

- 会 総 会 、 Presidential Symposium 1 「プロテオーム解析」、東京、(2003年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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

消化器系がんの腫瘍マーカーの開発

分担研究者 前川真人 浜松医科大学医学部・臨床検査医学

研究要旨

- 1) 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。
- 2) *CKB* 遺伝子のスプライシングバリエント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。
- 3) 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。

A. 研究目的

癌における遺伝子異常として、遺伝子変異と欠失の他にメチル化が注目されている。確かに、癌化の過程で、また結果として、いくつかの遺伝子がメチル化されている。それらのいくつかは発癌の過程で重要であり、遺伝子発現の沈黙化によって発癌メカニズムの一翼をなしていると考えられている。また、メチル化異常を癌診断の指標として考えることもできる。ただ、これらの研究は核ゲノムにおける変化であって、細胞内にはもう一つ、ミトコンドリアゲノムが存在する。ミトコンドリアゲノムは、全長が約16.5 kbで、13個のrespiratory chain subunits, 22個のtRNA, 2個のribosomal RNAから成っており、細胞あたり10の3乗から4乗

コピー存在するとされている。Cytosine は4747+435=5182, CpG 435であるため、CpGサイトが多いわけではない。今までに遺伝子変異やマイクロサテライト不安定性の報告がなされているが、メチル化についてはコンセンサスが得られていない。もし、ミトコンドリアゲノムが癌化により高率にメチル化を受けるとするならば、核ゲノムよりも数千倍多いミトコンドリアゲノムの異常を検出することは多大なメリットとなる可能性がある。そこで、ミトコンドリアという小器官の中で、DNAはメチル化を受けるのかについて検討した。

血液悪性腫瘍では、CK-BB出現例が散発的に報告されていること、フローサイトメーターを用いたALLにおける微小

残存病変のモニターのための新規マーカー検索研究の結果でCKBが一つの候補となった報告がある。一方、固形がん、特に消化器系のがんでは、患者血清中でCK-BB活性の増加がしばしば認められる。ではなぜ、CK-BBが増加するか。一つの考え方としては、正常平滑筋が傷害を受けて、CK-BBが遊出すると考えられたことであった。しかし、腫瘍由来のCKB発現量が増加している可能性も否定できないし、それがメチル化の異常と何らかの関係があるかどうかについては明らかではない。そこで、がん細胞におけるCKB発現量とメチル化について検討した。

最近、ヘッジホッグカスケードの遺伝子発現ががん細胞で増加していることが報告された。そこで、これらの関連遺伝子の発現量をがん細胞株、臨床材料、がん患者血液を試料として検討した。

B. 研究方法

1) ミトコンドリア DNA のメチル化

ミトコンドリアDNA内でCpG配列が比較的多い領域を3カ所(16S rRNA, Cytochrome c oxidase subunit I, Cytochrome c oxidase subunit II; GC content がいずれも約 23%、CpG 配列が 11-13 個、PCR 増幅産物のサイズはそれぞれ 318, 317, 200bp) 選択し、sodium bisulfite 処理後のDNAをPCR-SSCPで解析した。電気移動度に異常が見られたものについては、そのバ

ンドを切り出し、塩基配列を決定した。

2) CKB 遺伝子のスプライシングバリエーション

がん細胞株、臨床のがん組織から抽出したRNAを試料として、RT-PCRによってCKB発現量を検討した。市販のcDNA panel (Clontech) を用いて、正常細胞/組織における発現量についても同様に調べた。次いで、抽出DNAを試料として、sodium bisulfite 処理後のDNAのCKB遺伝子プロモーター、エクソン6近傍のエクソン、イントロンをPCR-SSCPで解析した。また、塩基配列決定し、メチル化の有無を確認した。別途、抽出DNAの同様の領域に遺伝子変異がないかどうかを、PCR-SSCP、塩基配列決定により調べた。一部の細胞株では、培養液に常法どおり5-aza dCを加えて培養した細胞と比較することによって、メチル化の影響を調べた。

