

## 研究の方法

### 5-1. 検体の種類・量

末梢血： 2検体（合計 13 ml）

1検体（7 ml）から血漿を分離し、プロテオーム解析に用いる。

1検体（6 ml）から血清を分離し、既存の腫瘍マーカー(CEA, CA19-9, DuPan2, CA125, CYFRA など対象疾患によって異なる)を測定する。

### 5-2. 検体の採取

がん患者に対しては未治療時と手術後再来時に採血をおこなう。良性疾患、および健常者に対しては、承諾が得られた時点で採血を行う。別添の説明同意文書を利用して十分な説明の上、書面で承諾を得た上で、全血を符号化した検体識別番号以外、姓名などの個人情報に関連するような事項が記載されていない専用の血漿採取用 EDTA 2Na 含有真空採血管に 7 mL、血清採取用真空採血管に 6 mL 採取し、各施設で一時保存する。採血管には連番の検体番号以外、個人情報に関連するような事項は記載されない。

### 5-3. 検体の搬入・処理

検体は担当医師の記入した検体識別番号以外、姓名などの個人情報に関連するような事項が記載されていない専用の匿名化専用依頼書とともに、検体検査委託契約を結んだ株式会社エスアールエル（東京都立川市曙町二丁目 41 番 19 号）の地域担当営業所によって各施設より収集され、同社の八王子ラボラトリー（東京都八王子市小宮町）に集められる。

同社は血清を用いて既存腫瘍マーカーを測定する。残りの検体は一時的に同社八王子ラボラトリーに-20℃保存され、1週間に1回、凍結保存状態で国立がんセンター研究所化学療法部に搬入する。

国立がんセンター研究所化学療法部にて専用の凍結保存チューブに分注し、再度-80℃にて測定まで専用の冷凍庫で凍結保存する。凍結保存チューブには検体識別番号以外、個人情報に関連するような事項は記載されない。同実験室は作業時間以外常時施錠し、関係者以外を入室させない。

また、医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターへは、測定必要量を検体識別番号のみを記載したチューブに分注し、凍結保存状態で輸送する。仮に残存が出た場合の検体は廃棄する。

### 5-4. 検体の保存および廃棄

検体は国立がんセンター研究所化学療法部の冷凍庫で凍結保存する。提供者との同意事項により検体を廃棄する場合には、充分の水道水で希釈し、廃棄する。

検体は研究期間終了後も同所に保管され、国立がんセンターの倫理審査委員会による審査と承認後、別の研究に使用される場合がある。ただし、更なる研究の目的は腫瘍マーカーの開発に限定した（遺伝子研究は含まない）ものとする。

#### 5-5. 個人識別情報の管理と符号化の方法

検体は登録された時点で、各施設の検体管理責任者が検体識別番号により符号化する。具体的には症例登録時に検体に対応する個人識別情報は施設、症例番号を示す6文字の英数字に変換し、以後、検体は符号化された番号のみで取り扱い、解析に用いる。症例・符号対照表は、各施設の共同研究者により厳重に保管する。

#### 5-6. 測定結果の開示

提供者にプロテオームの解析結果は開示しない。既存の腫瘍マーカーに関しては株式会社エスアールエルより担当医師に報告する。

#### 6-7. プロテオーム解析方法

国立がんセンター研究所化学療法部および医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターにてプロテオーム解析を行い、タンパク質の発現や翻訳後修飾を網羅的に解析する。

### 6. 研究材料、使用機器とそれらを得る方法

#### 研究材料

末梢血： 2検体（合計 13 ml）

1検体（7 ml）から血漿を分離し、1検体（6 ml）から血清を分離し、マーカー開発、および、既存腫瘍マーカーの測定を行う。

#### 使用する機器

- 1) 質量分析計 Q-star XL (Applied Biosystems 社製)
- 2) 質量分析計 Q-star pulsar-i (Applied Biosystems 社製)
- 3) 質量分析計 QTOF ultima (Waters 社製)
- 4) 質量分析計 NanofrontierLD (Hitachi 社製)
- 5) 質量分析計 LTQ Orbitrap XL ELD (Thermo 社製)
- 6) 質量分析計 AB SCIEX QTRAP5500 (Applied Biosystems 社製)
- 7) 質量分析計 Ultra flexIII (Burker 社製)

