

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06846

研究課題名(和文)血液中エクソソームに着目した去勢抵抗性前立腺癌特異的タンパクの網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for castration-resistant prostate cancer-specific proteins in serum extracellular vesicles.

研究代表者

中野 剛佑 (Nakano, Kosuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00804410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨転移を有する前立腺癌患者の血清エクソソーム中のタンパクをLC-MS/MS法を用いて網羅的に解析し、未治療群、アンドロゲン除去療法(ADT)奏効群、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)群で比較を行った。CRPC群のみで特異的に高発現するタンパクは認めなかったが、CRPC群において未治療群と比較して有意に高発現するタンパクを6個、CRPC群においてADT奏効群と比較して有意に高発現するタンパクを1個同定した。今後は前立腺癌細胞株を用いてこれらのタンパクの機能解析を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対して近年、複数の新規薬剤が登場しているが、効果は限定的でありさらなる予後の改善が求められる。本研究では骨転移を有する前立腺癌患者の血清エクソソーム中のタンパクに着目し、CRPC群において未治療群やアンドロゲン除去療法(ADT)奏効群と比較して有意に上昇しているいくつかのタンパクを同定した。今後はこれらのタンパクの機能解析を行い、CRPCの新たな治療標的の探索を行う予定である。予後不良であるCRPCに対する新たな治療標的につながる研究として、本研究の学術的意義、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively analyzed proteins in serum exosomes of prostate cancer patients with bone metastasis using LC-MS/MS. Comparisons were made among untreated, androgen-deprivation therapy (ADT)-responsive, and castration-resistant prostate cancer (CRPC) groups. In the CRPC group alone, no protein was expressed at a high level. However, six proteins expressed at a significantly higher level in the CRPC group than in the untreated group and one protein expressed at a significantly higher level in the CRPC group than in the ADT response group were identified. In the future, the functional analysis of these proteins is scheduled using the prostatic cancer cell line.

研究分野：前立腺癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 エクソソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌(castration-resistant prostate cancer : CRPC)に対して新規抗アンドロゲン剤などが使用可能となったが、依然としてその予後は不良であり、新規治療の開発が急務である。細胞より分泌されるエクソソームは血液、尿、唾液、母乳などの体液に存在し、細胞間伝達に重要な役割を果たしている。近年、癌細胞由来のエクソソームが微小環境の制御により癌の進展に関与することが明らかになりつつある。体液中を循環するエクソソームに着目することは、低侵襲に癌細胞由来の情報が得られ、癌の進展に寄与するエクソソームそのものが治療標的となり得ることから、新規治療標的の探索に有望である。

CRPC の病変の多くは骨転移であり、低侵襲に十分量の組織を採取することが困難であるため、血液中を循環するエクソソームから直接、新規治療標的を見出す手法が有効であると考えられ、われわれは CRPC 患者血清のエクソソーム中のタンパクに着目し、解析を着手することに至った。

### 2. 研究の目的

去勢抵抗性前立腺癌患者の血清エクソソーム中のタンパクを網羅的に解析し、新規治療標的を同定すること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 前立腺癌患者血清からのエクソソームの回収

-80 保存血清からスクロースクッション超遠心法によりエクソソームを回収する。

エクソソームを、ウエスタンブロット法によるエクソソーム表面マーカータンパク発現の評価、ナノ粒子トラッキング解析(Nanosight)による粒子径・粒子数測定、免疫電子顕微鏡法による観察の3つの方法で確認する。

#### (2) 網羅的タンパク解析による CRPC 特異的エクソソームタンパクの同定

骨転移を有する前立腺癌患者 36 例(3 群: 未治療 stage D2 患者 8 例, アンドロゲン除去療法(androgen deprivation therapy : ADT)奏効中患者 8 例, CRPC 患者 20 例)を対象とする。