3) ヘッジホッグカスケードの遺伝子

PTCH1 (膜タンパク質; ヘッジホッグの受容体), *GLI1* (転写調節因子; ヘッジホッグの下流の遺伝子の転写制御), *SMO* (膜タンパク質; 細胞内シグナル伝達経路の活性化) の発現量をがん細胞株、がん組織、cDNA panel を用いてRT-PCRで調べた。

4) 倫理面への配慮

ヒト試料を研究に使用する際には、ヘルシンキ宣言を遵守し研究を行う。遺伝子解析研究については学内の所定

の倫理委員会の審査を受け、承認を得た後に行う。個人の人権擁護は常に最大限に重視する。

C. 研究結果、D. 考察

1) ミトコンドリア DNA のメチル化

15種類のがん細胞株、31種類の胃がん組織、10種類の大腸がん組織から抽出したDNAを試料として上記の方法で検討したところ、2種類の胃癌組織を除いた胃癌組織、全ての癌細胞株・大腸癌組織でミトコンドリアDNAの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。従って、ミトコンドリア内では、細胞内、核内のようにメチル化酵素が働く環境にないのではないかと考えられた。それは、内部環境もしくは環状DNAであることに起因しているかもしれない。

2) *CKB* 遺伝子のスプライシングバリエーション

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。

エクソン5-7の塩基配列に有意な異

常はなく、メチル化にも有意な違いはなかった。しかし、プロモーター領域のメチル化と一定の関係を認めた。すなわち、メチル化によってそのスプライシングバリエーションが発現する関係にあるかもしれない。HL-60RG細胞では、5-aza dC添加により、スプライシングバリエーションの割合が減少したとプロモーターのメチル化の割合の変化が対応したこともそれを示唆していると考えられた。

我々は既に*LDHA*、*LDHB*遺伝子のメチル化をそれぞれ網膜芽細胞腫・胚細胞性腫瘍、胃がん・膵がんで見いだした。特に、網膜芽細胞腫の1例では、*LDHA*にエクソンaとエクソン0という2個の5' non-coding exonのうち、エクソンaがメチル化を受けており、メチル化されていないエクソン0から始まるバリエーション型の*LDHA*サブユニット蛋白が転写・翻訳されていることがわかった。よって、今回の結果と考えあわせると、プロモーター領域のメチル化はスプライシングバリエーションの生成に関与している可能性を示しているのではないかと推定した。

3) ヘッジホッグカスケードの遺伝子

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、膵がん、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（膵がん細胞株）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、プレリミナリーではあるが、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、膵がんの患者の血清／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。

E. 結論

- 1) ミトコンドリアDNAのメチル化を癌細胞の指標とすることは困難であることが判明した。
- 2) *CKB* 遺伝子のスプライシングバリエーションは腫瘍マーカーとはなりえなかったが、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。
- 3) 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。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Liu ZJ, Maekawa M, Horii T, Morita M. The multiple promoter methylation profile of PR gene and ERalpha gene in tumor cell lines. Life Sci. 73: 1963-1972, 2003.
 - 6) Liu ZJ, Maekawa M. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. Anal Biochem. 317: 259-65, 2003.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 前川真人, 谷口照美, 立林千夏, 堀井俊伸, 竹下明裕, 相村春彦, 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.
 - 11) 前川真人. 遺伝子診断. 現代医療 35 (7): 1516-1522. 2003.
 - 12) 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.
- ## 2. 学会発表
- 1) 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)
 - 2) 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)
 - 3) 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, 51 巻補冊

- Page275(2003年9月)
- 4) 渡邊弘子、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)
 - 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 前川真人、竹下明裕、菅野康吉、相村春彦、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、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、Page543(2003年9月)
 - 10) 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)
 - 11) 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砒酸療法的心自律神経系に及ぼす副作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、Page111(2003年9月)
 - 12) 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)
 - 13) 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)

- 14) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

糖鎖遺伝子をターゲットとした分子診断法の開発

分担研究者 中山淳 信州大学医学部・病理組織学講座

研究要旨

膵癌患者の末梢血有核細胞から抽出した全 RNA を対象に、膵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 は膵癌、慢性膵炎、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膵癌で慢性膵炎や健常人に比べて有意に高値であったことから、膵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

