

200823005A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成21(2009)年 4月

別添 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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 21 (2009) 年 4 月

別添 2

I. 総括研究報告

- がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発・・・・・・・・・・ 1
山田哲司

II. 分担研究報告

1. プロテオーム解析による新しい膵がん血液診断法の
有用性を検討する多施設共同研究・・・・・・・・・・ 7
安波洋一、土田明彦、中森正二、佐田尚宏、
奥坂拓志、井岡達也、島原政司、山田哲司
2. 血漿ペプチドプロファイルを用いた膵がん診断法の実用化、
血漿・血清腫瘍マーカー候補を迅速に検証するための
逆相血漿マイクロアレイ法の開発・・・・・・・・・・ 11
本田一文
3. 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・・・・・・・・・・ 18
尾野雅哉
4. 特異抗体を用いた炎症性サイトカインの網羅的解析、
血清腫瘍マーカーの候補となる
腫瘍組織に特異的タンパク質の解析・・・・・・・・・・ 26
近藤格
5. ホルマリン固定肺癌保存組織を用いた肺癌タイプ識別マーカーの
探索と検証・・・・・・・・・・ 29
西村俊秀

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 32

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・ 34

別添3

厚生労働科学補助金（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20年度総括研究報告

研究代表者 山田哲司 国立がんセンター研究所 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は有効ながん対策法の一つと考えられる。本研究班では、非浸襲的に得られる血液を検体に用い、精密検診を行うべき症例を効率良く絞るプレスクリーニングに使用できる新規腫瘍マーカーを開発することを目的とし、下記の5項目を分担して研究を行った。

1. 多施設共同研究による血漿・血清検体の収集

腫瘍マーカーの開発と検証を目的として、大規模な血漿・血清バンクの構築を進めている。国際がんバイオマーカーコンソーシアム(ICBC, International Cancer Biomarker Consortium)へ唯一の日本チームとして参加し、7つの医療機関（自治医科大学病院、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、国立病院機構大阪医療センター、福岡大学病院、大阪医科大学病院）より膵がん、胃がん、大腸がん、肝細胞がんなどの消化器がん患者、鑑別疾患の対象となる良性疾患患者、および健常者より同一の採血・保存プロトコールで血漿・血清検体を臨床情報とともに収集した。平成21年3月4日採血分までで1315症例分の血清・血漿検体の収集が終了した。

2. 膵がんの血液診断法の検証とマーカー分子の構造解明

逆相磁気ピーズクロマトグラフィーによる血漿前処理とMALDI-QqTOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Quadrupole Time-Of-Flight) による精密質量分析により、従来より報告している低分子のマーカータンパク質が検出できることを確認した。現在までに上記多施設共同研究で前向きに収集した検体を含め4つの独立したコホート1594例分の血漿タンパク質の質量分析が終了した。さらにハイデルベルグ大学との共同研究により同大学の163検体を解析し、同様の結果が得られることが明らかになった。

3. 血漿フィブリノーゲンの酸化修飾検出による膵がん診断法の開発

国立がんセンター研究所で独自に開発した 2DICAL (2-Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and mass spectrometry)法により、plasma fibrinogen α -polypeptide の 2 箇所の proline 残基に膵がん患者で酸化修飾が見られることを報告してきたが、今年度は内 1 箇所の proline hydroxylation を特異的に検出できるモノクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて膵がん患者における血漿 fibrinogen の酸化修飾を証明し、また本酸化修飾をもたらす酵素を特定した。ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を構築し、上記多施設共同研究により収集した血漿検体の定量解析し、その有用性を検証した。

4. 炎症性サイトカインの腫瘍マーカーとしての意義の検討

上記血漿・血清バンクの膵がん、胃がん、大腸がん患者、健常者の各 25 例、合計 100 例の血清を用い、サスペンションアレイシステムで 50 種類のサイトカインを定量解析した。FDR (False Discovery Rate) 5%未満の基準で 3 種類の悪性腫瘍に共通して変化するサイトカインを 11 種類同定した。

5. ホルマリン固定肺癌保存組織を用いた新規腫瘍マーカーの探索

ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed Paraffin Embedded: FFPE) 組織切片よりマイクロダイゼクションで得られた微量な検体を用いて、量的な質量分析を行い、肺がんの組織型に関わるタンパク質を同定した。

【分担研究者】

本田一文	国立がんセンター研究所 室長	井岡達也	大阪府立成人病センター 副部長
尾野雅哉	国立がんセンター研究所 室長	土田明彦	東京医科大学 准教授
近藤格	国立がんセンター研究所 プロジェクトリーダー	奥坂拓志	国立がんセンター中央病院 医長
西村俊秀	東京医科大学 客員教授	安波洋一	福岡大学 教授
佐田尚宏	自治医科大学 教授	中森正二	大阪医療センター 診療統括部長
		島原政司	大阪医科大学 教授

