

combined analysis of data from two phase II studies (an early phase II study and a late phase II study)
The Joint meeting of The 3rd ISC International Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy

Furuse J, Yonemoto N, Saito T, Okusaka T, Yamao K, Funakoshi A, Ohkawa S, Boku N, Tanaka K, Nagase N, Saishoi H.

Impact of systemic chemotherapy on the survival of patients with unresectable biliary tract cancer.
The Joint meeting of The 3rd ISC International Cancer Therapeutics and The 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy.

Ueno H, Okusaka T.

A multicenter phase II study of gemcitabine and S-1 combination therapy (GS therapy) in patients with metastatic pancreatic cancer.
2007 Gastrointestinal Cancer Symposium.

Ikeda M, Okusaka T, Ito Y, Ueno H, Morizane C, Furuse J, Ishii H, Kawashima M, Kagami Y, Ikeda H.

A phase I trial of S-1 with concurrent radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer.
2007 Gastrointestinal Cancer

Symposium.

Tanaka T, Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Ogura T, Hagihara A, Iwasa S.

A phase II trial of transcatheter arterial infusion chemotherapy with epirubicin-lipiodol emulsion for advanced hepatocellular carcinoma refractory to transcatheter arterial embolization.

2007 Gastrointestinal Cancer Symposium

池田公史、奥坂拓志、竹内義人、石井浩、古瀬純司、佐竹光夫、佐藤洋造、稲葉吉隆、荒井保明

進行肝細胞癌に対するFMP動注療法の第I相臨床試験。

第31回リザーバー研究会。

Ueno H, Sato T, Yamamoto S, Tanaka K, Ohkawa S, Takagi H, Yokosuka O, Furuse J, Saito H, Sawaki A, Kasugai H, Osaki Y, Fujiyama S, Sato K, Wakabayashi K, Okusaka T.

Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral lectoferrin for chronic hepatitis C.

17th APASL Conference

Nagakawa Y, Tsuchida A, Ozawa T, Kasuya K, Saito H, Ikeda T, Aoki T.
Effectiveness of intraoperative frozen section for diagnosis of

unsuspected gallbladder cancer
 during laparoscopic surgery.
 16th China-Japan Joint Congress for
 Gastroenterological Surgery

Aoki To, Suzuki Y, Sumi T, Takagi M,
 Yasuda Y, Yoneda K, Ogata T, Nomura
 T, Tsuchida A, Aoki T.
 Our technique of
 pancreaticogastrostomy following
 pancreaticoduodenectomy.
 16th China-Japan Joint Congress for
 Gastroenterological Surgery

榎本正統、土田明彦、横山智央、鵜田
 博美、宮澤啓介、青木達哉
 胆管細胞癌細胞株における Vitamin
 K2 の抗腫瘍効果に関する検討
 第 61 回日本消化器外科学会総会

永川裕一、土田明彦、小澤 隆、粕谷
 和彦、斎藤 準、池田隆久、遠藤光史、
 富岡英則、青木達哉
 尾側膵切除における膵切離方法と膵
 液瘻発生の検討
 第 61 回日本消化器外科学会総会

逢坂由昭、高木 融、星野澄人、立花
 慎吾、林田康治、土田明彦、青木達哉、
 本田一文、山田哲司
 血中プロテオーム解析による食道癌
 術前化学放射線療法の効果予測
 日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会、
 第 2 回日本臨床プロテオーム研究会

日比康太、岩屋啓一、土田明彦、青木

達哉、向井 清
 通常型膵管癌と膵管内乳頭粘液性腫
 瘍 (IPMNs) との浸潤転移との関係
 第 44 回日本癌治療学会総会

永川裕一、土田明彦、粕谷和彦、小澤
 隆、斎藤 準、池田隆久、青木達哉
 Gemcitabine による膵癌術後補助化学
 療法の安全性と有効性
 第 68 回日本臨床外科学会総会

H, 知的財産権の出願・登録状況 (予
 定を含む)

1、特許取得
 「膵臓がん診断用マーカータンパク
 質」として平成 18 年 1 月 26 日財団法人
 ヒューマンサイエンス振興財団よ
 り国際特許出願 (PCT/JP2006/301243)

2、実用新案登録
 なし

3、その他
 なし

厚生労働科学補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）分担研究報告
がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

「実用化を目指した血漿プロテオーム解析の自動化と再現性の確保」

	氏名	所属	職名
分担研究者	本田一文	国立がんセンター研究所化学療法部	室長

研究要旨

難治がんのひとつである膵がんの死亡率を減少させるためには、治癒可能な早期膵がんを非侵襲的な方法で検出し、治療を開始する戦略が有効である。血漿ペプチドプロファイルを利用した膵がん診断法の可能性を昨年度までの研究で報告してきた。本年度は、昨年度までの研究成果を実際の検診に応用するための研究に特化し、実用化を目指して以下の4点について技術開発を行った。

- 1) 測定装置と試薬の安定性と再現性の確保
- 2) 測定の自動化と高速化
- 3) 得られたデータの品質管理法と多検体計測時の解析結果統合法の確立

A. 研究目的

膵がんは主要な固形がんの中では最も予後が不良で、その5年生存率は6%と低率である（地域がん登録共同調査）。わが国で1年間に22260人の方が膵がんのために死亡し、がんによる死亡原因の第5位を占めている（平成16年度厚生労働省「人口動態統計」）。膵がんが難治性である理由は、早期から周囲組織に浸潤性増殖をきたし、肝臓やリンパ節などに転移巣を形成することにより外科的な根治的切除術施行が困難だけでなく、臨床症状が乏しいため先に述べた根治切除術を施行可能な患者を有効に検出する方法が存在しないことなどが理由にあげられる。事実、

全国膵がん登録20年間の集計によると、膵がん症例の約95%が発見時、臨床病期IIIまたはIVの進行がんであると報告されている。このような膵がんの生命予後を改善させるためには、切除可能な膵がんを有効に検出できる診断法が開発が望まれており、もしこのような診断法が開発されれば、予後成績は飛躍的に向上することが期待される。

現在、膵がんでは臨床的に使用される腫瘍マーカーはCEA、CA19-9、エラスターゼIがあげられるが、早期膵がんに対する検出感度は十分ではなく、腫瘍の最大径別でみた陽性率はそれぞれT1で0%、0%、30%、T2で0%、25%、8%でしかない。ま

た、胆石や膵炎のような良性疾患にも高値をしめすことが多く、膵がんを有効的に検出するマーカーとしては、満足できるものではない。

近年、プロテオームの研究手法が急速な進歩をとげ、血液中に含まれる微量なタンパク質やペプチドが網羅的に解析できるようになってきた。われわれは、Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spectrometry (SELDI-TOF-MS)法を独自に改良し、高分解能質量分析装置と SELDI-TOF-MS法を組み合わせた分析法 (SELDI-QqTOF-MS法) とその解析結果を解析するソフトウェア

(NCC-ProteoJudge) を開発し、多数の膵がんと良性膵臓疾患患者ならびに健常者血漿の血漿ペプチドプロファイルを網羅的に取得してきた。このプロファイルをバイオインフォマティクス的手法を用いて膵がんと健常者を判別するマーカー開発を試みるところ、既存のCA19-9の値と組み合わせることで、早期膵がんを含めて膵がん患者を100%検出するペプチドパターンの同定に成功し、臨床応用への可能性について報告してきた

