

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

平成15年度～平成17年度 総合研究報告書

主任研究者 山田哲司

平成18（2006）年 4月

## 別紙 2

### 目次

I. 総合研究報告書	
がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発	1
山田哲司	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
III. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総合研究報告書

「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部長

研究要旨

がん検診で無症状の段階でがんを発見し、早期に治療を開始することが有効ながん対策法の一つと考えられる。近年急速に進歩した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、流血中や尿中等に存在する核酸、タンパク質、ペプチドを高感度に検出・定量解析し、腫瘍マーカーとしてがん検診に応用できる可能のある分子を特定することを目的に研究を行った。現在までに胃がん、膵がん、腎細胞がん、子宮体がんの早期診断や病態の診断に臨床応用が期待できる腫瘍マーカーを開発した。今後多施設共同研究を行い、十分な検証を行った後に早期に臨床応用に発展させる必要がある。

山田哲司

国立がんセンター研究所部長

前川真人

浜松医科大学医学部教授

中山 淳

信州大学医学部教授

近藤 格

国立がんセンター研究所室長

佐々木一樹

国立循環器病センター研究所室長

A. 研究の目的

肺がん、スキルス胃がん、膵がん等の難治がんでは、進行症例の治療は現在利用可能な医療技術では著しく困難であり、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ことにより、予後の改善を求める必要がある。Computerized tomography (CT) や positron emission tomography (PET) などの画像診断を利用した検診も考えられるが、設置に高額な経費がかかり、また放射線被曝の問題も指摘

されており、全国規模で均一に行うには問題点が多い。

この様な状況の一方で、プロテオームの基礎研究の領域では近年急速な技術革新が行われ、微量なタンパク質、ペプチドの発現パターンが高感度で網羅的に検出されるようになってきている。また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タンパク質の定量データからも、新たな診断情報が得られる事例も見られる様になって来ている。昨今ではDNAやRNAという広い意味での分子マーカーが腫瘍マーカーとして考えられ始めている。そこで、臨床検査として使用可能ながんマーカーの開発を目的として、DNAメチレーションとスプライシングバリエーションに焦点をあてて、特定の遺伝子配列や報告例を基に解析を行い。また現在、日常臨床検査で使用されている項目のDNAメチル化との関わりについても検討し、詳細な検査データの解釈による臨床検査診断を目指した。

胃粘膜の中層から下層にかけて存在する腺粘液細胞と十二指腸粘膜のブルンネル腺、ならびに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  $\beta$  残基を産生している。このユニークな糖鎖は胃癌や膵癌でも高頻度に発現していることから、GlcNAc  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4Gal  $\beta$  残基は胃癌や膵癌

における癌関連糖鎖抗原と考えることができる (Nakamura et al, 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、私達は発現クローニング法によってこの酵素の cDNA を単離し、その組織局在等を明らかにしてきた (Nakayama et al, Proc Natl Acad Sci USA, 96, 8991-8996, 1999; Zhang et al, J Histochem Cytochem, 49, 587-596, 2001; Nakajima et al, J Histochem Cytochem, 51, 1689-1698, 2003)。さらに  $\alpha$  4GnT が胃癌細胞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末梢血の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における  $\alpha$  4GnT mRNA の発現量を定量する RT-PCR 法が微量な胃癌細胞 (circulating tumor cell) の検出に有用であることを報告した (Shimizu et al, Lab Invest, 83, 187-197, 2003)。私達はこのアッセイ法を改良することによって、より簡便かつ高感度な測定結果を得ることができたので、この方法が膵癌の検出に有用か否かを検討した。更に膵癌に対する  $\alpha$  4GnT mRNA の陽性率と他の腫瘍マーカーの陽性率を比較検討した (Ishizone et al, Cancer Sci, 97, 119-126, 2006)。

本研究班はこのような近年急速に  
進歩したバイオテクノロジーの先端  
技術を応用し、流血中や尿中等に存在  
する核酸、タンパク質、ペプチドや腫  
瘍がん細胞などの癌細胞自身が分泌す  
るペプチドを高感度に検出・定量解析  
し、従来の概念とは全く異なる腫瘍マ  
ーカーを開発し、がん検診に応用する  
事で、難治がんの早期発見による治療  
成績の向上をさせることを目的とし  
た。

## B. 研究方法

### プロテオーム解析による新規腫瘍マ ーカーの探索

米国のサイファージェン社で開発され  
たプロテインチップシステムに精密  
なハイブリッド型四重極質量分析装  
置を使用し、ペプチドの高精度・高分  
解度の検出と再現性に優れる定量が  
可能な方法[SELDI-QqTOF-MS (Surface  
Enhanced Laser  
Desorption/Ionization hybrid  
Quadrupole Time-of-Flight Mass  
Spectrometry)法]を確立した。さら  
に国立がんセンター研究所で新たに  
ペプチド検出・補正・定量と機械学習  
が可能な独自のソフトウェアを開発  
した。現在わずか20  $\mu$ L ほどの血漿  
(血清)から 2000 m/z から 40,000 m/z  
の範囲で約 1000 の低分子タンパク質  
とペプチドを検出することができる

