



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109906382 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201780067027.4

神宫司健太郎

(22)申请日 2017.10.26

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

(30)优先权数据

代理人 龙淳 狄茜

2016-211239 2016.10.28 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2019.04.28

G01N 33/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/68(2018.01)

PCT/JP2017/038812 2017.10.26

G01N 33/15(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

G01N 33/50(2006.01)

W02018/079689 JA 2018.05.03

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/92(2006.01)

(71)申请人 公益财团法人癌研究会

地址 日本东京都

申请人 国立大学法人大阪大学

(72)发明人 植田幸嗣 大西直美 野野村祝夫

植村元秀 藤田和利 辻川和丈

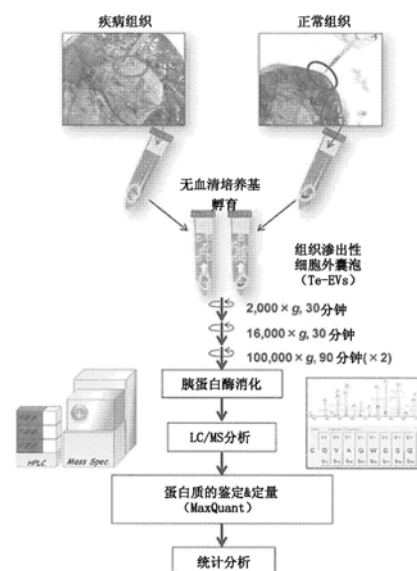
权利要求书1页 说明书19页 附图7页

(54)发明名称

生物标志物、疾病关联基因的探索方法及肾癌标志物

(57)摘要

将疾病组织以及从其周边得到的正常组织在培养基中静置,探索渗出的疾病特异性的生物标志物。通过该方法,发现了肾细胞癌特异性的生物标志物。



1. 一种探索方法,其特征在于:
将切除的疾病组织浸渍于浸渍液中,
对从浸渍液中的所述疾病组织渗出的源自疾病组织的渗出成分进行分析,
对源自所述疾病组织的生物标志物和/或疾病关联基因进行鉴定。
2. 如权利要求1所述的探索方法,其特征在于:
将所述被切除的疾病组织的周围的正常组织浸渍于浸渍液中,
对从浸渍液中的所述正常组织渗出的源自正常组织的渗出成分进行分析,
对源自所述正常组织的生物标志物和/或疾病关联基因进行鉴定,
将源自所述疾病组织的生物标志物和/或疾病关联基因和源自所述正常组织的生物标志物和/或疾病关联基因进行比较研究,选择疾病特异性的生物标志物和/或疾病关联基因。
3. 如权利要求1或2所述的探索方法,其特征在于:
所述渗出成分为细胞外囊泡、蛋白质、核酸、脂质。
4. 如权利要求1~3中任一项所述的探索方法,其特征在于:
所述渗出成分为细胞外囊泡,
细胞外囊泡中所含的所述生物标志物和/或疾病关联基因为蛋白质、核酸、脂质。
5. 如权利要求1~4中任一项所述的探索方法,其特征在于:
所述疾病为癌、神经变性疾病、多发性硬化症、糖尿病、肝疾病、自闭症、脑梗塞。
6. 一种肾细胞癌的检查方法,其特征在于:
将体液中所含的细胞外囊泡进行分离,
检出所述细胞外囊泡中所含的表1、表2、表4中记载的生物标志物的至少一种,
与给定值进行比较。
7. 如权利要求6所述的肾细胞癌的检查方法,其特征在于:
所述生物标志物为AZU1、CA9、STBD1、COMT、GYG1。
8. 如权利要求6或7所述的肾细胞癌的检查方法,其特征在于:
所述体液为血液或尿。
9. 表1、表2、表4中记载的肾细胞癌的生物标志物。
10. 一种以AZU1、CA9、STBD1、COMT、GYG1为靶的肾细胞癌的治疗药物筛选方法,其特征在于:
将AZU1、CA9、STBD1、COMT、GYG1作为指标,
选择候补化合物。

生物标志物、疾病关联基因的探索方法及肾癌标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种将细胞外囊泡进行分离、精制,鉴定生物标志物、疾病关联基因的方法、以及检查方法。另外,涉及使用该探索方法得到的肾癌标志物。

背景技术

[0002] 生物标志物是指与身体的正常过程或病态过程、或者对治疗的药理学反应相关的生物体内的物质或图像数据,成为身体状态的客观指标。生物标志物包含生化学检查、血液检查、肿瘤标志物之类的所谓的临床检查值、CT或MRI之类的图像诊断数据等各种各样的标志物。特别是作为疾病的指标表示疾病的存在或分级的生物标志物在疾病的发现、诊断、预后预测等目前的诊疗中是不可缺少的。另外,在新药开发中,生物标志物在开发化合物的选择和评价中被利用。

[0003] 近年来,能够检出极微量的蛋白质或核酸的技术的开发、基因组分析和蛋白质组分析的进展使得许多生物标志物被发现。但是,在实际上,临床中被使用的标志物是其中极少的。特别是在疾病的初期的阶段,在缺乏自觉症状的癌或神经变性疾病等疾病中,期望作为诊断或新药研发工具有用的生物标志物。但是,被实用化的生物标志物几乎没有。

[0004] 例如,肾细胞癌在许多情况下几乎没有症状,进入晚期后才被发现的情况占大半。最近,虽然在健康诊断或其它疾病中接受超声波检查或CT检查时偶然被发现的情况增加,但是,依然认为是难以早期发现的癌。专利文献1~3中报告了肾细胞癌的生物标志物,但尚未达到实用化。

[0005] 近年来,在使用了生物标志物的临床诊断的领域中,液体活检(Liquid Biopsy,体液诊断)备受关注。液体活检在癌的诊断区域中,不进行采取肿瘤组织的现有的活检(活体组织检查),而是将体液作为被检体使用,检出癌细胞或测定生物标志物,由此可以非侵袭性、低侵袭性地检出疾病。

[0006] 作为液体活检的分析对象,源自血中循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells; CTC)或癌细胞的DNA(Circulating Tumor DNA; ctDNA)是人们所熟知的。但是,由于设想CTC或ctDNA是在癌细胞转移时被检出的,所以认为虽然适于癌的预后预测,但是不能在早期诊断中使用。因此,作为用于以癌为主以及其它疾病的早期诊断的分析对象,细胞外囊泡(Extracellular vesicles,以下有时记载为EVs。)备受关注。

[0007] 细胞外囊泡为从几乎所有细胞中释放的囊泡,根据其大小或表露的标志物分子大致区分为外泌体、微囊泡、凋亡小体。近年得知细胞外囊泡担负各种作用。特别是得知在外泌体或微囊泡中含有mRNA、microRNA等核酸、蛋白质,不仅参与接近的细胞间的通信,而且参与脏器间的通信(非专利文献1~4)。

[0008] 有报告细胞外囊泡与癌症中包括血管新生、免疫抑制、转移的癌的进展有关。进而,根据细胞外囊泡中所含的特殊的整联蛋白的组成,暗示癌细胞进行转移准备的可能性(非专利文献5)。由此可见,细胞外囊泡也与疾病的进展有关,内包于细胞外囊泡的蛋白质或核酸根据生物体的状态而变化。因此,已知根据疾病的种类或状态而在细胞外囊泡中检

出的蛋白质或核酸不同,而成为生物标志物。

[0009] 但是,迄今为止所报告的研究结果为主要使用培养细胞而进行的结果,完全没有将从组织学上具备相同背景的疾病部位、正常部位得到的微囊泡进行比较研究的数据。因此,是否在疾病的诊断或新药开发中作为有效的生物标志物起作用尚存在疑问。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:日本特开2016-86678号公报

[0013] 专利文献2:日本特开2013-140030号公报

[0014] 专利文献3:日本特表2015-505965号公报

[0015] 非专利文献

[0016] 非专利文献1:Kahlert,C.,&Kalluri,R.,J.Mol.Med.(Berl),2013,Vol.91(4),p.431-437.

[0017] 非专利文献2:An,T.et al.,J.Extracell.Vesicles.,2015,Vol.4,27522.

[0018] 非专利文献3:Peinado,H.et al.,Nat.Med.,2012,Vol.18(6),p.883-891

[0019] 非专利文献4:Costa-Sliva,B.et al.,Nat.Cell Biol.,2015,Vol.17(6),p.816-826.

[0020] 非专利文献5:Hoshino,A.et al.,Nature,2015,Vol.527(7578),p.329-335.

[0021] 非专利文献6:Lasser,C.,et al.,J.Vis.Exp.,2012,Vol.59,e3037,doi:10.3791/3037.

[0022] 非专利文献7:Geissler,K.et al.,Oncoimmunology,2015,Vol.4,e985082.

[0023] 非专利文献8:Teltsh,O.,et al.,Oncotarget,2015,Vol.32,p.33191-33205.

[0024] 非专利文献9:Guldur,M.E.et al.,J.Pak.Med.Assoc.,2014,Vol.3,p.300-303.

[0025] 非专利文献10:Bussolati,B.et al.,FASEB J.,2003,Vol.17(9),p.1159-1161.

[0026] 非专利文献11:Wiklander,O.P.et al.,J.Extracell.Vesicles,2015,Vol.4,26316.

[0027] 非专利文献12:Tominaga,N.et al.,Adv Drug Deliv.Rev.,2015,Vol.95,p.50-55.

[0028] 非专利文献13:Lai,C.P.et al.,ACS Nano.,2014,Vol.8(1),p.483-494.

[0029] 非专利文献14:Gruenwald,V.et al.,BMC Cancer,2010,10:695.

[0030] 非专利文献15:Vroling,L.et al.,Angiogenesis,2009,Vol.12(1),p.69-79.

[0031] 非专利文献16:del Puerto-Nevado,L.et al.,Br.J.Cancer,2014,Vol.110,p.2700-2707.

[0032] 非专利文献17:Shankhajit,D.et al.,International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological diseases,2012,Vol.2,p.3-7.

发明内容

[0033] 发明所要解决的技术问题

[0034] 本发明的课题在于提供一种由可以用于液体活检的细胞外囊泡中所含的生物体构成成分探索新型的生物标志物的方法。另外,本发明的课题还在于提供一种疾病关联基

因的新的探索方法。进而,提供一种迄今为止不存在有效的生物标志物的肾细胞癌(Renal Cell Carcinoma)的新的生物标志物以及检查方法。

[0035] 用于解决技术问题的技术方案

[0036] 本发明涉及以下的源自疾病组织的生物标志物或疾病关联基因探索方法、肾细胞癌的检查方法、肾细胞癌的生物标志物、肾细胞癌的治疗药物筛选方法。

[0037] (1) 一种探索方法,其特征在于:将被切除的疾病组织浸渍于浸渍液中,对从浸渍液中的所述疾病组织渗出的源自疾病组织的渗出成分进行分析,对源自所述疾病组织的生物标志物和/或疾病关联基因进行鉴定。

[0038] (2) 根据(1)所述的探索方法,其特征在于:将所述被切除的疾病组织的周围的正常组织浸渍于浸渍液中,对从浸渍液中的所述正常组织渗出的源自正常组织的渗出成分进行分析,对源自所述正常组织的生物标志物和/或疾病关联基因进行鉴定,将源自所述疾病组织的生物标志物和/或疾病关联基因和源自所述正常组织的生物标志物和/或疾病关联基因进行比较研究,选择疾病特异性的生物标志物和/或疾病关联基因。

[0039] (3) 如(1)或(2)所述的探索方法,其特征在于:所述渗出成分为细胞外囊泡、蛋白质、核酸、脂质。

[0040] (4) 如(1)~(3)中任一项所述的探索方法,其特征在于:所述渗出成分为细胞外囊泡,细胞外囊泡中所含的所述生物标志物和/或疾病关联基因为蛋白质、核酸、脂质。

[0041] (5) 如(1)~(4)中任一项所述的探索方法,其特征在于:所述疾病为癌、神经变性疾病、多发性硬化症、糖尿病、肝疾病、自闭症、脑梗塞。

[0042] (6) 一种肾细胞癌的检查方法,其特征在于:将体液中所含的细胞外囊泡进行分离,检出所述细胞外囊泡中所含的表1、表2、表4中记载的生物标志物的至少一种,与给定值进行比较。

