

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10560

研究課題名(和文) CEACAM1を標的とした大腸癌新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy for colon cancer targeting CEACAM1

研究代表者

横山 省三 (Yokoyama, Shozo)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90398462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血清exosomal CEACAM1測定はCEAの測定と同様に、凍結血清を25℃で融解、exosome再溶解を5倍に濃縮、1% bovine serum albumin (BSA)に溶解することでELISAにて測定可能となった。血清中のCEACAM1とexosomal CEACAM1の割合が、Stage I, II, IIIの症例の0.004%～9%に対しStage IVの症例は7.8%～45.4%であった。血清exosomal CEACAM1が遠隔転移を有する病期で血清での割合が上昇することは、exosomal CEACAM1が転移を有する病期において何らかの作用を有している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は他の細胞との接着によりシグナルを交換しあうことが知られている。血清エクソソーム内に存在する細胞膜たんぱく質により、エクソソームと細胞の接着により、細胞と細胞との接着のような何らかのシグナルを伝達する可能性がある。その生物活性がある分子の1つとしてエクソソーム内のCEACAM1の測定法を確立し、臨床検体で測定したことに学術的意義ある。社会的意義としては、大腸癌患者の血清中の生物活性のある膜たんぱく質を有するエクソソームが明らかになることで癌患者に効果のある診断法、治療法の開発への礎となる。

研究成果の概要(英文)：Implication of exosomal carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1 (CEACAM1) in patients with colorectal cancer remains to be investigated. We optimized a method for assessment of serum exosomal CEACAM1. Whole blood samples were collected from patients during surgery. Exosomes were isolated using the ExoQuick reagent, solubilized in an assay buffer and subjected to CEACAM1 detection by ELISA. A five-fold increase in the concentration of the exosomes in the assay buffer and the addition of bovine serum albumin (BSA) for measurements of the serum exosomal CEACAM1. The thawing temperature of frozen serum samples before exosome extraction was 25°C. The ratio between serum CEACAM1 and serum exosomal CEACAM1 increased in Stage IV colorectal cancer. Serum exosomal CEACAM1 may have some biological activity in colorectal cancer patients with distant metastasis.

研究分野：外科学

キーワード：CEACAM1 exosome colorectal cancer serum

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは大腸癌の浸潤および分化誘導に関係する分子として、CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)に着目しその浸潤転移への関与および分化誘導能およびがん幹細胞特性の誘導について検討してきた。CEACAM1は上皮細胞や血球系細胞、血管内皮細胞に発現するI型膜貫通型糖蛋白でありImmunoglobulin super familyおよびCEA familyに属する接着分子である。3個または4個の細胞外ドメインとlong isoform (CEACAM1-L)またはshort isoform (CEACAM1-S)の細胞内ドメインを有する。CEACAM1-Lの細胞内ドメインにはimmunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)を有しており、細胞に対し抑制的に機能すると考えられている。近年、CEACAM1がimmune check point 蛋白であるTIM-3(Huang YH et al: *Nature* 2015), PD-1に関与することが報告されている。大腸癌において、これまでわれわれは、CEACAM1が進行大腸癌において浸潤先進部で再発現すること、CEACAM1の発現により浸潤・遊走能が促進されることを明らかにした(Ieda J, Yokoyama S et al: *Int J Cancer* 2011)。また、大腸癌発育先進部間質に中空を伴う球体(3次元培養やマウスモデルで観察検討されている間葉上皮転換)を発見し、CEACAM1の発現はlumen formationを誘導し大腸癌の転移や予後に相関すること(Tamura K, Yokoyama S et al: *BMJ open* 2011)。肝転移巣においてCEACAM1の発現が増加していることを確認した。CEACAM1は多彩な機能を有しており、その機能は、CEACAM1細胞内ドメインバランスにより調整されている。これまでに、CEACAM1の細胞内ドメイン isoform balanceにおいてCEACAM1 long cytoplasmic domain isoform balance dominanceが大腸癌の悪性度と相関することを報告してきたが、元来CEACAM1は細胞にsuppressiveに作用することが知られており、大腸癌の原発巣および転移巣で発現していることが大腸癌増殖の緩慢性に影響を及ぼしている可能性がある。exosomal CEACAM1は細胞外ドメインのみの分泌型と比べ、分子がfull sequenceであることからより効果的な細胞生物活性を引き起こす可能性がある。