胃粘膜の副細胞や幽門腺細胞、十二指腸粘膜のブルネル腺及び胃幽門腺化生を示した膵導管上皮細胞は特徴的に $GlcNAc\alpha 1 \rightarrow 4Gal\beta$ 残基を持つ O -グリカンを発現している (*Biochem J* 318:409-416, 1996)。このユニークな糖鎖は胃癌や膵・胆道癌でも高頻度に発現していることから、 $GlcNAc\alpha 1 \rightarrow 4Gal\beta$ 残基はこれら腫瘍の癌関連糖鎖抗原と考えることができる (*J Histochem Cytochem* 46: 793-802, 1998)。一方、 $\alpha 1, 4-N$ -アセチルグルコサミン転移酵素 ($\alpha 4GnT$) は $GlcNAc\alpha 1 \rightarrow 4Gal\beta$ 残基を生成する糖転移酵素であり、私達は以前、発現クローニング法によっ

てこの酵素の cDNA を単離し (*Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8991-8996, 1999)、その組織局在等を明らかにしてきた (*J Histochem Cytochem* 49:587-596, 2001)。さらに $\alpha 4GnT$ が胃癌や膵癌細胞でも高頻度に発現しているが、好中球やリンパ球などの末梢血有核細胞では発現していないことを見出し、胃癌患者の末梢血有核細胞分画中における $\alpha 4GnT$ mRNA の発現量を定量する real-time RT-PCR 法が末梢血中に存在する微量な胃癌細胞の検出に有用であることを報告した (*Lab Invest* 83:187-197, 2003)。最近、私達はこのアッセイ法をさらに改良することでより高感度なアッセイ法を開発したので、本アッセイ法が膵

癌のスクリーニングや早期発見に有用か否かを検討した。

B. 研究方法

インフォームドコンセントの得られた膵癌患者 45 名、慢性膵炎患者 10 名及び健常人 70 名について検討した。採取した 5ml の末梢血から有核細胞成分を分画して全 RNA を抽出、DNaseI で処理した後、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。 $\alpha 4GnT$ 遺伝子に特異的なプライマー (5'-GTTTTCTCTTCCCTTTGGATATGA-3'、5'-AGCTGATGTGGAGCCAGTTTCT-3') と TaqMan プロブ (5'-TGGTACAATCAAATCAACGCCAGCGC-3') を用いて、ABI PRISM 7700 により real-time PCR 法を行った。アッセイは $\alpha 4GnT$ と内部標準である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を同時に測定する multiplex PCR 法にて行い、 $\alpha 4GnT$ cDNA のコピー数/GAPDH cDNA のコピー数を 10^7 倍した値を $\alpha 4GnT$ の発現量と定義した。まず、膵癌患者群と健常人群で得られた $\alpha 4GnT$ の発現量に対して ROC 曲線を作製し、両群間を判別するカット・オフ値として 12 を得た。従って、 $\alpha 4GnT$ 発現量の基準値を 12 以下と定義することで各群を解析し、群間の比較検討を行った。

(倫理面への配慮) ヒト試料を研究

に使用する際には、ヘルシンキ宣言を遵守し、「疫学的研究に関する倫理指針」等の指針に沿って研究を行う。研究内容は事前に信州大学医学部医倫理委員会にて、1) 研究の対象となる個人の人権擁護、2) 同意を得る方法、3) 研究によって生じる個人の不利益ならびに危険性と医学上の貢献予測を中心に審査され承認を得ている。検体は提供者の同意のもとに採取し、個人の人権擁護を常に最大限重視する。