(Honda et al. 2005)。本研究の目的は、この診断法を検診に応用できるように基盤を整備し、それを実用化することにある。本診断法を実用化し検診に応用できれば、先に記述したように膵がんの生命予後を著しく改善することが期待される。

われわれは、昨年までに報告して

きたSELDI-QqTOF-MS法を用いて実用化を目指していたが、最近では下記にあげる問題点もみえてきた。

- 1) SELDI-Q q TOF-MS法に使用するプロテインチップは米国サイファージェン社が特許取得している技術であるため競合品が存在せずまた国立がんセンター研究所で独自に仕様を変更することが不可能なため、製品の安定供給と品質管理の面で問題がある。
- 2) SELDI-Q q TOF-MS法に使用する質量分析計はアミノ酸構造を同定するために特化した高精度・高解像能質量分析計のために、質量分析計の解析速度と長期間の安定的稼動に問題がある。
- 3) 得られたデータの品質を管理する方法と多検体を計測した場合に解析結果を統合し評価する方法が存在しない。

そこで本年度は以下の研究方法を用い、上記4つの問題点の克服に努めた。

B. 研究方法

1) プロテインチップの安定計測と解析速度の向上について

変性した標準血漿サンプルを、H50 EBMキット (バイオラッド社製) のプロトコールに従い逆相クロマトグラフィー用のプロテインチップH50 (バイオラッド社製) の48スポット (8スポット、6本分) をバイオメック

2000 (ベックマンコールター社製)を用いて作製した。プロテインチップの計測には、4重極搭載高分解能質量分析計proTOF 2000 (パーキンエルマー社製)を国立がんセンターとパーキンエルマー社と共同で改良を行い、プロテインチップ計測用アダプターを開発し質量分析した。計測は1サンプルあたり3回の重複計測とし、計測された結果は後に詳述する三井情報開発社と国立がんセンター研究所との共同開発ソフトウェアであるNCC-ProteoJudgeを使用し、検出総ピーク数、相関係数分布、4本の膀胱がん血漿マーカーピークのCV値を計算した。

2) SELDI-QqTOF-MS法に変わる逆相コート磁気ビーズクロマトグラフィーMALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) 法の開発とその日々測定間誤差、測定試薬製造ロット間誤差を補正するアルゴリズム開発

SELDI-QqTOF-MS法に変わる高速度、高再現性を有する計測システムを開発に着手した。逆相c8官能基をコートした磁気ビーズClinProt C8 kit(ブルカードルトニクス社製)とClinProtロボットシステムを国立がんセンター仕様に部品を改造したシステムを採用することでクロマトグラフィー処理を96サンプルと、それを4重複で384個のスポットとしてテフロン金蒸着MALDIプレート上に全自

動でスポットできるシステム開発を試みた。

検体総数が多くアッセイを長期間かけて行う場合や、それに伴い測定試薬の製造ロットが複数にわたらざるを得ないなどのことが今後の実用化に向けて想定される。よって測定の日日間誤差と測定試薬の製造ロットによる測定の影響を明らかにする必要があった。そこで本システムを用いて標準健常者血漿をc8磁気ビーズでクロマトグラフィーしたのち4992個のMALDIプレート上にスポットし、これらスポットすべてをprTOF 2000で質量分析することで、本システムの定量再現性と測定日日間再現性を明らかにすることにした。本解析は異なった製造ロット番号のClinProt c8磁気ビーズを2種類用いて各々2688回と2304回の計測を行っており、製造ロット間による計測誤差を明らかにした。さらに異なったロット間で計測される結果を統合し定量性をソフトウェア上で補完するアルゴリズム開発を試みた。計測したデータは前処理クロマトグラフィーを別々に4回、またそこから得られた抽出液を4回質量分析する計16重複計測を1単位としてデータを統合し、NCC-ProteoJudgeを用いて、検出ピーク総数、各アッセイの相関係数、膀胱がんマーカー候補である4本のピークのCV値を計算した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会によ

る審査を受け、承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮して健常人より得られた血漿検体を用いた。

C、研究結果

1) プロテインチップの安定計測と解析速度の向上について

国立がんセンター研究所とパーキンエルマー社との共同で、4重極搭載直行型高分解能質量分析計を改良し、プロテインチップが計6本全自動計測できるシステムを開発した。前年度まで使用していた質量分析計

(Q-star XL, アプライドバイオシステムズ社製) では90秒ごとに1スポット毎でレーザ照射を手動で行わなければならない、8スポット終了後1本枚でプロテインチップを差し替えるという作業が必要であった。そのため、6本計測のためには1時間半の時間が必要であり、その間研究者が機械の前に拘束されていたが、本システムを採用することにより、約3時間で6本を全自動計測が終了できるようになった。質量精度の安定性は、Q-star XLの場合は0.05%の質量誤差がみられたが、proTOF2000の質量誤差はさらに低く、0.015%程度の計測を可能にした。本計測によって検出されたピーク本数は2000~3000 m/zの範囲で1741本であり、その相関係数の平均値は0.9662であった。腫がんマーカーとなる8766 m/z, 14778

m/z, 17272 m/z, 28080 m/zの4本のピークのCV値 (アッセイは複数日に及ぶが日々間補正なし) はそれぞれ0.2225、0.1730、0.2047、0.4124であった。

2) SELDI-QqTOF-MS法に変わる逆相コート磁気ビーズクロマトグラフィー-MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) 法の開発とその日日間測定誤差、測定試薬製造ロット間誤差を補正するアルゴリズム開発

SELDI-QqTOF-MS法はサイファージェン社の特許技術であり、当研究所で独自に仕様の変更等を行うことができない。安定供給の面からも不安が残り、事実2006年の11月に SELDI-QqTOF-MS法の販売権はサイファージェン社からバイオラッド社に移管された。このような事実を鑑み、2007年の1月には、1) バイオラッド社は国立がんセンター研究所に対し事前に連絡なく仕様の変更や製品の販売中止などが無いよう安定的に製品を納めることと、2) 国立がんセンター研究所に限りproTOF2000などのバイオラッド社と無関係な質量分析メーカーの質量分析計を用いても特に異論は唱えないという約束を書面にて交わした。しかしながら、今後の実用化を考えた場合は、SELDI-QqTOF-MS法だけに頼るのではなく、われわれが独自に品質管理と仕様の変更が可能で簡便な測定系の

開発が必須であると考えられる。そこで、研究方法に記載したClinProtoc8磁気ビーズを採用し、MALDI-TOF-MS法によるプロファイル法を開発に着手した。国立がんセンター研究所仕様のロボットシステムで96個の血漿サンプル逆相クロマトグラフィーで処理した後、4回重複で384個のMALDI スポットまで全自動で行っても約2時間程度で終了できるシステムを確立した。また384個にスポットされたMALDIプレートをproTOF2000で質量分析しても分析は約10時間程度で終了した。16重複測定を1単位として仮定し測定しても前処理を含めて本システムは1日に24検体を全自動でこなせる能力を持つ。16重複実験結果を統合した場合の総ピーク数は1917本で、1プレート内での測定再現は相関係数の平均値は0.9875であった。膵がんマーカーになりうる8766 m/z, 14778 m/z, 17272 m/z, 28080 m/zはすべて十分なS/N比を持って検出でき、そのCV値はそれぞれ0.0417、0.0497、0.0322、0.0617であった。測定の日日間誤差を検討した。1プレート内における膵がんマーカー候補である4本のピークのCV値は前述の通りであったが、測定日を違えた場合のCV値は0.0840、0.0708、0.1079、0.1482と、若干の上昇がみられた。そこで、これらのCV値を改善する目的でプレート間強度比のM/Zに対するLowess補正で補正したところ、日日間測定誤差はCV値0.0591、0.0669、