### 2. 研究の目的

われわれは大腸癌におけるCEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)の検討から大腸癌の浸潤・転移にCEACAM1細胞内ドメイン isoform balanceが重要であり、大腸癌の転移、予後と相関することを明らかにした。癌細胞が培養液や血清中に分泌するのは、CEACAM1の切断された細胞外ドメインであるため、細胞内ドメインを含むfull sequenceで血液中に存在するCEACAM1をとらえることは困難であった。近年、血清中の40~100 nmのリン脂質膜を有する膜小胞 exosome が診断の新しいツールとして注目されている。exosomeは癌細胞のリン脂質2重膜から構成されることから、癌細胞が分泌するexosomeに膜貫通型分子であるCEACAM1の細胞内ドメインが含まれた形で血中を循環していることが推測される。本研究では、癌細胞が分泌するexosomeのリン脂質2重膜上のCEACAM1およびCEA family (CEACAM5, CEACAM6)による新規大腸癌腫瘍マーカーを開発することを目的とする。近年、血清中の40~150 nmのリン脂質膜を有する膜小胞 exosome が診断・治療の新しいツールとして注目されている。しかしながら、これまで、exosome上の膜蛋白を簡便に測定する方法が確立されておらず、基礎研究および臨床研究においてexosome上の膜蛋白はバイオマーカーとしての期待があるにも関わらず、検討できない状況であった。われわれは、血中 exosome に存在する膜蛋白のEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)による測定法を新たに開発し、特許を出願した(特許2016-158985)。この方法で、現在注目されているexosome上のさまざまな膜蛋白について臨床での測定が可能となった。本研究では細胞機能抑制機能を有するCEACAM1による臨床における免疫機能への関わりを解明し、診断法・治療法の開発のため、癌細胞が分泌するexosomeのリン脂質2重膜上のCEACAM1の大腸癌患者における体内動態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

症例は和歌山県立医科大学第2外科にて手術を施行した大腸癌患者を対象とした。手術中に全血7mlを採取し、血清分離試験管に入れ1000g, 10分, 4にて遠心し血清を分離した。分離した血清を250µlづつ eppenndolf tubeにわけ-20にて測定まで凍結保存した。凍結した血清を25で30分間で融解した。Exosomeの抽出は製造メーカによる取扱説明書にそって行った。63µlのExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (System Bioscience, Palo Alto, CA, USA)を融解した250µlの血清に添加し、室温で30分間インキュベートした後1500g, 30分, 4で遠心し、上清を吸引除去しexosome pelletを得た。exosome pelletの再溶解は1% bovine serum albumin (BSA)に溶解し、Human CEACAM-1 DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN)を血清CEACAM1および血清 exosomal CEACAM1の測定に使用した。上記のサンプル調整について下記の検討の結果より設定した。

#### 凍結血清検体の融解温度による測定値変化：血清 exosomal CEAでの検討

手術を施行した大腸癌患者8例を対象とした。同一患者から採取した凍結血清を4, 25 または36で30分間で融解した。63µlのExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (System Bioscience, Palo Alto, CA, USA)を融解した250µlの血清に添加し、室温で30分間インキュベートした後、1500g, 30分, 4で遠心し、上清を吸引除去し、exosome pelletを得た。exosomeの定量にEXOCET Exosome Quantitation Kit (System Bioscience, Palo Alto, CA, USA)を使用した。exosomal CEAの測定においてexosome pelletの再溶解は50µl

の 1%BSA に溶解し、また CEA (human) ELISA kit (abnova, Taipei city, Taiwan) にて exosomal CEA を測定した結果、25 が適切な温度であった。

