

令和元年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「前立腺がん骨転移の診断キットの研究開発」

研究開発成果等報告書

令和2年5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 株式会社ハカレル

目 次

第1章 研究開発の概要

1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2	研究体制	12
1-3	成果概要	14
1-4	当該研究開発の連絡窓口	14

第2章 本論

2-1 抗 CDCP1 モノクローナル抗体の作製

2-1-1	CDCP1 発現ベクターの構築	15
2-1-2	CDCP1 蛋白の発現と精製	15
2-1-3	免疫	16
2-1-4	CDCP1 抗体産生細胞の樹立	16
2-1-5	CDCP1 抗体の精製	17

2-2 CDCP1 陽性エクソソーム測定キットの作製

2-2-1	抗体の組み合わせの検討	17
2-2-2	製造処方および反応条件の最適化	19
2-2-3	標準蛋白の調製	20
2-2-4	測定キットの試作と提供	22

2-3 臨床検体を用いた CDCP1 陽性エクソソーム測定

2-3-1	臨床検体の収集	22
2-3-2	測定キットを用いた臨床検体の測定	22
2-3-3	データ解析と臨床的意義の検討	23

最終章	全体総括	24
-----	------	----

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究背景

(1) 前立腺がんと骨転移

前立腺がんは欧米において最も多い男性悪性腫瘍であり、日本においても、悪性腫瘍の中で最も高い増加傾向を示している。国立がん研究センターがん対策情報センターの予測によると、2015年の前立腺がん罹患数は男性の部位別罹患数において第一位となっている。毎年約80,000名の男性が前立腺がんと診断されており、また毎年約10,000名が前立腺がんを原因として死亡している。

進行前立腺がんにおいて、骨は主要な転移臓器であり、患者増加に伴い骨転移症例も増えることが知られている。骨転移は強い痛み（疼痛）や病的骨折、脊髄圧迫といった骨関連事象の発症と関連があり、患者の生活を営む上で不可欠な基本的行動である日常生活動作や社会的にみて「人間らしい生活」と考える生活であるQOL（Quality of life）を低下させ、また、死亡リスクを高くすることも知られている。さらに全前立腺がん患者の約80%が66歳以上であり、健康長寿社会を目指す日本としては、解決すべき重要課題の一つと言える。

(2) エクソソーム

エクソソームと呼ばれる細胞外小胞顆粒は、あらゆる細胞から分泌される小胞であり、蛋白質のみならず mRNA やマイクロ RNA といった核酸も内包している。最近の研究によりエクソソームは、これまで細胞間を移動しないと考えられてきた蛋白質や核酸を運び、受け取った細胞内で機能することが証明され、細胞間情報伝達に寄与することがわかった。特にがん研究においては、がん細胞由来のエクソソームが、がん微小環境や遠隔転移などに関与することが明らかになり、がん細胞の治療抵抗性の原因の一つと考えられるようになった。それと同時にエクソソームは、上述に挙げた性質により、がん細胞の性質を持って細胞外に分泌され、体液中に存在することがわかったため、疾患の新たなバイオマーカーとして現在注目されている。特に骨周囲環境に与える因子を同定することで、骨転移における新たなバイオマーカーを見出すことができると考えられる。これにより、詳細に検査すべき患者を振り分けることができ、骨転移の早期発見、あるいは医療費削減にも繋がると考えられた。

（３）エクソソームと骨転移

我々は、骨転移の新たな悪性化機構として、骨組織に転移したがん細胞が破骨細胞に直接働きかけ、破骨細胞が骨を溶かすことによって、がん細胞が生存する場所を確保できると考えた。そこで、前立腺がん細胞から分泌されるエクソソームを回収し、破骨前駆細胞にエクソソームをかけたところ、破骨細胞への分化が促進されることがわかった。破骨細胞の数の増加は、いわゆる骨が溶けていくという骨組織の溶骨を促進することが知られている。この溶骨によって空いたスペースに、転移したがん細胞が増えることにより、前立腺がん細胞の悪性化が促進される可能性が見出された。そこで、エクソソーム上のどの分子が破骨細胞の分化に関わるかを解析するために、どのような蛋白質がエクソソーム上に存在するかを同定する網羅的なプロテオーム解析を行った。その結果、CDCP1 と呼ばれる分子が同定された。実際、エクソソーム膜上から CDCP1 を除外すると、破骨細胞の分化を抑制することを確認した。つまり前立腺がん細胞から分泌されるエクソソーム膜上の CDCP1 が、破骨前駆細胞に入り、結果的には破骨細胞の数を増やしていることを意味している。上述の結果より、骨転移する前立腺がんのエクソソーム上には CDCP1 が存在し、CDCP1 を持ったエクソソームが、がん細胞から破骨前駆細胞に移動することによって、破骨細胞の分化を誘導し、溶骨が促進され、結果的に転移した前立腺がん細胞の生存する空間が広くなるということを意味している（図 1）。

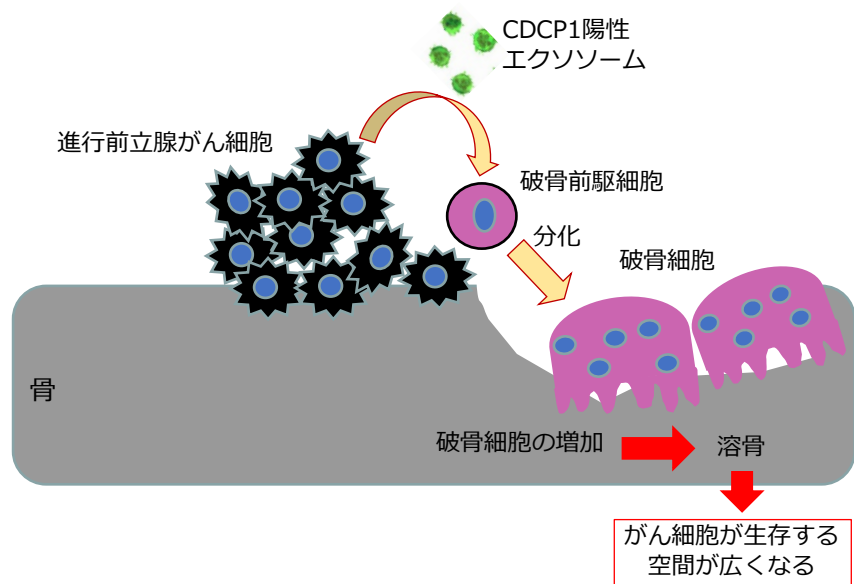


図1 CDCP1 陽性エクソソームによる破骨細胞の分化誘導

（４）バイオマーカーとしての CDCP1 陽性エクソソーム

上述の結果から、CDCP1 を持ったエクソソームを検出できれば、骨転移の有無を調べることができる画像診断の感度を補うバイオマーカーになるのではないかと考えた。そこで、

【公開版】

in vitro, in vivo で得られた結果の臨床的意義を評価するために、骨転移を有する、および骨転移を有しない前立腺がん患者および前立腺肥大症患者の血漿を採取し、これよりエクソソームを回収し解析した。その結果、骨転移が見られる症例に関しては CDCP1 の発現が見られた。以上の結果から CDCP1 陽性のエクソソームは、前立腺がん患者における新規のバイオマーカーになる可能性を有していると言える。具体的には、1) 骨転移を予測する新たなバイオマーカー、2) がん特異的なバイオマーカー、のそれぞれが期待できる。

（５）組織生検とリキッドバイオプシー

一般に、より早期の段階でがんを診断して精度の高い治療を行うことは、がん患者の死亡率を低下させることに有効であると考えられており、「早期発見・早期治療」はがん治療におけるひとつのスローガンとなっている。がんの確定診断の方法として、患部の一部をメスや針などで取って顕微鏡などで調べる生検と呼ばれる検査方法が一般的である。これにより診断や時には治療方針も決めることになる。しかし生検は、1) 患者の組織の一部を採取するという「侵襲性」が非常に高く患者に多くの苦痛を与える、2) 例えば腫瘍の一部しか採取できないため、その腫瘍全体の性質を表しているとは限らない、3) 腫瘍を採取する医者の技術に左右される、などの問題がある。一方、これらの問題を補う方法としてリキッドバイオプシー（liquid biopsy）と呼ばれる血液や体液により検査する方法がある。リキッドバイオプシーでは、生検に存在する上述の1)～3)の問題点を解決できるが、検査するバイオマーカーの種類により偽陽性や偽陰性などの誤診断が出てくることがある。そのため、リキッドバイオプシーにおいては、これらの問題点を解決するバイオマーカーの発見が、今後の医療の問題点を解決する大きな課題となっている。バイオマーカーはアメリカ国立衛生研究所 NIH により、「病態生理学的な裏づけのもとに測定され、治療介入による薬理学的応答を評価しうる客観的指標」と定義づけされたものである。つまり、その患者のがんの有無や進行を評価する手法を意味しており、現在のがん治療においても、PSA や CEA といった複数のバイオマーカーが使われている。

（６）骨転移の検査

近年、早期の微小骨転移巣に対する治療効果を示した報告があり、骨転移の早期発見により進行前立がんの骨転移を止める可能性が提示されており、骨転移の早期発見は喫緊の課題

【公開版】

であると言える。しかし、前立腺がんのバイオマーカーである PSA でさえも、早期の骨転移を見つけることは難しく、どの患者に骨転移が今後起こりやすいかや微小な骨転移がすでに存在しているかを予測する有効なバイオマーカーは存在しない。そのため、定期的な画像検査に頼らざるを得ない状況である。現時点での画像検査のスタンダードは骨シンチグラフィーであるが、放射性検査である点やその正確性から改善点も多々ある。また Choline PET の検出感度は高いが、限られた施設のみ保有し、医療経済的な問題からも普及していないのが現実である。上述のように、前立腺がんの患者は高齢であることから、患者の QOL の向上には、生検を用いない安価で負担が少ない骨転移を早期で発見できることが望まれる。このような観点からもリキッドバイオプシーに应用可能な新たな高性能バイオマーカーの同定が望まれている（図2）。