0.0661、0.0897まで回復させることに成功した。このアルゴリズムによる結果補正法はNCC-ProteoJudgeに搭載した。製造ロット間誤差について検討したところ、ロットを違えて測定したときの4本のピークのCV値は0.1370、0.1266、0.3790、0.2171と上昇した。これらのCV値を改善する目的で製造ロット毎のピーク平均値と標準偏差が一致するように補正したところ、製造ロット間誤差に対するCV値は0.0555、0.0846、0.0759、0.0917まで回復した。このアルゴリズムによる結果補正法はNCC-ProteoJudgeに搭載した。

D, 考察

われわれは、昨年度までに質量分析法による血漿ペプチドプロファイル法を用いて膵がん患者検出の可能性を報告してきた。本年度はこの技術の精度をあげ、実際の検診法として実現可能かどうか、その妥当性を検討した。Q-star XL SELDI-QqTOF-MS法を用いた検討では、研究室レベルの検討では再現性等に問題なかったが、長期間にわたり質量分析計を安定的に維持すること、検査時間に長時間を要すること、機械の操作等が煩雑であることを考えると、実用化にはQ-starを用いた SELDI-QqTOF-MS法では不可能であると考えられた。そこで、プロテインチップの計測を6本まで自動計測でき

る質量分析計としてproTOF2000に変更することで高速化と安定化の可能性を探った。本機器を使用することにより、計測の煩雑さと質量精度は明らかに改善した。

しかしながら、SELDI-QqTOF-MS法による技術的な問題点と実用化に向けた障害をあぶり出したところ、特許技術である以上これ以上の精度管理や技術開発は困難であることがはっきりしたため、これに変わる方法を独自に開発することとした。そこで磁気ビーズコートc8逆相クロマトグラフィーMALDI-TOF-MS法の開発を行った。本法の利点は、すべて既存の技術であるため国立がんセンター独自の技術開発が容易で、さらに試薬やロボット等の精度管理を自分たちとその周辺企業で行うことが可能なことである。また、コスト面でSELDI-QqTOF-MS法で使用するプロテインチップに比べて明らかに安価である。そのため、プロテインチップ使用時に比べて再現性向上のための多重アッセイを容易に行うことができ、そのためCV値も非常に低減させやすいという利点を持つ。また磁気ビーズであるため製造ロット間誤差の問題を危惧していたが、製造メーカーに問い合わせたところ1ロットの製造は4万回アッセイ分以上が1単位であるため、多検体アッセイでも1ロットで通して検査を行うことが可能である。ただし、製品には有効使用期限があるため、実用化した場合はどうしてもロット間を補正する

技術が必要になる。これについての検討でも製造ロット毎のピーク平均値と標準偏差が一致するように補正を行うことによってCV値を低減させることができるため克服は可能である。さらに言えば、本アッセイシステムは384スポットを1日で計測するため16重複アッセイで行ったとしても1日24症例分を全自動で計測するという高速計測性能を有している。

以上述べてきたとおり本年度は、検診のための臨床検査法として確立するために、基礎的な技術開発を行ってきた。来年度は、本システムを使って、昨年度に解析した2施設から採取した血漿サンプルの検証実験を行う予定であり、さらに問題点を抽出する。その後は現在全国8施設から前向きに集められている検体を用いて感度と特異度を明らかにする予定である。

一方で本解析に使用している試薬、器具は必ずしも薬事法の規定にそったものではない。今後は薬事法の規定に鑑みた試薬開発と臨床治験を計画する予定である。

E、結論

- 1、 SELDI-QqTOF-MS法を改良して高速解析を可能にするシステム開発を行った。本改良型SELDI-QqTOF-MS法は従来まで使用していたものより、質量精度と再現性が高かった。
- 2、 SELDI-QqTOF-MS法に変わる新

たな解析系、磁気ビーズ逆相クロマトグラフィーMALDI-TOF-MS法を開発した。本解析系は、改良型 SELDI-QqTOF-MS法より解析速度が高速で、再現性が高く、さらに解析コストが安価であった。また、検診への実用化を鑑み、測定日日間誤差の補正法と検査試薬製造ロット間誤差の補正法を開発した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

(2006年4月1日から2007年3月31日まで)

1. 論文発表

- 1) Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. Mol Cell Proteomics. (in press)
- 2) Kikuchi S, Honda K, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Umaki T, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirhashi S, Yamada T. Serum Albumin-Associated Peptides of in Patients with Uterine Endometrial Cancer. Cancer Science, (in press).
- 3) Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Involvement of Splicing Factor-1 in β -Catenin/T Cell Factor-4-mediated Gene Transactivation and Pre-mRNA Splicing. Gastroenterology (in press)
- 4) Kakisaka T, Kondo T, Okano T, Fujii K, Honda K, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Yamada T, Kato H, Nishimura T, Todo S, Hirohashi S. Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life (in press).
- 5) Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene

- transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res.* (in press).
- 6) Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, Matsuzuki H, Hirohashi S, Yamada T. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 5(7):1338-47. 2006.
- 7) 本田一文 逢坂由昭、土田明彦、青木達哉、山田哲司 放射線感受性 - 血清ペプチドプロファイルを用いた食道がん術前化学放射線療法奏効性予測の可能性別冊医学のあゆみ, 341-344. 2006.
- 8) 下重美紀、本田一文、山田哲司 血液試料の最適な調整法と解析 バイオテクノロジージャーナル, 3-4:148-152. 2006.
- 9) 本田一文、山田哲司 腫瘍マーカーと包括的プロテオーム解析: ペプチドの包括的プロファイリングによる非侵襲的腫瘍マーカー開発 分子呼吸器病 10:133-135. 2006.
- 10) 本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司 '膀胱癌' 早期発見の新技术 日本臨床 64:1745-1755. 2006.
- 11) 本田一文、山田哲司 ゲノム・プロテオーム情報を利用した薬剤感受性・副作用予測 臨床と研究 83:1270-1755. 2006.
- 12) 山田哲司、本田一文 プロテオミクス解析による膀胱がんの血漿マーカーの開発 ファルマシア 43:32-33. 2007.
- 13) 尾野雅哉、本田一文、山田哲司 バイオテクノロジーのがん検診への応用とその将来性 公衆衛生 71:100-102. 2007.
- 14) 尾野雅哉、本田一文、山田哲司 腫瘍マーカー クリニカルプラクティス 26: 235-236. 2007.
- 15) 本田一文、尾野雅哉、山田哲司 血漿・血清がん診断法、新たな検診方法はあるのか。- 血漿ペプチドプロファイルによる難治がん患者検出の可能性- 呼吸器コモンディジーズ 肺がんのすべて, 49-51. 2007.
- 16) 下重美紀、本田一文、尾野雅哉、山田哲司 プロテオミクスの臨床応用への期待 Annual

Review 呼吸器 , 208-213.
2007.

