthy donors. In summary, this is the first experimental record reporting extraction of EVs from viable human tissue samples (Te-EVs) and identification of a novel serum biomarker.

研究分野：泌尿器がん

キーワード：腎がん エクソソーム 血液バイオマーカー

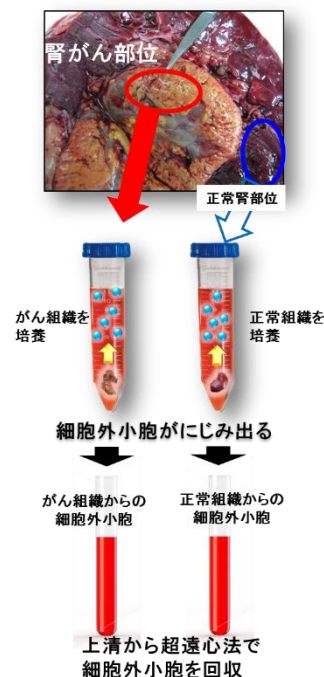
1. 研究開始当初の背景



分子標的療法が転移性腎細胞癌の標準治療となったが、奏効率は30%程度にすぎず、さらなる成績の改善が急務であり新規標的治療の開発が求められている。癌細胞は自らのタンパク質およびmiRNAなどをエクソソームと呼ばれる細胞外小胞体に封入して周囲および血液、尿中に分泌し(左図AB)、周囲の細胞をより浸潤、増殖しやすい環境に変化させたり(A)、血管などを通して転移先に到達し転移、進展し易い環境へと変化させる(B)ことによって癌の微小環境を制御していることが明らかになっている。このような癌細胞から分泌されるエクソソームに含まれる分子を癌の診断や治療効果判定に用いられるのではないかと期待されている。最近になって尿や血液中に存在するエクソソームが癌のバイオマーカーとして有用とされる報告がなされてきたが、臨床の場

で利用できるものはなかった。

癌由来のエクソソームは血液中にも存在するため、これを同定する試みが行われてきているが、正常人においても多くのエクソソームが存在することから、癌特異的エクソソームの単離および解析は困難を極める。そこで腎がん組織から分泌されるもののみを抽出することが画期的になると考え、腎がん組織および正常腎組織を別々に培養し、癌組織由来特異的エクソソームを得る方法の開発に成功した(ここでは Cultured Tissue-Derived Exosome, CTD エクソソームと呼ぶ)。本方法の革新的な特徴として①がん組織、正常組織特異的エクソソーム抽出が可能であること、②同一患者での癌および正常の比較解析が容易であることまた③他の癌種においても応用可能であることが挙げられる。



2. 研究の目的

腎がん特異的エクソソームに含まれるタンパク質を網羅的に解析することにより、腎がんの微小環境を制御し得るタンパクを同定し、それらを治療標的、血液バイオマーカーとして臨床応用することを目的とする。さらに同定したタンパクの機能解析を行うことによって転移、浸潤のメカニズムを解明することが期待される。

3. 研究の方法

- (1) われわれの開発した抽出方法によって得たものでエクソソーム(細胞外小胞)であることを確認  
(ナノトラッキング解析による粒子径測定, 透過型電子顕微鏡による形態確認, ウェスタンブロットによりエクソソーム特異的なタンパクの発現の確認により行った)
- (2) がん組織特異的に由来するエクソソームを用いた網羅的タンパク質解析による腎がん特異的エクソソーム内タンパクの同定  
(開発した新規方法によって得た癌組織培養由来エクソソームに特異的なタンパク質を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)を用いて網羅的に解析した)
- (3) 同定したタンパクの血清中検出による血液バイオマーカーとしての有用性の評価  
網羅的探索によって得られた複数の候補タンパクに対して血液バイオマーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