A. 研究目的

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。本研究班では、全国どの医療施設でも同じ条件で、被験者の負担が少なく、非侵襲的に得られる血液を検体に用い、精密検診を行うべき症例を効率良く絞るプレスクリーニングに使用できる新規腫瘍マーカーを開発することを最終的な目的としている。平成から15年から17年度までの第3次対がん総合戦略研究事業研究課題「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」では、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90%以上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と思われる。

平成20年度はこの質量分析法の膵がん診断能について検証するため、対象を膵以外の臓器にも範囲を拡げ、大規模な検証研究を行った。

B. 研究方法

多施設共同研究による血清・血漿の収集

各地のがん医療の中核となる7つの医療機関が参加する班組織により添付する研究計画書のように全く同一

の採血、輸送、保存プロトコールで、膵がん以外にも胃がん、大腸がん、などの比較的罹患率の高いがんの罹患患者、および鑑別疾患の対象となる良性疾患患者および健常者から血清・血漿を匿名化された精度の高い臨床情報とともに前向きに集める多施設共同研究を行った。

膵がんの血液診断法の検証とマーカー分子の構造解明

昨年度までに本検査の実用化に向けた技術開発として逆相磁気ビーズクロマトグラフィー (magnetic bead based hydrophobic interaction chromatography system: MBHICs) とMALDI-QqTOF-MS法を組み合わせたMBHICs-MALDI-QqTOF-MS法を考案し、「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システムの確立、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」の3点に重点を置き、開発を進めてきた。

SELDI-QqTOF-MS法によって抽出され報告されてきたペプチドピーク候補のアミノ酸配列と翻訳後修飾状態を決定し、さらに実用化に向けて確立されたMBHICs-MALDI-QqTOF-MSによる血漿プロファイル法による膵がん診断法の診断精度を独立した4つ集団を用いて検証を行った。

血清・血漿のタンパク質発現解析による新規腫瘍マーカーの探索

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。

抽出したペプチドを 2DICAL で解析し、膵がん患者群と健常者群間で U 検定で有意差 ($p < 0.0005$) のあるピークを拾い出し、目視にて確認したものをマーカー候補とした。

炎症性サイトカインの腫瘍マーカーとしての意義の検討

膵癌患者、胃癌患者、大腸癌患者、健常者、それぞれ 25 名ずつより採取した血清サンプル (合計 100 サンプル) を使用した。測定にはバイオラド社の BioPlex サスペンションアレイシステムを使用した。マーカー推奨の方法にしたがって合計 50 種類のサイトカインを調べた。健常者と悪性腫瘍患者の血清間で統計的な有意差を示すものを調べた。Z 検定の p 値に対して、BH 法にて False Discovery Rate (FDR) を推定した。

腫瘍組織のタンパク質発現解析による新規腫瘍マーカーの探索

レーザーマイクロディセクション (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した。

(倫理面への配慮)

多施設共同研究の実施にあたっては「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、平成 16 年 12 月 28 日改正)」等の指針に沿った計画を作成し、国立がんセンターおよび自治医科大学、東京医科大学、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、福岡大学の 7 施設で倫理委員会による審査を受け、研究によって提供者に危険や不利益が生じない事、匿名化が厳重に行われ、個人情報厳重に管理されていること、提供者に同意を得る方法に倫理的な問題がないことを確認し、施設審査委員会の承認を得た後に研究を開始した。

C. 研究結果

多施設共同研究による血清・血漿の収集

全国 7 施設から血液検体を集める方法を統一した。平成 21 年 3 月 4 日採血分までで 1315 症例分の血清・血漿検体の収集が終了した。全ての検体において血清ビリルビン値と既存の腫瘍マーカーの CEA、CA19-9、DuPan-2 の値を測定した。

膵がんの血液診断法の検証とマーカー分子の構造解明

浸潤性膵管がん患者では健常者に比べて高度な統計学的有意差を持って低下し、健常者から浸潤性膵管がんを選別するための AUC 値は 0.885 であった。早期膵がん（臨床病期 I, II）に対する AUC 値は 0.835、進行膵がん（臨床病期 III, IV）に対する AUC 値は 0.896 であった。浸潤性膵管がん臨床病期 I, II, III, IV のすべてで統計学的有意性を持って PancJudge の発現低下が認められた ($p=1.99E-3$, $6.924E-8$, $3.149E-19$, $2.857E-32$)。浸潤性膵管がん以外の消化器疾患で AUC 値が 0.85 を超えたものは、浸潤性膵管がん以外の膵悪性腫瘍 (0.921)、慢性膵炎 (0.971)、十二指腸がん (0.939) のみであった。さらに Ca19-9、DUPA2 の組み合わせによる診断精度の検証を試みた。ロジスティック回帰法を用いた組み合わせによる浸潤性膵管がんの判別 AUC 値は 0.996 と高値を示し、CA19-9、DUPAN2 単独による AUC 値 0.907、0.921 より上回った。