1 7) 本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司 質量分析をもちいた血清・血漿プロテオーム解析によるがん診断マーカー開発法 細胞工学 (印刷中)

1 8) 本田一文、山田哲司 がん転移・浸潤に対するアクチン結合たんぱく質アクチニン-4の生物学的機能 生化学誌 (印刷中)

2、学会発表

1) Seki K, Honda K, Yamada T, Hirohashi S. Actinin-4 Expression in 187 Cases of Gastrointestinal Stromal Tumor (GISTs) of the Stomach and Intestine: An Immunohistochemical (IHC) Study. United States and Canadian Academy of Pathology, 2007 annual meeting 96th, 2007 San Diego USA.

2) Hara T, Honda K, Umaki T, Ono M, Hayashida Y, Niato K, Hirohashi S, Yamada T. TWO SERUM BIOMARKERS OF RENAL CELL CARCINOMA BY SURFACE-ENHANCED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY, 28th Congress of the Societe

Internationale d'Urologie.
2006, Cape Town, South Africa.

3) Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Development of a biomarker discovery software platform NCC-ProteoJudge for large scale clinical proteomics. International Cancer Biomarker Consortium Meeting 2006, Singapore.

4) Ono M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Plasma biomarker discovery by a new proteome platform 2DICAL. International Cancer Biomarker Consortium Meeting 2006, Singapore.

5) Yamada T, Honda K, Ono M, Hirohashi S. Biomarker discovery strategy of Japanese ICBC team. International Cancer Biomarker Consortium Meeting 2006, Singapore.

6) Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Association of the beta-catenin and actinin-4 proteins in infiltrating colorectal cancer cells. 97th Annual Meeting American Association for Cancer Research, 2006 Washington DC.

7) 本田一文、山田哲司、血漿

ペプチドプロファイルを用いた膵がん検出の可能性、第15回日本癌病態治療研究会 シンポジウム、2006年6月、東京

8) 本田一文、桑原秀也、佐久間朋寛、佐藤美和、山田哲司、大規模臨床プロテオーム解析に対応するマーカー探索ソフトウェアシステムの開発、第2回臨床プロテオーム研究会 一般演題、2006年7月、東京

9) 逢坂由昭、高木 融、星野澄人、立花慎吾、林田康治、土田明彦、青木達哉、本田一文、山田哲司、血中プロテオーム解析による食道癌術前化学放射線療法の効果予測、第15回日本癌病態治療研究会 シンポジウム、2006年6月、東京

10) 逢坂由昭、高木 融、星野澄人、立花慎吾、林田康治、土田明彦、青木達哉、本田一文、山田哲司、血中プロテオーム解析による食道癌術前化学放射線療法の効果予測、第2回臨床プロテオーム研究会 一般演題、2006年7月、東京

11) 原 智彦、本田一文、下重美紀、尾野雅哉、松山豪泰、内藤克輔、広橋説雄、山田哲司、Actinin-4による前立腺がん細胞増殖抑制効果に関するプロテオ-

ーム解析、第65回日本癌学会総会ワークショップ、2006年9月、横浜

12) 菊池 哲、本田一文、半田康、加藤秀則、山下幸紀、土田明彦、広橋説雄、山田哲司、プロテオミクス解析による子宮体癌の血清バイオマーカー探索、第65回日本癌学会総会 ワークショップ、2006年9月、横浜

13) 山田哲司、本田一文、下重美紀、尾野雅哉、広橋説雄、プロテオミクスによる大規模解析と臨床応用、第65回日本癌学会総会 シンポジウム、2006年9月、横浜

H、知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1、特許取得

「膵臓がん診断用マーカータンパク質」として平成18年1月26日財団法人ヒューマンサイエンス振興財団よりPCT出願 (PCT/JP2006?301243) を行った。

2、実用新案登録
なし

3、その他
なし

厚生労働科学研究補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発
近藤格

プロテオーム バイオインフォマティクス プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨

既存の血清腫瘍マーカーのほとんどはタンパク質あるいはタンパク質に結合した糖鎖であることから、血清タンパク質の発現を網羅的に調べる「血清プロテオミクス」による腫瘍マーカー開発は有望である。しかしながら、血中に存在する少数の多量の血清タンパク質のため、最新の高感度プロテオーム解析技術をもってしても微量な血清タンパク質の発現解析はきわめて困難であり、精度の高い血清腫瘍マーカーの開発には解析技術の工夫が必要とされている。本研究では、このような血清タンパク質の性格を踏まえ、既存のプロテオーム解析技術の特徴を活かした工夫を行い、血中に微量に含まれるタンパク質を定量的に解析し、がん患者で発現が異常になる血清タンパク質を同定している。昨年度までに、1) 6種類の多量血清タンパク質に対する抗体カラムで血清タンパク質を分画し、2) 分画した血清タンパク質をイオン交換カラムでさらに分画し、3) 蛍光二次元電気泳動法で個々の血清タンパク質の発現を定量的に比較し、4) 質量分析でタンパク質の構造解析・同定を行う、という手法を考案した。今年度は、この考案した実験系を用いて健常者と比較して膵がん患者で発現が異常になる血清タンパク質の同定を試み、leucine-rich-alpha 1 glycoproteinを新規に同定した。さらに、新しい試みとして、12種類の多量に存在する血清タンパク質に対する抗体を含む抗体カラムを用い、血中に多量に含まれるタンパク質をその他の血清タンパク質から分画し、蛍光二次元電気泳動で分離する試みを行った。また、多量に存在する血清タンパク質に結合して存在する血清タンパク質を分画する試みも行った。がん患者血清中で非特異的に検出される炎症性タンパク質をがん特異的血清タンパク質と区別する目的で、健常者血清ではなく慢性疾患患者の血清をコントロールとして用いることを検討した。今年度に新しく考案した方法を用い、肺がん患者血清と慢性呼吸器疾患患者血清とを比較し、両群で発現差を示す血清タンパク質の同定を行った。

A. 研究目的

液体クロマトグラフィーと蛍光二次元電気泳動法を組み合わせた血清タンパク質の発現解析の手法を考案し、がんの診断に役立つ血清腫瘍マーカーを開発することを目的とする。

B. 研究方法

B-1. 昨年度構築した手法を用いた膵がん血清腫瘍マーカーの開発

国立がんセンター中央病院を受診した10名の健常者および10名の膵がん患者より採血した血清を使用した。また、東京医科大学を受診した5名の健常者、4名の慢性膵炎患者、8名の膵がん患者の血清も使用した。