- (1) 以下の3つの方法によって開発した方法によって抽出されたものがエクソソーム(細胞外小胞であることを確認した。

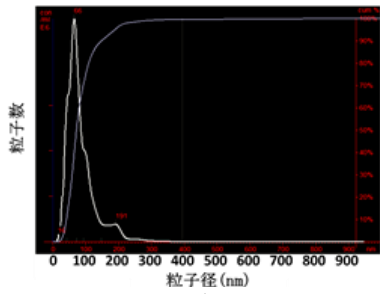


図1 ナノ粒子解析

組織から培養することによって得た細胞外小胞はエクソソームと定義される 200nm 以下の粒子が高濃度に抽出されていることが確認された。

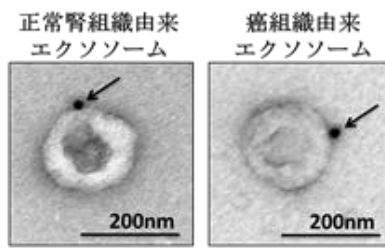


図2 透過型電子顕微鏡写真

粒子径の解析のみならず電子顕微鏡を用いた形態学的観察においても CD9 陽性エクソソームの存在が確認された (←; 金コロイド標識 CD9 抗体)

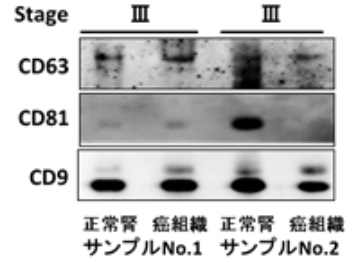
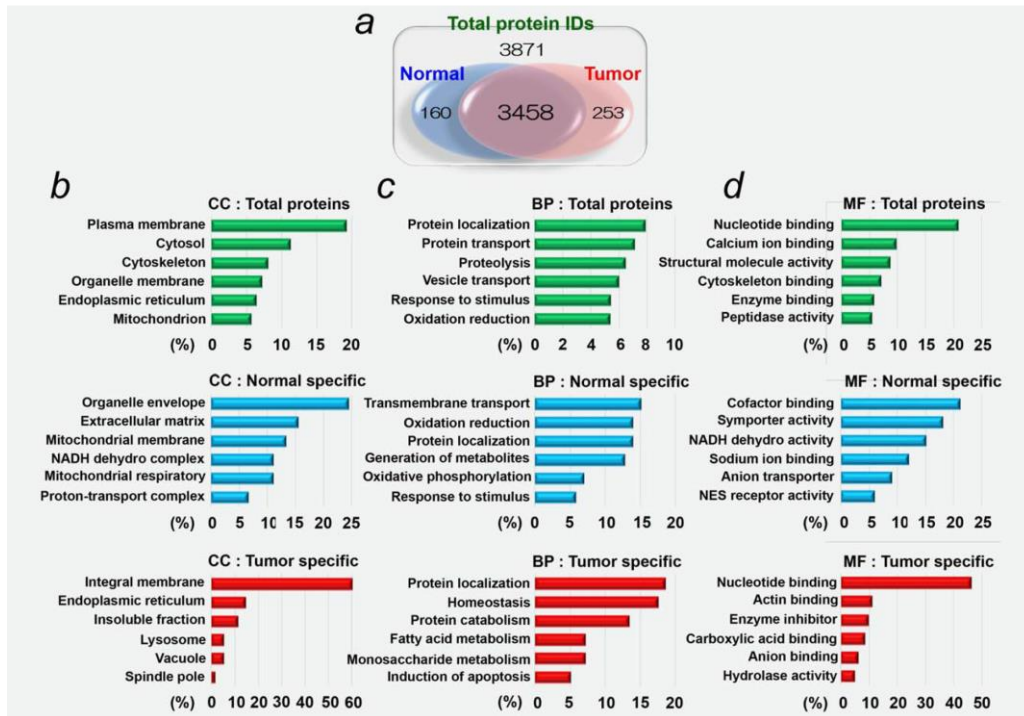