[0043] (7) 如(6)所述的肾细胞癌的检查方法,其特征在于:所述生物标志物为AZU1、CA9、STBD1、COMT、GYG1。

[0044] (8) 如(6)或(7)所述的肾细胞癌的检查方法,其特征在于:所述体液为血液或尿。

[0045] (9) 表1、表2、表4中记载的肾细胞癌的生物标志物。

[0046] (10) 一种肾细胞癌的治疗药物筛选方法,其以AZU1、CA9、STBD1、COMT、GYG1为标靶,其特征在于:将AZU1、CA9、STBD1、COMT、GYG1作为指标,选择候补化合物。

附图说明

[0047] 图1是表示组织渗出性细胞外囊泡的分离、以及生物标志物探索方法的概略图。

[0048] 图2是表示得到的组织渗出性细胞外囊泡的标志物分析、尺寸分布的图。

[0049] 图3是表示通过质谱法分析组织渗出性细胞外囊泡中的四跨膜蛋白超家族的分子表达的结果的图。

[0050] 图4是利用基因本体分析得到的组织渗出性细胞外囊泡的分析结果。图4A表示在由肾细胞癌组织、癌组织周边的正常组织得到的组织渗出性细胞外囊泡中被鉴定的蛋白质的数。图4B是细胞成分的图,图4C是生物学过程的图,图4D是分类为分子功能的3个范畴的蛋白质具备怎样的生物学性质的汇总图。

[0051] 图5是表示通过配对t检验分析了源自正常组织、癌组织的细胞外囊泡的蛋白质表

达的结果的火山图(volcano plot)。

[0052] 图6是表示源自正常组织、癌组织的细胞外囊泡中的AZU1的表达的图。图6A是将源自同一患者的样品作为对照表示AZU1表达的图。图6B是表示癌的病期分期与AZU1表达相关的图。图6C是利用蛋白质印迹分析AZU1表达的图。图6D是表示血清样品中的AZU1量的图。

[0053] 图7是表示利用源自肾细胞癌株的细胞外囊泡而使血管内皮层依赖于AZU1而崩解的图。图7A是表示利用免疫电子显微镜像得到的AZU1的表达和定位的图。图7B是表示肾细胞癌株中的AZU1的表达量和所分泌的细胞外囊泡中的含量的图。图7C是表示使用了从细胞株分泌的细胞外囊泡而得到的TEER分析结果的图。图7D是表示由强制表达了AZU1的ACHN细胞株所分泌的细胞外囊泡内的AZU1量的蛋白质印迹的图。图7E是表示强制表达的AZU1的定位的免疫电子显微镜像。图7F是表示使用了由强制表达AZU1的ACHN细胞株所分泌的细胞外囊泡而得到的TEER分析结果的图。

[0054] 图8是表示利用源自患者的细胞外囊泡而使血管内皮层崩解的图。图8A-B是表示使用了源自患者组织的组织渗出性细胞外囊泡而得到的TEER分析结果的图。图8C是表示源自癌组织、正常组织的组织渗出性细胞外囊泡向HUVEC细胞中摄取的显微镜图像。图8D是表示使用源自患者的组织渗出性细胞外囊泡得到的TEER分析结果的图。

具体实施方式

[0055] 以下,以肾细胞癌标志物的探索为例,对从组织中分离细胞外囊泡、分析生物标志物的方法、疾病关联基因的探索方法进行详述,但本发明的生物标志物、疾病关联基因的探索方法不限于肾细胞癌,可以应用于所有的疾病。特别是通过手术进行疾病组织的切除治疗的癌可以通过本发明的方法探索有用的生物标志物、疾病关联基因。另外,疾病组织不仅可以使使用通过手术得到的组织,还可以使使用通过剖检得到的组织,可以也应用于迄今为止没有发现有效的生物标志物的肌肉萎缩性侧索硬化症、帕金森病、阿尔兹海默病等神经变性疾病、多发性硬化症、前列腺癌、胰腺癌、糖尿病、肝疾病、自闭症等发育障碍、脑梗塞等各种各样的疾病。

[0056] 例如,在通过手术进行切除治疗的癌的情况下,癌部位周围的所谓的非癌部位(正常组织)也一起进行切除。因此,可以从同一患者获得疾病部位和正常部位的组织,由此可以得到遗传背景一致的样品。因此,通过对由这些试样得到的细胞外囊泡进行分析,可以在其个体中与作为对象疾病没有关系的表达蛋白或核酸排除在外。其结果,可以探索疾病特异性的生物标志物。另外,在神经变性疾病等不能获得完全的正常组织的情况下,通过从严重程度、进展程度不同的患者群体获得组织并进行比较定量分析,可以确定疾病关联基因、生物标志物。进而,也可以将从组织渗出的生物标志物和由血清等体液得到的生物标志物的信息组合使用。

[0057] 另外,也可以不仅从患者得到的组织,还可以从模型动物得到组织,探索生物标志物。关于神经变性疾病、糖尿病等不会为了治疗而从患者切除组织的疾病,也可以通过使用模型动物来探索生物标志物。

[0058] 另外,所探索的疾病特异性生物标志物是从疾病组织渗出的,但通过从其中选择在尿液、血液等体液中分泌的细胞外囊泡中含有的物质,可以设为用于液体活检的疾病标志物。

[0059] 进而,由于在细胞外囊泡中含有许多蛋白质等生物体构成成分,因此,可以发现疾病特异性的许多生物标志物。通过从得到的生物标志物中选择多个生物标志物并组合而测定,可以与诊断的灵敏度同时提高特异度。通过使用多个标志物,也可以检出迄今为止不能早期发现的疾病。

[0060] 另外,也可以根据疾病特异性表达的蛋白质或核酸的分析,发现与疾病关联、可成为治疗药物靶点的生物体构成成分。例如,对在疾病组织中高表达的蛋白质的功能进行分析,如果其在疾病的发症或进展中具有必须的功能,则可以将其作为治疗药物靶点进行医药的开发。

[0061] 另外,通过使用源自对分子靶药获得耐性的患者的组织,可以捕捉分子靶药耐性获得细胞释放出的细胞外囊泡。也有可能利用被认为细胞的复型的细胞外囊泡而发现打破耐性的出路。

[0062] 另外,所探索的生物标志物可以在新药研发时,在进行候补化合物的筛选时使用。在高通量筛选中,大多使用细胞株进行筛选。作为筛选中使用的细胞株,如果预先选择与通过本发明的方法所探索得到的多个疾病标志物显示同样的表达倾向的细胞株,则可以更准确地进行候补化合物的缩减。另外,不仅是使用细胞株时,而且在使用动物模型时,或者在治疗阶段研究候补化合物的效果的情况下,也可以使用得到的生物标志物。

[0063] 以下,以肾细胞癌为例,对新型的生物标志物探索方法、以及使用其的检查方法详细地进行说明。其中,使用人组织的分析在得到各研究机关的伦理委员会的承认下进行。另外,肾细胞癌组织、癌组织周边的正常组织在根据知情同意书得到患者的同意下用于分析。

[0064] [实施例1]Te-EVs的分离方法

[0065] 图1是表示从疾病组织中分离组织渗出性细胞外囊泡(tissue-exudative EVs,以下有时记载为Te-EVs。),分析生物标志物的方法的概要图。由手术切除的组织中切出疾病组织、正常组织,立即浸渍于浸渍液中。在肾细胞癌的情况下,使用无血清DMEM作为浸渍液,但浸渍液可以根据提取Te-EVs的组织而适当选择。由于在血清中含有细胞外囊泡,因此,作为浸渍液,优选使用无血清培养基,但如果预先除去细胞外囊泡,则也可以使用含有血清的培养基。

[0066] 从疾病部位、正常部位采取的组织片在浸渍液中于4℃静置1小时左右,使细胞外囊泡分泌。在浸渍液中静置的时间可以根据得到的组织片的量而进行调整。通过将组织片长时间静置在浸渍液中,可以得到更多的细胞外囊泡。另外,只要浸渍组织的温度条件为0℃~37℃,则可以为任意温度。温度高的时候,分泌速度快,得到的细胞外囊泡等的量也多,因此,浸渍时间、温度适当确定即可。另外,也可以不静置,以振荡、翻转、旋转等缓慢搅拌浸渍液的方式浸渍。在使细胞外囊泡充分地分泌之后,在2,000g下离心30分钟,使组织片及细胞沉淀并除去。接着,以16,000g离心30分钟,使细胞碎片沉淀并除去。进而,通过将上清液以100,000g离心90分钟,使从疾病组织、正常组织中分泌的Te-EVs沉淀而聚集。得到的Te-EVs悬浮于PBS,以100,000g离心90分钟并清洗。所分离的Te-EVs为从同一患者中得到的疾病组织、源自正常组织的细胞外囊泡,因此,遗传背景相同,通过将两者进行比较分析,可以选择疾病特异性的生物标志物。

[0067] 分离的Te-EVs通过胰蛋白酶消化,分解成以质谱法可分析的肽。得到的肽通过LC/MS(液相色谱质谱法)分析,进行鉴定和定量。进而,通过统计分析,对各Te-EVs中特异性的

蛋白质进行分析。

[0068] [实施例2]来自肾组织的细胞外囊泡的精制

[0069] 对从20名肾细胞癌患者中得到的癌组织、正常组织(非癌部)两者采取Te-EVs并进行分析。肾细胞癌的组织诊断通过苏木精-伊红染色而进行。基于AJCC TNM第6版而分类的患者的病期为T1a~T3c。

[0070] 所得到的细胞外囊泡的精制度通过蛋白质印迹法、免疫电子显微镜法、纳米颗粒跟踪分析(图2)和及质谱法(图3)进行分析。蛋白质印迹法使用所得到的Te-EVs蛋白质各100ng,利用常规方法而进行。作为一次抗体,使用作为外泌体标志物的抗CD63单克隆抗体(8A12)、抗CD81单克隆抗体(12C4)、抗CD9单克隆抗体(12A12)(均为Cosmo Bio公司制),作为二次抗体,使用HRP标记山羊抗小鼠IgG抗体(Santa Cruz Biotechnology公司制),利用ECL(ECL Prime western blotting detection reagent,GE Healthcare公司制)进行检出。

[0071] 图2上部分为利用蛋白质印迹法分析了从3个患者中得到的Te-EVs的结果。N表示非癌部位(正常组织),T表示源自癌部位的Te-EVs。不论癌部位还是非癌部位,所有试样都确认了作为外泌体标志物的CD63、CD81、CD9的表达。

[0072] 就免疫电子显微镜而言,使用抗CD9单克隆抗体(12A12)作为一次抗体,作为二次抗体,使用20nm胶体金标记抗小鼠抗体(Abcam公司制),基本上按照Lasser等的方法(非专利文献6)而进行。具体而言,使Te-EVs试样1 μ g静置在进行了碳蒸镀的甲醛支持膜上1小时,之后,用2%对甲醛进行固定,与一次抗体反应。其后,与二次抗体反应,使用电子显微镜H-7650(株式会社日立高新技术制)进行观察。在源自正常组织、癌组织的任一种组织的Te-EVs上,如箭头所示,都观察到结合于CD9的胶体金(图2中央部分)。

[0073] 利用电子显微镜观察的结果,源自癌组织的Te-EVs的粒径的偏差大。因此,通过纳米颗粒跟踪测定源自各组织的Te-EVs的粒径。已知肾细胞癌组织不仅含有癌细胞,而且含有非癌细胞(免疫细胞、内皮细胞、肥大细胞)(非专利文献7~10)。因此,认为不仅分泌源自癌细胞的EVs,而且分泌源自正常细胞的EVs。因此,不仅对于Te-EVs、而且对于从由肾细胞癌树立的细胞株、786-0、ACHN、Caki-1细胞株中分泌的细胞外囊泡也同样地进行了分离、精制,进行尺寸分布的分析。

[0074] 786-0、ACHN、Caki-1细胞株均从美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection,ATCC)获得,在添加有10%胎牛血清、100U/mL青霉素G、0.1 μ g/mL链霉素的RPMI培养基(和光纯药工业株式会社制)中进行培养。在从细胞株分离EVs的情况下,将 5.0×10^5 的细胞接种于10cm的培养皿,培养48小时,将分泌于培养液中的EVs与Te-EVs同样地利用超离心法聚集而用于分析。