ようになっている。国立がんセンター  
の104症例の膵がん血漿と116例の健  
常者の血漿を SELDI-QqTOF-MS 法でプ  
ロテオーム解析を行い、膵がん患者特  
有にみられるプロテオームパターン  
を検索した。71 症例の膵がん血漿と  
71 例の健常者学習セットとして機械  
学習を行い両者を識別できるタンパ  
ク質発現パターン同定し、検証セット  
78 例を判別した。

独立行政法人国立病院機構北海道  
がんセンター婦人科で2001年から2004年9月までの期間に採取  
された子宮体がん患者92例と対照  
者34例(子宮脱患者17例、健常者  
17例)の合計125症例の凍結保存  
されていた血清を用いた。Perkin-Elmer 社から市販されている  
proEXPRESSION kit を用いてアルブミ  
ン結合ペプチドを分離した。ZipPlate  
C-18(Millipore 社)を用いて脱塩後、  
Perkin-Elmer 社 の  
MALDI(matrix-assisted laser  
desorption/ionization) plate に添  
付し、マトリックスとして sinapnic  
acid を用いた。四重極搭載の飛行時間  
型質量分析器(ProTOF2000  
Perkin-Elmer 社)にて1000-8000 m/z  
の範囲でスペクトラを3回測定した。  
得られたペプチドデータは独自に開  
発したソフトウェア NCC-ProteoJudge  
にてピーク検出し、ペプチドピーク強

度を取得した。ペプチドピーク強度は総強度補正を行い、症例間で一定の値とした。

### 膵癌のペプチド性腫瘍マーカーの開発に関する研究

目的ペプチドの血中での測定系構築のために、C端およびN端を認識する抗体を各種作成した。さらに標識ペプチドを合成し、ELISA系およびRIA系を確立した。分泌ペプチド、蛋白質の同定には多次元液体クロマトグラフィーで分離した試料のタンデム質量分析法を用いた。分析試料には培養細胞の上清から調製した蛋白質およびペプチド画分を用いた。両者を分離後、定法によるショットガン的なプロテオーム解析および、本研究者が確立しているペプチドーム解析の手法で同定した。そのプロファイルは膵癌培養株でのみ同定されるペプチド選択の基礎データとした。

### 悪性腫瘍において異常を来している血清タンパク質の網羅的解析

血漿あるいは血清サンプルを使用した。血漿（血清）タンパク質のうち比較的量が多いアルブミン、トランスフェリン、ハプトグロビン、alpha-1-antitrypsin、IgG、IgAなどを抗体カラムで除去した。次に、イオン交換法で分画をとった。各分画に含

まれるタンパク質を超高感度の蛍光色素で標識した。その後、異なる検体から得られた分画はそれぞれ異なる蛍光色素で標識し、比較したいサンプルどうしを標識後に混ぜ合わせたあと二次元電気泳動法で分離した。泳動終了後にゲルをレーザースキャナーでスキャンすることでタンパク質はスポットとして検出し、定量情報は蛍光シグナルの強度から定量した。タンパク質スポットに対応するタンパク質の同定は、ゲル中に含まれるタンパク質をトリプシン処理し、ペプチド化して質量分析装置にかけることで行った。質量分析装置はイオンとラップ型のLC-MSMS (LTQ) を使用した。肺がん血漿サンプルと膵がん血清サンプルを用いて健常者に比べ発現が異常になっているタンパク質を探索した。

### 膵癌診断における $\alpha 1, 4\text{-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子}$ をターゲットとした定量 RT-PCR 法の臨床的有用性

膵癌患者 55 名、慢性膵炎患者 10 名、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 total RNA を抽出、逆転写酵素により cDNA を合成し、 $\alpha 4\text{GnT}$  遺伝子に特異的なプライマー (5'-GTTTTCTCTTCCCTTTGGATATGA-3'、5'-AGCTGATGTGGAGCCAGTTTCT-3') と

TaqMan プ ロ ー プ (5'-TGGTACAATCAAATCAACGCCAGCGC-3')を用いて real-time RT-PCR を行った。同時に multiplex PCR にて GAPDH mRNA の発現量も定量し、 $\alpha$  4GnT mRNA/GAPDH mRNA  $\times 10^7$  を  $\alpha$  4GnT mRNA の発現量と定義した。さらに膵癌患者については同時に膵癌関連腫瘍マーカーである CEA、CA19-9、DU-PAN-2 及び Span-1 を測定した。

### 体液診断への応用を目指した腫瘍のバイオマーカーの開発 に関する研究

#### 1) 対象

膵がん細胞株 (AsPC-1, MIApaca2, PANC-1, Qcp-1, Kp3, Kp4, BxPC3, H48N, YPK1, YPK2, S2-013, PSN1)、白血病細胞株 (HL60RG, Raji, K562, Daudi, U937, NB4)、消化器系癌細胞株 (MKN1, MKN7, MKN28, MKN45, MKN74, KATO III, NEDATE, SW1116, C-1, Colo320 HSR)、脳腫瘍 (Daoy, PFSK, ON776, TE671, uw228, D283) などがん細胞株 39 種、大腸がん患者組織 (癌部と正常粘膜、25 症例)、正常組織 (パネルセル 16 種類; クロンテック社)、全血 14 種 (正常人 9 人、白血病 5 人)

