

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861265

研究課題名(和文)前立腺癌由来エクソソームの解析

研究課題名(英文)Analysis of Prostate cancer-related exosome

研究代表者

水谷 晃輔(Mizutani, Kosuke)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80397356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌では細胞内のアンドロゲンレセプターの変異をはじめとした多彩な変化が現れる。培養前立腺癌細胞由来エクソソームの解析を行い、アンドロゲンレセプターを同定した。mRNAの解析ではアンドロゲンレセプター変異の同定が可能であった。抗体ビーズを使用して前立腺癌患者血液のエクソソームを解析したところ、前立腺癌関連エクソソームが増加しており今後、解析の有用なターゲットになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is a great need of the development of novel diagnostic strategies that target the castration-resistant prostate cancer. One of the potential strategies is the use of microvesicles including exosomes secreted from prostate cancer cells as a tool for diagnosis. Prostate cancer related exosome included androgen receptor. mRNA analysis of prostate cancer-related exosome derived from prostate cancer cell line showed that androgen receptor and its variant were detectable. Antibody conjugated beads was capable of isolation of prostate cancer-related exosomes from patient's blood. The results showed that the amount of isolated exosomes was higher in advanced and chemo-resistant prostate cancer patients than in prostate cancer patients without metastasis and healthy volunteers. Overall, this study showed that analysis of prostate cancer-related exosomes will enhance the research on prostate cancer.

研究分野：泌尿器科

キーワード：前立腺癌 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は本邦で増加しつつある癌であり、進行性前立腺癌はホルモン療法によって治療されるが早晩再発を来す。前立腺癌はアンドロゲン依存性であり、その受容体であるアンドロゲンレセプターが腫瘍の増殖に関与している。去勢抵抗性前立腺癌では細胞内に様々は変化が生じているが、アンドロゲンレセプターの変異もその一つであり、治療選択の上で重要視される。アンドロゲンレセプターは癌組織の免疫染色などで同定、解析することが一般的であるが、そのためには生検や手術で癌組織を採取する必要がある。去勢抵抗性となった状態では複数回の生検を行うことは一般的ではなく、再発を来した前立腺癌患者でのアンドロゲンレセプターなどの細胞内因子の研究は重要であるが困難である場合が多かった。そのため本研究では前立腺癌から分泌されるエクソソーム内のアンドロゲンレセプターや細胞内因子を解析することによって、将来的に採血によって前立腺癌細胞内の解析を行うべく基礎的なデータを収集した。エクソソームは、直径30-100nmの膜小胞であり、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた膜小胞が陥入されることにより形成され、最終的にエキソサイトーシスによって分泌される。分泌されたものは分泌型エクソソーム(以下エクソソーム)と呼ばれ、元の細胞の特徴を有し特徴的な細胞膜タンパク質を発現し、内部には細胞質タンパク質、核酸が含まれている。これらの結果に加えて細胞間情報伝達の新たな方法としてエクソソームを介した系が証明されつつあり、実際に癌細胞と免疫細胞、線維芽細胞、血管系細胞などのかかわりが報告されている。前立腺癌においても分泌される膜小胞のサイズより名称は異なるが類似のプロスタソームについては以前より報告が散見されるし、前立腺癌エクソソームについては診断や治療効果に関係するという報告がなされている。しかしエクソソームはすべての細胞から分泌されるため、前立腺癌研究への応用のためには前立腺癌関連エクソソームの単離方法の確立が必要であった。

2. 研究の目的

前立腺癌の治療抵抗性に伴う細胞内情報を得るために、培養前立腺癌細胞関連エクソソームの単離と解析を第一段階の目的とした。最終的には培養細胞を用いて確立した方法が、患者血液を用いて使用可能かどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