ハイデルベルグ大学外科学病院で採取された膵がん (n=52)、慢性膵炎 (n=58)、健常者 (n=53) の血漿検体を用いて PancJudge の有用性を検討した。膵がんを健常者から判別する AUC 値は 0.946 であり、慢性膵炎を健常者から判別する AUC 値は 0.857 であった。

血清・血漿のタンパク質発現解析による新規腫瘍マーカーの探索

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。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。

これらのピークのなかでペプチド配列が決定されたものに、水酸化プロリンを含む α -フィブリノゲンのペプチド配列が認められたため、この配列に対する特異抗体を作成した。この抗体は、 α -フィブリノゲンがタンパク質の状態でも反応したため、2DICAL で解析した血漿でその発現を解析したところ、膵がんで水酸化プロリンを含む α -フィブリノゲンの発現が上昇していることが確認された。

さらに、本研究班で収集した血液での発現を解析したところ健常者に比べ膵がんで有意に上昇していることが確認された。年齢性別をあわせ、各種疾患での発現を調べたところ、膵がんでより上昇が認められた。

炎症性サイトカインの腫瘍マーカーとしての意義の検討

健常者と悪性腫瘍患者の血清間で統計的な有意差(Z検定のp値に対して、BH法にてFalse Discovery Rateが5%未満)を示したサイトカインとして、膵癌で25種類、胃癌で25種類、大腸癌で24種類を特定した。3種類の悪性腫瘍に共通していたものは11種類あり、それぞれの悪性腫瘍に特有的なものは膵癌で5種類、胃がんで4種類、大腸癌で6種類だった。

ホルマリン固定肺癌保存組織を用いた新規腫瘍マーカーの探索

大細胞癌 (large cell cancer: LCC)、小細胞癌 (small-cell lung cancer: SCLC)、肺大細胞神経内分泌系癌 (large cell neuroendocrine cancer: LCNEC) の各々1,000種類以上のタンパク質が同定された。同定されたタンパク質群におけるスペクトラル・カウンティングに基づく半定量比較解析から各群に有意と考えられるタンパク質を各々100種類以上見出した。

D. 考察

臨床検体のプロテオーム解析を行う場合は、その検体の採血、保存方法で、結果は大きく左右される。今回われわれは日本全国の地理的に異なる計7施設から同一の方法で検体を採取して輸送・保存する実際の臨床検査を想定したシステムを構築した。この検体を用いことにより、がん検診に応用し

た場合に近いデータが取得できたと考えられる。今後より汎用性の高いがん検診に応用可能な血液診断法を開発するため、新たな腫瘍マーカーの探索が必要である。

E. 結論

全国7施設の病院から膵がん患者を中心にその他の消化器疾患や健常者の血液検体を同一のプロトコールで収集するシステムを構築した。この検体を用いて質量分析法による膵がんの血漿診断法の診断能について大規模な検証実験を行い、良好な成績がえられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

分担研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許出願

分担研究報告書に記載

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添4

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

「プロテオーム解析による新しい膵がん血液診断法の 有用性を検討する多施設共同研究」

	氏名	所属	職名
分担研究者	安波洋一	福岡大学	教授
分担研究者	土田明彦	東京医科大学	准教授
分担研究者	中森正二	大阪医療センター	統括診療部長
分担研究者	佐田尚宏	自治医科大学	教授
分担研究者	奥坂拓志	国立がんセンター中央病院	医長
分担研究者	井岡達也	大阪府立成人病センター	副部長
分担研究者	島原政司	大阪医科大学	教授
主任研究者	山田哲司	国立がんセンター研究所	部長

（順不同）

研究要旨

平成17年度までに開発した膵がんの血液診断法の検証、および新規腫瘍マーカーの探索のために、本研究班では大規模な血液（血漿・血清）の収集を進めている。7つの医療機関（自治医科大学病院、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、国立病院機構大阪医療センター、大阪医科大学病院、福岡大学病院）が参加する班組織により全く同一の採血・輸送・保存のプロトコールで、膵がん以外にも胃がん、大腸がん、などのがんの罹患者、および鑑別疾患の対象となる良性疾患患者および健常者から、匿名化された臨床情報とともに、血清・血漿の前向きに収集し、平成21年3月4日採血分までで、1315名分の検体を保存・管理している。

