

-MALDI-QqTOF-MS 法による血漿ペプチドプロファイル取得法の開発を終了し、前年度までに再現性試験を完了させている。本システムを使用することにより、解析ピーク本数は SELDI-QqTOF-MS 法と遜色なく 24 検体全自動計測でき、変動係数は SELDI-QqTOF-MS 法に比べて 1/4 まで低減させることが可能になった。本方法は、サイファージェン社の SELDI-QqTOF-MS 法の特許を侵害するものではなく、国立がんセンター研究所とその周辺企業で独自に改良を加えることができるシステムである。また、検査費用は 1/6 程度まで軽減させることが可能である。

われわれは、4 本または 5 本ペプチドピーク情報もちいて膵がんを正確に判別する血漿ペプチドプロファイルを報告、特許出願を行ってきたが、昨年度まではそのアミノ酸配列および翻訳後修飾状態を明らかにすることができていなかった。

本年度は、本血漿ペプチドプロファイル膵がん診断法を実用化するための検証作業に特化して研究を進めていった。

すなわち、

1) 臨床検査としての生物学的・診断学的根拠を明らかにするため、ペプチドマーカ候補のアミノ酸配列、翻訳後修飾状態を明らかにする。

2) 少数の臨床施設から後ろ向き研究で収集され凍結保存されている血漿検体を MBHICs-MALDI-QqTOF-MS 法により血漿ペプチドプロファイルを取得し、われわれが以前報告してきたマーカ候補の診断精度を検証する。

3) 日本全国 7 臨床施設から前向きに収集されている消化器疾患血漿検体を

MBHICs-MALDI-QqTOF-MS 法により血漿ペプチドプロファイルを取得し、膵がんと健常者、他疾患との診断学的有意性を検討する。

上記 3 点について、以下のごとく報告する。

B、研究方法

1) 検証のための血漿検体

549 例分の血漿検体は以下にあげる 4 個の独立した集団に割り当てた。

検証セット 1：以前に SELDI-QqTOF-MS にて計測経験があり、国立がんセンター中央病院で採血・保存されていた 2002 年 8 月から 2003 年 10 月までに採血された膵がん患者と健常者の計 200 症例分の血漿を検証セット 1 として定義した（膵がん n=94, 健常者 n=106）。

検証セット 2：国立がんセンター中央病院で 2003 年 10 月から 2004 年 5 月まで採血・保存されていた過去未計測の膵がん患者と健常者の 103 症例分の血漿検体を検証セット 2 として定義した（膵がん n=62, 健常者 n=41）。

検証セット 3：以前に SELDI-QqTOF-MS 法にて計測経験があり、東京医科大学病院で 2004 年 2 月から 2005 年 2 月までに採血・保存されていた膵がん、良性膵疾患、健常者の 26 症例分の血漿検体を検証セット 3 と定義した（膵がん n=9, 健常者 n=6, 良性膵疾患 n=11）。

検証セット 4：本血漿プロファイル法による膵がん診断法の診断精度検証目的で前向きに日本国内 7 臨床施設（自治医科大学、国立がんセンター中央病院、東京医科大学病院、大阪府立成人病センター、大阪医療センター、大阪医科大学病院、福岡大学病

院) から収集された 964 症例分の血漿検体のうち、臨床診断名が確定している 220 症例の血漿を無作為に抽出し、検証セット 4 と定義した (膵がん n=62, 健常者 n=39 慢性膵炎 n=10, 良性胆嚢疾患 n=8, 大腸がん n=31, 胃がん n=68, その他のがん n=2)。

2) MBHICs による血漿前処理法と

MALDI-QqTOF-MS による解析

血漿の前処理は脱塩目的で、c8 官能基がコートされた磁気ビーズ (ClinProt c8 protein purification kit, BlukerDlutronics 製) を用いて行った。また、この前処理は、ClinProt robot を用いて全自動で脱塩処理ができるシステムで構築された。脱塩された血漿検体は、CHCA (Wako) と混合され 384 穴金蒸着された MALDI プレート上に分注・乾固された。ひとつの血漿検体を 4 重複で前処理し、この処理産物をさらに 4 点に重複スポットした。血漿検体は各検証セットごとに無作為に割り付けられ実験が行われた。連日計測される 384 穴 MALDI プレートには、それぞれ別々に前処理される 2 つ標準血漿検体が質量分析されていて、この標準検体全ピークデータの相関係数、変動係数を用いて検出データの品質を管理した。スポットされた 384 穴金蒸着 MALDI プレートは、4 重極搭載直行型 MALDI 質量分析器 (ProTOF-2000 PerkinElmer 製) で自動計測した。

3) マーカー候補のアミノ酸配列決定と翻訳後修飾決定

ペプチドマーカー候補 (8765, 17252, 17269, 28080 m/z) は、SDS-PAGE 銀染色によりマーカー候補を切り出しトリプシン

消化後質量分析を行う方法か、または HPLC 分離後トリプシン消化を行い質量分析にてアミノ酸配列を決定した。正常血漿を同定されたたんぱく質特異抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降産物を質量分析 (ProTOF-2000) した。

4) 臨床データの保存・管理、ピーク検出と統計解析

各検体の匿名化臨床情報とその質量分析データは、昨年度までに開発された質量分析解析ソフトウェア NCC-ProteoJudge (国立がんセンター研究所-MKI 社 共同開発) により数値データに変換され解析された。各マーカーの U 検定、ROC 曲線は R-Project を用いて計算された。

(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血保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が行われた血漿検体を使用した。

C, 研究結果

1) 解析データの品質と定量再現性

標準血漿検体を用いて、全実験の定量再現性を確認した。検出されたペプチドピークの総数は 2100 本以上であり、その再現性は、全ピークの相関係数の平均値±標準偏差は 0.993 ± 0.0029 で、変動係数の平均値は 0.0392 ± 0.0161 であった。

