

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09384

研究課題名(和文)尿中CD55/CD9共陽性エクソソームを標的とした膀胱癌の新規診断・治療法の確立

研究課題名(英文) Novel method for diagnosis and therapy of bladder cancer by targeting urinary CD55/CD9 double-positive exosomes

研究代表者

菊地 栄次 (Kikuchi, Eiji)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：10286552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌患者の尿中で発現が増加しているCD55+9+exosomeについて、膀胱癌診断および再発・病期進展の予後マーカーとしての有用性の検証と、膀胱癌の腫瘍環境における役割を明らかにすることを目的として研究を行なった。尿中CD55+9+exosomeのExoScreen法による定量は膀胱癌の診断法として非常に有用であることが証明された。さらにCD55+9+exosomeは膀胱癌の悪性度や浸潤に関連しており、予後マーカーともなり得ることが示唆された。また、シスプラチン曝露により膀胱癌細胞株のCD55+9+exosome分泌量が増加することが判明し、抗癌剤への抵抗性に寄与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来検討されてきた尿中の膀胱腫瘍マーカーは感度、特異度や尿中安定性に問題があるが、CD55+9+exosomeはそれらの問題をクリアできる可能性を持つ。さらに、今回尿中CD55+9+exosomeの定量は膀胱癌の診断法として有用であることが示され、即時に臨床応用が可能なExoScreen法を用いることで、新たな診断法開発の早期実現が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to validate the usefulness of urinary CD55+9+exosome, which is upregulated in bladder cancer patients, as a diagnostic and prognostic marker for bladder cancer, and to elucidate the role of CD55+9+exosome in the tumor environment of bladder cancer patients. Quantification of urinary CD55+9+exosomes using the ExoScreen method proved to be a very useful diagnostic method for bladder cancer. Urinary CD55+9+exosome levels were associated with bladder cancer grade and invasion, suggesting that they may be prognostic markers for recurrence and stage progression. Cisplatin exposure was found to increase CD55+9+exosome secretion in bladder cancer cell lines. This indicates that CD55+9+exosome may also contribute to resistance to anticancer drugs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱癌 エクソソーム CD55 ExoScreen バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱癌の再発率は3年以内に約40%と高率であることが知られており、その内の10%が病期進展する。膀胱癌の経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) 後2年間は、3ヶ月に一度の尿細胞診検査、膀胱鏡検査が診療ガイドラインで推奨されている。前者は感度が40-60%と低く、後者は精度は良いが侵襲の比較的高い検査である。よって、無あるいは低侵襲かつ高精度のバイオマーカーの開発は、我々泌尿器科医に課せられた急務の課題と考える。

近年、体液診断 (liquid biopsy) の急速な進歩に伴い、エクソソームをバイオマーカーとして診断を試みる研究が世界中で注目されている。脂質二重膜構造の細胞外小胞顆粒であるエクソソームは、DNA、RNA、タンパク質などのメッセージ物質を内包し細胞間のコミュニケーションツールとして重要な役割を果たしている。エクソソームが新規バイオマーカーとして魅力的な点は、血液、尿、唾液、母乳など様々な体液に存在すること、さらに、疾患特異的なエクソソームには、疾患特異的な分子が濃縮されていることである。分担研究者である吉岡が開発し、特許を取得している ExoScreen 法は、光増感剤ビーズに結合させたエクソソーム特異的抗体2種を用いてエクソソームを捕捉・検出することで、精製操作なしに体液検体 5 μ L というごく少量からわずか1時間ほどで特異的エクソソームの検出を可能にする画期的なシステムである。申請者らは予備検討において、膀胱癌患者尿中および細胞株由来のエクソソームについて、CD55+9+exosome の量を ExoScreen 法にて解析している。その結果、膀胱癌患者および膀胱癌細胞株において CD55+9+exosome が増加していることが明らかとなった。CD55 は単鎖細胞表面タンパクで、多くの癌種で発現が亢進していること、また CD55 の機能阻害が治療効果を示すことも報告されている。しかし、エクソソームの内包量や機能については未知である。CD9 は細胞間の接着やシグナル伝達、運動能に関与しており、エクソソームに高率に発現するエクソソームマーカーとして知られている。本研究ではさらに 500 例の尿検体を用いて CD55+9+exosome の解析を行い、膀胱癌診断および再発・病期進展を予測する予後マーカーとしての有用性を検証したいと考えた。

