

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) がん特異的エクソソームの捕捉による新規体液診断の実用化研究  
(英語) Practical application of novel body fluid diagnosis using cancer specific exosomes
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野  
主任分野長 落谷 孝広
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Molecular and Cellular Medicine,  
National Cancer Center Research Institute,  
Chief, Takahiro Ochiya
- 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) がん特異的エクソソームによる新規体液診断の実用化研究に資する臨床検体の  
収集、エクソソームを標的とした肝がん・胆道がんの早期再発予測バイオ  
マーカーの開発
- 開発課題名： (英語) Collection of clinical specimens that contribute to practical  
application of novel body fluid diagnosis using cancer specific  
exosome, Development of biomarker for predicting early recurrence  
of liver cancer and biliary tract cancer targeting exosome
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 先端医療開発センター  
免疫療法開発分野 分野長 中面 哲也
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Cancer Immunotherapy,  
Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center  
National Cancer Center  
Chief, Tetsuya Nakatsura

## II. 成果の概要（総括研究報告）

国立がん研究センターの中面哲也 分野長のグループとともに、膵臓がん、膀胱がん、卵巣がん、肺がん、肝臓がん、胆道がんのバイオマーカーおよび診断マーカーの開発に取り組んだ。

以下、各開発項目ごとに研究成果を報告する。

### （1）エクソソームを標的とした膵臓がんの早期診断バイオマーカーの開発

平成 28 年度中は血清検体の収集および収集した検体の解析を行った。解析方法は超遠心法にて回収したエクソソームをウェスタンブロット法でバイオマーカー候補の EPS8 と GPRC5C タンパク質の量を解析した。合計 92 人の膵臓がん患者、60 人の健常人、10 人の慢性膵炎患者、それぞれの血清を解析し、膵臓がん患者血清中のエクソソームにマーカータンパク質が多く含まれることを明らかにした。さらに術後、再発時の血清もそれぞれ 20 検体ほど解析した。その結果、再発時の微小な膵臓がんにおいても血清中に EPS8 および GPRC5C 陽性エクソソームを確認できた。一部、慢性膵炎患者の血清で、マーカータンパク質が確認されたが、半数以上の膵臓がん患者で高値を示した。

### （2）尿中エクソソームを標的とした非侵襲的な膀胱がんの再発診断バイオマーカーの開発

平成 28 年度は尿検体収集に重点を置き、特に膀胱がん再発患者の尿の収集を行った。症例数は多くないが、数例収集できたので、平成 29 年度に解析を行う。

### （3）新規抗がん剤におけるコンパニオン診断薬の開発

平成 28 年度は肺腺がん細胞株 PC9 を含む複数の細胞株から分泌されるエクソソームには、タンパク質 X のリガンドであるタンパク質 Y が内包されていることを明らかにした。また、肺癌患者肺手術検体を用いて腫瘍組織内のタンパク質 Y の発現と血清由来エクソソーム及びがん細胞初代培養細胞由来エクソソーム内のタンパク質 Y の発現の相関を解析した。これら結果をもとに継続して解析することで、血中エクソソームに由来するタンパク質 Y が組織生検不要の代替方法になるか検討する。

### （4）エクソソームを標的とした肝がん・胆道がんの早期再発予測バイオマーカーの開発

平成 28 年度は肝がん・胆道がんの検体の収集を計画通りに遂行し、予定数を達成した。またすでにエクソソームの精製などの技術開発などを行い、マーカー探索の予備検討を開始する準備を確実に進めており、エクソソームのみならず血中 miRNA の解析にも着手し、現在解析中である。血中 miRNA に関して、22 例の胆道がんの患者の術前術後の血清を解析している。そのうち、13 例は再発確認時の血清も解析しており、胆道がんの再発予測マーカーおよびモニタリングマーカーの同定を試みた。

英文による成果概要

#### (1) Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma.

We collected serum samples from pancreatic cancer patient and analyzed extracellular vesicles associated proteins from patient sera by immunoblotting. These results indicated that EPS8 or GPRC5C positive extracellular vesicles were detected in cancer patient sera. Moreover, we could detect EPS8 or GPRC5C

positive extracellular vesicles in serum of patients with recurrent cancer.

- (2) Cancer-associated urinary extracellular vesicles as novel markers in monitoring for recurrence of bladder cancer.

We collected urine samples of patient with recurrence of bladder cancer. In 2017, we will analyze these samples.

- (3) Analysis of serum exosome proteins X in non-small cell lung cancer.

In 2016, we identified protein X in exosomes from human non-small cell lung cancer cell lines including PC9. We also analyzed the correlation between the levels of protein X in circulating serum exosomes and the expression of protein X by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer.