C. 研究結果

膵癌患者群における $\alpha 4GnT$ の陽性率は 80.9% でありその発現量は 34.87 (平均)であった。さらに膵癌における各病期別の陽性患者数は、0 期 0/1 例 (0%)、II 期 2/2 例 (100%)、III 期 6/7 例 (85.7%)、IV 期 28/35 例 (80%) であり、また $\alpha 4GnT$ の発現量は病期の進行と共に増加の傾向にあった。また、膵内における腫瘍の占拠部位別の検討では、膵頭部癌 21/25 例 (84%)、体尾部癌 15/20 例 (75%) で $\alpha 4GnT$ が陽性となり、癌の占拠部位にかかわらず高頻度に陽性となった。 $\alpha 4GnT$ の発現量に関しても膵頭部癌と膵体尾部癌の両群間で有意な差は認められなかった。一方、切除された膵癌症例 18 例に対する病理組織学的な検討では、 $\alpha 4GnT$ の発現量と、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無及び癌細胞の分化度との

間にいずれも有意な差は認められなかった。また、免疫組織化学的には α 4GnT は 88.4%の膵癌細胞に陽性細胞が認められた。

慢性膵炎患者群における α 4GnT の陽性率は 40.0%であったが、 α 4GnT の発現量は 17.84 (平均)であり、膵癌と比較して有意に低値であった ($P < 0.05$; Bonferroni 検定)。また、健常人群でも α 4GnT は 14.2%に陽性であったが、 α 4GnT の発現量は 7.15 (平均)と膵癌と比較して有意に低値であった ($P < 0.001$; Bonferroni 検定)。なお、43名の膵癌患者では、同時に血清中の CEA と CA19-9 を測定し、それぞれ 51.2%、76.7%の陽性率であったが、2例の II 期膵癌では CEA、CA19-9 の何れも陰性であった。

D. 考察

α 4GnT mRNA を対象とした real-time RT-PCR 法は胃癌の場合と同様 (*Lab Invest* 83:187-197, 2003)、膵癌のスクリーニングにも有用であると考えられた。特に CEA や CA19-9 では検出困難な II 期の膵癌では、今回検討し得た症例は 2例と少ないもののその 2例全例において α 4GnT が陽性となったことから、早期膵癌における本アッセイ法の有用性が期待できる。また、膵癌の病期が進行するにつれ、 α 4GnT の発現量も増加傾向にあったことから、癌の進

展とともに末梢血に流入する癌細胞も増加している可能性が示唆された。慢性膵炎でも 40%に α 4GnT は陽性であったが、その発現量は膵癌に比較し有意に低値であった。しかしながら α 4GnT は胃癌や胃潰瘍、胃生検後等の胃粘膜障害を生じた場合にも陽性になることから (*Am J Gastroenterol* 95:3017-3018, 2000)、このアッセイ法で陽性であった場合には、胃内視鏡検査にて胃粘膜病変の有無を検索すると同時に、腹部超音波検査や腹部 CT 検査等による膵臓の精査を進める必要がある。今後は本アッセイ法の実用化を目指し、更に症例数を積み重ねて検討を行う予定である。

E. 結論

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 法は膵癌のスクリーニングに有用であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 heig endothelial venule-restricted sulfotransferase collaboratively control lymphocyte homing. *J Biol Chem.* 279:3058-3067, 2004.
- 2) 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.
- 3) 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 clorectum. *J Histochem Cytochem.* 51:567-573, 2003.
- 4) 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.
- 5) 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 trophinin by maternal Fallopian tube epithelia during tubal pregnancies: Possible role of human chorionic gonadotrophin on ectopic pregnancy. *Am J Pathol.* 163:2211-2219, 2003.
- 6) 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.
- 7) 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.

