

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 3 月 31 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293133

研究課題名(和文) 婦人科系腫瘍由来エクソソームの特異的かつ高感度検出法の開発研究

研究課題名(英文) Development of diagnostic system with high specificity and sensitivity for exosome derived from gynecologic cancer

研究代表者

加藤 和則 (Kato, Kazunori)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60233780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：EphA2は肺癌、卵巣癌、前立腺癌などの癌で高発現する糖蛋白質で、酵素切断によりsEphA2として遊離した状態でも存在している。本研究では各種癌患者血清中のsEphA2検出を目的に、感度と特異性の高いsEphA2測定ELISA系の樹立に成功した。その系を用いて各種癌患者血清中を測定した結果、肺癌、前立腺癌および卵巣癌の患者血清中に、健常人血清と比較して有意に高いsEphA2値を検出した。肺癌バイオマーカーであるCYFRAおよびCEAとは正の相関性を示したが、前立腺癌マーカーPSAおよび卵巣癌マーカーCA125との相関性は低く、sEphA2が新規のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：EphA2 is a cell surface glycoprotein expresses in various tumor tissues including lung, ovary and prostate carcinoma. EphA2 fragment is also released in a soluble form by the proteolytic cleavage from tumor cell surface. We tried to detect the soluble form of EphA2 (sEphA2) in the serum of various cancer patients. By using antibodies to EphA2, we developed a new sandwich ELISA system detecting human sEphA2 with high sensitivity and specificity. With this system, we measured the concentration of sEphA2 in the serum of normal healthy donors and various carcinoma patients. The concentration of sEphA2 was significantly higher in sera of lung, prostate, ovarian cancer patients than healthy control donors. The levels of sEphA2 in serum of lung cancer are correlated with CYFRA and CEA. In contrast, sEphA2 levels versus PSA or CA125 are not correlated. These data indicate that the diagnosis of lung, prostate and ovary cancer patients enabled by measuring the concentration of sEphA2.

研究分野：血清診断学 腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍マーカー 卵巣がん EphA2 乳がん エクソソーム 抗体 ELISA

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 乳がん

乳がんは乳管と小葉からなる乳腺に発生する悪性腫瘍である。がん全体の罹患数が年々増加傾向にあるのと同様に乳がんの罹患数も年々増加しており、現在では女性の部位別がん罹患数の第1位である(2011年)。乳がんの発生や進行には女性ホルモンであるエストロゲンが関与していることが知られている。エストロゲンに暴露されている期間が長いほど乳がんの発症リスクが増加するため、40代・50代が最も患者数の多い年代となっている。検査方法として、マンモグラフィや超音波検査、視触診などがあり、また、乳がんはステージ初期であれば比較的高い5年生存率を有することも相まって、死亡率はそれほど高くない。しかし、女性の12人に1人の割合で発症すると言われていたほど罹患率の高いがんである。

### (2) 卵巣がん

卵巣がんは卵巣で発生する悪性腫瘍である。婦人科系がんにおいては乳がんに次いで罹患率の高いがんであり、特徴として初期症状がほとんどないため、「沈黙の腫瘍(サイレントキラー)」とも呼ばれ、発見時にはステージの後期に差し掛かっていることも珍しくない。検査方法として、超音波検査やバイオマーカー診断(CA125)などがあるが、精度が低く、がんが大きくなるまで発見しづらいという問題点がある。ステージ後期の5年生存率はステージ初期よりも急激に低い値であり、初期症状がほとんどないという卵巣がんの特徴もあるため、早期発見方法の確立が課題である。乳がん・卵巣がんともに早期治療を行うことが重要な課題であるため、早期発見の重要性が増している。

### (3) 膵臓がん

毎年3万人以上の方が膵臓がんで亡くなっており、膵臓がんのうち90%以上は膵液を十二指腸まで運ぶ膵管にできる膵管がんが占めている。膵臓がんでは、5年生存率が10%以下と極めて低いことが知られており、初期での膵臓がんの特徴的な症状はなく、発見が難しい。膵臓がんでは、CA19-9・CEAなどの腫瘍マーカーがあるが、必ずしも早期に膵臓がんを発見できるとは限らない。膵臓がん患者におけるこれらの腫瘍マーカー検査の陽性率はCA19-9:70-80%、CEA:55-62%と報告されている。他のがんや良性疾患、喫煙などでも陽性となることや、膵臓がん特異的ではないことが問題点としてある。

### (4) バイオマーカー

現在行われているがんの診断方法の中で低侵襲的かつ被曝のない検査方法の一つとして、バイオマーカー診断がある。バイオマーカーとは生体由来の物質で生体内の変化を定量的にはかる指標となる物質のことで

