

令和 2 年 11 月 28 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05232

研究課題名(和文) エクソソームによる前立腺がんの質的診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic system for prostate cancer by using exosomes

研究代表者

伊藤 雅史 (ITO, MASAFUMI)

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・研究部長

研究者番号：80393114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームにより前立腺がんの質的診断を行うための検出システムを開発することを目的とした。前立腺がん細胞培養液から単離したエクソソームのプロテオーム解析を行い、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ1(GGT1)を候補マーカーとして同定後、エクソソーム上GGT活性を測定することにより前立腺がんと前立腺肥大の鑑別ができる可能性を示した。＜本項目は特許出願予定であるので、現時点での公表を差し控える。＞以上により、前立腺がんのエクソソーム診断の実用化に資する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中前立腺特異的抗原(PSA)が前立腺がんのマーカーとして使われているが、低値の症例では前立腺肥大との鑑別は困難である。今回、血清中エクソソーム上GGT活性の測定により両者の鑑別ができる可能性を示した。今後、検出システムを構築し多検体で測定することにより、臨床的有用性を確立し、実用化を目指す。一方、＜本項目は特許出願予定であるので、現時点での公表を差し控える。＞

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to develop exosome-based diagnostic systems for prostate cancer (PC). First, we performed proteomic analysis of exosomes isolated from culture medium of PC cell lines and identified gamma-glutamyltransferase 1(GGT1) as a candidate marker for PC. We found that serum exosomal GGT activity was significantly higher in PC patients than in benign prostatic hyperplasia (BPH) patients, suggesting its potential for differential diagnosis of PC and BPH. Second, <本項目は特許出願予定であるので、現時点での公表を差し控える。>

研究分野：病態検査学

キーワード：エクソソーム 前立腺がん 診断システム 去勢・薬剤抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた膜小胞がさらに陥入することにより形成される直径 50-150 nm の膜小胞であり、エクソソームを含む多小胞体のエキソサイトーシスによって細胞外に分泌される。エクソソームの表面には細胞膜タンパクが発現し、中には細胞質内のタンパク・miRNA が含まれる。エクソソームは元の細胞の特徴を反映し、体液中に安定的に存在することから、血液・尿中エクソソームは、新たなタイプのバイオマーカーとして注目されている (Biochim Biophys Acta 1820:940, 2012)。

前立腺がんは診断時アンドロゲン依存性でありアンドロゲンを遮断するホルモン療法により前立腺癌の増殖や著明に抑えられ血中 PSA (前立腺特異的抗原) レベルは劇的に低下するが、最終的には PSA レベルは再上昇し、去勢抵抗性前立腺がん (castration-resistant prostate cancer; CRPC) となることが多い。CRPC になった場合、これまでドセタキセル等タキサン系抗がん剤 (微小管脱重合阻害薬) による化学療法が選択されてきたが、最終的には抵抗性を獲得することが多い。このドセタキセル抵抗性 CRPC に有効な新規タキサン系抗がん剤としてカバジタキセル (cabazitaxel) が、CRPC に対する新規薬剤として、既存のアンドロゲン受容体阻害剤より受容体に親和性の高いエンザルタミド (enzalutamide)、アンドロゲン合成酵素阻害剤 (CYP17 阻害剤) であるアピラテロン (abiraterone) が上市された。これらの新規薬剤の導入に伴い、前立腺がんの治療プロトコールは今後様変わりする可能性があるが、いずれの新規薬剤についても抵抗性の出現は不可避である。また、抵抗性の獲得に伴い、浸潤・転移能の亢進すなわち悪性化が認められることが多い。前立腺がんの治療の現場で、去勢・薬剤抵抗性、悪性化の質的診断が血中エクソソームにより可能となれば、最適な治療法を選択し、副作用を回避できることから、臨床的有用性は極めて大きい。以上のことからエクソソームによる前立腺がんの質的診断を目指した研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソームによる前立腺がんの質的診断を目的として、前立腺がん細胞の培養上清から単離したエクソソームのプロテオーム解析により同定した候補マーカー (γ-グルタミルトランスフェラーゼ 1: GGT1) について、その血清中エクソソーム上の酵素活性を測定し、臨床的有用性の検証を行った。また、前立腺細胞で特異的に発現している前立腺特異的膜抗原 (PSMA) が陽性のエクソソームを検出するシステムを構築し、患者血清を用いて臨床的有用性を検証した。