2. 学会発表

- 1) 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、 α 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隣癌の分子診断. 第23回日本分子腫瘍マーカー研究会、名古屋、(2003年)

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ペプチド性腫瘍マーカーの開発

分担研究者 佐々木一樹 国立がんセンター研究所・細胞増殖因子研究部

研究要旨

膀胱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、膀胱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。

A. 研究目的

腫瘍マーカーは細胞外液での測定が可能な分子が対象になる。培養細胞株の培養上清中には、分泌ペプチドや膜タンパク質の細胞外ドメインなどが豊富に含まれると予想される。この中から癌細胞に特有の分泌ペプチドを同定する目的に、網羅的な分析法が適用可能であれば理想的である。しかし、現時点でペプチドの網羅的な分析は世界的にもまだ発展途上の段階である。そこで培養上清中のペプチドを網羅的に分析する手法を確立し、膀胱癌を対象として、この手法での膀胱癌固有のペプチドの同定の可能性について検討することを目的とした。本年度は、これまでに膀胱癌での産生が知られている分子がどの程度同定可能であるかについて基礎検討をおこなった。

B. 研究方法

現在の技術では、細胞培養時に添加する血清などの外因性物質の存在下で、細胞が上清中に放出する分子を識別しながら網羅的に同定することは事実上不可能である。そこで、これまで探索に用いた膀胱癌培養株の中から、以下の3つの条件をみたく細胞株を選択した。1) 無血清培養条件下での上清回収に適する、2) 単位時間あたりの蛋白質分泌量が多い、3) 樹立後の経過時間が短い。

その細胞を通常スケールでコンフルエントになるまで培養した。増殖培地を完全無血清培地に置換する操作を経て、顕微鏡下100倍の視野で浮遊細胞が平均5個以下となる条件で培地を回収し、遠心後の上清を実験に用いる無血清培養上清とした。培地は凍結せずにただちに固相抽出で脱塩を行い、凍結乾燥した。凍結乾燥後の試料を還元ア

ルキル化し、再度脱塩操作と凍結乾燥をおこなった。蛋白質成分からの分離のためにゲル濾過 HPLC を行い、ペプチド画分とした。画分を陽イオン交換 HPLC にかけて、塩濃度勾配で分画した。各分画を逆相 HPLC にかけて、MALDI 法で分子量 4000 以下を中心にペプチドの検出とタンデム質量分析法による同定をおこなった。

C. 研究結果

研究で用いた細胞株から、通常の培養スケールで 452 種類のペプチドを同定した。分析は同じ条件で 2 回実施した。その細胞株からは、本研究者が以前により小さなスケールで分画を行わない状態で一斉分析した場合、s/n 3 以上で約 20 個のペプチドが検出されるのみであった。このことは分画の効果を示している。また、この方法により、細胞内主要蛋白質である cytokeratins 8 & 18、tubulin alpha, beta-actin、histone H2B 由来のフラグメントは 10 種類しか同定されなかった。またウシとヒトで共通配列部分のヘモグロビン β 鎖由来の断片が 2 種類同定された。その他は、32 種類の膜蛋白質の細胞外ドメイン、25 種類の分泌蛋白質および分泌ペプチド、局在の詳細が不明の蛋白質が 10 種類同定された。膜蛋白質の細胞外ドメインおよび分泌蛋白質・ペプチドについて

は、臨床材料の膀胱癌での発現解析に関する過去の文献を調査することにより、膀胱癌に特有、または膀胱癌をはじめとする腺癌で高頻度で発現することが報告されている分子が多数含まれることが明らかになった。また、本研究の先行研究で、膀胱癌特異的と考えられた分泌ペプチドも含まれていた。

D. 考察

細胞培養上清は、網羅的なアプローチによる分泌ペプチドの探索材料としては魅力的である。しかしながら、実際の探索材料としてはこれまで困難とされてきた。本研究の基礎検討で、浮遊細胞出現によって細胞内容物の存在量が無視できなくなると、同定ペプチドの過半数が、サイトケラチン、チューブリン、ヒストンで占められることを明らかにしている。一方で、本研究で使用している細胞培養上清は、極めて限定された条件で獲得されているものであるが、このような内容物の漏出と考えられる蛋白質由来のペプチド断片が極めて少ないことが示された。ヘモグロビン由来の断片は 2 種類のみ、また血清アルブミン、免疫グロブリン断片は一切同定されなかったことも、分析試料の質を示している。また、膀胱癌に高頻度で発現することが他方面の研究で明らかになっている分子由来のペプチドが同定されており、腫瘍マーカ

