

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790360

研究課題名(和文)腫瘍特異的エクソゾーム含有蛋白質を用いた新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Acquisition of novel bio-markers for cancers using cancer-specific exosomal proteins.

研究代表者

長塩 亮(Nagashio, Ryo)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40618568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は早期診断に有用なマーカーが少なく、初診時には既に進行癌であることが多い。肺腺癌の早期診断に有用なマーカーを獲得するため、肺腺癌由来A549細胞のエクソゾーム含有蛋白質を免疫源として39個の単クローン性抗体を作製した。作製した抗体は組織診断並びに血清診断マーカーとしての有用性を評価するため、肺癌組織を用いた免疫染色並びに肺癌患者と健常者の血清を用いたドットプロット法にて評価した。その結果、肺腺癌の診断に有用なマーカー候補の獲得に成功した。

研究成果の概要(英文)：There are few useful biomarkers for early diagnosis of lung cancer. Therefore most patients with lung cancer are at an advanced stage at the time of diagnosis. To obtain useful diagnostic markers for lung adenocarcinoma, we generated monoclonal antibodies using exosomal proteins from lung adenocarcinoma-derived A549 cells by employing the random immunization method. To evaluate the utility of these antibodies as differential diagnostic marker and/or sero-diagnostic marker for lung adenocarcinoma, we performed immunohistochemical study with tissue microarray and dotblot analysis with sera from lung cancer patients and normal controls. As the results, we successfully obtained the candidate biomarkers for diagnosis of lung adenocarcinomas.

研究分野：疾患プロテオミクス

キーワード：エクソゾーム ランダム免疫法 単クローン性抗体 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は膀胱癌とともに難治性癌の代表であり、本邦では男性癌死の第1位、女性でも2位を占めている。肺癌は早期診断に有用なマーカーが少なく、初診時にはすでに進行癌であることが多い。化学療法としてプラチナ製剤を基本とした多剤併用療法も用いられているが十分な効果は得られておらず予後不良の原因となっている。肺癌患者の予後を改善するためには、より早期に癌を診断し根治的治療を施す必要があり、それを可能とするための新規早期診断マーカーの獲得が望まれている。我々はこれまでに肺癌の組織・細胞を免疫源に用いたランダム免疫法により1,000種を超えるハイブリドーマを樹立し、それらが産生する抗体群の中から肺腺癌の診断に有用な抗体を選択してきた(研究業績、)

(2) 血清中の腫瘍特異的な蛋白質を直接的に探索することは、アルブミン・イムノグロブリンといった血清中の主要蛋白質に邪魔され非常に困難を極める。そのため、現在、血清中の腫瘍特異的な蛋白質を直接的にではなく、その蛋白質に対して宿主より産生される自己抗体の検出が注目されている。抗体を基盤とした免疫反応を引き起こす腫瘍抗原群の同定は癌のスクリーニングや免疫療法に有用である。目的にあったバイオマーカーを見出す方法の一つとして、血清中に循環している自己抗体を利用する方法はPCR法に匹敵するほどの感度を有しており、大変魅力的であるとされている(Hanash et al. Nature Tech 2003,21:37)。

(3) エクソゾームは生体内や培養液中の殆どの細胞から分泌され、血液、尿等の体液や培養液中に存在する。エクソゾームに含まれる蛋白質は細胞の種類や生理学的状態で異なり、中に抗原を保有し免疫系を制御することも報告されているので、新規のバイオマーカー探索に有用である。

2. 研究の目的

本研究は、肺癌細胞の培養液や肺癌患者血清中のエクソゾームを抽出し、その含有蛋白質に対する単クローン性抗体の網羅的作製、並びに二次元免疫プロット法により展開したエクソゾーム含有蛋白質に対する肺癌患者血清中の自己抗体を検出する。得られた抗体や検出された自己抗体は組織診断マーカーとしての有用性、並びに肺癌患者血清を用いたドットプロット法による解析により新規血清診断マーカーとしての有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞の培養上清中、並びに肺癌患者血清中に含まれるエクソゾームの抽出