A. 研究目的

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は有効ながん対策法の一つと考えられる。

本研究班では、全国どの医療施設でも同じ条件で、被験者の負担が少なく、非侵襲的に得られる血液を検体に用い、精密検診を行うべき症例を効率良

く絞るプレスクリーニングに使用できる新規腫瘍マーカーを開発することを最終的な目的としている。平成から15年から17年度までの第3次対がん総合戦略研究事業研究課題「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」では、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90%以上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。

平成18年度よりは前向きに検体を集め、この質量分析法の膵がん診断能について検証すること、対象を膵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にも対応できる搬送システムを確立することを目的とした多施設共同研究を開始した。

B. 研究方法

プロテオーム解析による血液診断法を検診に応用し、実用化していくためには、複数施設から同一のプロトコールで採血し収集された多数の症例を用いて、その感度、特異度を検証していく必要がある。今年度は各地のがん医療の中核となる7つの医療機関が参加する班組織により全く同一の採

血、輸送、保存プロトコールで、膵がん以外にも胃がん、大腸がん、などの比較的罹患率の高いがんの罹患患者、および鑑別疾患の対象となる良性疾患患者および健常者から血清・血漿を匿名化された精度の高い臨床情報とともに集める多施設共同研究を開始した。

また将来の臨床検査への展開が迅速に可能なように、血液検体は通常の臨床検査と同様に臨床検査会社の株式会社エスアールエルによって各施設より収集され、同社にて血漿・血清分離を行った。さらに同社は1週間に1回、凍結状態で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に搬出するシステムを構築した。

さらに既存の膵がん血液腫瘍マーカーとの優劣を検討するため血清のCA19-9、DUPAN-2、CEA、およびビリルビン値の測定を行った。搬入された血漿・血清は解析までは国立がんセンター研究所の冷凍庫にて凍結保存した。症例の臨床情報もすべて匿名番号を用いて匿名化を行い、所定の様式の採血前確認書および症例報告書にて収集し、セキュリティーの整備された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の中央サーバーNCC-ProteoJudgeに保存した。

(倫理面への配慮)

「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)」等の指針に沿った計画を作成し、国立がんセンターおよび自治医科大学、東京医科

大学、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、福岡大学の7施設で倫理委員会による審査を受け、研究によって提供者に危険や不利益が生じない事、匿名化が厳重に行われ、個人情報厳重に管理されていること、提供者に同意を得る方法に倫理的な問題がないことを確認し、承認症例内訳（平成20年3月4日まで）

認を得た後に研究を開始した。

C, 研究結果

平成21年3月4日採血分までで1315症例分の血液検体の収集が進んでいる。症例の内訳は下記のとおりである。

	採血前確認書まで	症例報告書受取
健常者	184	138
浸潤性膵管がん	313	285
浸潤性膵管がん以外の膵悪性腫瘍	0	22
良性膵腫瘍・のう胞	66	40
慢性膵炎	13	15
肝細胞がん	34	23
十二指腸がん	17	11
胆管がん・胆のうがん	57	51
良性胆道系疾患	27	24
食道がん	26	17
胃がん	204	171
大腸がん	209	172
GIST	3	4
消化器系良性疾患	16	14
不明	14	0
その他	92	1
除外症例	40	43
合計	1315	1031

D, 考察

臨床検体のプロテオーム解析を行う場合は、その検体の採血、保存方法で、結果は大きく左右される。今回われわれは日本全国の地理的に異なる計7施設から同一の方法で検体を採取し

て輸送・保存する実際の臨床検査を想定したシステムを構築した。この検体を用いことにより、実用化した場合に近いデータが取得できると考えられる。

E, 結論

全国7施設の病院から膵がん患者を中心にその他の消化器疾患や健常者の血液検体を同一のプロトコールで収集した。腫瘍マーカーの開発や検証において、正確な臨床情報が付随し、採血方法、保存状態がそろった大規模な血液収集が重要である。質量分析による膵がん診断法の検証のみならず、新規腫瘍マーカー探査に有用な研究資材になるものと思われる。

F, 健康危険情報

なし

G, 研究発表

1、論文発表

多数のため省略

2、学会発表

多数のため省略

H, 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1、特許出願

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

がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発

「血漿ペプチドプロファイルを用いた膵がん診断法の実用化」

「血漿・血清腫瘍マーカー候補を迅速に検証するための逆相血漿マイクロアレイ法の開発」

分担研究者 氏名 本田一文 所属 国立がんセンター研究所 化学療法部 室長

研究要旨

「血漿ペプチドプロファイルを用いた膵がん診断法の実用化」

難治がんの一つである膵がんの死亡率を減少させるために、早期膵がんを効率良く判定する血漿ペプチドプロファイルによる膵がん診断法の開発を行ってきた。昨年度までわれわれは、逆相磁気ビーズクロマトグラフィー (magnetic bead based hydrophobic interaction chromatography system: MBHICs) と MALDI-QqTOF-MS (high-resolution performance hybrid quadrupole matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) を組み合わせて血漿ペプチドプロファイルを取得する MBHICs MALDI-QqTOF-MS 法を開発し、その自動計測法、再現性の確認、小規模検体による診断精度の検証を行ってきた。本年度はこの計測システムを用いて本研究班で収集された 833 例分の消化器悪性腫瘍、消化器良性疾患、健常者に対する診断精度の検証と、さらにハイデルベルグ大学外科学病院で収集された膵がん、慢性膵炎、健常者血漿の合計 163 例分の血清検体診断精度検証を試みた。国内 7 臨床施設から前向きに収集された 833 例の血漿検体に対する本診断法の診断精度は、膵がんと健常者間で AUC (area under curve) 値で 0.885 に達することが検証された。さらに、CA19-9 と DUPAN2 をロジスティック回帰法で組み合わせることにより 0.99 を超える診断精度を有することを確認した。また、本邦で収集された血漿検体のみならず、ドイツハイデルベルグ大学の血清検体でも、本診断法の AUC 値は 0.946 に達することを確認した。

「血漿・血清腫瘍マーカー候補を迅速に検証するための逆相血漿マイクロアレイ法の開発」
血漿・血清たんぱく質を網羅的に解析し得られたバイオマーカー候補は、別に集められた多数の血液検体を用いた検証研究で有用性が確認されて初めて、その臨床的意義を議論することが可能になる。われわれの研究室では、網羅的解析で得られた血漿・血清バイオマーカー候補の迅速検証研究ツールを開発するために、ガラス基板上に血漿検体を 100 μm の直径で 6144 スポットにマイクロアレイできる逆相血漿マイクロアレイの技術開発を行った。本研究班で収集した 384 例の消化器悪性腫瘍、消化器良性疾患、健常者血漿 384 検体を 4 段階の濃度で希釈し 4 重複でプリントした逆相血漿マイクロアレイを作成した。現在、血漿診断マーカー候補の有用性確認試験を行っている。

I、「血漿ペプチドプロファイルを用いた膵がん診断法の実用化」

A,研究目的

われわれは、SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) QqTOF・MS法を用いた血漿ペプチドプロファイル法による早期膵がん新規診断法の可能性を報告してきた。本研究は、本診断法の診断精度を検証するために前向きに収集された血液検体を使ってその精度を確認し、本診断法が新規早期膵がん診断法として実用化が可能かどうかを検討するために行った。

B,前年度までの概要

前年度までに、実用化を考え SELDI-QqTOF・MS法に代わる新規血漿ペプチドプロファイル取得法である MBHICs-MALDI-QqTOF・MS法による血漿ペプチドプロファイル法の技術基盤を確立しプロトコールを作成した。さらに昨年度は MBHICs-MALDI-QqTOF・MS法の信頼性と計測法の妥当性を検討するために、以前われわれが SELDI-QqTOF・MS法で計測した経験がある膵がんと健常者の血漿検体を MBHICs-MALDI-QqTOF・MSで計測し新規計測法に対する診断精度の確認を行った。この結果は SELDI-QqTOF・MSとほぼ同様な成績で診断できたため、さらに国立がんセンター中央病院単施設で収集された未計測血漿検体を用いて診断精度の検証を行ったが、新しい検体を用いてもその精度は安定であることが確認された。そこで、昨年度は本研究班で前向きに収集されたもののうち 220 例を任意に抜きだし計測したが、高い診断精度で検証できることを確認

されたため、昨年度の研究報告書に以上のところまでを報告した。また、本診断法に關与する血漿タンパク質の同定およびその翻訳後修飾の決定は昨年度まで完了している（未発表のためたんぱく名と翻訳語修飾の詳細は割愛）。

本年度は、MBHICs-MALDI-QqTOF・MS法による早期膵がん診断法が、実用化に耐えるかどうかを検討する目的で、本研究班で上記目的のために前向きに集められた 833 例の消化器悪性腫瘍、消化器良性疾病、健常者血漿を用いて、診断精度の検証を行った。さらに、日本国内のみならずドイツから供与された検体を用いて、生活習慣や人種間差を超えた診断精度検証を行った。

