

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 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：2015～2017

課題番号：15K10588

研究課題名(和文) 前立腺癌由来エクソソームを用いた癌進展機構の解明および新規尿中マーカーの開発

研究課題名(英文) The analysis of prostate cancer exosome and the development of new urinary biomarker

研究代表者

藤田 和利 (Fujita, Kazutoshi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50636181

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)：尿中エクソソームに着目し、プロテオミクスの手法を用いて高リスク前立腺癌の新規尿中バイオマーカーの探索を行った。iTRAQ法を用いて尿中エクソソームより合計3520個のタンパクを同定した。11個のタンパクがGS8-9群で有意に上昇していた。これら複数のタンパクをバイオマーカー候補としてSRM/MRM法にて検証したところ、FABP5が有意にGleason scoreと関連し、また生検陰性群に比べ前立腺癌患者において有意に高値を示した。ヒト前立腺全摘標本でFABP5の発現を検討したところ、高グリソンスコア前立腺癌での高発現を認め、前立腺癌細胞株での検討でもエクソソーム中のFABP5の発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) are microvesicles secreted from various cell types. EVs contain microRNAs, proteins, and mRNAs and play a role in intercellular communications via the mechanisms of exocytosis and endocytosis. The objective of this study is to discover a biomarker of high risk prostate cancer in urinary extracellular vesicles. This is the strategy of biomarker discovery. Urinary EVs were isolated by ultracentrifuges and confirmed by western blots and electromicroscopy. Protein were labelled with iTRAQ, and we found several biomarker candidates by LC-MS/MS analysis. Those candidates were verified by SRM analysis in an independent cohort. SRM analysis showed that FABP5 was associated with high Gleason score prostate cancer. Multivariate analysis showed that FABP5 was significantly associated with high gleason score. Immunohistochemical analysis showed that FABP5 was overexpressed in high Gleason score prostate cancer. Prostate cancer cell lines and those EVs expressed FABP5.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 エクソソーム 尿中バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌腫瘍マーカーの PSA 検査により前立腺癌の早期発見が可能となったが、未だ多くの患者で High risk 前立腺癌が転移を起こし、年間 1 万人以上の日本人が前立腺癌により死亡する。このため High risk 前立腺癌の進展、転移のメカニズムを解明することが重要である。

癌細胞は自らのタンパクや核酸などをエクソソームと呼ばれる膜小胞を形成して細胞外へ輸送し、離れた部位もしくは周囲の細胞に到達し、血管内皮細胞や免疫細胞に影響を及ぼし転移、進展を促進していることが明らかになりつつある(図 1A-B)(Zhou W et al. *Cancer Cell*. 2014; 25(4):501-15)。

エクソソームの機能については未解明な点が多いが、血液や尿中に安定して存在し、診断や治療への応用が期待されている。直腸診後の尿中に前立腺癌由来の RNA である PCA3 および TMPRSS-fusion gene を含むエクソソームが含まれていることが報告されており(Duijvesz D et al. *Eur Urol*, 2011;59(5),823-31)、直腸診後の尿を用いることにより、生体より前立腺癌由来のエクソソームを簡便に採取することが可能である。現在までに我々は前立腺から産生される前立腺液やそれらが排出される尿を用いて、前立腺癌の進展のメカニズムの解明および新規バイオマーカーとしての有効性の検討を行い、その結果、Endoglin および IL18Bpa が前立腺癌患者由来の尿中に多く含まれ、前立腺癌の新規尿中マーカーとなり、更に癌の進展との関係を明らかにしてきた(Fujita, K., et al. *The Prostate*. 2008 68(8), 872-82, Fujita K et al. *Int J Cancer*. 2009 124(3):664-9, Fujita K et al, *Int J Cancer*. 2011;129(2):424-32)。

2. 研究の目的

本研究では、直腸診後の尿中に存在する前

立腺癌由来のエクソソームに着目し、プロテオミクス的手法を用いて High risk 前立腺癌に特徴的なタンパクを同定し、High risk 前立腺癌の進展のメカニズムの解明を通して新規治療法の開発および前立腺癌の予後と関連する新規のバイオマーカーの開発を試みる。

3. 研究の方法

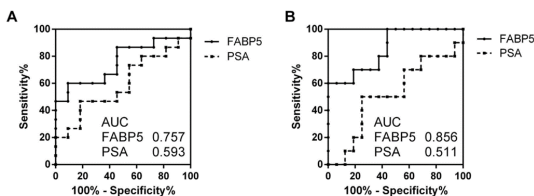
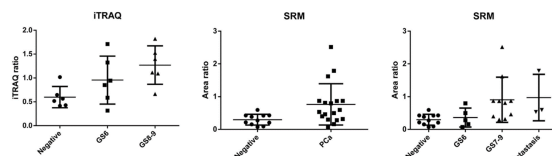
尿中エクソソームの Deep Proteomics 解析および候補タンパク定量分析による検証および候補タンパクの定量分析による検証を行う。次に候補タンパクに着目した前立腺癌エクソソームの in vitro, in vivo での機能解析を行う。最後にバイオマーカー候補物質の多数症例での測定方法の開発および検討を行う。