#### 2) 遺伝子メチル化の解析

種々の遺伝子のプロモーター領域のメチル化について sodium

bisulfite 処理した DNA を試料として PCR に基づいた分析法を用いて解析した。遺伝子発現量は、精製した RNA を試料として、RT-PCR によって調べた。

#### 3) スプライシングバリエーションの解析

Hedgehog シグナル伝達遺伝子 3 種類 (PTCH1, GLI1, SMO) の発現スクリーニングを RT-PCR により行った。PTCH1 発現スクリーニングで目的以外のバンドについては、それぞれのバンドをゲルから切り出し再度の PCR および塩基配列決定によりスプライシングバリエーションを同定した。さらにそれらスプライシングバリエーションに特異的なプライマーを作成し、RT-PCR、Real-time-PCR で、正常遺伝子と発現組織・発現量を比較した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト試料を研究に使用する際には、

「臨床研究に関する倫理指針 (平成 15 年厚生労働省告示第 255 号) 等の指針に沿って計画を作成し、研究計画は事前に各施設の倫理委員会の審査を受け、研究によって提供者の不利益が生じない事を確認し、承認を得た後に行った。本研究では「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に定められている生殖細胞系のゲノム・遺伝子情報は含まれない。

### C. 研究結果

## プロテオーム解析による新規腫瘍マーカーの探索

膵がん患者 71 例と対照者 71 例の結果を学習セットとして質量と発現量を、独自に開発した解析ソフトウェアをもちいて support vector machine、neural network、fuzzy neural network などのアルゴリズムで統計解析するシステムにて機械学習法を行い、がん患者に固有に見られるタンパク質発現パターンを同定した。このパターンは別の検証セット（膵がん患者 33 例と健常者 45 例）の血漿を判別率 91.0% (71/78) と高精度に診断できた。さらに既存の腫瘍マーカーである CA19-9 と組み合わせることで病期 I 期の早期症例を含めた膵がん症例の 100% が検出可能であった。

子宮体がん患者と対照者で Mann-Whitney U 検定で P 値が 0.00001 以下、Receiver operating characteristics (ROC) 曲線下面積が 0.8 以上で鑑別が可能なピークを 3 本同定した。対照者の平均値+標準偏差の 2 倍値をカットオフとすると、感度 65% (60/92)、特異度 94% (32/34) で子宮体がん患者を検出することが可能であった。さらに手術病期が 0 期や I 期の早期症例でも、それぞれ感度 67% (4/6)、60% (38/63) で検出可能であった。さらに 3 本のピークを組み合わせることで、感度 65% (60/92)、特

異度 94% (27/30) で子宮体がん患者を検出でき、CA125 の感度 22% (17/77)、特異度 90% (27/30) を上回った。

## 膵癌のペプチド性腫瘍マーカーの開発に関する研究

1) 本研究に先立つ研究で、表面改良型レーザー脱離イオン化質量分析計を用い膵癌に特徴的なペプチドとして明らかにした DMBT1 および、ある分泌蛋白質のプロペプチド部分に対する抗体を作成し、前者は ELISA の系、後者は RIA の系を構築し、血中濃度を測定可能とした。DMBT1 のフラグメントを対象とする ELISA 系では、健常者 24 例に対し、慢性膵炎 25 例膵癌 34 例 (stage II 以上) の血清中で高値になる傾向を認めた。後者のペプチドは RIA 系で測定し、大腸癌や膵癌の血漿で高値を示す傾向を認めた。従来の腫瘍マーカー CA19-9 陰性の進行膵癌 3 例で健常者に対して有意に高値を呈することが判明した。

2) 昨年樹立が報告された膵癌培養株の上清のプロテオームおよびペプチドーム解析を実施した。合計で 1502 個の非酵素消化 (内在性) ペプチド、および消化断片の配列情報を得ることができ、385 種類のタンパク質前駆体を明らかにした。大腸癌、膵管上皮、膵内分泌腫瘍培養細胞との比較の結果、これらの中で、膵癌に特徴的と考



えられ、積極的なプロセッシングが推定される前駆体が 19 種類見出された。内訳は膜タンパク質 12、分泌蛋白質 2、その他 5 であった。これらの中には、上記の 1) で記載の 2 前駆体が含まれていた。

#### 悪性腫瘍において異常を来している血清タンパク質の網羅的解析

イオン交換カラムで分画を取ったサンプルを逆そうカラムで分画し、さらに SDS-PAGE で各分画に含まれるタンパク質を分離する方法を初めに検討した。多くのカラムを試したが、逆そうカラムからの回収率が芳しくなかったためイオン交換後のサンプルは二次元電気泳動で分離することにした。肺がんにおいては血漿サンプルを使用して、イオン交換で 8 分画を取って二次元電気泳動で分離した結果、3890 のスポットが観察できた。プールした健常者とがん患者のサンプル間で 2 倍以上の発現差があったタンパク質スポットは 364 スポットでこれは 58 の遺伝子産物に対応していることが質量分析による解析から分かった。次に膵がんにおいては血清サンプルを使用した。肺がん血漿サンプルを用いた実験の過程で、分画の数を増やしても観察できるタンパク質の種類はそれほど増えていない印象を受けていたので、分画をとる数を 5 つに減ら