培養上清中のエクソゾームの抽出

サブコンプレントとなった培養細胞をリン酸緩衝液で2度洗浄した後、無血清培地中

で48時間培養する。その後、培養上清を回収し、段階的にg(重力)を上げていき、最終的に100,000×gで遠心した際の沈殿物としてエクソゾーム分画を回収する超遠心法にて抽出を行った。

肺癌患者血清中のエクソゾームの抽出

血清中のエクソゾームの抽出については、貴重な少量の血清から、より高効率にエクソゾーム蛋白質を回収するために Exosome Precipitation Solution, ExoQuick キットを用いてプロトコル通りに行った。

(2) エクソゾーム含有蛋白質に対する単クローン性抗体の網羅的作製

組織診断あるいは血清診断マーカーとなる抗体を獲得するため培養上清中に含まれるエクソゾーム含有蛋白質に対する網羅的な単クローン性抗体の作製を行った。上記 - で抽出したエクソゾーム含有蛋白質とアジュバント試薬を混合しミセルを形成させた後、5週齢のBALB/cマウス(雌)の腹腔に免疫を行った。その後、抗体価のチェックを行い、抗体価が上昇していたマウスより脾臓を摘出し、そのリンパ球を回収した。その後、マウスミエローム細胞と細胞融合することで抗体産生ハイブリドーマの作製を行った。その後、2度の限界希釈法を行うことで単クローン化を行った。

(3) エクソゾーム含有蛋白質を用いた二次元免疫プロット法による自己抗体の検出

血清中の自己抗体を検出するため、エクソゾーム含有蛋白質を対象とした二次元免疫プロット法を行った。上記 - で抽出したエクソゾーム含有蛋白質を二次元電気泳動法にて展開し、PVDF膜への転写を行った。このPVDF膜に対して、肺癌患者血清を1次抗体に用いた免疫プロット法を行い、自己抗体と反応する蛋白質を検出した。

(4) 作製した抗体・検出した自己抗体の有用性評価

作製した抗体、並びに検出した自己抗体が肺癌を対象とした診断マーカーとして有用であるかを評価するために、肺癌組織を用いた免疫染色法、並びに肺癌患者血清・健常者血清と作製した抗体を用いたドットプロット法による解析を行った。

肺癌の組織マイクロアレイ切片を対象として作製した単クローン性抗体の染色性を免疫染色法により評価した。切片は脱パラフィン後、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを処理し、0.01Mクエン酸緩衝液に0.1%量のTween20を加えた溶液中で、オートクレーブによる抗原性の賦活化を行った。2%正常ブタ血清でブロッキングを行った後、作製した単クローン性抗体、ChemMATE ENVISION 試薬(DAKO社)を順に反応させ、Stable DAB(Invitrogen社)を用いて反応産物を可視化した。核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。染色の評価は腫瘍細胞における発現の強さ(0:陰性、1:弱、2:中、3:強)と範囲(0:0-10%、1:11-25%、2:26-50%、

3 : 51-75%、4 : 76-100%)を数値化しそれらの積算値を染色スコア(0-12)とした。

作製した抗体と血清を用いたドットプロット法 : まず血清からアルブミンと免疫グロブリンをカラムで除去し、20 倍希釈で PVDF 膜に所有の自動ドットプロット装置を用いてドットした。次に、ブロッキング剤で処理した PVDF 膜は樹立したハイブリドーマの培養上清(原液)と反応させ、TBS-T で洗浄後、HRP 標識二次抗体を反応させた。TBS-T で洗浄後、化学発光試薬を反応させ、その発光をイメージアナライザーにて記録し、ドットプロット用に最適化された Dot Blot Chip System ver.4 ソフトウエア(ダイナコム社製)上で解析した。