[0075] 使用从由21个正常组织得到的Te-EVs、28个癌组织中得到的Te-EVs、以及从上述3个肾细胞癌株分离的EVs进行粒径的分析。纳米颗粒跟踪分析使用搭载有NTA2.0分析软件的NanoSight LM10(Malvern公司制),全部在相同的条件下进行分析(图2下部分)。从肾细胞癌株得到的EVs的平均粒径的值处于源自癌组织的Te-EVs的粒径分布的范围内,因此,暗示在源自癌组织的Te-EVs中含有从癌细胞分泌的EVs。另外,可以明确源自正常组织、癌组织的Te-EVs的平均粒径显著不同($p < 0.001$)。在源自肾细胞癌患者的组织中,疾病组织、正常组织在Te-EVs的粒径分布上可看到差异,因此,有可能Te-EVs在源自疾病组织、源自正常

组织时在其粒径分布上也可看到差异。

[0076] 接着,使用源自由20个患者得到的癌组织以及作为对照的源自正常组织的Te-EVs,通过质谱法将作为外泌体标志物已知的四跨膜蛋白分子进行鉴定,对其表达量利用LC/MS进行分析(图3)。

[0077] 分离的Te-EVs利用20mM二硫代苏糖醇,在100℃下还原10分钟后,利用50mM碘乙酰胺,在周围温度下进行45分钟烷基化。其后,使用5 μ l的被固定化的胰蛋白酶(immobilized trypsin,Thermo Fisher Scientific公司制),一边在37℃下以1000rpm旋转摇动6小时,一边进行消化。得到的肽在醋酸乙酯提取后,用Oasis HLB μ -elution plate(WATERS公司制)进行脱盐,进行质谱法。质谱法使用直接连接于UltiMate 3000RSLC nano-flow HPLC系统的LTQ-Orbitrap-Velos质谱仪(均为Thermo Fisher Scientific公司制)。蛋白质的鉴定和定量利用MaxQuant软件进行分析。

[0078] 为了研究所得到的Te-EVs的性质,将四跨膜蛋白分子的表达量进行比较。检出15种四跨膜蛋白分子,源自任意组织的Te-EVs显示为精制度高的物质。进而可以明确:与源自正常组织的Te-EVs相比,在源自癌组织的Te-EVs中,四跨膜蛋白超家族的大部分分子的表达减少。[实施例3]肾细胞癌中的癌组织、正常组织的Te-EVs的分析

[0079] 使用由20个患者得到的癌组织、以及作为对照的源自癌部位周边正常组织的Te-EVs,与上述同样地操作,进行LC/MS分析(图4)。对合计3871种蛋白质进行鉴定,其中160种在源自正常组织的Te-EVs中特异性表达,253种在源自癌组织的Te-EVs中特异性表达,3458种在两者中共同表达(图4A)。

[0080] 图4B~D是将这些基因按照DAVID基因本体分析分类为细胞构成要素(CC; Cellular components,图4B)、生物学过程(BP;Biological process,图4C)、分子功能(MF; Molecular function,图4D),在源自各个组织整体、正常组织、癌组织的Te-EVs中,分别表示最靠前的6个特征性蛋白质组的图。

[0081] 根据基因本体富集分析,在源自癌组织的Te-EVs中,其特征在于,在被分类为细胞构成要素的蛋白质中,存在膜蛋白质(图4B)的表达;在生物学的过程中,存在与代谢有关的蛋白质(图4C)的表达;在分子功能中,存在核苷酸结合蛋白质(图4D)的表达。在源自癌组织的Te-EVs、源自正常组织的Te-EVs中所含的蛋白质中可观察到不同的含义为:细胞外囊泡中所含的蛋白质,根据与癌有关的各种情况也进行调节,显示作为癌标志物是有用的。

[0082] 在被鉴定的3871种蛋白质中,对源自肾细胞癌组织的Te-EVs中显示特异性表达的蛋白质进行了分析。将由同一患者的肾组织得到的源自癌组织、源自正常组织的Te-EVs通过作为一对,利用配对t检验(paired t-test)进行分析。图5中示出在源自癌部位、源自非癌部位的Te-EVs中,可观察到表达有显著性差异($p < 0.05$, fold change(差异倍数) ≥ 2.0 、图5中,虚线的两侧)的蛋白质。另外,用箭头表示差异倍数大的物质。碳酸酐酶9(Carbonic anhydrase 9,CA9)、淀粉结合域蛋白1(Starch-binding domain-containing protein 1,STBD1)、天青杀素(Azurocidin,AZU1)、儿茶酚O-甲基转移酶(Catechol O-methyltransferase,COMT)、糖原生成蛋白1(Glycogenin-1,GYG1),与源自正常组织的Te-EVs相比,在源自癌组织的Te-EVs中含量显著增加。

[0083] 在源自肾细胞癌组织的Te-EVs中,与源自正常组织的Te-EVs中所含的蛋白质相比,表1的106种蛋白质(表1-1、1-2)或表2的291种蛋白质(表2-1~表2-5)分别显示出显著

地表达增加或表达减少。

[0084] [表1-1]

[0085]

AC号	蛋白概述	基因名称
P46976	糖原生成蛋白1	GYG1
P20160	天青杀素	AZU1
P09104	γ 型烯醇化酶	ENO2
Q16790	碳酸酐酶9	CA9
Q96HE7	ERO1样蛋白 α	ERO1L
A2PYH4	可能的ATP依赖性DNA螺旋酶HFM1	HFM1
Q5VT79	膜联蛋白A8样蛋白2	ANXA8L2
P21964	儿茶酚O-甲基转移酶	COMT
Q95210	淀粉结合域蛋白1	STBD1
P20701	整联蛋白 α -L	ITGAL
Q8N386	具有富含亮氨酸重复单位的蛋白25	LRRC25
Q75505	推定双同源盒蛋白2	DUX2
Q9NWQ8	鞘糖脂微结构域1相关磷酸化蛋白	PAG1
P11215	整联蛋白 α -M	ITGAM
P32455	干扰素诱导鸟苷酸结合蛋白1	GBP1
P13726	组织因子	F3
P19971	胸腺嘧啶磷酸化酶	TYMP
Q8UZ83	醛脱氢酶家族16成员A1	ALDH16A1
P46821	微管相关蛋白1B	MAP1B
Q02928	细胞色素P450 4A11	CYP4A11
Q8IZJ1	神经生长因子受体UNC58	UNC5B
Q6GTX8	白细胞相关免疫球蛋白样受体1	LAIR1
P04179	超氧化物歧化酶[Mn], 线粒体	SOD2
P05107	整联蛋白 β -2	ITGB2
Q6NYC8	Phostensin	PPP1R18
Q14956	跨膜糖蛋白NMB	GNPMB
Q96FQ6	蛋白S100-A16	S100A16
P32942	细胞间粘附分子3	ICAM3
Q0JRZ9	唯FCM结构域蛋白	FCHO2
P30453	HLA I级组织相容性抗原, A-34 α 链	HLA-A
Q8IYT3	具有卷曲螺旋结构域的蛋白170	CCDC170
Q06210	谷氨酰胺果糖-6-磷酸氨基转移酶[异构化]1	GFPT1
Q96A46	线粒体转铁蛋白2	SLC25A28
P13807	糖原[淀粉]合成酶, 肌肉	GYS1
Q9NZR1	原肌球调节蛋白2	TMOD2
Q43752	突触融合蛋白6	STX6
Q6UWP8	Suprabasin	SBSN
P30273	高亲和性免疫球蛋白 ϵ 受体 γ 亚基	FCER1G
P10321	HLA I级组织相容性抗原, Cw-7 α 链	HLA-C
Q5T681	未知特性蛋白C10orf62	C10orf62
P02794	铁蛋白重链	FTH1
P13611	多功能蛋白聚糖核心蛋白	VCAN
Q8N6N2	三十四肽重复蛋白9B	TTC9B
P01892	HLA I级组织相容性抗原, A-2 α 链	HLA-A
P01612	Ig κ 链V-1区Mev	-
P10316	HLA I级组织相容性抗原, A-69 α 链	HLA-A
Q92614	非常规肌球蛋白X VIIIa	MYO18A
P49454	着丝粒蛋白F	CENPF
Q92572	AP-3复合体亚基 σ -1	AP3S1
Q13643	四个半LIM结构域蛋白3	FHL3
Q5SNT6	WASH复合体亚基FAM21B	FAM21B
P33908	甘露糖基寡糖类1, 2- α -甘露糖苷酶IA	MAN1A1
P28799	颗粒体蛋白	GRN

[0086] [表1-2]

[0087]

AC号	蛋白概述	基因名称
Q01628	干扰素诱导跨膜蛋白3	IFITM3
P20929	伴肌动蛋白	NEB
Q9H2L5	具有RAS相关结构域的蛋白4	RASSF4
Q8TD55	具有普列克底物蛋白同源结构域的家庭0成员2	PLEKHO2
Q53T59	HCLS1结合蛋白3	HS1BP3
P49207	60S核糖体蛋白L34	RPL34
P31146	冠蛋白1A	CORO1A
P51397	死亡相关蛋白1	DAP
P39060	胶原 α -1(XVIII)链	COL18A1
P02786	转铁蛋白受体蛋白1	TFRC
Q6ZUB1	精子发生相关蛋白31E1	SPATA31E1
P28065	蛋白酶体亚基 β 型-9	PSMB9
P02792	铁蛋白轻链	FTL
P34810	Macrosialin	CD68
P16188	HLA I级组织相容性抗原, A-30 α 链	HLA-A
Q9P2B2	前列腺素F2受体负调节物	PTGFRN
O00151	PDZ和LIM结构域蛋白1	PDLIM1
P09972	果糖二磷酸醛缩酶C	ALDOC
Q9Y4A5	转化/转录结构域相关蛋白	TRRAP
P18084	整联蛋白 β -5	ITGB5
P30508	HLA I级组织相容性抗原, Cw-12 α 链	HLA-C
P47914	60S核糖体蛋白L29	RPL29
P17693	HLA I级组织相容性抗原, α 链G	HLA-G
P16989	Y盒结合蛋白3	YBX3
P11169	溶质转运家族2, 易化葡萄糖转运蛋白成员3	SLC2A3
P16949	Stathmin	STMN1
P30685	HLA I级组织相容性抗原, B-35 α 链	HLA-B
Q02388	胶原 α -1(VII)链	COL7A1
P02747	补体C1q亚成分亚基C	C1QC
Q9ULU4	蛋白激酶C结合蛋白1	ZMYND8
P78324	酪氨酸蛋白激酶非受体型底物1	SIRPA
P04430	Ig κ 链V-1区BAN	-
Q725R6	淀粉样蛋白 β A4前体蛋白结合家族B成员1-相互作用蛋白	APBB1IP
P01714	Ig λ 链V-III区SH	-
P06748	核仁磷蛋白	NPM1
Q99571	P2X嘌呤受体4	P2RX4
P08575	受体型酪氨酸蛋白激酶C	PTPRC
Q99426	微管蛋白折叠辅因子B	TBCB
Q9NYZ2	线粒体转铁蛋白1	SLC25A37
P05534	HLA I级组织相容性抗原, A-24 α 链	HLA-A
Q6ZRP7	巯基氧化酶2	QSOX2
Q16555	二氢嘧啶酶相关蛋白2	DPYSL2
O43583	密度调节蛋白	DENR
Q96M9	胞质羧肽酶4	AGBL1
P62280	40S核糖体蛋白S11	RPS11
P27695	DNA-(无嘌呤或者脱嘧啶位点)分解酶	APEX1
Q07812	凋亡调节因子BAX	BAX
O15155	BET1同源物	BET1
P10632	细胞色素P450 2C8	CYP2C8
P08670	波形蛋白	VIM
P30622	具有GAP-Gly结构域的连接蛋白1	CLIP1
P07451	碳酸酐酶3	CA3
P01703	Ig λ 链V-I区	-

[0088] [表2-1]

[0089]

