

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 切除組織培養分泌エクソソームの網羅的解析によるがん早期診断薬開発
(英語) Development of cancer early detection biomarkers using cultured tissue-derived exosomes
- 研究開発担当者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 ゲノムセンター
がんオーダーメイド医療開発プロジェクト プロジェクトリーダー
植田 幸嗣
- 所属 役職 氏名： (英語) Project for Realization of Personalized Cancer Medicine,
Genome Center, Japanese Foundation for Cancer Research
Project Leader, Koji Ueda
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) バイオマーカー測定キット構築・検証試験
開発課題名： (英語) Development of biomarker detection system
- 研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 ゲノムセンター
がんオーダーメイド医療開発プロジェクト プロジェクトリーダー
植田 幸嗣
- 所属 役職 氏名： (英語) Project for Realization of Personalized Cancer Medicine,
Genome Center, Japanese Foundation for Cancer Research
Project Leader, Koji Ueda
- 分担研究 (日本語) 大腸癌検体収集・検証試験結果評価
開発課題名： (英語) Acquisition of colon cancer clinical samples
- 研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人がん研究会 がん研究会 有明病院 消化器外科
医長 長山 聡
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Gastroenterological Surgery, Cancer Institute Hospital,
Japanese Foundation for Cancer Research
Chief Surgeon, Satoshi Nagayama

II. 成果の概要（総括研究報告）

（日本語）

本研究は根治可能な早期の段階で腎癌、大腸癌の存在診断が可能な体外診断薬の開発、実用化を最終目的とする。具体的には研究代表者のこれまでの研究から明らかとなった癌細胞に由来する細胞外分泌小胞（エクソソーム）上の腎癌、および大腸癌特異的タンパク質抗原を標的とした診断薬開発を目指す。

腎癌早期診断バイオマーカー候補として同定したエクソソーム上 MPF1 (Exo-MPF1) タンパク質について、平成 28 年度は市販抗体や質量分析法を用いた血清中 Exo-MPF1 の高感度検出系確立を行った。血清使用量をはじめ各種実験条件の至適化を完了し、健常者 10 例、腎癌患者 19 例由来血清を用いた Exo-MPF1 測定を行った結果、健常者血清からは Exo-MPF1 が 1 例も検出されず、腎癌患者血清では 19 例中 10 例で検出に成功した（感度 52.6%、特異度 100%）。この結果から、血清検体から Exo-MPF1 を特異的に検出可能であることが分かった。また、癌特異性が非常に高いバイオマーカーであることも示唆されたため、将来的な診断キット化も加味した自製抗体の作成も開始した。

一方、研究分担機関と協力して Exo-MPF1 の生理的機能の解明を行った結果、MPF1 高発現エクソソームが血管内皮細胞シートにダメージを与え、透過性を有意に上昇させることが明らかとなった。MPF1 はプロテアーゼ活性を持つタンパク質であることが知られ、これらのことは腎癌細胞由来エクソソームが MPF1 の活性依存的に血管壁を傷害し、血管内浸潤、さらに遠隔転移を惹起していることが推察される。さらに、MPF1 上に存在する 3 本の N 型糖鎖修飾が MPF1 タンパク質のエクソソームへの搭載に必須であることも判明した。引き続きこれらの事象は腎癌モデルマウスや腎癌 PDX マウスへのエクソソーム投与実験など *in vivo* での検証を進めていく予定である。ここまでの成果は特許申請を行うとともに論文投稿を完了した。

大腸癌早期診断バイオマーカーについては、腎癌同様、切除組織培養分泌エクソソームを 20 症例の癌部、正常部から調製して網羅的なエクソソームタンパク質定量比較解析を実施した。LC/MS 分析の結果 6,371 タンパク質が同定され (FDR < 1%)、その中から $p < 0.05$ (paired *t*-test)、fold change > 4.0、さらに Transmembrane domain を持つ膜タンパク質、というすべての条件を満たす 27 タンパク質を大腸癌エクソソームバイオマーカー候補分子として決定した。特に平成 28 年度は公的な遺伝子発現データベースや過去の論文などで大腸癌細胞内における発現亢進が報告されている 4 分子に焦点を絞って以下の検証試験を進めた。