3. 研究の方法

【GGT】

- (1) ホルモン感受性前立腺がん細胞と去勢抵抗性前立腺がん細胞の培養上清から超遠心法によりエクソソームを単離した。
- (2) エクソソームをトリプシン消化しペプチドを iTRAQ 法によりラベルした後、プロテオーム解析を行い、去勢抵抗性の獲得によりエクソソームで発現が変化するタンパク質を同定した。
- (3) プロテオーム解析により同定されたタンパク質の中から GGT1 を選抜し、エクソソーム上の GGT 活性を蛍光プローブにより検出するシステムを構築した後、前立腺がんと前立腺肥大の患者血清でエクソソーム上 GGT 活性を測定し、その臨床的有用性を検証した。

【PSMA】

- (1) エクソソーム上 PSMA を測定するシステムを構築するため、エクソソーム捕捉分子、抗 PSMA 抗体、バックグラウンド等を最適化した。
- (2) 前立腺がん患者血清から Tim4 タンパク質を用いた PS アフィニティ法によりエクソソームを単離した。
- (3) エクソソームに含まれる PSMA 陽性エクソソームを Tim4 分子と抗 PSMA 抗体を用いたサンドイッチ ELISA により検出し、その臨床的有用性を検証した。

4. 研究成果

【GGT】

- (1) 培養細胞を用いたマーカー探索

アンドロゲン依存性の異なる 4 種類の前立腺がん細胞（アンドロゲン依存性：LNCaP > C4 > C4-2 > C4-2B）の培養上清から超遠心法によりエクソソームを単離し、iTRAQ 法によりプロテオーム解析を行い、タンパク質の発現量の比較を行った（表 1）。

C4-2B 細胞で LNCaP 細胞と比較して 1.5 倍以上増加したタンパク質の中から GGT1 に着目した。培養上清から超遠心法で単離したエクソソームおよび培養上清から抗 CD9 抗体または抗 PSMA 抗体を結合させた磁気ビーズで免疫沈降したエクソソームにおける GGT1 の発現レベルをウェスタンブロット解析により検討した。その結果、超遠心法により単離したエクソソームだけではなく、エクソソームマーカー CD9 や前立腺特異的膜抗原 PSMA に対する抗体で免疫沈降したエクソソームでも GGT1 の発現が LNCaP 細胞と比較して C4-2B 細胞で増加していることを確認した。

Accession Number	Protein Name	Gene Symbol	C4 /LNCaP	C4-2 /LNCaP	C4-2B /LNCaP
P05106	Integrin beta-3	ITGB3	0.78	1.50	2.00
O60716	Catenin delta-1	CTNND1	1.10	1.58	1.94
P35221	Catenin alpha-1	CTNNA1	0.97	1.51	1.77
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	0.96	1.19	1.71
P19440	Gamma-glutamyltranspeptidase 1	GGT1	0.82	1.56	1.63
P61224	Ras-related protein Rap-1b	RAP1B	0.75	1.25	1.58
P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1.66	1.29	1.54
P53985	Monocarboxylate transporter 1	SLC16A1	1.13	1.56	1.51