#### 濃度と溶解液による測定値変化：血清 exosomal CEA での検討

手術を施行した大腸癌患者 8 例を対象とした。凍結した血清は 25 で 30 分間で融解した。63  $\mu$ l の ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (System Bioscience, Palo Alto, CA, USA) を溶解した 250  $\mu$ l の血清に添加し、室温で 30 分間インキュベートした後、1500g, 30 分, 4 で遠心し上清を吸引除去し、exosome pellet を得た。同一患者からの exosome pellet の再溶解は 250  $\mu$ l (1x) or 50  $\mu$ l (5x) の MilliQ 水または 250  $\mu$ l (1x) or 50  $\mu$ l (5x) 1%BSA に溶解し、exosomal CEA を CEA (human) ELISA kit (abnova, Taipei city, Taiwan) にて測定した結果、50  $\mu$ l (5x) 1%BSA に溶解することが適切な方法であった。

#### 4 . 研究成果

Exosomal CEACAM5 の測定と同様に、凍結血清を 25 で融解、exosome pellet の再溶解を 5 倍になるよう濃縮、1% bovine serum albumin (BSA) に溶解することで血清 exosomal CEACAM1 も測定可能となった。血清中 exosomal CEACAM1 が遠隔転移を有する病期の Stage IV において著明に上昇することを確認し、血清中の CEACAM1 と比較し exosomal CEACAM1 の割合が、病期が I ~ III の症例が 0.004% ~ 9% に対し Stage IV の症例は 7.8% ~ 45.4% 上昇していることを確認した。また、血清 CEACAM1 は術後一旦減少したあと、再発大腸癌において上昇を認めなかった。血清中 exosomal CEACAM1 が遠隔転移を有する病期である Stage IV においてその血清での量および割合が上昇すること、再発による腫瘍量の増大と血清 CEACAM1 値が相関しないことから、転移を有する病期において何らかの宿主の反応を反映している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Yokoyama S, Takeuchi A, Yamaguchi S, Mitani Y, Watanabe T, Matsuda K, Hotta T, Shively JE, Yamaue H.              | 4. 巻<br>12             |
| 2. 論文標題<br>Clinical implications of carcinoembryonic antigen distribution in serum exosomal fraction- Measurement by ELISA. | 5. 発行年<br>2017年        |
| 3. 雑誌名<br>PLoS One  | 6. 最初と最後の頁<br>e0183337 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0183337.  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>該当する           |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yamaguchi S, Yokoyama S, Ueno M, Hayami S, Mitani Y, Takeuchi A, Shively JE, Yamaue H.    | 4. 巻<br>220           |
| 2. 論文標題<br>CEACAM1 is associated with recurrence after hepatectomy for colorectal liver metastasis. | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Surgical Research  | 6. 最初と最後の頁<br>353-362 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jss.2017.07.035.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する          |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>横山省三   |
| 2. 発表標題<br>Diagnosis of distant metastasis in colorectal cancer by carcinoembryonic antigen distribution in serum exosomal fraction |
| 3. 学会等名<br>日本がん転移学会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>横山省三   |
| 2. 発表標題<br>Clinical implications of CEA in serum exosomal fraction of patients with colorectal cancer |
| 3. 学会等名<br>日本癌学会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>横山省三、松田健司、竹内昭博、渡邊高士、田村耕一、岩本博光、水本有紀、中村有貴、村上大輔、岡田健一、尾島敏康、上野昌樹、中森幹人、山上裕機   |
| 2. 発表標題<br>血清exosomal CEAによる大腸癌遠隔転移診断 血清CEAとの比較 . Diagnosis of colorectal cancer with distant metastasis by using serum exosomal CEA |
| 3. 学会等名<br>日本外科学会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shozo Yokoyama, Akihiro Takeuchi, Junji Ieda, Koichi Tamura, Shigehisa Kiriya, Naoyuki Yamamoto, Yasuyuki Mitani, John E. Shively and Hiroki Yamaue |
| 2. 発表標題<br>CEACAM1 expression and its cytoplasmic isoform balance in gastrointestinal cancer.  |
| 3. 学会等名<br>The 27th Annual International CEA Symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 山上 裕機<br><br>(Yamaue Hiroki)<br><br>(20191190) | 和歌山県立医科大学・医学部・教授<br><br><br><br>(24701)    |    |
| 研究分担者 | 松田 健司<br><br>(Matsuda Kenji)<br><br>(30398458) | 和歌山県立医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(24701)    |    |
| 研究分担者 | 堀田 司<br><br>(Hotta Tsukasa)<br><br>(50244744)  | 和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員<br><br><br><br>(24701) |    |