

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K18140
研究課題名（和文）膀胱癌特異的エクソソームタンパクによる癌微小環境調節機序の解明と診断キット開発

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of cancer microenvironment by exosome proteins in bladder cancer and development of a diagnostic system

研究代表者
富山 栄輔（Tomiyama, Eisuke）
大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40845244
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）：膀胱癌から尿中に分泌されるエクソソームは癌特異的なタンパクを含み、膀胱癌の新規診断マーカーの探索源として有望である。本研究課題では、膀胱癌および非膀胱癌患者の尿から回収したエクソソームを用いたプロテオミクスにより、尿中エクソソーム中のEphrin type-A receptor 2(EphA2)を膀胱癌の新規診断マーカーとして同定した。さらに同タンパクがエクソソームを介して膀胱癌の浸潤や遊走を促進することを明らかにし、尿中エクソソーム中のEphA2の簡便な測定系(ELISA)を開発した。同ELISAは優れた膀胱癌診断能を示し、今後の臨床応用に向けたproof of conceptが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌は本邦で年間25,000人に発症する主要な悪性腫瘍である。診断は主に膀胱鏡によって行われるが、膀胱鏡は侵襲的でコストが高く、いかに不要な検査を行わずに膀胱癌を除外できるかが大きな臨床上の課題となっている。癌細胞から分泌されるエクソソームは癌由来の分子を含み体液中に安定して存在するため、癌の新規診断マーカーの探索源として期待されている。本研究課題ではエクソソーム中のタンパクに着目し、非侵襲的かつ迅速な膀胱癌診断法の開発を行った。本研究課題の成果により同診断法が実用化されれば、膀胱癌の診断時や経過観察時に繰り返し行われる膀胱鏡を減らし、患者の身体的、医療経済的負担の軽減が期待される。

研究成果の概要（英文）：Urinary exosomes secreted by bladder cancer contain cancer-specific proteins and are a promising source of novel diagnostic markers for bladder cancer. In this project, we performed proteomic analysis using urinary exosomes from bladder cancer and non-bladder cancer patients and identified urinary exosomal Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) as a novel diagnostic marker of bladder cancer. Furthermore, we demonstrated that this protein promotes the invasion and migration of bladder cancer via exosomes, and developed a simple ELISA for quantifying urinary EphA2. The ELISA showed excellent diagnostic performance for bladder cancer, which gave us Proof Of Concept for future clinical application.

研究分野：リキッドバイオプシー

キーワード：膀胱癌 エクソソーム プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は本邦で年間約 25,000 人に発症する主要な悪性腫瘍の一つであり、進行し筋層浸潤や転移を来した場合の予後は極めて不良であるため、早期診断が重要である。膀胱癌の診断は主に膀胱鏡によって行われるが、膀胱鏡は侵襲的でコストが高く、経過観察中も繰り返し行われる膀胱鏡が患者の負担となっている。膀胱癌の初期症状は血尿であるが、尿潜血陽性の患者で膀胱癌が発見される確率は約 0.5% であり、いかに不要な検査を行わずに膀胱癌を除外できるかが大きな臨床上の課題となっており、非侵襲的かつ高精度な膀胱癌診断法の開発が求められている。

尿は膀胱癌が常にするため膀胱癌の情報を得るのに最も適した体液であると期待され、非侵襲的に繰り返し採取可能であるため、これまでも尿を用いた膀胱癌診断法の開発が行われてきた。現在、膀胱癌診療で唯一広く実施されている尿検査は尿細胞診のみであるが、尿細胞診は特に低悪性度腫瘍における感度が低く、膀胱鏡の補助診断としての使用に留まる。尿細胞診以外にも尿を用いた膀胱癌診断法の開発は多く試みられており、BTA や NMP22、UroVision などが本邦において保険承認されているものもあるが、低悪性度腫瘍での偽陰性や、血尿、膀胱炎症例での偽陽性などによる診断能低さ、コスト面や検査の煩雑さなど、改善すべき問題点は多く、いずれも膀胱癌診療における普及には至っていない。

エクソソームはあらゆる細胞から体液中に分泌される膜小胞である。癌由来のエクソソームは表面や内部に分泌元の細胞由来の核酸、タンパクなどを含み、体液中に安定して存在するため、近年癌の診断マーカーの探索源として注目を集めている。また、癌由来のエクソソームは癌促進的な働きを持つことが知られており、膀胱癌由来のエクソソームに含まれる診断マーカーは同時に膀胱癌促進的な働きを持つ可能性があり治療標的としても期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では、

