

20031407

厚生労働科学研究研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発 (H15-がん予防-09)

平成15年度 統括・分担研究報告書

主任研究者 山田 哲司
平成16 (2004) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発 (H15-がん予防-09) ----- 1
山田哲司

II. 分担研究報告

1. モノクローナル抗体とトランスクリプトーム解析を用いた腫瘍マーカーの開発 ----- 14
山田哲司
2. 消化器系がんの腫瘍マーカーの開発 ----- 20
前川真人
3. 糖鎖遺伝子をターゲットとした分子診断法の開発 ----- 27
中山 淳
4. ペプチド性腫瘍マーカーの開発 ----- 32
佐々木一樹
5. プロテオーム解析を用いた腫瘍マーカーの開発、ペプチド性腫瘍マーカーの開発 ----- 36
近藤 格

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 46

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）

統括研究報告書

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

主任研究者 山田哲司 国立がんセンター研究所
・化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト

研究要旨

ProteinChip システムを用い、がん患者に固有に見られるタンパク質の発現パターンを検索するための基礎的検討が終了した。次年度には約100例の膀胱がん患者の血漿を用いた解析を開始している。GeneChip システムを用い、膀胱特異的に発現する分子を検索してきた。さらにバイオインフォマティクスの手法を用いて、分泌される可能性のある分子を選定し、腫瘍マーカーとしての有用性を検討する計画である。Actinin-4 の splice variant は肺小細胞がんの特異性が高く、正常組織では精巣に発現が限られ、所謂 cancer-testis antigen の範疇に含まれる。特異性の高い腫瘍マーカーであるとともに、免疫療法の標的となるものと考えられた。ミトコンドリア DNA のメチル化は、種々の癌細胞において低頻度であり、腫瘍マーカーとすることは困難であることが判明した。CKB 遺伝子のスプライシングバリエーションは正常組織にも認められたが、その存在とプロモーターのメチル化に興味深い関連性を見いだした。固形がんの患者血清中にヘッジホッグカスケードの遺伝子発現が認められた。膀胱癌患者の末梢血有核細胞から抽出した全 RNA を対象に、膀胱癌細胞で発現している糖転移酵素、 $\alpha 1, 4-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素 ($\alpha 4GnT$) の発現量を real-time RT-PCR 法にて定量した。 $\alpha 4GnT$ mRNA は膀胱癌、慢性膀胱炎、健常人のそれぞれ 80%、40%、14.2% に陽性であり、さらにその発現量は膀胱癌で慢性膀胱炎や健常人に比べて有意に高値であったことから、膀胱癌のスクリーニングにおける本アッセイ法の有用性が示された。

A. 研究目的

前立腺がんにおける PSA (prostate-

specific antigen) の様にスクリーニングに有用であることが確立された腫瘍マ

一カーが少数ではあるが発見されており、また SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) を応用した ProteinChip法では、100%の検出率と94%の特異性をもって早期症例を含む卵巣がん患者を血清診断にて特定できたとの報告がなされている。一方バイオインフォマティクスの技術が進歩し、一見特異性のない様に思われる検査データからも、統計解析を行う事で診断に応用できる情報を選別できる可能性がでてきた。本研究班では近年急速に進歩したトランスクリプトームやプロテオーム等のバイオテクノロジーの先端技術を応用し、従来の概念とは全く異なる腫瘍マーカーを開発し、肺がん、スキルス胃がん、膵がん等の難治がんの早期発見による克服を目的とする。

B. 研究方法

下記の1-6の方法にて難治がんを中心にがん罹患者に特有な流血中や尿中等の核酸・蛋白質・ペプチドを同定し、がんの早期発見に適した検出方法を確立する。

1. ProteinChip法によるペプチドと低分子タンパク質のプロフィール解析
2. ランスクリプトームとプロテオーム解析による腫瘍あるいは臓器特異的な分子の同定
3. ボット化された大規模なスクリー

ニングによるがん関連抗原に対するモノクローナル抗体の作製

4. がん細胞特異的な糖転移酵素遺伝子発現解析
5. がん特有の遺伝子 alternative splicingの検出
6. メチル化 DNA やミトコンドリア DNA 異常の検出

C. 研究結果

1. ProteinChip法によるペプチドと低分子タンパク質のプロフィール解析

Ciphergen社のProteinChipシステムで再現性よくかつ網羅的にペプチドと低分子タンパク質のプロフィール解析する方法の標準化を終了した。膵癌細胞に特異的な分泌ペプチドを同定する前段階として、膵癌培養細胞株が細胞外に放出する微量ペプチドを網羅的に探索・同定する方法を確立し、452種類のペプチドを同定した。