した。結果的に 1200 のスポットを観察し、健常者とがん患者の間に発現差が 2 倍以上ある 33 のスポット (10 遺伝子産物) を同定した。いくつかのタンパク質については抗体を用いてバリデーションを行ったが、SDS-PAGE/Western blotting では二次元電気泳動の結果を再現できないものもあった。いずれのサンプルにおいても同一の遺伝子に由来するタンパク質が異なるスポットとして繰り返し検出されたことから、血漿 (血清) 中ではタンパク質はさまざまな翻訳後修飾を受けていることが分かった。さらに同一の遺伝子に由来していても、がん患者サンプルにおいて増加しているものもあれば減少しているものもあるというタンパク質が多数見つかった。膵がんにおいては leucine-rich alpha 2 glycoprotein (LRG) の発現が亢進していることに着目し、追加症例においても LRG の発現異常を確認した。

#### 膵癌診断における $\alpha$ 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子をターゲットとした定量 RT-PCR 法の臨床的有用性

膵癌患者群と健常人群で得られた  $\alpha$  4GnT mRNA 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 10.5 を得た。従って、

$\alpha$  4GnT mRNA の基準値を 10.5 以下と定義することで各群を解析し、さらに群間の比較検討を行った。膵癌患者群の末梢血における  $\alpha$  4GnT mRNA の陽性率は 76.4% でありその発現量は  $37.50 \pm 5.44$  (平均  $\pm$  標準誤差)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% (0/1 例)、II 期 66.7% (2/3 例)、III 期 87.5% (7/8 例)、IV 期 76.7% (33/43 例) であり、また  $\alpha$  4GnT mRNA の発現量は病期の進行とともに増加の傾向にあった。膵内における腫瘍の占拠部位別の検討では、膵頭部癌 78.1% (25/32 例)、体尾部癌 73.9% (17/23 例) で  $\alpha$  4GnT mRNA 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 mRNA 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。また、切除された膵癌症例 23 例の癌組織を  $\alpha$  4GnT に対する特異抗体で免疫組織学的解析した結果と末梢血で検出された  $\alpha$  4GnT mRNA の結果は有意に相関していた。

また膵癌患者で同時に測定した CEA、CA19-9、DU-PAN-2、Span-1 の陽性率はそれぞれ 49.1% (26/53 例)、74.1% (40/54 例)、53.1% (17/32 例)、71.4% (20/28 例) であったが、何れの腫瘍マーカーも  $\alpha$  4GnT と同時に測定してどちらか一方あるいはその両者が陽性となった率が 86.8% (46/53 例)、

88.9% (48/54 例)、93.8% (30/32 例)、96.4% (27/28 例) といずれも腫瘍マーカー単独で測定した場合に比べて高かった。

一方、慢性膵炎患者群における  $\alpha$  4GnT mRNA の陽性率は 40.0% であったが、 $\alpha$  4GnT mRNA の発現量は  $17.87 \pm 6.98$  であり、膵癌に比較して有意に低値であった。また、健常人群でも  $\alpha$  4GnT mRNA は 17.1% に陽性であったが、 $\alpha$  4GnT mRNA の発現量は  $7.2 \pm 0.9$  と膵癌に比較して有意に低値であった。

#### 体液診断への応用を目指した腫瘍のバイオマーカーの開発に関する研究

##### 1) 各種遺伝子のメチル化

39 種類のがん細胞株を bisulfite-PCR-SSCP で調べた結果、hMAD2 遺伝子プロモーター領域にメチル化は認められなかった。また、RT-PCR により特に発現量に差がある例も認めなかった。

SNCG 遺伝子は、のメチル化している場合は発現が沈黙し、低メチル化によって SNCG 遺伝子の発現が生じていると考えられた。しかし、メチル化しているにもかかわらず、発現が認められた細胞もあった。白血病・消化器癌・脳腫瘍でも約半数で低メチル化と SNCG 遺伝子の発現が認められた。健常人の全血から抽出した DNA ではメチル

化しており、発現は認められなかった。

SARP2 遺伝子のメチル化は膵癌細胞株 3/12、白血病細胞株 6/6、消化器系癌細胞株 12/12、脳腫瘍 4/6 に認められた。メチル化していた細胞株では SARP2 遺伝子の発現はみられなかった。5-aza-dC, TSA 含有の培養では脱メチル化され発現が回復した。

NPTX2 遺伝子のメチル化は、膵癌細胞株 13/13、白血病細胞株 6/6、消化器系癌細胞株 12/12、脳腫瘍 4/6 に認められた。メチル化していた細胞株では NPTX2 遺伝子の発現はみられなかった。5-aza-dC, TSA 含有の培養では若干脱メチル化されたが、十分な発現が認められるには至らなかった。

JAK2 遺伝子の F617V ミスセンス変異が、近年ヒト骨髄増殖性疾患において報告されてきたが、メチル化についての報告はない。そこで、白血病および固形癌の細胞株で JAK2 プロモーターのメチル化と遺伝子発現について検討を行った。その結果、Daudi で JAK2 遺伝子プロモーター領域と JAK2 遺伝子 exon1~inton1 内 CpG アイランドのいずれもメチル化していることが判明した。また、この細胞株では遺伝子発現が低かったことから、プロモーター領域のメチル化が発現を抑制していると考えられた。

