

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08490

研究課題名(和文) エクソソームによる甲状腺濾胞癌診断システムの開発

研究課題名(英文) The development of diagnostic system for thyroid follicular cancer using exosome analysis

研究代表者

盛田 幸司 (Morita, Koji)

帝京大学・医学部・病院教授

研究者番号：30535216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：術前診断困難な甲状腺濾胞癌について、腫瘍が分泌する小型細胞外小胞(エクソソーム)がもつ蛋白の特徴を対象に、新診断法開発を目指した。

甲状腺にはTSH受容体が存在する。我々はヒト甲状腺癌細胞株や不死化ヒト甲状腺濾胞上皮細胞が、TSH受容体をもつエクソソームを分泌することを初めて示した。

甲状腺腫瘍患者血清からのエクソソームで、蛋白の網羅的解析を行い、濾胞癌診断に有用な候補蛋白を選別した。この蛋白の定量測定法を構築し検討したが、現在の検討数(濾胞癌12例、濾胞腺腫42例、乳頭癌10例、腺腫様結節15例)では、濾胞癌で有意差の出る蛋白は特定できなかった。今後は術前後血清比較も含め、検討を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺癌のエクソソーム診断に関するこれまでの報告の殆どは、エクソソームに含有されるマイクロRNAをターゲットにしたものだった。RT-qPCRで増幅が可能で解析し易いことがその理由と想像されるが、実臨床での実用化にはデバイスの開発等解決されるべき問題が残っている。本研究では、有用な診断マーカーの特定には至らなかったものの、エクソソーム中の蛋白を対象にELISA法等での定量評価を試みた点は、今後のエクソソーム診断の発展や実用化の可能性を示す、意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Follicular thyroid cancer is difficult to diagnose preoperatively. We aimed to develop a new diagnostic technique focusing on the characteristics of proteins contained in exosomes secreted by tumors.

We demonstrated for the first time that human thyroid cancer cell lines and immortalized human thyroid follicular epithelial cells secrete exosomes containing thyrotropin receptors.

We performed exhaustive protein analysis using serum extracted from patients with thyroid tumors and screened useful candidate proteins for diagnosing follicular carcinoma. We constructed a quantitative method to test these proteins; however, no proteins exhibiting significant differences in follicular carcinoma were identified with the current sample size (12 cases of follicular carcinoma, 42 cases of follicular adenoma, 10 cases of papillary cancer, and 15 cases of adenomatous nodule). In future studies, we plan to examine serum comparison between preoperative and postoperative samples among other exams.

研究分野：代謝および内分泌学関連

キーワード：エクソソーム 甲状腺濾胞癌 プロテオーム解析 診断マーカー サンドイッチELISA系 TSH受容体 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲状腺分化癌である濾胞癌は進行が緩徐な反面、穿刺細胞診での細胞異型に基づく診断はできず、微小浸潤のみの濾胞癌と濾胞腺腫とを術前に鑑別することは不可能である。このため、濾胞性腫瘍は、一定程度の腫瘍径以上のもの、経過観察の中で増大傾向を示すものを手術適応とし、術後の組織診断で診断せざるを得ないのが現状である。

(2) 一方、エクソソームは細胞から分泌される直径 40-100 nm の膜小胞で、細胞由来の蛋白・マイクロ RNA を含有し、体液中に存在することから、新たなバイオマーカーとして期待される。これまでに血液中エクソソームの表面に発現している癌特異的膜蛋白をターゲットとして大腸癌と膀胱癌が早期診断できる可能性が報告されている(文献)。また、癌細胞由来のエクソソームは転移前ニッチの形成にも関与し、臓器特異的転移を誘導している可能性が示唆されている(文献)。

そこで我々は、血液中エクソソーム上に発現する蛋白(特に膜蛋白)をマーカーとして、甲状腺濾胞癌の術前診断ができないか?という学術的問いを着想した。

2. 研究の目的

本研究は、術前診断が困難な甲状腺濾胞癌について、腫瘍細胞から分泌されるエクソソームをターゲットにして、新しい診断システムを構築することを目的としたものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト甲状腺癌細胞株や不死化ヒト甲状腺濾胞上皮細胞由来のエクソソームにおける TSH 受容体発現の検討

甲状腺濾胞上皮細胞は TSH 受容体を発現している。もしこれらの細胞が分泌するエクソソームにも TSH 受容体が存在していれば、甲状腺由来エクソソームを選別・抽出する(TSH 受容体への抗体を使って補足する等)ための指標になると考え、検討を行った。

ヒト甲状腺癌細胞株である FTC-133 (濾胞癌)、8505C (低分化型乳頭癌)、8305C (未分化癌)と、不死化されたヒト正常甲状腺濾胞上皮細胞(Nthy-ori 3-1)の培養上清から超遠心法でエクソソーム分画を単離し、本分画中に TSH 受容体が存在するかどうか、ウエスタンブロットにて検討を行った。