2. トランスクリプトームとプロテオーム解析による腫瘍あるいは臓器特異的な分子の同定

膵、卵巣、胃がんの診断に有用なそれぞれに特有な臓器特異マーカーを同定するために、Affymetrix社のGeneChipシステムを用いた膵がん株6種、卵巣がん株4種、胃がん株7種を含む細胞株34種と全身の正常臓器の遺伝子発現解析が終了した。蛍光二次元電気泳動法でタンパク質の発現プロファイルを作成し、その情

報を多変量解析・機械学習法の手法で調べることにより、臓器または組織特異的なタンパク質の発現パターンが存在する事を発見した。また、パターンを構築するタンパク質を質量分析器を用いて同定した。

3. ロボット化された大規模なスクリーニングによるがん関連抗原に対するモノクローナル抗体の作製 膀胱がん患者血清と高率に反応する新しい8種の新規モノクローナル抗体を選択した。膀胱がん患者98例、健常人41例の血清を用い、カットオフ値を3SDとした評価では8種の抗体を組み合わせたアッセイでは74.4%、健常人9.7%が陽性を示した。

4. がん細胞特異的な糖転移酵素遺伝子発現解析
糖転移酵素、 α 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (α 4GnT) を対象とした real-time RT-PCR法が膀胱癌のスクリーニングに有用であることが示された。

5. がん特有の遺伝子 alternative splicing の検出
難治性が高い肺小細胞がんには actin 細胞骨格の異常が認められ、actin 細胞骨格結合タンパク質 actinin-4 の actin 結合ドメインにアミノ酸3個の変化をともなう alternative splicing が特異的に認められる事を見出した。CKB の新しいスプライシングバリエーション (エクソン6をスキップ) を見いだした。それはいくつかのがん細胞株で比較的強く発現していた。

しかし、精巣、卵巣、膵臓などの正常組織にも発現していた。従って、このスプライシングバリエーション自体はがんのマーカーとはなりにくい。しかし、プロモーター領域のメチル化とスプライシングバリエーションの出現に一定の関係を認めた。

6. メチル化 DNA やミトコンドリア DNA 異常の検出

がん細胞株、胃がん/大腸がん組織から抽出した DNA を試料としてミトコンドリア DNA のメチル化を調べたところ、2種類の胃癌組織を除いた胃癌組織、全ての癌細胞株・大腸癌組織でメチル化は認められなかった。メチル化と考えられた2種類の胃癌組織においても軽い部分的なメチル化が疑われたのみであった。

ヘッジホッグカスケードの遺伝子について検討した結果、PTCH1, GLI1, SMO いずれも白血病細胞株、脳腫瘍細胞株の全てで発現していた。しかし、胃がん、膀胱がん、大腸がんの細胞株では PTCH1 は大部分の細胞で発現していたが、GLI1 と SMO は発現がなかった。5-aza dC 添加による影響は YPK2 (膀胱がん細胞株) 1種で PTCH1 の発現の沈黙化という影響がみられたのみであった。

がん患者の血液 (全血、血漿、血清) を用いて、RT-PCR でこれら遺伝子の発現をみたところ、乳がん、結腸がん、膀胱がんの患者の血清/血漿で増幅バンドが検出された。再現性、発現由来細胞など方法論の確認を含め、さらに検

討している。

D. 考察

膵がんは進行して発見された場合著しく予後が不良であり、早期発見の効果的な戦略が重要である。治癒率を向上させるためには、より検出率を向上させる必要がある。正常ヒト組織と培養細胞の遺伝子発現解析結果を統計学的に処理し、腫瘍特異的あるいは PSA (prostate-specific antigen) の様な臓器特異的に発現する分子を同定する。さらにバイオインフォマティクスの手法を用いて、分泌される可能性のある分子を選定する計画である。がん患者と対象者の血漿を用い、プロテインチップ法にてがん患者に固有に見られるタンパク質の発現パターンを同定する。現在約100例の膵がん患者の血漿を用いた解析を開始している。Actinin-4 の splice variant は肺小細胞がんの特異性が高く、正常組織では精巣に発現に限られ、所謂 cancer-testis antigen の範疇に含まれる。特異性の高い腫瘍マーカーであるとともに、免疫療法の標的となるものと考えられた。