まず、市販されている抗体カラム (Multi Affinity Removal Column, Agilent社) を用いて、血清中に含まれる量が多い6種類のタンパク質を除去した。この6種類のタンパク質は、血清タンパク質のアルブミン、IgG、トランスフェリン、IgA、 α 1アンチトリプシン、ハプログロビンである。本カラムを素通りした血清タンパク質を、イオン交換カラム (GE Healthcare社) にて5つに分画し、遠心濃縮後に凍結保存した。液体クロマトグラフィーはGE Healthc

are社のAKTA Exploreを使用した。

次に、各分画ごとに全サンプルを少量ずつ混合したサンプルを作成した (計5種類)。このサンプルは超高感度の蛍光色素Cy3で、個別のサンプルはCy5で、それぞれ標識した。蛍光色素はGE Healthcare社のものであり蛍光二次元電気泳動法 (2D-DIGE法) 用に市販されているもので、標識条件は同社の推奨のものを使用した。Cy3またはCy5で標識されたサンプルは同量ずつ混合され、市販の大型二次元電気泳動装置を用いて等電点と分子量に従って分離された。等電点電気泳動はGE Healthcare社のMultiphor IIを使用し、等電点幅4-7、泳動距離24cmのイモビライズドライストリップゲルにて泳動を行った。分子量での分離はSDS-PAGEを用い、GE Healthcare社のEttanDalt IIを使用して泳動距離20cmで泳動を行った。ゲルのアクリルアミド濃度は9%から16%のグラディエントとした。

泳動後のゲルはTyphoon Trio (GE Healthcare社) を用いてスキャンした。画像解析には、GE Healthcare社のDeCyder二次元電気泳動画像解析ソフトを使用した。タンパク質スポットの定量情報の解析には、GeneData社のExpressionistを使用した。また、タンパク質スポットの回収には同社のSpotPick

erを使用した。

スポットに対応するタンパク質の同定には質量分析装置を用いた。回収されたスポットをトリプシンで処理し、タンパク質をペプチド化して回収した。回収したペプチドは、Thermo Electron社のLTQイオントラップ型質量分析装置にて分離し、質量とイオン価数を測定した。タンパク質の同定にはマスコット検索エンジンを使用した。

同定されたタンパク質の発現を検証する目的で、leucine-rich alpha-2-glycoproteinに対する抗体を用いたWestern blottingを行った。Western blotting用のタンパク質の分離には二次元電気泳動法とSDS-PAGEの両方を使用した。

B-2. 新しい手法を用いた肺がん血清腫瘍マーカーの開発

日本医科大学大学病院を受診した12名の肺がん患者および9名の慢性呼吸器疾患患者の血清を使用した。12名の肺がん患者のうち2名は、採血時にすでに手術を受けてから時間が立っており、画像上は再発が認められなかった症例である。

まず、市販されている抗体カラム (ProteomeLab IgY LC10、ベックマンコールター社) を用いて、血清中に含まれる量が多い12種類のタンパク質をその他の血清タンパク質から分画した。この12種類のタンパク質は、血清タンパク質の96%を占めるもので、アルブミン、IgG、トランスフェリン、フィブリノーゲン、IgA、 α 2マクログロブリン、IgM、 α 1アンチトリプシン、ハプログロビン、 α 1酸性糖タンパク質、アポリポプロテインA-1/A-IIである。本カラムで用いられる抗体は鳥類のIgY抗体であり、哺乳類タンパク質に対する強い抗原活性があり、しかも非特異的吸着が低い。本カラムを素通りした血清タンパク質を回収し、遠心濃縮後に凍結保存した。液体クロマトグラフィーはGE Healthcare社のAKTA Exploreを使用した。カラムに結合した画分のタンパク質を回収し、ウレアで処理しタンパク質同士の結合をはずし、バッファーで希釈することでウレア濃度を下げ、再度抗体カラムに添加した。この操作でカラムに再結合するタンパク質は12種類のタンパク質そのものであり、この操作でカラムを素通りする画分として回収されるタンパク質は12種類のタンパク質に結合していたタンパク質であると考えられる。すなわち、抗体カラムを用いた分画により、血清タンパク質は次の3つの画分に分けられる；1) 12種類のタンパク質ではなくこれらに結合もしない血清タンパク質、2) 12種類のタンパク質のいずれかに結合する血清タンパク質、3) 12種類のタンパク質そのもの。この分画操作はすべての症例の血清サンプルに対して行った。

次に、画分ごとに、全サンプルを少量ずつ混合し

たサンプルを作成した (計3種類)。このサンプルは超高感度の蛍光色素Cy3で、個別のサンプルはCy5で、それぞれ標識した。蛍光色素はGE Healthcare社のものであり蛍光二次元電気泳動法 (2D-DIGE法) 用に市販されているもので、標識条件は同社の推奨のものを使用した。Cy3またはCy5で標識されたサンプルは混合され、大型の二次元電気泳動装置を用いて等電点と分子量に従って分離された。等電点電気泳動はGE Healthcare社のMultiphor IIを使用し、等電点幅4-7、泳動距離24cmのイモビライズドライストリップゲルにて泳動を行った。分子量での分離はSDS-PAGEを用い、バイオクラフト社のGiantGelRunnerを使用して泳動距離38cmで泳動を行った。SDS-PAGEのゲルは同社のGiantGelMakerを使用して一度に13枚作成することで労力の軽減を図った。アクリルアミド濃度は9%から16%のグラディエントとした。泳動バッファー中のSDS濃度は通常よりも濃い濃度とすることで収束を向上させた。

泳動後のゲルはTyphoon Trio (GE Healthcare社) を用いてスキャンした。画像解析には、パーキンエルマー社のProgenesis二次元電気泳動画像解析ソフトを使用した。タンパク質スポットの定量情報の解析には、GeneData社のExpressionistを使用した。また、タンパク質スポットの回収にはAsOne社のGiantGelPickerを使用した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施については国立がんセンターの倫理委員会へ許可を申請し研究内容の妥当性や個人情報の扱いなどについて審査を受け承認を得ている。また試料提供者には同意を得ており、個人に不利益が及ぶことがないように配慮している。

C. 研究結果

C-1. 昨年度構築した手法を用いた肺がん血清腫瘍マーカーの開発

まず国立がんセンター中央病院にて得られた健常者と肺がん患者それぞれ10名の血清を用いた解析を行った。両群で濃度が異なるタンパク質スポットの検出を試みた。分画を取らなかった場合のタンパク質スポットの総数は290だったのに対し、分画を取ることで合計1200ものタンパク質スポットを観察することができた。そのうち、濃度差が統計的に有意 (Student's t-test, $p < 0.01$) なスポットは33個あった。そのうち27個のスポットは肺がん患者血清で健常者血清に比べ濃度が高く、6個のスポットは低かった。質量分析装置を用いて、これら33個のタンパク質スポットに対応するタンパク質を同定した。

同定したタンパク質の中でも、leucine-rich alpha-2-glycoproteinに特に注目した。このタンパク質は5つのスポットとして観察され、しかも肺がん患者血清中で健常者に比べ2倍以上の濃度の増加を

示していた。特異抗体を用いた二次元電気泳動/Western blottingにて、まず質量分析による同定結果を検証したところ、質量分析によるタンパク質同定実験の結果leucine-rich alpha-2-glycoproteinであると結論された5個すべてのスポットがleucine-rich alpha-2-glycoproteinに対する抗体に反応し、質量分析による同定結果が正しかったことが分かった。次に、同様に特異抗体を用いてSDS-PAGE/Western blottingにて血清中の本タンパク質の全発現差を検証し、使用した膵がん患者血清中で健常者に比べleucine-rich alpha-2-glycoproteinの発現が増加していることを確認した。健常者と膵がん患者の発現の差はきわめて明瞭であり、本タンパク質の血清腫瘍マーカーとしての有用性が強く示唆されるものだった。