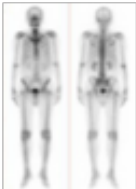
	現状	新技術
がんの検査方法	生検 〔課題〕 ・ 侵襲性高い ・ がん組織の部分的情報 ・ 医師の技術差あり 	リキッドバイオプシー 〔現状の課題の解決〕 ・ 侵襲性低い ・ がん組織全体の情報 ・ 簡便 
前立腺がんの骨転移の検査	骨シンチグラフィー 〔課題〕 ・ 早期発見困難 ・ 放射性検査 ・ 高額な費用 	〔現状の課題の解決〕 ・ 早期発見可能 ・ 非放射性検査 ・ 安価 〔新たな課題〕 ・ 高性能なバイオマーカーが必要

図2 がんの骨転移検査の現状と新技術の比較。新技術により現状の課題は克服される。
また、新技術の開発には高性能なバイオマーカーの同定が必要となっている。

1-1-2 研究目的及び目標

上述の背景のもと、新技術を実現するために解決すべき研究課題、(十一) バイオに係る技術に関する事項

1 バイオに係る技術において達成すべき高度化目標

(4) 川下分野特有の事項

1) 医療・健康・介護分野に関する事項

① 川下製造業者等の特有課題及びニーズ

エ. 生体試料を利用した測定・解析・開発技術

について、前立腺がんの骨転移をモニターする新たなバイオマーカーの同定とその超高感度検出法の開発を行うことを目的とし、後述の高度化目標を達成するために、以下のように

【1】～【3】のサブテーマを設定し、研究開発を実施した。

【1】抗 CDCP1 モノクローナル抗体の作製

前立腺がん細胞から分泌され、血液中に循環している CDCP1 陽性エクソソームを検出するために、抗エクソソーム抗体と抗 CDCP1 抗体の2種類のモノクローナル抗体を用いたサ

ンドイッチ ELISA

を用いた。抗エクソソーム抗体は我々が既に樹立した高性能抗体を利用した。本研究開発においては抗 CDCP1 抗体を作製した。図3にその工程を示し、以下にその各工程を概説する。

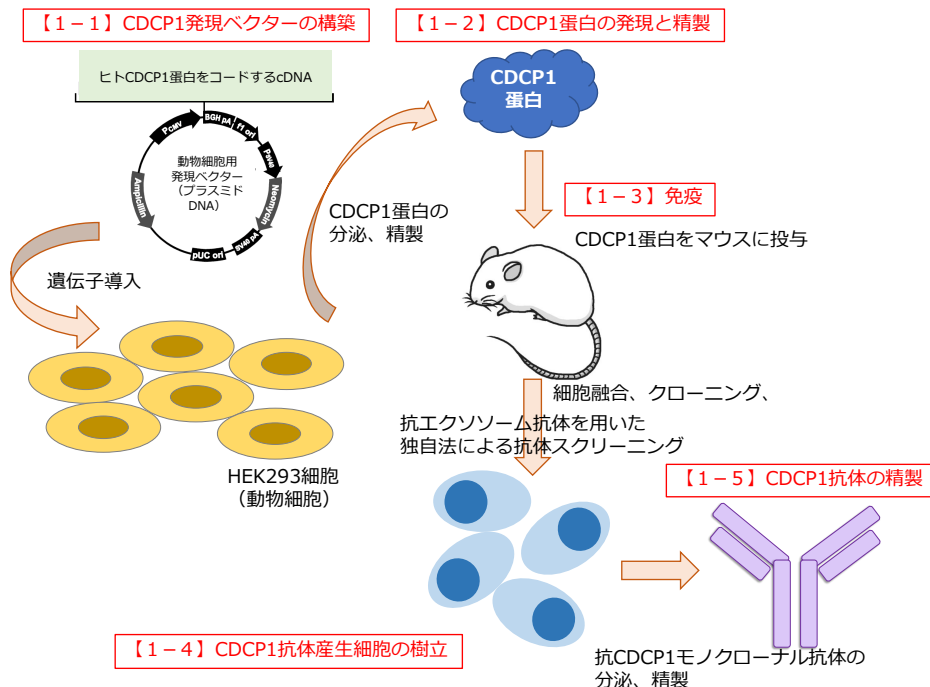


図3 抗 CDCP1 抗体作製の工程

【1－1】CDCP1 発現ベクターの構築

モノクローナル抗体を作製するために、抗原として必要な CDCP1 蛋白を作製した。抗原蛋白の3次元立体構造を認識する抗体を作る必要があるため、抗原は立体構造を保持した形で発現が期待される動物細胞の発現系（Expi293 細胞）を用いた。動物細胞用のベクターとして pD603 を用い、精製のための His タグを接続した形でベクターを構築した。

【1－2】CDCP1 蛋白の発現と精製

CDCP1 発現ベクターを市販のトランスフェクション試薬を用いて Expi293 細胞に一過的に導入し発現させた。1 週間の発現後に培養液を回収し、ニッケルカラムに通すことにより、His タグを結合させ蛋白を精製した。

【1－3】免疫

精製した CDCP1 蛋白は、2系統（BALB/C および A/J）のマウス3匹ずつにそれぞれ5回免疫し、最後にブースター投与を行った。また、これと並行して、発現ベクターを直接マウスに投与する DNA 免疫も実施した。双方の免疫法において、採血して抗体価がもっとも高いマウスを各系統1匹ずつ選択した。

【1－4】CDCP1 抗体産生細胞の樹立

選択したマウスからそれぞれ脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させた。得られたハイブリドーマ（融合細胞）を限界希釈法によりクローニングし、その培養上清に含まれる抗体の CDCP1 蛋白との反応性を調べた。高い反応性を示したクローンについては、我々が保有する高性能な抗エクソソーム抗体を用いることによって、エクソソーム上の CDCP1 分子と強く反応する抗体を選択した。この独自方法によって選択された CDCP1 陽性エクソソームと強く結合する抗体を産生するハイブリドーマを確保した。

【1－5】CDCP1 抗体の精製

CDCP1 高反応性抗体を産生する複数クローンのハイブリドーマをそれぞれ高密度培養し、培養液を回収後、プロテイン G カラムに通すことにより、抗 CDCP1 モノクローナル抗体を精製した。

【2】CDCP1 陽性エクソソーム測定キットの作製

【1】で作製した抗 CDCP1 モノクローナル抗体と抗エクソソーム抗体とを組み合わせたサンドイッチ ELISA を作製し、CDCP1 陽性エクソソームの定量を行うためのキットを作製した。エクソソーム定量のためのサンドイッチ ELISA における反応の概略を図 4 に示す。

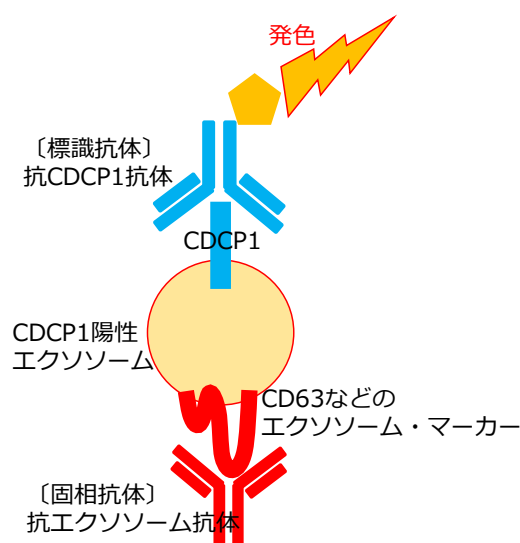


図4 CDCP1 陽性エクソソーム測定のためのサンドイッチ ELISA

【2-1】抗体の組み合わせの検討

固相抗体には抗 CD9 抗体を用い、標識抗体として CDCP1 陽性エクソソームとの反応性の高い抗 CDCP1 抗体を選択した。また、CD63 抗体を標識抗体とした場合に、固相抗体として CDCP1 陽性エクソソームとの反応性の高い抗 CDCP1 抗体を選択した。これらの組み合わせの中から、もっとも高感度に CDCP1 陽性エクソソームを検出できる組み合わせを決定した。

【2-2】製造処方および反応条件の最適化

ELISA の反応に用いるプレートおよび標識抗体やバッファーなどの試薬の製法や内容、また反応温度や反応時間などの条件を検討し、もっとも感度よく検出できる製造処方や反応条件を決定した。

【2-3】標準蛋白の調製

ELISA には検量線を引くための標準試薬が必要であるが、エクソソームそのものを標準試薬とすることは保存安定性の問題から困難である。その代替として、CDCP1 の細胞外ドメインと CD9 あるいは CD63 の細胞外ドメイン同士を連結させた融合蛋白の発現ベクターを

【公開版】

作製し、Expi293 細胞に導入、発現させ、その培養液中に分泌された融合蛋白を精製して標準蛋白とした。

【2-4】測定キットの試作と提供

上記の図4に示した ELISA を原理とするキット試作品を作製した。これは抗体を固定した96穴のプラスチック・プレートと試薬類から構成される。

【3】臨床検体を用いた CDCP1 陽性エクソソーム測定

前立腺がん患者のがん組織から分泌され血液中を循環する CDCP1 陽性エクソソームの量と前立腺がんの骨転移発生頻度の相関性を検討するために、前立腺がん患者から採取した血液（血清サンプル）を用いて、【2】で作製した CDCP1 測定キット試作品によって CDCP1 陽性エクソソームを測定した。