2) マーカー候補たんぱく質のアミノ酸配列と翻訳後修飾の決定

8765, 17252, 17269, 28080 m/z のマーカー候補のアミノ酸修飾とその翻訳後修飾を実

験結果と過去に報告された精密質量情報から推測した。8765 m/z は protein X (既知血漿タンパク質、論文投稿前のため分子名は割愛) のたんぱく質翻訳後非修飾体であった。17252 m/z と 17269 m/z は双方とも protein Y (既知血漿タンパク質、論文投稿前のため分子名は割愛) の翻訳後修飾体であった。17269 m/z (Protein Y^o) は 17252 m/z (Protein Y^o) たんぱく質のメチオニンの酸化体であった。28080 m/z は、apolipoprotein AI (Apo AI) であった。14772 m/z たんぱく質のアミノ酸配列は決定できなかった。これらたんぱく質に対する特異的抗ウサギポリクローナル抗体を用いて、標準血漿を免疫沈降法を行い、その沈降物の質量分析を行ったが、理論質量値に同様のピークを認め、これらたんぱく質であることを確定した。

MBHICs-MALDI-QqTOF-MS 法では、14778 m/z たんぱく質はピークとして検出できなかった。

3) マーカー候補たんぱく質に対する有用性の検証

A, 検証セット1、検証セット2 (国立がんセンター中央病院にて採血収集された検体) による検証

過去に計測した経験のある国立がんセンター中央病院で採取された検体 (検証セット1) を用いて、Protein X (8765 m/z)、Protein Y (17252, 17269 m/z)、Apolipoprotein AI (28080 m/z) の発現について膵がん患者と健常者について統計学的有意性を計算した。Protein X, Protein Y^o (17252 m/z)、Protein Y^o (メチオニン酸化

体 17279 m/z) の発現は、いずれもがん患者が健常者に比べて減少しており、その U 検定値はそれぞれ、 $P=2.22 \times 10^{-13}$, 1.46×10^{-20} , 1.33×10^{-19} であり、AUC 値は $AUC=0.801, 0.881, 0.872$ であり、本検出方法でも統計学的に高度な有意差をもって検証できた。

検証セット2による未計測検体での検証でも U 検定値はそれぞれ $P=1.31 \times 10^{-11}$, 9.72×10^{-11} , 2.64×10^{-9} であった。AUC 値はそれぞれ、 $AUC=0.893, 0.875, 0.848$ であり、未計測検体でもこれらたんぱく質マーカーの有用性は確認できた。検証セット1による検証では、Apo AI の統計学的有意性は認められなかった。また 14776 m/z (たんぱく質未同定) は、本検出法では検出できなかった。よってその後の解析からこの2つのマーカー候補は除外した。

Protein X (8765 m/z) と Protein Y^o (17252 m/z) の測定値の和による膵がん健常者間の統計学的有意性を検証した。検証セット1、検証セット2における Protein X と Protein Y^o の和の U 検定値はそれぞれ $P=3.44 \times 10^{-22}$, 4.61×10^{-14} で健常者に比べて膵がん患者に発現低下が認められ、AUC 値はそれぞれ $AUC=0.906, 0.925$ であった。

さらに、これら検体の中で CA19-9 が計測されている検体が 115 例存在したが、CA19-9 の AUC 値は、 $AUC=0.863$ であり、これらたんぱく質マーカー測定値の和の方が、CA19-9 の AUC 値より勝っていた。さらに今回の検証セット1、検証セット2の解析から 13762 m/z (Transthyretin; Tth) が、膵がん患者が健常者に比べて低下することを見出した。Protein X, Protein Y^o, Transthyretin (Tth) のイオン化強度の和

は、過去未計測検体の検証セット2においてAUC値が0.941と高度な有用性を有していた。

B, 検証セット3 (東京医科大学病院で採血収集された検体) による検証

過去に計測した経験のある東京医科大学病院で採血された検体(検証セット3)でも、Protein X (8765 m/z)、Protein Y (17252 m/z)、Tth (13762 m/z)の計測値の和は、統計学的な有意性をもって健常者に比べて膵がん患者で減少していることが検証できた($P=0.0019$ 、 $AUC=0.889$)。さらに、統計学的な有意性は認められなかったが、良性膵嚢胞、良性膵腫瘍などでも減少が認められた。

C, 検証セット4 (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開発」研究班で前向きに収集された検体) による検証

日本全国の7施設から本診断法の診断精度を検証するために前向きに採血収集された検体を用いて、Protein X (8765 m/z)、Protein Y (17252 m/z)、Tth (13762 m/z)の発現状態を検討した。これら3つのマーカーはすべて、そのU検定値はそれぞれ $P=4.99 \times 10^{-5}$ 、 $P=1.22 \times 10^{-7}$ 、 $P=4.45 \times 10^{-8}$ と統計学的な有意性をもって膵がん患者が健常者に比べて発現の低下が認められ、前向きに多数施設から収集された検体を用いても検証ができた。さらに、これら3個のマーカーの測定値の和も健常者に比べて膵がん患者で統計学的な有意差(U検定 $P=2.68 \times 10^{-10}$)を持って低下することが検証された。ROC解析では、CEA、

DUPAN-2のAUC値はそれぞれ

$AUC=0.691$ 、 0.863 であり、われわれの3マーカーの和は 0.875 と、これら2つのマーカーに比べて勝っていた。3マーカーはCA19-9のAUC値、 $AUC=0.907$ に比べて劣っていた。各種疾患に対する特異性を検討するために、健常者と各種疾患に対して測定値のU検定を行ったが、慢性膵炎($P=3.82 \times 10^{-5}$)、良性胆嚢疾患($P=0.024$)、膵がん($P=2.68 \times 10^{-10}$)、大腸がん($P=0.00085$)、胃がん($P=0.0020$)、その他のがん($P=0.30$)であり 10^{-4} 以下の高度な統計学有意差を持って低下するのは、慢性膵炎と膵がんだけであった。また、この3マーカーの和は臨床病期I、II期の早期がんから低下する傾向がみられた。

