

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09357

研究課題名(和文) エクソソームを利用した下垂体腺腫でのソマトスタチン受容体発現の評価システムの開発

研究課題名(英文) Development of analyzing system for expression level of somatostatin receptors in pituitary neuroendocrine tumors using exosome

研究代表者

大山 健一 (Oyama, Kenichi)

国際医療福祉大学・国際医療福祉大学三田病院・教授

研究者番号：70350048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、術後の免疫組織染色でしか知り得ないGH産生下垂体腺腫でのソマトスタチン受容体(SSTR)サブタイプの発現を、末梢血エクソソームの解析により測定するシステムを構築した後、術前後の患者の血清で測定し、組織でのSSTRの発現レベルとの相関を検討することにより、エクソソームによるソマトスタチンアナログの薬効予測診断の実現に向けた基盤的な知見を得ることを目的として行った。結果として、培養細胞液上清からのエクソソームの単離が可能であること、SSTRの発現解析に有用な抗体があること、SSTR2発現プラスミドが確かに機能していること、などが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から放出され体液中に存在するエクソソームは由来する細胞の特徴を反映していることから、様々な疾患で新たなタイプのバイオマーカーとして注目されている。本研究は、術後の免疫組織染色でしか知り得ないGH産生下垂体腺腫でのソマトスタチン受容体(SSTR)サブタイプの発現を、末梢血エクソソームの解析により測定するシステムを構築した後、術前後の患者の血清で測定し、組織でのSSTRの発現レベルとの相関を検討することにより、エクソソームによるソマトスタチンアナログの薬効予測診断の実現に向けた基盤的な知見を得ることを目的としている。

研究成果の概要(英文)：We have carried out this research project aiming to build up the analyzing system for expression level of somatostatin receptors (SSTRs) in pituitary neuroendocrine tumors using exosome and thereafter analyze the relationship between expression level of SSTRs in patients' blood sample and expression level of SSTRs in tumor tissue sample. As the results, we found that (1) we could isolate exosome from cultured cell supernatant, (2) immunohistochemically we could detect SSTR in the isolated exosome, and (3) plasmid containing SSTRs were surly functionally active.

Based on the results of this research, we will proceed to develop the analyzing system for expression level of somatostatin receptors in pituitary neuroendocrine tumors using exosome.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：下垂体神経内分泌腫瘍 エクソソーム ソマトスタチン受容体 ソマトスタチンアナログ 先端巨大症

1. 研究開始当初の背景

GH 産生下垂体腺腫におけるソマトスタチンアナログ (SSA) の薬効予測因子には、腫瘍径や MRI の T2 信号強度、SSTR5 遺伝子多型等、術前検索可能な項目もあるが、多くは摘出腺腫の病理組織学的検索に頼らざるを得ず (分泌顆粒の形態: DG type か SG type か、SSTR サブタイプ発現解析、Ki-67 index、ZAC1 や AIP の発現解析等)、非手術例での薬効予測は困難である (*Mol Endocrinol.* 52:R223, 2014)。

SSA の薬効予測の上で鍵となるのは、ソマトスタチン受容体 (SSTR) のサブタイプの発現パターンとその発現量である。第一世代 SSA では SSTR2 の発現が (*Neuroendocrinology.* 71:344, 2001) 新世代 SSA (パシレオチド) では SSTR5 の発現が薬効予測に重要とされている (*Eur Endocrinol.* 174:241, 2016)。

細胞から放出される膜小胞であるエクソソームは由来する細胞のタンパク・核酸を含有し体液中に存在することから、新たなタイプのバイオマーカーとして期待されている。由来する細胞の表面に発現している受容体がエクソソーム上に発現していることはよく知られており、例えば、ヒト上皮様細胞癌 A431 細胞由来エクソソームの表面には EGF 受容体が発現している (*Exp Cell Res.* 1:314, 2008)。したがって、GH 産生腺腫細胞から放出されるエクソソームに SSTR が発現しているものと予想される。エクソソーム上での SSTR のサブタイプ発現パターンとその発現量、さらには truncated SSTR5 variants の有無 (*J Clin Endocrinol Metab.* 95:2497, 2010) を測定することができれば、手術例では病理診断を補強する SSA の薬効予測マーカー、非手術例では病理診断に代わるマーカーとなりうる。

SSTR は脳の中樞神経、膵ラ氏島、胃等でも発現しているため (*Front Neuroendocrinol.* 20:157, 1999) 末梢血中には GH 産生腺腫以外の細胞から放出された SSTR 陽性エクソソームが存在することから、GH 産生腺腫細胞由来のエクソソームを特異的に捕捉する必要がある。最近になり、摘出した腫瘍の培養液から単離したエクソソームのプロテオーム解析により腫瘍特異的タンパクを同定した報告がなされていることから (*Int J Cancer.* 142:607, 2018) 本研究では、その方法を用いて GH 産生腺腫細胞特異的の表面タンパクを同定する。