4. 研究成果

尿中エクソソームに着目し、プロテオミクス的手法を用いて高リスク前立腺癌の新規尿中バイオマーカーの探索を行った。前立腺生検陰性患者、予後良好前立腺癌患者 (Gleason score 6)、予後不良前立腺癌患者 (Gleason score 8-9) から得られた前立腺直腸診後の尿を用いて (各群 6 例)、尿中のエクソソームを超遠心法により抽出精製し、iTRAQ 法を用いて標識し、高分解能質量分析計 (LTQ Orbitrap Elite) で網羅的にタンパクの発現を比較したところ、尿中エクソソームより合計 3520 個のタンパクを同定した。これらのタンパクの中で、生検陰性群に比べ、前立腺癌群で有意に上昇しているタンパクを 11 個認めた (表参照)。これら複数のタンパクをバイオマーカー候補として SRM/MRM 法にて別コホートで検証したところ、FABP5 が有意に Gleason score と関連し、また生検陰性群に比べ前立腺癌患者において有意に高値を示した。ROC 曲線解析では FABP5 の前立腺癌診断能および高リスク前立腺癌の予測

能はともに PSA よりも良い結果であった。また FABP5 以外にも、Granulin, AMBP, CHMP4A, CHMP4C は高グリソン前立腺癌患者尿中のエクソソーム内で有意に上昇していた。前立腺癌に対して施行した前立腺全摘標本で FABP5 の発現を免疫化学染色法にて検討したところ、高グリソンスコア前立腺癌での FABP5 の高発現を認めた。また、前立腺癌細胞株での検討でも、前立腺癌細胞株および、そのエクソソーム中に FABP5 の発現を認め、前立腺癌の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Accession	Protein name	Gene name	PCA/Neg.	p-value	G56/Neg.	p-value	G58-9/Neg.	p-value
Q9Y6U3	Adesverin	SCIN	2.74	0.043	2.79	0.089	2.69	0.031
P02760	Protein AMBP	AMBP	2.72	0.041	2.69	0.090	2.76	0.035
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	2.31	0.009	1.85	0.020	2.76	0.006
Q96CF2	Charged multivesicular body protein 4c	CHMP4C	2.19	0.040	2.46	0.041	1.93	0.066
Q9UQN3	Charged multivesicular body protein 2b	CHMP2B	2.14	0.028	2.42	0.019	1.86	0.080
Q9UQB8	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	BAIAP2	2.07	0.031	2.22	0.040	1.91	0.047
P28799	Granulin	GRN	2.00	0.013	1.99	0.071	2.02	<0.001
Q9HCH5	Synaptotagmin-like protein 2	SYTL2	1.95	0.028	1.87	0.029	2.03	0.050
P27797	Calreticulin	CALR	1.87	0.024	1.89	0.035	1.85	0.053
Q9BY43	Charged multivesicular body protein 4a	CHMP4A	1.62	0.022	1.66	0.015	1.57	0.065
Q43598	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase I	DNPH1	1.51	0.034	1.42	0.048	1.59	0.051



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 1 件)

Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. Fujita K, Kume H, Matsuzaki K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Uemura M, Miyagawa Y, Tomonaga T, Nonomura N. *Sci Rep.* 2017 Feb 17;7:42961.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Discovery of high-Gleason prostate cancer biomarker candidates from exosomes in urine after massage by proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring. Kazutoshi Fujita, Hideaki

Kume, Kyosuke Matsuzaki, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Motohide Uemura, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR), 2016/7/10, Manchester, UK

2. FABP5 in urinally extracellular vesicles is a potential biomarker of high Gleason score prostate cancer Kazutoshi Fujita, Hideaki Kume, Kyosuke Matsuzaki, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Motohide Uemura, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura AACR 2017, 2017/4/3 Washington D.C.

3. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer Kazutoshi Fujita, Hideaki Kume, Kyosuke Matsuzaki, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Motohide Uemura, Yasushi Miyagawa, Takeshi Tomonaga, Norio Nonomura AUA 2017, 2017/5/16 Boston

4. プロテオミクス解析による尿中前立腺癌由来エクソソームを用いた High risk 前立腺癌新規バイオマーカーの開発 藤田和利, 久米秀明, 松崎恭介, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 植村元秀, 宮川 康, 朝長 毅, 野々村祝夫 日本アンドロロジー学会第 35 回学術大会 2016/6/24 前橋

5. 尿中前立腺癌由来エクソソームのプロテオミクス解析による High risk 前立腺癌バイオマーカーの開発 藤田和利, 久米秀明, 松崎恭介, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 植村元秀, 宮川 康, 朝長 毅, 野々村祝夫 第 8 回日本 RNA i 研究会・第 3 回日本細胞外小胞学会 JSEV、2016 年 9 月 1 日 広島

6. 尿中エクソソームを用いた高リスク前立腺癌バイオマーカーの開発 藤田和利, 久米秀明, 松崎恭介, 河嶋厚成, 氏家 剛, 永原 啓, 植村元秀, 宮川 康, 朝長 毅, 野々村祝夫 第 32 回前立腺シンポジウム、2016 年 12 月 11 日 東京

7. 尿中エクソソームを用いた泌尿器科癌の診断 藤田和利 第 106 回日本泌尿器科学会総会 2018/4/19 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 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

藤田和利 (FUJITA, Kazutoshi)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：50636181

(2) 研究分担者

野々村祝夫 (NONOMURA, Norio)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30263263

(3) 研究分担者

植村 元秀 (UEMURA, Motohide)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：40631015

(4) 連携研究者

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)
独立行政法人医薬基盤研究所・フロンティア
フロンティア・フロンティア
研究者番号：80227644

(5) 連携研究者

久米 秀明 (KUME, Hideaki)
独立行政法人医薬基盤研究所・フロンティア
フロンティア・研究員
研究者番号：50322714

(6) 連携研究者

松崎 恭介 (MATSUZAKI, Kyouzuke)
大阪大学・医学系研究科・医員
研究者番号：90747081

(7) 連携研究者

林 拓自 (HAYASHI, Takuji)
大阪大学・医学系研究科・医員
研究者番号：50747079