あり、特にがんにおけるバイオマーカーは腫瘍マーカーと言われている。主に、細胞表面から切断・遊離され、血液などの体液中に存在している。バイオマーカーの欠点として、対象に特異的でなくかつ精度も低いといった点が挙げられる。今日では、臨床的に多くのがんにおいて特異的分子の同定がされており、バイオマーカーに関する研究が進められている。

### (5) EphA2

上記より、本研究では多くの種類のがんで高発現しているEphA2をバイオマーカー候補として検討した。EphA2はチロシンキナーゼ受容体のファミリーに属し、腫瘍の増殖や浸潤、遊走等のシグナル伝達に関与していることが知られている。また、胃がんや肺がん等の各種がん細胞で多く発現していることやMT1-MMPによって切断され、可溶性EphA2(sEphA2:soluble EphA2)として遊離した状態で血液中に存在していることが知られている。これまでの先行研究において、肺がんおよび前立腺がん患者の血清中においてsEphA2が高値を示すことを報告した。

## 2. 研究の目的

これらの背景より、本研究では乳がんおよび卵巣がん細胞の細胞表面上のEphA2を表面分子解析法で解析し、各細胞上清および各がん患者血清中のEphA2濃度をサンドウィッチELISAで測定した。また、従来のバイオマーカーと比較し、EphA2が乳がんおよび卵巣がんに対する新規バイオマーカーとしての可能性を検討することを目的とした。さらに近年女性で急増している膵臓がんのバイオマーカーとしてのEphA2の有用性も検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) 使用細胞

ヒト乳がん細胞(MCF-7・T-47D)、ヒト卵巣がん細胞(SK-OV-3)、およびヒト膵臓がん細胞株(PK-1, SUIT-2, Tcc-PANC2)を培養し、細胞表面での発現と培養上清中のsEphA2の産生を検討した。

### (2) EphA2 抗体

研究者が樹立した抗EphA2モノクローナル抗体(SHM20・SHM41)および検出用ビオチン標識抗EphA2ポリクローナル抗体(R&D社より購入)を使用し、独自のサンドウィッチELISAを樹立した。標準タンパクrhEphA2はR&D社より購入した。

### (3) 健常人および癌患者血清サンプル

健常人血清サンプル30検体、乳がん患者血清サンプル10検体、卵巣がん患者血清サンプル26検体、膵臓がん患者血清サンプル13検体(South Florida Biologicals社、bioserve社、BioreclamationIVT社)を購入

し用いた。尚、本研究は東洋大学ヒトおよびヒト試料を用いた臨床研究倫理委員会の承認を得て実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳がん・卵巣がん・膵臓がん細胞表面上における EphA2 発現

乳がん・卵巣がん細胞における細胞表面上の EphA2 の発現を蛍光抗体法で解析した。その結果、今回研究に用いた乳がん・卵巣がん細胞および膵臓がんともに EphA2 の発現が高いことが判明した。

##### (2) EphA2 標準タンパク希釈列の検量線

EphA2 標準タンパク質の濃度希釈列を作成し、各濃度における吸光度から検量線を作成した。縦軸が EphA2 濃度、横軸が 450nm の波長で測定した吸光度になっている。検量線より多項式を導き、サンプルの吸光度を多項式の x に代入することで、y の値より EphA2 濃度を算出した。また、 $R^2$  は 1 に近いほど近似曲線の信頼性が高いことを表している。標準曲線は実験ごとに作成したものを使用するが、今回新たに樹立した検出系で、可溶性 EphA2 を 30pg/ml の低濃度まで検出することができることが判明した [Figure 1]。

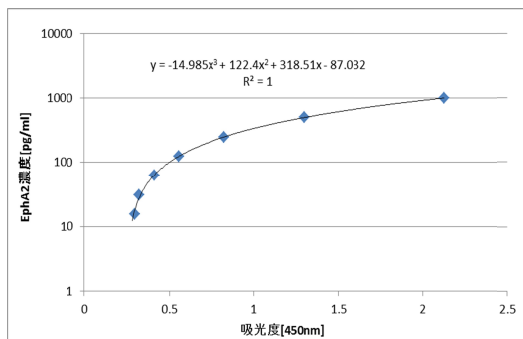


Fig1. 標準タンパク希釈列による標準曲線

##### (3) 乳がん細胞上清中の sEphA2 濃度

次に乳がん細胞上清における EphA2 の濃度をサンドウィッチ ELISA で測定した。初期細胞数を  $1 \times 10^5$  cells/ml に調整し、5日間培養した細胞上清を使用し測定した結果、乳がん細胞上清中に sEphA2 の産生が確認できた。

