

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20130

研究課題名(和文)腎癌由来エクソソームの解析と応用

研究課題名(英文)Analysis of exosomes from renal cell carcinoma

研究代表者

水谷 晃輔(Mizutani, Kosuke)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80397356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在腎癌におけるエクソソームの役割や有用性は不明である。本研究ではエクソソームに着目し、最初に腎癌細胞株由来エクソソームのプロテオーム解析とWestern blot法によるタンパク解析をおこなった。ついで腎癌患者の血清エクソソームのタンパク発現解析を行い、グルコーストランスポーターやmTORが発現していることを見出した。さらに腎癌患者血清エクソソーム由来のmiRNA array解析を行い、22のmiRNAが腎癌患者において上昇していることを見出した。さらに腎癌細胞株由来エクソソーム上で発現しているCA9の機能解析を行い、CA9を発現したエクソソームが血管新生を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Exosomes from cancer cells are capable of a diagnostic and therapeutic target for cancer. In the present study, exosomes from renal cell carcinoma (RCC) cell lines were analyzed by proteomic analysis and Western blot. Next, exosomes from serum of RCC patients were analyzed. Glucose transporters were expressed in the exosomes and mechanistic target of rapamycin (mTOR) was increased in RCC patients. Expressions of miRNA in exosomes were also analyzed. Exosomes were collected by immunocapture method and expressions of miRNA were evaluated by miRNA array. 22 miRNAs were increased in RCC patients compared to healthy volunteers. In addition, the role of carbonic anhydrase 9 (CA9) in exosomes was demonstrated. The CA9 level in exosomes was increased under hypoxic conditions. CA9-overexpressed exosomes promoted enhancing migration and tube formation of vascular endothelial cells suggesting enhancing angiogenesis in tumor microenvironment.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎癌 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

腎癌の増殖や転移において、癌細胞を取り巻く微小環境は重要であり、多くの研究で細胞間の相互作用が明らかになってきた。細胞間の相互作用は、細胞から分泌されるタンパクや一部の RNA によって複雑に構成されていることが報告されている。癌領域では、臓器特異的なタンパクの増加（前立腺癌における PSA など）や癌細胞に特徴的なタンパクの増加（CEA や AFP など）を腫瘍マーカーとして利用している。これらのタンパクは血中で測定可能なことからよく研究され、癌の進行度や治療効果の判定に使用できるといった報告も多い。腎癌ではこのようなマーカーは実用化されておらず、我々は多方面からのアプローチをとるべく分泌型エクソソームに注目した。エクソソームは、直径 30-100nm の膜小胞であり、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陥入されることにより形成され、最終的にエクソサイトーシスによって分泌される。分泌されたものは分泌型エクソソーム（以下エクソソーム）と呼ばれ、元の細胞の特徴を有し特徴的な細胞膜タンパクを発現し、内部には細胞由来のタンパク質、核酸が含まれている。これらの結果に加えて細胞間情報伝達の新たな方法としてエクソソームを介した系が証明されつつあり、実際に癌細胞と免疫細胞、線維芽細胞、血管系細胞などとの関わりが報告されている。我々は前立腺癌のエクソソーム研究において、前立腺癌治療の重要なターゲットであるアンドロゲンレセプターが前立腺癌由来エクソソームに含まれている事や、進行性前立腺癌患者血清中には前立腺癌特異的エクソソームが増加していることを報告している。そのためこれらの方法を応用して腎癌に関しての先行研究を行ったところ、腎癌由来エクソソーム内に有望なターゲットの候補が含まれていることを見出した。我々はこれらの方法をさらに発展させて、腎癌患者の末梢血よりエクソソームを解析し腫瘍マーカーを探索したり、腎癌由来エクソソームの機能解析を行うことを目的として本研究をおこなった。

2. 研究の目的

腎癌のマーカーを見出し、さらに癌化や細胞増殖、転移に関するメカニズムを解析するために、エクソソームを利用してそれらの研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

腎癌関連エクソソームの有用性や機能の解析をするために以下の順序で研究をおこなった。

腎癌培養細胞株由来のエクソソーム解析

腎癌細胞株 (Caki-1、KMRC-1、OS-RC-2) と近位尿管細胞 (RPTEC) をエクソソームフリー培地で 5 日間培養し、超遠心法でエクソソームを精製した。精製したエクソソーム

