

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16758

研究課題名(和文)がん細胞由来エクソソームに着目した骨転移進展メカニズムの解明とバイオマーカー探索

研究課題名(英文)The role of exosomes derived from prostate cancer in bone metastasis

研究代表者

占部 文彦(Urabe, Fumhiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90840067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌より分泌されるエクソソームの膜上に存在するCDCP1の骨微小環境に与える影響を検討した。本研究では、エクソソーム膜上に存在するCDCP1が破骨細胞前駆細胞を少量のRANKL存在下に有意に破骨細胞へと誘導することを見出し、前立腺癌の骨転移進展メカニズムの一端を明らかにした。さらに、骨転移を有する前立腺癌患者の血漿中では、骨転移のない前立腺癌患者と比較してCDCP1の発現値が上昇しており、バイオマーカーとしてのCDCP1の可能性も報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
エクソソーム膜上に存在するCDCP1が破骨細胞前駆細胞を少量のRANKL存在下に有意に破骨細胞へと誘導することを見出し、前立腺癌の骨転移進展メカニズムの一端を明らかにした。さらに、骨転移を有する前立腺癌患者の血漿中では、骨転移のない前立腺癌患者と比較してCDCP1の発現値が上昇しており、バイオマーカーとしてのCDCP1の可能性も報告した。この成果により、今後CDCP1を標的とした新規治療法の開発や診断マーカーの開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of CUB domain containing protein 1 (CDCP1), which is present on the membrane of exosomes secreted from prostate cancer, on the bone microenvironment. We found that CDCP1 on the exosomal membrane significantly induced osteoclast precursor cells to become osteoclasts in the presence of a small amount of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), and revealed one of the mechanisms of bone metastasis development in prostate cancer. Furthermore, we reported that the expression level of CDCP1 was elevated in the plasma of prostate cancer patients with bone metastasis compared to that of prostate cancer patients without bone metastasis, suggesting the possibility of CDCP1 as a biomarker.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：細胞外小胞顆粒 前立腺癌 エクソソーム 骨転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は欧米において最も多い男性悪性腫瘍であり、本邦においても、悪性腫瘍の中で最も高い増加傾向を示している。前立腺癌の主な遠隔転移臓器は骨である。通常の骨代謝では骨芽細胞と破骨細胞が相互に作用し、骨は常に作り変えられている。しかし、癌の骨転移が成立すると癌細胞、骨芽細胞、破骨細胞は相互に連携し、骨転移の進展をもたらす vicious cycle を形成することが知られている。しかしながら、現状の治療薬では完全に骨転移の進展を止めることが出来ず、骨転移の病態は完全には明らかになっていない。そのため骨転移進展の詳細な分子機構解明が骨転移の制圧を目指すには必須である。

近年、新たな細胞間コミュニケーション分子としてエクソソームの存在が様々な研究分野で注目されている。エクソソームは、あらゆる細胞から分泌される脂質二重膜に包まれた小胞であり、マイクロ RNA (miRNA) などの核酸や蛋白質などを内包している。最近の研究によりエクソソームを介してこれらの内包物が細胞間で受け渡されており、エクソソームが細胞間情報伝達に寄与することが分かってきた。特に癌研究においては、癌細胞由来のエクソソームが、癌微小環境や遠隔転移などに大きく関わっていることが明らかになっており、癌の治療抵抗性の原因の一つと考えられている。

そこで申請者は前立腺癌の骨転移の進展においても、前立腺癌細胞が分泌するエクソソームが重要な役割を担っていると考えた。特に前立腺癌細胞が骨で生存場所を確保するのに重要な破骨細胞との関係に注目し、エクソソームを利用した新たな骨転移の治療戦略を確立することを目的とした。

2. 研究の目的

進行性前立腺癌の転移の約 80%は骨に起こり、骨転移は前立腺癌治療において大きな課題となっている。実際、申請者は泌尿器科医としてこれまでに多くの前立腺癌患者の診療に従事してきたが、骨転移を有する前立腺癌患者の治療は十分とは言えず、自らの研究を通して骨転移の病態解明やその治療薬の開発に貢献したいという強い気持ちが芽生えた。

エクソソーム中に miRNA が内包されるという報告を契機にエクソソーム研究が大きく発展しはじめたのが 2007 年であるが、現在世界的にエクソソーム研究が急速な勢いで進んでいる。申請者のこれまでのエクソソーム研究の技術を活かし、エクソソームを中心とした新たな骨転移の病態を解明することで、骨転移に苦しむ患者に貢献できる治療法の確立を目指したいと思った。前立腺癌細胞由来のエクソソームが破骨細胞の分化を誘導し、骨転移の進展に重要な役割を担っていると考え、事前検討を行った。本研究では、その詳細な機序を明らかにし、前立腺癌の骨転移の新たな治療法の開発につながる研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 前立腺癌細胞由来エクソソームが破骨細胞分化に与える影響