一方、短鎖ノンコーディング RNA の1種である miRNA は、発生・増殖・細胞死・癌化など生物の高次機能の調節に重要な役割を担っていることが確認され、新しい腫瘍マーカーとしての開発が進められている。また我々の研究グループでは、前立腺癌細胞において特定の miRNA の発現が減少することでエクソソームの分泌が亢進し、それが癌の増殖や進展をうながすことを報告している。そこで本研究では、膀胱癌において CD55+9+exosome の分泌を制御している miRNA を見出し、その miRNA が膀胱癌の進展に与える影響を解析するとともに、miRNA を用いた新規膀胱腔内注入療法の開発を目指すことを立案した。『エクソソームはどのような機構で膀胱癌から分泌され、どのように働いて癌細胞の増殖・進展に寄与しているのか?』というのが本研究の学術的問いである。

2. 研究の目的

本研究計画は『CD55+9+exosome を指標とした ExoScreen 法による膀胱癌の迅速診断法の確立と、そのエクソソームが細胞機能に与える影響の解明』『CD55+9+exosome の分泌を制御する miRNA を見出し、膀胱癌の増殖に与える影響の解析、さらにこの miRNA を用いた新規膀胱腔内注入療法の開発』の2つを到達目標とする。

エクソソームを指標とした尿検体を用いた癌診断の試みは他になく、CD55+9+exosome が膀胱癌患者尿中に多く含まれることを知り得ているのは申請者のグループのみであるため、独自性が高い(特許出願済)。さらに即時に臨床応用が可能な ExoScreen 法を用いることで、新たな診断法開発の早期実現が期待できる。

また、再発・病期進展の可能性が高い筋層非浸潤性膀胱癌は、局所治療として腔内治療である膀胱内注入が可能である。RNA 干渉を用いた膀胱内注入治療の試みは散見されるが、未だ実用化にはつながっていない。我々はすでに miRNA を用いた膀胱内注入局所療法の試みに成功しており、独自にモデル系を立ち上げている。miRNA が治療標的として有利な理由は、1種類の miRNA で複数種類の遺伝子を標的とすることである。siRNA では、基本的に1対1対応で標的とした遺伝子のみを抑制するが、miRNA を用いることで、同じパスウェイに存在する複数遺伝子を標的としうるため、より強固な機能抑制が期待される。したがって、miRNA の膀胱内注入により膀胱内でのエクソソームの分泌抑制が可能となれば、従来の治療とは一線を画す新規治療法ならびに再発予防法の開発に繋がる可能性がある。同所性に膀胱腫瘍を確立し、膀胱内注入の研究を行うには同所性膀胱腫瘍モデルが現在の膀胱癌臨床に即したモデルとして最適である。miRNA をターゲットにした治療の有用性が確立すれば、miRNA によりエクソソームが制御を受ける他癌腫に対する治療効果も期待でき、その波及効果は大きいと考える。

3. 研究の方法

(1) エクソソーム検出のための ExoScreen 法の構築

ExoScreen 法ではそれぞれ一つのエクソソーム膜タンパクに対する抗体が標識された 2 種類のビーズを用いて蛍光共鳴による発光をレーザー光にて検出する。本検討では 2 種類とも CD9 標識ビーズを用いて一般的なエクソソーム全般を検出する CD9 単独陽性エクソソーム (CD9+exosome) と、CD55 抗体および CD9 抗体を標識したビーズを用いて膀胱癌特異的エクソソームを検出する CD55/CD9 共陽性エクソソーム (CD55+9+exosome) の 2 つの系を構築した。

(2) 尿中 CD55+9+exosome の腫瘍マーカーとしての有用性の検証

膀胱癌患者 109 例と同患者の中で術後の検体採取が可能であった 42 例および非膀胱癌患者 42 例から計 193 検体の尿を収集した。

凍結保存した尿検体から Total Exosome Isolation (from urine)を用いてエクソソームを抽出し、高感度迅速測定法である ExoScreen 法にてエクソソームの測定を行った。

(3) 膀胱癌細胞株における CD55+9+exosome の発現解析

膀胱癌細胞株として T24、UMUC-3、TCCSUP、J82、HT1376 を用いた。正常コントロールとして正常尿路上皮細胞株 (SVHUC-1) を、さらに他癌種コントロールとして腎癌細胞株 3 種 (ACHN, CAKI2, 786-O) を使用した。これらの細胞を無血清培地 (エクソソームフリー) で 48 時間培養後の培養上清をサンプリングし、Total Exosome Isolation (from cell culture media)を用いてエクソソームを抽出後、ExoScreen 法にてエクソソームを測定した。