- 8) 質量分析計 Maxis (Burker 社製)
- 9) 質量分析計 Synapt HDMS (Waters 社製)
- 10) 質量分析計 PrOTOF 2000 (パーキンエルマー社製)
- 11) プロテインマイクロアレイヤー (カケンジェネックス社製)
- 12) プロテインアレイスキャナー (イノプシス社製)
- 13) その他の関連機器

いずれの機器も既に国立がんセンター研究所化学療法部、または医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターに設置済みである。

## 7. 観察項目、臨床検査項目、観察方法、追跡観察期間

### 化学療法部に提供される観察項目、臨床検査項目

臨床情報は、担当医師から検体とは別途郵送される検体識別番号により符号化された採血前確認書と症例報告書を用いて郵送にて収集する。個人の特定につながるような情報は含まれない。採血前確認書と症例報告書はそれぞれの施設で倫理審査委員会あるいはそれに相当する組織で審査を受ける。

送付先：〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1  
国立がんセンター研究所化学療法部 山田哲司

#### 7-1. 採血前確認書

生年月日、年齢、性別、採血日、採血前診断名、病理学的診断の有無（予定）、前治療の有無、がんの既往や合併の有無

#### 7-2. 症例報告書

全例に共通の情報  
病理学的診断の有無（組織型）、最終診断名

がん患者からの情報

原発部位、UICC-TNM 分類（各がんの最新版）、原発巣の最大径、転移臓器

良性腫瘍患者からの情報

原発部位、病名、原発巣の最大径

他の良性疾患患者からの情報

病名

全症例からの情報

## 逸脱事項の有無

本研究は上記の項目とプロテオーム解析結果を比較する研究であり、追跡観察は行わない。

### 8. 患者およびその家族に対する説明と同意を得る方法

担当医師あるいは担当医師が指導・指定した代理人により、研究の内容・目的、不同意による不利益がないこと、さらに同意がいつでも撤回できること、個人情報 は 厳重に管理されることを口頭と説明文書を用いて説明した後、自由意志にて同意を得られ、同意文書に署名した提供者の検体をもちいる。説明文書と同意文書はそれぞれの倫理審査委員会あるいはそれに相当する組織で審査を受ける。

### 本研究で予測される成果

本研究では各種がん患者、良性疾患患者、健常者の血液を臨床情報とともに多施設の共同研究によりプロスペクティブに多数の症例を集積し、プロテオーム解析による臓器・疾患特異的、かつ早期のがんから量や翻訳後修飾が変化する血液タンパク質を同定し、新たな腫瘍マーカーを開発する。本研究の推進により、がんの早期発見を実現し、がん死亡率の激減に寄与する成果が期待される。

### 9. 評価方法とその基準、解析方法、判定の指標とその判定基準は明示されるか。

学術論文や学会発表として発表する際に明示される。

### 10. 有害事象のチェック項目とチェック方法、報告方法

本研究で用いる検体は血漿、血清のみであり、通常の上記に必要な採血に際し、13 mL の採血管を追加するのみで可能である。従って、身体的な危険や負担はほとんどないと考えられる。担当医師の判断で 13 mL でも身体的な影響が予測される場合、当然本研究の対象としては除外する。

本研究で解析するのは血中のペプチドとタンパク質のみであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」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。本研究は既に診断された臨床診断・病理診断と血漿、血清のプロテオーム解析結果をレトロスペクティブに比較する研究であり、提供者の診断や治療方針に一切影響を与えない。