C,方法

- 1) 前向き収集された未治療症例の消化器疾患患者（詳細は以下：浸潤性膵管がん n=249, 浸潤性膵管がん以外の膵悪性腫瘍 n=18, 良性膵腫瘍・のう胞 n=38, 慢性膵炎 n=14, 肝細胞がん n=13, 十二指腸がん n=10, 胆道がん・胆管がん n=44, 良性胆道系疾患 n=21, 食道がん n=11, 胃がん n=142, 大腸がん n=142, GIST n=3）と健常対照者（n=128）の 833 症例分の血漿検体から MBHICs-MALDI-QqTOF・MS法を使って血漿ペプチドプロファイルを取得した。
- 2) 上記 1) で記された 833 例の血漿検体は、CA19-9, CEA, DUPAM2 が ELISA 法を用いて計測された。
- 3) ドイツハイデルベルグ大学外科学病院で集められた未治療症例の膵がんおよび慢性膵炎の血清検体（詳細は以下：慢性膵炎

n=58, 膵が 52) と健常者 (n=53) の計 163 分の血清検体から MBHICs-MALDI-QqTOF-MS 法を使って血清ペプチドプロファイルを取得した。

D, 結果

1) 日本国内の 7 臨床施設から前向きに収集された計 833 例分の血漿検体を用いた検証研究

以前報告した 5 本のペプチドピークのうち 3 本のペプチドピークで浸潤性膵管がん と健常者間で高度な統計学的有意性が認められた (ペプチド名は割愛。ペプチド名は便宜上ペプチド A, ペプチド B, ペプチド C と略す)。ペプチド B とペプチド C は同一たんぱく質の同一ペプチド断片であったがペプチド C はペプチド B の酸化体であり、さらにその統計学有意性も浸潤性膵管がん と健常者の間で明らかな差が認められなかったため、S/N 比の大きなペプチド B のイオン化強度情報を採用し、ペプチド C は今後の解析対象から除外した。(ペプチド A: $p=4.224E-17$, ペプチド B: $p=9.558E-38$)。この 2 本のペプチドイオン化強度の和による診断法を PancJudge と命名し診断精度検証を行ったところ、浸潤性膵管がん患者では健常者に比べて高度な統計学的有意差を持って低下し、健常者から浸潤性膵管がんを選別するための AUC 値は 0.885 であった。早期膵がん (臨床病期 I, II) に対する AUC 値は 0.835、進行膵がん (臨床病期 III, IV) に対する AUC 値は 0.896 であった。浸潤性膵管がん臨床病期 I, II, III, IV のすべてで統計学的有意性を持って PancJudge の発現低下が認められた ($p=1.99E-3$, $6.924E-8$, $3.149E-19$, $2.857E-32$)。浸潤性

膵管がん以外の消化器疾患で AUC 値が 0.85 を超えたものは、浸潤性膵管がん以外の膵悪性腫瘍 (0.921)、慢性膵炎 (0.971)、十二指腸がん (0.939) のみであった。

PancJudge と Ca19-9, DUPAN2 の組み合わせによる診断精度の検証を試みた。ロジスティック回帰法を用いた PancJudge, Ca19-9, DUPAN2 の組み合わせによる浸潤性膵管がんの判別 AUC 値は 0.996 と高値を示した。CA19-9, DUPAN2 単独による AUC 値はそれぞれ 0.907, 0.921 であった。

2) ドイツハイデルベルグ大学外科学病院で収集された 163 例分の血清検体を用いた検証研究

ハイデルベルグ大学外科学病院で採取された膵がん (n=52)、慢性膵炎 (n=58)、健常者 (n=53) の血漿検体を用いて PancJudge の有用性を検討した。膵がんを健常者から判別する AUC 値は 0.946 であり、慢性膵炎を健常者から判別する AUC 値は 0.857 であった。

3) 実用化を見据えた三菱化学、モリキュエンスとの共同研究

MBHICs 用の磁気ビーズの安定供給と品質保証の管理を目的に三菱化学グループに磁気ビーズ作成を依頼し、タンパク質脱塩用 C8 磁器ビーズを作成した。さらにその磁気ビーズに特化した MBHICs-MALDI-QqTOF-MS 法のプロトコールを確立した。本プロトコールと血漿検体は三菱化学グループのモリキュエンスに技術移管され、モリキュエンス社にて 1000 例を超える血漿検体が本方法を用いた解析が進めら