血清由来エクソソームを Tandem Mass Tag(TMT)標識 LC-MS/MS 法により網羅的にタンパク同定・定量する。

同定したタンパクの発現量を 3 群間で比較し、CRPC で有意に高発現するタンパクを新規治療標的候補として抽出する。

### 4. 研究成果

#### (1) 前立腺癌患者血清からのエクソソームの回収

超遠心法で前立腺癌患者血清中からエクソソームを回収しウエスタンブロット法でエクソソーム表面マーカーである CD9, CD63 を確認した(図 1)。

ナノトラッキング解析によりエクソソームに相当する 200nm 以下の粒子を確認した(図 2)。

抗 CD9 抗体、金コロイド標識二次抗体を反応させ、表面に CD9 を発現する 200nm 以下の小胞を免疫電子顕微鏡法で確認した(図 3)。

図 1 <粒子径・粒子数の測定>

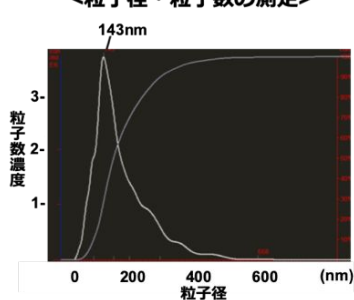


図 2 <エクソソーム表面マーカータンパクの発現>

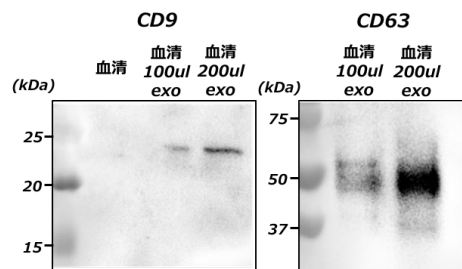
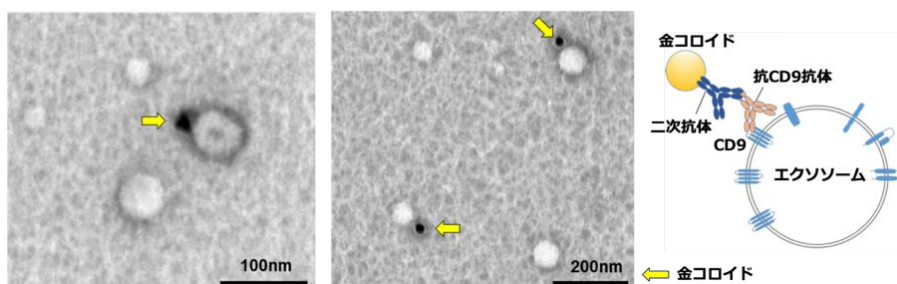


図 3

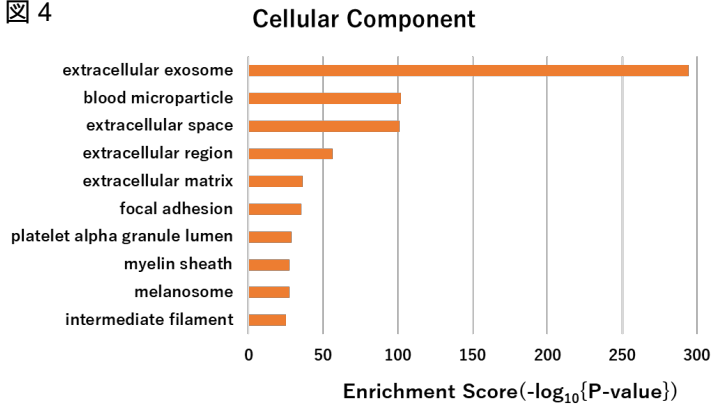
<免疫電子顕微鏡法によるエクソソームの観察>



(2) 網羅的タンパク解析による CRPC 特異的エクソソームタンパクの同定

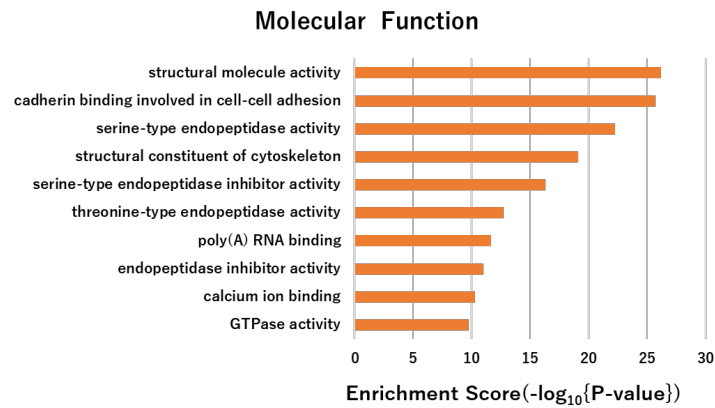
TMT 標識 LC-MS/MS 法により 36 例の骨転移を有する前立腺癌患者血清エクソソームから 823 のタンパクを同定した。同定された 823 タンパクにつき、DAVID 6.7 を用いて Gene Ontology 解析を行った。Cellular Component においては extracellular exosome が最も enrich されており、exosome の精製が十分になされていると考えられた (図 4)。Molecular Function においては細胞間接着に関連する遺伝子等が enrich されていた (図 5)。

