

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K11640

研究課題名（和文）生活習慣病に合併する肝癌の早期診断マーカーの開発：血中細胞外小胞の解析

研究課題名（英文）Development of an early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma associated with lifestyle-related diseases: analysis of circulating extracellular vesicles

研究代表者

山口 奈津（Yamaguchi, Natsu）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40450671

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）：本研究では、非B非C型肝癌を、リスク要因である生活習慣病罹患から早期発見するための低侵襲かつ高精度な診断マーカーを開発するという観点から、肝癌細胞が分泌する細胞外小胞で高発現するタンパク質を明らかにすることを目的とした。肝癌細胞株HuH-7および正常肝臓細胞株Fa2N-4の培養上清から細胞外小胞を精製し、プロテオーム解析を行った。その結果、HuH-7由来細胞外小胞でのみ発現するタンパク質109個を同定した。このうち、既報において肝癌以外のヒト血液検体で発現がみられなかったタンパク質のうち、存在量の多い11個のタンパク質をマーカー候補とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年急増する非B非C型肝癌は、糖尿病など生活習慣病をリスク要因とするが、ハイリスク群の同定方法が確立していない。早期発見には、合併率7割である生活習慣病との高い識別能をもつ低侵襲な診断法が必要である。本研究では、高い肝癌識別力をもつ診断マーカー候補としてEV発現タンパク質に着目し、培養細胞を用いた解析によりマーカー候補となるタンパク質を同定した。今後、マーカー候補の臨床的有用性を検証し研究を進展させることにより、血液検体を用いた肝癌の早期診断法の開発や、ex vivoでの腫瘍評価につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, from the perspective of developing a minimally invasive and highly accurate diagnostic marker for early detection of non-B non-C hepatocellular carcinoma in patients with lifestyle-related diseases, which are risk factors, we aimed to identify proteins that are highly expressed in extracellular vesicles secreted by liver cancer cells. We purified extracellular vesicles from the culture supernatants of the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 and the normal liver cell line Fa2N-4, and performed proteomic analysis. As a result, we identified 109 proteins that were expressed only in extracellular vesicles derived from HuH-7 cells. Among these, we selected 11 proteins with high abundance as marker candidates, which had not been reported to be expressed in human blood samples other than liver cancer.

研究分野：予防医学

キーワード：hepatocellular carcinoma extracellular vesicles

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝癌は現在7割がB・C型ウイルス性肝炎を成因とするが、新規感染の減少や治療薬の開発に伴い減少しており、今後希少疾患になることが見込まれている。これに対し、肝癌の約3割を占める非B非C型肝癌は増加傾向にあるが、成因不明のためハイリスク群の同定方法が確立しておらず、発見時にステージが進んだ状態であることが多い。糖尿病を主とした生活習慣病がリスク要因である可能性が示されており、早期発見のためにはこれらの患者の中から精密検査対象者を絞り込むための低侵襲かつ高精度な診断法の開発が急務である。

細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EV) は細胞から循環血中に分泌される膜小胞体であり、もとの細胞の分子情報を豊富に含む。腫瘍細胞ではネオアンチゲンなど腫瘍特異的に発現するタンパク質が存在することが明らかになってきている。したがって、肝癌細胞が分泌する細胞外小胞で特異的に発現するタンパク質を明らかにすることにより、糖尿病など生活習慣病患者から肝癌を検出するための、低侵襲かつ臓器特異性を示す高精度な診断マーカーを開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、生活習慣病罹患者を含む集団から肝癌を早期発見するための血液診断マーカーを開発するという観点から、肝癌細胞が分泌する細胞外小胞で高発現するタンパク質を、培養細胞を用いて明らかにすることを目的とする。マーカー候補となる細胞外小胞タンパク質が診断マーカーとして必要十分な検出力をもつのかを臨床検体を用いて検証し、新規診断マーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

肝癌を早期診断するための血中バイオマーカーを探索するにあたり、種々の疾患や生理状態を有する肝癌患者の血液中でわずかに変化する標的分子を網羅的解析により同定するのは困難と考えた。また本研究においてターゲットとする血中循環細胞外小胞に限っても、肝癌細胞を含む様々な組織細胞由来の細胞外小胞が含まれており、血中にわずかに存在する肝癌細胞由来細胞外小胞に特異的に発現する分子を絞り込むのは難しい。そこで、本研究では、肝癌細胞株由来 EV と、正常肝細胞株由来細胞外小胞のプロテオーム解析を行い発現タンパク質を比較することにより、肝癌細胞由来細胞外小胞で特異的に発現するタンパク質を明らかにし、その中のマーカー候補となるタンパク質について臨床検体を用いて検証するという戦略のもとに解析を進めた。

(1) 細胞株

肝癌細胞株として HuH-7 細胞 (JCRB 細胞バンク) を、また正常肝臓細胞株として Fa2N-4 細胞 (XenoTech 社) を用いた。

(2) 細胞外小胞の精製

細胞を 90%コンフルエントになるまで培養した後、無血清培地に交換し、30 時間培養した。培養上清を 800 x g、4℃で 5 分間遠心分離して上清を回収後、さらに 2,000 x g、4℃で 20 分間遠心分離して細胞残渣を除き上清を得た。上清に吸着防止剤 EV-Save (FUJIFILM) を 100 倍希釈となるように添加した後、限外ろ過法により濃縮した。濃縮後サンプルに含まれる細胞外小胞を MagCapture エクソソームアイソレーションキット PS Ver2 (FUJIFILM) にて精製し、ナノサイト (NanoSight LM10) による粒子濃度及び粒子径分布の測定とて透過型電子顕微鏡 (TEM) による解析に供した。