AC号	蛋白概述	基因名称
Q8WWT9	溶质转运家族13成员3	SLC13A3
P31639	钠-葡萄糖协同转运蛋白2	SLC5A2
O75264	跨膜蛋白C19orf77	C19orf77
P07148	脂肪酸结合蛋白, 肝	FABP1
Q9UHI7	溶质转运家族23成员1	SLC23A1
P16444	二肽酶1	DPEP1
P05062	果糖-二磷酸醛缩酶B	ALDOB
Q9NZA1	氯化物细胞内通道蛋白5	CLIC5
P36269	γ -谷氨酰转移酶5	GGT5
Q03154	氨基酰化酶-1	ACY1
Q92499	ATP-依赖性RNA螺旋酶DDX1	DDX1
Q695T7	钠依赖性中性氨基酸转运蛋白B(0)AT1	SLC6A19
Q13113	PDZK1-相互作用蛋白1	PDZK1IP1
O00592	足糖萼蛋白	PODXL
P09467	果糖-1,6-二磷酸酶1	FBP1
P21695	3-磷酸-甘油脱氢酶[NAD(+)], 细胞质	GPD1
Q5T2W1	Na(+)/H(+)交换调节辅因子NHE-RF3	PDZK1
Q15599	Na(+)/H(+)交换调节辅因子NHE-RF2	SLC9A3R2
Q9BYF1	血管紧张素转换酶2	ACE2
Q8WW52	蛋白FAM151A	FAM151A
P51580	硫代嘌呤S-甲基转移酶	TPMT
Q96013	丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶PAK4	PAK4
Q93088	甜菜碱同型半胱氨酸S-甲基转移酶1	BHMT
P07911	尿调节素	UMOD
P29972	水通道蛋白-1	AQP1
Q07837	中性和碱性氨基酸转运蛋白rBAT	SLC3A1
P08473	肾胰岛素残基溶酶	MME
P15144	氨肽酶N	ANPEP
P35558	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶, 细胞溶质[GTP]	PCK1
O43175	D-3-磷酸烯醇丙酮酸羧激酶	PHGDH
P08729	角蛋白, II型细胞支架7	KRT7
O14745	Na(+)/H(+)交换调节辅因子NHE-RF1	SLC9A3R1
P09758	肿瘤相关钙信号转导蛋白2	TACSTD2
P00742	凝血因子X	F10
Q9UGT4	具有苏希结构域的蛋白2	SUSD2
Q1EHB4	钠结合单羧酸转运蛋白2	SLC5A12
O75348	V型质子ATP酶亚基G1	ATP6V1G1
Q16864	V型质子ATP酶亚基F	ATP6V1F
Q14894	羧酸硫代吗啉脱氢酶	CRYM
Q9Y2J2	带4,1样蛋白3	EPB41L3
Q4V9L6	跨膜蛋白119	TMEM119
P11465	妊娠特异性 β -1-糖蛋白2	PSG2
Q9H0W9	酯水解酶C11orf54	C11orf54
P12821	血管紧张素转化酶	ACE
P13640	金属硫蛋白1G	MT1G
P21266	谷胱甘肽-S-转移酶Mu3	GSTM3
P52758	核糖核酸酶UK114	HRSP12
P16083	核糖基二氢烟酰胺脱氢酶[醌]	NQO2
Q6ZON7	溶质转运蛋白有机阴离子转运蛋白家族成员4C1	SLCO4C1
P36543	V型质子ATP酶亚基E1	ATP6V1E1
O75954	氢乙甾甾碱9	TSPAN9
O43451	麦芽糖酶葡萄糖淀粉酶, 肠	MGAM
P11137	微管相关蛋白2	MAP2
P15941	粘蛋白1	MUC1
Q9NQ84	G蛋白偶联受体家族C组5成员C	GPRC5C
P07305	组蛋白H1.0	H1FO
P53990	IST1同源物	IST1
P05937	钙结合蛋白	CALB1

[0090] [表2-2]

[0091]

AC号	蛋白概述	基因名称
P50135	组胺N-甲基转移酶	HNMT
O75131	Copine-3	CPNE3
O60262	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(I)/G(S)/G(O)亚基 γ -7	GNG7
Q9Y2S2	δ -晶体蛋白同源物	CRYL1
Q16822	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶[GTP], 线粒体	PCK2
P62330	ADP核糖基化因子6	ARF6
Q16625	闭锁蛋白	OCLN
P22748	碳酸酐酶4	CA4
P18859	ATP合酶偶联因子6, 线粒体	ATP5J
O43895	Xaa-Pro氨肽酶2	XPNPEP2
P27487	二肽基肽酶4	DPP4
Q9U112	V型质子ATP酶亚基H	ATP6V1H
P29034	蛋白S100-A2	S100A2
Q01740	二甲基苯胺单氧化酶[N-oxide-forming]1	FMO1
P07195	L-乳酸脱氢酶B链	LDHB
P38606	V型质子ATP酶催化亚基A	ATP6V1A
Q8N357	溶质转运蛋白家族35成员F6	SLC35F6
Q14019	毛状样蛋白	COTL1
Q96X06	TBC1结构域家族成员10A	TBC1D10A
P09669	细胞色素c氧化酶亚基6C	COX6C
Q98UT1	3-羟丁酸脱氢酶2型	BDH2
P21281	V型质子ATP酶亚基B, 脑亚型	ATP6V1B2
O76094	信号识别颗粒亚基SRP72	SRP72
Q00796	山梨糖醇脱氢酶	SORD
Q2LD37	未知特性蛋白KIAA1109	KIAA1109
Q96C23	醛糖1-表异构酶	GALM
Q9Y696	氯化物细胞内通道蛋白4	CLIC4
Q12929	表皮生长因子受体激酶底物8	EPS8
P30086	磷脂酰乙醇胺结合蛋白1	PEBP1
O60749	分选连接蛋白2	SNX2
Q9BYE9	钙粘蛋白同源物族成员2	CDHR2
B2RUZ4	小整合膜蛋白1	SMM1
P05413	脂肪酸结合蛋白, 心脏	FABP3
P17813	内皮因子	ENG
P00966	精氨基琥珀酸合酶	ASS1
Q96FL8	多药耐药相关蛋白1	SLC47A1
Q92820	γ -谷氨酰基氧化酶	GGH
O43181	NADH脱氢酶[醌]铁硫蛋白4, 线粒体	NDUFS4
Q13228	硒结合蛋白1	SELENBP1
Q9H8J8	Collectrin	TMEM27
P13073	细胞色素c氧化酶亚基4亚型1, 线粒体	COX4I1
P09210	谷胱甘肽-S-转移酶A2	GSTA2
P35241	根蛋白	RDX
P22732	溶质转运家族2, 易化葡萄糖转运蛋白成员5	SLC2A5
Q9Y5X3	分选连接蛋白5	SNX5
P96082	Disabled同源物2	DAB2
Q07075	谷氨酰氨肽酶	ENPEP
P21291	富半胱氨酸和甘氨酸蛋白1	CSRFP1
P29992	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基 α -11	GNA11
P82980	视黄醇结合蛋白5	RBP5
Q9UB18	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(I)/G(S)/G(O)亚基 γ -12	GNG12
Q13277	突触融合蛋白3	STX3
O43490	Prominin-1	PROM1
Q95747	丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶OSR1	OXR1
Q9HD42	带电多颗粒体蛋白1a	CHMP1A
Q8NGM8	嗅觉受体6M1	OR6M1
P05026	钠/钾转运ATP酶亚基 β -1	ATP1B1
Q9NVS9	5-磷酸吡哆醇氧化酶	PNPO
P21912	琥珀酸脱氢酶[醌]铁硫亚基, 线粒体	SDHB

[0092] [表2-3]

[0093]

AC号	蛋白概述	基因名称
P16930	延胡索酰乙酰乙酸酶	FAH
P08195	4F2细胞表面抗原重链	SLC3A2
P14550	乙醇脱氢酶[NADP(+)]	AKR1A1
Q9H0E2	To11相互作用蛋白	TOLLIP
P56385	ATP合酶亚基e, 线粒体	ATP5I
Q9Y5K8	V型质子ATP酶亚基D	ATP6V1D
Q93099	尿黑酸1,2-二氧化酶	HGD
Q9Y6R1	电性碳酸氢钠协同转运蛋白1	SLC4A4
Q16853	膜伯胺氧化酶	AOC3
P54710	钠/钾转运ATP酶亚基 γ	FXD2
P34896	丝氨酸羟甲基转移酶, 细胞溶质	SHMT1
Q9NVD7	Alpha-parvin	PARVA
Q7Z3B1	神经生长调节蛋白1	NEGR1
P12277	肌酸激酶B型	CKB
Q95292	囊泡相关膜蛋白相关蛋白B/C	VAPB
P63000	Ras相关C3肉毒杆菌毒素底物1	RAC1
Q15244	溶质转运蛋白家族22成员2	SLC22A2
Q92736	兰尼碱受体2	RYR2
Q13427	肽基脯氨酰顺反异构酶G	PPIG
Q96019	肌动蛋白样蛋白6A	ACTL6A
P50148	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(q)亚基 α	GNAQ
P35611	α -内收蛋白	ADD1
Q99653	钙神经素B同源蛋白1	CHP1
P00167	细胞色素b5	CYB5A
Q8NFU3	硫代硫酸硫基转移酶/硫氨酸酶样结构域包含蛋白1	TSTD1
P19440	γ -谷氨酰转移酶	GGT1
Q96IX5	骨骼肌生长时的上调蛋白5	USMG5
P09455	视黄醇结合蛋白1	RBP1
P15311	埃兹蛋白	EZR
Q94760	N(G), N(G)-二甲基精氨酸二甲基氨基酸水解酶1	DDAH1
Q00499	Myc盒依赖性相互作用蛋白1	BIN1
P48059	LIM和衰老细胞抗原样包含结构域蛋白1	LIMS1
Q16775	羧基谷胱甘肽水解酶, 线粒体	HAGH
P05023	钠/钾转运ATP酶亚基 α -1	ATP1A1
Q8WU39	边缘区B与B1细胞特异性蛋白	MZB1
P80723	脑酸溶性蛋白1	BASP1
P54920	α 可溶性NSF附着蛋白	NAPA
Q75309	钙粘蛋白16	CDH16
P62873	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(I)/G(S)/G(O)亚基 β -1	GNB1
P98164	低密度脂蛋白受体相关蛋白2	LRP2
Q9Y2Q5	Ragulator复合体蛋白LAMTOR2	LAMTOR2
P20073	膜联蛋白A7	ANXA7
Q96IU4	α / β 水解酶结构域包含蛋白14B	ABHD14B
Q98ZV1	UBX结构域包含蛋白6	UBXN6
Q75936	γ -丁酰甜菜碱脱氧酶	BBOX1
P50053	己酮糖激酶	KHK
P00918	碳酸酐酶2	CA2
P11279	溶酶体相关膜糖蛋白1	LAMP1
Q75874	异柠檬酸脱氢酶[NADH], 细胞质	IDH1
P00325	乙醇脱氢酶1B	ADH1B
Q14699	Raftin	RFTN1
Q8N201	整合因子复合体亚基1	INTS1
Q9NZZ3	带电多颗粒体蛋白5	CHMP5
Q8WUM4	程序性细胞死亡6相互作用蛋白	PDCD6IP
P09211	谷胱甘肽-S-转移酶P	GSTP1
Q10587	AP-1复合体亚基 β -1	AP1B1
Q96KP4	细胞质非特异性二肽酶	CNDP2
Q9H1C7	半胱氨酸富跨膜结构域包含蛋白1	CYSTM1
P60953	细胞分裂控制蛋白42同源物	CDC42

[0094] [表2-4]

[0095]