【3-1】臨床検体の収集

非がん患者、骨転移あり前立腺がん患者、骨転移なし前立腺がん患者の3群より、1 群あたり10検体ずつ血液を収集し、血清を調製して凍結保存した。

【3-2】測定キットを用いた臨床検体の測定

測定キットの性能試験の一環として、まず血漿検体の希釈直線性試験および添加回収試験を実施し、血漿を用いた測定の条件設定を行った。【3-1】で収集、保存しておいた血漿検体のすべてについて CDCP1 陽性エクソソームの定量測定を行った。

【3-3】データ解析と臨床的意義の検討

【3-2】における血液検体の測定結果と、がんの有無あるいは転移の有無といった臨床情報とを照らし合わせ、その相関性についての検討を行った。

以上の【1】～【3】のサブテーマそれぞれについて、新技術を実現するために解決すべき研究課題、（十一）バイオに係る技術に関する事項

1 バイオに係る技術において達成すべき高度化目標

(4) 川下分野特有の事項

1) 医療・健康・介護分野に関する事項

② 高度化目標

ア. 生物としてのヒトや疾病の個体・細胞・分子レベルでの理解に資する解析技術の高度化

に基づき、それぞれ以下の数値目標を設定した。

【1】抗 CDCP1 モノクローナル抗体の作製

CDCP1 陽性エクソソームと強い反応性を示し、かつ大量調製可能なモノクローナル抗体を少なくとも3クローン取得する。

【2】CDCP1 陽性エクソソーム測定キットの作製

【1】で得られた抗体と高性能抗エクソソーム抗体とのすべての組み合わせの検討から選択した測定キット試作品による測定において、CDCP1 陽性エクソソームを用いて 10～250ng の範囲で検量線が引けること。

【3】臨床検体を用いた CDCP1 陽性エクソソーム測定

血液検体中のエクソソームに存在する CDCP1 陽性エクソソームを定量でき、骨転移の有無によって測定値の間に統計学的有意差 ($p<0.05$) があり、感度・特異度が共に 80%を超えること。また、ROC 曲線における AUC 値が 0.7 を超えることなど総合的な検討により、臨床的意義があると判断すること。

1-2 研究体制

1-2-1 株式会社ハカレル

株式会社ハカレルは2017年10月に創業した新しいバイオベンチャーである。近年研究が盛んとなってきたエクソソームに基づく研究開発に特化し、研究用試薬の開発と販売、また、エクソソーム関連の受託研究を主な業務としている。代表取締役の園田はもともと塩野義製薬診断薬事業部の研究開発部門長であり、エクソソーム研究に精通している。塩野義製薬で作製したエクソソームに対する高性能抗体はその後コスモ・バイオ社に譲渡され、現在はコスモ・バイオ社が特許を保持している。塩野義製薬を役職定年と共に早期退職した園田は、国内ではエクソソーム研究の最先端にある国立がん研究センター研究所・分子細胞治療研究分野の客員研究員となり、さらに大阪大学大学院薬学研究科招聘研究員を併任しながらエクソソーム研究を続け、その成果を自ら社会実装する目的で当社を設立した。コスモ・バイオ社も当社設立に出資している。本社兼研究室は大阪府茨木市でバイオベンチャーが多数入居している彩都バイオヒルズセンターの1室で（図5）、エクソソーム関連の研究開発に必要な実験設備を設置している。



図5 当社の入居する彩都バイオヒルズセンター外観（左）と研究室内部（右）

1-2-2 東京医科大学

本研究開発においてアドバイザーを担当する東京医科大学・医学総合研究所の落谷孝広教授は、日本を代表するエクソソーム研究者である。また、東京医科大学の代表研究者である小坂展慶も落谷と共にこれまでがんの増殖・転移とエクソソームの関連について多くの研究成果を挙げてきた。図1に示したがん転移の分子メカニズムも今回新たに小坂らが発見した

【公開版】

ものである。この知見はがんの骨転移とエクソソームの関係を示す初めての発見であり、その成果をアカデミアとベンチャー企業が共同でいち早く臨床現場に実装しようとするのが本事業の主旨である。なお、代表研究者の小阪は事業終了直前に転職のため東京医科大学を退任し、後任として同大学の吉岡祐亮が着任した。

1-2-3 研究体制と役割分担

東京医科大学による前立腺がん骨転移に関する最新知見に基づき、CDCP1 陽性エクソソーム測定系を開発するため、東京医科大学と株式会社ハカレルが共同で本研究開発を実施した。その役割分担は、サブテーマ【1】抗CDCP1モノクローナル抗体の作製および【2】CDCP1 陽性エクソソーム測定キットの作製を株式会社ハカレルが、【3】臨床検体の収集およびそれを用いた CDCP1 陽性エクソソーム測定を東京医科大学がそれぞれ担当し、それぞれの施設において実施した（図6）。

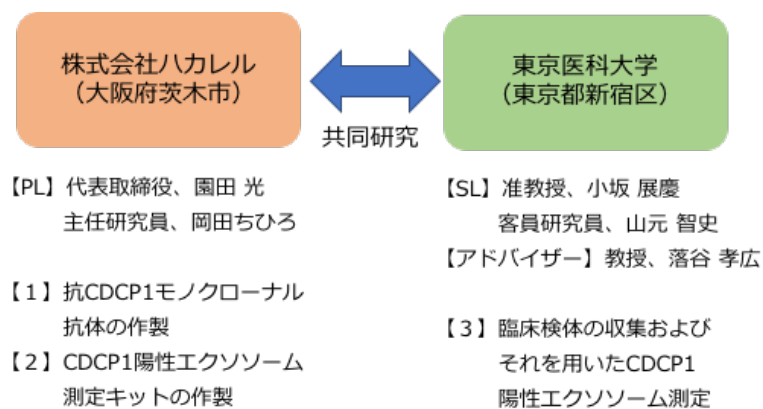


図6 共同研究体制と役割分担

1-3 成果概要

1-1-2項で設定した各サブテーマの目標に対して、以下の成果が得られた。

【1】抗 CDCP1 モノクローナル抗体の作製

CDCP1 陽性エクソソームと強い反応性を示し、かつ大量調製可能なモノクローナル抗体 22 クローンを取得し、目標の3クローンを大きく超えて達成した。

【2】CDCP1 陽性エクソソーム測定キットの作製

【1】で得られた抗体と高性能抗エクソソーム抗体とのすべての組み合わせの検討から選択した測定キット試作品による測定において、CDCP1 陽性エクソソームを用いて、抗 CD9 抗体との組み合わせでは 1.56~100ng、抗 CD63 抗体との組み合わせでは 3.9~250ng の範囲で検量線を引くことができ、目標感度を越えることができた。

【3】臨床検体を用いた CDCP1 陽性エクソソーム測定

血液検体中に存在する CDCP1 陽性エクソソームの検出を測定キット試作品によって試みたが、検出できたのはごく一部の検体のみであり、骨転移の有無との相関性など臨床的意義を見出すには至らなかった。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社ハカレル

園田 光

電話/FAX：072-657-9980

E-mail：hsonoda@hakarel.com

第2章 本論

2-1 抗 CDCP1 モノクローナル抗体の作製

2-1-1 CDCP1 発現ベクターの構築

本事業で作製する抗 CDCP1 モノクローナル抗体は、生体内のエクソソーム上に発現している CDCP1 分子と強く結合する必要があるため、抗原となる CDCP1 蛋白は生体内に存在する本来の CDCP1 蛋白質とできるだけ近い高次構造を取っていることが望まれた。したがって、抗原蛋白の発現系としてヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞の亜株で浮遊培養系に適した細胞株である Expi293 細胞を用いた。また、ベクターとしては商業ライセンスに制約のないプラスミド pD603 (図7) を用いた。ヒト CDCP1 の細胞外領域 (Met1~Thr667) の C 末端にヒスチジンが6回繰り返すタグ配列を接続したポリペプチドをコードする cDNA を発現ベクター pD603 に組み込み (pD603-CDCP1EC)、大腸菌 DH5 α を形質転換して増幅させ、プラスミド DNA を大量調製した。

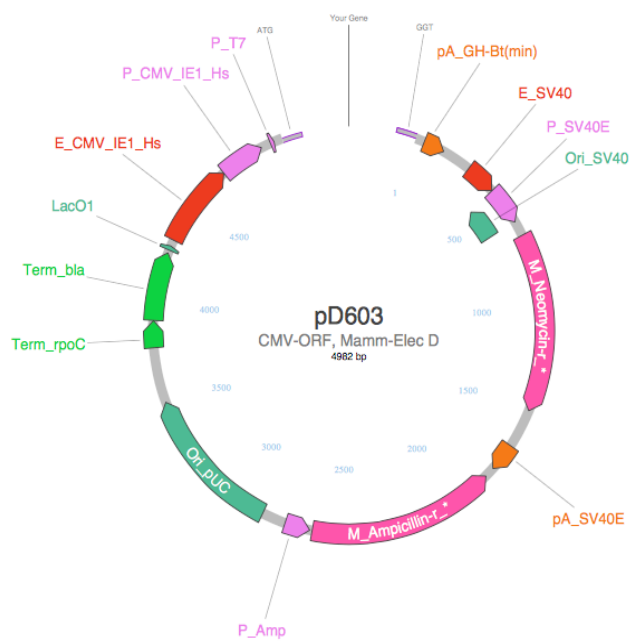


図7 発現ベクターpD603

2-1-2 CDCP1 蛋白の発現と精製

Expi293 細胞はサーモフィッシャー・サイエンティフィクス社から市販の専用液体培地で継代し、プラスミド pD603-CDCP1EC は同社の ExpiFectamine293 試薬を用いて添付のプロトコルどおりの操作により Expi293 細胞に導入した。トランスフェクション操作8日後の培養液を回収し、GE ヘルスケア社製 His-Mag Sepharose excel を用いて CDCP1 細胞外領域の組換え蛋白質を抽出し (図8)、透析により PBS に溶解させた。

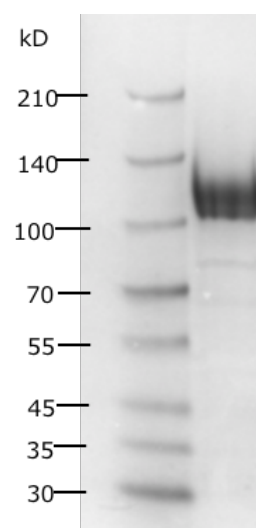


図8 精製 CDCP1 蛋白の SDS-PAGE 解析

最終的な精製蛋白の収量は培養液 485mL から 8mg であった。

2-1-3 免疫

精製した CDCP1 細胞外領域蛋白を初回免疫には完全アジュバントと、2回目以降は不完全アジュバントと等量混和することにより、免疫原としての乳剤を調製した。5週齢の雌 A/J 系マウスおよび Balb/c マウスに、投与 1 回につき、一匹あたり 100 μ g の精製タンパク質を皮下と腹腔内に等量に分けて投与した。

DNA 免疫法としては、発現ベクター-pD603-CDCP1EC を 1 回につき 1 匹あたり 30 μ g ずつ A/J 系マウスおよび Balb/c マウスに投与した。合計 8 回の DNA 免疫の後、抗体価の上昇が顕著に見られなかったため、蛋白の投与に切り替えて 3 回免疫を継続した。

2-1-4 CDCP1 抗体産生細胞の樹立

6 回目の免疫後に最終のブースターを行い、その4日後にマウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。脾細胞とミエローマ細胞 (P3U1) との細胞融合は、K.Watanabe et al., Vasohibin as an endothelium-driven negative feedback regulator of angiogenesis, J. Clin. Invest. 114(2004), 898-907 に記載した方法で行った。

抗血清とハイブリドーマ上清の抗体価の評価 (1 次評価) は下記に記述する ELISA 法にて行った。即ち、ヤギ抗マウス IgG 抗体を固相した 96 穴マイクロプレートに、抗血清又はハイブリドーマ上清を添加し、さらにビオチン化 CDCP1 蛋白質とユーロピウム標識ストレプトアビジンを混合攪拌後、室温で 2 時間反応させた。反応後、洗浄液 (0.01%Tween20 と 0.1%ProClin150 を含む生理食塩水) にて

抗原	クローン番号	サンプル名
DNA免疫 + 蛋白免疫	A2-4D2	d1
	A2-18E1	d4
	A2-20G1	d5
	B2-2B3	d8
	B2-4E7	d10
	B2-9H4	d15
	B2-10B8	d16
	B2-11A5	d18
蛋白単独免疫	B2-1E7	EC1
	B2-2B10	EC2
	B2-3A5	EC4
	B2-3F6	EC5
	B2-4C3	EC6
	B2-6H1	EC7
	B2-10G2	EC8
	B2-12F8	EC9
	B3-2C9	EC10
	B3-3H2	EC13
	B3-4B4	EC14
	B3-7H3	EC16
	B3-8B3	EC17
	B3-10F7	EC20

表 1 得られた抗 CDCP1 モノクローナル抗体

【公開版】

3回洗浄し、100 μ L 増強試薬を加え、5 分間攪拌した。時間分解蛍光強度を Nivo (Perkin Elmer 社製) にて測定し、抗血清やハイブリドーマを未添加の場合に得られるシグナルの3倍を超えるシグナル強度を示す場合を陽性と判断し、DNA 免疫と蛋白免疫の組み合わせから8クローン、CDCP1 蛋白単独免疫分より14クローンの合計22クローンの抗体を選択した(表1)。

2-1-5 CDCP1 抗体の精製

得られた各モノクローナル抗体は、抗体産生ハイブリドーマの無血清培地による培養液 40mL より、プロテイン G カラム (GE ヘルスケア社製) を用いて精製した。収量はプロテインアッセイ BCA キット (富士フィルム和光純薬社製) により測定した。各抗体サンプルは PBS により 1 mg/mL の濃度に調製し、以下の実験に供した。

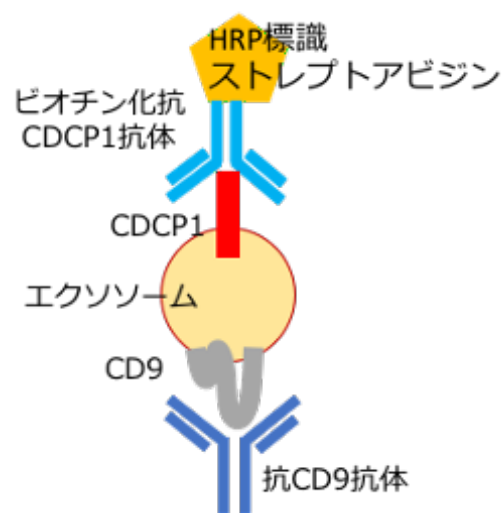


図9 CD9 陽性 CDCP1 陽性エクソソームとの反応性試験の概略図

2-2 CDCP1 陽性エクソソーム測定キットの作製

2-2-1 抗体の組み合わせの検討

抗体の2次評価には、ヒトCDCP1 陽性エクソソームとの反応性を検討した。ヒトの全長CDCP1 蛋白をコードするcDNA をプラスミド pD603 に組み込み、HEK293 細胞に導入し、1mg/mL G418 耐性となった安定発現株を選択、単離した。この細胞株を無血清培地で培養した上清から超遠心法にて精製したエクソソームをヒト CDCP1 陽性エクソソームとして用いた。

エクソソームを定量するためのサンド

クローン番号	サンプル番号	ex(-)	ex(+)	ex(+)-(-)
A2-4D2	d1	0.044	0.932	0.888
A2-18E1	d4	0.047	0.841	0.794
A2-20G1	d5	0.052	0.834	0.782
B2-2B3	d8	0.048	0.304	0.256
B2-4E7	d10	0.048	0.241	0.193
B2-9H4	d15	0.049	0.257	0.208
B2-10B8	d16	0.050	0.495	0.445
B2-11A5	d18	0.055	0.185	0.130
B2-1E7	EC1	0.047	0.835	0.788
B2-2B10	EC2	0.113	0.821	0.708
B2-3A5	EC4	0.05	0.939	0.889
B2-3F6	EC5	0.052	0.823	0.771
B2-4C3	EC6	0.051	0.98	0.929
B2-6H1	EC7	0.053	0.835	0.782
B2-10G2	EC8	0.063	0.883	0.820
B2-12F8	EC9	0.051	0.873	0.822
B3-2C9	EC10	0.047	0.894	0.847
B3-3H2	EC13	0.047	0.989	0.942
B3-4B4	EC14	0.049	1.196	1.147
B3-7H3	EC16	0.051	0.892	0.841
B3-8B3	EC17	0.051	0.784	0.733
B3-10F7	EC20	0.051	0.941	0.890
	buffer	0.045	0.045	0.000

表2 CD9 陽性 CDCP1 陽性エクソソームとの反応性試験の結果

イッチ ELISA 法においては、エクソソーム・マーカーに対する抗体と CDCP1 に対する抗体の2種類の抗体で挟み込む形で CDCP1 陽性エクソソームを検出する。本事業では、エクソソーム・マーカーとして代表的な CD9 および CD63 を用い、検討を行った。

CD9 とのサンドイッチ ELISA は抗 CD9 抗体（コスモ・バイオ社、クローン 12A12）を固相抗体、抗 CDCP1 抗体を標識抗体として検討した（図9）。すなわち、96 穴プラスチックプレートに抗 CD9 抗体を固相した上に CDCP1 陽性エクソソームを結合させ、表1の各抗体をビオチン化させて結合させ、HRP（horse radish peroxidase）標識ストレプトアビジンを反応させることにより、各抗体と CD9 抗体で捕捉されたエクソソーム上のCDCP1 蛋白との反応性を評価した（表2）。検出されたシグナル（ex(+)）からエクソソーム非存在下でのシグナル（ex(-)）を差し引いた値で評価したところ、DNA 免疫との蛋白免疫の組み合わせより選択した抗体は反応性が低い傾向が見られたが、蛋白単独で免疫した抗体では強く反応する抗体が複数クローンあり、強いものから順に3種類の抗体（クローン B2-4C3、B3-3H2、B3-4B4）を選択した（表2の黄色の網掛け）。

CD63 とのサンドイッチ ELISA は表1の各抗 CDCP1 抗体を固相抗体、CD63 抗体（コスモ・バイオ社、クローン 8A12）を標識抗体として検討した（図10）。すなわち、96穴

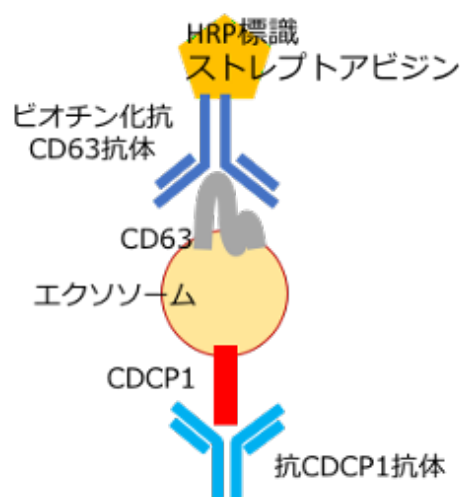


図10 CD63 陽性 CDCP1 陽性エクソソームとの反応性試験の概略図

クローン番号	サンプル番号	ex(-)	ex(+)	ex(+)-(-)
A2-4D2	d1	0.066	0.512	0.446
A2-18E1	d4	0.058	0.516	0.458
A2-20G1	d5	0.067	0.377	0.310
B2-2B3	d8	0.048	0.072	0.024
B2-4E7	d10	0.071	0.097	0.026
B2-9H4	d15	0.065	0.070	0.005
B2-10B8	d16	0.084	0.090	0.006
B2-11A5	d18	0.071	0.075	0.004
B2-1E7	EC1	0.072	1.168	1.096
B2-2B10	EC2	0.073	1.14	1.067
B2-3A5	EC4	0.506	1.514	1.008
B2-3F6	EC5	0.068	1.388	1.320
B2-4C3	EC6	0.076	1.124	1.048
B2-6H1	EC7	0.068	1.291	1.223
B2-10G2	EC8	0.074	1.043	0.969
B2-12F8	EC9	0.071	1.278	1.207
B3-2C9	EC10	0.06	1.539	1.479
B3-3H2	EC13	0.068	1.394	1.326
B3-4B4	EC14	0.064	1.359	1.295
B3-7H3	EC16	0.065	1.052	0.987
B3-8B3	EC17	0.074	0.241	0.167
B3-10F7	EC20	0.076	1.461	1.385
	buffer	0.052	0.051	-0.001