D, 考察

昨年度までは、SELDI-QqTOF-MS法に変わるMBHICs-MALDI-QqTOF-MS法による自動検出システムを考案し、その再現性試験を行ってきた。本年度は実際の臨床検体におけるMBHICs-MALDI-QqTOF-MS法に対する有効性の検討から始めた。検証セット1、検証セット3は一昨年度にSELDI-QqTOF-MS法で測定されていた検体で、MBHICs-MALDI-QqTOF-MS法に検出法を変更しても以前報告したマーカー候補の検出が可能かどうか、さらにその検出された測定結果がSELDI-QqTOF-MS法と同様に統計学的有意差を持つかどうかの検討を行った。Protein X (8765 m/z)、Protein Y (17252 m/z)、Protein Y^o (17269 m/z)は本方法を用いても検出することが可能であり、さらにこの3個のマーカーは、以前の結果と同様に統計学的な有意差を持

って健常者に比べて膵がん患者の方が低下することが検証された。しかしながら、Apo AI (28080 m/z)は統計学的な有意差を持って発現の差異は検証できず、14772 m/zは本検出法では検出できないことが判明した。本事実を踏まえて、この2つのマーカーは今後の解析から除外した。ここに挙げた3個のマーカーは過去計測経験の無い2つの検証集団(検証セット2、検証セット4)でも高度な統計学的有意差を持って膵がん患者は健常者に比べて低下することが検証された。以前の検討では、サポートベクターマシンという高度な数学を駆使したアルゴリズムを使って判別モデルを構築していたが、実用化を考えた場合はできるだけ簡素化された方法を採用したいと考えていた。そこで検証された3個のマーカーの中からProtein XとProtein Yを選びその計測値の和を用いて診断するという方法を考案した。本方法は過去計測検体ではAUC値で既存の消化器がんマーカーであるDUPAN-2やCEAより高値で診断できる可能性が示された。この2個のマーカーの和にTthの測定値を加えると、さらにAUC値は上昇し、少なくとも過去の未計測検体では、CA19-9より診断精度が勝ることが見出された。しかしながら、今回前向きに集めた7施設からの多施設共同研究検体では、DUPAN-2、CEAには勝っていたがCA19-9のAUC値より若干ではあるが劣ってしまった。全国7施設から収集するために、運用上単一施設から収集に比べて溶血検体が持ち込まれる頻度が高くなる。溶血した検体はヘモグロビン α (15156 m/z)とヘモグロビン β (15869 m/z)が非常に高値に観察されやすく、このピークがその近傍にあるTth

(13762 m/z)とProtein Y (17252 m/z)のイオン化強度を相対的に低下させるため、見かけ上健常者を膵がんと判定したものと思われる。よって、CA19-9にAUC値が劣ったものと考えられた。本3マーカーの和は、他の消化器がんには高度な統計学的有意差を持たず、膵がんに特異的である可能性も示唆されている。ただし、今回の検証検体には慢性膵炎の患数(n=10)が少なかったためさらなる検討を加える必要があるものと思われるが、良性膵疾患でも低下が認められており、膵がんと良性膵疾患判別マーカーになりえるかどうかの確証は得られていない。しかしながら、検診に使用するマーカーとしては膵疾患患者を幅広く拾い上げると言う意味で有用なものになると考えられる。

まだ症例数が少なく確定的なことはいえないが、臨床病期I,II期の膵がん患者でも低下する傾向が観察されている。早期症例を用いた更なる検討で統計学的有意を検証したいと考えている。

本中間報告から、日本全国の7施設から集められた検体でも、溶血の問題はあるがCA19-9と同等程度のAUCを持っていることが検証できた。今後は、現在まで前向きに収集されている964症例(2008年3月4日現在)について最終結果を報告する予定である。

また、本年度の研究に用いた逆相磁気ビーズはBlukerDlutonics社製の研究用試薬であるため、実用化に向けては製品品質に不安が残る。現在、三菱化学とその100%子会社であるモレキュエンスで、体外診断薬レベルまで品質を向上させた逆相磁気ビーズ開発が進められており、来年度は、新

開発ビーズによる検出系の構築を試み、最終的には GLP 基準を持つ臨床検査センターでの臨床試験を目指したいと考えている。

E, 結論

1、SELDI-QqTOF-MS 法にかわる前処理測定方法として逆相磁気ビーズクロマトグラフィー高速直型 MALDI-TOF-MS (MBHICs-MALDI-QqTOF-MS) 法による定量解析システムの構築を行った。

2、MBHICs-MALDI-QqTOF-MS 法にて 549 例分の血漿ペプチドプロファイルの取得を行った。

3、4 個の独立した集団からも Protein X (8765 m/z)、Protein Y' (17252 m/z)、Protein Y'' (17269 m/z) は、健常者に比べて膵がん患者で低下することが検証できた。

4、Protein X、Protein Y'、Tth の測定値の和は、CEA、DEPAN-2 に比べて AUC 値は勝っており、CA19-9 と比べても AUC 値は同程度であった。

F, 健康危険情報

特になし

G, 研究発表

(2007 年 4 月 1 日から 2008 年 3 月 31 日まで)

1、論文発表

1: Huang L, Shitashige M, Satow R, **Honda K**, Ono M, Yun J, Tomida A, Tsuruo T, Hirohashi S, Yamada T.

Functional Interaction of DNA Topoisomerase II α with the β -Catenin and T-Cell Factor-4 Complex.

Gastroenterology. 2007

Nov;133(5):1569-78.

2, Shitashige M, Satow R, **Honda K**, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.

Increased susceptibility of Sf1(+/-) mice to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Cancer Sci*.

Dec;98(12):1862-7.

3, Yamamoto S, Tsuda H, **Honda K**, Kita T, Takano M, Tamai S, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. Actinin-4 expression in ovarian cancer: a novel prognostic indicator independent of clinical stage and histological type. *Mod Pathol*. 2007 Dec;20(12):1278-85.