(3)細胞外小胞のプロテオーム解析

精製した細胞外小胞をトリプシン消化して得られたペプチドを nanoLC-MS/MS 分析に供した。液体クロマトグラフ (LC) に UltiMate® 3000、質量分析装置 (MS) に Q-Exactive Plus を用い、Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) で LC 及び MS を制御して測定した。得られたデータは Proteome Discoverer (PD) Ver2.5 (Thermo Fisher Scientific) で Mascot Ver2.7 (マトリックスサイエンス) および Sequest HT を検索エンジンとしてデータベース検索した。検索結果を Scaffold Ver5.3.2 (Proteome Software) で取り込み、タンパク質の同定および定量比較解析を行った。

4. 研究成果

HuH-7 細胞および Fa2N-4 細胞の培養上清から得られた細胞外小胞の粒子径の最頻値はそれぞれ、 $146 \pm 5.4 \text{ nm}$ 、 $163 \pm 7.4 \text{ nm}$ であり、HuH-7 細胞でやや小さかった。細胞外小胞の電子顕微鏡解析の結果を図 1 に示す。

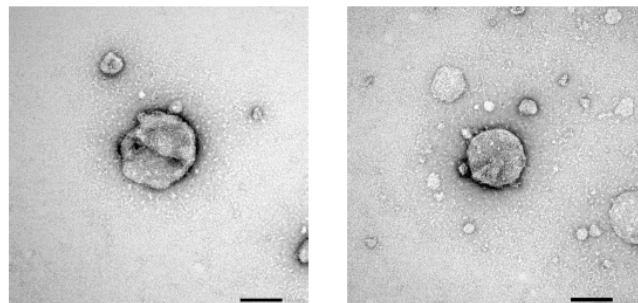


図1. HuH-7細胞(左)およびFa2N-4細胞(右)の培養上清から精製したEVの電子顕微鏡解析(TEM)の結果. スケールバーの長さは 100 nmを示す.

HuH-7 細胞および Fa2N-4 細胞の培養上清から得られた細胞外小胞についてプロテオーム解析を行った。その結果、HuH-7 細胞で 1004 個、Fa2N-4 細胞で 1750 個のたんぱく質が同定された。このうち、HuH-7 細胞由来細胞外小胞でのみ発現するタンパク質は 109 個であった。さらに、このうち、健常人の血中細胞外小胞で発現することが報告されているタンパク質 (参考文献 1) を除外すると、48 個のタンパク質が抽出された。この中で、癌患者を含む 235 のヒト血液試料から得られた細胞外小胞のプロテオーム解析データセット (参考文献 2) において肝癌以外の試料で発現がみられなかったタンパク質のうち、タンパク質存在量の定量指標である iBAQ 値 (intensity-based absolute quantification) の大きい 11 個のタンパク質をマーカー候補とした (表 1)。

タンパク質名	iBAQ値
タンパク質 1	145185000
タンパク質 2	44643000
タンパク質 3	15380250
タンパク質 4	14354000
タンパク質 5	7452750
タンパク質 6	5881550
タンパク質 7	4200935
タンパク質 8	4147000
タンパク質 9	3924350
タンパク質 10	3644050
タンパク質 11	3361950

表1. マーカー候補のタンパク質とその iBAQ値.

今後はこれらのマーカー候補について、必要十分な肝癌検出力をもつのかを臨床検体を用いて検証を行い、血中細胞外小胞を用いた肝癌早期診断法の開発を目指す。

参考文献

1. Muraoka S, et al. Comprehensive proteomic profiling of plasma and serum phosphatidylserine-positive extracellular vesicles reveals tissue-specific proteins. *iScience*, 25(4):104012, 2022.
2. Hoshino A, et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell*. 182(4):1044-1061, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mahbub MH, Yamaguchi Natsu, Nakagami Yuki, Hase Ryosuke, Takahashi Hidekazu, Ishimaru Yasutaka, Watanabe Rie, Saito Hiroyuki, Shimokawa Junki, Yamamoto Hiroshi, Kikuchi Shinya, Tanabe Tsuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Association of Plasma Branched-Chain and Aromatic Amino Acids with Reduction in Kidney Function Evaluated in Apparently Healthy Adults	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5234 ~ 5234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10225234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mahbub M. H., Yamaguchi Natsu, Hase Ryosuke, Takahashi Hidekazu, Ishimaru Yasutaka, Watanabe Rie, Saito Hiroyuki, Shimokawa Junki, Yamamoto Hiroshi, Kikuchi Shinya, Tanabe Tsuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Plasma Branched-Chain and Aromatic Amino Acids in Relation to Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3791 ~ 3791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12123791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mahbub M. H., Yamaguchi Natsu, Takahashi Hidekazu, Hase Ryosuke, Yamamoto Hiroshi, Kikuchi Shinya, Tanabe Tsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship of reduced glomerular filtration rate with alterations in plasma free amino acids and uric acid evaluated in healthy control and hypertensive subjects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46598-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔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
研究分担者	佐伯 一成 (Saeki Issei) (60634756)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	田邊 剛 (Tanabe Tsuyoshi) (80260678)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	中上 裕有樹 (Nakagami Yuki) (30843304)	下関市立大学・データサイエンス学部・講師 (25501)	

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