れている。

E, まとめ

- 1) PancJudge は、日本人の浸潤性膵管がん患者で健常者にくらべて高度な統計学的有意性を持って低下することが検証された。
- 2) PancJudge は、浸潤性膵管がん、浸潤性膵管がん以外の膵悪性腫瘍、慢性膵炎、十二指腸悪性腫瘍で 0.85 を超える AUC 値を持つことが判明した。
- 3) Ca19-9、DUPAN2、PancJudge の組み合わせは早期膵管がんを含めて健常者から判別できる可能性がある。
- 4) 同様な結果がドイツで収集された血清検体でも確認できた。
- 5) 三菱化学グループと実用化を見据えた共同研究が進行中である。

II, 「血漿・血清腫瘍マーカー候補を迅速に検証するための逆相血漿マイクロアレイ法の開発」

A, 研究目的

網羅的発現解析を用いたバイオマーカー研究では、探索研究に依存しない多数の検体を用いて検証研究が行われなければならない。血漿・血清に対してプロテオームの手法を用いて網羅的な探索研究が行われても、それを迅速に検証するためのツールがなければ、臨床現場で使用できる真実のマーカーにたどり着くことは困難である。本研究の目的は簡便で迅速な検証研究用ツールを構築することを目的に、ガラス基板上に血液検体を多数印刷する逆相血漿マイクロア

レイ法を確立するである。

B, 方法と結果

本研究班で収集された血漿検体から先述の PancJudge 前向き検証研究以外で使用を承諾されている血漿検体を 384 症例分選別し (詳細は下記 健常者 n=106, 浸潤性膵管がん n=164, 浸潤性膵管がん以外の膵悪性腫瘍 n=22, 慢性膵炎 n=10, 肝細胞がん n=11, 胆管・胆道がん n=13, 胃がん n=30, 大腸がん n=28)、この検体を 4 種類の希釈濃度、4 重複試験で印刷した計 6144 スポットを有する逆相血漿マイクロアレイとして作成できる技術基盤を確立した。現在までに 300 枚以上の上記マイクロアレイを作成した。さらに、このマイクロアレイを蛍光抗体法で検出できる基盤技術を確立した

C, まとめ

- 1) 逆相血漿マイクロアレイ技術基盤を確立し、300 枚以上の血漿マイクロアレイを作成した。
- 2) 蛍光抗体法を用いて多数検体を有するマイクロアレイから特定のたんぱく質の発現プロファイルを迅速に取得できるシステム構築を完了した。

III, 健康危険情報

特になし

IV, 研究発表

(2008 年 4 月 1 日から 2009 年 3 月 31 日まで)

論文発表

- 1, Yamamoto, S., H. Tsuda, K. Honda,

- K. Onozato, M. Takano, S. Tamai, I. Imoto, J. Inazawa, T. Yamada, and O. Matsubara. 2009. Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol*.
- 2, Negishi A., M. Ono, Y. Handa, H. Kato, K. Yamashita, K. Honda, M. Shitashige, R. Satow, T. Sakuma, H. Kuwabara, K. Omura, S. Hirohashi, and T. Yamada. 2009. Large-scale quantitative clinical proteomics by label-free liquid chromatography and mass spectrometry. *Cancer Sci*. 100:514-9.3,
- 3, Yamaguchi, U., R. Nakayama, K. Honda, H. Ichikawa, T. Hasegawa, M. Shitashige, M. Ono, A. Shoji, T. Sakuma, H. Kuwabara, Y. Shimada, M. Sasako, T. Shimoda, A. Kawai, S. Hirohashi, and T. Yamada. 2008. Distinct gene expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*. 26:4100-8.
- 4, Shitashige, M., R. Satow, K. Honda, M. Ono, S. Hirohashi, and T. Yamada. 2008. Regulation of Wnt signaling by the nuclear pore complex. *Gastroenterology*. 134:1961-71, 1971 e1-4.
- 5, Kikuchi, S., K. Honda, H. Tsuda, N. Hiraoka, I. Imoto, T. Kosuge, T. Umaki, K. Onozato, M. Shitashige, U. Yamaguchi, M. Ono, A. Tsuchida, T. Aoki, J. Inazawa, S. Hirohashi, and T. Yamada. 2008. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res*. 14:5348-56.
- 6, 本田一文, 尾野雅哉, 下重美紀, 佐藤礼子, 山田哲司 癌分子診断のための手法 プロテオミクス解析 *がん薬物療法学 - 基礎・臨床研究のアップデート - 日本臨床* 2009年増刊号 180-185 (2009.1)
- 7, 尾野雅哉, 佐藤礼子, 下重美紀, 本田一文, 山田哲司 癌診断治療のバイオマーカー - *Cancer Frontier*(1344-8919)10巻1号 Page14-20(2008.08)
- 8, 原智彦, 本田一文, 内藤克輔, 廣橋説雄, 山田哲司 腎細胞癌の診断と治療 診断 質量分析における腎がんの診断 *尿路悪性腫瘍研究会記録34巻* Page25-30(2008.10)
- 9, 原智彦, 内藤克輔, 本田一文, 山田哲司 質量分析器を用いたヒト体液タンパクプロファイル解析による疾患バイオマーカー探索 *西日本泌尿器科* 70 巻 9 号 Page484-491(2008.09)
- 10, 下重美紀, 佐藤礼子, 本田一文, 尾野雅哉, 山田哲司 臨床プロテオミクスの現状と将来像 網羅的から選択的解析へ/定性から定量的解析へ 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*