AC号	蛋白概述	基因名称
P24539	ATP合酶亚基b, 线粒体	ATP5F1
P62070	Ras相关蛋白R-Ras2	RRAS2
Q9UHE5	可能的N乙酰转移酶8	NAT8
Q8NFJ5	视黄酸诱导蛋白3	GPRC5A
Q13596	分选连接蛋白1	SNX1
Q8N3Y1	F盒/WD重复包含蛋白8	FBXW8
Q9NZ45	CDGSH铁硫结构域包含蛋白1	CISD1
Q9H4A4	氨基酶8	RNPEP
Q96DG6	羧甲烯丁烯羧酸内酯酶同源物	CMBL
Q9ULE6	Paladin	PALD1
Q6UX53	甲基转移酶样蛋白7B	METTL7B
P17174	天冬氨酸氨基转移酶, 细胞质	GOT1
P55795	不均一核糖核酸核糖核蛋白H2	HNRNPH2
Q9NQR4	ω -酰胺酶NIT2	NIT2
P51149	Ras相关蛋白Rab-7a	RAB7A
P11908	磷酸核糖焦磷酸激酶2	PRPS2
P10599	硫氧还蛋白	TXN
P05783	角蛋白, I型细胞骨架18	KRT18
Q84903	脯氨酸合成酶共转录细菌同源物蛋白	PROSC
Q9UJ68	线粒体肽硫氧甲硫氨酸还原酶	MSRA
P15374	泛素羧基末端水解酶同工酶L3	UCHL3
P32119	过氧化物酶2	PRDX2
Q9NVA2	Septin-11	SEPT11
Q6QHC5	鞘脂 δ (4)-去饱和酶/C4脱氢酶DES2	DEGS2
P11233	Ras相关蛋白Ral-A	RALA
Q96CX2	BTB/POZ结构域包含蛋白KCTD12	KCTD12
Q95154	黄曲霉毒素B1醛还原酶成员3	AKR7A3
Q13183	溶质转运家族13成员2	SLC13A2
P84077	ADP-核糖基化因子1	ARF1
P21810	双糖链蛋白多糖	BGN
P21796	电压依赖性阴离子选择性通道蛋白1	VDAC1
Q16270	胰岛素样生长因子结合蛋白7	IGFBP7
P62834	Ras相关蛋白Rap-1A	RAP1A
P13473	溶酶体相关膜糖蛋白2	LAMP2
Q00839	不均一核糖核酸核糖核蛋白U	HNRNPU
Q13418	整联蛋白连接蛋白激酶	ILK
P51148	Ras相关蛋白Rab-5C	RAB5C
P50895	基底细胞粘附分子	BCAM
P62820	Ras相关蛋白Rab-1A	RAB1A
Q96F10	二胺乙酰转移酶2	SAT2
P21283	V型质子ATP酶亚基C1	ATP6V1C1
Q9HCU5	促乳素调节元件结合蛋白	PREB
P68104	延长因子1- α 1	EEF1A1
Q9NQV5	PR结构域包含蛋白11	PRDM11
Q9JEU0	通过与t-SNAREs的相互作用的囊泡转运同源物1B	VT11B
Q9H2A2	醛脱氢酶家族8成员A1	ALDH8A1
Q01650	大分子中性氨基酸转运子亚基1	SLC7A5
P11142	热休克同源物71kDa蛋白	HSPA8
Q9NRA2	唾液酸转运蛋白	SLC17A5
O75185	DnaJ同源物亚家族C成员13	DNAJC13
P61224	Ras相关蛋白Rap-1b	RAP1B
P17927	补体受体1型	CR1
Q96A57	跨膜蛋白230	TMEM230
Q94886	跨膜蛋白63A	TMEM63A
P60981	Dextrin	DSTN
P30153	丝氨酸/苏氨酸-蛋白磷酸酶2A 65kDa调节亚单位A α 亚型	PPP2R1A
Q06830	过氧化物酶1	PRDX1
Q96BW5	磷酸三酯酶相关蛋白	PTER
Q6P4A8	磷脂酶B样1	PLBD1

[0096] [表2-5]

[0097]

AC号	蛋白概述	基因名称
P04216	Thy-1膜糖蛋白	THY1
P56199	整联蛋白 α -1	ITGA1
Q95865	N(G), N(G)-二甲基精氨酸二甲基氨基酸水解酶2	DDAH2
Q6IAA8	Ragulator复合体蛋白LAMTOR1	LAMTOR1
P40925	苹果酸脱氢酶, 细胞质	MDH1
O00560	Syntenin-1	SDCBP
P54707	钾转运ATP酶 α 链2	ATP12A
Q02952	A激酶锚定蛋白12	AKAP12
P08183	多药耐药蛋白1	ABCB1
Q9Y4F1	FERM、RhoGEF和pleckstrin结构域包含蛋白1	FARP1
P02549	膜收缩蛋白 α 链, 红细胞1	SPTA1
Q5TZA2	Rootletin	CROCC
P01116	GTP酶KRas	KRAS
Q15907	Ras相关蛋白Rab-11B	RAB11B
Q9H2P9	白喉毒素合酶	DPH5
Q75223	γ -谷氨酰环化转移酶	GGCT
Q9H223	EH结构域包含蛋白4	EHD4
P30041	过氧化物酶6	PRDX6
P30046	D-多巴色素脱羧酶	DDT
P22352	谷胱甘肽过氧化物酶3	GPX3
Q13200	26S蛋白酶体非ATP酶调控亚基2	PSMD2
P62879	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(I)/G(S)/G(O)亚基 β -2	GNB2
P00441	超氧化物歧化酶[Cu-Zn]	SOD1
P98172	Ephrin-B1	EFNB1
Q13526	肽基脯氨酰顺反异构酶NMA相互作用1	PIN1
P15090	脂肪酸结合蛋白, 脂肪细胞	FABP4
P00491	嘌呤核苷酸磷酸化酶	PNP
P18206	纽蛋白	VCL
P14384	羧肽酶M	CPM
Q96KX1	未知特性蛋白C4orf36	C4orf36
Q93050	V型质子ATP酶116kDa亚基 α 亚型1	ATP6V0A1
Q93052	脂肪瘤多见融合作伙伴	LPP
Q13576	Ras GTP酶活化样蛋白IQGAP2	IQGAP2
Q8MAA5	胆碱转运蛋白样蛋白2	SLC44A2
Q15847	脂肪生成调控因子	ADIRF
Q9Y5Z4	血红素结合蛋白2	HEBP2
Q96CW1	AP-2复合体亚基 μ	AP2M1
Q98X97	细胞膜囊泡相关蛋白	PLVAP
P26038	膜突蛋白	MSN
P11277	膜收缩蛋白 β 链, 红细胞	SPTB
Q92692	脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白2	PVRL2
Q15286	Ras相关蛋白Rab-35	RAB35
Q01995	转凝蛋白	TAGLN
P15586	N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶	GNS
Q9UL25	Ras相关蛋白Rab-21	RAB21
P05106	整联蛋白 β -3	ITGB3
P13987	CD59糖蛋白	CD59
P06703	蛋白S100-A6	S100A6
Q43488	黄曲霉毒素B1醛还原酶成员2	AKR7A2
Q13423	NAD(P) 转氢酶, 线粒体	NNT
Q9UK41	空泡蛋白分选相关蛋白28同源物	VPS28
Q06495	钠依赖性磷酸转运蛋白2A	SLC34A1
Q9Y266	核迁移蛋白nudC	NUDC
Q7LBR1	带电多颗粒体蛋白1b	CHMP1B
Q43707	α -辅肌动蛋白-4	ACTN4
Q9UBV8	Pefin	PEF1

[0098] 可看到106种表达增加的蛋白质中,以天青杀素(azurocidin,下文中记作AZU1。)

为首的表3中记载的蛋白质,其特征在于与源自正常组织的Te-EVs中所含的蛋白质的表达量的差异大,因此,可以更优选用作肾细胞癌的标志物。

[0099] [表3]

[0100]

蛋白概述	基因名称	AC号
糖原生成蛋白1	GYG1	P46976
天青杀素	AZU1	P20160
碳酸酐酶9	CA9	Q16790
儿茶酚O-甲基转移酶	COMT	P21964
淀粉结合域蛋白1	STBD1	O95210
鞘糖脂微结构域1相关磷酸化蛋白	PAG1	Q9NWQ8
组织因子	F3	P13726
胸腺嘧啶磷酸化酶	TYMP	P19971
白细胞相关免疫球蛋白样受体1	LAIR1	Q6GTX8
跨膜糖蛋白NMB	GPNMB	Q14956
谷氨酰胺果糖-6-磷酸氨基转移酶[异构化]1	GFPT1	Q06210
糖原[淀粉]合成酶, 肌肉	GYS1	P13807
高亲和性免疫球蛋白ε受体γ亚基	FCER1G	P30273
多功能蛋白聚糖核心蛋白	VCAN	P13611
颗粒体蛋白	GRN	P28799
前列腺素F2受体负调节物	PTGFRN	Q9P2B2
溶质转运家族2, 易化葡萄糖转运蛋白成员3	SLC2A3	P11169
酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型底物1	SIRPA	P78324
核仁磷蛋白	NPM1	P06748
受体型酪氨酸蛋白磷酸酶C	PTPRC	P08575
密度调节蛋白	DENR	O43583
DNA-(无嘌呤或者脱嘧啶位点)分解酶	APEX1	P27695
细胞色素P450 2C8	CYP2C8	P10632
波形蛋白	VIM	P08670
具有GAP-Gly结构域的连接蛋白1	CLIP1	P30622
碳酸酐酶3	CA3	P07451

[0101] 特别是碳酸酐酶9(Carbonic anhydrase 9)、儿茶酚O-甲基转移酶(Catechol O-methyl transferase)、鞘糖脂微结构域1相关磷酸化蛋白(Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1)、白细胞关联免疫球蛋白样受体1(Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1)、Transmembrane glycoprotein NMB(跨膜糖蛋白NMB)、高亲和性免疫球蛋白ε受体γ亚基(High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma)、溶质转运家族2,易化葡萄糖转运蛋白成员3(Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3)、酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型1(Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1)、蛋白酪氨酸磷酸酶受体C(Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C)、波形蛋白(Vimentin)、碳酸酐酶3(Carbonic anhydrase 3),有报告在肾癌中高表达,因此认为是特别有用的标志物。进而,鞘糖脂微结构域1相关磷酸化蛋白(Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains 1)、酪氨酸蛋白磷酸酶非受体型1(Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1)通过高表达

而有助于T细胞活性抑制和癌细胞导致的免疫逃避,因此,认为作为新药研发的标靶候补也是有希望的。这些标志物可以单独使用,也可以通过将多个标志物组合使用而提高特异性、灵敏度。进而,也可以与现有的生物标志物组合而用于诊断。

[0102] 另外,在此示出Te-EVs中所含的蛋白质的分析结果,但也可以对Te-EVs中所含的怎样的生物体构成成分进行分析而作为生物标志物使用。作为这样的生物体构成成分,为核酸、脂质。

[0103] [实施例4]AZU1的分析

[0104] 以下,示出对于距volcano plot(火山图)的原点最远的AZU1($p=2.85 \times 10^{-3}$, fold-change(差异倍数)=31.59,在图5中用箭头AZU1表示。)进行详细分析的结果,不言而喻,对于上述中示出的其它蛋白质而言,也同样可以作为标志物使用。

[0105] 图6A示出20个病例的肾细胞癌患者的源自正常组织、癌组织的Te-EVs中的AZU1的浓度。在通过质谱法进行分析的全部20个病例的肾细胞癌患者中,在源自癌组织的Te-EVs中,可看到AZU1的表达增强。图6B是表示癌的不同发展程度下AZU1的浓度的图,伴随肾细胞癌的发展,Te-EVs中所含的AZU1量增加。病期T3的肾细胞癌(T3a、T3b)的癌部位与非癌部位相比,AZU1的含量显著地高。另外,如图6B中的放大图所示,即使为初期的癌(T1a~T2a),与源自正常组织的Te-EVs相比,在AZU1含量上也可看到差异。

[0106] 另外,利用蛋白质印迹法确认癌的发展所伴随的AZU1表达增加(图6C)。将各泳道500ng的EVs蛋白质通过电泳进行分离,转印于膜上之后,将抗AZU1单克隆抗体(Abcam公司制)作为一次抗体使用,与实施例2同样操作进行检出。对由T1a~T3b的4名患者得到的Te-EVs进行分析,结果确认:在所有试样中,由癌部位(T)得到的Te-EVs与由非癌部位(N)得到的Te-EVs相比,AZU1的表达显著增加。

[0107] 有报告源自癌的细胞外囊泡也在血清中被检出(非专利文献3~5、11~13)。因此,将血清样品中所含的EVs的AZU1量通过定量的质谱法进行测定(图6D)。