4: Ota Y, Takagi Y, Osaka Y, Shinohara M, Hoshino S, Tsuchida A, Aoki T, **Honda K**, Yamada T. Usefulness of serum protein profiling for prediction of preoperative chemoradiosensitivity of esophageal cancer. *Oncol Rep*. 2007 Sep;18(3):653-7.

5: Kikuchi S, **Honda K**, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Umaki T, Shitashige M, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. Serum albumin-associated peptides of patients with uterine endometrial cancer. *Cancer Sci*. 2007 Jun;98(6):822-9.

6, 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 α -2-glycoprotein in pancreatic cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 1;852(1-2):257-67.

7, 下重美紀、本田一文、尾野雅哉、山田哲司、プロテオミクスによる発現蛋白の解析—疾患関連蛋白の同定—
分子消化器病 2007 Apr; 4(3):201-207.

8, 本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司
質量分析を用いた血清・血漿プロテオーム解析による癌診断マーカー開発法
細胞工学 別冊 2007 2007 Jul 5; 97-103.

9, 本田一文、山田哲司
がん転移・浸潤に対するアクチン結合タンパク質アクチニン-4の生物学的機能
生化学 2007 79(7):643-654.

10, 本田一文、山田哲司
ダイレクトタンパク質プロファイルによる膵癌血漿診断への応用
実験医学増刊 2007 25(17):2732-8.

11, 本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司
膵がんのプロテオミクス解析と高感度診断法を実用化に向けた試み
Cancer Frontier 2007 9:119-126.

2, 学会発表

1, Honda K, Kikuchi S, Hiraoka H, Hayashida Y, Hirohashi S, Yamada T. Increased actinin-4 protein expression contributes to the poor prognosis of pancreatic cancer. April 17, 2007, *Annual meeting 2007, American Association for Cancer Research*. Los Angeles USA.

2, Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito S, Hirohashi S, Yamada T. Actinin-4-mediated inhibition of cell proliferation and mass spectrometry analysis of native protein complex. April 15, 2007, *Annual meeting 2007, American Association for Cancer Research*. Los Angeles USA.

3, Ono M, Negishi A, Shitashige M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Peptide alignment of nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) enable large scale comparisons of the human plasma proteome. *HUPO 6th Annual World Congress*, October 6-10, 2007, Seoul, Korea.

4, Yamada T, Shitashige M, Honda K, Ono M, Hirohashi S. Proteomics analysis of beta-catenin-mediated carcinogenesis. *HUPO 6th Annual World Congress*, October 6-10, 2007, Seoul, Korea.

5, Honda K, Shitashige M, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Mass spectrometry analysis native protein complex containing actinin-4 in prostate

cancer cells. **HUPO 6th Annual World Congress**, October 6-10, 2007, Seoul, Korea.

6, Shitashige M, **Honda K**, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Large scale identification of proteins whose expression is regulated by the beta-catenin and T-cell factor-4 (TCF-4) complex in colorectal cancer cells. **HUPO 6th Annual World Congress**, October 6-10, 2007, Seoul, Korea.

7, Negishi A, Ono M, Matsubara J, Chikui E, **Honda K**, Shitashige M, Omura K, Hirihashi S, Yamada T. Biomarker discovery by 2-dimensional image converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry. **HUPO 6th Annual World Congress**, October 6-10, 2007, Seoul, Korea.

8, **Honda K**, Ono M, Yamada T. High-throughput biomarker validation by automated magnetic bead-based chromatography and quantitative high-resolution MALDI-TOF-MS. **International Cancer Biomarker Consortium Member Meeting**, Hawaii, February 20-22, 2008.

9, Ono M, **Honda K**, Yamada T. Detection of plasma protein modification by 2DICAL. **International Cancer Biomarker Consortium Member Meeting**, Hawaii, February 20-22, 2008.

10, **Honda K**, Yamada T. High-throughput biomarker validation by automated magnetic bead-based chromatography and quantitative high-resolution MALDI-TOF-MS. **5th Early Detection Research Network Scientific Workshop**, March 16-20 2008, Bethesda in USA.

11, **本田一文**、原 智彦、下重美紀、廣橋 説雄、山田哲司. 前立腺がんの内源性 actinin-4 タンパク質複合体の質量解析と機能解析. **日本ヒトプロテオーム機構第5回大会 シンポジウム** 2007年7月30-31日 東京

12, 菊池哲, 永川裕一, 池田隆久, 斎藤準, 粕谷和彦, 小澤隆, 土田明彦, 青木達哉, **本田一文**, 山田哲司. **東京医科大学雑誌** (0040-8905)65 巻 4 号 Page468-469(2007.10)

12. 山本宗平, 津田均, **本田一文**, 高野政志, 喜多恒和, 山田哲司, 松原修. Actinin-4 expression in ovarian cancer: a novel prognostic indicator independent of clinical stage and histologic type. **第66回 日本癌学会総会** 2007年10月2-4日 横浜, 日本癌学会総会記事(1347-9032)66回 Page571(2007.08)

13, 山田哲司, **本田一文**, 下重美紀, 尾野雅哉, 廣橋説雄. Oncogenomics Identification of biomarkers and therapy targets by oncogenomics and

oncoproteomics. **第66回日本癌学会総会
シンポジウム** 2007年10月2-4日 横
浜, 日本癌学会総会記事(1347-9032)66回
Page433(2007.08)

14, 佐藤礼子, 下重美紀, 本田一文, 金井
弥栄, 廣橋説雄, 山田哲司. Whole-Genome
Exon-level Transcriptome Survey of
Human Hepatocellular Carcinoma. **第66
回日本癌学会総会** 2007年10月2-4日
横浜, 日本癌学会総会記事(1347-9032)66
回 Page304(2007.08)

15, 菊池哲, 本田一文, 平岡伸介, 林田康
治, 土田明彦, 廣橋説雄, 山田哲司.
Association of actinin-4 expression with
poor prognosis of pancreatic cancer. **第66
回日本癌学会総会 ワークショップ**
2007年10月2-4日 横浜, 日本癌学会総
会記事(1347-9032)66回
Page57-58(2007.08).