解析者には上記にある臨床情報のみが提供されるため、プロテオームの解析結果と姓名などの個人情報に関連付けられることもない。プロテオーム解析を

行うのは法的に守秘義務をもつ医師または歯科医師の国立がんセンター研究所とプロテオームリサーチセンターの職員、その監督・指導下に業務を行う国立がんセンターとプロテオームリサーチセンターの職員と登録された常勤の研究補助員、癌研究振興財団のリサーチレジデントと医師または歯科医師の研修者に限られる。解析を行う実験室は使用時以外施錠し、個人情報電子媒体として外部ネットワークに接続されたコンピューターに記憶させることはない。匿名化措置とこのような情報の厳密な管理により、個人情報が遺漏する可能性はないと考えられる。また解析後の検体は適切な方法で破棄する。

以上により提供者に対し、本研究により新たに生じる提供者個人の不利益で明らかに予測されるものはない。

### 1 1. 集計表（記録表）とその保管

化学療法部には上記にある観察項目、臨床検査項目のみが提供されるため、プロテオームの解析結果と提供者の氏名や ID 番号などの個人情報が関連付けられることはない。解析結果の生データは化学療法部解析室のサーバーコンピューターとそのバックアップ以外に保存しない。解析室は作業中以外常時施錠し、関係者以外を入室させない。プロテオーム解析を行うのは法的に守秘義務をもつ医師または歯科医師の国立がんセンター研究所の職員と、その監督・指導下に業務を行う国立がんセンターの職員と登録された常勤の研究補助員、癌研究振興財団のリサーチレジデントと医師または歯科医師の研修者に限られる。

### 1 2. 予後の追跡方法、期間

本研究には該当しない。

### 1 3. 最終集計・解析方法

各種がんについて、対照者に比べ、量や翻訳後修飾が変化するタンパク質を探索し、見出された腫瘍マーカー候補の測定系を構築し、健常者および他の疾患（他臓器のがん、良性疾患）とのあいだで定量比較し、疾患特異性・臓器特異性を検討する。また、同一疾患内で病期別発現を調べ、早期診断マーカーとしての有用性を検討する。実用化にあたっては、既存の腫瘍マーカーとの優劣を比較して判断する。

### 1 4. 研究成果の発表方法

本研究の成果は特許申請の可能性を検討後、多施設共同研究として学術論文や学会発表として発表し、その成果を広く医療の進歩のために還元する。これらの情報の公開に際しては、個人情報が含まれることはない。

#### 15. 研究費算定根拠

既に解析に使用する機器は取得済みであるので、採血管などの消耗品と株式会社エスアールエルに委託して行う既存の腫瘍マーカーを測定するための研究費が必要である。委託測定の経費は国立がんセンター研究所化学療法部が負担する。

#### 研究費

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）

#### 16. 病歴の記載：プロトコール番号、実施年月、後の調査に必要な記録など 実施年月

本研究の承認日から平成26年3月31日まで

ただし、必要に応じて国立がんセンターと各共同研究施設の倫理審査委員会の審査と承認を経て、研究期間を延長することがある。

病歴の記載：プロトコール番号、後の調査に必要な記録など  
該当しない。

#### 17. モニタリングの内容及び方法

該当しない。

#### 18. 特許に関連したとりきめ（得られたデータの帰属）

本研究で臨床応用の可能性と市場性のある成果が得られた場合に限り、協議し、互いの同意を得た上で、特許を出願する。

#### 19. 参考文献

1. 山田哲司 厚生労働省科学研究費補助金 第3次対がん総合戦略事業

- がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発 総合研究報告.
2. 稲本善人、河村奨 集検発見膵癌の実態と特徴：全国 14 施設アンケート調査による 消化器集団検診, 96:88-94 1992.
  3. Honda K, Hayashida Y, Umaki T. *et al.* Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Research*, 65:1061-3, 2005.
  4. Ono M, Shitashige M, Honda K. *et al.* Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry, *Molecular Cellular Proteomics* 5:1338-47, 2006.
  5. Negishi A, Ono M, Handa Y. *et al.* Large-scale quantitative clinical proteomics by label-free liquid chromatography and mass spectrometry. *Cancer Science* 100:514-9, 2009
  6. Matsubara J, Ono M, Negishi A. *et al.* Identification of a Predictive Biomarker for Hematologic Toxicities of Gemcitabine. *Journal of Clinical Oncology* 27:2261-8, 2009