4. 研究成果

肺癌細胞株の培養上清に含まれるエクソソーム含有蛋白質を対象とした実験を行うため、始めに肺腺癌由来の A549 細胞でエクソソーム濃縮方法を検討した。A549 細胞は無血清培地で培養し、培養上清を回収した。分子量 10 万までをカットするフィルターで限外濾過することで培地由来のトランスフェリンの混入を軽減させ、培養上清を濃縮した。その後、20 万 × g で 2 時間遠心することで、エクソソームを沈殿物として回収した。このエクソソーム濃縮検体は、各種エクソソームマーカー (CD9, CD63, CD81, HSP70) を用いた免疫プロット法により濃縮されていることが確認された。培養上清に含まれるエクソソームの量を測定するため、抗 CD81 抗体を用いた ELISA キットで解析した結果、約 8.47×10^7 個/ml であった。

エクソソーム含有蛋白質に対する肺癌患者血清中の自己抗体を検出するため、肺腺癌患者血清を一次抗体に用いた二次元免疫プロット法を行った。その結果、複数の抗原スポットにおいて反応性が認められた。反応した抗原スポットの蛋白質を質量分析法により同定したところ、大部分が培地由来のトランスフェリンの分解物であることが分かった。自己抗体の検討において有用な抗原タンパク質を得ることはできなかった。

次に、エクソソーム含有蛋白質に対する単クローン性抗体を作製するため、エクソソーム濃縮検体を免疫源に用いたランダム免疫法を行った。免疫後のマウスの尾静脈より採血し、ELISA 法、二次元免疫プロット法、及び免疫染色法による抗体価のチェックを行った(図 1)。ELISA 法ではコントロールマウス(免疫無し)に比べ免疫後のマウスはエクソソーム濃縮試料に高い反応性を示し、二次元免疫プロット法においては様々なエクソソーム含有蛋白質に対する抗体の産生が確認できた。細胞融合法を行い、抗体産生ハイブリドーマの培養上清を用いて免疫染色によるスクリーニングを行った結果、A549 細胞の細胞質や細胞膜、核膜など様々な染色性を示す 39 種の抗体を樹立した。

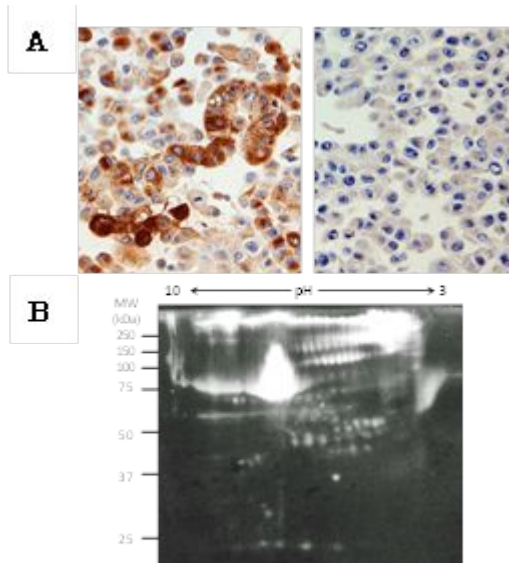


図1. 免疫マウス血清を用いた抗体価チェック。A:A549細胞を用いた免疫染色、(左)エクソソーム免疫マウス血清、(右)コントロールマウス血清、B:エクソソーム検体を対象に用いた免疫プロット法。エクソソーム免疫マウス血清中に多数のエクソソーム含有蛋白質に対する抗体が産生されている。

これらの 39 抗体について組織診断マーカーとしての有用性を評価するため、124 例のホルマリン固定パラフィン包埋肺癌組織マイクロアレイを用いた免疫染色を行った。その結果、1965 抗体の反応性は粘液産生性と相関しており ($p=0.0008$)、扁平上皮癌に比べ、腺癌で有意に染色性が強いことが示された ($p=0.007$)。また 1979 抗体は扁平上皮癌に比して腺癌で染色性が有意に高い ($p=0.00017$) だけでなく、腺癌において腫瘍径や分化度、血管侵襲の有無と有意に相関することが確認された(それぞれ $p=0.00559$, $p=0.00114$, $p=0.04065$)。1965 抗体と 1979 抗体について抗原同定を試みているが、現状では抗原は不明である。1949 抗体は腺癌での陽性率は約 3 割であるが、扁平上皮癌は全例陰性であり、抗原同定の結果、MUC5B を認識していることが分かった。MUC5B については従前の研究においても抗体が獲得されており、MUC5B を抗原とする 1292 抗体を用いた実験により MUC5B が肺腺癌の鑑別診断マーカー並びに独立した予後不良因子であることを報告 (Sci Rep 2015, 5, 8649) した。どちらの抗体も同じ MUC5B を抗原として認識しているが、1292 抗体が低分化な腺癌の細胞質に強く染まるのに対し、1949 抗体は高分化な腺癌の粘液様物質に強い傾向を示し、両者の染色性は大きく異なっていた。この染色性の差異(翻訳後修飾や立体構造の変化等)と肺腺癌の悪性度との関連が予想され、今後より詳細な検討を行う必要があると考えている。