16, 原 智彦, 本田一文, 下重美紀, 尾野
雅哉, 松山豪泰, 内藤克輔, 廣橋説雄, 山田
哲司. Actinin-4による前立腺がんの細胞増
殖抑制効果およびエンドサイトーシスに関
するプロテオーム解析. **第3回日本臨床プ
ロテオーム研究会** 2007年4月28日 東
京

17, 菊池 哲, 本田一文, 半田 康, 加藤
秀則, 山下幸則, 土田明彦, 青木達哉, 廣橋
説雄, 山田哲司. プロテオミクス解析によ
る子宮体癌の血漿バイオマーカー探索. **第
3回日本臨床プロテオーム研究会** 2007年
4月28日 東京

H, 知的財産権の出願・登録状況
(予定含む)

1、特許取得
なし

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

「新規プロテオーム解析技術 2DICAL 法による血中腫瘍マーカーの開発」

氏名	所属	職名
分担研究者 尾野雅哉	国立がんセンター研究所化学療法部	室長

研究要旨

われわれが開発した 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry(LC/MS))法はハイスループットなショットガンプロテオミクス解析手法である。この手法を用い新規の血中腫瘍マーカーを開発することを目的として、本年度より分担研究を開始した。本年度は、膵がん血漿腫瘍マーカー、及び、子宮体がん血清腫瘍マーカー候補を開発することに成功した。

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なだけでなく、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。

また、子宮体がんは年々増加傾向にあり、年間約18000人が発病しているといわれている。子宮がんに占める割

合は1970年代では10%程度であったが2000年で約40%と著明に増加している。好発年齢は50~60歳代で、危険因子として未婚・不妊・出産児数の減少、高血圧・肥満・高血糖、乳癌術後Tamoxifen内服などが挙げられ、生活習慣の変化とともに、今後更に増加すると考えられている。

しかし、現在の子宮体がん検診法としては、子宮内腔に細いスティック状の器具を挿入して細胞を採取する子宮内膜細胞診が主に行われているが、進行初期では診断にいたらないことも多く、また本検査は閉経後の被検者では子宮口が閉鎖して検査自体が行えない場合があること、検査時の強い痛み、出血、感染、子宮穿孔などの合併症の可能性があり幾多の問題点を有している。別の診断法としての経膈超音波法は子宮内膜の厚さ、形状をみる侵襲度の低い検査ではあるが、早期のがん診断における感度は10~30%程度とされており、検診における有用性は十分とはいえない。子宮体がんを用いられている腫瘍マーカーは、CA125、CA602、CA19-9などであるが、いずれもI期の早期がんでの陽性率は20%前後であり、治療効果の判定と治療後の再発指標として用いられているのが現状である。このような現況において、子宮体がんも膵がん同様に、非侵襲的で有効な診断法の開発が強く望まれている。

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。本研究班において本田らは、トップダウンプロテオミクス解析手法として、SELDI-QqTOF-MS法を開発し、膵がん腫瘍マーカーの開発をすすめてきたが、われわれはショットガンプロテオミクス解析手法として2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC/MS))法を新規に開発し、LC/MSから得られる膨大なデータを効率よくハイスループットに解析することを可能とした(Ono, M. et al. 2006)。われわれはこの新規技術を応用し、前述の如く開発が望まれている、膵がん、子宮体がんの血中腫瘍マーカー開発を目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) 2DICAL法によるプロテオーム解析

われわれが開発した2DICAL法を用いて、腫瘍マーカー探索を行った。2DICAL法は、複数のスペクトラムからなるLC/MSデータを、各スペクトラムの相関係数からLCの時間変動を補正して、質量電荷比(m/z)、保持時間(RT)の2軸を持つ平面に描出する手法であり、これにより同一ペプチド由来のピークが、強度(Intensity)を変数に持つ m/z 、RT座標に変換され、複数サンプル間での無標識定量比較を可能にしたショットガンプロテオミクス解析手法である。さらに、サン

プル (S) をもうひとつの次元ととらえ、同一 m/z のピークを RT、サンプルの 2 軸の平面で描出することにより、多数検体間の定量比較を可能としている。

この技術の開発により、LC/MS で作成される膨大なピークデータから効率よくかつ定量的に多数検体解析が可能となり、ショットガンプロテオミクスにおける血中腫瘍マーカー開発が可能となった。

2) 膵がん血漿腫瘍マーカーの開発

倫理要件を満たす膵がん患者血漿および健常者血漿を国立がんセンター中央病院にてそれぞれ 38 症例、39 症例、東京医科大学病院にてそれぞれ 5 症例、4 症例集積し、計 86 症例を解析対象とした。アルブミンなどの血中に存在する大量のたんぱく質の影響を除外するために、特異糖鎖を認識するコンカナバリン A (ConA) にて血漿を前処理し、ConA に吸着する分画を抽出した。同分画にトリプシン 3.3 μ g 5M 尿素 10 μ l 1M 炭酸水素アンモニウム 2.5 μ l を加え、MilliQ で計 30 μ l に調整した後、20 時間摂氏 37 度でたんぱく質を消化させた。消化産物にアセトニトリルを加え遠沈し、上清を抽出、真空乾燥させた後、0.1%ギ酸を 80 μ l 加え、質量分析測定用試料とした。一回の質量分析には 10 μ l を用い、同一試料に対して 3 回の測定を行った。残りの試料は同定用試料として摂氏 -80 度で保存した。