得られた値について、SVHUC-1 のシグナル強度を 1 としたときの各細胞のシグナル強度比を求めて比較した。

(4) 抗癌剤の暴露による膀胱癌細胞株の CD55+9+exosome 分泌量の変化

CD55+9+exosome の発現が最も高い/低い膀胱癌細胞株である HT1376/UMUC3 について、無血清培地にて培養し、シスプラチンを各濃度で 48 時間暴露した後の培養上清中をサンプリングした。その後同様にエクソソーム量を、ExoScreen 法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) エクソソーム検出のための ExoScreen 法の構築

CD9+ exosome ならびに CD55+9+ exosome の検出系を構築し、全検体において有効なシグナル強度が得られた。以降の検討においては常に両者を測定し、総エクソソーム量と膀胱癌特異的エクソソーム量を比較することで CD55+9+ exosome の特異性を検証することとした。

(2) 尿中 CD55+9+exosome の腫瘍マーカーとしての有用性の検証

CD9+exosome ならびに CD55+9+exosome は膀胱癌患者で有意に高い傾向が見られた (図 1)。ROC 曲線による解析から、高い精度で膀胱癌患者を検出することが可能であった (図 2)。また、CD55+9+exosome は尿細胞診陰性 (class I, II) の膀胱癌患者のうち 55%を陽性として検出できた。一方、術前後の CD55+9+exosome には一定の傾向は認められなかった。

次に、組織学的所見との関連において、CD55+9+exosome は高異型度および筋層浸潤性の膀胱癌患者の尿中で有意に上昇していた (図 3)。この結果より、CD55+9+exosome が癌の悪性度に関与している可能性が示唆された。

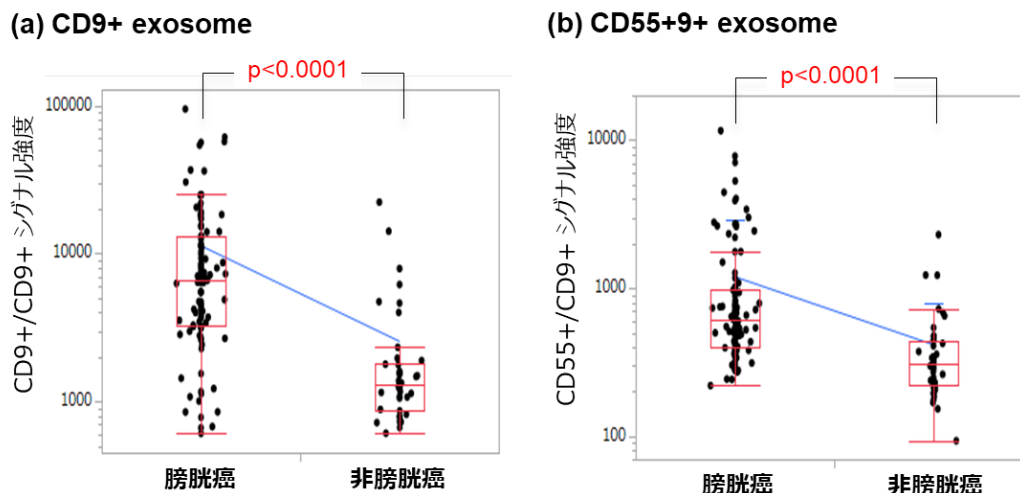
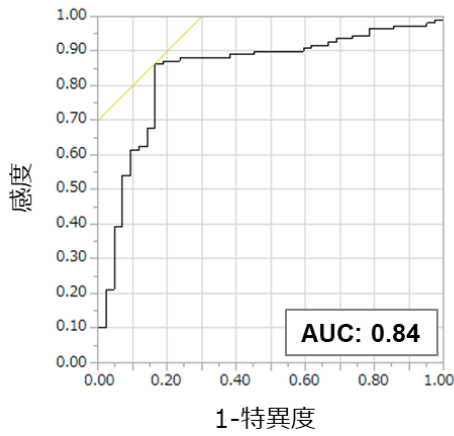