##### (4) 乳がん患者血清中の sEphA2 濃度

乳がん患者血清における EphA2 のサンドウィッチ ELISA の結果である。縦軸が EphA2 濃度を表している。健常人および乳がん患者各 10 検体ずつ使用し、棒線はそれぞれの平均値を示している。乳がん患者において、EphA2 値が健常人より有意に高い値にはならなかった。非常に興味深いことに、乳癌患者の方が EphA2 値が低値を示す傾向にあった (有意差無し) [Figure 2]

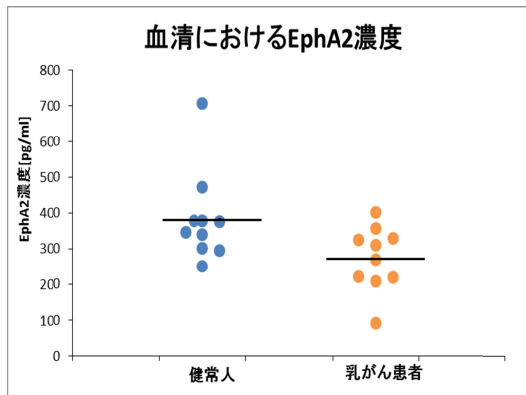


Fig.2 乳がん患者血清中の sEphA2 濃度

##### (5) 卵巣がん細胞上清中の sEphA2 濃度

卵巣がん細胞上清における EphA2 のサンドウィッチ ELISA で測定した結果、乳がん細胞と同様に卵巣がん細胞でも sEphA2 の存在が確認できた。

##### (6) 卵巣がん患者血清中の sEphA2 濃度

卵巣がん患者血清における EphA2 のサンドウィッチ ELISA の結果である。縦軸が EphA2 濃度を表している。健常人 30 検体、卵巣がん患者 26 検体を使用し、棒線はそれぞれの平均値を示している。また、点線は健常人の平均値に 2 倍の標準偏差を足した値である。結果より、卵巣がん患者の平均値の方が健常人よりも有意に高いことがわかった。 ( $p < 0.01$ ) [Figure 3]

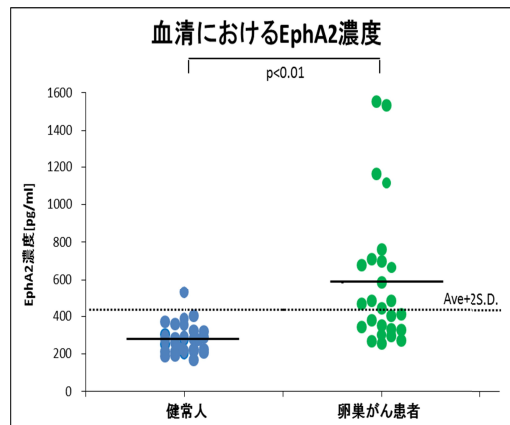


Fig.3 卵巣がん患者血清中における sEphA2 濃度

##### (7) 卵巣がん患者血清中の CA125 濃度

現在、卵巣がんのバイオマーカーとしてよく用いられている CA125 という糖タンパクを対象とした卵巣がん患者血清における ELISA の結果である。縦軸は CA125 濃度を表している。健常人 20 検体、卵巣がん患者 16 検体使用し、棒線はそれぞれの平均値を示している。また、点線は CA125 の基準値である。EphA2 の結果と同様に、卵巣がん患者の方が健常人より、平均値が有意に高いことを確認した。 ( $p < 0.01$ ) [Figure 4]

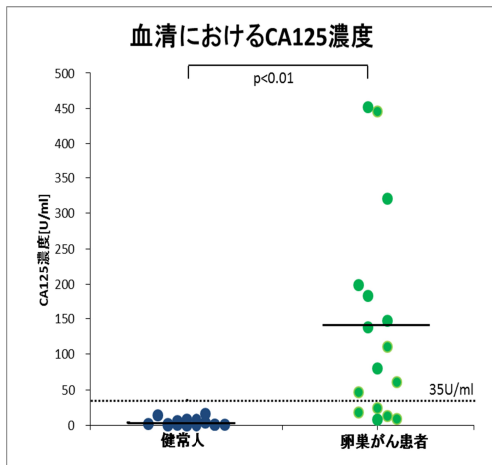


Fig.4 卵巣がん患者血清中における CA125 濃度

( 8 ) 卵巣がん患者血清における EphA2 と CA125 の相関

( 7 )および( 8 )の結果を用いて、EphA2 と CA125 の相関を取った図である。縦軸が CA125 濃度、横軸が EphA2 濃度である。R<sup>2</sup> が低いことより、両者においては弱い相関しかなく、両者は独立したものであると考えることができるので、EphA2 の新規のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。[Figure 5]