[0108] 血清试样中的EVs使用EVSecond柱(GL科学株式会社制)进行精制。从健康者10例的血清中所含的EVs中完全没有检出AZU1,与此相对,在肾细胞癌患者19例中的10例中检出AZU1。如源自肾细胞癌组织的Te-EVs那样,虽然没有看到AZU1含量伴随癌的进展而增加,但是,在T1a~T2b这样的早期的癌患者血清中所含的EVs中被检出的比例高。该结果显示:使用血清检出AZU1的肾细胞癌检查是有效的。

[0109] 在存在于肾细胞癌患者的血清中的细胞外囊泡中检出AZU1显示:在Te-EVs中观察到含量差异的蛋白质可能在血清中检出。因此显示:通过该方法探索得到的生物标志物作为可以使用血清进行检查的疾病标志物起作用。

[0110] [实施例5]肾细胞癌中的AZU1的作用分析

[0111] AZU1的表达在肾细胞癌组织中被特异性检出,因此,对AZU1的生物学作用进行了研究。已知在肾细胞癌中发生很多血管新生,构建癌组织的微小环境(非专利文献14~17)。因此,研究了AZU1对血管内皮细胞的形态产生的影响。

[0112] 首先,利用免疫电子显微镜研究了内源性AZU1的定位。使用对兔免疫而得到的抗AZU1抗体(Abcam公司制),将抗CD9单克隆抗体作为一次抗体使用,并使用由大小不同的胶体金颗粒标记的二次抗体,在由同一患者的正常组织、癌组织得到的Te-EVs中研究了AZU1的定位(图7A)。

[0113] 抗兔抗体使用以40nm的胶体金颗粒标记的抗体,抗小鼠抗体使用以20nm的胶体金颗粒标记的抗体。因此,在图7A中,大的颗粒显示AZU1的表达,小的颗粒显示CD9的表达。CD9在由正常组织、癌组织的任意组织得到的Te-EVs表面均可以确认表达,与此相对,AZU1仅在源自癌组织的Te-EVs表面可看到表达。

[0114] 利用蛋白质印迹法确认肾细胞癌株中的AZU1表达(图7B)。对从786-0、ACHN、Caki-1、Caki-2(由ATCC获得)细胞株中分离的EVs以及总细胞裂解物(Whole cell lysate)中的AZU1的表达进行了研究。在任一种细胞中,均确认AZU1的表达,但是,在从786-0、Caki-1、Caki-2的3个细胞株的培养液中分离的EVs(cultured media EVs,以下有时记载为CM-EVs。)中检出AZU1,然而在源自ACHN细胞株的CM-EVs中几乎没有检出AZU1。

[0115] 接着,利用经内皮电阻(transendothelial electrical resistance,TEER)分析了由这些细胞株得到的CM-EVs的血管内皮细胞的透过性(图7C)。TEER使用HUVEC细胞(由Gibco公司获得。)进行测定。将 4.0×10^4 个HUVEC细胞接种于微孔径0.4 μ m的24孔培养插件(Thermo Fisher Scientific公司制)并培养4天后,以10 μ g/ml的浓度添加从各细胞株得到的CM-EVs,使用Millicell(注册商标)ERS-2电压电流计(Millipore公司制)测定TEER,利用以下的式子算出各试样的TEER。

[0116] [式1]

[0117] (试样孔的电阻(Ω)-空的孔的电阻(Ω)) \times 培养面积(cm^2)=TEER($\Omega \text{ cm}^2$)

[0118] 将结果示于图7C。经时测定了TEER,结果,在CM-EVs添加24小时后,可观察到HUVEC细胞片的TEER的减少。特别是在添加了由在EVs上表露出更多AZU1的Caki-1和786-0细胞所得到的CM-EVs的试样中,确认TEER显著减少。

[0119] 可以认为表露出更多的AZU1的EVs具有提高透过性的作用,因此,使用使AZU1强制表达的系统进行了详细的分析。在CM-EVs中几乎没有检出AZU1的ACHN细胞中,导入AZU1-FLAG(Addgene公司制)并进行强制表达。如图7D所示,确认了在使AZU1-FLAG强制表达的ACHN细胞株中,在EVs中也含有许多AZU1-FLAG。

[0120] 进而,利用免疫电子显微镜确认了在EVs上也表露AZU1-FLAG。将抗FLAG单克隆抗体(Sigma-Aldrich公司制)作为一次抗体,使用胶体金标记抗小鼠抗体进行FLAG的检出(图7E)。在由仅导入了载体的细胞得到的CM-EVs中没有检出FLAG,与此相对,在由导入了AZU1-FLAG的细胞得到的CM-EVs上检出FLAG。由以上的结果可以确认:强制表达的AZU1-FLAG也与内源性AZU1同样地在EVs上表露。

[0121] 使用该表达系统,用HUVEC研究了透过性(图7F)。得知:与由仅导入了载体的细胞得到的CM-EVs相比,由强制表达AZU1的细胞得到的CM-EVs使得TEER显著地减少。因此暗示:AZU1具有破坏血管内皮细胞的形态的作用。

[0122] 接着,研究了在由肾细胞癌患者得到的Te-EVs中是否也具有同样的作用。使用由各种病期的6名患者得到的源自正常组织、癌组织的Te-EVs测定细胞的透过性。图8A是表示每名患者的源自正常组织、癌组织的Te-EVs添加后的TEER的经时变化的图,图8B是汇总各测定值而标绘的图。通过添加源自癌组织的Te-EVs,从12小时后可看到TEER显著减少。另外,通过添加由癌进展的患者得到的Te-EVs,显示了更显著的TEER的减少。

[0123] 研究了源自正常组织、癌组织的Te-EVs对于TEER的效果不同是否起因于细胞摄入源自各自组织的Te-EVs。将源自正常组织、源自癌组织的Te-EVs分别用PKH-67或PKH-26

(Sigma-Aldrich公司制)标记后进行混合,添加于HUVEC细胞的培养液中,在12小时后进行显微镜观察。图8C表示使用了由2名患者得到的Te-EVs的结果。在所有试样中,无论是在核的周围鲜明可见的源自正常组织的Te-EVs(在荧光显微镜下被染色成绿色。),还是作为暗的染色像被确认的源自癌组织的Te-EVs(在荧光显微镜下被染色成红色,每各2个用箭头表示。),均被同等程度地检出。因此确认:Te-EVs的摄入效率不因Te-EVs所来源的组织而变化。即,显示:源自癌组织的Te-EVs引起的TEER的减少并非由Te-EVs的摄入效率不同引起的。因此,可以认为是以表露于Te-EVs上的以AZU1为代表的蛋白质等引起的。

[0124] 在患者的血液中,是在源自癌组织、源自正常组织的Te-EVs混合的状态下进行循环。研究了在混合的状态下是否诱导TEER的减少。图8D是经由3名患者得到的源自正常组织、源自癌组织的Te-EVs进行混合,添加于HUVEC细胞的培养液中并经时地进行TEER测定的结果。对于由任意患者得到的Te-EVs,即使将源自癌组织、源自正常组织的Te-EVs混合使用,也能够观察到TEER的减少。该结果认为反映了患者体内实际的现象,认为通过AZU1诱导血液循环性的转移。

[0125] 根据上述结果认为:AZU1是密切地参与肾细胞癌的发病和进展的疾病关联基因。因此,可以将AZU1作为标靶研发治疗药物。由此可见,通过分析疾病特异性表达的蛋白质或核酸等生物体构成成分的功能,能够发现新的治疗药的标靶。

[0126] [实施例6]使用患者血清的分析

[0127] 如果能够在血清中的EVs中检出肾细胞癌患者中的特征性蛋白质,则能够制成对肾细胞癌的早期发现有用的标志物。因此,在血清中所含的EVs中,探索了在肾细胞癌患者和健康者中可看到差异的蛋白质。表4中记载了在血清中的EVs中,在肾细胞癌患者中可以检出、但在健康者中不能检出的蛋白质中,除外利用表1和表2所示的Te-EVs的分析结果被检出的物质。

[0128] [表4]

[0129]

AC号	蛋白概述	基因名称
P11678	嗜酸性粒细胞过氧化物酶	EPX
Q8NI35	InaD样蛋白	INADL
P68104	延长因子1- α 1	EEF1A1
Q63ZY3	KN模体和锚定蛋白重复结构域包含蛋白2	KANK2
Q16836	羟酰辅酶A脱氢酶, 线粒体	HADH
P07437	微管蛋白 β 链	TUBB
P55058	磷脂转移蛋白	PLTP
Q9Y3R5	蛋白dopey-2	DOPEY2
P05543	甲状腺素结合球蛋白	SERPINA7
P06732	肌酸激酶M型	CKM
P31946	14-3-3蛋白 β/α	YWHAB
O75533	剪接因子3B亚基1	SF3B1
P07900	热休克蛋白HSP 90- α	HSP90AA1
Q15404	Ras抑制蛋白1	RSU1
Q9UII5	锌指蛋白107	ZNF107
P09874	聚[ADP-核糖]聚合酶1	PARP1
P10619	溶酶体保护蛋白	CTSA
P14618	丙酮酸激酶PKM	PKM
P14625	内质网素	HSP90B1
P23284	肽基脯氨酰顺反异构酶B	PPIB
P60033	CD81抗原	CD81
P62249	40S核糖体蛋白S16	RPS16
Q86XI8	未知特性蛋白C19orf68	C19orf68

[0130] 这些蛋白质虽然在肾细胞癌患者中是特征性的,但是,并不是从所有肾细胞癌患者中均可被检出。但是,通过组合多个这些标志物,就有可能使用血液试样在早期检出肾细胞癌的患者。除了由肾细胞癌患者的Te-EVs得到的见解之外,在肾细胞癌患者的血清中特异性被检出的这些蛋白质成为迄今为止没有有效的生物标志物的肾细胞癌的新的标志物。

[0131] 产业上的可利用性

[0132] 通过本发明的生物标志物的探索方法,能够得到细胞外囊泡中所含的组织特异性的疾病标志物。由于细胞外囊泡分泌于体液,因此,作为非侵袭性或低侵袭的疾病标志物是非常有用的。如果使用该方法,则即使对于迄今为止没有有效的生物标志物的疾病,也能够得到生物标志物。

[0133] 进而,在此所示的肾细胞癌标志物能够作为迄今为止不存在有效的生物标志物的肾细胞癌的新的标志物而用于肾细胞癌的检查。另外,由于AZU1具有破坏血管内皮细胞的形态的作用,因此,暗示对癌细胞的转移是重要的。因此,以AZU1为标靶的分子靶向药物可期待具有抗癌转移作用。