LC/MS 測定に当たっては、ナノ LC (超

低流量液体クロマトグラフィー) を用い、C18 逆相カラム (内径 0.15mm、長さ 50mm) で、毎分 200nl の超低流量の流速でアセトニトリル濃度を 0% から 80% まで 60 分かけて直線勾配で上昇させ、測定試料を分離した。MS (質量分析計) は QTOF-ULTIMA (Waters, Milford, MA) を用い、質量測定範囲を 250-1600 m/z とし、1 秒毎の積算でスペクトラムデータを 60 分間採取した。採取した LC/MS データは、独自に開発した方法で、2DICAL 用の解析データに変換した。

2DICAL では、各測定における液体クロマトグラフィーの時間変動を補正し、同一ペプチド由来のピークを検出し、(質量電荷比 (m/z)、保持時間 (RT)) の座標を与え、症例毎に 3 回測定したピーク強度の中央値を各症例のピーク強度代表値とした。国立がんセンター中央病院症例において膵がん患者群と健常者群間で有意差のあるピークを U 検定で $p < 0.0005$ 、ピーク強度 ≥ 10 、強度比 ≥ 2 で拾い出し、目視にてピークの有効性を確認したものをマーカー候補とした。東京医科大学病院症例にてマーカー候補の検証を行い、同時にペプチド配列を決定した。

3) 子宮体がん血清腫瘍マーカーの開発

倫理要件を満たす子宮体癌 40 症例、対照者 30 症例、子宮筋腫 30 症例、子宮肉腫 25 症例の血清を北海道がんセンターで集積し、計 125 例を解析対象

とした。アルブミン、IgGなどの血中に大量に存在する12種のタンパク質を除去するカラム (ProteomeLab IgY-12 SC, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) で前処理し、前記と同様のトリプシン消化処理を施し、質量分析測定用試料を作成した。

前記と同様に2DICALで拾い出したピークから、子宮体がん患者群と対照者群間で、U検定で $p < 0.01$ のピークを拾い出し、それらのピークから強度差の大きいピークを抽出するために、IQR (四分位範囲) 20以上のピークを選別した。これらのピークに対し、ペプチド、蛋白質同定を行い、それら同定蛋白質の発現差をウェスタンブロットにて確認した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター、東京医科大学病院、北海道がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が漏出す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たがん患者、健常人より得られた血漿血清検体を用いた。

C、研究結果

1) 膵がん血漿腫瘍マーカー

2DICAL法で検出したピークは115,325ピークあり、そのピークから上記方法で絞り込んだマーカー候補は6ピークであった。それぞれピークの(質量電荷比(m/z), 保持時間(RT))は、(412 m/z , RT 13.7min)、(546 m/z ,

RT 8.3min)、(552 m/z , RT 8.3min)、(827 m/z , RT 8.3min) (1141 m/z , RT 29.0min) (1185 m/z , RT 9.2min)、であった。これらのピークは東京医科大学病院症例にても差が認められ、検証された。

特に有意な差を認めた3つのピーク(552 m/z , RT 8.3min)、(827 m/z , RT 8.3min) (1141 m/z , RT 29.0min)による判別率、ROC曲線下面積は、552 m/z , 827 m/z , 1141 m/z の順に、それぞれ、81%、0.83、89%、0.92、86%、0.91であった。そしてこれらのペプチド配列とその配列内のアミノ酸の翻訳後修飾が解明され、有力な腫瘍マーカー候補となった。(特許出願)

2) 子宮体がん血清腫瘍マーカー

2DICAL法で検出したピークは154,992ピークであり、そのピークから上記方法で絞り込んだマーカー候補は100ピークであった。これら100ピークに対して、ペプチド、蛋白質同定を行ったところ、53ピークがペプチドとして同定され、それらは14のたんぱく質を構成していることが明らかとなった。

同定されたたんぱく質には、Apolipoprotein A-IV、Complement component C4A、Complement component C3が含まれており、これらの血中での発現差はウェスタンブロットで確認された。また、同定されなかった47ピークのペプチドフラグメントはタンデムマスデータが十分に取得されており、翻訳後修飾のためにペプチド

配列が確定されなかった可能性が高いと思われる。

これら 100 ピークから、9 ピークを用いることで子宮体がん患者群と対照群を 90%の精度で判別することが可能であった。

D. 考察

ショットガンプロテオミクスにおいては、たんぱく質がトリプシン処理された膨大なペプチドデータとなるため、同位体標識等することにより、少数のサンプル比較を精密に行うことが解析の主体であった。事実、培養細胞などで洗練された比較系を構築することで、新規のシグナル伝達物質やたんぱく質相互作用を見出している。しかし、多数検体の処理を必要とする臨床検体の解析はショットガンプロテオミクスにおいては不得手な領域であった。われわれが開発した 2DICAL 法はいくつかの斬新的な手法を構築することで、ショットガンプロテオミクスにおける多数検体処理を可能にし、膵がんや子宮体がんの血中腫瘍マーカー候補の発見を可能とした。

今回発見された膵がんにおける腫瘍マーカー候補は、肝臓で主に産生され、血中に豊富に認められるたんぱく質の 2 つのペプチド配列であった。腫瘍マーカー候補となったのは、このペプチド配列の中のひとつのアミノ酸が翻訳後修飾を受けたものであり、膵がん患者と健常者の間で大きな差が認められた。しかし、修飾のない同ペプ

チド配列も同時に血中に存在し、それは膵がん患者と健常者の間で差が認められなかった。このような変化は、たんぱく質レベルでの検討では十分な差が見出せない可能性が高く、ペプチドレベルまで分解するショットガンプロテオミクスの中で初めて見られる変化であると考えられる。このように血中の豊富なたんぱく質でもペプチドまで分解して解析すれば新しい腫瘍マーカーとなりうる可能性があり、2DICAL 法による解析は、そのような腫瘍マーカーを発見する上で、大きな強み (advantage) を持っているシステムであるといえる。