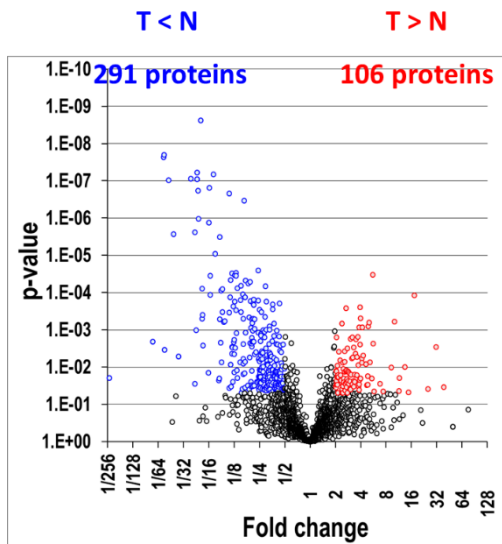
図3 Western blottingによるタンパクの発現解析

エクソソーム膜に特異的に発現を認めるとされるマーカータンパク (CD9, CD63, CD81)の発現を認める。

(2) 腎がん特異的エクソソームおよび正常腎組織由来エクソソームの質量分析による網羅的タンパク質解析の結果, 3871 種のタンパク質を同定した(a)。また細胞組成 CC, 生物学的プロセス BP, 分子学的機能 MF の観点から DAVID gene ontology 解析した結果を全タンパク, 正常由来, がん由来別に上位 6 位までを (b-d) に示した。



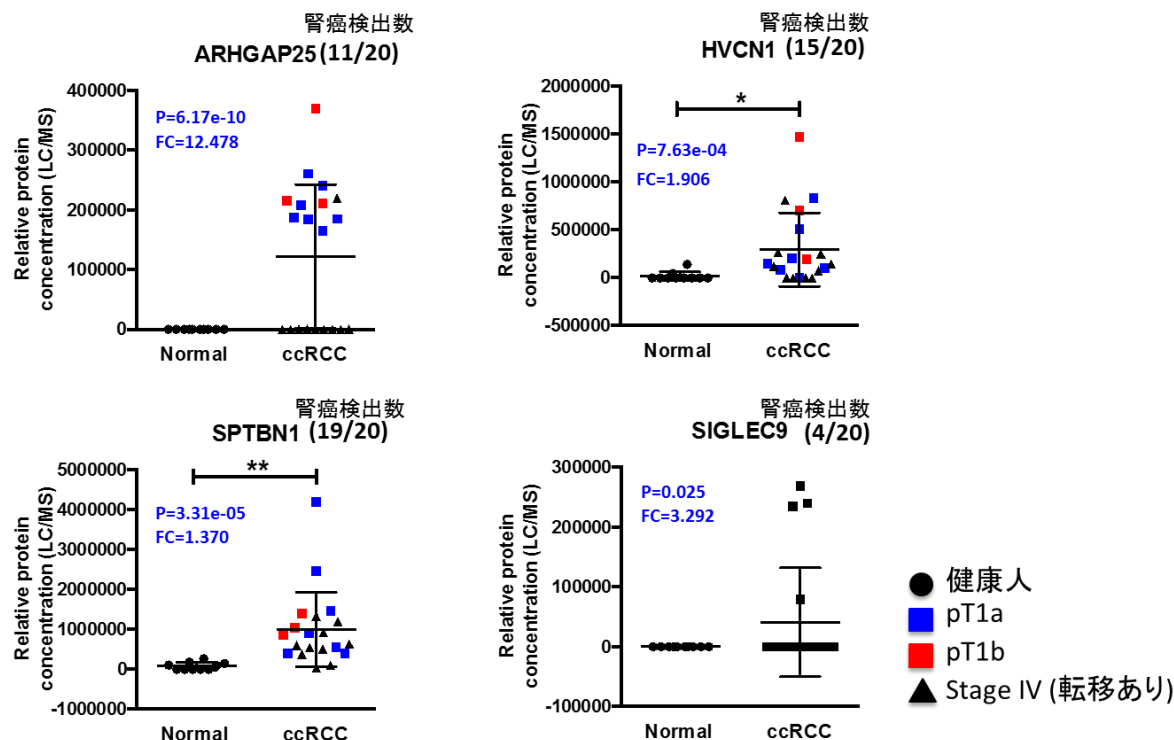
さらに, 以下にがん特異的タンパク質を同定するため, volcano プロットを作成した。これにより