図1 膀胱癌/非膀胱癌患者における尿中エクソソーム発現量

(a) CD9+ exosome



(b) CD55+9+ exosome

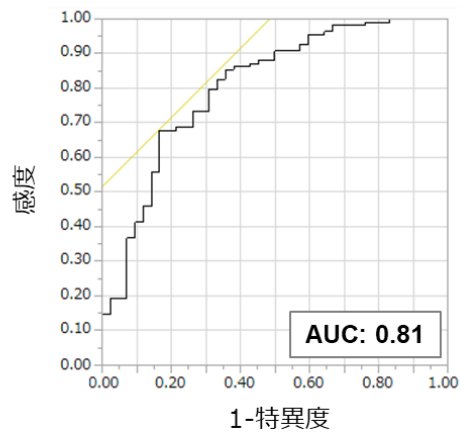
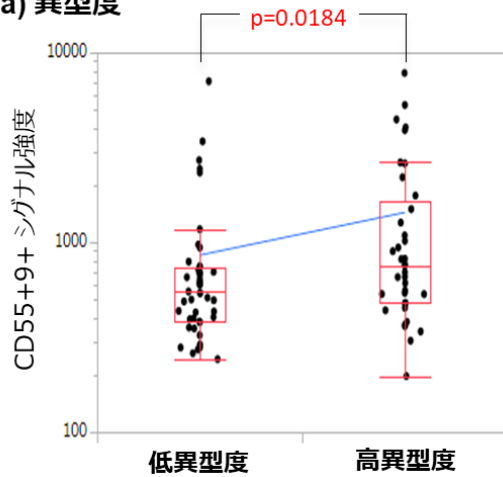


図2 尿中エクソソーム発現量による膀胱癌検出のROC曲線

(a) 異型度



(b) 筋層浸潤

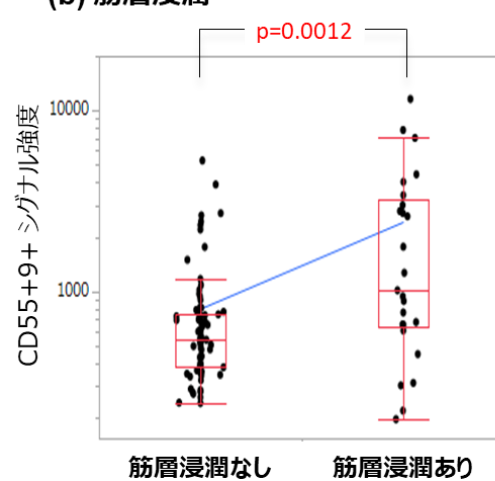


図3 膀胱癌の異形度および筋層浸潤と尿中CD55+9+ exosome発現量

(3) 膀胱癌細胞株における CD55+9+exosome の発現解析

SVHUC-1 を基準としたときのエクソソームの相対発現量は各細胞株によって大きく異なっていた。CD9+exosome の発現量には一定の傾向はなく膀胱癌と腎癌の発現量の差も見られなかった。検討した全ての膀胱癌細胞株において CD55+9+exosome が増加しており、最も高かったのは HT1376 (163 倍) で、次いで J82、T24 であり (図 4)、3 種の腎癌細胞株はほぼ同等に低値であった。これより、CD55+9+exosome が膀胱癌細胞から特に多く分泌されていることが証明された。