「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」  
《協力のお願い説明文書》

■ 1. 研究への協力のお願いについて理解を助けるため、文書で説明します。

現在、国立がんセンターならびに全国の共同研究施設において、「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」の研究が行われています。本研究では、〇〇がんの患者さん、その他の疾患の患者さんや健康な方からいただいた血液のタンパク質の解析を行って、検診に応用できる早期診断マーカーの開発を行います。

この説明をよく理解でき、研究に協力しても良いと考えた場合には、この説明書とおわたしする同意書に署名をお願いします。

■ 2. 「研究に協力するというのは具体的には何をやるのですか？」

血液約13 ml を採血させていただきます。血清と血漿を別々に分離するために、2種類の採血管に約7 mlと6 mlずつ採血させていただきます。がんの治療のために手術を受けられる方には、手術の前後の2回採血させていただく場合があります。

なお担当している医師によって、この採血が病状には全く影響がないと判断した方にものみ、お願いしております。

■ 3. 「気が進まなければ協力を断っても、本当に問題ないのでしょうか？」

もちろん、結構です。この研究に協力をする、しないは完全にあなたの自由であり、如何なる意味でも強制されません。また、この研究に協力しなくても、あなたの今後の診療には何の影響も与えませんし、その他、あなたの不利益になるようなことは一切ありません。

一旦同意された場合でも、いつでもあなたの連絡先(住所・電話番号等)と署名入りのお手紙をいただければ、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができます。その場合はいただいた血液やタンパク質を調べた結果などは廃棄されます。同意の取り消しを希望される時は、この説明文書の末尾に書いてある「お問い合わせ及び同意の取り消しの連絡先」にご連絡ください。

ただし、同意取り消しのご希望をうかがった時にすでにその結果が学術論文に公表されていた場合など、完全に解析結果を廃棄することができない場合があります。

■ 4. 「この研究の目的と意味は何でしょうか？」

がんの早期発見です。〇〇がんやその他の臓器がんも早期に見つけることが出来れば、有効な治療を行い、治癒する可能性が高いと考えられます。簡単な採血による



診断の方法が開発されれば、より多くの方が簡単に検査を受けることができ、治療成績が向上するものと予測されます。

この研究の目的は、〇〇がんの患者さんで特徴的に変化する特異的な血液タンパク質を見出し、検診に利用できる診断マーカーを開発することです。また、他の病気の患者さんでも測定し、腫瘍マーカーとしての特異性を確認いたします。

#### ■5. 「この研究はおおやけに認められたものでしょうか？」

この研究は△△大学や国立がんセンターの倫理や利益相反に関する委員会にて研究の科学的な妥当性、提供された方への不利益や倫理的・経済的な問題がないことが有識者により審査され、承認されたものです。

研究にかかる費用は、国の予算より厚生労働省を通じて支出されています。提供された方にこの研究に関わる費用を負担いただくことは決してありません。

#### ■6. 「私のプライバシーは守られますか？」

血液は病院の略号のアルファベットと連番の数字しか書かれていない容器に採取いたします。また上記のアルファベットと連番の数字に加え、あなたの年齢、性別、研究に必要な限られた医学的な項目を記入した報告書を担当の医師が作成し、別途国立がんセンターに提出します。この報告書にはあなたの名前、カルテ番号、住所や電話番号のような個人的な情報は一切記載されませんので、プライバシーは完全に守られます。