RUNX1/AML1 遺伝子は、造血系細胞の発生・分化に必須の転写因子であり、

exon2 の上流のプロモーター領域に巨大な CpG アイランドを有している。さらに exon1 と exon2 に転写開始部位があり、多様な splicing variant を発現する。そこで、RUNX1 遺伝子の splicing variant 発現と、exon2 のプロモーター領域、exon2a および exon2b 内にある CpG アイランドのメチル化状態の関連について調べた。AML1a はほとんどの細胞株で発現がなく、発現していた場合でも薄いバンドが検出されるのみであった。AML1c は、固形癌細胞株の MKN1、KATOIII および Caki-1 で高発現していたが、その他は VMRC-RCW と VMRC-RCZ で発現がみられただけで、その他では認められなかった。固形癌細胞株では白血病細胞株と部位によって異なるメチル化パターンを示したが、3 種類の splicing variant 発現とメチル化パターンの間に、相関や法則を見出すことはできなかった。

## 2) PTCH1 遺伝子

PTCH1 遺伝子について 4 種の選択的スプライシング変異遺伝子を見いだした。遺伝子バンクの情報を照らし合わせると、いずれもエクソンの脱落したバリエーションであった。RT-PCR の産物の長さは、それぞれ 759bp, 557bp, 394bp, 239bp であった。そのうちの最も長い 1 種は、エクソン 2 を丸ごとスキップしたスプライシングバリエーション

トで、脳、肺、大腸、白血球においてがん特異的に発現している可能性が示唆された。また、がん細胞株 39 種類のいずれにも発現を認めた。大腸がん患者組織では、正常粘膜 25 種中 5 種 (20%) で発現を認めたのに対し、がん組織では 25 種中 18 種 (72%) で発現を認め、発現率はがん組織で有意に高かった。さらに同一患者の正常粘膜とがん組織で比較すると、13 人中 8 人 (62%) でがん特異的に発現を認め、定量 PCR でも同等の結果が得られた。

### 3) アミラーゼ遺伝子の発現プロファイル

正常組織 22 種、がん細胞株 35 種、大腸がん患者臨床検体 30 症例 (正常粘膜、がん組織のペア) について、今回確立した RT-PCR-SSCP 法でアミラーゼ遺伝子発現型のプロファイリングを行った。その結果、ほぼ全ての組織で AMY2B 遺伝子が発現しており、そのうち肺、腎臓、精巣、胸腺は唾液型の AMY1A 遺伝子、膵臓、脾臓、大腸は膵型の AMY2A 遺伝子、前立腺は AMY1A、2A 遺伝子が同時に発現していることが判明した。アミラーゼ産生骨髄腫細胞株 KMS-12-PE は AMY1A 遺伝子のみの発現を認めた。

### 4) 血清酵素遺伝子のメチル化

CKB の新しいスプライシングバリエント (エクソン 6 をスキップ) を見いだしたが、癌細胞株のみならず、精巣、

卵巣、膵臓などの正常組織にも発現していた。HL-60RG 細胞では、5-aza dC 添加により、スプライシングバリエントの割合が減少したことでプロモーターのメチル化の割合の変化が対応した。

LDHA のメチル化が悪性胚細胞性腫瘍で見出され、血清と腫瘍の LDH アイソザイムパターンに影響を与えていることが判明した。すなわち、臨床検査で用いられている検査結果は、DNA メチル化の影響も受けていることがわかった。

## D. 考察

### プロテオーム解析による新規腫瘍マーカーの探索

高分解能・高質量精度の質量分析装置を使用し、難治性の高い膵がん患者を 94% (207/220) の正診率で診断でき、さらに既存の腫瘍マーカーである CA19-9 と組み合わせることで、病期 I 期の早期症例を含めた 100% が検出可能な新規腫瘍マーカーを開発した。この成果は血液バイオマーカーによるがん検診に現実性があることを示したものである。さらに対象を膵がん以外の臓器にも範囲を拡げ、より汎用性の高いがん検診に応用可能な血液診断法に発展させること、遠隔地を含めた全国の医療機関の血液検体にも対応できる搬送システムを確立す

ること、日本の中心的なプロテオーム研究施設が連携をとり最先端の技術を導入することが必要があると考えられる。

腫瘍組織より分泌されたペプチドはアルブミンなどの担体に結合することで、腎からの排出が抑制され、安定的に流血中に存在するものと考えられる。アルブミン結合ペプチドのプロファイリングががんの診断に有用性があることは国内外の研究者により指摘されていたが、本研究で初めてそれを実証した。また翻訳後修飾の異常を検出することで血清診断を行うことができる可能性がある結果が得られた。

本研究で発見した子宮体がんのマーカによる感度は65%であり、見落としがあるため、単独では子宮体がんの検診には用いることができない。子宮内膜細胞診、超音波検査などを補い、これらの検査と併用することにより、診断精度を上げることが期待される。