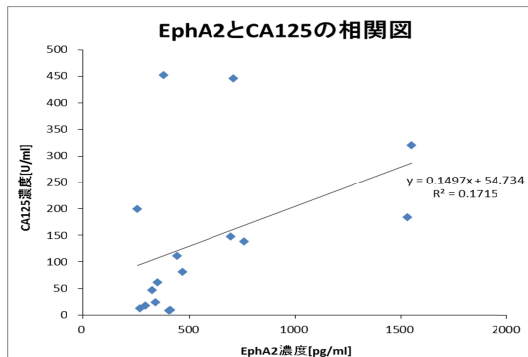


Fig.5 卵巣がん患者血清中における sEphA2 と CA125 の相関図

( 9 ) 膵臓がん患者血清中の sEphA2 濃度

健常人 40 検体および膵臓がん 13 検体・前立腺がん 25 検体の血清サンプルの sEphA2 濃度をサンドウィッチ ELISA 法で測定した。その結果、膵臓がん患者血清 (0.22-1.34 [ng/ml]) 中の sEphA2 平均濃度は 0.56 [ng/ml]、および前立腺がん患者血清 (0.20-1.35 [ng/ml]) 中の sEphA2 の平均濃度は 0.55 [ng/ml] と、健常人血清 (0.00-0.39 [ng/ml]) の平均値 0.25 [ng/ml] より有意 ( $p < 0.01$ ) に高値を示した [Figure 6]。また、赤い点線は健常人の平均値に 2 倍の標準偏差を足した値を示しており、この値である 0.41 [ng/ml] を基準値とした場合、膵臓がんにおいて偽陰性となるのは 13 検体中 6 検体 (46%)、前立腺がんにおいて 25 検体中 13 検体 (52%) となった。

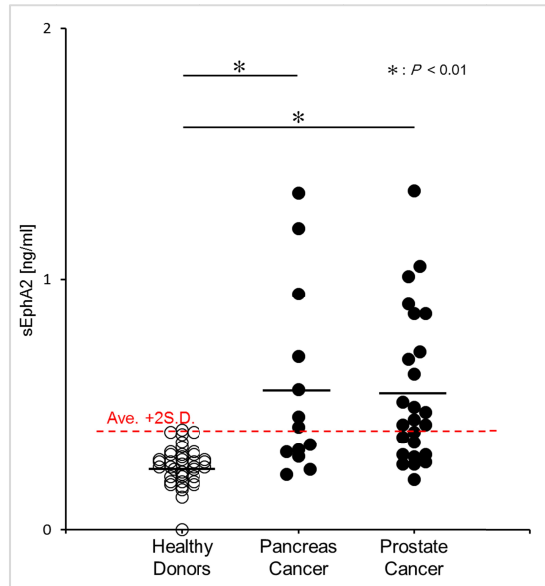


Fig.6 膵臓がん患者血清中における血清 sEphA2 濃度

以上の結果をまとめると、乳がんにおいて、細胞表面および細胞上清中の EphA2 の存在は確認できたが、血清中においては確認できなかった。本実験において、使用した乳がん血清は「治療済み」であったため EphA2 濃度が低下したと考えられる。また、使用した乳がん血清はステージが から まであり、ステージ後期であるステージ の患者血清は 2 検体であった。よって、ステージ初期の血清の方がステージ後期の血清より検体数が多いため、結果として平均値が低くなってしまったという可能性も考えられる。どちらにしても、目的である乳がんの早期発見が難しいということから、EphA2 は乳がんのバイオマーカーには適していないと考えられる。

卵巣がんにおいて、細胞表面および細胞上清中の EphA2 の存在を確認でき、血清中の EphA2 濃度も健常人より有意に高いことが判明した。さらに、従来の卵巣がんのバイオマーカーである CA125 との相関性が低いことから新規のバイオマーカーとしての可能性も示唆された。今後の展望として、子宮筋腫や子宮内膜症といった CA125 陽性となる疾患に対して、患者血清中における EphA2 濃度を測定し、CA125 の偽陽性による誤診断減少に向けて、EphA2 の有用性を検討する予定である。