#### ■7. 「研究の責任者を教えてください」

国立がんセンター研究所化学療法部部長山田哲司です。

#### ■8. 「提供した血液の何をしらべるのでしょうか？」

提供していただいた血液から遠心分離して血清と血漿を抽出します。この血清と血漿に含まれている様々なタンパク質の量をまんべんなく正確に測定します。結果をコンピュータに入力し、〇〇がんの患者さん、良性の疾患や他の臓器のがんの患者さん、あるいは健康な方と比較します。コンピュータに入力されるデータには年齢、性別、研究に必要な限られた医学的な項目に限られ、提供していただいた方の名前、カルテ番号、住所や電話番号のような個人的な情報は一切含まれません。

また、すでに診断法として確立している腫瘍マーカー値を、同時に測定します。その結果は担当医師より説明いたします。

血液に含まれる遺伝子(DNA)の情報を解析することはありません。

#### ■9. 「提供した血液は保存されますか？」

この研究は平成26年3月31日に終了する予定ですが、提供された血清と血漿は、研究が終了した後も国立がんセンター研究所において引き続き凍結保存され同様のタンパク質解析研究において活用される可能性があります。

また一旦同意された場合でも、あなたの連絡先(住所・電話番号等)と署名入りのお手紙を担当医師にいただければ、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができ、その場合は保存させていただいている血清や血漿はすべて廃棄します。同意の取り消しを希望される時は、この説明文書の末尾に書いてある「お問い合わせ及び同意の取り消しの連絡先」にご連絡ください。

また凍結保存された血清と血漿は研究責任者の判断により、必要に応じて廃棄される場合もあります。具体的には、検体番号が読みとれなくなった場合、試料の取り違えや混入が起きたような場合、その他研究責任者が必要と認めた場合などです。廃棄に当たっては、あらかじめラベル等にかかれた情報は完全に除去し、医学的に安全性が確かめられた方法で行います。

#### ■10. 「解析の結果は教えてもらえるのですか？また研究成果は公開されるのですか？」

既存の腫瘍マーカー値を測定した結果のみ、お知らせいたします。それ以外の解析の結果は、お一人お一人にはお知らせいたしません。その理由は次の通りです  
本研究の目的は血液タンパク質を解析して、検診に利用できる新しいがん診断法を開発することです。まだ診断法として医学的に確立したものではありません。将来医学的な意義が明らかになった時点で、研究成果をまとまった形で広く社会に公開し、国民全体のがんの治療成績向上に役立てたいと考えています。このような結果の公表の場合、言うまでもなく、研究に協力してくださった方のプライバシーは厳重に守ります。

#### ■11. 「研究に協力することで、私にどのような利益や、不利益・危険性が予想されますか？」

研究の成果は、あなた個人には直接利益になることはほとんどないと思います。しかし、将来のがんのよりよい診断法が確立し、社会的に貢献するということが挙げられます。また同時に測定する、既存の腫瘍マーカー値は、担当医師によって、あなたの診療に活用されます。

一方、予測されるあなたの危険や不利益の可能性はほとんど考えられません。その理由は厳重な匿名化により、個人のプライバシーが保護されていること、血液のタンパク質解析結果と個人情報に関連づけられないこと、さらに13 ml の採血による、身体への影響はほとんどないことです。

## ■12. その他

- ① あなたのご希望により、研究に協力してくださっている他の患者さん達のプライバシー等に問題が生じない範囲で、この研究の計画や方法について資料を見ることができます。
- ② 将来、本研究の成果が特許権など知的財産権を生み出す可能性があります。その場合、権利は国や研究者等に属します。血液等を提供してくださった一人一人の方々には知的財産権は生まれません。
- ③ 本研究に協力してくださることに対しては、金銭などの謝礼はございません。
- ④ 研究に参加するにあたっては、負担していただく費用はありません。一方病気の診断や治療は従来通り、保険診療で行われます。

「お問い合わせ及び同意の取り消しの連絡先」

〇〇大学病院 〇〇府〇〇市大学町〇〇

072-×××-△△△△

〇〇科 〇〇〇〇、△△△△

## 同意書

〇〇大学附属病院  
病院長 〇〇 〇〇殿  
〇〇大学附属病院 〇〇科  
担当医師 〇〇 〇〇 殿

私は、「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」の研究に関して、以下の項目について口頭および文書で十分な説明を受け、理解致しました。

