

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09437

研究課題名(和文) 血清エクソソームを用いた去勢抵抗性前立腺癌治療薬の感受性診断

研究課題名(英文) Diagnosis of drug sensitivity for castration-resistant prostate cancer using serum exosomes

研究代表者

加藤 卓 (Kato, Taku)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50596202

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)：細胞外小胞(EVs/エクソソーム)を用いた去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)治療薬(ARAT)に対する感受性診断を目的に、2例のCRPC患者からARAT投与前と抵抗性獲得後に血清を採取し、EVsを単離しRNAを抽出、RNA-sequencing(RNA-seq)を行った。RNA-seqの結果、long non-coding RNA H19に注目し、前立腺癌(PC)患者でEVs内のH19(EV-H19)を測定した。その結果、EV-H19はCRPCや転移性PCと比べARAT耐性CRPCで有意に上昇しており、ARAT耐性の新規バイオマーカーとなる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の腫瘍マーカーとして前立腺特異抗原(PSA)が普及している。PSAは前立腺癌の治療モニタリングに有用であるが、ARAT投与中の患者ではPSAと病状がしばしば乖離する。本研究ではEV-H19がARAT耐性の新規バイオマーカーとして単独もしくはPSAとの併用により、ARAT耐性をより正確に診断できる可能性を示した。また、EV-H19が前立腺癌の神経内分泌分化を反映している可能性も見出した。以上よりEV-H19は生検を行わず、より低侵襲な方法として前立腺癌のARAT耐性診断及び表現型の変化を捉えられることを示した本研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： We aimed to evaluate the changes of RNAs in serum extracellular vesicles (EVs/exosomes) from prostate cancer (PC) patients in order to identify novel biomarkers for AR axis-targeted therapy (ARAT)-resistance among castration-resistant PC (CRPC) patients. EVs were isolated from 2 patients before and after acquiring ARAT-resistance. RNA profiling of EVs was performed by RNA-sequencing. The expression levels of selected RNAs in EVs were analyzed by digital droplet PCR (ddPCR) in 85 PC patients. RNA-sequencing and ddPCR revealed that H19 contained in EVs (EV-H19) was significantly increased among ARAT-resistant patients compared to ARAT-naive CRPC or metastatic PC patients. In PC tissue, H19 was negatively correlated with AR protein and AR-activity score and upregulated in neuroendocrine CRPC tissue with low AR expression. EV-H19 may negatively correlate with AR-signaling activity and could be a marker to diagnose ARAT-resistance among CRPC patients.

研究分野：がん研究

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 細胞外小胞 H19 RNA-sequencing

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対する薬物治療として、アビラテロンやエンザルタミド、アパルタミドなどの第2世代のアンドロゲン受容体(AR)シグナル阻害剤(ARAT)やドセタキセル、カバジタキセルといった化学療法が用いられるが、Androgen receptor variant 7(AR-V7)の発現はアビラテロン・エンザルタミド・アパルタミド耐性をもたらし、MDR-1にコードされるP-gpの発現はドセタキセル耐性の一因となる。これらの前立腺癌細胞での発現を評価することはCRPCの治療選択の一助となる。それらの確認のためには組織採取が必要となるが、CRPCに対し繰り返し生検を行うことは侵襲的であり、一般的には行われない。そのため生検に代わる低侵襲な検査の開発が求められていた。

2. 研究の目的

細胞から分泌される膜小胞である細胞外小胞(EVs/エクソソーム)は由来する細胞の特徴を反映することが知られている。EVsは血液や尿等の体液に含まれ、低侵襲に繰り返し採取可能であることから、組織生検の代替手段となると考えた。

本研究では血清中EVsに含まれるRNAの検出により、CRPCに対する薬剤の効果予測および選択が可能かどうかを検証することを目的とした。

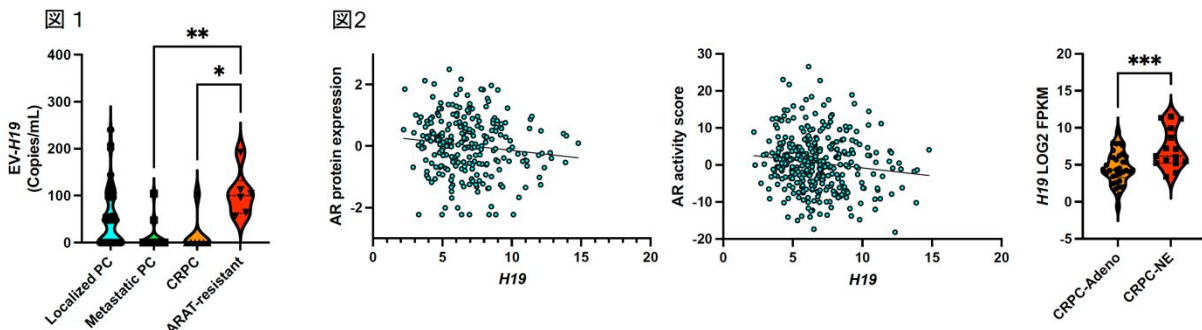
3. 研究の方法

- (1) 2例のCRPC患者からARAT治療開始前と耐性獲得後に血清を採取しEVsを単離、RNAを抽出しRNA-sequencing(RNA-seq)を行った。
- (2) RNA-seqで発現変化が認められたRNAから候補RNAを選択し85例の前立腺癌患者でのEVsでの発現をdigital droplet PCR(ddPCR)法で定量した。
- (3) 前立腺癌組織での候補RNAの発現は公開データベースを用いて解析した。
- (4) 候補RNAのEVsでの発現がアンドロゲン除去療法(ADT)に対する予後に寄与するかを、Kaplan Meier法を用いて評価した。
- (5) 候補RNAのタンパク発現への影響を、siRNAを用いてknockdownし、プロテオーム解析を用いて検討した。

