

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23002

研究課題名（和文）骨転移に対する新規血液バイオマーカーGDPP発現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of expression of GDPP, a novel blood biomarker of bone metastases

研究代表者

山道 岳 (Gaku, Yamamichi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40882262

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）：転移性骨腫瘍はほとんどの癌腫で起こり得るうえにQOLを大きく低下させるため早期発見・早期治療が重要な病態である。我々が血中で測定可能な新規タンパクとして同定しELISAによる測定キットを確立したgrowth differentiation factor 15 propeptide(GDPP)は、破骨細胞・骨芽細胞・骨細胞から分泌されるため既存の骨代謝マーカーより有用である可能性がある。そこで我々は前立腺癌・尿路上皮癌・腎癌患者検体を用いてGDPPの骨転移診断能を検討したところ、GDPPではAUC0.90,0.87,0.81でありいずれもALPよりも高値(0.65,0.87,0.67)であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が新規に見出し作成した血中GDPP測定キットは泌尿器癌において、従来の日常臨床で用いられている骨代謝マーカーよりも骨転移を鋭敏に診断できかつ、骨転移量とも強く相関している可能性が示された。血中バイオマーカーとしてGDPPを測定することは、骨転移診断を簡便かつ早期に行えて患者のQOLや予後の改善に寄与する可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Early detection and early treatment are important for bone metastases, as they can occur in almost all carcinomas and significantly reduce QOL. Growth differentiation factor 15 (GDPP), which we identified as a novel protein that can be measured in blood and established a measurement assay system, is secreted by bone-related cells, such as osteoclast, osteoblast and osteocyte and may be more useful than existing bone turnover markers. We investigated the diagnostic ability of GDPP for bone metastasis using samples from prostate, urothelial, and renal cancer patients, and found that the AUC values of GDPP were 0.90, 0.87, and 0.81, all higher than those of ALP (0.65, 0.87, and 0.67).

研究分野：泌尿器癌

キーワード：GDPP 転移性骨腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨転移は様々な癌腫でおこりえる病態であり、骨関連事象(Skeletal related event: SRE)により終末期の癌患者に対して大きな苦痛を与えうる。我々泌尿器科医が扱う前立腺癌の骨転移において、早期に骨修飾薬を開始することで SRE がおきにくくなるが、骨転移診療ガイドラインでも骨転移の診断における有効な画像検査や血中の骨代謝マーカーの記載は無く早期診断は困難とされている。そのため簡便かつ正確な骨転移の診断およびモニタリングにつながる検査の開発が求められている。

われわれは血液バイオマーカー探索のために、種々の癌細胞株の上清に対して質量分析を用いた網羅的タンパク質解析をおこない、他の泌尿器癌とともに前立腺癌では成長分化因子 GDF15(Growth differentiation factor)のプロペプチドである GDPP(GDF15 propeptide)が上昇していることを見出していた。mGDF15(mature GDF15)と異なり GDPP が血中に分泌されるという報告は無く細胞動態や機能に関しては不明である。そこで前立腺癌患者の血中 GDPP 値をサンドイッチ ELISA 法で測定したところ、骨転移がある患者において GDPP が上昇することを示した。さらに腎癌や肺癌や乳癌でも同じように、血中 GDPP 値は骨転移があると上昇することが確認できたので GDPP は骨転移診断やモニタリングに有用なバイオマーカーである可能性があると考えている。そこで血中 GDPP 測定の臨床応用を目指し、骨転移を定量的に評価する新しい血液バイオマーカーとして有用か評価していく。