EphA2 は腫瘍細胞で多く発現されている物質の一つであり、既にバイオマーカーとしての有用性が報告されている肺がんや前立腺がん、本研究で対象とした乳がんや卵巣がん以外の腫瘍細胞でも多く発現していることが知られている。今後は、膵臓がんや黒色腫 (メラノーマ) 神経膠腫 (グリオーマ) などの腫瘍細胞に対して、EphA2 のバイオマーカーとしての有用性を検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Nohara S, Kato K, Fujiwara D, Sakuragi N, Iwanuma Y and Kajiyama Y. Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target molecule for scirrhus gastric cancer. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 40: 494-503, 2016.
2. Ikeda M, Yamaguchi M, Kato K, Nakamura K, et al. Pr1E11, a novel anti-TROP2 antibody isolated by adenovirus-based antibody screening, recognizes a unique epitope. Biochem Biophys Res Commun. 458: 877-882, 2015.
3. Kato K. A novel screening method to establish tumor-targeting antibodies reliable for drug delivery system. Yakugaku zasshi, 133: 931-938, 2013.
4. Fujiwara D, Kato K, Nohara S, Iwanuma Y and Kajiyama Y. The usefulness of three-dimensional cell culture in induction of cancer stem cells from esophageal squamous cell carcinoma cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 434: 773-778, 2013.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Okuda S, Ito T, Tamura N, Tada K, Yamaji K, Takasaki Y and Kato K. Serum CD146 as a biomarker of patients with Behcet's disease. 2015 Annual Meeting for American College of Rheumatology, San Francisco, CA, USA, 2015.11.8.
2. Honma M, Ohmori N, Kudo Y and Kato K. Contrary anti-tumor effect of nobiletin in combination with various chemotherapeutic agents. The 74<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.10.8.
3. Koshiduka S, Noguchi T and Kato K. Silencing hypoxia-related carbonic anhydrase XII expression inhibits tumor cell growth of human pancreatic cancer. The 74<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.10.8.
4. Kondo T, Yumoto H, Usui K and Kato K. Soluble EphA2 is a potential serum biomarker for lung cancer. 2015 American Association for Cancer Research Annual Meeting. Philadelphia, PA, USA, 2015.4.18.
5. Naka E, Takahashi Y, Matsubara H and Kato K. Inhibitory effect of phytochemicals on Oncostatin-M-induced tumor invasion and migration in esophageal carcinoma. 2015 American Association for Cancer Research Annual Meeting. Philadelphia, PA, USA, 2015.4.18.
6. Kudo Y, Fukuda J, Harigai R, Matsubara H and Kato K. Contribution of carboxypeptidase M to tumor growth and metastasis by regulating ETM in esophagesl

carcinoma. 2015 American Association for Cancer Research Annual Meeting. Philadelphia, PA, USA, 2015.4.18

7. Kato K, Sakamoto A, Kojima T, Hasegawa T and Ikeda S. An agonistic antibody to EphA2 exhibits anti-tumor effect to human melanoma. 2015 American Association for Cancer Research Annual Meeting. Philadelphia, PA, USA, 2015.4.18.
8. Kato K, Sakamoto A, Kojima T Harigai R, Hasegawa T and Ikeda S. An agonistic antibody to EphA2 exhibits anti-tumor effect to human melanoma. Antibody Engineering and Therapeutics 2014. Huntington Beach, CA, USA, 2014.12.8.
9. Kondo T, Yumoto H, Usui K and Kato K. Soluble EphA2 is a potential biomarker for lung cancer. The 73<sup>rd</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014.9.27.
10. Naka E, Takahashi Y, Matsubara H and Kato K. Inhibitory effect of phytochemicals on Oncostatin-M-induced tumor invasion and migration in esophageal carcinoma. The 73<sup>rd</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014.9.27.
11. Kudo Y, Fukuda J, Harigai R, Matsubara H and Kato K. Contribution of carboxypeptidase M to tumor growth and metastasis by regulating ETM in esophagesl carcinoma. The 73<sup>rd</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014.9.27.
12. Ikarashi Y, Asahira J, Matsuyama T, Shiokawa D, Kato K, Imai T, Nakagama H and Okamoto K. Interleukin-22 disrupts cell polarity and barriers function of intestinal epithelial cell in 3D cell culture models. The 73<sup>rd</sup> annual meeting of the Japanese Cancer Association. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014.9.27.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

特願 2017-009349、「抗 EPHA2 抗体及びこれを用いた EPHA2 の免疫学的検出」出願日：平成 29 年 1 月 23 日、発明者：加藤和則、我妻利紀、長谷川純

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 和則 (KATO KAZUNORI)  
東洋大学・理工学部・教授  
研究者番号：60233780

(2) 研究分担者

加藤 聖子 (KATO KIYOKO)  
九州大学・医学部・教授  
研究者番号：10253527