図 4



823 タンパク中、全例で定量可能であったのは 429 タンパク、半数(18 例)以上の症例で定量可能であったものは 678 タンパクであった。同定された 823 タンパクについて、未治療 stage D2 群、ADT 奏効群、CRPC 群の 3 群間における比較を行った。当初、CRPC のみで特異的に高発現するタンパクに注目する予定であったが、ADT 奏効群と CRPC 群で比較し、CRPC 群で有意に高発現する (p<0.05)、あるいは高発現する傾向のある (p<0.1) exosome 内包タンパクは 1 つも認めなかった。未治療群と CRPC 群の比較においては CRPC 群で有意に高発現 (adjusted P-value < 0.05 かつ Fold change > 1.5) する 6 個のタンパクを同定した (図 6)。

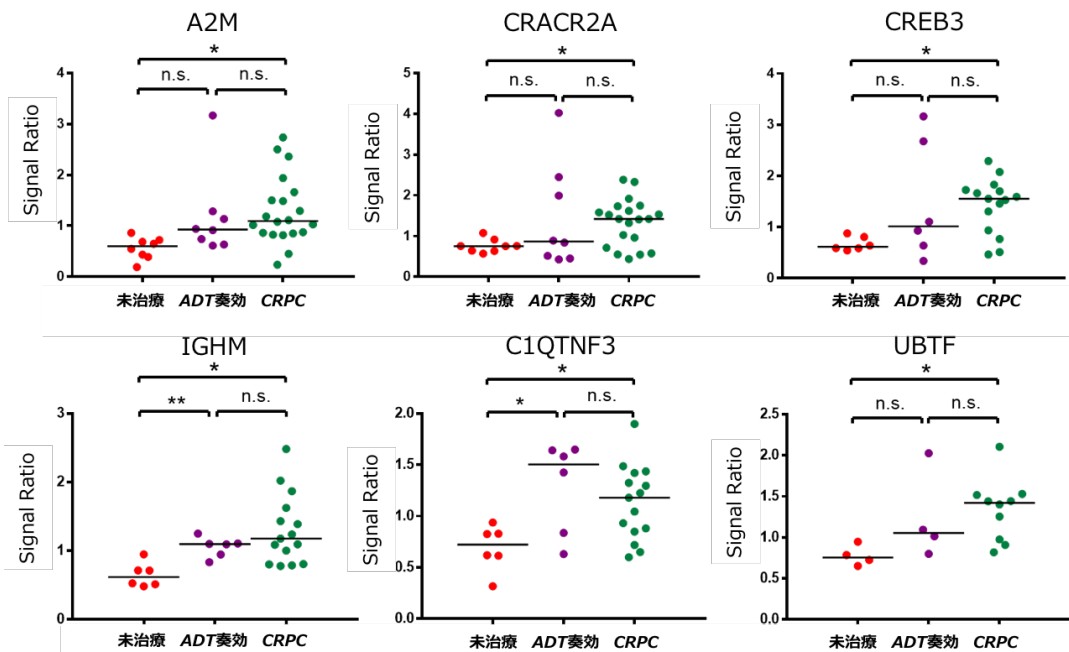
図 5



エクソソーム中存在することが既報の分泌タンパク (A2M, C1QTNF3) や膜タンパク (IGHM) の他に、エクソソーム中存在することが知られていない転写因子 (CREB3, UBTF) が含まれていた。

図 6

CRPCで有意に高発現するエクソソームタンパク



t-test, Bonferroni correction \* adjusted p value < 0.05, \*\* adjusted p value < 0.01, n.s. not significant

今後、前立腺癌細胞株を用いてこれらのタンパクの機能解析を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

中野剛佑, 植村元秀, 洪陽子, 松下慎, 林裕次郎, 王聡, 山本致之, 加藤大悟, 河嶋厚成, 氏家剛, 永原啓, 藤田和利, 野々村祝夫. 上部尿路上皮癌における血中遊離 DNA の血液バイオマーカーへの臨床応用 第 107 回日本泌尿器科学会総会 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。