1. 研究の必要性（目的）と内容
2. 危険性（副作用）について
3. 同意しない場合でも不利益を受けないこと
4. 同意した後であっても、いつでも撤回でき、その場合でも不利益を受けないこと
5. プライバシー等の人権の保護について

よって、今回の「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」の研究に参加することに同意致します。

平成 年 月 日

住所 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

氏名 \_\_\_\_\_ 印

説明をおこなった医師

職名 〇〇大学附属病院 〇〇科 \_\_\_\_\_

氏名 \_\_\_\_\_ 印

説明日 \_\_\_\_\_ 年 月 日

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

【研究1：特異抗体を用いたサイトカインの網羅的解析】サイトカインのように通常のプロテオーム解析では微量すぎて測定できないタンパク質を、特異抗体を用いた実験系で調べることで診断マーカーを開発する可能性を検討した。膵がん患者、胃がん患者、大腸がん患者、健常者の血清をそれぞれ20検体ずつ（合計80検体）用い、Meso Scale Discoveryシステムによって10種類のサイトカインの濃度を比較した。それぞれの悪性腫瘍で血清中の濃度が健常者に比べ有意に高いサイトカインを同定した。【研究2：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】正常組織に比べ腫瘍組織で発現亢進するタンパク質のうち、血清腫瘍マーカーになりうるタンパク質を同定することを試みた。大腸がんの手術検体を用い、大型蛍光に次元電気泳動法と186種類の特異抗体によるウェスタンブロッティングで、腫瘍組織で高発現するタンパク質を探索した。発現差のあったタンパク質のうち、大腸がん培養細胞においては細胞外に放出されているタンパク質を同定した。

## 研究1：特異抗体を用いたサイトカインの網羅的解析

### A. 研究目的

通常のプロテオーム解析では同定し難いサイトカインのような超微量タンパク質を特異抗体を用いて調べることで、がん検診に有用なバイオマーカーを開発する可能性を検討している。

### B. 研究方法

#### B-1. 血清サンプル

膵癌患者、胃癌患者、大腸癌患者、健常者、それぞれ20名ずつより採取した血清サンプル（合計80サンプル）を使用した。

#### B-2. Meso Scale Discoveryシステム

測定にはMeso Scale Diagnostics社のMeso Scale Discoveryシステムを使用した。本システムでは複数の特異抗体を固相化したプレートを用い、血清中に含まれる微量なタンパク質の同時測定を高感度に行うことができる。メーカー推奨の方法にしたがって合計10種類のサイトカインを調べた。

#### B-3. 数値解析

それぞれのサイトカインについて、健常者と悪性腫瘍患者の血清間で統計的な有意差（Wilcoxon検定にて $p < 0.05$ 、群間平均値2倍以上）を示すものを調べた。

### C. 研究結果

#### C-1. 10種類のサイトカインの発現レベル

調べたすべてのサイトカインが定量性のあるレンジ内において測定でき、1mlあたりサブピコモルの感度であることを確認した。このことから、Meso Scale Discoveryシステムが血中サイトカインを測定する実験系として有効であると結論した。

#### C-2. 発現解析

健常者と悪性腫瘍患者の血清間で統計的な有意差（Wilcoxon検定の $p$ 値 $< 0.05$ 、群間平均値2倍以上）を示したインターロイキンを、大腸がん、胃がん、膵がん、のそれぞれで1種類ずつ特定した。腫瘍ごとに異なるサイトカインだった。

### D. 考察

プロテオーム解析では比較的発現量の多いタンパク質が血清腫瘍マーカー候補として報告されることがほとんどである。サイトカインのような超微量なタンパク質は現在のプロテオーム解析の技術では測定しがたい。本研究では特異抗体を用いて超微量タンパク質であるサイトカインを調べた。Meso Scale Diagnostics社のMeso Scale Discoveryシステムを使用した。調べた大腸がん、胃がん、膵がんの患者血漿において、それぞれ異なるインターロイキンが健常者よりも高い発現レベルであることが分かった。同様に特異抗体を用いた実験系で、昨年度は異なる原理のBio-Plex（BioRad社）のシステムを使用した。使用した検体は重複している。今回同定されたインターロイキンのうち2つまでが昨年度の実験で同定されたものに含まれていた。