E. 結論

進行がんの治療は現在利用可能な医療技術では困難な場合が多く、高感度な検出方法を用いて微少のがんを発見

し、早期に治療を開始する以外には予後の改善に大きな期待がもてないのが現状である。そのため多数の被験者からがん罹患者を効率良く、かつ血液などを用いて非侵襲的にスクリーニング出来るがん検診技術の開発が国民から強く要望されている。国立がんセンターでは平成16年2月よりがん予防・検診研究センターが開設され、既存のがん検診方法を検証し、新しいがん検診技術を開発する事が責務となっている。Ciphergen 社のプロテインチップシステムと Correlogic 社が開発したアルゴリズムを用いた多変量解析を用い、米国 NCI と FDA の共同で行われている Clinical Proteomics Project は治癒可能性の高い Stage I の早期症例を含め、100%に近い正診率で卵巣癌が診断できたと報告しているが、国内では少数例を用いた散発的な研究しか行われていなかった。今後は大規模な検証を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda J, Yokoo H, Yamada T, Kitabayashi I, Sekiya T, Ichikawa H. Nemo-like kinase suppresses a wide range of

- transcription factors, including nuclear factor-kappaB. *Cancer Sci.* 95(1):52-57, 2004.
- 2) Honda K, Yamada T, Seike M, Hayashida Y, Idogawa M, Kondo T, Ino Y, Hirohashi S. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene*. Epub. 2004.
 - 3) Liu QY, Lei JX, LeBlanc J, Sodja C, Ly D, Charlebois C, Walker PR, Yamada T, Hirohashi S, Sikorska M. Regulation of DNaseY activity by actinin-alpha4 during apoptosis. *Cell Death Differ.* Epub. 2004.
 - 4) Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T, Hirohashi S. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics.* 3(9):1758-1766, 2003.
 - 5) Seike M, Kondo T, Mori Y, Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized beta-catenin. *Cancer Res.* 63(15):4641-4647, 2003.
 - 6) Yasuda J, Tsuchiya A, Yamada T, Sakamoto M, Sekiya T, Hirohashi S. Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 308(2):227-233, 2003.
 - 7) Terasaki H, Niki T, Matsuno Y, Yamada T, Maeshima A, Asamura H, Hayabuchi N, Hirohashi S. Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol.* 27(7):937-951, 2003.
 - 8) Yoshimura A, Gemma A, Hosoya Y, Komaki E, Hosomi Y, Okano T, Takenaka K, Matuda K, Seike M, Uematsu K, Hibino S, Shibuya M, Yamada T, Hirohashi S, Kudoh S. Increased expression of the LGALS3 (galectin 3) gene in human non-small-cell lung

- cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 37(2):159-164, 2003.
- 9) Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2(2):147-156, 2004.
- 10) Ishikawa J, Fujita K, Kanno T, Maekawa M. Lactate dehydrogenase (LD) extra isoenzyme electrophoretic band between LD1 and LD2 caused by a complex with α 1-lipoprotein. A case report. *Clin Chem Lab Med*. 42: 102-104, 2004.
- 11) Takeshita A, Uehara A, Shinjo K, Naito K, Sahara N, Yamazaki K, Katoh H, Kamikawa T, Ohnishi K, Maekawa M, Hayashi H, Ohno R. Impairment of heart rate variability control during arsenic trioxide treatment for acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 18(3):647-648, 2004.
- 12) Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J, Sugimura H, Sugano K, Kanno T: Promoter hypermethylation in cancer silences LDHB, eliminating lactate dehydrogenase isoenzymes 1-4. *Clin Chem*. 49: 1518-1520, 2003.
- 13) Liu ZJ, Maekawa M, Horii T, Morita M. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ER α gene in tumor cell lines. *Life Sci*. 73: 1963-1972, 2003.
- 14) Liu ZJ, Maekawa M. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. *Anal Biochem*. 317: 259-265, 2003.
- 15) Liu J, Peng WC, Yang X, Huang JF, Zhang XB, Zhang Y, Maekawa M. Relative mRNA expression of the lactate dehydrogenase A and B subunits as determined by simultaneous amplification and single strand conformation polymorphism. Relation with subunit enzyme activity. *J Chromatogr B*. 793: 405-412,