表 1 C4-2B 細胞で LNCaP 細胞と比較して 1.5 倍以上増加したタンパク質

(2) 培養細胞由来エクソソーム上の GGT 活性の測定

GGT はグルタチオンを分解する酵素であり、その活性は基質の分解により測定可能である。そこで培養上清より超遠心法で単離したエクソソーム上の GGT 活性を、蛍光基質である gGlu-HMRG を用いて測定した。その結果、ウェスタンブロット解析の結果と相関して、LNCaP 細胞と比較して C4-2B 細胞で GGT 活性が増加していた。

(3) ヒト血清エクソソーム上 GGT 活性の測定

培養細胞由来エクソソームと同様に、ヒト血清から単離したエクソソームでも GGT1 の発現と GGT 活性が相関するかを検討した。ヒト血清より超遠心法にて単離したエクソソームについて、GGT1 の発現と GGT 活性を測定したところ、両者には正相関が認められた。ウェスタンブロット解析では多検体比較は困難なため、GGT1 発現ではなく GGT 活性で臨床的有用性を検証した。

前立腺肥大 (n=8) と前立腺がん (n=31) 患者の血清中 PSA と GGT 活性および血清から超遠心法で単離したエクソソーム上の GGT 活性を調べたところ、PSA と GGT 活性では両者に有意差は無かったが、超遠心エクソソーム上 GGT 活性では有意差が認められた（図 1）。

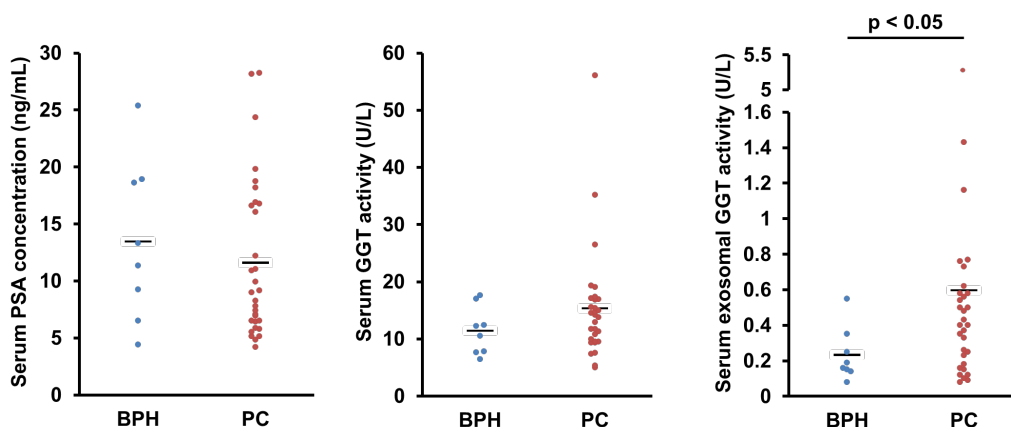


図 1 前立腺肥大 (BPH)・前立腺がん (PC) 患者の血清中 PSA、GGT 活性、超遠心エクソソーム上 GGT 活性

(4) 組織における GGT1 発現

前立腺肥大 (n=50) と前立腺がん (n=50) の組織を抗 GGT1 抗体により染色した。細胞膜と細胞質に分けて解析を行い、染色強度と染色陽性率を 1~4 の 4 段階に分け、それらを乗算した値を PSMA の発現スコアとした。その結果、細胞膜では前立腺肥大および前立腺がんの非がん部と比較して前立腺がんのがん部で PSMA の発現が有意に増加していた。細胞質では前立腺がんの非がん部に対してがん部で有意な増加を示した。これらのことから、がん部での GGT1 発現が亢進していることが明らかとなった。

以上の結果から、血清エクソソーム上の GGT 活性が前立腺がんの診断および、前立腺肥大との鑑別診断に有用である可能性を見出した。

【PSMA】

(1) エクソソーム捕捉分子の決定

血中にはごく少量しか存在しないと考えられる前立腺がん由来のエクソソームを捕捉するには、捕捉力の高い分子が必要となる。そこで、我々はエクソソームマーカーである CD9 に対する抗体(市販の2種類を使用)およびエクソソーム表面に存在するホスファチジルセリン(PS)に親和性のある分子 Tim4 を用いてエクソソームを捕捉した後、エクソソームマーカーである CD9、CD63、CD81 を検出することにより血清中のエクソソーム捕捉能力を比較した。その結果、いずれのエクソソームマーカーについても、Tim4 が抗 CD9 抗体よりもエクソソームの捕捉力が高いことが判明した。