次に、leucine-rich alpha-2-glycoproteinの発現の異常を他施設（東京医科大学）にて得られた追加血清サンプルでも検証した。5名の健常者、4名の慢性膵炎患者、8名の膵がん患者の血清をSDS-PAGE/Western blottingで調べた。3群を比較すると、平均値としては健常者、慢性膵炎患者、膵がん患者の順でleucine-rich alpha-2-glycoproteinの発現は高くなっていることが分かった。しかしながら、その発現差は国立がんセンターの症例ほどには明らかではなく、膵がん患者間での発現の差異（ばらつき）がかなり認められた。

C-2. 新しい手法を用いた肺がん血清腫瘍マーカーの開発

血清腫瘍マーカーを開発する新しい手法として、血清タンパク質を分離するために大型の二次元電気泳動装置(GiantGelRunner)を使用した。本装置は24 x 38cmの泳動面積でタンパク質を分離するものであり、個別化医療のためのバイオマーカー開発を目的として本プロジェクトにて開発されたものである。昨年度まで使用していた泳動装置(EttanDalt II)に比べ泳動距離は2倍になり、すなわち解像度が2倍向上している。本装置によって細胞内タンパク質であれば5000個以上のタンパク質スポットを一度に観察することが可能であることを確認している。従来のサイズだと観察できるスポット数はたかだか200個だったので、網羅性の点で著しい向上が認められた。泳動距離を延ばしたことでフォーカスがわるくなったスポットがあったが、泳動バッファーの組成を標準のものから変更を加えることで解決できた。しかしながら、分画をとらずに血清タンパク質を泳動すると、やはり量の多いタンパク質のスポットばかりが観察されてしまったことから、依然として前処理によってタンパク質サンプルの分画をとる必要があることが分かった。

新しい手法として、12種類のタンパク質を分画で

きるカラム(ベックマンコールター社)を使用した。本抗体カラムで分画されたタンパク質をさらにイオン交換によってさらに分画してから蛍光二次元電気泳動法にて分離する方法を当初検討した。昨年度と同様の分離条件を用いたが、イオン交換によって分画しても観察できるタンパク質スポットの数は少ない場合に比べてそれほど増加しないことが分かったため、スループロット性を考慮し、イオン交換による分画は行わないことにした。

アルブミンなど運搬タンパク質に結合している血清タンパク質を検出する目的で、抗体カラムに吸着したタンパク質を回収し、いったんウレアで処理してから再度抗体カラムに添加する実験を行った。この実験でカラムに吸着しないタンパク質は12種類のタンパク質のどれかに結合していたことになる。そのようなタンパク質を回収し、蛍光二次元電気泳動法にて分離したところ、他の分画とは明らかに異なる発現プロファイルが得られた。本方法によって従来の方法では観察困難であった微量の血清タンパク質を調べることができていることが分かった。同一サンプルを何度も異なる日時に分離したが、クロマトグラム上は再現性のよい分離が得られていることを確認した。以後もクロマトグラムはその都度記録し、再現性が低下していないことを確認している。

血清タンパク質は二次元電気泳動で分離された際に同心円状のスポットにならないものが多い。これは細胞内タンパク質ではあまり認められない現象で、糖鎖修飾の結果ではないかと推測している。蛍光二次元電気泳動法で通常よく用いられているGE Healthcare社のDeCyder二次元電気泳動画像解析ソフトは、非同心円状のスポットをいくつものスポットに分割して認識してしまうため、画像解析のレベルで再現性のよい解析を行うためには、その都度スポットの周囲を目視して解釈する必要があった。また、Bio-Rad社のPDQUEST二次元電気泳動画像解析ソフトを用いた場合は、スポットをガウシアン分布に補正して解析するためこの問題はやや改善されるものの、マニュアル操作による補正をかなり行う必要があり、オペレーターによる差が出易いという欠点があった。今回はこの問題の解決を図るために、Progenesis二次元電気泳動画像解析ソフトを使用した。本ソフトではスポット認識の閾値変更を全画像に対して同時に行うことができるため、上記の問題はかなり解決できることが分かった。さらに画像を局所的に歪ませてスポットマッチを行うことで複数のスポットのマッチが同時にできるため、画像解析にかかる時間が大幅に短縮できることも分かった。本ソフトで得られた定量情報のデータマイニングソフトへの出力も可能であることも確認した。さらに、本ソフトからの出力データは我々が開発した、大型ゲル用のスポット回収装置(GiantGelPicker)とも連携できる

ことを確認した。

血清腫瘍マーカーの開発ではコントロールとして健常者の血清が用いられることが多いが、その場合はがん患者と健常者の間で発現差のあるタンパク質として炎症性タンパク質が多数検出されてしまう。炎症性タンパク質は各種慢性炎症性疾患や感染症でも血中濃度が上昇するために、血清腫瘍マーカーとしては特異性に乏しい。炎症性のタンパク質を肺がん特異タンパク質として検出しないために、コントロールには慢性呼吸器疾患患者血清を使用した。また、肺がん患者で腫瘍を切除し画像上は再発が認められない症例の血清もコントロールとして使用した。肺がん患者と慢性呼吸器疾患患者の血清を分画し蛍光二次元電気泳動法で比較したところ、両群間で発現差のあるタンパク質を3つの分画で同定することができた。手術を受け再発が起きていない時期に採血された2症例については、肺がん患者でもなく慢性呼吸器疾患患者でもない発現パターンを示すことが分かった。このことは、我々が同定したタンパク質スポットは病態をある程度まで反映しており、慢性炎症を含むがんでない個人からがん患者を識別できることを示唆している。

D. 考察

昨年度までに開発された手法を今年度は膵がん患者血清に応用した。国立がんセンター中央病院で得られた検体を使用した場合にはleucine-rich alpha-2-glycoproteinが血清腫瘍マーカー候補として同定された。leucine-rich alpha-2-glycoproteinと悪性腫瘍との関わりは従来報告されておらず、国立がんセンターの症例では膵がん患者血清で明らかな高値を示したため、腫瘍マーカーとしての有用性が期待された。しかしながら、他施設（東京医科大学）で得られた検体を用いた場合には膵がん患者の中にも健常者や慢性膵炎患者と同程度の発現を示す症例が半数ほどあり、血清腫瘍マーカーとしての有用性に乏しいことが判明した。このことは、複数の施設の検体を用いた検証がバイオマーカー開発では必要であることを示唆しているのだが、そのためには多検体を短時間に調べることができるハイスループットなマーカー開発実験系が必要である。液体クロマトグラフィーと蛍光二次元電気泳動法を組み合わせた方法において、スループット性を向上させるための工夫が必要である。

今年度の新しい試みとして、血清に多量に含まれる12種類のタンパク質を除去するアフィニティークラムを使用することにより、従来はまったく得られなかったタンパク質発現プロファイルを得ることができていることが分かった。アフィニティークラムに吸着するタンパク質には、目的とする12種類のタンパク質に加え、それらに結合するタンパク質も含まれ

