

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462411

研究課題名(和文)腎癌における血液中バイオマーカーとなるmiRNA網羅的探索と新規核酸治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a novel method to analyze cancer-derived circulating exosomes

研究代表者

植村 元秀 (Uemura, Motohide)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40631015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌における血液中バイオマーカーとなるmiRNA網羅的探索と新規核酸治療薬の開発のために、まず癌特異的エクソソームに着目し、研究を開始した。特に患者血清から癌特異的エクソソームを抽出、濃縮する方法として腎癌に高発現し、またエクソソームの膜上に存在するタンパクによって免疫沈降を行うことを予定したが、この手法による腎癌特異的エクソソームの濃縮は期待したほどの効果はなかった。そこで、腎癌組織および正常腎組織から分泌されるエクソソーム別々に得る方法を新規に開発し、知財の確保を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop novel methods for detecting cancer-specific exosomes. We cultured paired renal cancer tissues and matched adjacent non-cancerous kidney tissues using our novel methods and obtained extracellular vesicles (EVs) derived from the matched tissues using an ultracentrifuge method. We confirmed that the EVs collected by our methods were genuine exosomes in terms of their size and morphologic features. Then, comprehensive proteomics analysis was performed by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) for exosomes obtained from cultured medium and matched patient serum. Protein identification was performed by Sequest and Mascot search. We identified several exosomal proteins in patient serum that could serve as biomarkers for renal cancer. We have also issued a patent application (2016-211239) so that our methods can be applied for international use.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

転移性腎細胞癌に対しては分子標的薬治療が標準治療となったが、いずれも奏効率は高々30%程度にすぎず、さらなる成績の改善が急務である。また腎細胞癌に対する有用な血液バイオマーカーは存在せず、長年その登場が望まれている。近年、ゲノム情報発現系における新たな調節・制御分子としてマイクロRNA(miRNA)が注目されている。miRNAはタンパクに翻訳されないnon-coding RNAであり翻訳阻害あるいはRNA干渉により標的分子を阻害することから、がん遺伝子やがん抑制遺伝子と同様にがんの発生・分化における分子機序に深く関与すると考えられている。さらに最近になって癌細胞が自らのmiRNAをエクソソームと呼ばれる小胞体に封入して血液、尿中に分泌し、周囲の細胞をより浸潤、増殖しやすい環境に変化させたり、血管などを通して転移先に到達し転移、進展し易い環境へと変化させることが明らかになっている。このようにエクソソームはいくつかのタンパクとmiRNAなどのRNAの断片を含んで、癌細胞から分泌されていることから癌の診断や治療効果判定に用いられるのではないかと期待されている。最近になって尿や血液中に存在するエクソソーム内のmiRNAが癌のバイオマーカーとして有用とする報告がなされてきたが、臨床の場で利用できるものはない。癌細胞は分泌するエクソソームによって細胞自身の増殖を促進するのみならず、転移に適した微小環境の形成以外にも免疫抑制状態の誘導など全身性環境も癌細胞に有利な方向へと変化をさせる作用などをもつことが報告されており、癌細胞が分泌するエクソソームを検出することは癌の状態を知るためのバイオマーカーになるだけでなく、治療標的にもなり得るものと考えている。われわれは癌特異的エクソソームの存在とその中に含ま

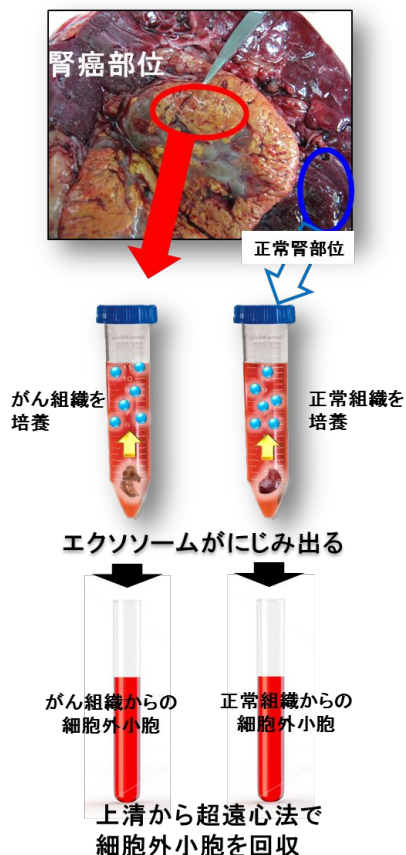
れるmiRNAに着目し、これを選択的に抽出することによって、より生物学的に意義深いmiRNAの同定が可能になると考えた。予後不良とされている転移性腎細胞癌患者の治療選択、治療効果判定に用いることのできる実用的バイオマーカーを開発し、臨床応用をめざすため、腎癌患者特異的に血液中に分泌されるmiRNAを同定しその検出、定量を行う。さらに微小環境(microenvironment)を制御する癌細胞特異的エクソソームに含まれるmiRNAを阻害することは新規治療薬の開発に直結するものと考えた。