培養細胞の上清を対象としたペプチドーム解析とプロテオーム解析を別途に実施することにより、膵癌培養細胞から分泌されるペプチドを多数同定することが可能であった。

#### 膵癌のペプチド性腫瘍マーカーの開発に関する研究

膵癌の新しいペプチド性腫瘍マーカー

を開発する目的で、培養細胞の上清中のペプチドに着目し、解析をすすめた。膵癌特異的な分泌ペプチドとして同定済みの分子については本研究において血中での測定系を確立した。膵癌細胞が分泌するペプチドの全体像は不明であり、新たなマーカー開発に際しても重要な情報となる為、培養上清のプロテオームおよびペプチドームを解析した。膵癌に特徴的で、積極的なプロセッシングにより分泌ペプチドを生成する蛋白質が存在することを明らかにした。それらの前駆体には、膵癌組織において遺伝子・蛋白質レベルで高発現を示すことが既知の分子に加えて、新規の分子が含まれており、ペプチド性マーカーとしての今後の評価が必要と考えられた。

培養細胞から見出されたペプチドも、実際の生体内に存在し、血中での測定系を構築可能であった。両マーカーともCA19-9と無関係に高値を呈する傾向にあった。しかし、両者の測定によっても、慢性膵炎と膵癌を区別することは不可能であった。この点に関しては現在見出されている新たな候補ペプチドの測定系とあわせ、複数のマーカーペプチドの測定により、診断に活用しうるか否か評価する必要がある。血中での測定で高値を呈する場合、その産生亢進が腫瘍自身の産生によるものか否かは今後の検討が必要

である。また ELISA 系では必要な血清量は 100  $\mu$ L で実施可能な系を構築しえたが、RIA 系の場合、プロテアーゼ阻害剤添加の血漿を最低でも 1 mL 現状では必要であり、微量の検体で、複数のマーカーを評価するためにも測定系の高感度化が最も重要と考えられた。

#### 悪性腫瘍において異常を来している血清タンパク質の網羅的解析

本研究では、多次元液体クロマトグラフィと蛍光二次元電気泳動法を組み合わせた新しい実験系を新たに構築した。血漿（血清タンパク質）は少数のタンパク質が多量に存在するため、組織内タンパク質に比べ一般に発現解析は難しい。我々は抗体カラムを用いて多量に存在するアルブミンや IgG などをあらかじめ除去することでこの問題を解決した。次にタンパク質サンプルの複雑度をさらに減少させるために、タンパク質を陰イオン交換で分画した。ほとんどのタンパク質は陰イオン交換カラムに吸着するため、陰イオン交換による分画は有効である。問題はいくつ分画を取るかということだった。分画数が少なければサンプルごとの複雑度は下がらないが、逆にあまりに分画を取りすぎると、異なる分画に同じタンパク質が出現することが想定される。血漿と血清では最

適な分画の数が異なる可能性もあり、この問題はさらに検討が必要である。二次元電気泳動法は質量分析に次ぐ分離能力をもっているため、最終分離には有効である。発現解析に二次元電気泳動用の市販画像解析ソフトがそのまま使用できるというのも最終分離に二次元電気泳動法を用いるメリットである。本方法では質量分析によるタンパク質の同定が律速段階になっている。分離の再現性はよいので、スポットに対応するタンパク質を同定してデータベース化をすれば次回からは少ない労力で実験が可能であると考えられる。

#### 膵癌診断における $\alpha$ 1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子をターゲットとした定量 RT-PCR 法の臨床的有用性

$\alpha$  4GnT mRNA をターゲットとした定量 RT-PCR 法による膵癌の検出率は 76.4% であり、その陽性率は CA19-9 や Span-1 とほぼ同様であった。また、CEA 等、他の腫瘍マーカーと併用することでその膵癌検出率は 86.8% 以上に上昇した。一方、検出困難な II 期の膵癌については今回検討し得た症例が 3 例と少ないものの、その 2 例において  $\alpha$  4GnT mRNA が陽性となったことから、 $\alpha$  4GnT mRNA は早期膵癌に対する新たな腫瘍マーカーとして期待で

きる。

本研究では末梢血中の膵癌細胞を実際に同定するまでには至っていないが、免疫組織化学的に検討した切除膵癌組織における $\alpha$ 4GnT 蛋白の発現パターンと、末梢血における $\alpha$ 4GnT mRNA の測定結果が有意に相関していることから、本アッセイ法で検出された $\alpha$ 4GnT mRNA は末梢血中の膵癌細胞由来であることが強く示唆された。

一方、慢性膵炎患者の40%と健常人の17.1%においても $\alpha$ 4GnT mRNA が陽性となったが、その発現量は膵癌に比較し有意に低値であり、また $\alpha$ 4GnT mRNA は胃潰瘍や胃生検後等、胃粘膜障害を生じた場合にも一過性に陽性となることから (Shimizu et al, Am J Gastroenterol, 95, 3017-3018, 2000)、これら非膵癌患者で検出された $\alpha$ 4GnT mRNA は炎症等によって末梢血に流入した胃の腺粘液細胞や腺粘液を産生する膵管上皮細胞由来である可能性が考えられる。

今後は膵癌や胃癌診断における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前向きコホート研究を行うと同時に、 $\alpha$ 4GnT 蛋白に対する2種類のペプチド抗体を得たので、これらを用いてELISAによる測定系を作成する予定である。また、平成17年度の研究成果により、 $\alpha$ 4GnT mRNA をターゲットとしたRT-PCR法が腹水中

に存在する胃癌細胞の検出および予後の推定に有用である可能性が示されたので、この点についても更に症例数を重ね、前向きコホート研究を行うことで本アッセイ法の臨床的な有用性を検証する予定である。