表3 CD63 陽性 CDCP1 陽性エクソソームとの反応性試験の結果

【公開版】

プラスチックプレートに抗 CDCP1 抗体を固相し、CDCP1 陽性エクソソームを結合させて、ビオチン化させた抗 CD63 抗体を結合させ、HRP (horse radish peroxidase) 標識ストレプトアビジンを反応させることにより、各抗体と CD63 抗体で捕捉されたエクソソーム上の CDCP1 蛋白との反応性を評価した (表 3)。その結果、CD63 陽性 CDCP1 陽性エクソソームと強い反応性を示す抗体が複数クローン得られ、強いものから順に 3 クローン (クローン B3-2C9、B3-10F7、B3-3H2) を選択した。

2-2-2 製造処方および反応条件の最適化

ELISAに用いる抗体の組み合わせ検討に用いた反応条件について、バッファー系および血清存在下での標準曲線の希釈直線性を調べ、検出されるエクソソーム存在量がどの値まで実際のエクソソーム濃度を反映しているものか検討した。その結果、CD9/CDCP1 ELISA においては、抗 CDCP1 標識抗体がクローン B2-4C3、B3-3H2、B3-4B4 のいずれの場合でも、バッファー系では $1 \mu\text{g/mL}$ 、血清存在下では 500ng/mL まで直線性が確認された。また、CD63/CDCP1 ELISA においては、抗 CDCP1 固相抗体がクローン B3-2C9、B3-10F7、B3-3H2 のいずれの場合でも、バッファー系では $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、血清存在下で

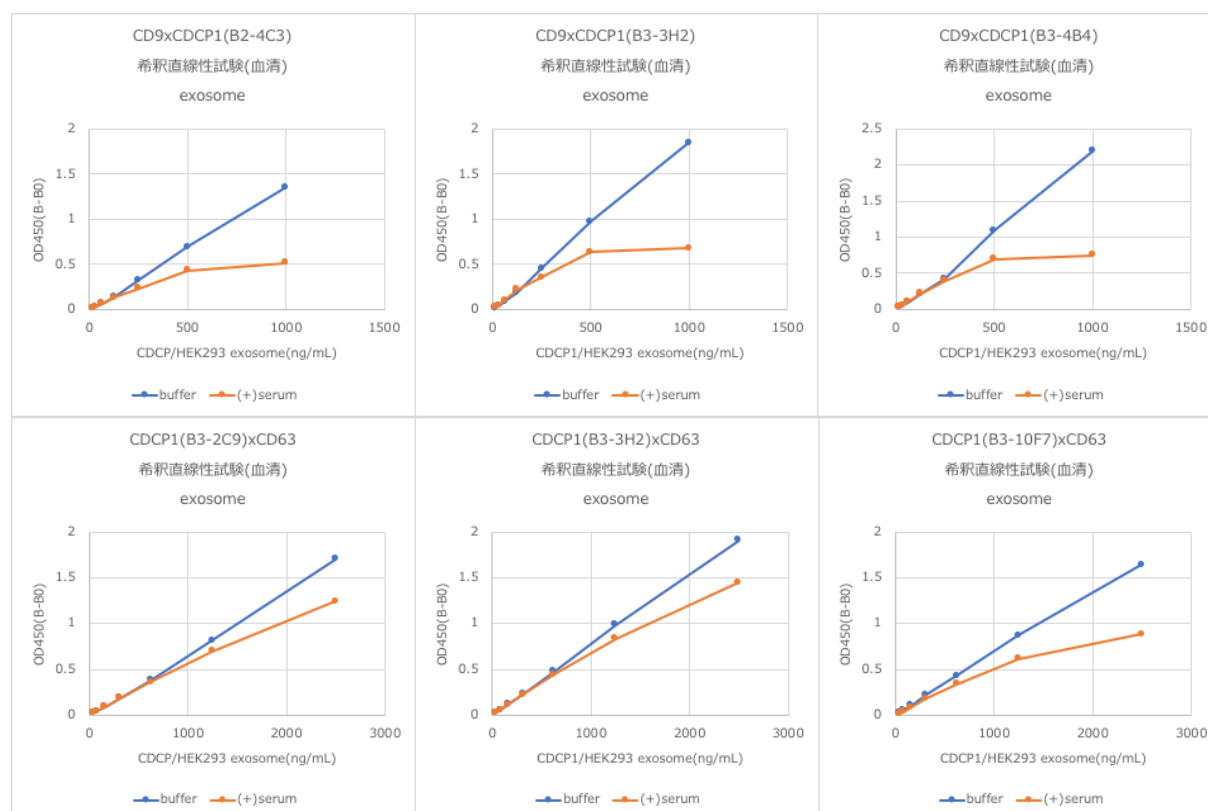


図 11 CDCP1 陽性エクソソームの希釈直線性試験

は $1.25 \mu\text{g/mL}$ まで直線性が確認された（図 11）。

次に、ヒト血清検体を測定する際に、反応液にどの量まで血清を添加しても正しい測定値が得られるかを検証するための添加回収試験を行った。その結果、CD9/CDCP1 ELISA においては、抗 CDCP1 標識抗体がいずれの場合でも、ウェルあたりの血清添加量が $25 \mu\text{L}$ までであれば概ね指標となる 70%以上の回収率が得られた。また、CD63/CDCP1 ELISA においては、抗 CDCP1 固相抗体がクローン B3-2C9、B3-3H2 では同様に $25 \mu\text{L}$ までで 70%以上の回収率であったが、クローン B3-10F7 では $10 \mu\text{L}$ までで 70%以上の回収率となった（図 12）。

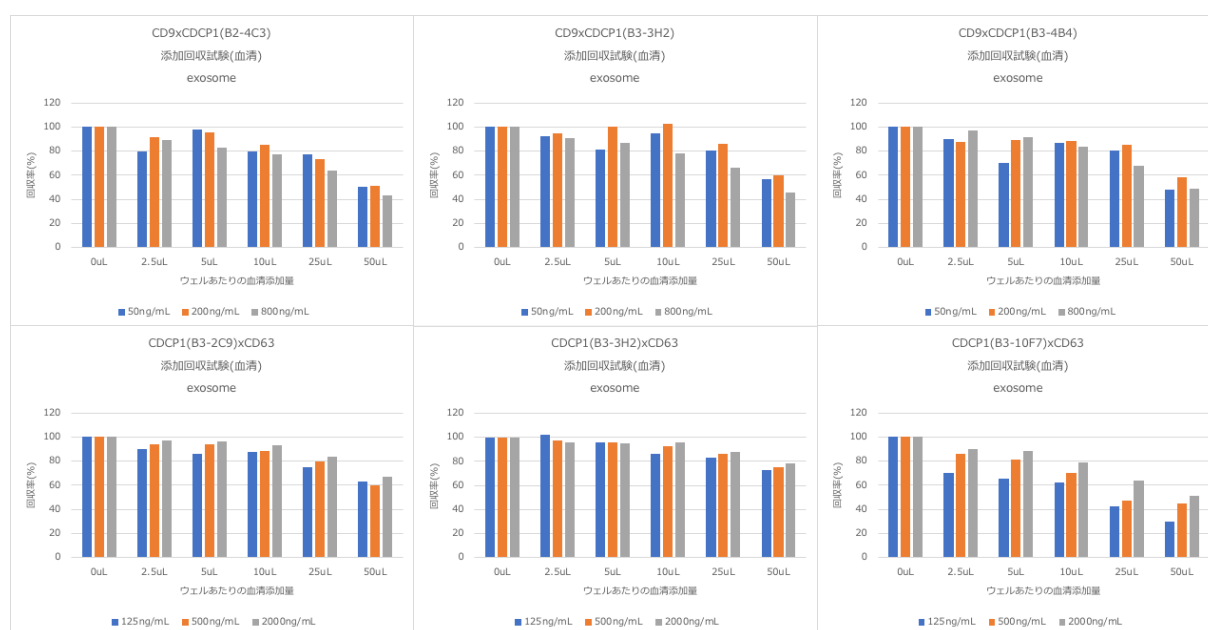


図 12 CDCP1 陽性エクソソームの添加回収試験

以上の結果より、キット試作品の構成試薬としては、別紙 1 【I-1】 構成品に記した試薬類を実験室レベルで製造することで問題はなく、また、血清検体を測定する際の血清添加量はウェルあたり $25 \mu\text{L}$ （CD63/CDCP1 におけるクローン B3-10F7 使用時のみ $10 \mu\text{L}$ ）が最適であることが判明した。