- 2003.
- 16) Hiraoka N, Kawashima H, Petryniak B, Nakayama J, Mitoma J, Marth JD, Lowe JB, Fukuda M. Core 2 branching β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and heparan sulfate sulfotransferase collaboratively control lymphocyte homing. *J Biol Chem.* 279:3058-3067, 2004.
 - 17) Shimizu F, Nakayama J, Ishizone S, Zhang MX, Kawakubo M, Ota H, Sugiyama A, Kawasaki S, Fukuda M, Katsuyama T: Usefulness of the real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay targeted to α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase for the detection of gastric cancer. *Lab Invest.* 83:187-197, 2003.
 - 18) Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato T-A, Nakayama J. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem.* 51:567-573, 2003.
 - 19) Nakajima K, Ota H, Zhang MX, Sano K, Honda T, Ishii K, Nakayama J. Expression of gastric gland mucous cell-type mucin in normal and neoplastic human tissues. *J Histochem Cytochem.* 51:1689-1698, 2003.
 - 20) Nakayama J, Aoki D, Suga T, Akama TO, Ishizone S, Yamaguchi H, Imakawa K, Nadano D, Fazleabas A T, Katsuyama T, Nozawa S, Fukuda MN. Implantation-dependent expression of trophoblast integrin by maternal Fallopian tube epithelia during tubal pregnancies: Possible role of human chorionic gonadotrophin on ectopic pregnancy. *Am J Pathol.* 163:2211-2219, 2003.
 - 21) Suzuki M, Angata K, Nakayama J, Fukuda M. Polysialic acid and mucin-type O-glycans on the neural cell adhesion molecule (NCAM) differentially regulate myoblast fusion. *J Biol Chem.* 278:49459-49468, 2003.

- 22) Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, Nakayama J, Levy B, Grubb JH, Gutierrez MA, Shim S, Yamaguchi S, Nishioka T, Montano A, Noguchi A, Orii T, Kondo N, Sly WS. Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns^{-/-}) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Hum Mol Genet.* 12:3349-3358, 2003.
- 23) Yamaguchi Y, Imai Y, Izutsu K, Asai T, Ichikawa M, Yamamoto G, Nitta E, Yamagata T, Sasaki K, Mitani K, Ogawa S, Chiba S, Hirai H, Kurokawa M. AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J Biol Chem.* 279:15630-15638, 2004.
- 24) Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T, Hirohashi S. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics.* 3:1758-1766, 2003.
- 25) Seike M, Kondo T, Mori Y, Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized beta-catenin. *Cancer Res.* 65:4641-4647, 2003.
- 26) 前川真人. イムノアッセイの測定原理とその特徴. *臨床検査.* 47 (13): 1611-1618. 2003.
- 27) 前川真人. 遺伝子検査をとりまく環境と現状・将来. *日本臨床検査自動化学会会誌.* 28 (5): 613-618. 2003.
- 28) 前川真人, 谷口照美, 立林千夏, 堀井俊伸, 竹下明裕, 梶村春彦, 菅野康吉, 米川裕之, 長岡智紀, 菅野剛史. 三次元マイクロアレイシステムによる K-ras コドン 12 の変異解析に関する基礎的検討. *臨床病理.* 51 (4): 306-312 . 2003.
- 29) 前川真人. 遺伝子診断. *現代医療* 35 (7): 1516-1522. 2003.
- 30) 前川真人. 腫瘍の検査(がんのバイオマーカー). *臨床病理レビュー特集号* 124: 15-20. 2003.
- 31) 佐々木一樹. SELDI-TOF-MS による腫瘍マーカー探索とがん診断の試み. 「ポストゲノムマ

スペクトロメトリー」. 化学
フロンティア第10巻. 化学
同人. pp.181-190. 2003.