のタンパクを網羅的に解析し、腎癌由来エクソソームとその発生母地である近位尿管細胞由来エクソソームと比較した。

で得られた結果をもとに一部のタンパクについて Western blot 法にて発現を確認した。さらに網羅的解析では発現を認めないが既知の腎癌の治療や診断において重要な因子 (mechanistic target of rapamycin : mTOR、carbonic anhydrase 9 : CA9 等) の発現についても同様に Western blot 法にて発現を確認した。

腎癌患者血清中のエクソソーム解析

血清からのエクソソーム精製法の確立。血清中エクソソームのタンパク、核酸の研究のため複数の方法 (超遠心法 : 血清を適宜希釈し超遠心法にてエクソソームを回収、サイズ排除クロマトグラフィー法 : サイズ排除クロマトグラフィーカラムに通しエクソソーム分画を回収、密度勾配遠心法 : Iodixanol とショ糖をもちいて密度勾配溶液を作成し、エクソソーム分画を回収、免疫沈降法 : エクソソーム表面の分子をターゲットとした抗体ビーズを作成し、エクソソームを回収) を用いてエクソソームの精製をおこなった。その中でタンパク解析や miRNA 解析に応じて精製法を選択し研究を進めた。エクソソーム回収の確認は Western blot 法を用いて CD9 等のエクソソームマーカータンパクの発現によって行った。

で精製したエクソソームを Western blot 法、ELISA 法、miRNA array を使用して解析を行った。またエクソソームの精製を行わず、血清から直接エクソソーム関連タンパクを測定する方法も模索した。

癌エクソソームの役割についての研究

腎癌細胞株由来エクソソームの役割を解析するために CA9 に着目した。CA9 は低酸素状態への抵抗性に関連しているという報告があるため以下に示すように研究を進めた。

低酸素状態下におけるエクソソームの CA9 発現の変化について

腎癌細胞を低酸素状態で培養しその状態で放出されるエクソソームの CA9 発現量を比較した。

CA9 過剰発現エクソソームの役割について

CA9 を過剰発現させたエクソソームをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に添加して、その増殖、細胞遊走能、管腔形成能を比較した。

4. 研究成果

腎癌細胞株エクソソーム解析

腎癌細胞株培養上清から超遠心法にてエクソソームを回収しタンパクの網羅的解析を行い、腎癌の発生母地である近位尿管細胞由来のエクソソームとの比較を行った。その結果 49 のタンパクが同定でき、そのうち 3 つのタンパクが腎癌で増加 (1.3 倍以上) しており、12 のタンパクは腎癌で低下 (0.8 倍以下) していた (表 1)。

Proteins	Caki1 /RPTEC	KMRC-1 /RPTEC	OSRC-2 /RPTEC
Fibronectin	0.413	0.1803	0.0294
Annexin A4	0.5861	0.0581	0.5105
Lactadherin	0.4699	0.0219	0.3698
Serotransferrin	0.0164	0.0278	0.0394
Lactotransferrin	0.3532	0.4207	0.7311
Dipeptidyl peptidase 4	0.1888	0.631	0.0946
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.4169	0.7943	0.5546
Moesin	0.3105	0.413	0.2014
Alpha-1-antitrypsin	0.2831	0.3373	0.3436
Aminopeptidase N	0.1019	0.0855	0.0501
Triosephosphate isomerase	0.3311	0.3908	0.2421
CD81 antigen	0.5754	0.597	0.4207
Protein disulfide-isomerase	21.0863	8.3946	3.1046
CD70 antigen	4.6559	2.6792	1.2134
Hemoglobin subunit gamma-2	2.9648	1.9953	4.0551

