

令和元年5月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16788

研究課題名(和文)尿路上皮癌由来尿中エクソソームにおける網羅的タンパク解析および新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Discovery of novel urinary biomarker of bladder cancer by proteomic analysis of urinary and tissue-exudative exosomes.

研究代表者

松崎 恭介 (Matsuzaki, Kyosuke)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90747081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：健常者4例、膀胱癌患者7例の尿から超遠心法でエクソソームを回収し、また同癌患者の癌組織を浸した培養液から癌組織分泌エクソソームも回収した。これらに含まれるタンパクを質量分析器で測定し、癌組織分泌エクソソームに含まれ、癌患者の尿中でのみ発現が見られたCLD4を同定した。CLD4の発現量を健常者30例、膀胱癌患者40例の別コホートの尿中エクソソームで検証すると、癌患者の尿中エクソソームで有意に上昇しており、CLD4を用いた癌診断能はAUC=0.845(感度72.5%、特異度86.7%)であり、その診断能は尿細胞診よりも良好であった(Youden's index 0.592 vs 0.475)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、膀胱癌患者の尿中エクソソームに加え、癌組織から分泌される癌特異的エクソソームを同時に解析することで、より癌特異度の高いエクソソームを同定することができ、結果としてより有用なバイオマーカーを探索、同定することができた。このCLD4は膀胱癌のスクリーニングとして用いるだけでなく、癌組織から分泌されていることより、エクソソームを介して微小環境(microenvironment)を制御している可能性もあり、これを阻害することで新規治療薬の開発に直結する可能性もあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles(EVs) were isolated from urine from 7 bladder cancer (BC) patients and 4 healthy controls(HC) by ultracentrifugation. We also extracted EVs directly from surgically resected viable BC tissues(tissue exudative EV; Te-EVs). EVs protein were labeled with TMT and analyzed by LC-MS/MS. We identified 1960 proteins in urinary EVs and 1538 proteins in Te-EV, among which CLD4 was detected in urine of only BC patients and was also enriched in Te-EV. CLD4 in urinary EVs was verified in 70 independent urine samples(BC[n=40], HV[n=30]) using SRM/MRM. CLD4 in urinary EVs was significantly higher in BC group than in HC group (fold-change=9.82, p-value) and was significantly associated with pT stage (p-value for trend <0.0001). The AUC was 0.845, and the sensitivity and specificity of the model at the best cutoff value were 72.5% and 86.7%, respectively. The diagnostic performance of CLD4 was better than that of urine cytology ((Youden's index 0.592 vs 0.475).

研究分野：尿路癌

キーワード：エクソソーム 膀胱癌 尿 バイオマーカー proteomics

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

1. 研究開始当初の背景

進行した尿路上皮癌は予後が悪く、この10年予後の改善を認めていない。しかし早期に発見された場合は手術による根治が見込まれるため早期発見早期治療が重要であり、また進行癌に対しての新規の治療薬開発も望まれる。近年、癌細胞が自らのタンパクをエクソソームと呼ばれる小胞体に封入し血液、尿中に分泌し、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、血管などを通して転移部位に到達し、癌細胞が転移、進展し易い環境へと変化させることが明らかになってきた。癌細胞から分泌されているエクソソームは、癌細胞に由来するいくつかのタンパクや miRNA、mRNA などを含んでいることから癌の診断や治療効果判定に用いることができるかと期待されている。また癌細胞は分泌するエクソソームによって細胞自身の増殖を促進するのみならず、線維芽細胞の活性化や血管新生の誘導など癌促進的な局所性環境へと変化させる作用を持ち、さらに転移に適した微小環境の形成以外にも免疫抑制状態の誘導など全身性環境も癌細胞に有利な方向へと変化をさせる作用などを持つことが報告されている。そのため癌細胞が分泌するエクソソームを検出することは癌の状態を知るためのバイオマーカーになるだけでなく、治療標的にもなり得るものと考えられている。申請者らはこれまでに、尿路上皮癌由来の尿中エクソソームに含まれる miRNA に着目し、これを選択的に抽出することによって尿細胞診陰性の尿路上皮癌を診断できることを報告してきた(第75回日本癌学会学術総会)。しかし臨床応用に向けて ELISA などのより簡便な検査で測定できる因子が望まれており、我々は新たに尿路上皮癌特異的エクソソーム中のタンパクに着目した。

またエクソソームは正常組織からも分泌されるため、尿中に含まれるエクソソームは癌組織由来以外に正常組織由来のものも含まれ、網羅的解析には注意を要する。申請者らは、手術検体の癌組織を特殊な条件で培養することで、癌組織から直接分泌される癌特異的エクソソームを抽出できることを明らかにした(第75回日本癌学会学術総会)。尿路上皮癌患者の尿中エクソソームに加え、癌組織から分泌される癌特異的エクソソームを同時に解析することで、特異度の高いエクソソームを同定し、より有用なバイオマーカーが探索できると考えられる。尿路上皮癌のスクリーニングとして、あるいは予後不良とされている浸潤性尿路上皮癌患者の治療選択、治療効果判定に用いることのできる尿中に分泌されるタンパクを同定しその検出、定量を行う。さらに微小環境(microenvironment)を制御する癌細胞特異的エクソソームに含まれるタンパクを阻害することは新規治療薬の開発に直結するものと考え、今回の申請に至った。