学会発表

1, K. Honda, S. Kikuchi, H. Tsuda, N. Hiraoka, I. Imoto, J. Inazawa, S. Hirohashi, T. Yamada. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. **Annual Meeting 2008. American Association for Cancer Research**. April 2008 in. San Diego CA USA.

2, U. Yamaguchi, R. Nakayama, K. Honda, H. Ichikawa, A. Kawai, S. Hirohashi, T. Yamada. Distinct gene-expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor. **Annual Meeting 2008. American Association for Cancer Research**, April 2008 in. San Diego CA USA.

3, K. Honda, M. Ono, T. Yamada. Multi-institutional validation of plasma biomarker of pancreatic cancer by MALDI-TOF-MS. **HUPO 7th Annual World Congress 2008**, August 2009 in Amsterdam Nederlanden

4, 根岸綾子, 尾野雅哉, 本田一文, 松原淳一, 村越雄介, 廣橋説雄, 小村健, 山田哲司. Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue of squamous cell carcinoma of the tongue 第66回 日本癌学会総会 ワークショップ 2008年9月 名古屋

5, 本田一文, 菊池哲, 津田均, 平岡伸介,

稲澤譲治, 井本逸勢, 廣橋説雄, 山田哲司. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas 第66回 日本癌学会総会 ワークショップ 2008年9月 名古屋

6, 山口洋, 中山ロバート, 本田一文, 市川仁, 長谷川匡, 島田安博, 笹子三津留, 下田忠和, 川井章, 廣橋説雄, 山田哲司. Gene-expression-defined Classes of Gastrointestinal Stromal Tumor 第66回 日本癌学会総会 ワークショップ 2008年9月 名古屋

7, 下重美紀, 佐藤礼子, 地神貴史, 本田一文, 廣橋説雄, 山田哲司. Regulation of Wnt Signaling by the Nuclear Pore Complex 第66回 日本癌学会総会 ワークショップ 2008年9月 名古屋

8, 村越雄介, 尾野雅哉, 笹月静, 根岸綾子, 本田一文, 土田明彦, 津金昌一郎, 廣橋説雄, 山田哲司. Large-scale plasma proteomics of colorectal cancer 第66回 日本癌学会総会 ポスター 2008年9月 名古屋

9, 佐藤礼子, 下重美紀, 地神貴史, 本田一文, 金井弥栄, 廣橋説雄, 山田哲司. Combined functional genomic survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma 第66回 日本癌学会総会 ポスター 2008年9月 名古屋

10, 山本宗平, 津田均, 本田一文, 高野政志, 山田哲司, 井本逸勢, 稲澤譲治, 松原修

The actinin-4 may be an oncogene in 19q13 region in human ovarian cancers
第66回日本癌学会総会 ポスター 2008年9月 名古屋

11, 山口 洋、本田一文、山田哲司 胃原発消化管間質腫瘍の予後所側マーカーの有用性検討 第28回日本分子腫瘍マーカー研究会 ワークショップ 2008年9月 名古屋

12, K. Honda, T. Yamada. Molecular mechanisms of cell migration in cancer invasion and metastasis The biological role of actinin-4 for cancer invasion and metastasis 第60回 日本細胞生物学会 シンポジウム 横浜

13, 本田一文 膵がんの診断バイオマーカーの開発 第11回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ 「医薬品開発におけるバイオマーカー活用法」シンポジウム 2009年11月 三島

14, 本田一文 膵がん血漿診断マーカーの多施設共同検証 第4回日本臨床プロテオーム研究会 シンポジウム 2008年5月 大阪

15, 本田一文、尾野雅哉、山田哲司 血漿早期膵がんマーカーの多施設共同研究 シンポジウム 日本ヒトプロテオーム機構 第6回大会 大阪 2008年 7月

V, 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1、特許出願

発明の名称：「 α -アクチニン-4遺伝子のコピー数または発現を指標とした膵がんの診断法」

発明者：本田一文、山田哲司、広橋説雄、稲沢譲治、井本逸勢、津田 均

出願番号：特願2007-257198（国内出願）

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団