### 体液診断への応用を目指した腫瘍のバイオマーカーの開発に関する研究

がんにおいては、その発がんの過程から、いくつかの遺伝子のメチル化が、多くは発現量の増減を介して関与していることがわかっている。正常組織とは異なるメチル化体系を示す遺伝子を見いだせば、そのメチル化、もしくは低メチル化を指標として、異常ながん細胞の存在を知ることができると考えられ、有望視されている。そこで、我々はピンポイントではあるが、がんの分子マーカーとして使用できるDNAメチル化の標的分子を見いだすべく、検討を加えた。hMAD2は、乳癌や肺癌では発現量の低下が、一方胃がんでは発現量の亢進が報告されている。すなわち、メチル化の態度に特徴的な所見が得られると考え検討したが、全てのがん細胞株でメチル化は認めなかった。SNCGは、乳がんや卵巣がん、膵がんでは発現量の増加を示し、メチル化の低下が原因の一つと考えられるため、低メチル化がマーカーにな

る可能性が考えられた。健常人の全血から抽出した DNA を調べたところ、メチル化しており発現はみられなかった。すなわち、低メチル化を指標としたマーカーは役に立つかもしれない。JAK2 プロモーターのメチル化は現在のところ Daudi のみにみられたため、その頻度はかなり低いことが予想される。SARP2、NPTX2 に関しては、メチル化が高率に見いだされたので、がん化によってメチル化される遺伝子のグループとして、多変量解析の一つのマーカーとして使用できる可能性が示された。その際、定量的に扱い、感度と特異度を十分考慮する必要がある。

我々は 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。今回判明した CKB 遺伝子の結果も合わせると、プロモーター領域のメチル化はスプライシングバリエントの生成に関与しているのではないかと推定した。ただ、RUNX1 遺伝子では、それぞれのメチル化パターンと 3 種類の splicing variant 発現プロファイルの関係に相関や法則を見出すことはできなかった。すなわち、メチル化はスプライシングに関与する場合があると考えるにとどめる必要がある。

アミラーゼ遺伝子の発現プロファイルには RT-PCR-RFLP 法が用いられて

きたが、複数の種類の制限酵素を用いて、複数ステップを要した。また、制限酵素では不完全消化を必ず伴うこともあり、正確性に問題があった。そこで、今回 RT-PCR-SSCP 法を開発し、1 回の泳動で、1A, 2A, 2B それぞれの割合が分別できた。アミラーゼ産生骨髄腫の細胞株では 1A の発現が増えており、本来アミラーゼ活性を持たない組織におけるアミラーゼ活性は 1A 型によると考えられた。

ヘッジホッグシグナル伝達遺伝子群は、はじめにショウジョウバエで同定された後、マウスやヒトなどの哺乳類においても相同遺伝子が同定され、機能解析が進められてきた。発生過程や生体機能の維持に重要な働きを有している。この遺伝子群には、Hedgehog (shh, Ihh, Dhh), Patched homolog (ptch1, ptch2), Smoothed homolog, Cubitus interruptus (Gli1, Gli2, Gli3) などがある。これらの一部は膵がんや前立腺がんで異常発現しているという報告がみられる。そこで我々は、これらの遺伝子群を RT-PCR によって発現解析を行い、特徴的なスプライスバリエントの存在を調べたところ、PTCH1 遺伝子でがん細胞に高頻度に発現しているスプライシングバリエントを見出した。CD44 のスプライシングバリエントのように存在診断・予後診断などに用いられるかどうか



か、症例を重ねて腫瘍マーカーとしての実用化を目指して検討を進めたい。

#### E. 結論

現在までに胃がん、膵がん、腎細胞がん、子宮体がんの早期診断や病態の診断に応用が期待できる腫瘍マーカーを開発した。今後発生頻度の高い腫瘍を含め、より汎用性の高い腫瘍マーカーの開発に発展させる必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**Ono M, Yamada T, et al.**

Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry.

*Mol Cell Proteomics. In press.*

**Sato S, Yamada T, et al.**

$\beta$ -catenin interacts with the *FUS* proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing.

*Gastroenterology. 129:1225, 2005.*

**Honda K, Yamada T, et al.**

Possible Detection of Pancreatic Cancer by Plasma Protein Profiling.

*Cancer Res. 65:10613, 2005.*

**Hayashida Y, Yamada T, et al.**

Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling.

*Clin Cancer Res. 11:8042, 2005.*

**Fujii K, Kondo T, Yamada T, et al.**

Protein expression pattern distinguishes different lymphoid neoplasms.

*Proteomics. 5:4274, 2005*

**Hayashida Y, Yamada T, et al.**

E-Cadherin Regulates the Association between  $\beta$ -Catenin and Actinin-4.

*Cancer Res. 65:8836, 2005.*

**Hara T, Yamada T, et al.**

Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry.

*J Urol. 174:1213, 2005.*

**Shibata T, Kondo T, et al.**

Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features.

*Clin Cancer Res. 11:6177, 2005.*

**Katoh H, Kondo T, et al.**

Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: identification of genetic indicators to predict patient outcome.  
*J Hepatol.* 43:863, 2005.

