

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20835

研究課題名(和文) 血漿細胞外小胞体タンパク質のがん予後予測因子としての検証

研究課題名(英文) Validation of Extracellular Vesicle Proteins as Cancer Prognostic Factor

研究代表者

笠原 桂子 (Kasahara, Keiko)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：70907956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌患者および健常人の血漿100 $\mu$ lという少量の臨床検体を用いて、細胞外小胞体に対して行ったターゲットプロテオミクスで得られたデータを解析した。TNM分類による病期によらず、予後が悪いサブタイプが明らかとした。このサブタイプから、細胞外小胞体タンパク質：ORM-1の発現量が高い群は予後が悪いこと、ORM-1が独立した予後予測因子となりうる可能性を明らかとし、2022年11月CancerMedicine誌に研究代表者を筆頭著者とする論文が掲載された。他の癌について検討予定であったが、バイオバンクの使用料について大幅な改定が計画され、当初の予定を遂行することが困難となり研究計画の見直しを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌患者と健常人の血漿から細胞外小胞体を分離し、タンパク質について詳細を調べたところ、大腸癌患者の少量の血漿から、予後が予測できる可能性を示しました。細胞外小胞体に含まれるORM-1というタンパク質の発現が多い患者は、TNM分類による病期分類によらず、予後が悪い可能性がある可能性があります。病院を初めて受診した時の採血から予後が予測できることで、治療方法や受診頻度の最適化などを行ったり、新しい治療ターゲットが見つかる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Using clinical samples as small as 100  $\mu$ l of plasma from colorectal cancer patients and healthy controls, we analyzed data obtained from targeted proteomics performed of plasma extracellular vesicles. We identified a subtype of patients with poor prognosis independent of TNM classification, which is important in determining treatment strategy. This subtype also suggested that patients with higher expression of extracellular vesicle protein: ORM-1 had a poorer prognosis and that ORM-1 may be an independent predictor of prognosis. The results were published in CancerMedicine in November 2022, with the lead author as the first author. We had planned to study other cancers, but a major revision of the biobank fee was planned, making it difficult to carry out the original plan, and the research plan was revised.

研究分野：医学

キーワード：細胞外小胞体 ターゲットプロテオミクス 大腸がん バイオマーカー

## 研究開始当初の背景

細胞外小胞体 (Extracellular vesicles : EVs) は、あらゆる細胞が分泌する脂質二重膜で構成された直径 nm ~  $\mu$ m サイズの粒子で、DNA、mRNA、miRNA やタンパク質を細胞から細胞へ運ぶ細胞間伝達における重要な因子として注目されていた。がん研究では診断、転移する臓器指向性の解明やドラッグデリバリーシステムへの応用など幅広く研究が行われていた(Hoshino\_Cell.2020, Hoshino\_Nature.2017, Vader\_Adv Drug Deliv Rev.2016) 。このEVs は、すべての細胞から体液中に分泌されており、血液や髄液、尿、腹水などからも分離できることが知られていた。そのなかでも、採取における患者への侵襲性の低さ、経時的な採取や保管が比較的容易であり、全国的にすでに多くの保管が見込まれる血漿を対象とすることとした。

血漿 EVs に含まれるタンパク質は、新たなバイオマーカーになる可能性があると考え、200名を超える大腸癌患者と50名を超える健常人の血漿 EVs を対象に400以上のタンパク質由来の1300本を超える合成ペプチドを用いてターゲットプロテオミクスのデータを取得した。血漿 EVs のタンパク質の定量データのみから、大腸癌は病期分類に依存しない2群の存在があることを発見していた。これらの2群は生存期間が有意に異なり、2群間で発現量に有意差があるタンパク質群を同定していた。

これらの発見から、大腸癌における予後予測バイオマーカーが存在する可能性が高いと考えた。すでに取得していたデータは治療前の血漿を対象としており、臨床的には初診時に相当したことから、TNM分類による病期分類のための検査の前に、予後を予測できる意義は大きいと判断した。このため、大腸癌だけではなく罹患者の多い他の癌を対象に検証する社会的意義を考慮し、バイオバンクに保管されている試料の解析を計画することとした。

## 研究の目的

大腸癌における予後予測定量バイオマーカーを見出し、肺癌、胃癌、乳癌においても臨床病理学的特徴を反映するのか、明らかとする。

## 研究の方法

(1) 定量バイオマーカーの同定と検証、(2) バイオマーカーとしての可能性の検証を計画した。

(1) では、臨床情報を用いたCox比例ハザードモデル解析などからバイオマーカーの精度解析を行う予定とした。(2) では、京都大学医学部附属病院クリニカルバイオリソースセンターで保管されている肺癌、胃癌、乳癌の血漿を用いて、(1)の定量バイオマーカーを測定し、その意義を検討する予定とした。

## 研究成果

(1)大腸癌患者 110 名の血漿から抽出した EVs に対して、99 タンパク質の発現量を用いて機械学習のひとつである ConsensusClustering を行い、2 群に分かれることを発見したが、これは各サンプルの臨床情報を含まず、結果に対する解釈や意義については研究者が見出す必要があった。そこで、各サンプルの臨床情報を様々なに解析したところ、生存期間が有意に異なることが明らかとなったが、各群にはすべての TNM 分類による病期が含まれることがわかり、大腸癌患者には病期によらない共通のメカニズムが存在する可能性が示唆された。

2 群のうち、予後の悪い群において有意に発現量が高い EVs タンパク質は 12 個認められた。この 12 タンパク質について、タンパク質間相互作用解析を行ったところ、6 タンパク質に強い相互作用が認められ、共発現解析でも 12 タンパク質が機能的に関与している可能性を示唆した。すべてのサンプルで定量が可能であったのは 5 個であり、このうち ORM-1 の発現量が高い群は有意に予後が悪いことも明らかとした。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では、ORM-1 が Stage IV と共に独立した予後予測因子となりうる可能性を明らかとした。GO 解析では、ORM-1 は炎症に関係する GO にアノテーションされ、12 タンパク質のうち 8 個が同じ GO にアノテーションされ、他の解析結果に矛盾しない結果となった。2022 年 11 月 CancerMedicine 誌に研究代表者を筆頭著者とする論文が掲載された。

これは、初診時の 100  $\mu$ l と少量の血漿から予後を予測可能とする可能性を示唆したもので、これまでの TNM 分類による病期分類に加えて、治療方針やサーベイランスに影響を与えうる臨床的還元の意味の大きい結果であった。しかしながら、血漿から EVs を分離する工程については、その純度や EVs の扱いなど技術的な問題を解決する必要があり、臨床現場に速やかに実装するには課題も多いと考えられた。

この結果は、大腸癌患者血漿中に存在する EVs の由来の検討や詳細なメカニズムが解明されていない ORM-1 の機能解析といった更なる研究への契機となり、臨床的意義だけでなく科学的意義も高い研究として位置づけられると考えている。

(1)の結果から、他の癌について同様の手法で実験を進める予定であったが、京都大学医学部附属病院クリニカルバイオリソースセンターの試料の使用料について、大幅な引き上げを伴う改定が計画されていることが明らかとなった。本研究では、限られた疾患の少数の試料を対象とすることを計画していたが、将来的には対象疾患を拡大し、多数の試料を解析する方針であったことから、根本的な研究計画の見直しが必要となった。倫理申請に向けて準備中であった研究計画については、将来性および継続性について十分な検討が必要である状況での申請および継続は困難であると判断し断念した。

機能的解析に向けて、当研究室で保有している試料や機器を用いて、試験的実験を行った。

本研究で発見した EVs タンパク質については、基盤研究や若手研究といった日本学術振興会の定めるさらなる研究費獲得を行い、継続していく予定である。

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 Kasahara Keiko, Narumi Ryohei, Nagayama Satoshi, Masuda Keiko, Esaki Tsuyoshi, Obama Kazutaka, Tomonaga Takeshi, Sakai Yoshiharu, Shimizu Yoshihiro, Adachi Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 A large scale targeted proteomics of plasma extracellular vesicles shows utility for prognosis prediction subtyping in colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 7616 ~ 7626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.5442	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 笠原 桂子
2. 発表標題 トランスレーショナル研究における問題点と解決への試み
3. 学会等名 第122回日本外科学会
4. 発表年 2022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
---------	---------