前立腺癌細胞株 (PC3M) の培養上清から超遠心法にてエクソソームを抽出し、破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7) に与える影響を検討した。破骨細胞前駆細胞は RANKL によって破骨細胞に分化することが知られており、エクソソームのみを添加する場合、RANKL と併用する場合の両方に関して検討を行った。また、コントロールとして、正常前立腺上皮細胞 (PNT2) 由来のエクソソームに関して同様の実験を行った。

2) 破骨細胞の分化をもたらす責任分子の同定

前立腺癌細胞由来のエクソソームが少量の RANKL 存在下に破骨細胞の分化を誘導することを明らかにしたが、前立腺癌細胞由来エクソソームに含まれる特異的分子を同定する目的で、PNT2 と PC3M のエクソソームをプロテオーム解析にかけ、発現の異なる分子を抽出した。

そして、これらの分子のエクソソーム上での発言を抑えるため、siRNA の前立腺癌細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションした前立腺癌細胞からエクソソームを抽出し、破骨細胞前駆細胞の分化に与える影響を評価した。

3) CDCP1 の破骨細胞前駆細胞の分化に与える影響

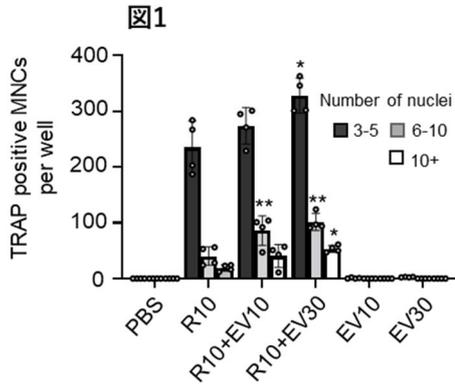
もともと CDCP1 の発現のない HEK293 細胞に CDCP1 を強制発現させた細胞株を樹立し、その培養上清中からエクソソームを抽出し、同様の実験を行った。

4) 臨床検体を用いた検討

治療介入のない前立腺癌患者の血漿からエクソソームを抽出し、CDCP1 の発現を Western blot にて評価した。

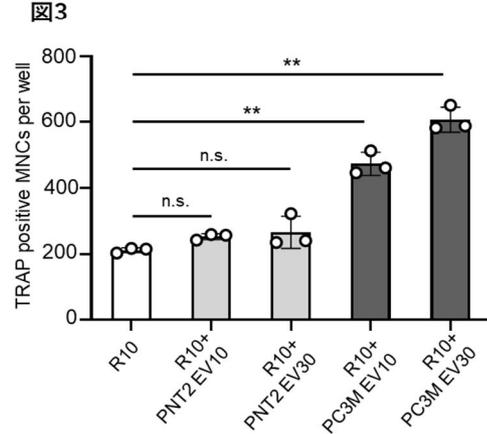
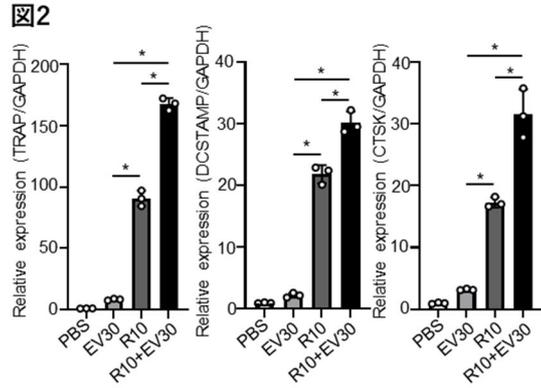
4. 研究成果

1) 前立腺癌細胞由来のエクソソームは少量 RANKL 存在下において破骨細胞の分化を誘導する



前立腺癌細胞の培養上清からエクソソームを抽出し、破骨細胞前駆細胞に添加し分化を評価した。エクソソームのみを添加した際には、破骨細胞の分化は誘導されなかったが、RANKL(10ng/ml)存在下において、破骨細胞前駆細胞の分化を有意に誘導することがわかった(図1)。さらに、PCRにて破骨細胞の分化マーカーとなる遺伝子の発現が上昇することも確認した(図2)。

興味深いことに、正常前立腺上皮由来のエクソソームは、同様の条件においても破骨細胞の分化を誘導しないことがわかった(図3)。これにより、前立腺癌細胞由来のエクソソームが特異的に破骨細胞の分化を誘導していることがわかった。



2) 前立腺癌細胞由来エクソソーム膜上に存在する CDCP1 が破骨細胞の分化を誘導する

前立腺癌細胞由来のエクソソームに存在する特異的な分子を同定する目的でプロテオーム解析と siRNA を組み合わせた functional screening を行った。プロテオーム解析からは X X 種類の前立腺癌細胞由来のエクソソームにおいて発現が上昇したタンパク質を同定することができた(図4)。