Mori Y, Kondo T, Yamada T, *et al.*  
Two-dimensional electrophoresis database of fluorescence-labeled proteins of colon cancer cells.  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 823:82, 2005.

Seike M, Kondo T, Yamada T, *et al.*  
Proteomic signatures for histological types of lung cancer.  
*Proteomics.* 5:2939, 2005.

Idogawa M, Yamada T, *et al.*  
Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/ $\beta$ -catenin complex.  
*Gastroenterology.* 128:1919, 2005.

Fujii K, Kondo T, Yamada T, *et al.*  
Proteomic study of human hepatocellular carcinoma using two-dimensional difference gel electrophoresis with saturation cysteine dye.  
*Proteomics.* 5:1411, 2005.

Naishiro Y, Yamada T, Kondo T, *et al.*  
Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic  $\beta$ -catenin protein.  
*Oncogene.* 24:3141, 2005.

Okano T, Kondo T, *et al.*  
Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE),  
*Proteomics.* In press

Fujii K, Kondo T, Yamada T, *et al.*  
Database of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins labeled with CyDye DIGE Fluor saturation dye.  
*Proteomics.* 6:1640, 2006.

Yokoo H, Kondo T, Yamada T, *et al.*  
Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells.  
*Hepatology.* 40:609, 2004.

Seike M, Kondo T, Yamada T, *et al.*  
Proteomic signature of human cancer cells.  
*Proteomics.* 4:2776, 2004.

Kondo T, Yamada T, *et al.*

Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool.

*Proteomics*. 3:1758, 2003.

Seike M, Kondo T, Yamada T, et al.  
Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized beta-catenin.  
*Cancer Res*. 63:4641, 2003.

**Honda K, Yamada T, et al.**

Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer.

*Gastroenterology*. 128:51, 2005.

**Honda K, Yamada T, et al.**

Alternative splice variant of actinin-4 in small cell lung cancer.

*Oncogene*. 23:5257, 2003.

**Miyakura Y, Maekawa M, et al.**

Methylation profiles of the *MLH1* promoter region and its relationship to colorectal carcinogenesis.

*Genes, Chrom Cancer* 35:17, 2003

**Li J, Maekawa M, et al.**

A common truncated variant of lipoprotein lipase in the Japanese population is characterized by increased atherosclerotic risk.

*Clin Chem Lab Med*. 41:1304, 2003.

**Maekawa M, et al.**

Hypermethylation of the promoter for the *LDHB* gene in cancer causes silencing of lactate dehydrogenase isoenzymes 1 to 4.

*Clin Chem*. 49:1518, 2003.

**Ishikawa J, Maekawa M, et al.**

Lactate dehydrogenase (LD) extra isoenzyme electrophoretic band between LD1 and LD2 caused by a complex with alpha1-lipoprotein. A case report.

*Clin Chem Lab Med*. 42:102, 2004.

**Miyakura Y, Maekawa M, et al.**

Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability.

*Clin Gastroenterol Hepatol*. 2:147, 2004.

**Takeshita A, Maekawa M, et al.**

Impairment of heart rate variability control during arsenic trioxide treatment for acute promyelocytic leukemia.

*Leukemia*. 18:647, 2004.

**Sahara N, Maekawa M, et al.**

Phenylarsine oxide (PAO) more intensely induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-resistant APL cell lines than As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by activating the

mitochondrial pathway.

*Leuk Lymphoma*. 45:987, 2004.

**Takeshita A, Maekawa M, et al.**

Deletion 6p23 and add(11)(p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia.

*Cancer Genet Cytogenet*. 152:56, 2004.

**Maekawa M, et al.**

Three-dimensional microarray compared with PCR-single-strand conformation polymorphism analysis/DNA sequencing for mutation analysis of K-ras codons 12 and 13.

*Clin Chem*. 50:1322, 2004.

**Maekawa M, et al.**

Methylation of mitochondrial DNA is not a useful marker for cancer detection.

*Clin Chem*. 50:1480, 2004.

**Ishikawa J, Maekawa M, et al.**

High lactate dehydrogenase isoenzyme 1 in a patient with malignant germ cell tumor is attributable to aberrant methylation of the LDHA gene.

*Clin Chem*. 50:1826, 2004.

**Shinmura K, Maekawa M, et al.**

Inactivating mutations of the human base

excision repair gene NEIL1 in gastric cancer.

*Carcinogenesis*. 25:2311, 2004.

**Maekawa M, et al.**

Problem with Detection of an Insertion-Type Mutation in the BCHE Gene in a Patient with Butyrylcholinesterase Deficiency.

*Clin Chem*. 50:2410, 2004.

**Maekawa M, et al.**

Pilot study of arbitrarily primed PCR-single stranded DNA conformation polymorphism analysis for screening genetic polymorphisms related to specific phenotypes.

*Clin Chim Acta*. 355:181, 2005

**Ishikawa J, Maekawa M, et al.**

Increased creatine kinase BB activity and CKB mRNA expression in patients with hematologic disorders: relation to methylation status of the CKB promoter.

*Clin Chim Acta*. 361:135, 2005.

**Izumi M, Maekawa M, et al.**

Increased serum alkaline phosphatase activity originating from neutrophilic leukocytes.

*Clin Chem*. 51:1751,2005.

**Shinjo K, Maekawa M, et al.**