一として使用されているコア蛋白質の断片も同定することができた。これらの結果は、この解析法をさらに改良、スケールアップ、ハイスループット化することにより、膵癌由来の分泌ペプチドで腫瘍マーカー候補となる分子を同定できることを示している。ただし、体液での測定には、分子量 3,000-10,000 程度のペプチドが抗体作成などの点で有利であるため、今後は、ESI イオン化法による同定で、この領域のペプチドの同定率を向上させることが重要と思われる。本アプローチは、2群の変動量発現に基づくものではないが、以下の事項を考慮しながら、膵癌特異的なペプチドの絞り込みを進めている。1) 膵癌に対するコントロールとして、本研究では、膵管上皮由来の2種類の細胞株の上清を分析する。2) 分泌ペプチド固有の翻訳後修飾に着目する。

E. 結論

膵癌細胞株の培養上清中のペプチドを対象とすることで、膵癌の腫瘍マーカー候補ペプチドの選択可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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) 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)
- 2) 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

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

分担研究者 近藤格 国立がんセンター研究所・
腫瘍プロテオミクスプロジェクト

研究要旨

腫瘍細胞のタンパク質発現プロファイルを蛍光二次元電気泳動法や質量分析器などの各種のプロテオーム解析技術で作成し、多変量解析法や機械学習法を用いることで腫瘍の個性を正確に判定できるタンパク質の発現パターンを発見する。そして、その発現パターンを腫瘍マーカーとして実用化する。

A. 研究目的

がんの個性を判定できるようなタンパク質発現パターンを同定し、それを腫瘍マーカーへと発展させること。

る倫理指針」等の指針に沿って研究を行う。検体は提供者の同意のもとに採取したものをを用いる。研究によって提供者の不利益が生じないように配慮し、個人の人権擁護は常に最大限に重視する。

B. 研究方法

性格が既知である各種の培養がん細胞、臨床検体よりタンパク質を抽出し、定量性に優れた蛍光二次元電気泳動法を用いてタンパク質の発現プロファイルを作成する。そして得られたプロテオームの情報を多変量解析や機械学習法の手法で解析し、がんの個性を判定できるようなタンパク質の発現パターンを同定する。ヒト試料を研究に使用する際には、ヘルシンキ宣言を遵守し、「疫学的研究に關す

C. 研究結果

由来する組織型が異なる肺がん細胞、由来する臓器が異なる腺がん細胞、転移能・浸潤能が異なる隣がん細胞、および臨床病期がことなる肺がんの臨床検体を用いた実験を行った。蛍光二次元電気泳動でタンパク質の発現プロファイルを作成し、多変量解析と機械学習法でがん細胞の既知の形質に対応するタンパク質の発現パターンの同定を

試みた。いずれの場合も、きわめて低い誤分類率でクラスを同定できるようなモデルを少ないタンパク質で構築することが可能だった。

D. 考察

蛍光二次元電気泳動で得られる高度な定量情報を伴ったタンパク質発現プロファイルはがん細胞の個性を反映するようなタンパク質の情報を含んでいること、そして、それを同定する手法として多変量解析や機械学習法の手法は有効であることがわかった。

E. 結論

われわれが用いている手法はプロテオミクス分野では他に類をみないユニークなものであるが、がんの個性を表す腫瘍マーカーを開発するうえで有効であることが明らかになった。今後は同様の手法を臨床検体に応用することで、がんの個性を明確に判定できるような腫瘍マーカーの開発を行っていく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo I, 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*. 3:1758-1786, 2003.

- 2) Seike M, Kondo I, 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.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) Kondo I, Metastasis-Associated proteomic signature of pancreatic cancer cells—study by fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) combined with statistical

methos-. 2nd Annual Meeting
of Human Proteome
Organization、Montreal、
(2003)

- 3) 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)
- 4) 近藤格、Cancer Proteomics
Project in National Cancer
Center Research Institute.
Liver Proteomics Project、
筑波、(2003 年)
- 5) 近藤格、がん研究におけるプ
ロテオーム解析—腫瘍マーカ
—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)
- 6) 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
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし