

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16977

研究課題名(和文)胆汁中細胞外小胞における分離法の確立と胆道癌診断の新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Establishment of isolation method in extracellular vesicles in human bile and search for novel biomarkers for cholangiocarcinoma diagnosis

研究代表者

池田 千咲 (IKEDA, CHISAKI)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60795706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌は予後不良な難治性癌であるが、病理学的診断困難例が多く存在する。細胞外小胞(EV)は様々な細胞から分泌されており、癌の新規バイオマーカーとして注目されている。胆汁中EVには胆道疾患に特異性が高いバイオマーカーが存在し、癌の早期発見に寄与するのではないかと考えた。そこで胆管癌における胆汁中EVを用いた新規バイオマーカーの探索を行った。第一に課題とされてきた高純度のEV分離を可能にする方法を確立した。また胆管癌と胆管結石症の2群間におけるプロテオーム解析により、胆管癌診断に有用な候補蛋白質を検出した。候補蛋白質をELISA kitで測定し、胆管癌診断マーカーとしての有用性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌は予後不良な難治性癌であるが、胆汁細胞診や生検組織での病理学的診断困難例が多く存在する。細胞外小胞はさまざまな体液中に存在する細胞間コミュニケーションツールであり、癌の診断マーカーとしても注目されている。本検討ではヒト胆汁中の細胞外小胞の高純度な単離法を確立し、診断マーカー検索のターゲットとして有用である可能性を示した。またそれらが有する蛋白質について、診断マーカーとしての有用性を示した。これらの候補因子により、胆管癌の早期診断が可能となり、早期治療介入、予後改善へ貢献される事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although cholangiocarcinoma (CCA) has a poor prognosis, there are many cases in which definitive diagnosis is difficult. Extracellular vesicles (EVs) are secreted by various cells and are attracting attention as new biomarkers of cancer. We thought that bile EV has biomarkers that are highly specific to biliary tract diseases, and may contribute to the early detection of cancer. Therefore, we searched for a novel biomarker of CCA using EV in human bile.

研究分野：消化器内科

キーワード：細胞外小胞 ヒト胆汁 胆管癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞 Extracellular vesicle(EV)は癌細胞を含む様々な細胞から分泌されており、癌の新規バイオマーカーとして注目されている^{1,2)}。しかし血液などの循環体液中のEVは、体内で起こるすべての病態生理学的変化を反映し、同時に存在している他疾患の影響を受ける可能性がある³⁾。胆道癌は予後不良な難治性癌であるが、病理学的確定診断に至らない症例が多く存在する⁴⁾。我々は胆道癌と直に接触している非循環体液である胆汁中のEVには胆道疾患に特異性が高いバイオマーカーが存在し、癌の早期発見に寄与できるのではないかと考えた。しかし、実際に胆汁からEVを採取する際には、黄疸の程度や期間、炎症などにより粘度が大きくばらつき、ヒト体液中の多くの夾雑物が存在するため高純度なEV採取に難渋する。そのためこれまでに胆管癌におけるヒト胆汁由来EVに関する研究はほとんど報告されていない。そのためEVの新規バイオマーカーの探索には高純度EV採取法の確率が必要と考えられた。

夾雑物の効率的な除去については、キレート剤(EDEG)の有用性がすでに報告されており⁵⁾、このキレート剤を胆汁由来EV採取にも応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は胆汁からの高純度EV分離法の確立、胆汁中EVの胆道癌新規バイオマーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

対象症例；

胆管癌が疑われた症例のうち、精査もしくは減黄目的に内視鏡的胆管造影検査(ERCP)が行われた10例を対象とした。またコントロールとして総胆管結石症(stone)にて内視鏡的治療を要した10例を対象とした。胆管癌の病理学的検査では胆汁細胞診、内視鏡下胆管生検、もしくは手術標本を用いて病理専門医2人によって診断された。

胆汁はドレナージ目的に留置された経鼻胆道ドレナージチューブ(NBD; QuickPlace 6Fr, Olympus, Tokyo, Japan)より氷冷下で採取した。採取後は直ちに分注し-80で保存した。

