

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発
(英語) Development of exosome-based early detection biomarkers for Pancreatic cancer
- 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 4 月 1 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

II. 成果の概要（総括研究報告）

（日本語）

本研究は血液中の癌細胞由来分泌小胞「エクソソーム」に発現しているタンパク質を標的とした膵癌早期診断バイオマーカーの開発と臨床応用を目的として実施した。

1. 膵癌早期診断エクソソームバイオマーカー候補タンパク質同定

血液中の分泌小胞エクソソーム上タンパク質を標的とした膵癌早期診断バイオマーカーを効率的に探索する目的で、サイズ排除クロマトグラフィーと弱疎水性相互作用を組み合わせた独自のエクソソーム精製ツール「EV-Second カラム」を開発した。当カラムは品質の維持と安定供給が可能なように株式会社 GL サイエンス社による工場生産、国際的に市販も開始された。本法を用いて 95 症例由来血清エクソソームを採取し、質量分析による網羅的定量プロテオーム解析を行った結果 987 エクソソームタンパク質が同定され (FDR < 1%)、続く統計解析から 14 タンパク質を新規膵癌バイオマーカーシーズとして決定した (t-test, $p < 0.05$, fold-change > 2.0)。さらにこの中から、エクソソームサンドイッチ ELISA 法での検出が可能な細胞膜貫通タンパク質 5 種を 2. 以降の大規模検証試験における標的分子として選択した。

2. エクソソームサンドイッチ ELISA による膵癌早期診断エクソソームバイオマーカー検証

探索フェーズ（平成 26～27 年度前半）にて同定された膵癌早期診断用エクソソーム表面抗原 (JFCR-P00197, P00269, P00288, P00510, P00693) について十分な測定濃度幅 (ダイナミックレンジ) を定量的に検出可能な ELISA キットを構築できた。この In-house ELISA キットと 240 例の血清セット (健常者 80 例、慢性膵炎患者 36 例、膵癌患者 124 例) を用いた検証試験を実施し、上記 5 バイオマーカーシーズについて感度、特異度、ROC 曲線下面積 (AUC) がそれぞれ 51.3～70.5%、81.2～100%、0.653～0.846 を示したことから、5 候補ともに膵癌患者群の診断効率は実用に耐える程度に高いと再評価できた。とりわけ AUC が 0.846 を示したエクソソーム上 P00269 タンパク質については、ROC 曲線から求めた至適閾値において感度 62.1%、特異度 94.9% と優れた診断能を示すことが検証試験においても確認され、単独マーカーとして最も有望なシーズとして評価できた。

3. 質量分析マルチマーカー診断法の構築

高速質量分析定量技術である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いた多項目診断アルゴリズムの構築を試みた。これまでに同定された 2. に記載の 5 種膵癌早期診断用エクソソーム表面抗原のアミノ酸配列のうち、それぞれのタンパク質を最も高感度、高特異度に検出可能な部分配列質量 (MRM チャネル)、および分析パラメータを決定し、25 分間の MRM 質量分析で 5 タンパク質を同時定量できる系を構築した。当分析システムを用いて 2. と同様の血清を用いた定量測定を行い、ROC 解析における AUC 値が最大となる条件で 5 バイオマーカーを使用したロジスティック回帰診断式を作成した結果、感度 70.3%、特異度 90.9%、AUC 0.870 となり、単独マーカーとして最善の結果を示した P00269 よりいずれも高値だったことから 5 マーカー統合診断法により更に診断能を向上できることが分かった。

(English)

This project aims to develop novel diagnostic methods, allowing early detection of pancreatic 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.

1. Identification of early detection biomarkers for pancreatic cancer

To perform sensitive and reproducible exosomal protein analysis, we developed the “EV-Second column” based on size exclusion chromatography and weak hydrophobic interaction. In 2015, factory production of the EV-Second column started to guarantee purification quality and stable supply, which is now commercially available from GL Sciences Inc. internationally. Using this technology, we isolated exosomes from 95 serum samples and performed quantitative proteome analysis. Following 987 protein identification (FDR < 1%), 14 proteins were selected by subsequent statistical analysis as novel pancreatic cancer biomarker candidates (t-test, $p < 0.05$, fold-change > 2.0). Among them, 5 transmembrane proteins were further extracted and subjected to next large-scaled validation experiments using exosome sandwich ELISA assay.

2. Biomarker validation study using exosome sandwich ELISA assay

We established exosome sandwich ELISA assays for 5 exosome surface antigens (JFCR-P00197, P00269, P00288, P00510, P00693) and confirmed sufficient sensitivity and specificity to detect them from serum exosomes. The large-scaled validation study was then performed using the immunoassays above and 240 serum samples (80 healthy donors, 36 chronic pancreatitis patients, and 124 pancreatic ductal adenocarcinoma patients). As a result, sensitivity, specificity, or area under the curve (AUC) of ROC analysis was 51.3~70.5%, 81.2~100%, or 0.653~0.846, respectively, indicating that the diagnostic powers of 5 biomarker seeds would be sufficient for usage in clinical diagnosis. In particular, exosomal P00269 was defined as the most preferable biomarker target demonstrating 62.1% sensitivity, 94.9% specificity, and AUC 0.846.

3. Development of mass spectrometric multi-marker diagnostics

We finally tried to construct a multi-marker diagnosis model to improve diagnostic performance using Multiple Reaction Monitoring (MRM), a multiplex mass spectrometric quantification method. After optimization of MRM parameters for 5 exosomal antigens described in the previous section, these proteins were simultaneously quantified in a 25 minutes LC-MS run. The logistic regression-based 5-marker diagnostic model showed that sensitivity, specificity, or AUC was 70.3%, 90.9%, or 0.870, respectively. This result suggested that integration of 5 exosomal biomarkers could have a better diagnostic potential compared to each single biomarker measurement.

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

2017 年 3 月 4 日にアキバホール (東京・秋葉原) で行われた、ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト 平成 28 年度市民向け成果発表会「目指すはひとつ 命のために—最新がん研究から未来を描く—」において、本事業の成果を冊子紙面上にて公開した。

(4) 特許出願

該当なし