4. 研究成果

RNA-seqの結果、EVsに内包されるlong non-coding RNA *H19* (EV-*H19*)の発現が、ARAT耐性獲得後に上昇していた。ddPCRの結果、EV-*H19*は転移性前立腺癌およびCRPC患者と比べ、ARAT耐性CRPC患者で有意に上昇していた(図1、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

公開データベースを用いた解析の結果、前立腺癌組織では*H19*はARタンパクおよびARシグナルの活性を示すAR activity scoreとの間に負の相関を認めた。ARAT抵抗性を有する神経内分泌腫瘍に分化したCRPC(CRPC-NE)の組織では、通常のCRPC(CRPC-Adeno)の組織と比べ*H19*は有意に上昇していた(図2、*** $P < 0.001$)。



EV-*H19*が発現している患者ではADTによる予後改善効果は有意に不良であった(図3)。

更に前立腺癌細胞株(22Rv1)を用いて *H19* のタンパク発現への影響をプロテオーム解析で評価した。siRNA を用いて *H19* を knock down したところ、前立腺に高発現するタンパクの発現が上昇しており、*H19* は前立腺癌の可塑性に関与することが示唆された(図4)。

図3

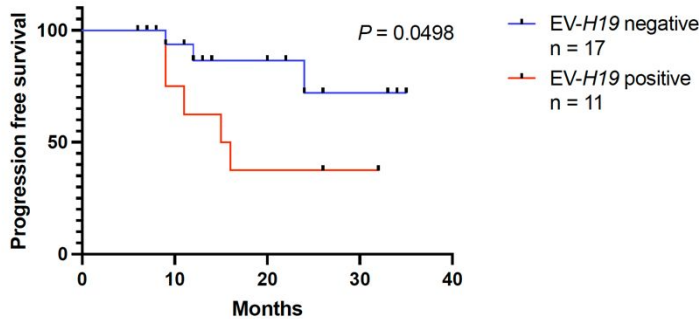
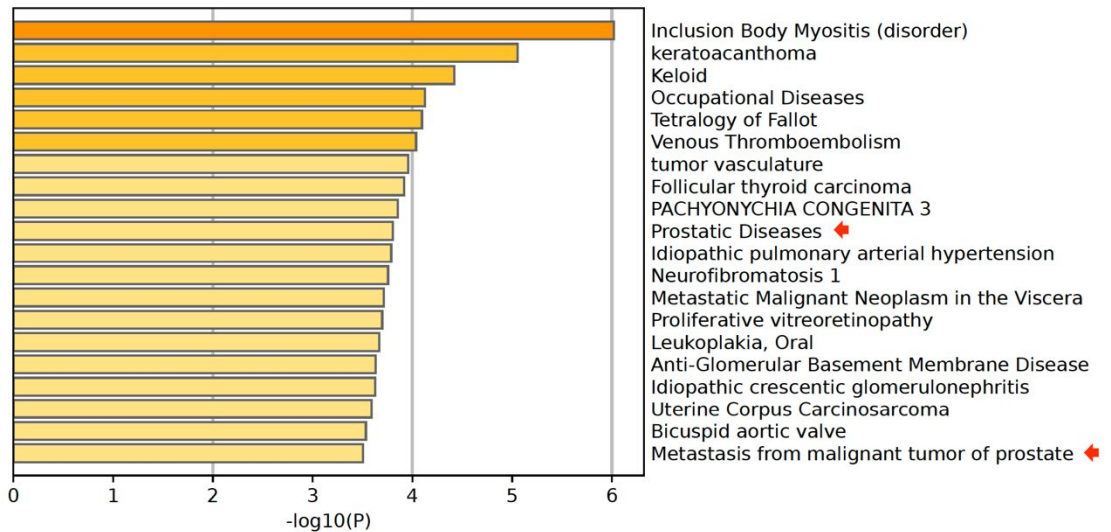


図4



以上の結果から、EV-*H19* が前立腺癌の神経内分泌分化および ARAT 耐性を診断する新規バイオマーカーとなり、更にはADTに対する予後予測因子となる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Taku Kato, Kyojiro Kawakami, Kosuke Mizutani, Tatsuya Ando, Yasuhiro Sakai, Kouhei Sakurai, Shohei Toyota, Hidetoshi Ehara, Hiroyasu Ito and Masafumi Ito	4. 巻 20
2. 論文標題 H19 in serum extracellular vesicles reflects resistance to AR axis-targeted therapy among CRPC patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Genomics & Proteomics	6. 最初と最後の頁 456-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20397	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 卓、酒井 康弘、伊藤 弘康
2. 発表標題 血清中細胞外小胞内のH 1 9 は去勢抵抗性前立腺癌患者の内 分泌療法に対する耐性の予測マーカーとなりうる
3. 学会等名 第70回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 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
研究分担者	水谷 晃輔 (Kosuke Mizutani) (80397356)	社会医療法人厚生会中部国際医療センター（研究支援センター）・がん研究部・主任研究員 (93703)	
研究分担者	川上 恭司郎 (Kyojiro Kawakami) (90589227)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	伊藤 雅史 (Ito Masafumi) (80393114)	藤田医科大学・生理学 (33916)	

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