前立腺癌関連エクソソームを単離、解析するために以下の順序で研究の方法を示す。

前立腺癌培養細胞上清からのエクソソーム単離

) 超遠心法による前立腺癌細胞培養上清か

らのエクソソーム単離

前立腺癌細胞をエクソソームフリー培地で培養し、超遠心法によりエクソソームを単離する。

) ビーズ法による前立腺癌細胞培養上清からのエクソソーム単離

細胞上清を遠心とフィルターで処理し細胞成分を除去した後に、抗PSMA抗体または抗CD9抗体を付加した磁気ビーズを使用して、エクソソームを単離する。

) エクソソームの確認

超遠心法またはビーズ法により単離したエクソソームからタンパクを抽出しウェスタンブロットにて複数のマーカーを用いエクソソーム分画であることを確認する。

培養前立腺癌由来エクソソーム内の細胞内因子の確認

ビーズ法にて単離したエクソソームタンパクを解析する。去勢抵抗性前立腺癌において最も研究が求められるアンドロゲンレセプターのmRNAについても解析を行う。

前立腺癌患者末梢血からの前立腺癌関連エクソソームの単離

) ビーズ法による患者血清からの前立腺癌関連エクソソームの単離

前述したビーズを使用し、遠心とフィルターにより細胞成分を除去した患者血清よりエクソソームを単離する。

前立腺癌患者血清から単離したエクソソームの確認

) 単離したエクソソームよりタンパクを抽出し、ウェスタンブロットにてマーカーを用いエクソソーム分画であることを確認する。

患者より採取した前立腺癌関連エクソソームのタンパク解析

ビーズ法にて単離したエクソソームタンパクをwestern blot法で解析する。

患者より採取した前立腺癌関連エクソソームのmRNA解析

ビーズ法にて単離したエクソソームからmRNAを抽出しアンドロゲンレセプター、特に治療抵抗性との関連が報告されているそのvariantについて発現を確認する。

4. 研究成果

前立腺癌細胞培養上清から超遠心法にてエクソソームを精製し、western blotを行った(Fig. 1)。超遠心法で精製した分画にはCD9、CD63が含まれ、エクソソームが回収できていることが確認できた。前立腺癌治療の重要なターゲットであるアンドロゲンレセプターも含まれていることが確認できた。また前立腺癌関連エクソソームに単離のターゲットとなるPSMAも含まれている事を確認した。

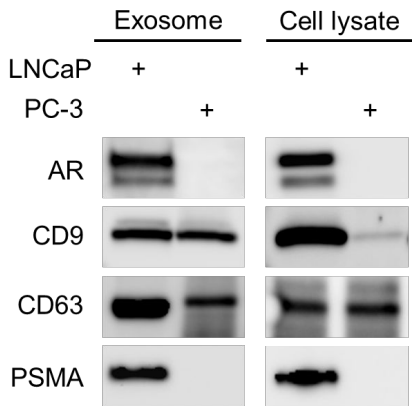


Fig. 1

前立腺癌関連エクソソームには前立腺に特異的な PSMA が含まれている事を見出したので、これをターゲットとして前立腺癌関連エクソソームを単離することとし、抗体を付加したビーズ（抗 PSMA ビーズ、抗 CD9 ビーズ）を作成し、前立腺癌培養細胞上清からビーズ法にてエクソソームを単離し、western blot 法にて解析した（Fig. 2）。ビーズ法にて単離したエクソソームにも、アンドロゲンレセプターや細胞内に存在する酵素の一つである GAPDH も含まれている事を確認した。以上より、ビーズ法にて単離した前立腺癌関連エクソソームが細胞内因子改正のためのツールになる可能性が示唆された。

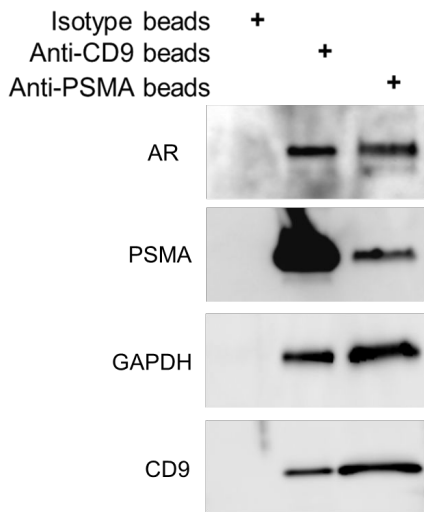


Fig. 2

次に前立腺癌関連エクソソーム内にアンドロゲンレセプターの mRNA が含まれているかを検討した。前立腺癌培養細胞（22RV-1）の上清より、前述のごとくビーズ法にて前立腺癌関連エクソソームを単離し、mRNA を抽出し定量的 PCR 法で解析した（Fig. 3）。前立腺癌関連エクソソーム内にはアンドロゲンレセプター（AR-WT）とその変異である variant 7（AR-V）の mRNA 存在することが明らかになった。