Uniprot ID	Protein Description	P-Value	Effect Size
P46976	Glycogenin-1	3.44E-02	38.85
P20160	Azurocidin	2.85E-03	31.59
P09104	Gamma-enolase	3.85E-02	25.24
Q16790	Carbonic anhydrase 9	1.18E-04	17.35
Q96HE7	ERO1-like protein alpha	4.76E-02	14.83
A2PYH4	Probable ATP-dependent DNA helicase HFMI	9.98E-03	13.45
Q5VT79	Annexin A8-like protein 2	1.98E-02	11.53
P21964	Catechol O-methyltransferase	4.34E-02	11.41
O95210	Starch-binding domain-containing protein 1	6.03E-04	10.08
P20701	Integrin alpha-L	1.03E-02	9.2

前表の如く、腎がん特異的エクソソームタンパク質をリストアップできた。

(3) (2)の質量分析の結果, 得られた腎がん特異的候補タンパク質の中で, 血清での発現を SRM を用いて, 定量的に評価を行った。以下に血清バイオマーカー候補の一部を示す。これにより本新規手法によって血液バイオマーカーとなり得る候補タンパク質を同定しうることを証明できた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Jingushi K, Uemura M, Ohnishi N, Nakata W, Fujita K, Naito T, Fujii R, Saichi N, Nonomura N, Tsujikawa K, Ueda K. : Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin. Int J Cancer 142(3):607-617 2018 査読あり

〔学会発表〕 (計 2 件)

①植村元秀, 神宮司 健太郎, 加藤 大悟, 河嶋 厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 藤田 和利, 木内 寛, 今村 亮一, 植田 幸嗣, 辻川 和丈, 野々村 祝夫: 腎癌特異的細胞外小胞(エクソソーム)の新規解析手法の開発および癌特異的エクソソーム中 AZU1 の血液バイオマーカーへの臨床応用

第 106 回 日本泌尿器科学会総会 京都市 京都府 2018/4/20

②植村 元秀, 神宮司 健太郎, 藤田 和利, 野々村 祝夫, 辻川 和丈, 植田 幸嗣: 腫瘍別シンポジウム 1. 泌尿器科がん研究の最前線. 腎癌特異的細胞外小胞 (エクソソーム) の新規解析手法の開発と血液バイオマーカー探索および治療への臨床応用

第 76 回 日本癌学会学術集会 横浜市 神奈川県 2017/9/28

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: バイオマーカー, 疾患関連遺伝子の探索方法, 及び腎がんマーカー

発明者: 植田幸嗣, 大西なおみ, 野々村祝夫, 植村元秀, 藤田和利, 辻川和丈, 神宮司健太郎

権利者: 国立大学法人大阪大学・公益財団法人がん研究会

種類: 特許

番号: 特願 2018-547766

出願年：2019  
国内外の別：国内移行

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：野々村 祝夫  
ローマ字氏名：(NONOMURA, norio)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：30263263

研究分担者氏名：中田 渡  
ローマ字氏名：(NAKATA, wataru)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：招へい教員  
研究者番号（8桁）：30648019

研究分担者氏名：植村 元秀  
ローマ字氏名：(UEMURA, motohide)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：特任准教授（常勤）  
研究者番号（8桁）：40631015

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：辻川 和丈  
ローマ字氏名：(TSUJIKAWA, kazutake)

研究協力者氏名：神宮司 健太郎  
ローマ字氏名：(JINGUSHI, kentaro)

研究協力者氏名：植田 幸嗣  
ローマ字氏名：(UEDA, koji)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。