膀胱癌から分泌された尿中エクソソームに含まれるタンパクに着目し、膀胱癌の新規診断マーカーを同定すること

同定した尿中エクソソームタンパクを用いた、非侵襲的かつ簡便な膀胱癌の新規診断法を開発すること

同定したエクソソームタンパクが膀胱癌の機能に与える影響を解析すること

を目的とした。

3. 研究の方法

膀胱癌患者 7 名、健常者 4 名の尿からエクソソーム回収のゴールドスタンダードである超遠心法によりエクソソームを回収した。なお、より夾雑物が少なく、タンパク解析に適した高純度のエクソソームを得るため、スクロースクッション法を併用した。

回収した尿中エクソソームを用いてショットガンプロテオミクス (TMT 標識 LC-MS/MS 法) による網羅的タンパク解析を行い、膀胱癌患者群で有意に上昇していた尿中エクソソームタンパクを膀胱癌の新規診断マーカー候補として選定した。なお、尿中エクソソームに加えて、同一患者の手術切除後の膀胱癌組織から分泌させた癌組織由来エクソソームについてもショットガンプロテオミクスを行い、尿中エクソソームが想定通り膀胱癌由来エクソソームタンパクを反映しているかについても確認した。

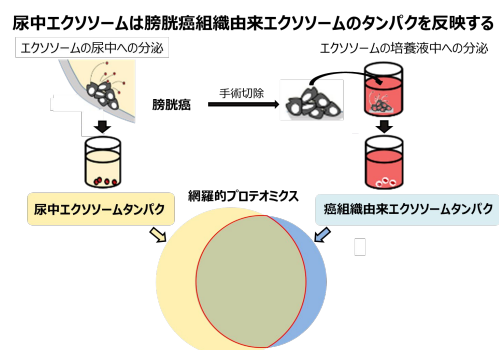
続いて、膀胱癌患者 49 名、血尿および膀胱炎患者を含む非膀胱癌患者 48 名の尿からスクロースクッション併用超遠心法により回収したエクソソームを用いたターゲットプロテオミクス (SRM/MRM 法) により、選定した新規診断マーカー候補タンパクの検証を行い、膀胱癌新規診断マーカーとなる尿中エクソソームタンパクを同定した。

続いて同定した尿中エクソソームタンパクを定量する ELISA を開発し、膀胱癌患者 46 名、非膀胱癌患者 46 名 (うち血尿および膀胱炎患者 18 名) の尿を用いて診断能を評価した。

さらに同定した尿中エクソソームタンパクが膀胱癌細胞機能へ与える影響を *in vitro* で解析した。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌患者の尿中エクソソームと、手術切除をおこなった膀胱癌組織から分泌させた癌組織由来エクソソームの両者について網羅的タンパク解析を行った結果、尿中エクソソームからは 1960 個のエクソソームタンパクが同定され、癌組織由来エクソソーム中のタンパクの大部分 (82.4%) が、尿中エクソソームでも同定可能であることを確認された。つまり、尿中エクソソームは膀胱癌組織由来エクソソームのタンパクを反映し、膀胱癌の診断マーカーの探索源として適切な体液と考えられた (Tomiyama E, et al. Cancer Sci.2021)。



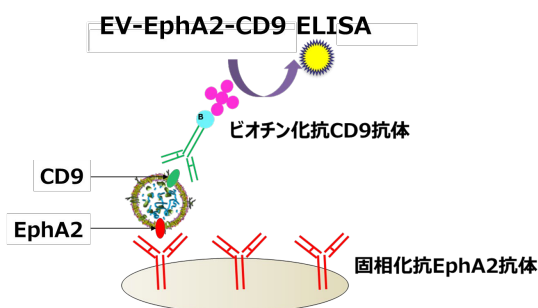
(2) 同定された尿中エクソソームタンパクのうち、健常者と比較し膀胱癌患者の尿中で有意に上昇 (Fold change > 2.0、P 値 < 0.05) していた 13 個の膜タンパクを診断マーカー候補タンパクとして選定し、それらをターゲットプロテオミクスにより検証した結果、定量可能であった 8 つのタンパク全てが非膀胱癌患者と比較し膀胱癌患者の尿中エクソソームで有意に上昇していることが確認された。これらのうち、Ephrin type-A receptor 2 (EphA2) は最も優れた膀胱癌診断能を示し (ROCAUC : 0.79)、非膀胱癌患者群を血尿症例に限定した場合にも膀胱癌患者の尿中エクソソームで有意に上昇していた唯一のタンパクであった。(右図)