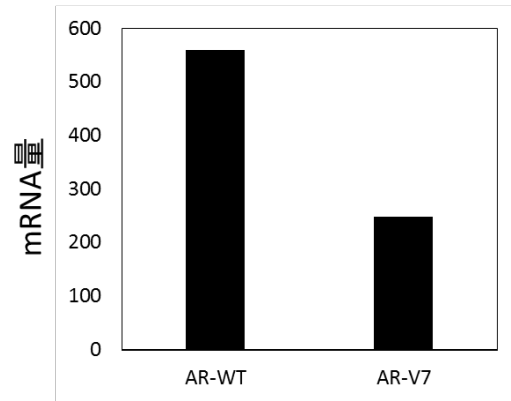


Fig. 3

上記で確立した方法が前立腺癌患者血液を用いて解析可能かどうかを検討した。同意を得られた健常ボランティア、早期前立腺癌、進行性前立腺癌患者より血液を採取し、ビーズ法にて前立腺癌関連エクソソームを単離し、western blot 法にて確認したところ進行性と治療抵抗性前立腺癌患者では前立腺癌関連エクソソーム量が増加していることが確認された（Fig. 4）。

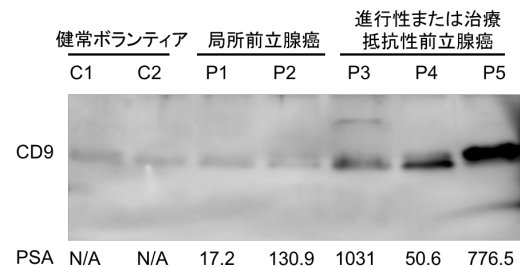


Fig. 3

さらに前立腺癌関連エクソソームの解析を進め、前立腺癌の増殖に関与しているテストステロンにターゲットを定め ELISA 法で定量解析したところ、治療前進行性前立腺癌の患者から得られたエクソソームではテストステロン値が高かったが、ホルモン療法下にある患者ではテストステロン濃度が低く、前立腺癌細胞内の情報を反映している可能性が示唆された。

以上の結果より、抗 PSMA 抗体ビーズを使用して、患者血液より前立腺癌関連エクソソームを単離、解析できることを証明した。生検なしで前立腺癌の細胞内情報を取得できる可能性が示唆され、今後の前立腺癌研究に寄与できると考えられた。

<引用文献>

Mizutani K, Terazawa R, Kameyama K, Kato T, Horie K, Tsuchiya T, Seike K, Ehara H, Fujita Y, Kawakami K, Ito M, Deguchi T. Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Res.* 2014;34:3419-23.

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 1 件)

Mizutani K, Terazawa R, Kameyama K, Kato T, Horie K, Tsuchiya T, Seike K, Ehara H, Fujita Y, Kawakami K, Ito M, Deguchi T. Isolation of prostate cancer-related exosomes. Anticancer Res. 2014;34:3419-23. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

水谷 晃輔: 前立腺癌由来エクソソームを用いた細胞内テストステロン濃度測定の試み。

第 11 回岐阜泌尿器科共同研究会: グランベール岐山 2015/07/04 岐阜県岐阜市

水谷 晃輔: Analysis of Prostate cancer-related exosomes.

第 103 回日本泌尿器科学会総会: ホテル日航金沢 2015/04/20 石川県金沢市

水谷 晃輔: 前立腺癌特異的エクソソーム単離・解析システムの構築。

第 10 回岐阜泌尿器科共同研究会: 岐阜会館 2014/07/06 岐阜県岐阜市

水谷 晃輔: 前立腺癌関連エクソソーム解析。

第 31 回 Gifu Urologists' Youth Seminar: 長良川国際会議場 2014/06/28 岐阜県岐阜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 晃輔 (MIZUTANI, Kosuke)

岐阜大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 80397356