2. 研究の目的

GDPP はわれわれが世界に先駆けて発見した血中のバイオマーカーであるという学術的独自性がある。そこで様々な癌腫において骨転移の有無と血中 GDPP 値の相関や、その臨床的有用性を検討する。さらに、骨転移巣において GDPP が高発現するメカニズムを明らかにして、骨転移診断やモニタリングに有用な新規血液バイオマーカー開発につなげることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)GDPP と mGDF15 の細胞内外における動態を検討する

mGDF15 と GDPP との細胞内外での動態を確認する。つまり、細胞内では GDPP と mGDF15 が結合した状態である pro GDF15 として存在し、タンパク切断酵素である furin によりこの結合が切断されて細胞外では分離した状態で存在するかを評価し、GDPP がヒトの血中に確かに分泌されており、新たなバイオマーカーとして利用できるものであるかを検討する。pro GDF15 が高発現している前立腺癌細胞株 LNCaP の whole cell lysate(WCL)と培養上清とペレットを用いて western blotting 法と蛍光免疫染色法を、GDPP 部を認識する抗体と mGDF15 部を認識する抗体を用いて行い細胞内外での動態を調べる。また、LNCaP に furin を添加することによる GDPP の動向の変化を検討する。

(2) 前立腺癌組織・骨関連細胞株や骨組織での GDPP の発現を検討する

骨関連細胞株である MC3T3-E1(マウス骨芽細胞株)、OSC14C(マウス破骨細胞株)、MLO-Y4(マウス骨細胞株)での GDPP の発現を western blotting 法を用いて検討し、腫瘍細胞以外にも骨転移により骨のリモデリングが活性化することで GDPP の分泌が亢進するかを検討する。また、ヒト前立腺癌の骨転移組織に免疫染色法を用いて骨転移の病態における GDPP の局在を評価する。

(3) GDPP の癌細胞や骨芽細胞に対する機能を検討する

GDPP を含むプラスミドを HEK293T 細胞に transfection し、その培養上清から strep-tag カラムを用いて recombinant human GDPP を精製・作成する。この recombinant GDPP を前立腺癌細胞株や骨芽細胞株に添加し癌や骨転移に関してどのように GDPP が関与するのかを検討する。

(4) ヒト血液検体における骨転移の有無と血中 GDPP 値の相関関係を検討する

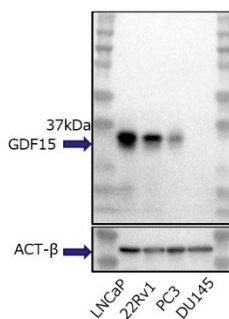
当科でバンキングしている泌尿器癌(前立腺癌・尿路上皮癌・腎癌)患者の血液検体中における GDPP 値と骨転移の有無の相関を検討し骨転移診断能を評価する。また、前立腺癌患者の骨転移量を表す指標である骨シンチグラフィの BSI(bone scan index)と GDPP 値との関係を検討する。

4. 研究成果

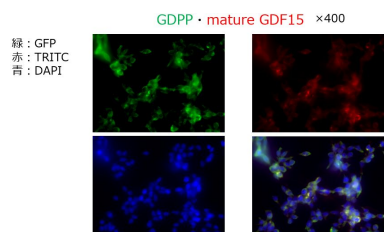
(1) GDPP と mGDF15 の細胞内外における動態

前立腺癌細胞株の WCL における GDF15 の発現には細胞株間の違いがあり LNCaP が高発現で DU145 は発現が乏しかった(図 1A)。そこで LNCaP 細胞株のペレットを用いて、GDPP 部を認識する抗体と mGDF15 部を認識する抗体を用いて蛍光免疫染色を行うと細胞内では GDPP と mGDF15 が同部位に共同在しており、細胞内では切離されずに全長で存在することが確認できた(図 1B)。培養上清を用いた検討では GDPP と mGDF15 は、結合した状態では存在せず切離された状態のみで存在しており WCL と同様に LNCaP で高発現していた(図 1C、1D)。LNCaP に furin 阻害剤を添加すると培養上清中に GDPP や mGDF15 は分泌されずに細胞内に全長の proGDF15 が貯留することが分かった(図 1E)。

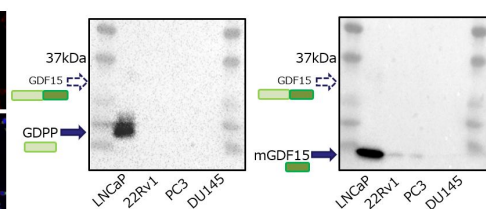
1 A



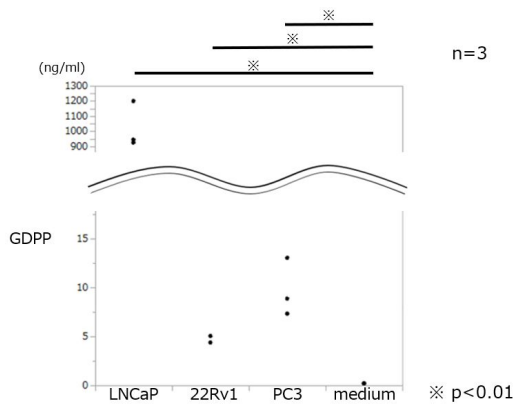
1 B



1 C



1D



1E

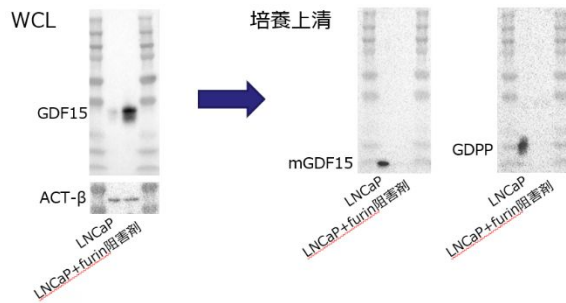


図 1A: 前立腺癌細胞株の whole cell lysate における WB 画像

図 1B: LNCaP 細胞ペレットにおける蛍光免疫染色画像

図 1C: 前立腺癌細胞株の培養上清における WB 画像

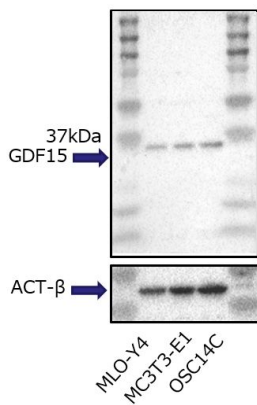
図 1D: 前立腺癌細胞株の培養上清に対する ELISA 法による GDPP 測定

図 1E: 前立腺癌細胞株における furin 阻害剤添加の有無による WB 画像

(2) 前立腺癌細胞株・骨関連細胞株での GDPP の発現

骨芽細胞株・破骨細胞株・骨細胞株の WCL いずれにおいても GDF15 は発現しており、前立腺癌骨転移組織においても同様に前立腺癌細胞以外に骨関連細胞でも GDF15 が発現していることが判明した(図 2A、2B)。

2A



2B

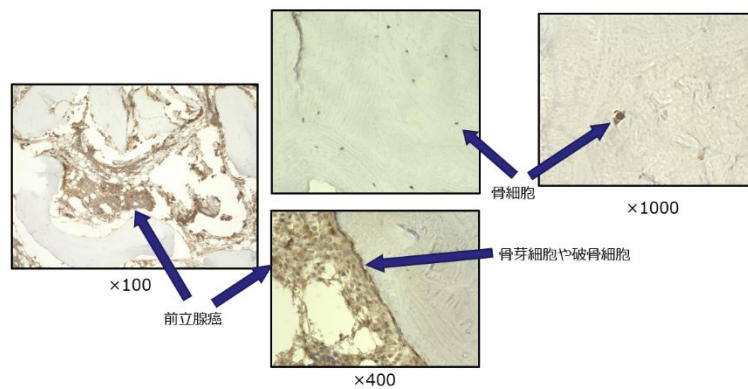


図 2A: 骨関連細胞株の whole cell lysate における WB 画像

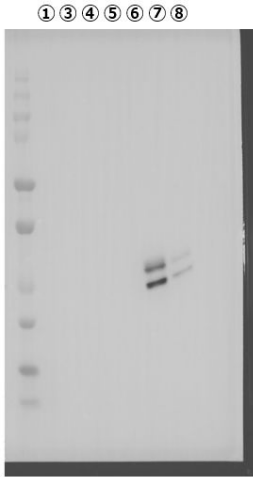
図 2B: 前立腺癌骨転移組織における免疫染色画像

(3) GDPP の癌細胞や骨芽細胞に対する機能

HEK293T 細胞を用いて recombinant human GDPP を作成し(図 3A)、前立腺癌骨転移組織の細胞株である PC-3 とヒト骨芽細胞株である HOB の GDF15 ノックダウン細胞株に GDPP を添加したとこ

ろ、増殖機能が亢進した(図 3B、3C)。

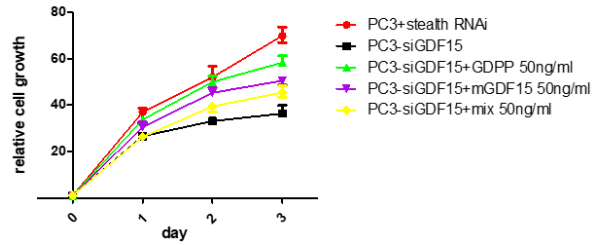
3A



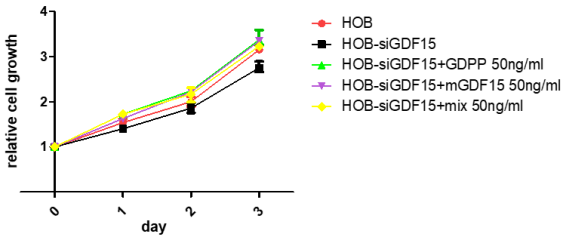
<sample>

- ① 組換えGDPP培養上清
- ② Strep-tagカラムpass-1
- ③ Strep-tagカラムpass-2
- ④ Strep-tagカラム溶出Fr.1
- ⑤ Strep-tagカラム溶出Fr.2
- ⑥ Strep-tagカラム溶出Fr.3
- ⑦ Strep-tagカラム溶出Fr.4
- ⑧ Strep-tagカラム溶出Fr.5

3B



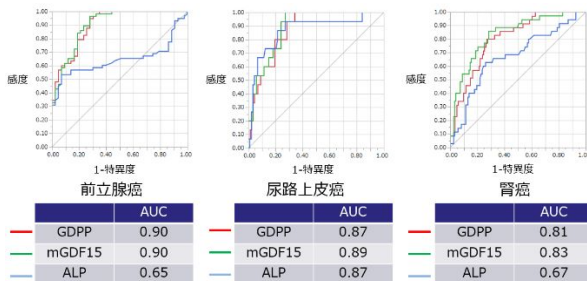
3C



(4) ヒト血液検体における骨転移の有無と血中 GDPP 値の相関

前立腺癌患者 67 例(骨転移 58 例)、尿路上皮癌患者 43 例(骨転移 14 例)、腎癌患者 99 例(骨転移 35 例)、健常者 59 例の血液検体を用いて骨転移の有無と血中 GDPP 値の関係を検討したところ、GDPP の AUC は 3 癌種ともにおいて実臨床で骨転移の指標として用いられている ALP よりも高値であった(図 4A)。さらに BSI を測定している前立腺癌患者 42 例において BSI 値と血液データの相関を検討したところ ALP、PSA、mGDF15 よりも GDPP が強く BSI と相関していた(図 4B)。

4A



4B

	r	p値*
GDPP vs ALP	0.81 vs 0.13	<0.001
GDPP vs PSA	0.81 vs 0.41	0.0069
GDPP vs mGDF15	0.81 vs 0.45	0.0135

図 4A: 前立腺癌・尿路上皮癌・腎癌患者の血中 GDPP、mGDF15、ALP と骨転移の有無別 AUC

図 4B: 前立腺癌骨転移患者における BSI 値と血中バイオマーカーの相関比較

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------