### E. 結論

本研究において、特異抗体を用いて超微量タンパク質（今回はサイトカイン）を網羅的に調べるといふアプローチは血清腫瘍マーカーの候補の探索に有効である可能性が示唆された。同定されたインターロイキンは腫瘍に特異的なもので、それぞれの悪性腫瘍の病態とどのように関わっているのかも含めた検証実験が必要である。

## 研究2：血清腫瘍マーカーの候補となる腫瘍組織にて異常発現するタンパク質の解析

### A. 研究目的

腫瘍組織で発現が異常になっているタンパク質の中から細胞外に放出されているタンパク質を調べ、血清腫瘍マーカー候補を同定すること。

### B. 研究方法

#### B-1. 組織サンプル

国立がんセンター中央病院において外科切除を受けた大腸がん59症例の腫瘍組織と正常組織を研究対象とした。大腸がんの正常組織は腫瘍組織より離れた正常粘膜上皮組織を使用した。

#### B-2. 培養細胞

大腸がん培養細胞7種類を使用した。無血清培地で培養し、1Lの培養上清を遠心濃縮して1-2mlとした。

#### B-3. 組織・細胞からのタンパク質抽出

凍結検体を液体窒素下で粉末破碎し、培養細胞はTCA固定後に、高濃度のウレアを含むタンパク質可溶化液を用いてタンパク質を抽出した。

#### B-4. 蛍光二次元電気泳動法

回収したタンパク質を超高感度の蛍光色素で標識し、内部標準となるサンプルと混合して大型の二次元電気泳動ゲルで分離した。電気泳動後のゲルをレーザーキャナーにかけ、タンパク質スポットを蛍光シグナルとして読み取った。専用の画像解析ソフトを使用して、ゲル間のばらつきを内部標準サンプルで補正しタンパク質発現情報を取得した。

#### B-5. ウェスタンブロッティング

抽出したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、膜に転写したあとで抗体と反応させた。二次抗体と反応させ、ECLシステムとLAS-3000（富士フイルム）にてタンパク質をバンドとして測定・定量化した。

#### B-6. タンパク質同定実験

同定したタンパク質スポットを自動分取ロボットにてゲルから回収し、トリプシンにてペプチド化し、質量分析装置（LTQ、サーモフィニガン社）にてタ

ンパク質を決定した。同定にはMasCotソフトウェアを使用した。

### C. 研究結果

蛍光二次元電気泳動法を用いた実験では、3458種類のタンパク質スポットのうち正常組織と腫瘍組織の間に有意な発現差を示すタンパク質スポット67個を特定した。対応するタンパク質をすべて質量分析で同定した。同定されたタンパク質の中には、細胞外に放出される可能性があり悪性腫瘍の発生や悪性度に関係することが報告されているものが含まれていた。

ウェスタンブロッティングと特異抗体を用いた解析では、186抗体中、正常組織と腫瘍組織で明らかな発現差があるものが34種類あり、そのうち9種類が大腸がん培養細胞の培地中に放出されていることが分かった。

### D. 考察

本研究では、最初から血液検体を調べるのではなく正常組織と腫瘍組織の間に著しく発現差を示すタンパク質を調べ、そのうち細胞外に放出されているタンパク質を調べている。同様の試みは質量分析を用いて行われた報告がある。蛍光二次元電気泳動法やSDS-PAGE/ウェスタンブロットから開始する実験では全長のタンパク質を観察することで翻訳後修飾や分解産物を観察することができるという点が特徴的である。蛍光二次元電気泳動法では発現差があるタンパク質を同定することは比較的容易である。一方、本実験で同定されたタンパク質スポットを血清タンパク質の画像から同定しようとしたが、あまりにも発現パターンが異なりできなかった。並行して行った抗体を用いた発現解析では、同じ抗体を用いて同定されたタンパク質が細胞外へ放出されているかどうかを調べることが容易に可能である。腫瘍組織で発現亢進し、しかもがん細胞の培養上清に放出されているタンパク質が実際に診断マーカーになりうるかを今後検証する必要がある。