2. 研究の目的

腎癌における血液中バイオマーカーとなるmiRNA網羅的探索し、新規核酸治療薬を開発する。

3. 研究の方法

腎細胞癌手術検体より癌組織と正常組織をそれぞれ採取し、それらを短時間培養液中で培養し、培養液中に分泌されたエクソソームを超速心法にて分離した。



回収した細胞外小胞がエクソソームであることを次の3つの手法を用いて確認した

Western blot 法にてエクソソームのマーカである CD63、CD81、CD9 の発現を確認する
 ナノ粒子解析装置を用いた粒子径の測定、
 透過型電子顕微鏡によるエクソソームタンパクである CD9 陽性の粒子の確認

4. 研究成果

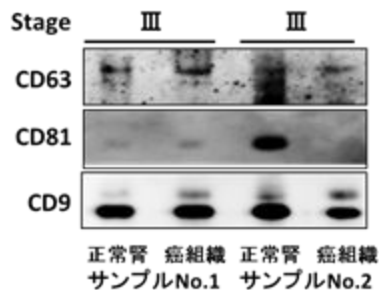


図 Western blotting によるタンパクの発現解析
 エクソソーム膜に特異的に発現を認めるとされるマーカータンパク (CD9、CD63、CD81) の発現を認める。

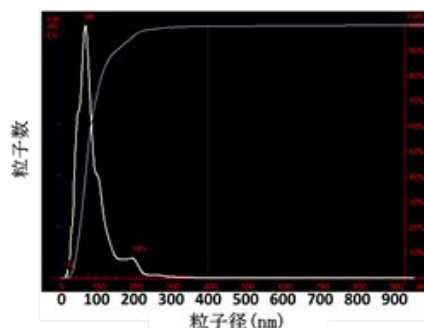


図 ナノ粒子解析
 組織から培養することによって得た細胞外小胞はエクソソームと定義される 200nm 以下の粒子が高濃度に抽出されていることが確認された。

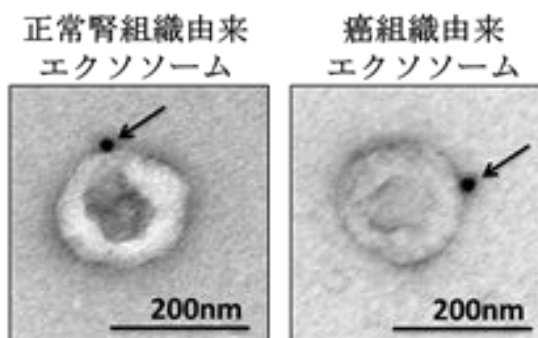


図 透過型電子顕微鏡写真
 粒子径の解析のみならず電子顕微鏡を用いた形態学的観察においても CD9 陽性エクソソームの存在が確認された。
 (; 金コロイド標識 CD9 抗体)

われわれが開発した手法によって、組織特異的に由来するエクソソームが抽出できることが示され、質量分析を用いた発現タンパク質の網羅的解析によって、多くの癌由来特異的タンパク質も同定された。さらにプレリミナリーではあるが、腎癌患者の血液中にも一部の同じタンパク質が同定されたことから、血液バイオマーカー探索の有用な手法となり得る革新的な技術であり、新規治療の開発も期待され、われわれの次研究につながるものとなった。

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 0 件)

投稿中

〔学会発表〕(計 1 件)

第 104 回 日本泌尿器科学会総会 仙台市宮城県 2016 年 4 月 23 日

腎癌特異的細胞外小胞(エクソソーム)の新規解析手法の開発と血液バイオマーカー探索および治療への臨床応用

植村元秀、中田渡、木内利郎、河嶋厚成、氏家剛、永原啓、藤田和利、神宮司健太郎、辻川和丈、植田幸嗣、宮川康、野々村祝夫

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: バイオマーカーの探索方法、及び腎がんマーカー

発明者: 植田幸嗣、大西なおみ、野々村祝夫、植村元秀、藤田和利、辻川和丈、神宮司健太郎

権利者: 植田幸嗣、大西なおみ、野々村祝夫、植村元秀、藤田和利、辻川和丈、神宮司健太郎

種類: 特願

番号: 2016-211239

出願年月日: 2016 年 10 月 28 日

国内外の別: 国際

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 元秀 (UEMURA Motohide)

大阪大学大学院医学系研究科・泌尿器腫瘍標的治療学寄附講座・寄附講座准教授

研究者番号: 40631015

(2) 研究分担者

藤田 和利 (FUJITA Kazutoshi)

大阪大学大学院医学系研究科・器官制御外科学講座(泌尿器科学)・講師

研究者番号: 50636181

(3) 連携研究者

神宮司 健太郎 (JINGUSHI Kentaro)

大阪大学大学院薬学研究科・分子細胞生理学・招へい教員

研究者番号: 80707571

辻川 和丈 (TSUJIKAWA Kazutake)

大阪大学大学院薬学研究科・分子細胞生理学・教授

研究者番号: 10207376

野々村 祝夫 (NONOMURA Norio)

大阪大学大学院医学系研究科・器官制御外科学講座(泌尿器科学)・教授

研究者番号: 30263263