

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012 ～ 2012

課題番号：24650641

研究課題名（和文） がん細胞分泌ナノベシクルのプロテオミクスと画期的診断法開発の試み

研究課題名（英文） Proteomic analysis of tumor-derived nanovesicles and its application for innovative diagnostic method.

研究代表者

角田 慎一（TSUNODA SHIN-ICHI）

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部 プロジェクトリーダー

研究者番号：90357533

研究成果の概要（和文）：

本研究は、がん細胞分泌ナノベシクル（Exosome）上の新規バイオマーカーを探索・同定することにより、がんの早期診断・悪性度診断・治療薬決定診断を可能とする革新的診断法の開発に挑戦するものである。本申請研究では、細胞から分泌・放出されることが近年明らかになってきた約百ナノメートル径の小胞である”Exosome”に着目し、Exosomeに含まれるがんマーカータンパク質にフォーカスした新規プロテオミクス解析を試みた。超遠心法により、培養がん細胞から exosome を回収し、電子顕微鏡観察、動的光散乱法による粒子径測定、マーカーとされるテトラスパンニン分子の発現解析を行った。その結果、確かに exosome が高純度で回収できていることが確認できた。さらに、exosome からたんぱく質を回収し、質量分析法により発現たんぱく質を解析した。その結果、複数のがん関連膜タンパク質が同定できた。以上の検討から、がん細胞分泌 exosome 上には、がん関連膜たんぱく質などが含まれることが判明した。今後は、がん組織から分泌される exosome を血液中から効率よく回収し、そのマーカーたんぱく質解析できるかどうかを調べ、診断法への応用の可能性を検証する予定である。

研究成果の概要（英文）：

This is a challenging study to explore biomarkers on tumor cell-derived nanovesicles (exosomes) and to investigate their potential as innovative diagnostic markers for early detection and molecular characterization of cancer, and for decision making in cancer treatment. Here, we performed a focused proteome analysis for the proteins of exosomes, which are recently revealed to be membrane vesicles secreted from various cells including tumor cells. At first, tumor cell-derived exosomes were collected by ultracentrifugation method from cell culture supernatant. The finally collected products were confirmed to be purified exosomes by morphology of electron microscopy, particle size by dynamic light scattering and expression of tetraspanins, which were markers of exosomes, by western blotting. Then, proteins were extracted from the purified exosomes and analyzed the expressed proteins by mass spectrometry. These experiments revealed that various tumor-related membrane proteins were detectable in tumor-derived exosomes. In the future, we will test the feasibility of exosome-based in vitro diagnosis by isolating the tumor-derived exosomes from the peripheral blood of patients and profiling tumor-related proteins of them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：医療・福祉、癌、生体分子、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

本邦死因の第一位を占めるがんの克服を図るには、早期の段階でがんを発見し、最適な治療を施すことを可能とする革新的診断法の開発が期待される。とりわけ肺がんや膵臓がん等、早期診断の難しさが最大の問題となっているがんにおいては有用な診断マーカーの開発は喫緊の課題である。近年ではトランスクリプトームやプロテオーム解析といったオミクスのアプローチによるバイオマーカーの探索が大規模に行われているが、これまでのところ期待されたような成果は乏しいと言わざるを得ない。とりわけ、従来の血漿プロテオーム解析では、多量に存在する分子の中で微量のがん関連分子を同定することに技術的障壁があった。

近年、がん細胞から分泌された Exosome が血液中に移行し、Exosome の膜タンパク質や miRNA が遠隔の細胞に移転されシグナル伝達するなど、がんにおいて重要な機能を有していることが示唆されている (Al-Nedawi et al. Nat Cell Biol. 2008)。また、従来の腫瘍マーカーのように死細胞等から漏出するものではなく、細胞から生理的に分泌されるものであるため、早期がんからも分泌されうることから、診断マーカーの標的としては極めて有望と考えられる (They et al. Nat Rev Immunol. 2009)。

2. 研究の目的

上記背景から、本研究では、近年、細胞から分泌されることが明らかとなってきた“ナノベシクル” exosome” にフォーカスした新規プロテオミクスのアプローチにより、肺がん等の難治がんの新規バイオマーカータンパク質の同定と革新的診断法の開発を試みる。Exosome 上のプロテオームを解析法は未だ確立されておらず、診断法への応用を図るためには、種々条件検討が必要である。そこで本研究では、Exosome の調整法、プロテオーム解析法の最適化、解析結果からがん診断法への応用の可能性を探る。本研究は、難治がんの早期診断法を開拓するためのパイロット的試みであり、次世代医療への貢献のみならず、腫瘍生物学等にも興味深い知見を提供するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト大腸がん細胞である SW480 と SW620 は、ATCC より購入した。SW480 と SW620 は、10% FCS 含有 Leibovitz' s L-15 培地を用いて培養した。いずれの細胞も継代培養し、サブコンフルエント状態のものを exosome 調製に供した。

(2) 培養上清由来 exosome の調製

培養ディッシュ上でサブコンフルエント状態になった細胞を PBS で洗浄し、無血清培地 (OptiMEM 培地、Invitrogen) に置換して 72 時間培養した。培養上清を回収し、200 g x 5 分の遠心で細胞を除去し、上清を回収した。次に、さらに 16,000 g x 20 分間遠心分離後の上清を回収し、0.22 μ m のニトロセルロースメンブレンフィルターでろ過することで細胞デブリ等を除去した。回収した溶液を 140,000 g x 70 分遠心分離した。ペレットに PBS を加え、再度 140,000 g で 70 分遠心分離することで洗浄し、得られたペレットを PBS で懸濁し、exosome 分画として回収した。