るが、本アプローチではそのようなタンパク質も区別して解析できることが分かった。アルブミン、 α 2マクログロブリン、アポリポロテインなどはサイトカインなど超微量血清タンパク質の運搬タンパク質として機能しており、生体の機能制御に関わる血清タンパク質を濃縮する手法として本方法は期待できる。また、大型の二次元電気泳動装置を用いることで、イオン交換カラムを用いて分画をとった場合と同じ程度の網羅性の向上が認められた。今回使用したゲルは、その面積をレーザースキャナー（市販のものとしては最大のスキャンサイズをもつTyphoon Trio、GE Healthcare社）の面積に合わせており、このゲル面積は一定のものとして今後は他のステップで網羅性の向上を図りたい。

慢性炎症を伴う疾患でも血中濃度が高値になる血清タンパク質を開発初期の段階から検出することも重要であると考え、コントロールとして慢性炎症疾患患者血清を使用した。健常者血清とがん患者血清では発現差があるが、慢性炎症性疾患患者血清とがん患者血清では発現差がない、というタンパク質を除外することが目的である。効果のほどは今回の実験では明らかではなかったため、本アプローチの有効性は今後検討の余地がある。

E. 結論

血中に多量に含まれるタンパク質に対するアフィニティークラムと蛍光二次元電気泳動法を組み合わせた方法を考案し、膵がんと肺がんの血清診断マーカー開発へ応用した。本アプローチは血清タンパク質の性格とプロテオーム解析技術の特性の両者をうまく踏まえた方法であり、従来の方法では観察困難だったタンパク質を二次元電気泳動法で検出することが可能である。血中の運搬タンパク質に結合するタンパク質を回収する方法を検討したが、本方法で回収されるタンパク質を調べることで、血清タンパク質への理解が深まると考えられる。昨年度に行ったがん患者と健常者の血清の比較では、がんの特異性の低い、いわゆる炎症性のタンパク質が検出されていたことから、今回は健常者ではなく慢性呼吸器疾患の患者血清をコントロールに使用することで、がんの特異性の低いタンパク質を検出しないように工夫した。非特異的なタンパク質を同定することを避けるためには、実験系だけでなくサンプルの内容も考慮する必要がある。現在までに報告のある血清腫瘍マーカー候補の多くは非特異的な炎症性タンパク質であり診断的有用性に欠けることが指摘されていることから、血清腫瘍マーカーの開発においてはがんの病態理解に基づいた実験系の構築が重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoo H, Kondo T, Okano T, Nakanishi K, Sakamoto M, Kosuge T, Todo S, Hirohashi S. Protein expression associated with early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative surgery. *Cancer Scie*, in press, 2007
2. Kakisaka T, Kondo T, Okano T, Fujii K, Honda K, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Yamada T, Kato H, Nishimura T, Todo S, Hirohashi S. Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2- glycoprotein in pancreatic cancer. *J Chromatograph B*, in press
3. Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, Tsuta K, Matsuno Y, Gemma A, Kato H, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 13: 799-805, 2006.
4. Kondo T and Hirohashi S. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor Saturation Dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nature Protocols*, 1: 2940-2956, 2007.
5. Hatakeyama H, Kondo T, Fujii K, Nakanishi Y, Kato H, Fukuda S, Hirohashi S. Proteomic study identified protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis of esophageal cancer. *Proteomics*, 6: 6300-6316, 2006.
6. Fujii K, Kondo T, Yamada M, Iwatsuki K, Hirohashi S. Toward a comprehensive quantitative proteome database: protein expression map of lymphoid neoplasms by 2-D DIGE and MS. *Proteomics*, 6: 4856-4876, 2006.
7. Suehara Y, Kondo T, Fujii K, Hasegawa T, Kawai A, Seki K, Beppu Y, Nishimura T, Kurosawa H, Hirohashi S. Proteomic signatures corresponding to histological

classification and grading of soft-tissue sarcomas. *Proteomics*, 6:4402-4409, 2006.

8. Okano T, Kondo T, Kakisaka T, Fujii K, Yamada M, Kato H, Nishimura T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*, 6:3938-3948, 2006.
9. 近藤格「疾患プロテオミクスと蛍光ディフレーション二次元電気泳動」*生物物理化学*, 50: 155-163, 2006.
10. 近藤格、廣橋説雄、「がんのプロテオミクス」*「新臨床腫瘍学」*, 83-86, 2006. 日本臨床腫瘍学会編集、南紅堂
11. 近藤格、「二次元電気泳動法と質量分析のための組織試料の調製法」*バイオテクノロジージャーナル*, 6: 153-156, 2006. 羊土社

2. 学会発表

1. シエナミーティング、イタリアシエナ市、Tadashi Kondo, Setsuo Hirohashi et al. Proteome Bioinformatics Project at the National Cancer Center Research Institute
2. 世界ヒトプロテオーム機構年会、米国ロングビーチ、Tadashi Kondo, Setsuo Hirohashi et al. Toward comprehensive expression proteomics in cancer research
3. アジアオセアニア世界ヒトプロテオーム機構年会、シンガポール、Tadashi Kondo and Setsuo Hirohashi. i. Toward comprehensive expression proteomics for cancer research
4. First JCA and AACR Special Joint Conference- The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics-, 名古屋市、Tadashi Kondo and Setsuo Hirohashi. Lung Cancer Proteomics for Biomarker Development for Personalized Medicine.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「消化管間葉系悪性腫瘍 (GIST) を処置するための医薬組成物、ならびに消化管間質悪性腫瘍を患う患者の予後を予測するためのキットおよび方法」特願2006-2860872.

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

厚生労働科学研究補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発
分担研究者 西村俊秀 東京医科大学外科第一講座 客員教授

研究要旨

プラズマに対する多次元液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせてから直接にバイオマーカー探索を行う方法、またホルマリン固定保存組織から腫瘍マーカーを探索する方法につきそれらのバイオマーカー開発への適用性を検討した。

A. 研究目的

本年度は、多次元プロテオーム解析技術のバイオマーカー探索への適用性を検討する。血液中のバイオマーカータンパク質候補を検出・同定するための二つの有力な方法を検討する。一つは多次元液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせた系による血漿からの直接探索法である。他は、がん組織の詳細解析でバイオマーカー候補を探索し、これらを血液において選択的に検出・定量して評価する方法論である。特に後者は多次元解析のひとつの方法論であるが、レーザーマイクロダイセクション(LMD)によりホルマリン固定組織切片における当該細胞箇所を切り出し、Liquid Tissue™(Expression Pathology社)により可溶化する技術の評価を行う。

B. 研究方法

二次元液体クロマトグラフィー(2D LC-MS)を用いたプロテオーム解析法に基づいて、血漿中にある極微量存在のPSAやIL-6が報告されている。臨床試料に適用して比較解析を可能とするには、システムを安定的、再現性良く実施する必要がある。強カチオンカラムと逆相カラムからなる二次元液体クロマトグラフィー(AMR株式会社)と高感度Linear Ion Trap 質量分析計(Thermo Electron社)からなるプロテオーム解析システムを構築した。初期肺線がん患者に関係する血漿を用いたバイオマーカー探索を行い、本多次元解析システムの再現性等の基礎的検討を行う。また、肺がん組織由来試料を用いた、Liquid Tissue技術の適用性を検討した。Liquid Tissue技術の出現は、これまで不可能とされてきたホルマリン固定組織試料からのプロテオーム解析を可能とする。ホルマリン固定組織は過去の症例で収集されたものであり、患者の病態、投与歴など情報が付随していることから、レトロスペクティブな探索的プロテオーム解析が実施できることから期待される。可溶化