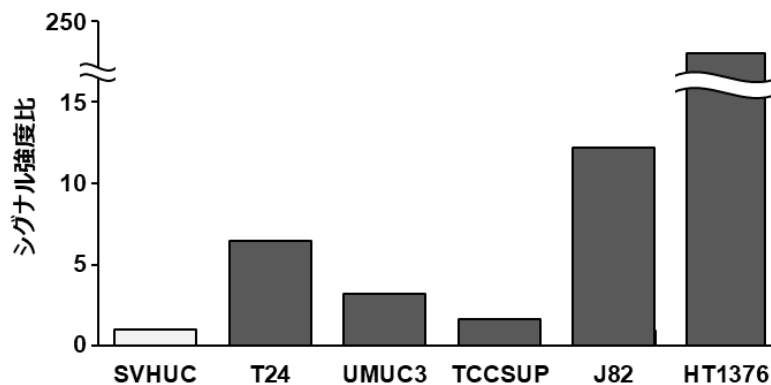


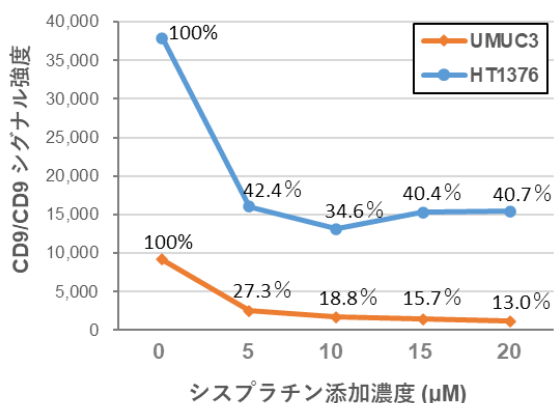
図4 膀胱癌細胞株におけるCD55+9+ exosome発現量

(4) 抗癌剤の暴露による膀胱癌細胞株の CD55+9+exosome 分泌量の変化

一般的なエクソソーム全般を検出する CD9+exosome 値は両細胞株ともにシスプラチン濃度依存性に減少した(図 5a)。シスプラチン 20 μ M 添加では無添加群と比較して HT1376 で 40.7%、UMUC3 で 13.0%に減少した。これはシスプラチンの殺細胞効果による生細胞数の減少と一致しており、細胞あたりの CD9+exosome の分泌量は変化していないことがわかった。

一方、膀胱癌特異的エクソソームである CD55+9+exosome 値はシスプラチン 20 μ M 添加で無添加群と比較して HT1376 は 81.7%、UMUC3 は 82.4%とあまり減少しなかった(図 5b)。シスプラチンの殺細胞効果により生細胞数が減少しているにもかかわらず CD55+9+exosome 分泌量があまり変化しないということは、1細胞あたりの分泌量が増加していることを示しており、膀胱癌細胞が抗癌剤に抵抗するために分泌量を増加させていることが推察された。

(a) CD9+ exosome



(b) CD55+9+ exosome

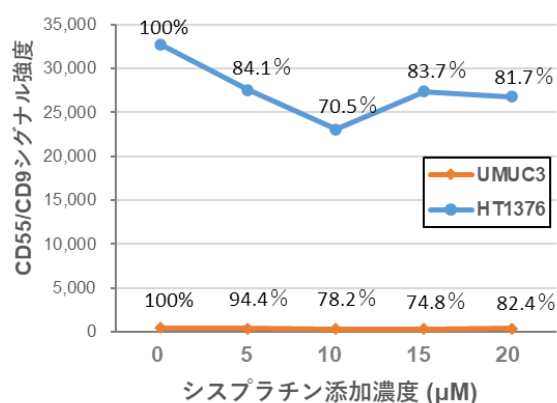


図5 膀胱癌細胞株におけるシスプラチン添加後のエクソソーム発現量

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 1件）

1. 著者名 Prieto Vila Marta, Usuba Wataru, Yoshioka Yusuke, Takeshita Fumitaka, Yoshiike Miki, Sasaki Hideo, Yamamoto Yusuke, Kikuchi Eiji, Ochiya Takahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 High grade bladder cancer cells secrete extracellular vesicles containing miRNA 146a 5p and promotes angiogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Biology	6. 最初と最後の頁 e47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jex2.47	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayakawa Nozomi, Yamada Ryuji, Aratake Satoe, Yoshiike Miki, Usuba Wataru, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Kikuchi Eiji.
2. 発表標題 CD55 positive exosomes as a novel urinary biomarker for bladder cancer.
3. 学会等名 19th Urological Association of Asia Congress（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 薄場渉, 吉池美紀, 荒武里衣, 吉岡祐亮, 山田龍治, 早川望, 落谷孝弘, 菊地栄次.
2. 発表標題 膀胱がんにおける尿中エクソソームの表面抗原CD55・CD9と内包物質miR-146a-5pのバイオマーカーとしての検討.
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 薄場渉, 吉池美紀, 荒武里衣, 吉岡祐亮, 山田龍治, 早川望, 落谷孝広, 菊地栄次
2. 発表標題 尿中CD55/CD9共陽性エクソソームは膀胱癌の新規診断バイオマーカーかつ予後進展に関与する
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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	吉岡 祐亮 (吉岡祐亮) (Yoshioka Yusuke) (60721503)	東京医科大学・医学部・講師(特任) (32645)	
研究 分担者	薄場 渉 (Usuba Wataru) (90867649)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教 (32713)	

	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 協力者	早川 望 (Hayakawa Nozomi) (10528441)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	
研究 協力者	吉池 美紀 (Yoshiike Miki) (60398964)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員 (32713)	
研究 協力者	荒武 里衣 (Aratake Satoe)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員 (32713)	

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