血中腫瘍マーカーの開発に当たっては、アルブミンなどの血中に存在する大量のたんぱく質の影響を除外する前処理が重要である。前処理としては、必要なものを集めてくる方法 (濃縮) と、不要な物質を除く方法 (除去) があるが、われわれは膵がん血漿腫瘍マーカー探索に当たっては、糖ペプチドを濃縮する ConA を用い、子宮体がん血清腫瘍マーカー探索に当たっては 12 種の主要たんぱく質を除去するカラムを用いて検討した。ConA を用いることにより、マンノースを糖鎖に持つ糖たんぱく質が濃縮され、がん患者と健常人間で差のあるたんぱく質の修飾変化を見出すことが出来た。豊富な上位 12 種のたんぱく質を取り除くことにより、がんで量的変化が起こることが知られているたんぱく質の定量的変化を 2DICAL 法で捉えられることが確認され、さらに新規の腫瘍

マーカー候補を見出せる可能性が示された。

2DICAL法はホルマリンパラフィン切片からの組織プロテオミクス解析も可能とし、種々のがんの血中腫瘍マーカーの開発に加え、組織からの腫瘍マーカー開発も視野にいれ、今後の研究開発を行う予定である。

E. 結論

- 1、 2DICAL法を用いることにより、LC/MS ショットガンプロテオミクスデータから血中腫瘍マーカーを開発することが可能である。
- 2、 血中に豊富に存在するたんぱく質の修飾変化が、膵がん血漿腫瘍マーカーとなる可能性が示唆された。
- 3、 2DICAL法は定量性に優れ、がんにおける血中たんぱく質の量的変化を正確に反映するだけでなく、新規の血中腫瘍マーカーを発見できる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

(2007年4月1日から2008年3月31日まで)

1、 論文発表

- 1) Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Regulation of Wnt Signaling by

the Nuclear Pore Complex. Gastroenterology. (in press)

- 2) Ono M. Glyco-biomarker identification with a new glycoproteome algorithm, the Glycodetector. Glycobiology. 17(11):1253. 2007.
- 3) Huang L, Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Yun J, Tomida A, Tsuruo T, Hirohashi S, Yamada T. Gastroenterology. 133(5):1569-78. 2007.
- 4) Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Increased susceptibility of Sf1(+/-) mice to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. Cancer Sci. 98(12):1862-7. 2007.
- 5) Kikuchi S, Honda K, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Umaki T, Shitashige M, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. Serum albumin-associated peptides of patients with uterine endometrial cancer. Cancer Sci. 98(6):822-9. 2007.
- 6) Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.

- Involvement of splicing factor-1 in beta-catenin/T-cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing. *Gastroenterology*. 132(3):1039-54. 2007.
- 7) 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*. 6(3):479-91. 2007.
- 8) Ono M, Honda K, Shitashige M, Yamada T. New proteome platform of 2DICAL and its clinical application. *Hitachi High-Technologies Application Note*. NF/AN8E)-011. 2007.
- 9) 尾野雅哉 LCMS 解析手法 2 DICAL を用いた糖鎖疾病マーカーの探索 遺伝子医学 MOOK11 号(印刷中)
- 10) 尾野雅哉、山田哲司 がん診断治療のバイオマーカー *Cancer Frontier* 2008 Vol. 10 (印刷中)
- 11) 下重美紀、佐藤礼子、本田一文、尾野雅哉、山田哲司 プロテオーム解析によるバイオマーカー探索と臨床応用 *生物物理化学* (印刷中)
- 12) 尾野雅哉、山田哲司 プロテオーム・糖鎖解析技術を活用した大規模解析による診断の現況 *実験医学*. 25(17):2714-22. 2007:
- 13) 尾野雅哉、本田一文、下重美紀、山田哲司 新規プロテオーム解析手法 2 DICAL とその臨床応用 *Hitachi Scientific Instrument News*. 2007:50(2):4339-42
- 14) 本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田哲司 質量分析を用いた血清・血漿プロテオーム解析による癌診断マーカー開発法 *細胞工学分冊*. 97-103, 2007.
- 15) 下重美紀、本田一文、尾野雅哉、山田哲司 プロテオミクスによる発現蛋白の解析 -疾患関連蛋白の同定- *分子消化器病* 4(3): 201-7 2007.
- 16) 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.
- 2、 学会発表
- 1) Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Actinin-4-mediated inhibition of cell proliferation and mass

- spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. AACR 2007, Los Angeles USA 2007.
- 2) Ono M, Negishi A, Shitashige M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Peptide alignment of nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) enables large-scale comparisons of the human plasma proteome. HUPO 6th Annual World Congress, Seoul Korea 2007.
- 3) Negishi A, Ono M, Shitashige M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Biomarker Discovery by 2-Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (2DICAL). HUPO 6th Annual World Congress, Seoul Korea 2007.
- 4) Yamada T. Shitashige M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Proteomics Analysis of β -Catenin-mediated Carcinogenesis. HUPO 6th Annual World Congress, Seoul Korea 2007.
- 5) Honda K, Shitashige M, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Mass Spectrometry Analysis of the Native Protein Complex Containing Actinin-4 in Prostate Cancer Cells. HUPO 6th Annual World Congress, Seoul Korea 2007.
- 6) Shitashige M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Large Scale Identification of Proteins Whose Expression Is Regulated by the β -Catenin and T-Cell Factor-4 (TCF4) Complex in Colorectal Cancer Cells. HUPO 6th Annual World Congress, Seoul Korea 2007.
- 7) Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Glyco-Biomarker Identification With A New Glycoproteome Algorithm, The Glycodetector. Glycobiology 2007, Boston USA 2007.
- 8) Ono M, Honda K, Yamada T. Detection of Plasma Protein Modification by 2DICAL. International Cancer Biomarker Consortium Meeting, Honolulu USA 2007.
- 9) Honda K, Ono M, Yamada T. High-throughput biomarker validation by automated magnetic bead-based chromatography and quantitative

high-resolution MALDI-TOF-MS.
International Cancer Biomarker
Consortium Meeting, Honolulu
USA 2007.