血清診断マーカーとしての有用性については肺癌患者血清(27 例)と健常者血清(8 例)を用いたドットプロット法により評価した。その結果、1962 抗体の反応性は健常人血清に比して肺癌患者血清で有意に高値を示した ($p=0.00177$)。また、1970 抗体は健常人と肺癌患者血清との間では有意な差は無いが、腺癌患者 8 例中 2 例で明らかに高い反応

性を示しており、腺癌特異的なマーカーとなる可能性が示唆された(図2)。1962抗体と1970抗体について、プロテオーム解析技術を用いて抗原同定した結果、1962抗体はMTAPを、1970抗体はVimentin (VIM)を認識していた。MTAPは尿中エクソゾームで報告があり、様々な腫瘍で高頻度にMTAP遺伝子のdeletionや高メチル化によるMTAPの欠損が認められている。VIMは間葉系細胞に発現する中間径フィラメントであり、腫瘍細胞では接着や運動能、細胞シグナル伝達等への関与が報告されている。また、肝細胞癌では血清VIM値が腫瘍径2cm以下の患者群で高値を示すことから有用な血清診断マーカーであることが示唆されている。本研究でも高い血清VIM値を示す肺腺癌患者が存在したことから、今後、多数の肺癌患者血清を用いて、血清診断マーカーとしての有用性を検証する必要がある。

癌細胞由来のエクソゾームはレシピエント側の細胞に取り込まれることで、その細胞の性質を癌細胞自身が増殖・浸潤しやすいように変化させることが報告されている。こうしたエクソゾームの働きを獲得した抗体が中和抗体として抑制可能かどうかを確認するため、培養している癌細胞の上清中に作製した抗体を添加することで形態変化、並びに癌細胞の増殖能への影響をMTTアッセイにより評価した。その結果、樹立した抗体の添加にともなう培養細胞の明らかな形態学的変化は認められなかった。一方、MTTアッセイの結果、抗体を添加しないコントロール細胞に比して、増殖能が10%以上低下した抗体が10個含まれていた。このことから、癌細胞の

増殖を抑制可能な機能性抗体が含まれていることが確認された。

以上の結果から、癌細胞由来のエクソゾーム含有蛋白質を用いたランダム免疫法により作製した単クローン性抗体を用いた一連の実験により、肺腺癌の組織診断マーカーや血清診断マーカー候補となる抗体の獲得に成功した。今後、多数の肺癌症例を用いて検証実験を行っていく予定である。

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11件)

Katono K, Sato Y, Jiang SX, Kobayashi M, Nagashio R, Ryuge S, Fukuda E, Goshima N, Satoh Y, Saegusa M, Masuda N. Prognostic Significance of MYH9 Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. PLoS ONE 2015, 10: e0121460 (査読有り) DOI:10.1371/journal.pone.0121460

Tsumura H, Matsumoto K, Ikeda M, Yanagita K, Hirano S, Hagiwara M, Nagashio R, Fujita T, Sato Y, Iwamura M. High Expression Level of Preoperative Serum Uroplakin III is Associated with Biologically Aggressive Bladder Cancer. APJCP 2015, 16: 1539-1543 (査読有り) DOI:10.7314/APJCP.2015.16.4.1539

Nagashio R, Ueda J, Ryuge S, Nakashima H, Jiang SX, Kobayashi M, Yanagita K, Katono K, Satoh Y, Masuda N, Murakumo Y, Hachimura K, Sato Y. Diagnostic and Prognostic Significances of MUC5B and TTF-1 Expressions in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. Sci Rep 2015, 5: 8649, (査読有り) DOI:10.1038/srep08649

Nakashima H, Jiang SX, Sato Y, Hoshi K, Matsumoto T, Nagashio R, Kobayashi M, Matsuo Y, Shiomi K, Hayakawa K, Saegusa M, Satoh Y. Prevalent and up-regulated vimentin expression in micropapillary components of lung adenocarcinomas and its adverse prognostic significance: Vimentin in lung adenocarcinoma. Pathol Int 2015, 65: 183-192, (査読有り) DOI: 10.1111/pin.12257

Nishi M, Matsumoto K, Kobayashi M, Yanagita K, Matsumoto T, Nagashio R, Ishii D, Fujita T, Sato Y, Iwamura M. Serum expression of S100A6 is a potential detection marker in patients with urothelial carcinoma in the urinary bladder. Biomed Res 2014, 35: 351-356, (査読有り) DOI:10.2220/biomedres.35.351

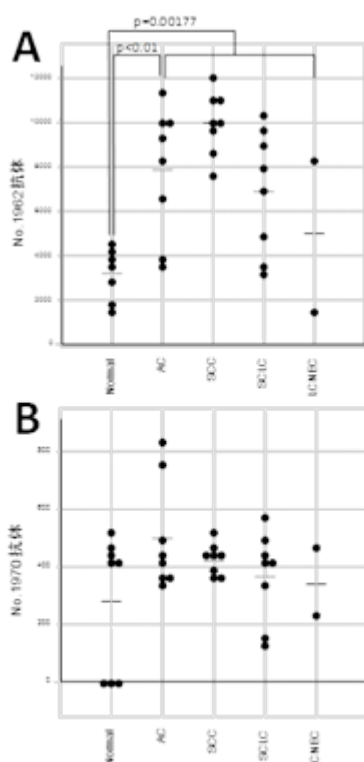


図2. 肺癌患者血清と単クローン性抗体を用いたドットプロット法の散布図。A:1962抗体 B:1970抗体。

Matsumoto K, Ikeda M, Matsumoto T, Nagashio R, Nishimori T, Tomonaga T, Nomura F, Sato Y, Kitasato H, Iwamura M. Serum Perioplakin as a Potential Biomarker for Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. APJCP 2014, 15: 9927-9931, (査読有り) DOI:10.7314/APJCP.2014.15.22.9927

Maejima H, Nagashio R, Yanagita K, Hamada Y, Amoh Y, Sato Y, Katsuoka K. Moesin and Stress-Induced Phosphoprotein-1 Are Possible Sero-Diagnostic Markers of Psoriasis. PLoS ONE 2014, 9: e101773, (査読有り) DOI:10.1371/journal.pone.0101773

Kobayashi M, Nagashio R, Ryuge S, Murakami Y, Yanagita K, Nakashima H, Matsumoto T, Jiang SX, Saegusa M, Satoh Y, Masuda N, Sato Y. Acquisition of useful sero-diagnostic autoantibodies using the same patients' sera and tumor tissues. Biomed Res 2014, 35: 133-143, (査読有り) DOI:10.2220/biomedres.35.133

Minami S, Nagashio R, Ueda J, Matsumoto K, Goshima N, Hattori M, Hachimura K, Iwamura M, Sato Y. Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. Biomed Res 2014, 35: 25-35, (査読有り) DOI:10.2220/biomedres.35.25

Ryuge S, Sato Y, Jiang SX, Wang G, Kobayashi M, Nagashio R, Katono K, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N. The clinicopathological significance of Lgr5 expression in lung adenocarcinoma. Lung Cancer 2013, 82: 143-148, (査読有り) DOI:10.1016/j.lungcan.2013.06.010

Masunaga A, Nagashio R, Iwamoto S, Takeyama N, Sato Y, Miyazaki A, Mitsuya T. A case of pulmonary papillary adenoma: possible relationship between tumor histogenesis/tumorigenesis and fibroblast growth factor receptor 2 IIIb. Pathol Int 2012, 62: 640-645, (査読有り) DOI:10.1111/j.1440-1827.2012.02841.x

〔学会発表〕(計 11 件)

長塩 亮、他、エクソゾーム含有蛋白質を免疫源に作製した抗体の肺腺癌における血清診断マーカーとしての有用性について、第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月 1 日、「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

長塩 亮、抗体を基盤としたプロテオミクスによるがんの診断と治療・予後推定マーカーの探索、北里大学癌プロフェッショナル養成基盤推進プランセミナー～バイオマーカーとオーダーメイド放射線治療の可能性～、2015 年 3 月 21 日、「メディコンヘルスケアサイエンスセンター東京(東京都・品川区)」

長塩 亮、抗体を基盤としたプロテオミクスによる癌の診断や予後予測マーカーの探索、BIO tech 2014 アカデミックフォーラム、2014 年 5 月 15 日、「東京ビッグサイト(東京都・江東区)」

長塩 亮、他、エクソゾーム含有蛋白質を免疫源に作製した単クローン性抗体を利用した肺腺癌の診断マーカー探索について、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 25 日、「広島国際会議場・ANA クラウンプラザホテル広島(広島県・広島市)」

Nagashio R, et al, Diagnostic Significance of MUC5B and TTF-1 Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer, HUP0 12th Annual World Congress, 2013 年 9 月 15 日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

長塩 亮、他、肺腺癌における TTF-1 発現と MUC5B 発現の関係性とその診断的有用性について、第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 7 日、「ロイトン札幌、さっぽろ芸文館(北海道・札幌市)」

長塩 亮、抗体を用いたプロテオミクスによる癌の診断並びに予後予測マーカーの獲得、BIO tech 2013 アカデミックフォーラム、2013 年 5 月 9 日、「東京ビッグサイト(東京都・江東区)」

長塩 亮、肺腺癌における MUC5B の診断的有用性ならびに予後との関連について、第 10 回北里疾患プロテオーム研究会、2012 年 8 月 23 日、「北里大学相模原キャンパス(神奈川県・相模原市)」

長塩 亮、他、肺腺癌における MUC5B 発現と予後との関連について、第 63 回日本電気泳動学会総会、2012 年 8 月 20 日、「沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)」

長塩 亮、他、抗体を基本とした癌の早期診断マーカーの探索 -臨床検査への応用を目指して-、第 23 回神奈川県臨床検査医学会大会、2012 年 6 月 2 日、「横浜情報文化センター(神奈川県・横浜市)」

長塩 亮、他、肺腺癌における MUC5B の診断的有用性について、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、「京王プラザホテル

(東京都・新宿区)」

〔図書〕(計1件)

長塩 亮、佐藤雄一、文光堂、病理と臨床
第32巻臨時増刊号 免疫組織化学 診断と
治療選択の指針、2014、12-18

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：生体試料中の個別多種及び/又は混
合多種の疾患関連自己抗体の検出方法、キッ
ト及び検出装置

発明者：鉢村和男、佐藤雄一、長塩亮、前田
忠計、狩野有作

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2014-84841

出願年月日：平成 26 年 4 月 16 日

国内外の別：国内

名称：生体試料中の疾患関連自己抗体の検
出方法、キット及び検出装置

発明者：鉢村和男、佐藤雄一、長塩亮、前田
忠計、狩野有作、山田雅雄、横田京子

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2014-048169

出願年月日：平成 26 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

名称：膀胱癌診断用ポリペプチドマーカー
及び膀胱癌診断用キット及びこれらを使用
する方法

発明者：佐藤雄一、松本俊英、松本和将、長
塩亮、鉢村和男、五島直樹、川上和孝

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2012-174602

出願年月日：平成 24 年 8 月 7 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/ahs/ml/rinken/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長塩 亮 (NAGASHIO, Ryo)

北里大学・医療衛生学部医療検査学科

臨床検査学・講師

研究者番号：40618568