血液中に存在する GH 産生腺腫細胞由来エクソソームを GH 産生腺腫細胞特異的の表面タンパクに対する抗体で捕捉した後、SSTR を測定することにより、GH 産生腺腫でのサブタイプとその発現量を推測することができるか? 将来的には、末梢血中の GH 産生腺腫由来 SSTR 陽性エクソソームの測定により SSA の薬効予測が可能か? という学術的「問い」を設定した。

2. 研究の目的

術後の免疫組織染色でしか知り得ない GH 産生下垂体腺腫でのソマトスタチン受容体 (SSTR) サブタイプの発現を、末梢血エクソソームの解析により測定するシステムを構築した後、術前後の患者の血清で測定し、組織での SSTR の発現レベルとの相関を検討することにより、エクソソームによるソマトスタチンアナログ (SSA) の薬効予測診断の実現に向けた基盤的な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

下垂体腺腫細胞株と下垂体腺腫の培養液からのエクソソーム単離

下垂体腺腫細胞株 (ラット GH3 細胞、マウス AtT20 細胞、ヒト HP75 細胞など) を 24 時間 無血清またはエクソソームフリーの条件下で培養後、上清を採取する。ヒト下垂体腺腫 (GH 産

生腺腫、ACTH 産生腫瘍、非機能性腺腫など)の摘出組織を1時間無血清またはエクソソームフリーの条件下で培養後、上清を採取する。上清から超遠心法またはサイズ排除クロマトグラフィーによりエクソソームを単離した後、エクソソームマーカーに対する抗体(CD9、CD63等)を用いてウエスタンブロットを行い、エクソソームの単離を確認する。

GH 産生腺腫細胞由来エクソソームでの SSTR サブタイプ発現パターンの確認

単離したエクソソームについて、抗 SSTR1~5 抗体によるウエスタンブロットを行い、GH 産生腺腫細胞由来エクソソームでの SSTR サブタイプの発現パターンを確認する。

プロテオーム解析による GH 産生腺腫細胞特異的表面タンパクの同定

単離したエクソソームについて、iTRAQ 法によるプロテオーム解析を行い、GH 産生腺腫細胞で特異的に発現が増加しているタンパクの中で、細胞表面に発現しているタンパクを選抜する。

4 GH 産生腺腫細胞由来 SSTR 陽性エクソソームの検出システム構築

選抜した SSTR のサブタイプと GH 産生腺腫細胞特異的表面タンパクを過剰発現する HEK293 細胞を樹立する。培養液から単離したエクソソームを用いて、GH 産生腺腫細胞特異的表面タンパクに対する抗体で捕捉し、抗 SSRT 抗体によりエクソソーム上の SSRT を検出するサンドイッチ ELISA システムを構築する

GH 産生腺腫細胞由来 SSTR 陽性エクソソームの臨床的有用性検証

構築した GH 産生腺腫細胞由来 SSTR 陽性エクソソーム検出システムを用いて、術前後の患者(術後3ヶ月で臨床的寛解が確認された患者に限る)血清で測定し、術前と比較し術後に低下していることを確認する。さらに、免疫染色による摘出組織での SSTR の発現レベルとの相関を検討する。これにより、検出システムの臨床的有用性を検証する。

4. 研究成果

初期研究として、ヒト胎児腎細胞(HEK細胞)にソマトスタチン受容体2型(SSTR2)プラスミドを導入し、24時間エクソソームフリーの条件下で培養。培養液の上清を採取し、上清から超遠心法によりエクソソームを単離した後、エクソソームマーカーに対する抗体を用いてウエスタンブロットを行い、エクソソームの単離を確認した。さらに単離を確認したエクソソームにおける SSTR2 の発現の有無を検討した。この際、最適濃度等の情報も十分でないため、まずはややタンパク量多め、抗体濃度高めにて行なったところ、エクソソーム内に SSTR2 の発現が確認された。このため引き続き同実験系にて至適タンパク量及び至適抗体濃度の検討を行った。結果として培養細胞液上清からのエクソソームの単離が可能であること、SSTR の発現解析に有用な抗体があること、SSTR2 発現プラスミドが確かに機能していること、などが確認できた。引き続き同実験系にて至適タンパク量及び至適抗体濃度の検討を行なっているが、至適タンパク量及び至適抗体濃度が定まれば、今後予定する下垂体腺腫細胞株エクソソームにおける SSTR サブタイプの発現解析にスムーズに着手することが可能となり、現在研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	盛田 幸司 (Morita Koji) (30535216)	帝京大学・医学部・病院教授 (32643)	
研究分担者	川上 恭司郎 (Kawakami Kyojiro) (90589227)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	

	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
研究協力者	江戸 直樹 (Edo Naoki)		

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