解析技術を応用した糖鎖腫瘍マ
ーカーの開発、第 27 回日本分子腫瘍
マーカー研究会、シンポジウム、
2007 年 10 月、東京

- 1 0) 尾野雅哉、根岸 綾子、廣橋 説
雄、山田哲司、nanoLC-MS を用い
た無標識タンパク質定量プラット
フォーム 2DICAL 法の臨床応用、
第 3 回日本臨床プロテオーム研究
会、シンポジウム、2007 年 4 月、
東京
- 1 1) 原 智彦、本田 一文、下重 美
紀、尾野 雅哉、松山 豪泰、内藤
克輔、廣橋 説雄、山田 哲司、
Actinin-4 による前立腺がん細胞
増殖抑制効果およびエンドサイト
ーシスに関するプロテオーム解析、
第 3 回日本臨床プロテオーム研究
会、口演、2007 年 4 月、東京
- 1 2) 尾野雅哉、根岸 綾子、廣橋 説
雄、山田哲司、定量 LCMS を用いた
大規模プロテオーム解析、第 5 回
日本ヒトプロテオーム機構大会、
シンポジウム、2007 年 7 月、東京
- 1 3) 尾野雅哉、無標識定量ショッ
トガンプロテオミクス解析手法 2
DICAL を用いた腫瘍マーカーの開
発、第 32 回日本医用マスペクト
ル学会年会、シンポジウム、2007
年 9 月、京都
- 1 4) 尾野雅哉、新規プロテオーム
- 1 5) Yamada T, Honda K,
Shitashige M, Ono M, Hirohashi S.
Identification of biomarkers
and therapy targets by
oncogenomics and oncoproteomics.
第 66 回日本癌学会学術総会、シン
ポジウム、2007 年 10 月、横浜
- 1 6) Negishi A, Ono M, Matsubara
J, Chikui E, Omura K, Hirohashi
S, Yamada T. Biomarker Discovery
by 2-Dimensional Image
Converted Analysis of Liquid
Chromatography and Mass
Spectrometry (2DICAL), 第 66 回
日本癌学会学術総会、口演、2007
年 10 月、横浜
- 1 7) 尾野雅哉、LCMS 解析手法
2DICAL を用いた糖鎖疾病マ
ーカーの探索、第 5 回糖鎖科学コンソ
シアムシンポジウム、シンポジ
ウム、2007 年 11 月、東京
- 1 8) 尾野雅哉、プロテオミクスに
よる癌診断に向けたバイオマ
ーカー探索、第 30 回日本分子生物学会
年会・第 80 回日本生化学会大会
合同大会、ランチョンセミナー、
2007 年 12 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

「膵癌の新規腫瘍マーカー」として平成19年7月25日財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より特許出願（特願2007-193328）した。

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
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

ホルマリン固定保存組織からのがん病態関連バイオマーカーの探索および検証方法の検討を行った。

A. 研究目的

本年度は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed Paraffin Embedded: FFPE) 組織切片の詳細解析でバイオマーカー候補を探索する方法論 (Direct Tissue Proteomics) の検討を行った。

B. 研究方法

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。

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) により可溶化の後、低流速液体クロマトグラフィーとナノエレクトロスプレーイオン化インターフェースをもつタンデム質量分析計により解析する。

(倫理面への配慮)

本研究にあたってインフォームド・コンセントが取られたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片を東京医科大学倫理委員会の承認を得て使用した。

C. 研究結果

原発性肺線癌 (Non-small Cell Lung Cancer: NSCLC) の転移・非転移及び病期を特徴づけるタンパク質分子群の探索を試みた。東京医科大学外科1講座における原発性肺腺癌手術症例 (2003年から2004年) につき、術後ICのとれたホルマリン固定パラフィン包埋切除標本としてIA期 (リンパ節転移 なし) 7症例、IIIA期 (リンパ節転移 あり) 6症例を用いた。

FFPE組織切片 (厚さ10 μ m、面積 2mm x 4mm) を、脱パラ後、ヘマトキシレン染色を行い、マイクロダイセクションで各試料当たり 30,000セル相当を収集した。収集癌細胞群からタンパク質可溶化技術 (Liquid Tissue®) を用いて抽出し、トリ

プシンによる酵素特異的消化を行いペプチド混合物試料とした。ペプチド混合物は高感度液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) によりプロテオーム解析を行い、タンパク質同定には検索ソフト Mascot v2.1.04を用いた。

D. 考察

原発巣間 (IA 対IIIA) の比較では、

- 1) タンパク質同定ソフトMascot (p-value < 0.05) で約 630タンパク質が同定された。
- 2) IA及びIIIA期特異的また共通はタンパク質の同定数はほぼ同等であった。
- 3) 特にIIIA期では進行性腫瘍形成、悪性腫瘍、転移関連と云われているタンパク質が多く検出された。
- 4) また、IA期を特徴づけるタンパク質も多く見出された。

IIIA期縦隔リンパ節巣とその原発巣の比較では、

- 1) タンパク質同定ソフトMascot (p-value < 0.05) で約500 タンパク質が同定された。
- 2) リンパ節巣で同定されたタンパク質の多くは原発巣と共通であった。

リンパ節特異的なタンパク質の数はあまり多くはなかった。

比較的分解能の低いLinear Ion Trap質量分析計を用いたため、半定量比較にはタンパク質同定に基礎をおくスペクトラル・カウント法を用いた (図1)。結果として、肺腺がんの進行及び転移に関わると考えられる約80個のバイオマーカー候補を見出した。候補分子のバイオマーカーとしての有効性を確認するために、Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry (MRM MS) に基づいたアッセイ法 (MS-based Assay) を適用し、このMS-based アッセイにより、いくつかの候補分子につき妥当性を評価した。 (図2)

E. 結論

本年度の検討により、形態学的な病期の判定と分子病態的なそれとが異なっているような知見も得ら