2. 研究の目的

- (1) 尿路上皮癌患者の尿からエクソソームを抽出し、尿路上皮癌特異的エクソソームに選択的に含まれるタンパクを質量分析法を用いて、網羅的に解析を行う。
- (2) 手術検体で得られた尿路上皮癌組織の分泌する癌由来エクソソームを抽出し、尿路上皮癌特異的エクソソームに含まれるタンパクを質量分析法を用いて解析する。
- (3) 1 および 2 の解析結果から候補となる尿路上皮癌特異的エクソソームタンパクを同定し、多検体を用いてバイオマーカーとなることを検証する。

3. 研究の方法

健常者4例、膀胱癌患者7例(表在癌3例、浸潤癌4例)の尿から超遠心法でエクソソームを回収し、また同癌患者の手術検体の癌組織を直接培養液に2時間浸し、その培養液を超遠心することで癌組織が直接分泌するエクソソームも回収した。これらのエクソソームを TMT ラベル質量分析で、尿中エクソソーム内の癌特異的タンパクを同定する。同定されたタンパクを別のコホートでも検証し、バイオマーカーとしての有用性を検証する。

4. 研究成果

尿中エクソソームからは計 1960 タンパク、癌組織エクソソームからは計 1538 タンパクを同定した。癌患者の尿中エクソソームで上昇(Fold-change>2.0、 $p<0.1$)しており、かつ膀胱癌組織分泌エクソソームでも同定されたタンパクは 55 個認め、このうち CLD4 は癌患者の尿中でのみ発現が見られたタンパクであった。これを別のコホートでも検証した。健常者 30 例、膀胱癌患者 70 例(表在癌 20 例、浸潤癌 20 例)の尿から超遠心法でエクソソームを回収し、SRM 質量分析にて CLD4 の発現量を測定した。CLD4 は癌患者の尿中エクソソームで有意に上昇($p<0.01$)しており(図 1)、CLD4 を用いた癌診断能は AUC=0.845。感度 72.5%、特異度 86.7%であった(図 2)。また癌診断能は尿細胞診よりも良好であった(Youden's index 0.592 vs 0.475)。

図1. (1)健常者および癌患者の尿中エクソソーム内CLD4発現量
(2)健常者、表在癌(pTa)、浸潤癌(\geq pT2)の尿中エクソソーム内CLD4発現量

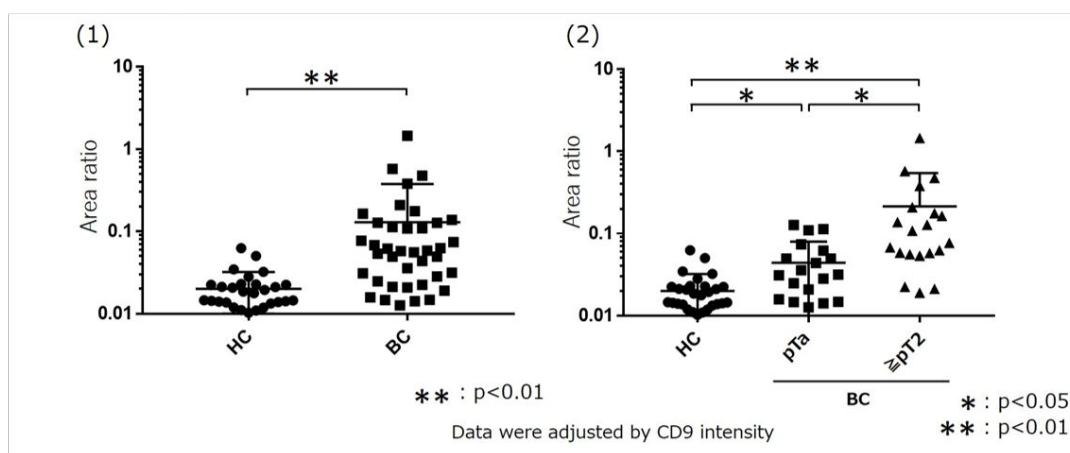
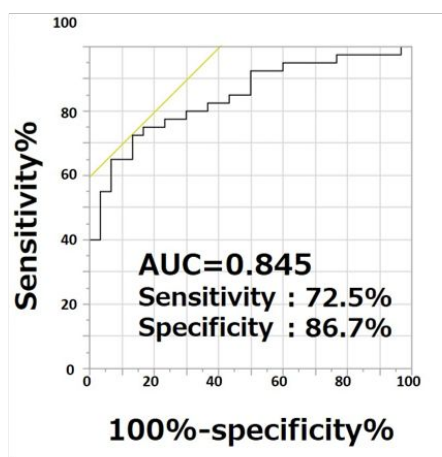


図2. 尿中エクソソーム内CLD4を用いた膀胱癌診断のROC曲線解析



5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Kyosuke Matsuzaki, Kazutoshi Fujita, Takashi Shiromizu, Ryohei Narumi, Yujiro Hayashi, Kentaro Jingushi, Taigo Kato, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Motohide Uemura, Takeshi Tomonaga and Norio Nonomura : Discovery of novel urinary biomarker of bladder cancer by proteomic analysis of urinary and tissue-exudative exosomes. The 16th Urological Association of Asia (UAA) Congress 2018、京都、2018年4月。

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 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 件)

出願状況(計 1 件)

名称：膀胱癌の尿中バイオマーカーの開発
発明者：藤田 和利 (共同発明者 松崎 恭介)
権利者：同上
種類：知的財産
番号：K20180172
出願年：2018 年
国内外の別： 国内
〔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。