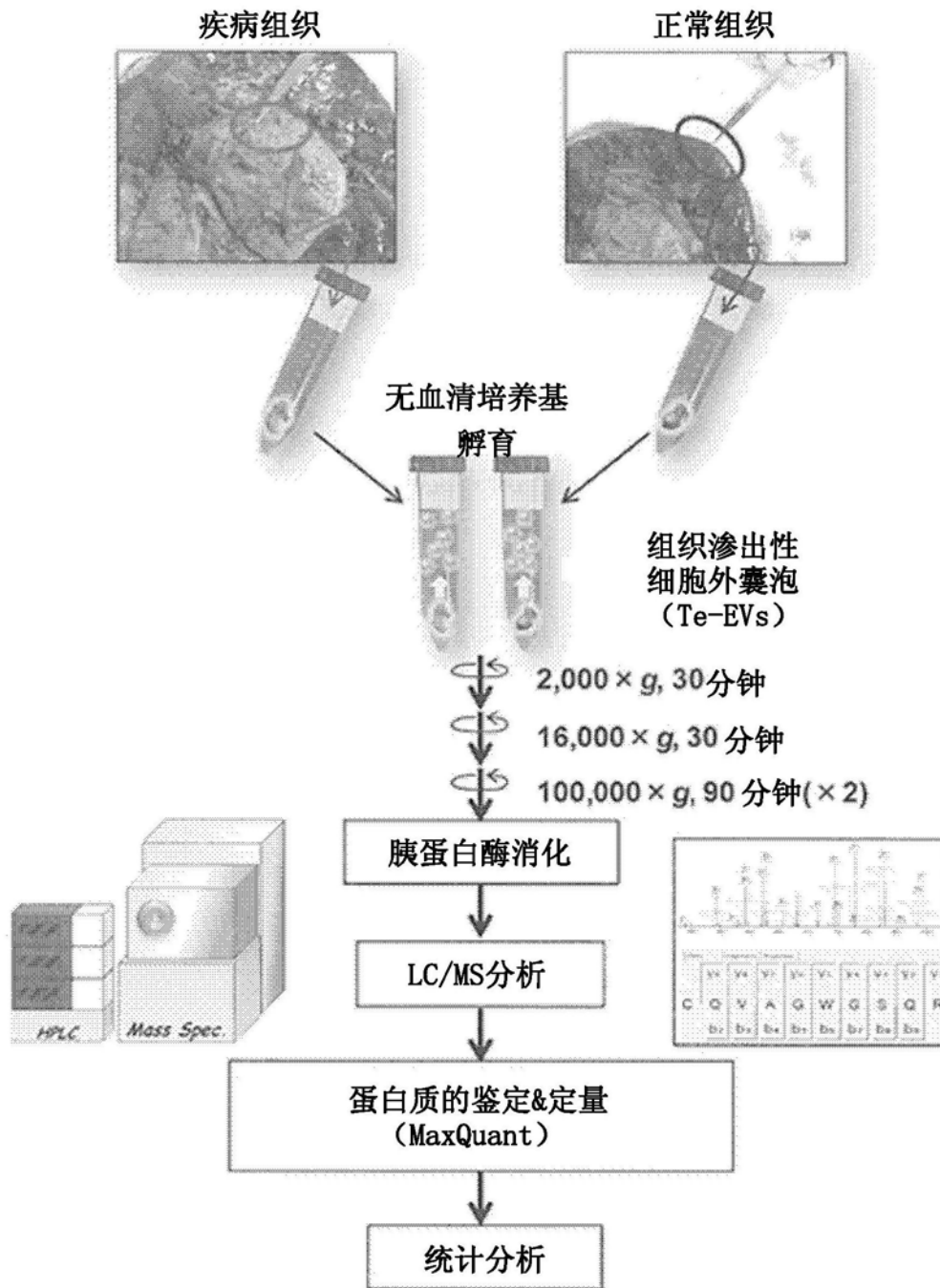


图1

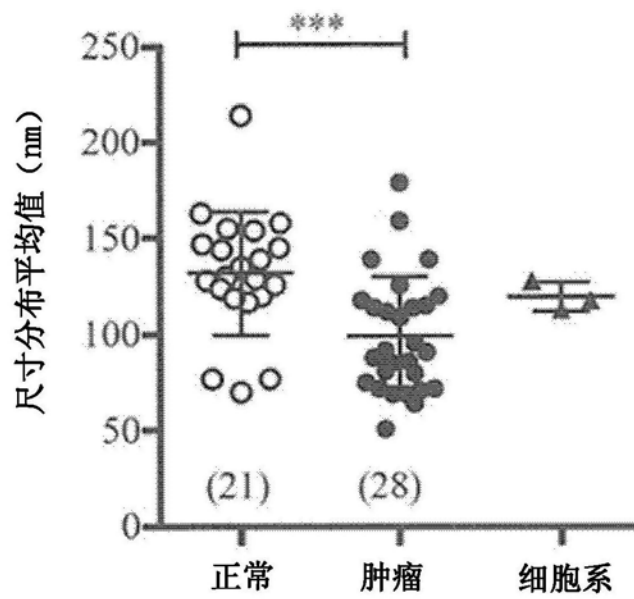
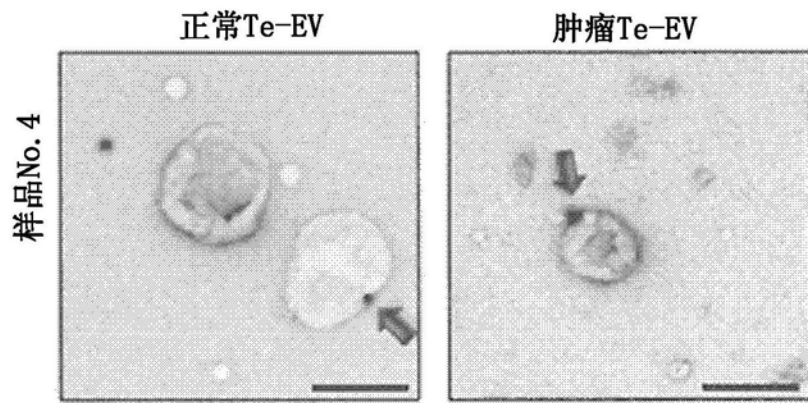
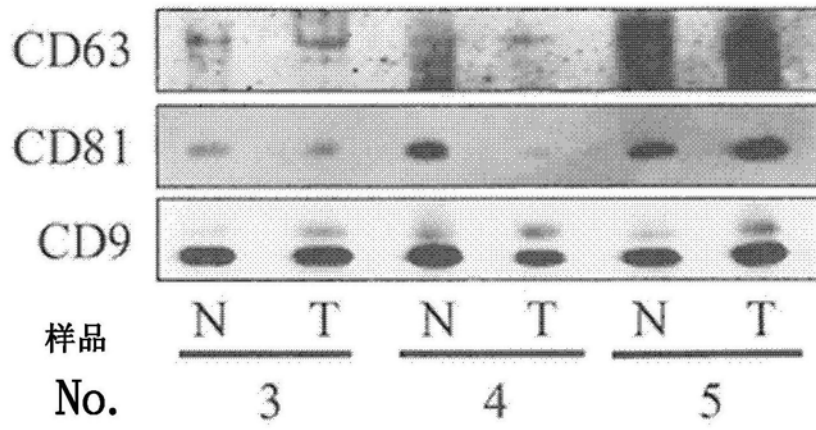