(3) Exosome タンパク質の定量

Exosome のタンパク質量の測定は、exosome の PBS 懸濁液を Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を用いて測定した。

(4) Exosome の粒子径の測定

Exosome の粒子径は動的光散乱法で測定した。タンパク質量として 1 μ g/ml になるよう PBS で調整した exosome を、Zetaseizer Nano-ZS (Malvern Instruments) にて測定した。

(5) Exosome の電子顕微鏡観察

カーボン蒸着した銅メッシュグリッドを親水化処理し、パラホルムアルデヒドで固定した exosome 懸濁液を載せ 15~20 分吸着させた。膜染色のため、2%酢酸ウラン溶液を添加し、濾紙で余分な溶液を除去した。その後、サンプルメッシュを乾燥させ、透過型電子顕微鏡 (TEM, HITACHI H-7650) により観察した。

(6) exosome のプロテオーム解析

SW480 と SW620 の培養上清から精製した exosome を可溶化してタンパク質を抽出し、

SDS-PAGEにより8分画した。切り出したゲル片に脱色液(25 mM 炭酸水素アンモニウム/50% アセトニトリル)を100 μ l 加え、室温で10分間振盪した。脱色液を除いた後、200 μ l のアセトニトリル中で10分間振盪させ、更に減圧遠心器を用いて脱水した。このゲル片に5 μ l のトリプシン溶液(100 μ g/ml Trypsin (Promega) / 50 mM 炭酸水素アンモニウム)をしみこませ、37 $^{\circ}$ Cで16時間反応させることで、ゲル内のタンパク質を消化した。これに抽出液(50 μ l の50% アセトニトリル / 0.1% ギ酸溶液)を加え、30分間振盪して回収した。本操作を2回(2回目は50 μ l の80% アセトニトリル / 0.1% ギ酸溶液、3回目は50 μ l の100% アセトニトリルで抽出)繰り返すことで消化ペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は減圧遠心器によって濃縮した後、ZipTip C18 チップ(Millipore)を用いて精製し、質量分析用サンプル溶液とした。質量分析にはLTQ Orbitrap XL(Thermo Scientific)を用いた。

4. 研究成果

がん細胞から分泌される exosome 上のプロテオームを解析するため、2種類の大腸がん細胞株 SW480 と SW620 をモデルがん細胞とし、その培養上清から exosome の回収・精製を試みた。超遠心分離法により回調製した exosome について、まず動的光散乱法により粒子径を測定した結果、各細胞から分泌された exosome の粒子径はいずれも平均粒径は80~100 nm であった。次に、TEM 観察により、exosome の形状を観察した。その結果、SW480・SW620ともに、動的光散乱法による解析結果と相関し、その粒径はおおよそ100 nm であった。さらに、既に報告されているように、脂質二重膜から成る小胞が観察され、exosome が確かに精製・回収できていることが確認できた。

そこで次に、これらがん細胞分泌 exosome のプロテオームを解析するため、exosome 由来タンパク質を抽出し、質量分析法により同定を試みた。その結果、SW480 由来の exosome から79種類、SW620 由来の exosome から144種類のタンパク質が同定され、48種類のタンパク質が共通して発現していることが判明した。この中には、exosome マーカーとして知られている CD63 (Fig. 1(c)参照)や CD9 といったテトラスパンニン分子も含まれており、実験系の有用性が改めて示された。さらに、Eph receptor A2 や Transferin receptor protein 1 などががん関連膜タンパク質も同定された。特に、Eph receptor A2 については、そのモノクローナル抗体が固形癌に対する治療薬として臨床試験中で有り、がん細胞から分泌される exosome 上のタンパク質に着目した解析の有用性が示唆された。今後、これ

ら分子のがん組織と血中 exosome 上での発現量の相関を解析すると共に、更に候補タンパク質を増やすことによって、コンパニオン診断薬に資するバイオマーカータンパク質の同定を推進していく予定である。

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)

- (1) Takano M., Yamashita T., Nagano K., Otani M., Maekura K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Tomiyama T., Mori H., Matsuura K., Matsuyama S.: Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis., *Neuroscience Letters.*, 534:85-9, 2013.
doi: 10.1016/j.neulet.2012.11.010.
- (2) Yamashita T., Nagano K., Kanasaki S., Maeda Y., Furuya T., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 421(1):140-4, 2012.
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.144.

[学会発表] (計7件)

- (1) 長野一也, 角田慎一, ほか: プロテオミクスによるシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索と評価., 日本薬学会第133年会., 横浜, 2013年3月.
- (2) 山下琢矢, 角田慎一, ほか: exosome 由来膜タンパク質のプロテオーム解析による新規肺がんバイオマーカーの探索., 第37回日本医用マススペクトル学会年会., 名古屋, 2012年10月.
- (3) Nagano K., Tsunoda S., et al.: Proteome analysis of lung cancer cell-derived exosomes for discovery of diagnostic biomarkers, HUP0 11th Annual World Congress (HUP0 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.
- (4) 鎌田春彦, 角田慎一, ほか: がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索., 日本プロテオーム機構 第10回大会, 東京(東京), 2012年7月.
- (5) 長野一也, 角田慎一, ほか: がん個別化医療のためのシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索., 第28回日本 DDS 学

会学術集会, 札幌, 2012年7月.

- (6) Maeda Y., Tsunoda S., et al.: Distribution and functional analysis of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer, The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS 2012), Quebec (Canada), 15-18 July, 2012.
- (7) Kamada H., Tsunoda S., et al.: Detection of drug-target proteins on tumor-derived exosomes by ELISA using anti-CD81 antibodies, EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 慎一 (TSUNODA SHIN-ICHI)
独立行政法人医薬基盤研究所
創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー
研究者番号: 90357533