(2) 甲状腺疾患患者血清中細胞外小胞のプロテオーム解析による濾胞癌診断マーカーの同定

研究に際し、本人から書面で同意を得た甲状腺疾患(濾胞癌、濾胞腺腫、腺腫様結節、乳頭癌)患者の血清を用いて、各疾患 5 検体ずつのプールサンプルを作製し、PS アフィニティ法にて疾患別の細胞外小胞を精製した。精製後の細胞外小胞をトリプシン消化し iTRAQ 試薬により安定同位体標識した後、nano-LC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を行い、悪性腫瘍と良性腫瘍、とりわけ濾胞癌と濾胞腺腫で発現変化のある蛋白を検索した。

(3) 濾胞癌診断マーカーのサンドイッチ ELISA 測定系の構築と臨床的有用性の検討

上記(2)で、濾胞腺腫と比較して濾胞癌で発現が 1.5 倍以上増加する膜蛋白をマーカー候補としてピックアップした。濾胞癌・濾胞腺腫・乳頭癌・腺腫様結節各 3 例ずつの血清から高純度エクソソームを精製、ウエスタンブロットを行い、候補蛋白の発現を確認した。次にサンドイッチ ELISA 系の構築を行い、エクソソーム膜上の候補蛋白の定量を可能にした。研究に際し、本人より書面で同意を得て、術後に病理診断が確定している濾胞癌 12 例、濾胞腺腫 42 例、乳頭癌 10 例、腺腫様結節 15 例の術前血清に対し、本測定系を用い候補蛋白の定量測定を行い、濾胞癌の術前診断の有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト甲状腺癌細胞株や不死化ヒト甲状腺濾胞上皮細胞由来のエクソソームにおける TSH 受容体発現の検討

不死化ヒト正常甲状腺細胞株 Nthy-ori 細胞、および甲状腺癌細胞株が分泌するエクソソーム上に TSH 受容体抗体が存在することを初めて示した(図 1, 2: 文献)。

なお、ヒト末梢血のエクソソーム分画から

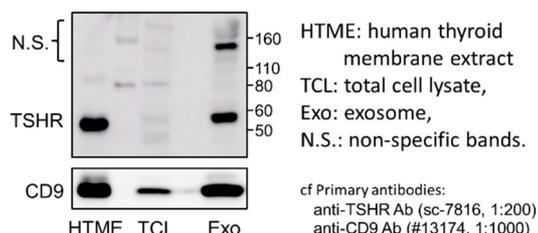


図1. Nthy-ori細胞におけるTSH受容体発現の検討

TSH 受容体を検出することも試みたが、現行の手法では同定に至らず、エクソソーム診断への応用は今後の課題である。加えて我々は、TSH 受容体を過剰発現させた HEK293 細胞を作成、これに刺激型抗ヒト TSH 受容体抗体 (M22 抗体) を添加した際、上記の TSH 受容体発現エクソソーム存在下では、デコイ効果により cAMP 産生増加が減弱することを立証した(文献)。TSH 受容体発現エクソソームが、生体でも何らかの機能をもつかもれない可能性を示すことができた。

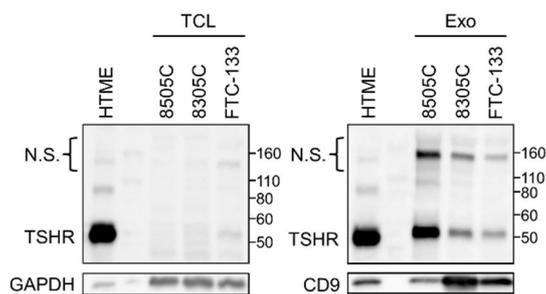


図2. ヒト甲状腺癌細胞株におけるTSH受容体発現の検討

(2) 甲状腺疾患患者血清中細胞外小胞のプロテオーム解析による濾胞癌診断マーカーの同定

甲状腺疾患患者のプール血清から細胞外小胞を精製し、iTRAQ 法を用いたプロテオーム解析を行ったところ、約 600 個の蛋白質が同定された。その中からグロブリン、アポリポロタンなどの血清蛋白質を除いた後、良性腫瘍と悪性腫瘍を比較したところ、濾胞腺腫と比較して濾胞癌で発現が 1.5 倍以上増加する蛋白が 24 個、3 分の 2 以下に減少する蛋白が 39 個同定された。また、腺腫様結節と比較して乳頭癌で発現が 1.5 倍以上増加する蛋白が 27 個、3 分の 2 以下に減少する蛋白が 14 個同定された。