- (4) Development of predictive marker for early recurrence of hepatocellular carcinomas and biliary tract cancer by targeting exosomes

In 2016, the sample collection of hepatocellular carcinomas and biliary tract cancer was achieved as planned. We have established a preliminary examination platform for the biomarker discovery by preparing technological system and protocols such as purification of exosomes, and as an ongoing work, we are analyzing circulating blood miRNAs as well as serum exosomes. As for serum miRNAs, the sera after preoperative surgery of 22 patients with biliary tract cancer are being analyzed. Of these, 13 samples were recurred and also the serum samples are planned to analyze and identify the predictive biomarkers for recurrence and also monitoring markers of biliary tract cancer.

### 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 1 件、国際誌 5 件）

1. Ofuji K, Saito K, Suzuki S, Shimomura M, Shirakwa H, Nobuoka D, Yawada Y, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, Yoshikawa T, Tada Y, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Nakamoto Y, Nakatsura T. Perioperative plasma glypican-3 level may enable prediction of the risk of recurrence after surgery in patients with stage I hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 27. doi: 10.18632/oncotarget.14271. [Epub ahead of print]
2. 中面哲也, Glypican-3 抗原を標的にしたがんペプチドワクチン、日本臨床 2017 年 2 月特集号「がん免疫療法」
3. Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nature Communications*. 2017; 8, 14470.
4. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016, 126(4):1163-72.
5. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016, 17, pii: E1801.
6. Kadota T, Yoshioka Y, Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung cancer- From bench to bedside. *Semin Cell Dev Biol*, 2017. pii: S1084-9521(17)30140-4.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血中全長型 Glypican-3 測定による肝細胞がん診断技術の開発, 口頭, 三浦雅央, 藤浪紀洋, 齊藤桂吾, 須藤浩三, 吉田智一, 中面哲也, 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会 (横浜), 2016/10/5, 国内.
2. 選択的スプライシングによって生成する分泌型 Glypican-3 アイソフォームの同定 (Alternative splicing generates the soluble isoform of glypican-3 in HCC and melanoma cell lines.), ポスター, Saito K, Yoshikawa T, Saito Y, Fujinami N, Suzuki T, Jimmy C, Nakatsura T, 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016/10/6~8, 国内.
3. Perioperative plasma glypican-3 levels predict the risk of post-operative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. Poster, Saito K, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nemoto T, Nakamoto Y, Nakatsura T. AASLD2016 (Boston) ,2016/11/11~15, 国外.
4. Circulating cancer-associated extracellular vesicles as early detection biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma. Poster Presentation. Yusuke Yoshioka, Hiroko Tadokoro and Takahiro Ochiya. 5th International meeting of ISEV. Rotterdam, The Netherlands, 4 – 7 May, 2016 国外
5. Malignant extracellular vesicles cause mesothelial cell damage toward peritoneal dissemination in ovarian cancer., Poster, Akira Yokoi, Takahiro Ochiya., The 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium Organized by AACR. Seattle, Washington, September, 2016/9/12-13, 国外.
6. Ovarian cancer-derived extracellular vesicles promote peritoneal metastasis by destruction of peritoneum., Poster, Akira Yokoi ,Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Tomoyasu Kato, Takahiro Ochiya., Exosomes/Microvesicles: Novel Mechanisms of Cell-Cell Communication; Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, 19 - 22, 2016/6/19-22 国外.
7. Malignant extracellular vesicles accelerate peritoneal metastasis by damaging mesothelium in ovarian cancer., Oral, Akira Yokoi, Yusuke Yoshioka, Yusuke Yamamoto, Mitsuya Ishikawa, Tomoyasu Kato, Tohru Kiyono, Hiroaki Kajiyama, Fumitaka Kikkawa and Takahiro Ochiya. 第 75 回日本癌学会総会. 横浜 2016 10/6-8, 国内.
8. 血清中 miRNA プロファイルによる早期卵巣がん診断バイオマーカーの開発., 口頭, 横井 暁, 吉岡 祐亮, 加藤 友康, 梶山 広明, 吉川 史隆, 落谷 孝広. 第 36 回日本分子腫瘍マーカー研究会. 横浜 2016 10/5, 国内.
9. 卵巣がん細胞由来 MMP1 含有悪性エクソソームによる腹膜播種促進メカニズム. Oral, 横井暁, 吉岡祐亮, 落谷孝広. 第 3 回細胞外小胞学会. 広島 2016/8/31-9/2, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がん診断・治療の最前線」三菱 UFJ モルガン・スタンレー証券 新春セミナー2017 (2017. 1. 12 東京)
2. 「血液 1 滴でがんを知る：体液マイクロ RNA 測定技術 未病社会の診断技術研究会：第 24 回講演会 (2016. 12. 7 東京)
3. 「エクソソーム」第 4 回創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム (2016. 12. 7 東京)

4. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」(2016.11.27 東京)
5. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技術～」NHK ジャーナル(2016.10.19 NHK ラジオ)
6. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」再生医療サポートビジネス懇話会(2016.10.17 京都)
7. 動き出したエクソソーム創薬」日経 BP 社講演会 エクソソームセミナー(2016.6.6 白金)

(4) 特許出願

公開対象なし。