ターゲットプロテオミクス結果

タンパク名	膀胱癌 49例 vs 非膀胱癌 48例		
	Fold change	P値	AUC
① Ephrin type-A receptor 2	2.51	0.0001	0.79
② Tight junction protein ZO-2	2.86	0.0001	0.78
③ MARCKS-related protein	2.76	0.0001	0.76
④ Protein diaphanous homolog 1	1.72	0.0001	0.72
⑤ Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	2.29	0.0002	0.72
⑥ Gamma-enolase	1.95	0.0008	0.70
⑦ Epidermal growth factor receptor	1.69	0.0060	0.66
⑧ Complement decay-accelerating factor (CD55)	1.73	0.0265	0.63

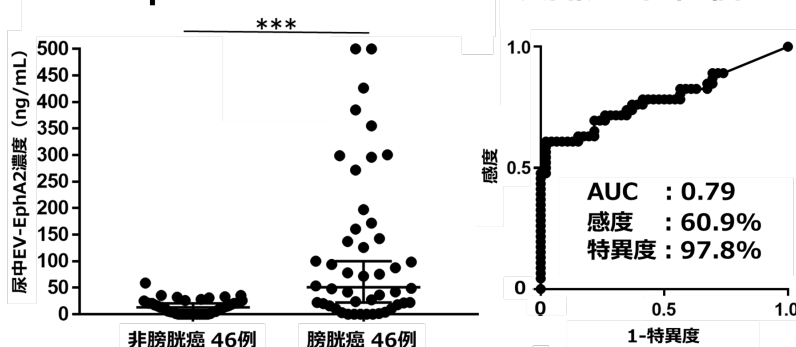
(3) 実臨床への応用を目指し、煩雑で時間のかかる超遠心法を用いず、より簡便な尿中エクソソームの回収および EphA2 の定量を可能とする測定系の構築のため、尿中エクソソームの回収には Mag capture (FUJIFILM) を採用した。Mag capture は大阪大学と富士フィルムが共同で開発したエクソソーム回収キットであり、簡便に高純度なエクソソームが短時間に回収可能である。尿 5ml からエクソソームを回収し、ELISA プレートに固相化した EphA2 抗体で EphA2 陽性エクソソームを捕捉し、エクソソームの表面マーカーである CD9 に対する抗体で検出する ELISA 系 (EV-EphA2-CD9 ELISA) を開発し、尿中エクソソーム中の EphA2 の簡便な測定を実現した (右図)。

尿中EV-EphA2の簡便な測定系の開発

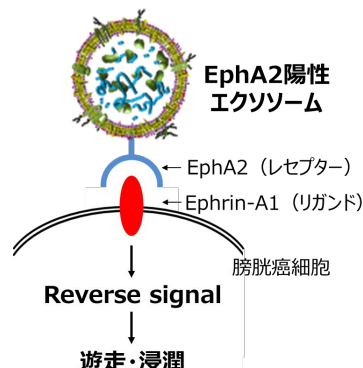


EV-EphA2-CD9 ELISA は優れた膀胱癌診断能を示し (感度 : 60.9%、特異度 : 97.8%、ROCAUC : 0.79) 膀胱癌の新規診断法として期待される結果であった (右図)

EV-EphA2-CD9 ELISAの膀胱癌診断能評価



(4) EphA2 陽性エクソソームが膀胱癌細胞に与える影響を in vitro で評価し、EphA2 陽性エクソソームを添加すると膀胱癌細胞の浸潤能・浸潤能が促進されることを示した。この EphA2 陽性エクソソームの膀胱癌浸潤促進作用は、EphA2 の癌細胞側のリガンドである Ephrin-A1 をノックダウンすることや、EphA2 陽性エクソソームに予めリコンビナント Ephrin-A1 を結合させて EphA2 陽性エクソソームと癌細胞側の Ephrin-A1 との結合を阻害することで減弱したため、EphA2 陽性エクソソームの添加による膀胱癌浸潤促進作用には膀胱癌細胞上の Ephrin-A1 を介した経路が関与していることが示唆され、EphA2 や Ephrin-A1 の膀胱癌に対する治療標的としての可能性が示唆された (右図)。