(3) 濾胞癌診断マーカーのサンドイッチ ELISA 測定系の構築と臨床的有用性の検討

上記(2)で濾胞癌で増加し、診断に有用な可能性のある膜蛋白を選択 (X とする) ウェスタンブロットで実際に患者血清中のエクソソームに発現していることを確認した。さらに X に対するサンドイッチ ELISA 系を構築し、濾胞癌 12 例、濾胞腺腫 42 例、乳頭癌 10 例、腺腫様結節 15 例の術前血清エクソソーム中で定量評価を行ったところ、濾胞腺腫より濾胞癌で高値となる傾向は見られたものの、統計的有意差は確認できなかった(図3)。

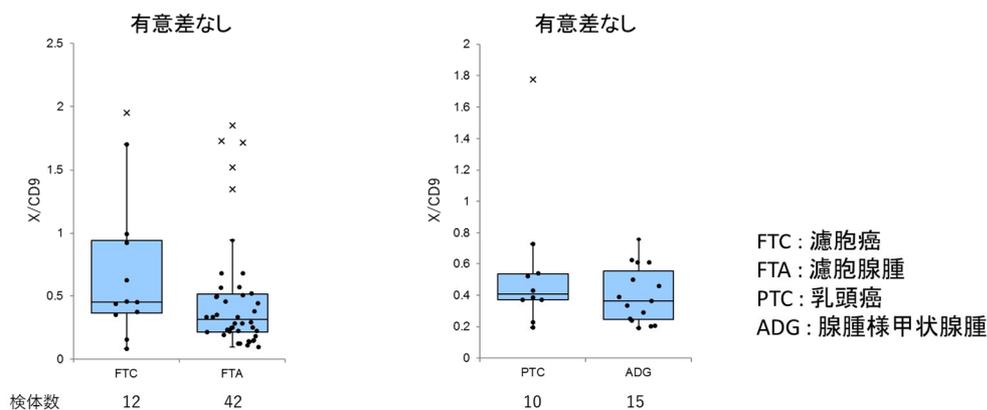


図3. 各疾患術前血清中エクソソームでのXの定量評価(CD9で補正)

本研究期間内で、エクソソーム蛋白による甲状腺濾胞癌診断システムの確立までに至ることは出来なかったが、甲状腺濾胞上皮や甲状腺癌由来のエクソソームが TSH 受容体を発現していることを初めて発見した点、エクソソーム中のマイクロ RNA でなく蛋白を対象にし、サンドイッチ ELISA 系での定量評価を試みた点は、今後の甲状腺疾患エクソソーム診断の発展につながる貴重な発見・試みであったと考える。

< 引用文献 >

- Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. Nat Commun. 5:3591, 2014.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. Nature. 523(7559):177-82, 2015.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature. 527(7578):329-35, 2015.
- Edo N, Kawakami K, Fujita Y, et al. Exosomes expressing thyrotropin receptor attenuate autoantibody-mediated stimulation of cyclic adenosine monophosphate production. Thyroid. 29(7):1012-7, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Edo Naoki, Kawakami Kyojiro, Fujita Yasunori, Morita Koji, Uno Kenji, Tsukamoto Kazuhisa, Onose Hiroyuki, Ishikawa Toshio, Ito Masafumi	4. 巻 29
2. 論文標題 Exosomes Expressing Thyrotropin Receptor Attenuate Autoantibody-Mediated Stimulation of Cyclic Adenosine Monophosphate Production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 1012-1017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/thy.2018.0772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川上恭司郎、江戸直樹、盛田幸司、石川敏夫、小野瀬裕之、福森龍也、津元裕樹、三浦ゆり、藤田泰典、伊藤雅史
2. 発表標題 甲状腺癌患者血清から単離した細胞外小胞のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 / 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江戸直樹、川上恭司郎、藤田泰典、盛田幸司、宇野健司、塚本和久、小野瀬裕之、伊藤雅史、石川敏夫
2. 発表標題 甲状腺濾胞細胞由来TSHR発現エクソソームの証明と、抗TSHR抗体によるcAMP産生への競合作用について
3. 学会等名 第62回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Edo Naoki, Kawakami Kyojiro, Fujita Yasunori, Morita Koji, Uno Kenji, Tsukamoto Kazuhisa, Onose Hiroyuki, Ishikawa Toshio, Ito Masafumi
2. 発表標題 Thyrotropin receptor-positive exosomes alleviate autoantibody-mediated stimulation of cAMP production
3. 学会等名 Annual meeting international society for extracellular vesicles 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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	伊藤 雅史 (Ito Masafumi) (80393114)	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
連携 研究者	石川 敏夫 (Ishikawa Toshio) (20323545)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
連携 研究者	藤田 泰典 (Fujita Yasunori) (30515888)	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)	
連携 研究者	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)	

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