2. 学会発表

- 1) 山田哲司、現在のプロテオーム解析技術の紹介と疾病モデルの解析、第19回日本DDS学会、京都、(2003年6月)
- 2) 山田哲司、プロテオミクス解析による大腸発がん機構の解明、第24回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会「国立がんセンターにおけるがん研究活動」、東京、(2003年8月)
- 3) 山田哲司、プロテオーム解析技術を用いた発癌機構の解明、第16回東日本呼吸器医研究会、東京、(2003年9月)
- 4) 山田哲司、プロテオーム解析による大腸発癌機構の解明、横浜市立大学よこはまアーバンカレッジリカレント講座、横浜、(2003年9月)
- 5) 山田哲司、近藤 格、広橋説雄、プロテオーム解析法を用いた大腸発がん分子機構の解明、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 6) 猪野義典、三浦彩華、海谷文美、似鳥修弘、山田哲司、金井弥栄、広橋説雄、大規模スクリーニングにより作製したモノクローナル抗体パネルによる膵がん血清診断、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 7) 近藤格、藤井一恭、横尾英樹、山田哲司、広橋説雄、二次元電気泳動(2D-DIGE法)と多変量解析による膵癌細胞のプロテオーム解析、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 8) 藤井一恭、近藤格、山田哲司、広橋説雄、二次元電気泳動(2D-DIGE法)と多変量解析による肝癌のプロテオーム解析、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 9) 山田哲司、トランスクリプトームとプロテオーム解析による大腸発がん機構の解明、疾患プロテオーム研究会 北里大学共同研究振興資金(AKPS研究助成金)補助対象事業、相模原、(2003年10月)
- 10) 山田哲司、PS1-3「プロテオーム解析技術を用いた発癌機構の解明、第44回日本肺癌学会総会、Presidential Symposium 1「プロテオーム解析」、東京、(2003年1

- 1月)
- 11) Seike M, Kondo T, Mori Y Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, and Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized beta-catenin. The 94th annual meeting, American Association for Cancer Research. Washington DC. (July 2003)
 - 12) Yamada T, Hayashi R, Takada M, Ino Y, Kondo T, and Hirohashi S. Suppression of intestinal polyposis in Mdr1-deficient Apc(Min/+) mice. The 94th annual meeting, American Association for Cancer Research. Washington DC. (July 2003)
 - 13) Idogawa M, Yamada T, Honda K, Imai K, and Hirohashi S. Proteomic analysis of the T-cell factor (TCF)-4/beta-catenin transcriptional complex. The 95th annual meeting, American Association for Cancer Research. Orland, FL. (March 2004)
 - 14) Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Ino Y, and Hirohashi S. Expression of actinin-4 enhances cell motility and mediates lymphatic spread of colorectal cancer. The 95th annual meeting, American Association for Cancer Research. Orland, FL. (March 2004)
 - 15) 前川真人、栄養アセスメントタンパクによる褥瘡の治療効果の判定及び予知、臨床病理、51 巻補冊 Page376、(2003 年 9 月)
 - 16) 伊藤由紀子、竹下明裕、金子誠、内山幸則、宮本健、菅野剛史、前川真人、経過中リンパ球の一過性かつ高度の形態異常を認めた熱中症の 1 例、臨床病理、51 巻補冊 Page303、(2003 年 9 月)
 - 17) 金子誠、渡辺弘子、前川真人、褥瘡対策における栄養アセスメント蛋白 (Rapid Turnover Protein) 測定の有効性の検討、臨床病理、51 巻補冊 Page275、(2003 年 9 月)
 - 18) 渡辺弘子、堀井俊伸、石川仁子、菅野剛史、前川真人、インフルエンザにおける血清 CK 活性の解析、臨床病理、51 巻補冊 Page271、(2003 年 9 月)

- 19) 浜田悦子、岡本明子、富永祥子、杉浦綾、伊藤祐子、泉正和、菅野剛史、前川真人、呼吸機能検査の精度保証を目指した精度管理法の確立、臨床病理、51 巻補冊 Page232、(2003 年 9 月)
- 20) 白井直人、前川真人、竹下明、堀井俊伸、H. pylori 除菌における早期除菌判定としての血清ペプシノゲン測定の有用性、臨床病理、51 巻補冊 Page179、(2003 年 9 月)
- 21) 浜田悦子、米川修、大橋弘幸、菅野剛史、前川真人、Crossed mixing test を用いた抗リン脂質抗体症候群の病態評価の有用性、臨床病理、51 巻補冊 Page145、(2003 年 9 月)
- 22) 宮倉安幸、菅野康吉、赤須孝之、吉田輝彦、前川真人、斉藤聡、佐々木秀之、野水整、小西文雄、藤田伸、森谷宜皓、永井秀雄、若年発症であるが孤発例の MSI 陽性大腸癌における末梢血リンパ球の hMLH1 プロモーター領域の広範囲なメチル化の関与、家族性腫瘍、3 巻 2 号 PageA33、(2003 年 9 月)
- 23) 前川真人、竹下明裕、菅野康吉、梶村春彦、三次元マイクロアレイシステムによる K-ras コドン 12 の変異解析に関する基礎的検討、日本癌学会 62 回総会記事、Page543、(2003 年 9 月)
- 24) 石川仁子、谷口照美、東仁美、立林千夏、前川真人、三浦克敏、鈴木一也、菅野剛、悪性胚細胞性腫瘍患者に認められた高 LD-1 血症は LDHA 遺伝子プロモーターのメチル化による、生物物理化学、47 巻補冊 Page37、(2003 年 10 月)
- 25) 竹下明裕、内藤健助、竹下香、佐原直日、大西一功、前川真人、大野竜、急性前骨髄球性白血病に対する亜硫酸療法的心自律神経系に及ぼす副作用、日本癌学会 62 回総会記事、Page111、(2003 年 9 月)
- 26) 石川仁子、菅野剛史、前川真人、LD アイソザイムの自動解析システム構築の検討 その 2、日本臨床検査自動化学会会誌、28 巻 4 号 Page365、(2003 年 9 月)
- 27) 石川仁子、菅野剛史、前川真人、臨床検査における分離分析法の活用 LD アイソザイムの自動解析システム構築、臨床化学、32 巻 Suppl. 1 Page149a、(2003 年 6 月)