され、ペプチド混合物とされた肺線がん組織由来試料を高性能液体クロマトグラフィー・質量分析を用いたプロテオーム解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いられた血液試料は東京医科大学倫理委員会の承認を得て研究に供している。また、肺がん試料についてはExpression Pathology社において変性、ペプチド化され、LC-MS用に試料化されたものを用いた。

C. 研究結果

1. 2D LC-MSによるプロテオーム解析

標記多次元プロテオーム解析では、強カチオンカラムからのペプチド混合物の分画は、ステップワイズに塩濃度を変えて溶出させ、トラップカラムにおいて濃縮及び洗浄を行った後、逆相カラムにおいて分離、質量分析計において、ペプチド m/z 値(MS)とイオン強度、およびアミノ酸配列情報を持つ娘イオン測定(MS/MS)を行った。システムの洗浄を適宜測定に組み込むことにより解析における主たるイオン群の強度変動が20%以内におさまるように再現性を確保できることが分かった。

標記多次元解析を正常及び初期肺線がん患者の血漿に適用し、両者を区別可能なペプチドシグナルが存在するかどうかを検討した。正常5例対初期肺線がん患者5例を対象として比較解析を行ったところ、各試料から平均230以上のタンパク質が同定された。これは通常の一次元の液体クロマトグラフィーと質量分析からなるプロテオーム解析から同定されたタンパク質数の大よそ2倍であった。また、 p 値 <0.01 では群特異的なペプチドシグナル数は約1,000で、 p 値 <0.001 では約500であり、正常と初期肺線がんの間で群特異的な多くのシグナルが検出された。これらの群特異的なペプチドシグナルを用いたクラスター解析および主成分解析は明確に正常人と初期肺線がん患者を区別すること

ができた。

2. Liquid Tissue 技術の適用性検討

Liquid Tissue技術を用いて抽出された肺線がん由来ペプチド混合物を高感度液体クロマトグラフィー質量分析計によりプロテオーム解析を実施した。その結果、約3,000タンパク質が同定された。Vimentin, lamin A/C, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogen, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion, tumor rejection antigen (gp96)1, moesinなどがんの発症機構に関連する分子が多数検出された。

D. 考察

多次元LC-MSを用いるプラズマ・プロテオーム解析では、群特異的なペプチドが多数検出及び同定された。これらペプチドから同定されたタンパク質群は、ほぼいわゆる古典的プラズマ・タンパク質であった。疾患を早期に発見するには浸襲性の低い血液を対象とすることが望まれる。血液中では古典的プラズマ・タンパク質が90%以上を占めている。プラズマ・タンパク質による診断の場合には、特定のがん疾患に対する得意性と感度の観点から今後ひきつづき検討が必要である。

Liquid Tissue技術による組織の詳細解析において膜タンパク質を含むがんの発症機構と関わるものが知られているタンパク質が多く検出され、新しいバイオマーカー探索の戦略、「組織から血液へ」(Tissue-to-serum strategy)の基盤となりえる。この戦略における比較定量解析技術の開発が必須である。

E. 結論

本年度の解析方法に関する検討では、二次元LC-MSによるプラズマ・プロテオーム解析によりがんの早期発見につながるような差別化可能なプラズマ・タンパク質群が見出された。また、肺がん組織由来試料に対するLiquid Tissue技術による詳細な組織解析の検討では、がんの発症機構と関わるような膜タンパク質を含む多数のタンパク質が同定された。後者の解析戦略では、がんの発症機構と関わる特異的タンパク質がバイオマーカーとして探索される可能性が高い。このようながん組織由来のタンパク質が血液において検出されれば、真の意味で特異的なバイオマーカーが確立されることが大いに期待できる。次年度は、実際のホルマリン固定組織試料を用いて、特にLiquid Tissue技術を中心とした多次元解析のバイオマーカー開発への適用を検討する。

F. 健康危険情報

本研究において用いた試料はすべて変性されたもの、またペプチドのレベルで密封容器にて提供され、これを液体クロマトグラフィーと質量分析による解析

を行っているため実験者には感染等の危険は無いと考えられる。ホルマリン固定組織試料はごく小さな切片を用い、また蛋白質はすでに架橋・変性しており、本研究のために危険が加わることは無いと考えられる。提供を受けたホルマリン固定組織試料の解析はすべて試料提供者の体外で行うため、試料提供者が被る身体的危険度および副作用はまったくない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tetsuya Okano, Tadashi Kondo, Kiyonaga Fujii, Toshihide Nishimura, Toshimi Takano, Yuichiro Ohe, Koji Tsuta, Yoshihiro Matsuno, Akihiko Gemma, Harubumi Kato, Shoji Kudoh, Setsuo Hirohashi, Proteomic Signature Corresponding to the Response to Gefitinib (Iresa, ZD1839), an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13: 799-805, 2007.

Kakisaka T, Kondo T, Okano T, Fujii K, Honda K, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Yamada T, Kato H, Nishimura T, Todo S, Hirohashi S. Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Feb 1.

Tetsuya Okano, Tadashi Kondo, Tatsuhiko Kakisaka, Kiyonaga Fujii, Masayo Yamada, Harubumi Kato, Toshihide Nishimura, Akihiko Gemma, Shoji Kudoh, Setsuo Hirohashi. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 6: 3938-3948, 2006.

Yoshiyuki Suehara, Tadashi Kondo, Kiyonaga Fujii, Tadashi Hasegawa, Akira Kawai, Kunihiko Seki, Yasuo Beppu, Toshihide Nishimura, Hisashi Kurosawa, Setsuo Hirohashi.

Proteomic signature corresponding to histological classification and grading of soft-tissue carcinomas. *Proteomics* 6: 4402 - 4409, 2006.

2. 学会発表

西村俊秀, 「プロテオミクスによるバイオマーカー探索 ―創薬と治療をkey wordとして―」、昭和大学上條講堂、2006年11月17日 (第11回医薬品開発基礎研究会、要旨集、p 6-16)

西村俊秀, 「臨床プロテオミクスによる診断マーカー探索」、東京コンファレンスセンター・品川、2006年11月8日 (第9回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、「疾患プロテオミクスの現状と展望」～バイオマーカーから創薬へ～、p17.)

T. Kawakami, T. Nishimura, H. Okamoto, M. Obazawa, T. Noda, A. Mizota, T. Iwata, Label-free comparative human plasma proteome analysis upon aged-related macular degeneration (AMD), Long Beach CA, Oct. 31, 2006 (HUPO 5th Annual World Congress, Final Program, p74.)

西村俊秀, 「プロテオーム技術によるバイオマーカー探索」、パシフィコ横浜アネックスホール、2006年10月4日 (オミックス医療が拓く未来2006シンポジウム、p21.)

西村俊秀, 「プロテオミクスの基礎から最先端まで―定量的プロテオーム解析を中心に―」、九州大学、2006年8月2日 (第19回バイオメディカル分析科学シンポジウム)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし