

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650637

研究課題名(和文) HSP72を標的としたエクソソーム単離法の評価と腫瘍マーカーの探索への応用

研究課題名(英文) Isolation of tumor-derived exosomes using NHq method and their appreciation for exploration of biomarker

研究代表者

塩田 正之 (Shiota, Masayuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30381990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームの膜表面にHSP72が発現しているという報告を基に、HSP72複合体単離法(NHq法)によるエクソソームの効率的な単離と腫瘍マーカーの探索を目的とした。癌細胞培養上清からNHq法でHSP72複合体を単離し、エクソソームマーカーにて超遠心法と比較したが、結果は陰性であった。したがってNHqではエクソソームの単離はできなかった。一方NHq法により、多発性骨髄腫マーカーの探索を試みた。患者血清に対してHSP72結合分子の探索を行った結果、10例中すべてで3種類のタンパク質を同定した。中でもプロテインXは腫瘍マーカーになりうる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Recent research has reported that HSP72 released from tumor cells on surface of exosome. Therefore, we aimed to assess the NHq method, which we established method to isolate of HSP72-binding proteins, for purification of exosome and to explore for biomarker. HSP72-binding molecules isolated with NHq could not involve CD63 and CD9. These markers of exosome were detected in flow-through of NHq method. HSP72 was mainly detected in the supernatant of ultracentrifugation. HSP72 did not exist on surface of exosome against previous report. Therefore, we concluded that NHq method could not isolate exosome. Whereas, we tried to explore the biomarker of multiple myeloma using NHq method. As a result, we identified 3 proteins in sera of patients. One of these proteins might be a biomarker of multiple myeloma.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：熱ショックタンパク質 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

血清プロテオームによる腫瘍マーカーの開発は急務であるが、血中にはアルブミンなどの夾雑タンパク質が大量に混在し、微量タンパク質の同定は困難を極めている。よって疾患特異性が高い微量タンパク質を検出する手法が切望されていた。申請者は分子シャペロンである Heat Shock Protein 72 (HSP72) が細胞内タンパク質と複合体を形成したまま、がん細胞から放出されることに着目した。自作の HSP72 モノクローナル抗体 9 種類を NHS セファロースに共有結合した NHq を作製し、バッチ法による血中微量タンパク質同定法を開発し (NHq 法)、特許申請した (特願 2011-169552)。一方、近年、がん細胞が miRNA やタンパク質を内包したエクソソーム小胞を血液中に分泌し、間質細胞や免疫細胞とクロストークを行うことが明らかとなった。エクソソーム中の miRNA やタンパク質の種類は、分泌した細胞の種類や生理学的状態により異なるためエクソソームを標的としたプロテオミクスは癌の診断法の開発につながる可能性が高く、既に複数のグループが取り組んでいる。さらにこのエクソソームの表面に HSP72 が発現していることが明らかになってきた。したがって、血清に対する NHq 法の適用でエクソソームを単離できる可能性がある。エクソソームを単離できれば、より簡便かつ特異的な方法となることから腫瘍マーカー探索が飛躍的に進むと考えられる。

## 2. 研究の目的

多発性骨髄腫の腫瘍マーカーの探索を目的とする。それに先立って申請者が開発した NHq 法がエクソソーム単離法になりうるかを検証し、腫瘍マーカー探索の効率化を試みる。

## 3. 研究の方法

NHq 法のエクソソーム単離法としての妥当性の評価

細胞は肺腺癌細胞 A549、膵管癌細胞 Panc1 を用いた。培養上清を限外濾過にて濃縮した後、NHq 法により HSP72 複合体を単離した。従来法のエクソソームの単離法としては超遠心法を用いた。アセチルコリンエステラーゼ、CD63、CD9 のウエスタンブロットを指標にエクソソーム画分が単離できているか評価した。

### 多発性骨髄腫腫瘍マーカーの探索

多発性骨髄腫細胞 KMS-12-PE を使用した。また、患者より同意のもとで採取した多発性骨髄腫患者血清を実験材料に用いた。多発性骨髄腫患者の血清 10 例を用いて NHq 法によって HSP72 複合体の単離を行い、SDS-PAGE にて展開した。銀染色の後、ゲルショットガン法にて結合分子の同定をおこなった。プロテオーム解析は LTQ (Thermo Fisher) にて行い、データ解析には swissprot (ヒト) を用いた。KMS-12-PE の培養上清に対して NHq 法を施行し、同定した分子が多発性骨髄腫細胞由来であることを検証した。

## 4. 研究成果

### NHq 法のエクソソーム単離法としての妥当性の評価

#### A549

A549 を用いて超遠心法で単離できるエクソソームと NHq によって単離できる HSP72 複合体を比較した。エクソソームマーカーとして用いたアセチルコリンエステラーゼは両群で認められた。次に超遠心の沈降物中に HSP72 が含まれるかを評価したところ、HSP72 陽性であった。さらに超遠心の際のフロースルーに HSP72 があるかを確認するために超遠心後の上清を用いて NHq 法を試行し、ウエスタンブロットにて評価したところ HSP72 の存在を認めた。一方で NHq にて精製したフロースルーの分画に CD63 やインテグリンのバンドを認めた。NHq による精製サンプルは CD63 陰性であった。したがって NHq のフロースルー

ーにエキソソームがあることが示唆された。以上より A549 由来のエキソソームには HSP72 が内包されているにも関わらず、NHq では単離できないと結論づけた。

Panc1

膵癌細胞は細胞外 HSP72 量が多いという予備検討の結果を踏まえて、同様に超遠心法と、NHq 法によるエキソソームの単離を試行した。超遠心法では CD63 を認めたが、NHq 法では CD63 を認めなかった。また超遠心法のエキソソーム画分に HSP72 を認めた。しかし、その量は NHq に比べて 1/10 以下であった。以上より、細胞外に分泌される HSP72 の大半はエキソソームの構成分子というよりもタンパク質複合体として放出されている可能性が示唆された。

一般に、HSP72 はエキソソームマーカー、すなわち構成タンパク質として知られ、細胞外 HSP72 の分泌メカニズムもエキソソームを介すると報告されている。しかし、従来の報告に反して細胞外 HSP72 のうちエキソソーム由来のものはごく一部であることが明らかとなった。NHq 法でエキソソームが単離できない理由として、1) 既存の報告に反して HSP72 がエキソソーム膜上に発現していない可能性、2) HSP72 はエキソソーム膜上に存在するが NHq が認識する抗原部位が膜上にあることでマスクされている可能性が考えられる。これに関しては引き続き解析を継続する。

#### 多発性骨髄腫バイオマーカーの探索

エキソソームの効率的な単離はうまくいかなかったが、NHq は細胞外 HSP72 複合体は効率的に単離可能であることから当初の目的であった多発性骨髄腫腫瘍マーカーの探索を行った。患者血清 10 例を使用し、NHq 法にて結合タンパク質の単離を試みた。結合タンパク質を SDS-PAGE で展開した後、15kD 以下の分画に存在するタンパク質を質量分析に供した。その結果、34 種類のタンパク質を

同定した。このうち、3 種類のタンパク質は患者 10 例中 10 例で同定できた。中でも protein X (特許の関係上、非公開) に着目した。これが多発性骨髄腫の細胞から分泌されるかを明らかにするために KMS-12-PE 株の培養上清を用いて HSP72 との結合を評価した。その結果、細胞内、細胞外で HSP72 と protein X の結合を認めた。以上より、protein X は多発性骨髄腫患者血清中で、HSP72 に結合して血液中に放出されることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Fujii Y, Shiota M, Ohkawa Y, Baba A, Wanibuchi H, Kinashi T, Kurosaki T, Baba Y.

Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 422:615-620

2. Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, Iwao H

Establishment of 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *Int J Oncol.* 2013; 43:1985-1991

3. Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M.

Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 445: 327-333

4. Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H  
“Hsc70 Contributes to Cancer Cell Survival by Preventing Rab1A Degradation under Stress Conditions” *PLOS ONE in press*

[学会発表](計 15 件)

1. 田中昌子、塩田正之、三嶋梨花、下條真未、岡田麻代実、高橋克之、山形雅代、岡真優子、泉康雄、雪村時人、三浦克之、岩尾洋 分子シャペロン Hsc70 を標的と

- した癌のストレス応答分子同定法の確立、第 121 回薬理学会近畿部会 2012 年 6 月 29 日 徳島
2. 田中昌子、高橋克之、鰐淵英機、塩田正之 がんのストレス応答を標的とした Hsc70 クライアントタンパクプロテオーム解析、第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 札幌
  3. 高橋克之、田中昌子、鰐淵英機、塩田正之 抗癌剤耐性胃癌細胞を用いた Hsp72 クライアントタンパク質のプロテオーム解析、第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 札幌
  4. 塩田正之、田中昌子、高橋克之、鰐淵英機 新規 FGF-2 機能阻害抗体による内皮細胞の生存抑制効果、第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19-21 日 札幌
  5. 岡真優子、西山方規、泉康雄、塩田正之、三嶋梨花、三浦克之、岩尾洋 心血管障害におけるエキソソームの役割、第 122 回薬理学会近畿部会 2012 年 11 月 16 日 大阪
  6. 泉康雄、西山方規、岡真優子、田中昌子、塩田正之、三浦克之、岩尾洋 アンジオテンシン II によるエキソソームへの影響、第 42 回日本心脈管作動物質学会 2013 年 2 月 8 日 奈良
  7. 田中昌子、塩田正之、高橋克之、山形雅代、雪村時人、鰐淵英機、岡真優子、泉康雄、三浦克之、岩尾洋 HSC70 結合解析が明らかにする RAB1A のストレス耐性への関与、第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21-23 日 福岡
  8. 西智史、田中昌子、植村遼、中尾隆文、大川恭行、鰐淵英機、泉康雄、三浦克之、塩田正之、岩尾洋 血中 Hsp72 結合分子を同定し、多発性骨髄腫に対する新規診断マーカーを探索する、第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21-23 日 福岡
  9. 植村遼、田中昌子、西智史、川口真紗子、大川恭行、鰐淵英機、泉康雄、三浦克之、塩田正之、岩尾洋 疾患プロテオミクスのための血中 HSP72 結合分子の単離 第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21-23 日 福岡
  10. 植村遼、田中昌子、西智史、鰐淵英機、泉康雄、三浦克之、塩田正之、岩尾洋 血中 Hsp72 を用いたバイオマーカー探索、第 123 回日本薬理学会近畿部会 2013 年 7 月 12 日 名古屋
  11. 田中昌子、高橋克之、鰐淵英機、塩田正之 The Search for Diagnostic Biomarkers of Multiple Myeloma by Analysis of HSP72 Interactome 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜
  12. 塩田正之、田中昌子、高橋克之、鰐淵英機 Isolation of HSP72-binding protein in the serum 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜
  13. 川口真紗子、田中昌子、泉康雄、塩田正之、岩尾洋 肺がん細胞における細胞外 HSP72 結合タンパク質の同定、第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日 神戸
  14. 高橋克之、田中昌子、塩田正之、泉康雄、三浦克之、岩尾洋 胃癌細胞株において Hsp72 はオキサリプラチン耐性の獲得に寄与する 第 87 回 日本薬理学会年会 2014 年 3 月 21 日 仙台
  15. 川口真紗子、田中昌子、塩田正之、泉康雄、三浦克之、岩尾洋 細胞外 HSP72 結合分子の同定 第 87 回 日本薬理学会年会 2014 年 3 月 20 日 仙台
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)
- 名称：形質細胞性腫瘍を検出するための方法、キット及びマーカー

発明者：塩田正之、岩尾洋、田中昌子、植村  
遼、西智史  
権利者：大阪市立大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-45581  
出願年月日：2013年3月7日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塩田 正之（SHIOTA MASAYUKI）  
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：30381990

##### (2) 研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：