- 28) 小谷一夫、前川真人、菅野剛史、脂質検査の最近の話題 酸化 LDL (MDA-LDL) 測定系の構築と臨床的意義、臨床化学、32 巻 Suppl.1 Page121a、(2003 年 6 月)
- 29) 石曾根聡、清水文彰、杉山敦、宮川眞一、川茂幸、山内一由、勝山努、中山淳、 $\alpha 1,4-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子を対象とした膀胱癌の分子診断、第 23 回日本分子腫瘍マーカー研究会、名古屋、(2003 年)
- 30) 佐々木一樹、Peptidomics-Based Discovery of Peptide Tumor Markers. 第 76 回日本生化学会、(2003 年 10 月)
- 31) 佐々木一樹、Peptidomics-Based Discovery of Peptide Tumor Markers. 国立循環器病センター知的基盤研究国際シンポジウム、(2004 年 1 月)
- 32) 近藤格、二次元電気泳動法を用いた臨床マーカーの開発、第 54 回日本電気泳動学会シンポジウム「医療プロテオミクス—基礎から臨床へ—」東京、(2003 年)
- 33) Kondo T. Metastasis-Associated proteomic signature of pancreatic cancer cells—study by fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) combined with statistical methods. 2nd Annual Meeting of Human Proteome Organization、Montreal、(2003)
- 34) 近藤格、二次元電気泳動 (2-DIGE 法) と多変量解析による膀胱癌細胞のプロテオーム解析、第 62 回日本癌学会、名古屋、(2003 年)
- 35) 近藤格、Cancer Proteomics Project in National Cancer Center Research Institute. Liver Proteomics Project、筑波、(2003 年)
- 36) 近藤格、がん研究におけるプロテオーム解析—腫瘍マーカー開発に向けた二次元電気泳動法の応用—、第 44 回日本生化学会中国・四国支部例会、岡山、(2003 年)
- 37) 近藤格、腫瘍マーカー探索のための臨床プロテオミクス、第 1 回日本ヒトプロテオーム学会、筑波、(2003 年)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許申請中

特許名称：疾病検出方法

発明者：中山 淳、石曾根聡

出願番号：特願 2003-185696

出願日：2003年6月27日

特許名称：新規なスクリーニン

グ法によるがんマーカーの探索

発明者：佐々木一樹

出願番号：PCT/JP02/07982

出願日：2002年8月5日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

モノクローナル抗体とトランスクリプトーム解析を用いた腫瘍マーカーの開発

主任研究者 山田哲司 国立がんセンター研究所
・化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト

研究要旨

膀胱がんは進行して発見された場合著しく予後が不良であり、早期発見の効果的な戦略が重要である。治癒率を向上させるためには、より検出率を向上させる必要がある。

ProteinChip システムを用い、がん患者に固有に見られるタンパク質の発現パターンを検索するための基礎的検討が終了した。次年度には約100例の膀胱がん患者の血漿を用いた解析を開始している。GeneChip システムを用い、膀胱特異的に発現する分子を検索してきた。さらにバイオインフォマティクス的手法を用いて、分泌される可能性のある分子を選定し、腫瘍マーカーとしての有用性を検討する計画である。

Actinin-4 の splice variant は肺小細胞がんの特異性が高く、正常組織では精巣に発現に限られ、所謂 cancer-testis antigen の範疇に含まれる。特異性の高い腫瘍マーカーであるとともに、免疫療法の標的となるものと考えられた。

A. 研究目的

前立腺がんにおけるPSA (prostate-specific antigen) の様にスクリーニングに有用であることが確立された腫瘍マーカーが少数ではあるが発見されており、また SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) を応用した ProteinChip 法では、100%の検出率と94%の特異性をもって早期症例を含む卵巣が

ん患者を血清診断にて特定できたとの報告がなされている。一方バイオインフォマティクスの技術が進歩し、一見特異性のない様に思われる検査データからも、統計解析を行う事で診断に応用できる情報を選別できる可能性がでてきた。本研究班では近年急速に進歩したトランスクリプトームやプロテオーム等のバイオテクノロジーの先端技術を応用し、従来の

概念とは全く異なる腫瘍マーカーを開発し、肺がん、スキルス胃がん、膵がん等の難治がんの早期発見による克服を目的とする。

B. 研究方法

下記の1-4の方法にて難治がんを中心にがん罹患者に特有な流血中や尿中等の核酸・蛋白質・ペプチドを同定し、がんの早期発見に適した検出方法を確立する。

1. ProteinChip法によるペプチドと低分子タンパク質のプロフィール解析
2. トランスクリプトームとプロテオーム解析による腫瘍あるいは臓器特異的な分子の同定
3. ボット化された大規模なスクリーニングによるがん関連抗原に対するモノクローナル抗体の作製
4. がん特有の遺伝子 alternative splicingの検出

C. 研究結果

1. ProteinChip法によるペプチドと低分子タンパク質のプロフィール解析
CIPHERGEN社のProteinChipシステムで再現性よくかつ網羅的にペプチドと低分子タンパク質のプロフィール解析する方法の標準化を終了した。膵癌細胞に特異的な分泌ペプチドを同定する前段階として、膵癌培養細胞株が細胞外に放出する微量

ペプチドを網羅的に探索・同定する方法を確立し、452種類のペプチドを同定した。

2. トランスクリプトームとプロテオーム解析による腫瘍あるいは臓器特異的な分子の同定

膵、卵巣、胃がんの診断に有用なそれぞれに特有な臓器特異マーカーを同定するために、Affymetrix社のGeneChipシステムを用いた膵がん株6種、卵巣がん株4種、胃がん株7種を含む細胞株34種と全身の正常臓器の遺伝子発現解析が終了した。蛍光二次元電気泳動法でタンパク質の発現プロファイルを作成し、その情報を多変量解析・機械学習法の手法で調べることにより、臓器または組織特異的なタンパク質の発現パターンが存在する事を発見した。また、パターンを構築するタンパク質を質量分析器を用いて同定した。

3. ロボット化された大規模なスクリーニングによるがん関連抗原に対するモノクローナル抗体の作製
膵がん患者血清と高率に反応する新しい8種の新規モノクローナル抗体を選択した。膵がん患者98例、健常人41例の血清を用い、カットオフ値を3SDとした評価では8種の抗体を組み合わせたアッセイでは74.4%、健常人9.7%が陽性を示した。

4. がん特有の遺伝子 alternative splicingの検出

難治性が高い肺小細胞がんにはactin細

胞骨格の異常が認められ、actin細胞骨格結合タンパク質actinin-4のactin結合ドメインにアミノ酸3個の変化をともなうalternative splicingが特異的に認められる事を見出した。

D. 考察

膀胱がんは進行して発見された場合著しく予後が不良であり、早期発見の効果的な戦略が重要である。治癒率を向上させるためには、より検出率を向上させる必要がある。正常ヒト組織と培養細胞の遺伝子発現解析結果を統計学的に処理し、腫瘍特異的あるいはPSA(prostate-specific antigen)の様な臓器特異的に発現する分子を同定する。さらにバイオインフォマティクスの手法を用いて、分泌される可能性のある分子を選定する計画である。がん患者と対象者の血漿を用い、プロテインチップ法にてがん患者に固有に見られるタンパク質の発現パターンを同定する。現在約100例の膀胱がん患者の血漿を用いた解析を開始している。Actinin-4のsplice variantは肺小細胞がんの特異性が高く、正常組織では精巣に発現に限られ、所謂cancer-testis antigenの範疇に含まれる。特異性の高い腫瘍マーカーであるとともに、免疫療法の標的となるものと考えられた。