検証コホートとして胆管癌8例、胆管結石症8例を対象とした。

EV分離；

胆汁400 μ Lに同量のキレート剤EDEGもしくはPhosphate-buffered saline (PBS)を加え希釈し、高速遠心、希釈を行った。さらに0.22 μ mのフィルター(Millipore, MA, USA)でろ過し超遠心(Himac, Koki Holdings, Tokyo, Japan Rotor S52ST-212)を行った。EDEGもしくはPBSでペレットを懸濁し再度超遠心を行った。ペレットは使用するまで4で保存した。

EV、質的評価；

透過型電子顕微鏡検査(TEM)にてEVにおける典型的なサイズと形態を確認した。またEV発現タンパクであるCD9、ALIX、Flotillin-2の発現をWestern blotで評価した。さらにナノ粒子トラッキング解析にて小胞のサイズと粒子数を測定した。

EV内包RNA抽出と評価；

EVサンプル200 μ LよりmiRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、プロトコール通りにRNAを抽出した。

RNA濃度はQubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)でmicroRNA assay kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。

またAgilent2100 bioanalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)でsmall RNA kit(Agilent Technologies)を用いてRNAの質を評価した。

プロテオーム解析；

既報と同様にして⁵⁾液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)(Thermo Fisher Scientific)にて分離後、Q Exactive(Thermo Fisher Scientific)によって検出した。Proteome Discovererを用いてラベルフリー定量(LFQ)を行った。

ELISA；

検証コホートにおいて、Claudin-3(CLDN3)、Leucyl-tRNA ligase, cytoplasmic (LARS)、FAS-associated factor 2 (FAF2)、Ras related protein Rab-20 (RAB20)濃度をELISAにて測

定した。それぞれプレートリーダー (Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad) を使用して、UV 吸収を 450 nm で 5 分以内に測定した。

免疫染色；

胆管癌の手術症例において、Claudin-3 antibody (abcam, MA, Cambridge, UK) を使用して免疫組織化学を行った。各標本の CLDN3 免疫染色スコアは病理学者によって評価され、染色強度 (0 - 3) と陽性細胞比率 (0 - 4) による積として算出した。染色強度は、0 (none)、1 (weak)、2 (moderate)、3 (strong) とした。腫瘍細胞染色のパーセンテージは、0 (<1%)、1 (> 0-25%)、2 (> 25-50%)、3 (> 50-75%)、4 (> 75-100%) とした。

4. 研究成果

ヒト胆汁由来 EV 分離；

我々の分離法にて採取された EV は、PBS 群、EDEG 群ともに TEM による可視化で直径 40-100 nm のサイズの典型的な円形、カップ型として確認できた。また Western blot ではエクソソームマーカーとされる CD9、ALIX、Flotillin-2 が検出された。Nanosight では粒子数平均は PBS 群で 1.92×10^{12} 、EDEG 群で 1.93×10^{12} と変わらなかったが、粒子径のピークの平均は PBS 群で 82.4 nm、EDEG 群で 78.9 nm と EDEG 群でより小粒子を分離できた。

RNA 定量と品質；

胆汁由来 EV から抽出した RNA 濃度は、PBS 群と比較し EDEG 群で高値であり有意差を認めた (PBS 群 2.32 ± 2.14 ng/ μ L、EDEG 群 4.56 ± 2.31 ng/ μ L、p 値= 0.0429)。また Bioanalyzer を用いて small RNA 中の miR の割合を比較したところ、PBS 群より EDEG 群で高かった (PBS 群 84%、EDEG 群 97%)。

プロテオーム解析；

胆管癌症例の胆汁より PBS と EDEG を用いて EV を抽出し、それぞれプロテオーム解析した。PBS と EDEG の両群で同定された蛋白質のうち、各蛋白質の検出強度を比較したところ、EDEG 群において夾雑物とされる血清 Albumin や Immunoglobulin が減少していた。