图2

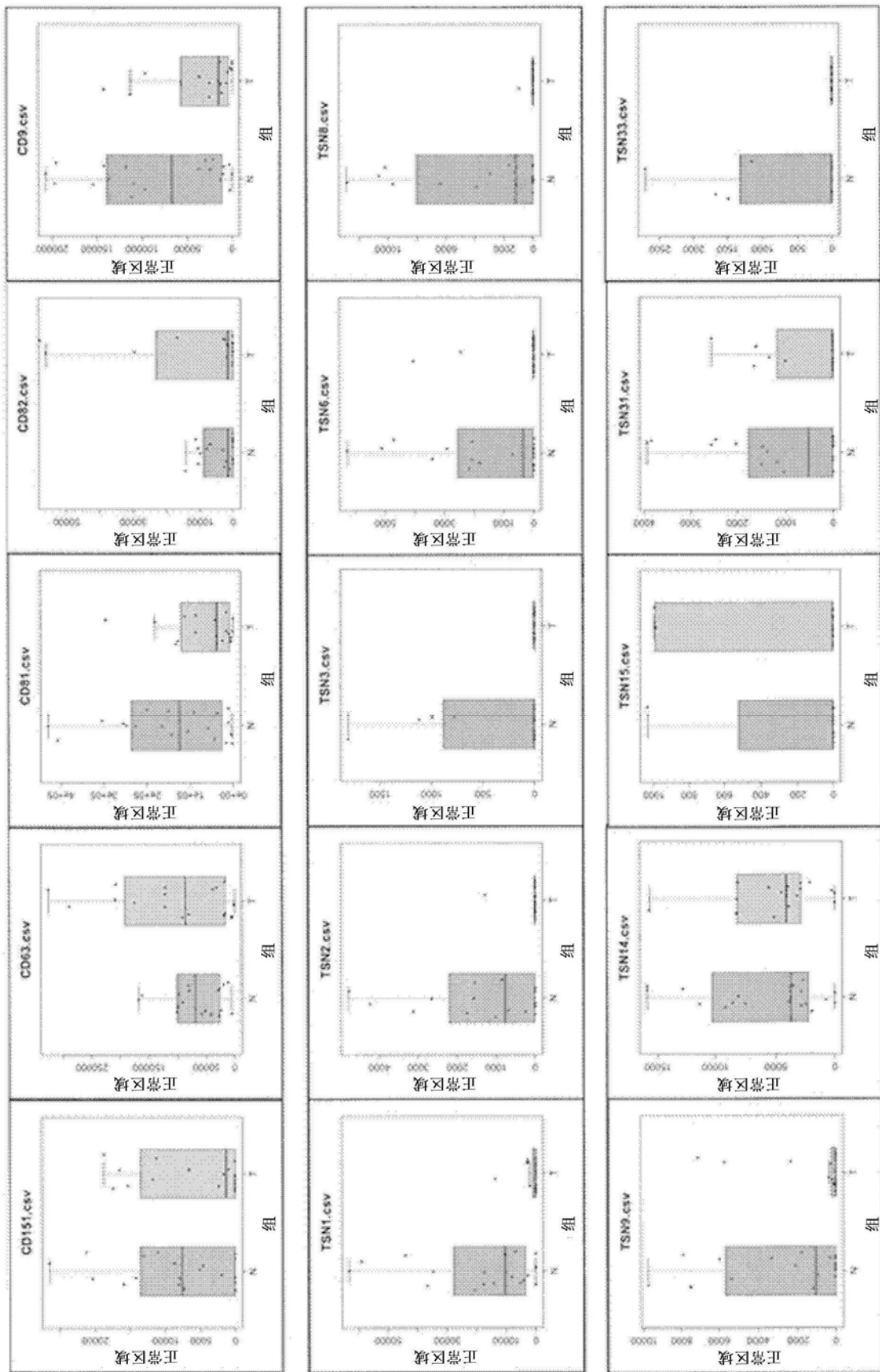


图3

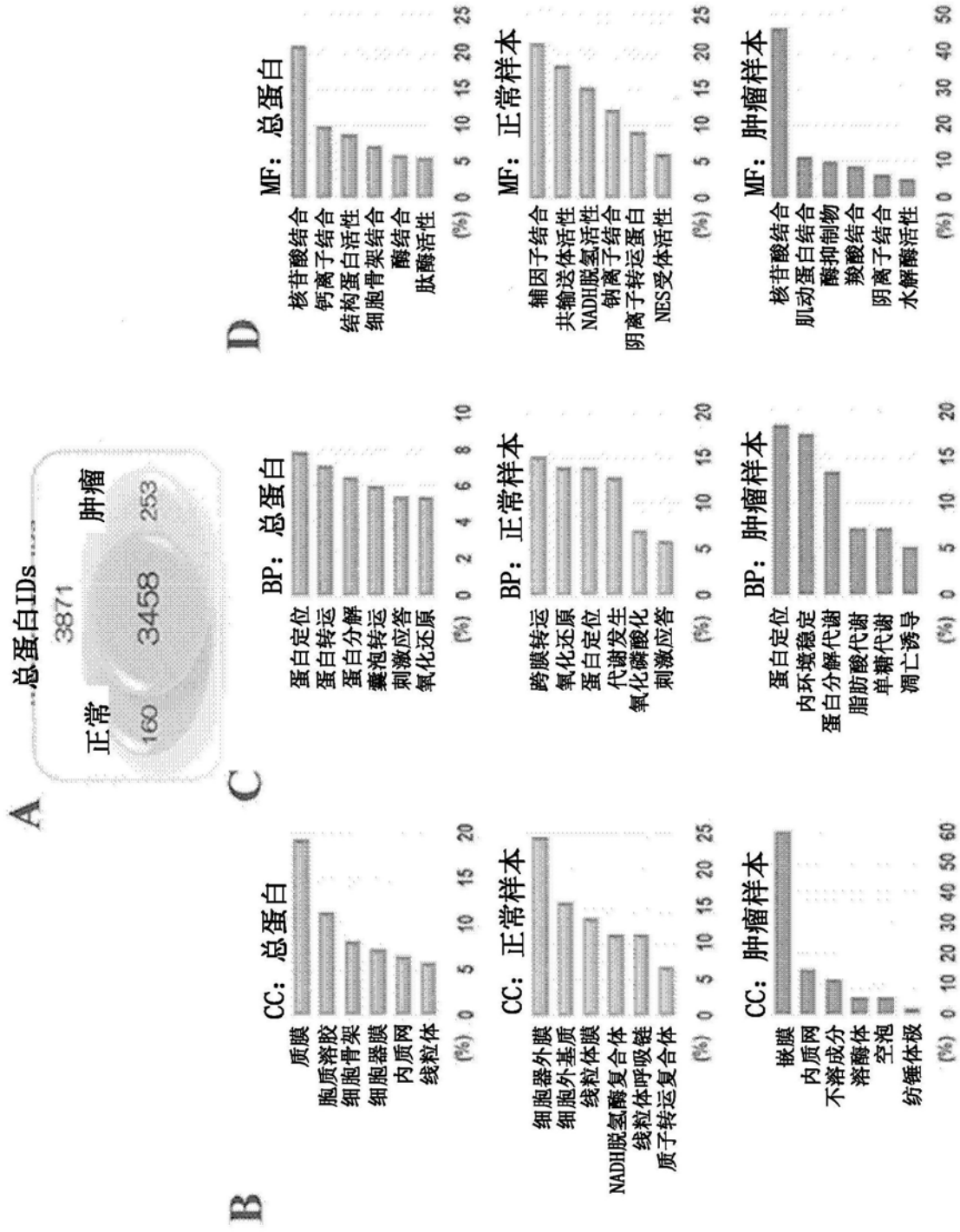


图4

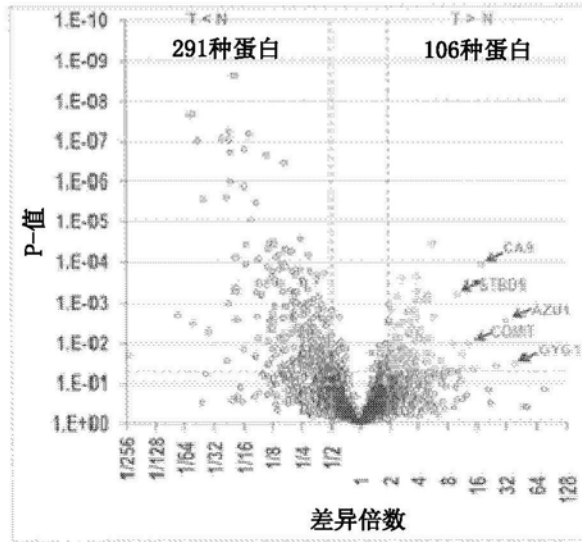


图5

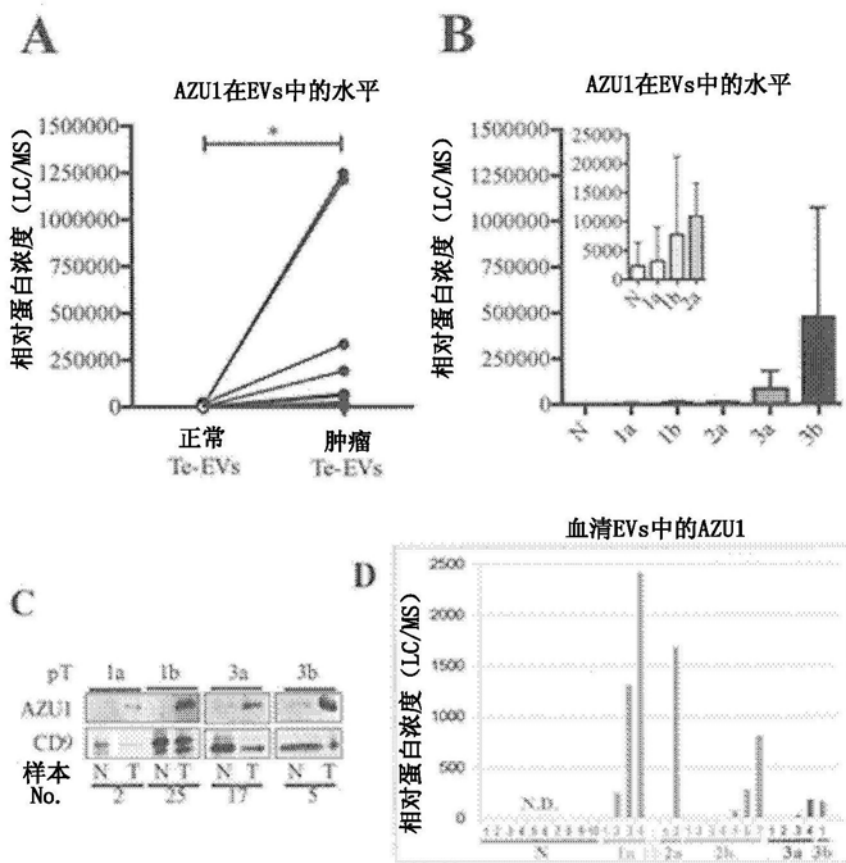


图6

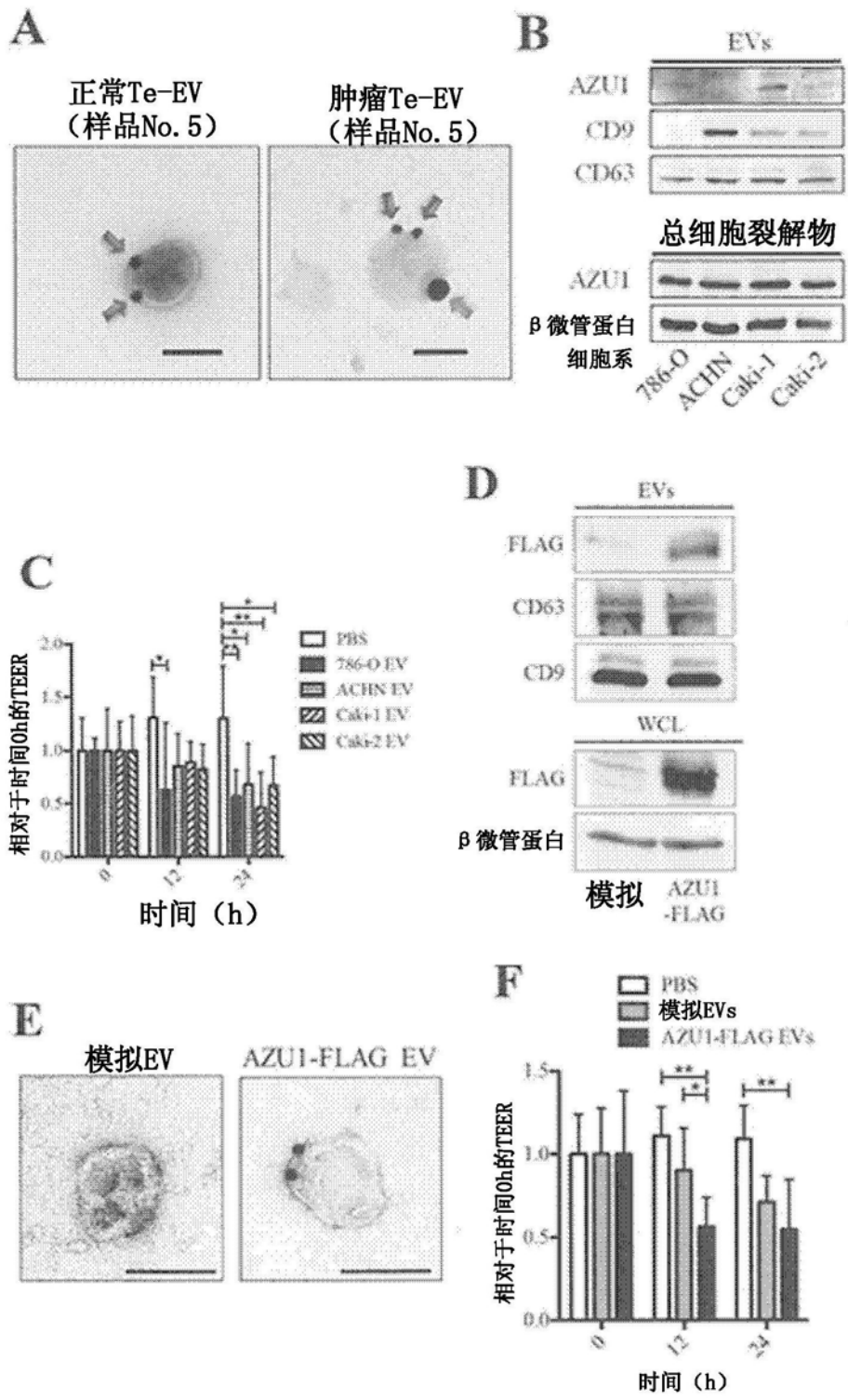


图7

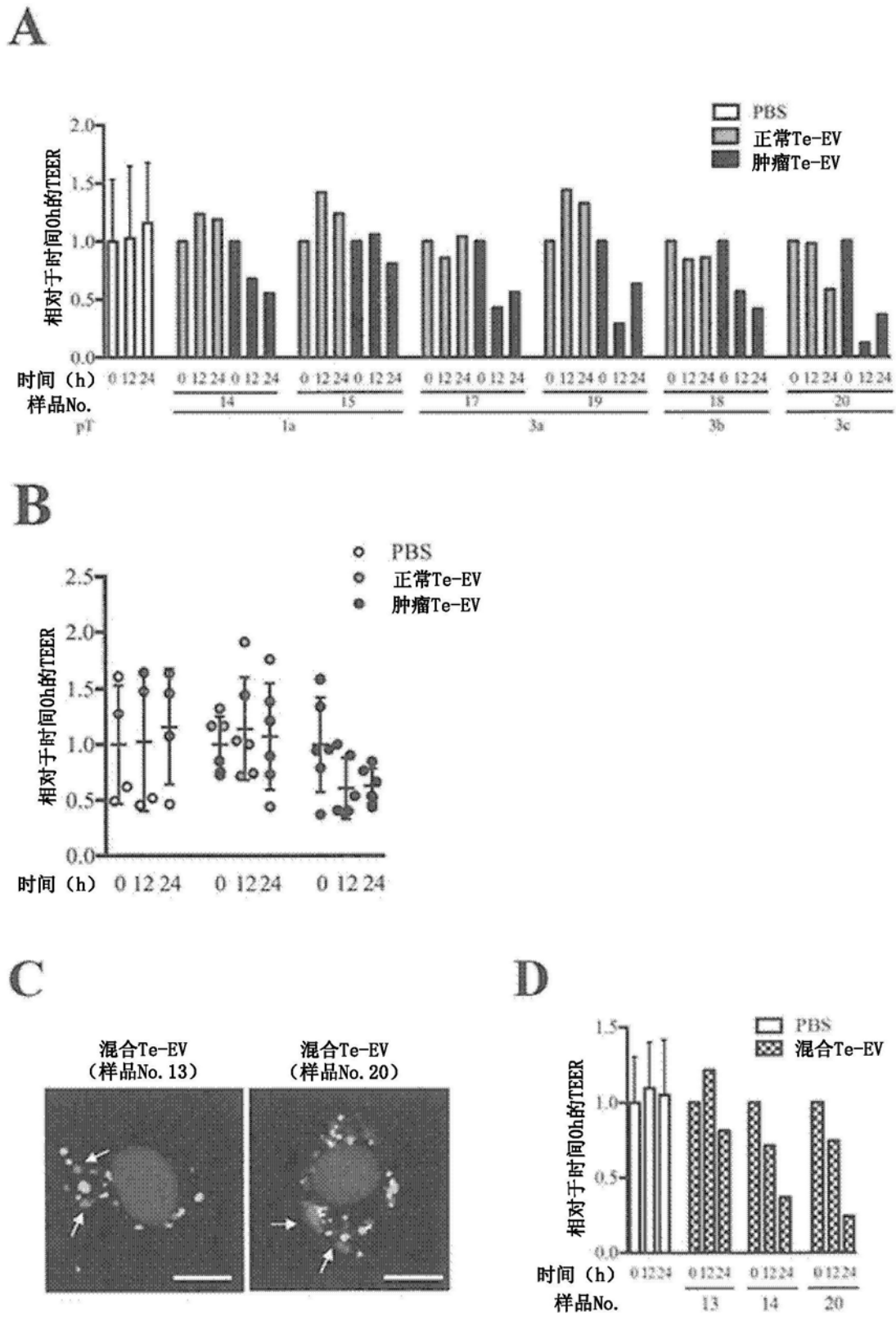


图8