(2) 抗 PSMA 抗体の選抜

様々な抗 PSMA 抗体が市販されているが、PSMA エクソソームの捕捉能力は不明である。そこで、PSMA 陽性の C4-2B 細胞から超遠心法により単離したエクソソームを用いて、Tim4 分子で捕捉し、抗 PSMA 抗体で検出するサンドイッチ ELISA により、市販抗体の PSMA エクソソーム捕捉能力を比較した。その結果、1社のモノクローナル抗体が最も強い捕捉能力を示したことから、以下の実験に使用した。

(3) 血清添加の検出システムへの影響

緩衝溶液中で C4-2B 細胞由来エクソソームに含まれる PSMA 陽性エクソソームを検出できても、患者血清中では PSMA 陽性エクソソームは大量の血清成分と共存することから、それらによる検出システムの阻害が問題となる。そこで、健常人血清に C4-2B 細胞由来エクソソームを添加し、エクソソーム濃度依存的にシグナルを測定できるかを検討した。その結果、Tim4 で捕捉し、抗 PSMA 抗体で検出する系では血清 50% 存在下でもエクソソーム濃度依存的な測定が十分可能であることが分かった。一方、捕捉を抗 CD9 抗体にした場合、血清濃度を上げていくと検出シグナルの減弱がみられ、血清 50% ではエクソソーム濃度依存的な測定が不可能であった。

(4) バックグラウンドの低減

血清添加により、バックグラウンドシグナルの増加が見られた。バックグラウンドシグナルの増加はウェルに非特異的に吸着する成分が原因と考え、Tim4 の特徴の一つでもあるエクソソームと Tim4 の結合を EDTA で外しエクソソームを単離した後、別のウェルで Tim4 により捕捉し、抗 PSMA 抗体で検出した。その結果、検出シグナルは多少減弱するものの、バックグラウンドを大幅に低減させることに成功した。

(5) 前立腺がん患者血清での測定

以上の検討により最適化されたエクソソーム上 PSMA 検出システムを用いて、前立腺肥大および前立腺がんの患者血清で測定を行った。その結果、前立腺肥大と前立腺がん患者間では有意な差は認められなかったが、ホルモン感受性の前立腺がん患者と比較し CRPC 患者では血清中の PSMA 陽性エクソソームのレベルが有意に高いことがわかった。

以上のことより、PSMA 陽性エクソソームは CRPC の診断もしくは予測に有用なマーカーである可能性が示された。今後、多検体で検証することにより臨床的有用性を確立し、実用化を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

川上恭司郎、藤田泰典、伊藤雅史、次世代がん検査技術への新しいアプローチ：エクソソームによるがんの診断、ファインケミカル、査読無、47、2018、33-38

Kawakami Kyojiro、Fujita Yasunori、Matsuda Yoko、Arai Tomio、Horie Kengo、Kameyama Koji、Kato Taku、Masunaga Koichi、Kasuya Yutaka、Tanaka Masashi、Mizutani Kosuke、Deguchi Takashi、Ito Masafumi、Gamma-glutamyltransferase activity in exosomes as a potential marker for prostate cancer、BMC Cancer、査読有、17、2017、316、DOI: 10.1186/s12885-017-3301-x

Horie Kengo、Kawakami Kyojiro、Fujita Yasunori、Sugaya Maki、Kameyama Koji、Mizutani Kosuke、Deguchi Takashi、Ito Masafumi、Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、492、2017、356-361、DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.107.

〔学会発表〕(計 8 件)

Mizutani K、Kawakami K、Fujita Y、Horie K、Kameyama K、Ito M、Deguchi T、Proteomic

analysis of prostate cancer related exosomes isolated by anti-PSMA antibody beads., AACR Annual Meeting 2017, 2017

Ito M, Kawakami K, Horie K, Fujita Y, Matsuda Y, Arai T, Kameyama K, Kato T, Masunaga K, Kasuya Y, Tanaka M, Deguchi T, Mizutani K., Gamma-glutamyltransferase activity in exosomes as a marker for prostate and renal cell cancers., International Society for Extracellular Vesicles 2017, 2017

水谷晃輔、川上恭司郎、藤田泰典、堀江憲吾、亀山紘司、伊藤雅史、出口隆、Immunocapture法を使用した前立腺癌関連エクソソームの解析、第105回日本泌尿器科学会総会、2017

川上恭司郎、藤田泰典、伊藤雅史、エクソソームを用いた前立腺がん診断法の開発、第6回TOBIRA研究交流フォーラム、2017

水谷晃輔、川上恭司郎、藤田泰典、堀江憲吾、亀山紘司、伊藤雅史、出口隆、抗PSMA抗体ビーズより採取した前立腺癌関連エクソソームのプロテオーム解析、第26回泌尿器科・細胞研究会、2017

川上恭司郎、藤田泰典、松田陽子、新井富生、堀江憲吾、亀山紘司、加藤卓、榎永浩一、粕谷豊、田中雅嗣、水谷晃輔、出口隆、伊藤雅史、エクソソーム上 -グルタミルトランスフェラーゼ活性の前立腺がんと前立腺肥大の鑑別における有用性、第39回日本分子生物学会年会、2016

Ito M, Kawakami K, Fujita Y, Matsuda Y, Arai T, Horie K, Kameyama K, Kato T, Masunaga K, Kasuya Y, Tanaka M, Deguchi T, Mizutani K., Exosomal gamma-glutamyltransferase activity as a marker for prostate cancer, 2016 ASEM annual meeting, 2016

川上恭司郎、藤田泰典、堀江憲吾、水谷晃輔、亀山紘司、加藤卓、粕谷豊、榎永浩一、松田陽子、出口隆、伊藤雅史、エクソソーム上の -グルタミルトランスフェラーゼ活性は前立腺がんのマーカーとなる、第8回日本RNAi研究会・第3回日本細胞外小胞学会、2016

〔図書〕(計 1件)

川上恭司郎、藤田泰典、伊藤雅史、シーエムシー出版、早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線：第12章 エクソソームによる泌尿器がんの診断、2019、pp.107-116

〔その他〕

ホームページ等

東京都健康長寿医療センター研究所 (<https://www.tmgig.jp/research/>)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤田 泰典

ローマ字氏名：(FUJITA, yasanori)

所属研究機関名：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）

部局名：東京都健康長寿医療センター研究所

職名：研究員

研究者番号（8桁）：30515888

研究分担者氏名：川上 恭司郎

ローマ字氏名：(KAWAKAMI, kyojiro)

所属研究機関名：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）

部局名：東京都健康長寿医療センター研究所

職名：研究員

研究者番号（8桁）：90589227

研究分担者氏名：水谷 晃輔

ローマ字氏名：(MIZUTANI, kosuke)

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80397356

研究分担者氏名：加藤 卓

ローマ字氏名：(KATO, taku)

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師
研究者番号（8桁）：50596202

研究分担者氏名：出口 隆
ローマ字氏名：(DEGUCHI, takashi)
所属研究機関名：岐阜大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：40163935

研究分担者氏名：亀山 紘司
ローマ字氏名：(KAMEYAMA, koji)
所属研究機関名：岐阜大学
部局名：医学部附属病院
職名：医員
研究者番号（8桁）：50610424

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀江 憲吾
ローマ字氏名：(HORIE, kengo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。