表 1

さらに得られた結果の一部と既知の腎癌の関連タンパク発現を確認した (図 1)。

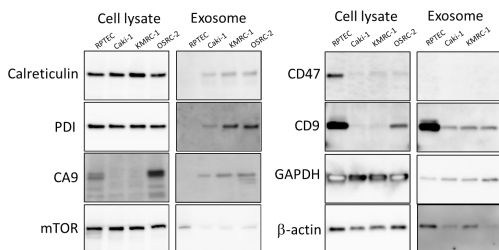


図 1

腎癌患者血清エクソソームのタンパク解析

腎癌患者血清から超遠心法によりエクソソームを精製し Western blot を行った。腎癌培養細胞を用いた結果から calreticulin、PDI、mTOR を候補に選び発現を解析した。Calreticulin、PDI は進行性腎癌を含む約 10 例の検討を行ったが、分子量が血清アルブミンや免疫グロブリンに近いためその発現解析が困難であった。さらに精製度が高い分離法が必要であると考えサイズ排除クロマトグラフィー法を使用したが高同様の結果であった。最終的に最も精製度が高いと考えられる密度勾配遠心法を使用したところ、血清タンパクの混入は低下したが、エクソソーム分画に一致しての発現は認めず、腎癌患者血清エクソソームには培養細胞と異なり calreticulin や PDI の発現はないかごく少ないことが明らかになった。

以上からさらに解析の対照範囲をひろげ、グルコーストランスポーターに着目して解析をおこなったところ一部のグルコーストランスポーターの発現確認が可能であったためこれらが腎癌エクソソームの指標になる可能性が示唆された。

しかし分子量によってはタンパク発現の確認が困難であることが判明したため、分子量

が血清関連タンパクと異なる mTOR についての発現を検討した。mTOR の分子量は約 290 kDa のため血清タンパクの影響を受けにくく、超遠心法で精製したエクソソームでも発現の確認が可能であった (図 2)。

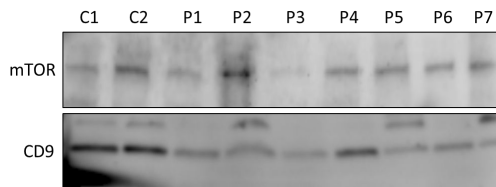


図 2

超遠心法ではエクソソーム量の指標となる CD9 の発現量が一定せず、血清エクソソーム内の mTOR の発現を定量化することは困難であると考えた。そのため ELISA 法にて測定することとした。界面活性剤にてエクソソームを溶解、測定すると添加しない場合と比較して高値を示し、またコントロールに比べて腎癌患者で高い傾向を示した (図 3)。以上からエクソソーム内の mTOR を定量化すると腎癌の進行度を示すマーカーになり得る可能性が確認された。

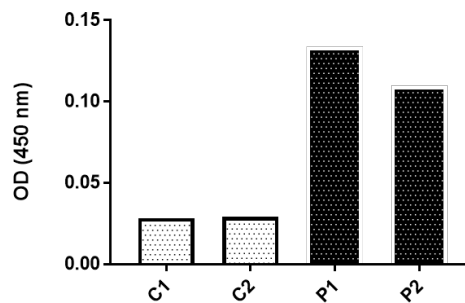


図 3

腎癌患者血清エクソソームの miRNA 解析

腎癌患者血清から免疫沈降法によりエクソソームを精製し miRNA array による網羅的解析をおこなった。コントロール群と早期腎癌群、進行腎癌群 (それぞれのプール血清よりエクソソームを回収) の発現を比較したところ、コントロール群に比較して早期腎癌で 2 倍以上の発現を認めるものは 56 であった。また同様に進行性腎癌で増加を認めたものは 74 であった。早期腎癌、進行性腎癌ともに増加しているものは 22 であった。

エクソソームからの miRNA を解析し発現量を測定することによりエクソソーム miRNA が腎癌のマーカーになる可能性が示唆された。

腎癌細胞株エクソソームの CA9 発現とその機能解析

CA9 は細胞表面に存在しており、低酸素下において発現が上昇し、アシドーシスや低酸素環境への適応、血管新生の促進に関与していることが報告されている。本研究では腎癌細胞株エクソソームには CA9 が発現しており、その発現量は低酸素刺激で増加することが示された。さらに CA9 を過剰発現させたエク

ソソームをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に添加すると、細胞遊走能や管腔形成能が上昇することが示され、癌微小環境においては、低酸素状態によって誘導されたエクソソーム上の CA9 の増加が血管新生を通して腎癌の進行に参与している可能性が示唆された (図 4)。