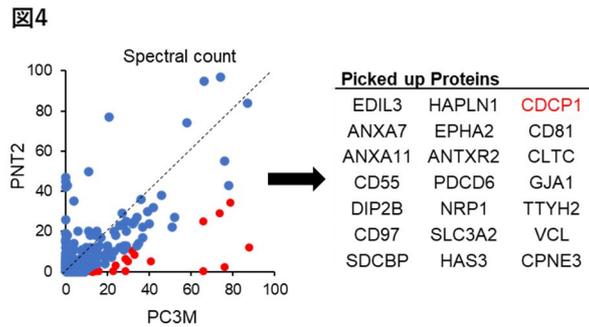
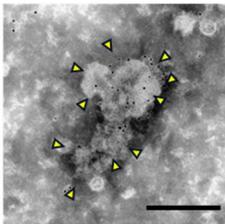


図5

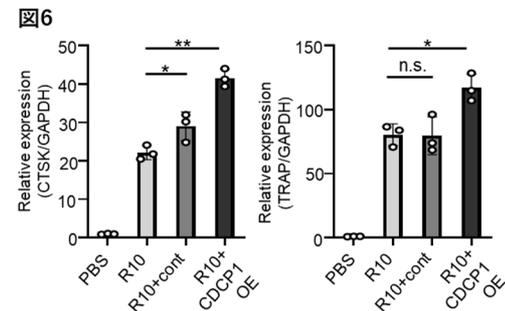


これらに対する siRNA をトランスフェクションし、トランスフェクションした前

立腺癌細胞からエクソソームを抽出し、破骨細胞前駆細胞に RANKL(10ng/ml) とともに添加し、分化を評価した。このスクリーニングによって CDCP1 の発現を落とした前立腺癌細胞由来のエクソソームは RANKL 存在下においても破骨細胞の分化を誘導しないことがわかった。また、この分子がエクソソームの膜上に存在することを免疫電顕にて確認した(図5)。

3) エクソソーム膜上に存在する CDCP1 の破骨細胞前駆細胞の分化に与える影響

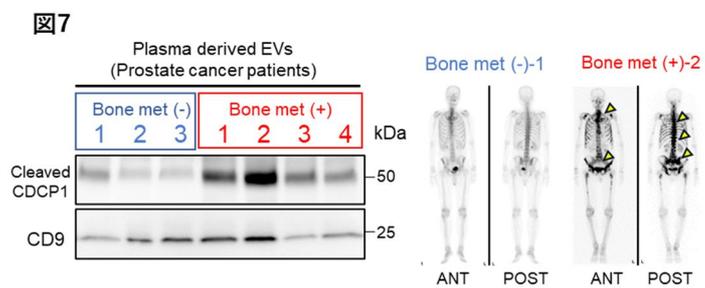
もともと CDCP1 の発現のない、HEK293 細胞に CDCP1 を強制発現させた細胞株を樹立し、その細胞株からエクソソームを抽出し、破骨細胞前駆細胞に RANKL(10ng/ml) とともに添加した細胞の分化を評価した。強制発現させた細胞株由来のエクソソームは破骨細胞の分化を誘導することが分かり、さらに、PCR でも破骨細胞の分化を示す遺伝子の発現が上昇することがわかった(図6)。



4) 骨転移を有する前立腺癌患者の血漿中のエクソソームでは CDCP1 の発現が上昇する

骨転移を有する前立腺癌患者由来の血漿中のエクソソームでは、骨転移のない前立腺癌患者に比較して CDCP1 の発現が上昇していることがわかった。さらに、最も濃いバンドを認めた症例

は、もっと多くの骨転移巣を認められた症例であり、転移巣の volume と CDCP1 の発現に相関関係があることが示唆された (図7)。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Urabe Fumihiko, Kimura Shoji, Iwatani Kosuke, Yasue Keiji, Koike Yuhei, Tashiro Kojiro, Tsuzuki Shunsuke, Sasaki Hiroshi, Kimura Takahiro, Egawa Shin	4. 巻 10
2. 論文標題 The Impact of ABO Blood Type on Developing Venous Thromboembolism in Cancer Patients: Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3692 ~ 3692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10163692	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fumihiko Urabe, Kagenori Ito, Yusuke Yamamoto, Takahiro Kimura, Shin Egawa, Takahiro Ochiya
2. 発表標題 The clinical application of extracellular vesicles for prostate cancer management
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumihiko Urabe
2. 発表標題 Circulating microRNAs: Next-generation urological cancer detection
3. 学会等名 American Urological Association 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 占部文彦、伊藤景紀、木村高弘、瀬川晋、落谷孝広	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 151
3. 書名 エクソソームをターゲットとしたがんの早期発見と治療	

〔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
---------	---------