2-2-3 標準蛋白の調製

CD9/CDCP1 ELISA あるいは CD63/CDCP1 ELISA において、測定の都度検量線を作成するための標準物質として、使用する抗体のエピトープとなるポリペプチドを接続した融合蛋白質を合成する。いずれも Expi293 細胞株で発現・精製するための発現ベクターを構築した。ヒト CD9 あるいは CD63 蛋白の細胞外ドメイン（2つのうち大きい方）、すなわち CD9 の His113~Ile195 あるいは CD63 の Gly104~Asn202 を CDCP1 蛋白の細胞外領域の C 末端側に接続し、さらにその C 末端側にヒスチジン・タグを接続した形の cDNA を発現ベクター pD603 に組込んだ。これらのプラスミドを Expi293 細胞にトランスフェクトし、7日後の培養液を回収して GE ヘルスケア社



図 13 測定キット試作品

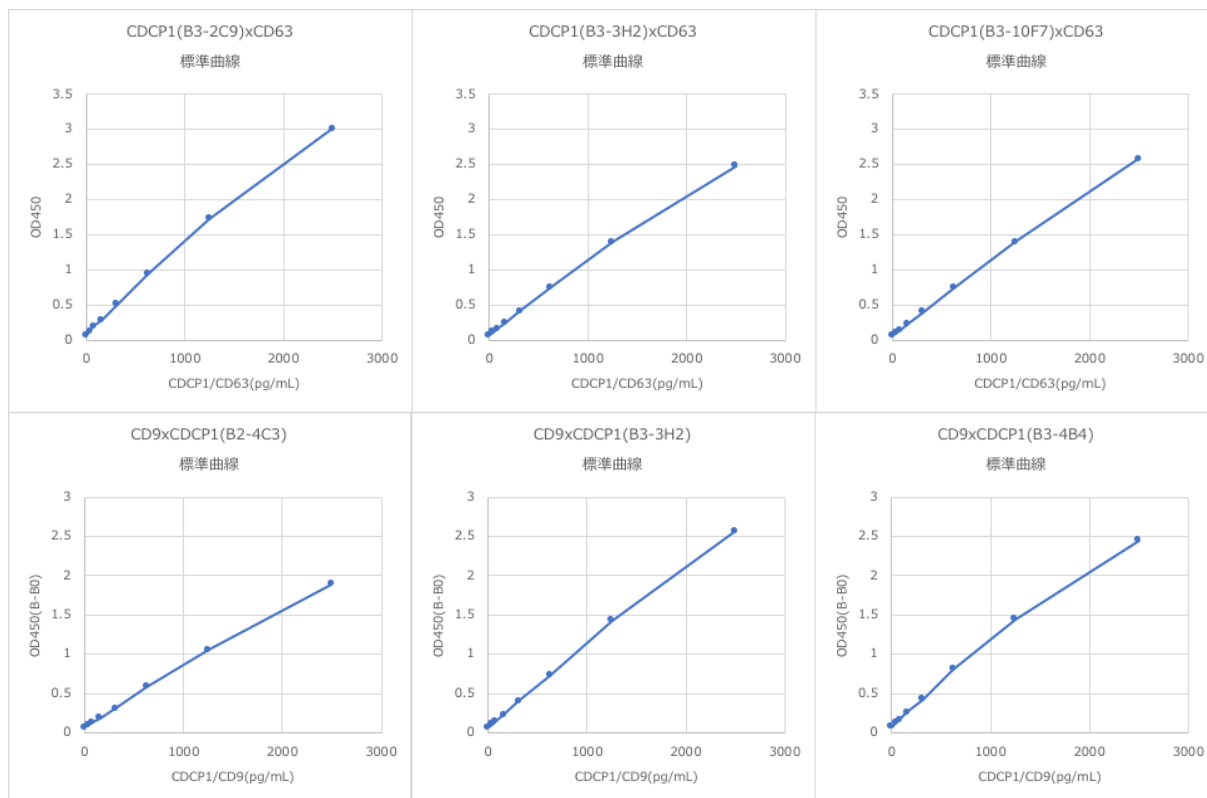


図 14 標準蛋白（融合蛋白）による標準曲線

製 His-Mag Sepharose excel を用いて各融合蛋白質を抽出し、透析操作を経て PBS に溶解させた。最終的な精製蛋白の収量は CD9/CDCP1 融合蛋白が培養液 25mL から 3mg、CD63/CDCP1 融合蛋白も培養液 25mL から 3mg であった。

2-2-4 測定キットの試作と提供

以上の検討より決定したキット構成試薬と試験方法に基づき、測定キット試作品（図 13）および別紙 1 に示す添付文書（CD9/CDCP1 ELISA 用）を作成した。CD9/CDCP1 ELISA あるいは CD63/CDCP1 ELISA における標準蛋白（CD9 あるいは CD63 と CDCP1 との融合蛋白）を用いた標準曲線は図 14 のようになった。

2-3 臨床検体を用いた CDCP1 陽性エクソソーム測定

2-3-1 臨床検体の収集

臨床検体としては、健常者 10 例、骨転移なし前立腺がん患者 10 例、骨転移あり前立腺がん患者 10 例について、年齢、性別、ステージ、既往歴、合併症などの臨床情報を確認して選択した（別紙 2）。これらのドナーによる血清検体各 1 mL を収集し、-80℃で保管した。

2-3-2 測定キットを用いた臨床検体の測定

CD9/CDCP1 ELISA および CD63/CDCP1 ELISA キットの試作品を用いて、臨床検体 30 例の測定を実施した。CD9/CDCP1 ELISA においては、標識抗体として 3 つの抗 CDCP1 抗体（クローン B2-4C3、B3-3H2、B3-4B4）を用い、CD63/CDCP1 ELISA においては、固相抗体として 3 つの抗 CDCP1 抗体（クローン B3-2C9、B3-10F7、B3-3H2）を用いた。測定操作は別紙 1 に示すプロトコールに従って実施した。各抗体の組み合わせにおける測定結果を図 15 および 16 に示す。

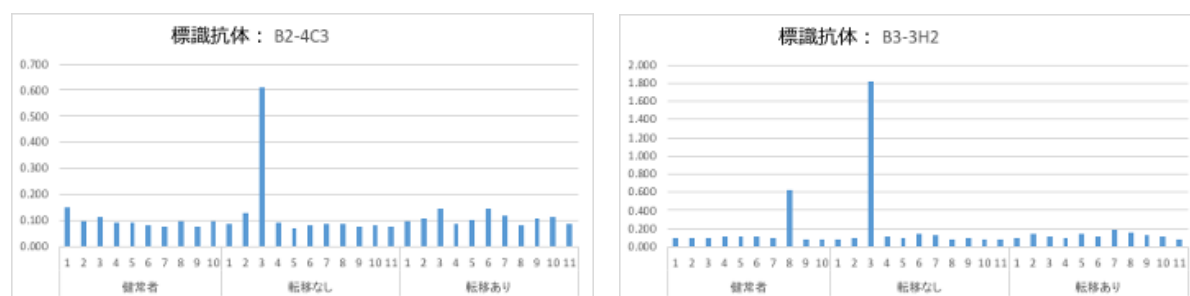




図 15 CD9/CD63 ELISA による測定結果

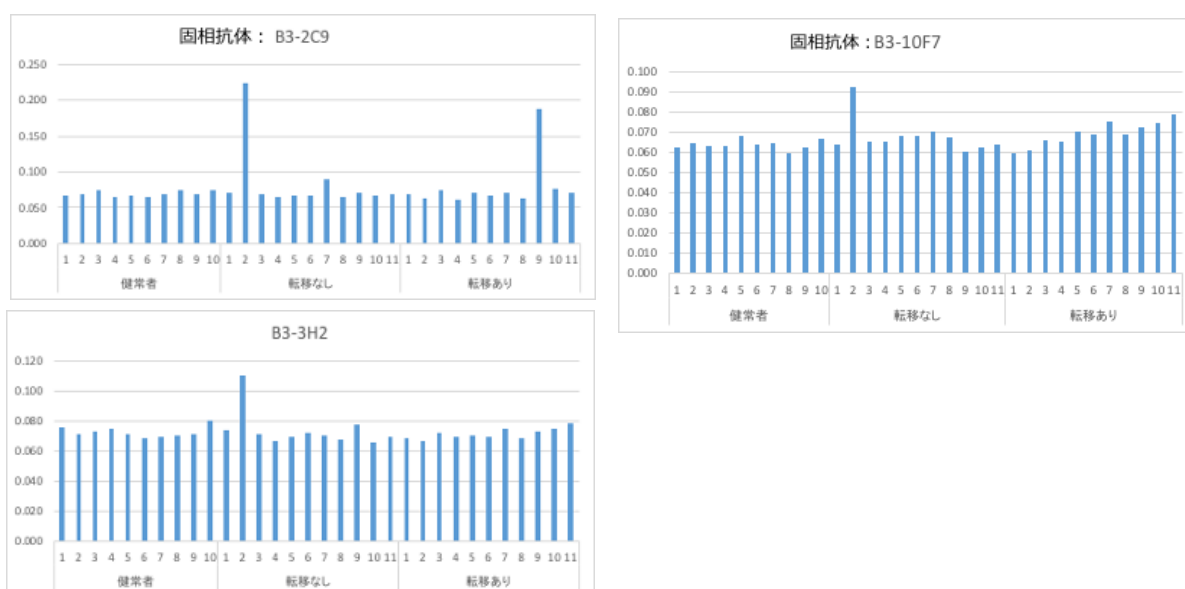


図 16 CD63/CD63 ELISA による測定結果

2-3-3 データ解析と臨床的意義の検討

CD9/CD63 ELISA においては、標識抗体をクローン B2-4C3 の場合に転移なし群のサンプル No.3、あるいはクローン B3-3H2 の場合に健常者群の No.8 と転移なし群の NO.3 においてのみ有意なシグナルが検出され、他のサンプルはバックグラウンド・レベルであった。標識抗体をクローン B3-4B4 とした場合にも有意な群間差は認められなかった。