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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomiyama E, Matsuzaki K, Fujita K, et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 Proteomic analysis of urinary and tissue exudative extracellular vesicles to discover novel bladder cancer biomarkers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2033～2045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14881	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 Tomiyama E, Fujita K, Matsuzaki K, et al.	4. 巻 127
2. 論文標題 EphA2 on urinary extracellular vesicles as a novel biomarker for bladder cancer diagnosis and its effect on the invasiveness of bladder cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1312～1323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-022-01860-0	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Eisuke Tomiyama, Kazutoshi Fujita, Kyosuke Matsuzaki, Kentaro Jingushi, Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Motohide Uemura, Ryoichi Imamura, Tetsuya Takao, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura
2. 発表標題 A novel strategy for the development of bladder cancer biomarkers by proteomic analysis of urinary and tissue-exudate extracellular vesicles
3. 学会等名 第109回 日本泌尿器科学会 総会 International Session
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Eisuke Tomiyama, Kazutoshi Fujita, Kyosuke Matsuzaki, Ryohei Narumi, Takeshi Shiromizu, Kentaro Jingushi, Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Motohide Uemura, Ryoichi Imamura, Tetsuya Takao, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura
2. 発表標題 Development of bladder cancer biomarkers by proteomic analysis of urinary and tissue exudative extracellular vesicles
3. 学会等名 第80回 日本癌学会 学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 富山栄輔, 藤田和利, 松崎恭介, 中野剛佑, 林裕次郎, 加藤大悟, 波多野浩士, 河嶋厚成, 氏家剛, 植村 元秀, 今村亮一, 朝長毅, 野々村祝夫
2. 発表標題 Development of diagnostic markers of bladder cancer by proteomics of urinary exosomes
3. 学会等名 第108日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 富山栄輔, 藤田和利, 鳴海良平, 請川 亮, 加藤大悟, 波多野浩士, 河嶋厚成, 植村元秀, 足立 淳, 朝長 毅, 野々村祝夫
2. 発表標題 尿中細胞外小胞に着目したプロテオミクスによる新規膀胱癌診断マーカー探索とその測定系の開発
3. 学会等名 第6回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Eisuke Tomiyama, Kazutoshi Fujita, Ryohei Narumi, Ryo Ukekawa, Sadamu Ozaki, Takahiro Nishibu, Hirotugu Uemura, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura
2. 発表標題 EphA2 on urinary extracellular vesicles is a novel diagnostic biomarker for bladder cancer
3. 学会等名 Inaugural Virtual Symposium on Urinary Extracellular Vesicles (uEV 2022) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Eisuke Tomiyama, Kazutoshi Fujita, Kyosuke Matsuzaki, Takashi Shimizu, Ryohei Narumi, Kentaro Jingushi, Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Motohide Uemura, Tetsuya Takao, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura
2. 発表標題 Proteomic analysis of urinary and tissue-exudative extracellular vesicles for the discovery of novel bladder cancer biomarkers
3. 学会等名 第41回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名	Eisuke Tomiyama, Kazutoshi Fujita, Kyosuke Matsuzaki, Akinaru Yamamoto, Toshihiro Uemura, Gaku Yamamichi, Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Motohide Uemura, Ryo Uekawa, Hirotsugu Uemura, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura
2. 発表標題	Discovery of a urinary exosomal protein-based bladder cancer biomarker and development of a novel diagnostic technique
3. 学会等名	第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名	富山栄輔, 藤田和利, 加藤大悟, 波多野浩士, 河嶋厚成, 足立 淳, 朝長 毅, 野々村祝夫
2. 発表標題	尿中細胞外小胞タンパクに着目した膀胱癌の新規診断マーカー探索と診断法の開発
3. 学会等名	第7回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名	Eisuke Tomiyama, Kazutoshi Fujita, Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Norio Nonomura
2. 発表標題	EphA2 on urinary extracellular vesicles as a novel diagnostic marker for bladder cancer and its effect on the invasiveness of bladder cancer.
3. 学会等名	2023 American Society of Clinical Oncology-Genitourinary Cancers Symposium 2023 (ASCO-GU 2023) (国際学会)
4. 発表年	2022年～2023年

1. 発表者名	富山 栄輔, 藤田 和利, 山本 顕生, 植村 俊彦, 山道 岳, 加藤 大悟, 波多野 浩士, 河嶋 厚成, 朝長 毅, 野々村 祝夫
2. 発表標題	尿中細胞外小胞上のEphA2は膀胱癌の新規診断マーカーとなり、膀胱癌の浸潤を促進する
3. 学会等名	第32回 泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年	2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------