胆管癌と胆管結石症におけるプロテオーム解析；

胆管癌と胆管結石症においてそれぞれ EDEG を用いて胆汁 EV を分離し、プロテオーム解析にて比較した。胆管癌と胆管結石症の両群で同定された全蛋白質を Volcano plot にて解析した。倍率変化 (Fold change) 2.0、p 値 < 0.05 において 166 種の蛋白質が胆管癌特異的であった。上位 4 蛋白質の発現強度を箱ひげ図で比較した。CLDN3、LARS、FAF2、RAB20 の p 値はそれぞれ 0.000232309、0.000232612、0.000491222、0.00072074 であった。

マーカー候補蛋白質における検証実験；

胆管癌特異的蛋白質の上位 4 蛋白において、新たに検証コホートをを用いて ELISA による濃度測定を行った。4 蛋白のうち CLDN3 が胆管癌で有意に高値を示した (胆管結石症 25.51 ± 10.71 pg/ml、胆管癌 76.99 ± 62.83 pg/ml、p 値=0.0385)。ROC 曲線では Cut off 値 37.61 pg/ml で感度 87.5%、特異度 87.5%、AUC 0.945 (95% confidence interval [CI]: 0.84 - 1) であった。

免疫組織化学染色；

胆管癌の手術症例において、正常胆管上皮と胆管癌の CLDN3 染色を比較した。染色強度と陽性細胞比率によるスコアでは、正常胆管上皮と比べて、胆管癌細胞で CLDN3 が有意に高発現していた。

今回我々は超遠心法において、ヒト胆汁からの高純度 EV 分離を目的にこのキレート剤を使用した。EDEG を用いることで血清 Albumin や Immunoglobulin などの夾雑物を減少させ、高純度 EV を抽出できたことを示唆している。

胆管癌のバイオマーカーとしての胆汁由来 EV 中 CLDN3 は、検証コホートにおいて感度 87.5%、特異度 87.5% であった。CLDN3 や CLDN4 は、卵巣、乳房、前立腺、膵臓の腫瘍でのアップレギュレートが報告されており⁶⁾、胆管癌においても CLDN3 の過剰発現が癌の生存に関与している可能性が考えられた。ヒト胆汁由来 EV 中 CLDN3 が胆管癌のバイオマーカーとなる可能性が示された。

【引用文献】

- 1) Revenfeld AL, et al. Clin Ther 2014; 36(6): 830-846
- 2) D'Souza-Schorey C, et al. Genes Dev 2012; 26(12): 1287-1299
- 3) Simak J, et al. Transfus Med Rev 2006; 20(1): 1-26
- 4) Razumilava N, Gores GJ. The Lancet 2014; 383(9935): 2168-2179
- 5) Ayako Kurimoto, et al. Enhanced recovery of CD9-positive extracellular vesicles from

human specimens by chelating reagent 2020
6) Hewitt KJ, et al. BMC Cancer 2006; 6: 186

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Chisaki, Haga Hiroaki, Makino Naohiko, Inuzuka Tatsutoshi, Kurimoto Ayako, Ueda Toshiki, Matsuda Akiko, Kakizaki Yasuharu, Ishizawa Tetsuya, Kobayashi Toshikazu, Sugahara Shinpei, Tsunoda Michihiko, Suda Kensei, Ueno Yoshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Utility of Claudin-3 in extracellular vesicles from human bile as biomarkers of cholangiocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81023-y	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 芳賀 弘明, 池田 千咲, 犬塚 達俊, 上野 義之	4. 巻 83
2. 論文標題 胆道疾患のバイオマーカー 胆道癌の胆汁EVs(細胞外小胞、エクソソーム)解析とバイオマーカーとしての意義.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 603-609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芳賀弘明
2. 発表標題 胆管癌バイオマーカーとしてのヒト胆汁および胆汁由来細胞外小胞におけるClaudin-3の検討
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田千咲
2. 発表標題 胆管癌における胆汁中細胞外小胞ないマーカー蛋白質の同定と定量化
3. 学会等名 日本消化器病学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 胆管がんのバイオマーカー	発明者 芳賀 弘明,池田 千 咲,犬塚 達俊,栗本 綾子,植田 俊樹	権利者 合同会社H.U.グ ループ中央研究 所
産業財産権の種類、番号 特許、2020-074425	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------