これらエクソソームバイオマーカーシーズタンパク質が大腸癌組織検体において実際に高発現が認められるかを確かめるため組織免疫染色実験を行ったところ、上記 4 タンパク質とも正常大腸組織では発現を全く認めないか非常に低い発現量であるのに対し、大腸癌細胞においては主に細胞膜部分への強い発現が確認できた。

さらに、同バイオマーカーシーズ 4 種が血中エクソソームからも大腸癌患者特異的に検出可能かどうかを検証するため、市販抗体を用いた Western blotting、ELISA、および定量質量分析法による検出テストを実施した。18 症例の健常者、および大腸癌患者由来血漿を用いた試験の結果、特に 14 回膜貫通タンパク質である GAM タンパク質が $p = 6.9 \times 10^{-3}$ 、fold change = 7.4 (*t*-test) と顕著に大腸癌患者血漿エクソソーム上において高発現していることが示された。

大腸癌早期診断バイオマーカーシーズ 27 種類の免疫アッセイ系構築、中規模検証試験は平成 29 年度までの完了を目標としているため、引き続き同様の検証を継続予定である。

(English)

This project aims to develop novel diagnostic methods, allowing early detection of kidney cancer or colon cancer at the curable stage. Particularly we here focused on exosomal proteins (protein cargoes encapsulated in cancer cell-derived extracellular vesicles) as targets of diagnostic biomarkers.

For kidney cancer biomarker project, we tried to establish sensitive and high-throughput detection system for exosomal MPF1 (Exo-MPF1) using commercial antibodies or quantitative mass spectrometric technology, which had been identified as the best candidate of kidney cancer exosomal biomarker in our previous screening using cultured tissue-derived exosomes. We optimized experimental parameters, such as concentration of antibody and serum volume, and measured Exo-MPF1 levels in 29 serum samples (10 healthy donors and 19 kidney cancer patients). As a result, Exo-MPF1 was detected in 10 of 19 kidney cancer cases, whereas it was undetectable in healthy donor serum samples (sensitivity = 52.6% and specificity = 100%), indicating that Exo-MPF1 would have a great potential to be used for non-invasive kidney cancer blood test.

We further performed biological functional analysis for Exo-MPF1. When MPF1-overexpressed exosome was added to the media of vascular endothelial cell sheet, permeability of the cell sheet was significantly increased. Since MPF1 is known to possess protease activity, this result suggested that Exo-MPF1 might damage vascular walls and promote kidney cancer hematogenous metastasis. We also found that three N-glycans on MPF1 were essential for incorporation of MPF1 into exosomes. These findings will be continuously validated *in vivo* using mice models. We applied a patent for new diagnostic kit.

For colon cancer biomarker project, we performed proteome-wide profiling of cultured tissue-derived exosomes derived from colon cancer tissues and adjacent normal mucosae (n = 20), resulting in identification of 6,371 exosomal proteins (FDR < 1%). The following statistical analysis extracted 27 biomarker candidate proteins which satisfied the criteria; $p < 0.05$, fold-change > 4.0 , and transmembrane proteins. In this year, we focused on 4 of 27 candidates based on public knowledgebase and reports showing overexpression in colon cancer cells. Indeed, Immunohistochemical staining analysis clearly showed that 4 candidate biomarker proteins strongly expressed on the plasma membrane of cancer cells, while no or very weak staining patterns were observed in normal cells. Next, western blotting analysis, ELISA assay, and quantitative mass spectrometric analysis were carried out to check the expression levels of biomarker candidates on plasma exosomes (n = 18). Especially, a 14 transmembrane protein GAM demonstrated significant overexpression on plasma exosomes derived from colon cancer patients compared to healthy donor group (t-test, $p = 6.9 \times 10^{-3}$, fold change = 7.4).

The remaining colon cancer exosomal biomarker candidates will be continuously evaluated in the next year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 9 件)

1) Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class X containing complex promotes cancer cell proliferation through suppression of EHD2 and ZIC1, putative tumor suppressors
Nakakido, M., Tamura, K., Chung, S., Ueda, K., Fujii, R., Kiyotani, K., and Nakamura, Y.
International journal of oncology, (2016) 49, 868-876.

2) Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma
Sakha, S., Muramatsu, T., Ueda, K., and Inazawa, J.
Scientific reports, (2016) 6, 38750.

3) Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the Helicobacter pylori virulence factor CagA
Shimoda, A., Ueda, K., Nishiumi, S., Murata-Kamiya, N., Mukai, S.A., Sawada, S., Azuma, T., Hatakeyama, M., and Akiyoshi, K.
Scientific reports, (2016) 6, 18346.

4) Morphological Changes, Cadherin Switching, and Growth Suppression in Pancreatic Cancer by GALNT6 Knockdown
Tarhan, Y.E., Kato, T., Jang, M., Haga, Y., Ueda, K., Nakamura, Y., and Park, J.H.
Neoplasia, (2016) 18, 265-272.

5) GALNT6 Stabilizes GRP78 Protein by O-glycosylation and Enhances its Activity to Suppress Apoptosis Under Stress Condition
Lin, J., Chung, S., Ueda, K., Matsuda, K., Nakamura, Y., and Park, J.H.
Neoplasia, (2017) 19, 43-53.

6) MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma
Matsuzaki, K., Fujita, K., Jingushi, K., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Ueda, Y., Tanigawa, G., Yoshioka, I., Ueda, K., Hanayama, R., Uemura, M., Miyagawa, Y., Tsujikawa, K., and Nonomura, N.
Oncotarget, (2017) 8, 24668-24678.

7) Argininosuccinate synthase 1 is an intrinsic Akt repressor transactivated by p53
Miyamoto, T., Lo, P., Saichi, N., Ueda, K., Hirata, M., Tanikawa, C., and Matsuda, K.
Science Advances, (2017) in press.

8) EPSIN 3, A Novel p53 Target, Regulates the Apoptotic Pathway and Gastric Carcinogenesis
Mori, J., Tanikawa, C., Ohnishi, N., Funauchi, Y., Toyoshima, O., Ueda, K., and Matsuda, K.
Neoplasia, (2017) 19, 185-195.

9) Effects of SMYD2-mediated EML4-ALK methylation on the signaling pathway and growth in non-small cell lung cancer cells
Wang, R., Deng, X., Yoshioka, Y., Vougiouklakis, T., Park, J.H., Suzuki, T., Dohmae, N., Ueda, K., Hamamoto, R., and Nakamura, Y. Cancer Sci, (2017) In press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1) エクソソームを利用したがんリキッドバイオプシー診断技術の開発, 口頭

Ueda, K.

Urological Research Seminar, (2016) June. 22, 国内.

2) Trans-OMICS analysis of immunopeptidome for development of personalized cancer immunotherapy, 口頭

Ueda, K.

日本プロテオーム学会 2016 年年会, (2016) July. 28, 国内.

3) エクソソームを利用したがん早期診断法の開発, 口頭

Ueda, K.

第 23 回 JBIC バイオ関連基盤技術研究会, (2016) Sep. 15, 国内.

4) Proteogenomic profiling of neoantigens for personalized cancer immunotherapy, 口頭

Ueda, K.

HUPO 2016, (2016) Sep. 21, 国外.

5) Development of personalized cancer immunotherapy by Trans-OMICS analysis, 口頭

Ueda, K.

第 89 回日本生化学会大会, (2016) Sep. 25, 国内.

6) Microenvironmental communications within gastrointestinal cancer tissue illustrated by proteome analysis of exosomes, 口頭

Ueda, K.

第 75 回日本癌学会学術総会, (2016) Oct. 8, 国内.

7) エクソソームを利用したがんリキッドバイオプシー診断法の開発, 口頭

Ueda, K.

JMAC 第 93 回ワーキンググループ会議, (2016) Nov. 21, 国内.

8) 細胞外分泌小胞エクソソームによるがん診断, 口頭

Ueda, K.

第 17 回関東ホルモンと癌研究会, (2017) Jan. 28, 国内.

9) Exosomal Liquid Biopsy for Early Detection of Kidney Cancer, 口頭

Ueda, K.

The 4th Annual US Japan Workshop on Cancer Biomarkers, (2017) Mar. 6, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

特願 2016-211239