CD63/CD63 ELISA においては、固相抗体をいずれの抗体にした場合でも転移なし群のサンプル No.2 のみが有意なシグナルを示した。他には固相抗体をクローン B3-2C9 にした場合に転移あり群のサンプル No.9 が有意なシグナルを示したが、それ以外はすべてバックグラウンド・レベルの測定値であった。これらの測定結果から、臨床検体を直接 ELISA 試作品で測定することからは臨床的に意義のあるデータは残念ながら得られないことが明らかとなった。

最終章 全体総括

（１）複数年の研究開発成果

２年間の事業において、以下の成果が得られた。

- ・ ヒト CDCP1 発現ベクターを構築した。
- ・ 動物細胞で発現・精製してヒト CDCP1 蛋白を得た。
- ・ 抗ヒト CDCP1 モノクローナル抗体 22 クローンを得た。
- ・ CDCP1 陽性エクソソーム検出用サンドイッチ ELISA を 6 キット作成した。
- ・ 作成したキットはすべて期待通りのスペックを満たしており、試作品とした。
- ・ ELISA 試作品ではヒト検体中の CDCP1 陽性エクソソームを検出できなかった。

作成した ELISA 試作品は当初想定した要求仕様を満たすものであったが、実際のヒト臨床検体中の CDCP1 陽性エクソソーム量は、試作品の検出限界以下であり、そのままでは試作品の臨床上の有用性を判断することはできなかった。

（２）研究開発後の課題・事業化展開

標準曲線を見る限り、ELISA 試作品のスペックは測定系としては決して悪いものではなく、改良によって大幅に高感度化することはあまり期待できない。むしろ測定の前処理として検体中の微量エクソソームを濃縮する技術の開発が望まれる。サポイン事業完了後、我々はすでにその開発を開始している。すなわち、抗 CD9 あるいは抗 CD63 抗体を固相した磁性ビーズを用いてサンプル中のエクソソームを回収・濃縮し、その中から CDCP1 陽性エクソソームを検出する方法を検討している。現在、ウェスタンブロット法で確認する限り回収・濃縮には成功しており、その後の検出技術の確立を試みている。これに成功すれば、改めて臨床検体の測定を実施して臨床上の有用性を検討する計画である。臨床的意義が見出された場合には、サポイン事業の当初計画どおり診断薬の開発に向けた事業展開を実施する予定である。

別紙 1

CDCP1/CD9 Exosome ELISA Kit, Human

ヒト CDCP1 陽性エクソソーム(CD9)ELISA キット

【I-1】 構成品

保存温度：冷蔵（2～8℃）

	内容	容量	数量	危険表記および取扱上の注意
1	抗 CD9 抗体 固相化プレート (96well)	8well x 12 strips	1 枚	成分は労働安全衛生法に非該当ですが、取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体への接触を避けるよう十分に配慮してください。
2	標準タンパク質 (CDCP1/CD9 融合タンパク質)	100μL	1 本*	
3	アッセイバッファー	25mL	1 本	
4	洗浄バッファー (10 倍濃縮)	25mL	1 本	
5	HRP 標識抗 CDCP1 抗体 (500 倍濃縮)	20μL	1 本	
6	基質液	12mL	1 本	
7	停止液(2N H ₂ SO ₄)	6mL	1 本	(成分として硫酸を 9.8%含む) 労働安全衛生法 第 57 条および第 57 条の 2 に該当 危険  ・吸入すると有害（気体、蒸気、ミスト） ・重篤な皮膚の薬傷及び眼の損傷 ・重篤な眼の損傷 ・呼吸器系の障害のおそれ ・長期にわたる、又は反復ばく露による呼吸器系の障害のおそれ
8	プレートシール		2 枚	

*n=2 として、検量線 2 回分

ご準備いただくもの（その他必要なもの）

- ・マイクロピペッター(10～1000 μ L)
- ・マルチチャンネルピペッター
- ・リザーバー
- ・プレートシェーカー
- ・プレートリーダー（波長 450nm が測定可能なもの）
- ・プレートウォッシャー

【Ⅱ】試薬、サンプルの調製方法

【Ⅱ－１】洗浄バッファの調製

洗浄バッファ(10 倍濃縮)を精製水で 10 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：洗浄バッファ(10 倍濃縮)25mL に精製水 225mL を加え、混合します。

【Ⅱ－２】標準タンパク質の希釈調製（プレート 1 枚あたり 2 ウェル分ずつ調製）

	濃度(pg/mL)	標準タンパク質	アッセイ バッファ	希釈率
A	25000			
B	2500	50 μ L of A	450 μ L	10
C	1250	250 μ L of B	250 μ L	2
D	625	250 μ L of C	250 μ L	2
E	312.5	250 μ L of D	250 μ L	2
F	156.3	250 μ L of E	250 μ L	2
G	78.1	250 μ L of F	250 μ L	2
H	39.1	250 μ L of G	250 μ L	2

キットに入っている標準タンパク質（上表の A）50 μ L にアッセイバッファ450 μ L を加え（10 倍希釈）、よく混合した溶液を B とします。この B 溶液 250 μ L にアッセイバッファ250 μ L を加え（2 倍希釈）、よく混合した溶液を C とします。以下、同様に 2 倍希釈した溶液を調製し、100 μ L ずつ測

定して下さい。各濃度 $n=2$ では、 $100\mu\text{L} \times 2 = 200\mu\text{L}$ 使用します。

希釈調製した標準タンパク質(39.1~2500pg/mL)は、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-3】抗体の調製

HRP 標識抗 CDCP1 抗体(500 倍濃縮)をアッセイバッファーで 500 倍希釈します。

例) プレート 1 枚分：アッセイバッファー10mL に HRP 標識抗 CDCP1 抗体(500 倍濃縮)20 μL を加え、転倒混和します。希釈調製した HRP 標識抗 CDCP1 抗体、必要量を用時調製してください。

【Ⅱ-4】サンプル調製 (血清サンプル)

血清はアッセイバッファーを用いて 4 倍に希釈し、これをサンプルとして測定します。すなわち 1 ウェルあたりに血清を 25 μL 、アッセイバッファーを 75 μL 添加してください。

測定範囲上限(2500pg/mL)を越えたサンプルは、アッセイバッファーを用いて更に適宜希釈して測定することにより、その濃度を求めることができます。

【Ⅲ】測定方法

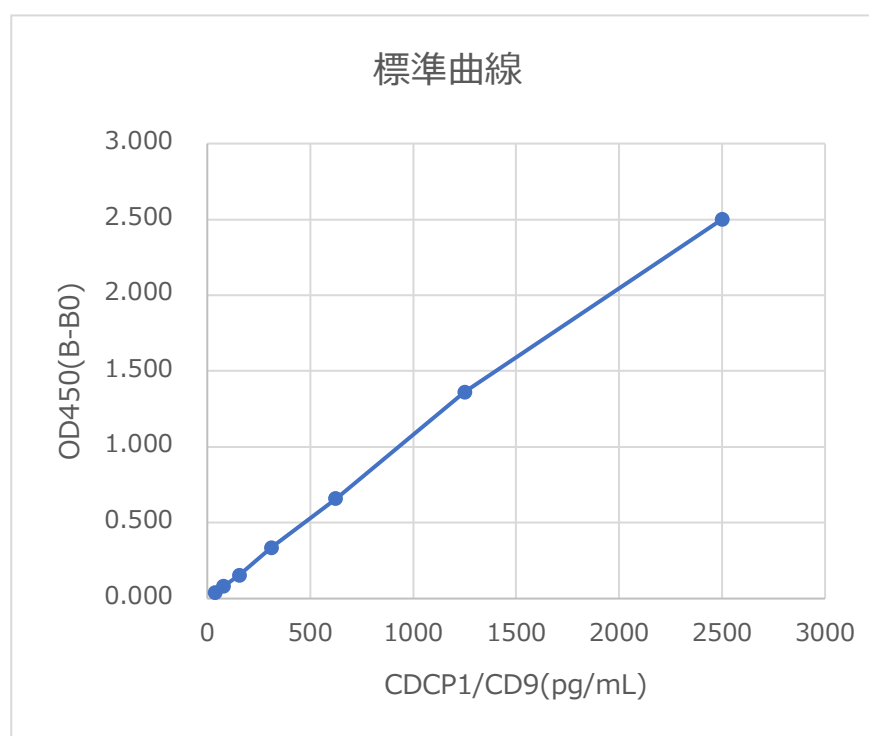
1. 抗 CD9 抗体固相化プレートと試薬を室温に戻します。
2. 標準タンパク質を希釈調製します (【Ⅱ-2】)。
3. 2 で希釈調製した標準タンパク質 (39.1~2500pg/mL)もしくはサンプル溶液を 1 ウェルあたり 100 μL ずつプレートへ加えます。
4. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
5. 室温で 1 時間攪拌(800rpm)して反応します。
6. 溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 μL の洗浄バッファー (【Ⅱ-1】)を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。
7. 希釈調製した HRP 標識抗 CDCP1 抗体 (【Ⅱ-3】)を各ウェルに 100 μL ずつ加えます。
8. プレートにシールし、プレートシェーカーで攪拌(800rpm, 30 秒)します。
9. 室温で 1 時間攪拌(800rpm)して反応します。
10. 抗体溶液を完全に除去し、各ウェルに 300 μL の洗浄バッファー (【Ⅱ-1】)を加え、洗浄します。この操作を 3 回行って下さい。

11. 基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温で 20 分間静置反応します。
12. 発色の濃度を确认后、各ウェルに 50 μ L ずつ停止液を加えます。
13. プレートリーダーにて各ウェルの吸光度を測定します（測定波長：450nm）。
14. 横軸に標準タンパク質濃度、縦軸に吸光度を取り、標準曲線を描きます。
15. サンプル溶液から得られた吸光度を標準曲線に対応させ、標準タンパク質（CDCP1/CD9 融合タンパク質(pg/mL)）相当量としてサンプル溶液中の CDCP1 陽性エクソソーム濃度(Unit/mL)を算出し、希釈倍数を乗じます。