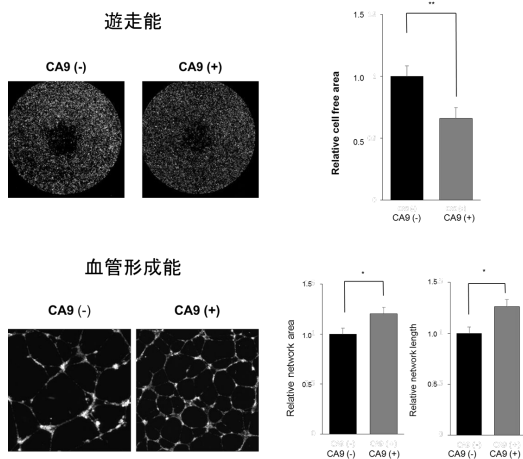


図 4

以上の結果より、患者血清中のエクソソームタンパクや miRNA を測定、解析を行うことにより、腎癌のマーカーとしての使用や今後の腎癌研究に寄与できると考えられた。

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 2 件)

Kameyama K, Horie K, Mizutani K, Kato T, Fujita Y, Kawakami K, Kojima T, Miyazaki T, Deguchi T, Ito M. Enzalutamide inhibits proliferation of gemcitabine-resistant bladder cancer cells with increased androgen receptor expression. *Int J Oncol*. 2017; 50: 75-84. 査読あり

Horie K, Kawakami K, Fujita Y, Sugaya M, Kameyama K, Mizutani K, Deguchi T, Ito M. Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 492: 356-361. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

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：腎癌細胞株由来 exosome の定量的プロテオーム解析
第 1 回 Liquid Biopsy 研究会：2017/01/21 東京新宿区

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 抗体ビーズに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 回泌尿器科分子・細胞研究会
2017/03/10-11 大分県大分市

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工

クソソームの解析

第 105 回日本泌尿器科学会総会
2017/04/21-24 鹿児島県鹿児島市

Kosuke Mizutani, Taro Shirahama, Naoya Akiyama, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Kengo Horie, Koji Kameyama, Masafumi Ito, Takashi Deguchi : Induction of Akt in urinary exosome by bacterial infection
The 37th Congress of Société Internationale d'Urologie 2017/10/19-22
ポルトガル リスボン

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：尿路感染の診断におけるエクソソームの有用性について

泌尿器科共同研究会 2017/07/01 岐阜県岐阜市

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：尿路感染症の診断における尿中エクソソームの有用性について

第 67 回日本泌尿器科学会中部総会 2017/11/24-27 大阪府大阪市

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：尿エクソソームを用いた尿路感染症診断法

第 2 回 Liquid biopsy 研究会 2018/01/18-19 東京都新宿区

Kosuke Mizutani, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Kengo Horie, Koji Kameyama, Masafumi Ito, and Takashi Deguchi : Proteomic analysis of exosomes isolated from ccRCC cell lines
AACR Annual meeting 2018 2018/04/14-18 米国 シカゴ

水谷晃輔：泌尿器科におけるリキッドバイオプシーとしてのエクソソームの役割

第 106 回日本泌尿器科学会総会
2018/04/19-21 京都府京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：尿路感染症バイオマーカー及びその用途

発明者：水谷 晃輔、出口 隆、伊藤 雅史、藤田 泰典、川上 恭司郎

権利者：国立大学法人岐阜大学、地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター

種類：特許

番号：特願 2017-193870

出願年月日：平成 29 年 10 月 3 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 晃輔 (MIZUTANI, Kosuke)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80397356

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

長澤 綾子 (NAGASAWA, Ayako)
岐阜大学大学院・医学系研究科・泌尿器科学
分野

白浜 太郎 (SHIRAHAMA, Taro)
岐阜大学大学院・医学系研究科・泌尿器科学
分野

秋山 直也 (AKIYAMA, Naoya)
岐阜大学大学院・医学系研究科・泌尿器科学
分野

上保 美奈 (JOUHO, Mina)
岐阜大学大学院・医学系研究科・泌尿器科学
分野