E. 結論

進行がんの治療は現在利用可能な医療技術では困難な場合が多く、高感度な検出方法を用いて微少のがんを発見し、早期に治療を開始する以外には予後の改善に大きな期待がもてないのが現状である。そのため多数の被験者からがん罹患者を効率良く、かつ血液などを用いて非侵襲的にスクリーニング出来るがん検診技術の開発が国民から強く要望されている。国立がんセンターでは平成16年2月よりがん予防・検診研究センターが開設され、既存のがん検診方法を検証し、新しいがん検診技術を開発する事が責務となっている。Ciphergen社のプロテインチップシステムとCorrelogic社が開発したアルゴリズムを用いた多変量解析を用い、米国NCIとFDAの共同で行われているClinical Proteomics Projectは治癒可能性の高いStage Iの早期症例を含め、100%に近い正診率で卵巣癌が診断できたと報告しているが、国内では少数例を用いた散発的な研究しか行われていなかった。今後は大規模な検証を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda J, Yokoo H, Yamada T, Kitabayashi I, Sekiya T, Ichikawa H. Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB. *Cancer Sci.* 95(1):52-57, 2004.
- 2) Honda K, Yamada T, Seike M, Hayashida Y, Idogawa M, Kondo T, Ino Y, Hirohashi S. Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer. *Oncogene*. Epub. 2004.
- 3) Liu QY, Lei JX, LeBlanc J, Sodja C, Ly D, Charlebois C, Walker PR, Yamada T, Hirohashi S, Sikorska M. Regulation of DNaseY activity by actinin-alpha4 during apoptosis. *Cell Death Differ.* Epub. 2004.
- 4) Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T, Hirohashi S. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics.* 3(9):1758-1766, 2003.
- 5) Seike M, Kondo T, Mori Y, Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized beta-catenin. *Cancer Res.* 63(15):4641-4647, 2003.
- 6) Yasuda J, Tsuchiya A, Yamada T, Sakamoto M, Sekiya T, Hirohashi S. Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 308(2):227-233, 2003.
- 7) Terasaki H, Niki T, Matsuno Y, Yamada T, Maeshima A, Asamura H, Hayabuchi N, Hirohashi S. Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol.* 27(7):937-951, 2003.
- 8) Yoshimura A, Gemma A, Hosoya Y, Komaki E, Hosomi Y, Okano T, Takenaka K, Matuda K, Seike M, Uematsu K, Hibino S, Shibuya M, Yamada T,

Hirohashi S, Kudoh S.
Increased expression of the
LGALS3 (galectin 3) gene in
human non-small-cell lung
cancer. Genes Chromosomes
Cancer. 37(2):159-164, 2003.

2. 学会発表

- 1) 山田哲司、現在のプロテオーム解析技術の紹介と疾病モデルの解析、第19回日本DDS学会、京都、(2003年6月)
- 2) 山田哲司、プロテオミクス解析による大腸発がん機構の解明、第24回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会「国立がんセンターにおけるがん研究活動」、東京、(2003年8月)
- 3) 山田哲司、プロテオーム解析技術を用いた発癌機構の解明、第16回東日本呼吸器医研究会、東京、(2003年9月)
- 4) 山田哲司、プロテオーム解析による大腸発癌機構の解明、横浜市立大学よこはまアーバンカレッジリカレント講座、横浜、(2003年9月)
- 5) 山田哲司、近藤 格、広橋説雄、プロテオーム解析法を用いた大腸発がん分子機構の解明、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 6) 猪野義典、三浦彩華、海谷文美、似鳥修弘、山田哲司、金井弥栄、広橋説雄、大規模スクリーニングにより作製したモノクローナル抗体パネルによる膵がん血清診断、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 7) 近藤格、藤井一恭、横尾英樹、山田哲司、広橋説雄、二次元電気泳動(2D-DIGE法)と多変量解析による膵癌細胞のプロテオーム解析、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 8) 藤井一恭、近藤格、山田哲司、広橋説雄、二次元電気泳動(2D-DIGE法)と多変量解析による肝癌のプロテオーム解析、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 9) 山田哲司、トランスクリプトームとプロテオーム解析による大腸発がん機構の解明、疾患プロテオーム研究会 北里大学共同研究振興資金(AKPS研究助成金)補助対象事業、相模原、(2003年10月)
- 10) 山田哲司、PS1-3「プロテオーム解析技術を用いた発癌機構の解明、第44回日本肺癌学