【IV】 測定例

【IV-1】 標準曲線

一例（検出抗体：B3-3H2）として、CDCP1/CD9 融合タンパク質の標準タンパク質に対する吸光度(OD450)をグラフに描くと図 1 のようになります。ただし、アッセイ毎に新たな標準曲線を描いて、サンプル中の濃度を算出してください。



（各標準タンパク質濃度の吸光度からブランク吸光度を差し引いた値をプロットしています）

標準タンパク質 (pg/mL)	吸光度(450nm)		平均吸光度
	1	2	
0	0.070	0.068	0.069
39.1	0.116	0.099	0.108
78.1	0.151	0.146	0.149
156.3	0.224	0.222	0.223
312.5	0.410	0.399	0.405
625	0.684	0.771	0.728
1250	1.400	1.460	1.430
2500	2.582	2.539	2.544

図1 CDCP1/CD9 融合タンパク質の標準タンパク質による標準曲線およびサンプル測定

健康者検体のリスト

	Case ID	Clinical site ID	Date of sample collection	Age at the time of sample collection	Gender	Diagnosis	Treatment history	Concomitant diseases	Smoking status	Alcohol consumption status	Height, cm	Weight, kg	BMI	HIV, HBV, HCV testing results
1	CIDp780001818	46	16-Jan-19	64	Male	Healthy control	No	No	No	No	171	75	25.7	Negative
2	CIDp780001819	46	15-Jan-19	68	Male	Healthy control	No	No	Yes	No	168	74	26.2	Negative
3	CIDp780001820	46	16-Jan-19	65	Male	Healthy control	No	No	No	No	173	70	23.4	Negative
4	CIDp780001821	46	16-Jan-19	61	Male	Healthy control	No	No	No	No	175	68	22.4	Negative
5	CIDp780001822	46	17-Jan-19	66	Male	Healthy control	No	No	Yes	No	178	86	27.1	Negative
6	CIDp780001823	46	17-Jan-19	67	Male	Healthy control	No	No	No	No	168	74	26.3	Negative
7	CIDp780001824	46	17-Jan-19	66	Male	Healthy control	No	No	No	No	176	79	25.5	Negative
8	CIDp780001825	46	17-Jan-19	62	Male	Healthy control	No	No	Yes	Yes	175	82	26.8	Negative
9	CIDp780001826	46	17-Jan-19	72	Male	Healthy control	No	No	No	No	169	70	24.5	Negative
10	CIDp780001827	46	17-Jan-19	66	Male	Healthy control	No	No	Yes	No	174	78	25.8	Negative

前立腺がん患者検体（骨転移なし）のリスト

#	Case ID	Clinical site ID	Date of sample collection	Age at the time of sample collection	Gender	Diagnosis	Date of prostate cancer diagnosis	Type of prostate cancer diagnosis (Histological Description)	T	N	M	Stage	Gleason score	Treatment history	Concomitant diseases	Smoking status	Alcohol consumption status	Height, cm	Weight, kg	BMI	HIV/HSV, HCV testing results
1	C/Dp780001713	36	16-Jan-19	65	Male	Prostate cancer	2018	Adenocarcinoma	3	0	0	II	6	Transrectal multifocal prostate biopsy (21-Dec-18), bilateral orchiectomy (28-Jan-19)	Chronic prostatitis, essential hypertension II, ischemic heart disease	Smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
2	C/Dp780001714	36	16-Jan-19	75	Male	Prostate cancer	2018	Adenocarcinoma	2	0	0	II	6	Transrectal multifocal prostate biopsy (12-Oct-18)	Chronic prostatitis, essential hypertension II, chronic pyelonephritis, peptic ulcer disease	Non-smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
3	C/Dp780001729	36	17-Jan-19	62	Male	Prostate cancer	2017	Adenocarcinoma	2	0	0	II	6	Transrectal multifocal prostate biopsy (05-Jul-17), Course of External beam radiation (01-Nov-17-26-Dec-17)	Peptic ulcer disease, chronic gastritis, chronic pyelonephritis	Smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
4	C/Dp780001855	36	23-Jan-19	53	Male	Prostate cancer	2017	Adenocarcinoma	3	0	0	II	10	Transrectal multifocal prostate biopsy (09-Feb-17), Course of External beam radiation (30-May-17-26-Jul-17)	Chronic gastritis	Non-smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
5	C/Dp780001922	36	25-Jan-19	61	Male	Prostate cancer	2016	Adenocarcinoma	3	1	0	III	7	Transrectal multifocal prostate biopsy (30-Mar-16), brachytherapy (April 2016)	Chronic gastritis, varicose vein disease, essential hypertension II, COPD	Smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
6	C/Dp780001937	36	28-Jan-19	68	Male	Prostate cancer	2017	Adenocarcinoma	2	0	0	II	6	Transrectal multifocal prostate biopsy (15-Dec-16), Course of External beam radiation (14-Aug-17-09-Oct-17), Zoladex	Combined hemorrhoid, atherosclerotic cardiovascular disease, essential hypertension II	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
7	C/Dp780001957	36	30-Jan-19	68	Male	Prostate cancer	2017	Adenocarcinoma	3	1	0	III	7	Radical prostatectomy (30-Jan-18)	Essential hypertension II, peptic ulcer disease	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
8	C/Dp780001980	36	31-Jan-19	70	Male	Prostate cancer	2018	Adenocarcinoma	2	0	0	II	6	Transrectal multifocal prostate biopsy (29-Oct-18)	Essential hypertension II, chronic pyelonephritis, peptic ulcer disease, chronic hemorrhoid	N/A	N/A	173	73	N/A	Negative
9	C/Dp780001996	36	01-Feb-19	60	Male	Prostate cancer	2017	Adenocarcinoma	1	1	0	II	8	Hormonotherapy Eufjord 45 mg, transrectal multifocal prostate biopsy	Chronic cholecystitis, essential hypertension II, hepatomegaly	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
10	C/Dp780002044	36	06-Feb-19	80	Male	Prostate cancer	2018	Adenocarcinoma	3	0	0	II	7	Transrectal multifocal prostate biopsy (10-May-18)	Chronic prostatitis	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative

前立腺がん患者検体（骨転移あり）のリスト

#	Case ID	Clinical site ID	Date of sample collection	Age at the time of sample collection	Gender	Diagnosis	Date of prostate cancer diagnosis	Type of prostate cancer diagnosis (Histological Description)	T	N	M	Stage	Gleason score	Metastases location	Treatment history	Concomitant diseases	Smoking status	Alcohol consumption status	Height, cm	Weight, kg	BMI	HIV/ABV, HCV testing results
1	CIDp780001728	36	17-Jan-19	63	Male	Prostate cancer	December 2018	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	9	Bones	Transrectal multifocal prostate biopsy (09-Jan-19) bilateral orchiectomy (28-Jan-19)	Essential hypertension II, degenerative dystrophic disk disease	Non-smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
2	CIDp780001884	36	23-Jan-19	71	Male	Prostate cancer	April 2018	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	8	Bones	Bilateral orchiectomy (13-Jan-18), transrectal multifocal prostate biopsy (20-Apr-18), Course of External beam radiation (20-Jan-18-26-Jul-18)	Essential hypertension II, ischaemic heart disease, atherosclerotic cardiovascularitis, angior pectoris, chronic heart failure, chronic pyelonephritis	Non-smoker	N/A	172	76	25.69	Negative
3	CIDp780001945	36	30-Jan-19	70	Male	Prostate cancer	December 2018	Adenocarcinoma	4	1	1	IV	8	Bones	Transrectal multifocal prostate biopsy (28-Dec-18)	Essential hypertension II, ischaemic heart disease, atherosclerotic cardiovascularitis, chronic heart failure	Non-smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
4	CIDp780001966	36	30-Jan-19	60	Male	Prostate cancer	January 2019	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	8	Bones	Transrectal multifocal prostate biopsy (22-Jan-19)	Essential hypertension II, chronic bronchitis, chronic gastritis	Smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
5	CIDp780002006	36	04-Feb-19	78	Male	Prostate cancer	2014	Adenocarcinoma	2	0	1	IV	8	Bones	Bilateral orchiectomy, Course of External beam radiation (22-Sep-14-05-Nov-14)	Essential hypertension II, ischaemic heart disease, COPD, chronic bronchitis, chronic gastritis	Smoker	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
6	CIDp520002216	30	07-Feb-19	68	Male	Prostate cancer	19-Feb-13	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	7	Bones	Androgen hormoneotherapy, Biphosphonate therapy, Palliative chemotherapy, Mastinib.	Essential hypertension II, ischaemic heart disease	Non-smoker	No	176	52	16.79	Negative
7	CIDp780001678	15	11-Feb-19	65	Male	Prostate cancer	2016	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	8	Bones	Transrectal multifocal prostate biopsy (20-Jan-17)	Essential hypertension II	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative
8	CIDp520002226	30	14-Feb-19	69	Male	Prostate cancer	26-Aug-16	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	7	Bones	Androgen hormoneotherapy, Biphosphonate therapy, Palliative chemotherapy.	Essential hypertension II, ischaemic heart disease	Smoker	No	172	50	16.90	Negative
9	CIDp520002227	30	14-Feb-19	72	Male	Prostate cancer	26-Nov-17	Adenocarcinoma	3	1	1	IV	7	Bones	Androgen hormoneotherapy, Biphosphonate therapy, Palliative chemotherapy.	Essential hypertension II	Non-smoker	No	170	46	15.90	Negative
10	CIDp780002411	36	05-Mar-19	53	Male	Prostate cancer	23-Apr-18	Adenocarcinoma	4	1	1	IV	8	Bones	Transrectal multifocal prostate biopsy (11-May-18), hormoneotherapy	No	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative

【公開版】