### E. 結論

腫瘍組織で発現亢進するタンパク質が血清腫瘍マーカーになる可能性を検討している。蛍光二次元電気泳動法と抗体を用いた二つの実験で、腫瘍組織で発現が異常になっているタンパク質を同定し、一部は大腸がん細胞の培養上清に放出されていることを確認した。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

## 1. 論文発表

1. Kikuta K, Tochigi N, Saito S, Shimoda T, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Suehara Y, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2010; 4, 560-7.
2. Kikuta K, Gotoh M, Kanda T, Tochigi N, Shimoda T, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Suehara Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Pftin as a prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor: novel monoclonal antibody and external validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol.* 2010; 40(1):60-72.
3. Kondo T. Cancer proteome-expression database: Genome Medicine Database of Japan Proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7(1):21-7.
4. Harada C, Tajima H, Hirohashi S, Kondo T. Toward high throughput western blotting using vacuum-driven system and laser scanner; comparison between two signal detection methods based on chemiluminescent and immunofluorescent imaging. *J Electrophoresis* 2009; 53, 63-6.
5. Kikuta K, Tsunehiro Y, Yoshida A, Tochigi N, Hirohashi S, Kawai A, Kondo T. Proteome expression databases of Ewing sarcoma: a segment of the Genome Medicine Database of Japan Proteomics. *J Proteomics Bioinform.* 2009; 2, 500-4.
6. Kosaihiira S, Tsunehiro Y, Tsuta K, Tochigi N, Gemma A, Hirohashi S, Kondo T. Proteome expression databases of lung adenocarcinoma: a segment of the Genome Medicine Database of Japan Proteomics. *J Proteomics Bioinform.* 2009; 2(11), 463-5.
7. Suehara Y, Kikuta K, Nakayam R, Fujii K, Ichikawa H, Shibata T, Seki K, Hasegawa T, Gotoh T, Tochigi N, Shimoda T, Shimada Y, Sano T, Beppu Y, Kurosawa H, Hirohashi S, Kawai A, Kondo T. Anatomic site-specific proteomic signatures of gastrointestinal stromal tumors. *Proteomics Clin Appl.* 2009; 3, 584-96.
8. Suehara Y, Kikuta K, Nakayam R, Tochigi N, Seki K, Ichikawa H, Fujii K, Hasegawa T, Shimoda T, Kurosawa H, Chuman H, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. GST-P1 as a histological biomarker of synovial sarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2009; 3, 623-34.
9. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, Nagino M, Hirohashi S, Kondo T. Antibody-based proteomics for esophageal cancer: Identification of proteins in the nuclear factor-kappaB pathway and mitotic

checkpoint. *Cancer Sci.* 2009;100(9):1612-22.

10. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, Saito S, Nagino M, Hirohashi S, Kondo T. Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics. *Int J Cancer.* 2009; 124(9):2106-15.

## 2. 学会発表

1. 「Pftin, as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor revealed by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and validated by antibody」ヨーロッパプロテオーム学会、ストックホルム、スウェーデン
2. 「Cancer proteomics for biomarker development toward personalized medicine」中国プロテオーム学会、中国
3. 「Cancer proteomics for biomarker development for personalized medicine」Europe Biomarker Summit、バルセロナ、スペイン
4. 「Cancer proteomics for biomarker development; lesson from 10,000 gels of two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and launch for antibody-based proteomics」Clinical and Translational Research on Cancer; Glycomic Applications、志摩
5. 「Cancer proteomics for biomarker study toward personalized medicine」International Congress of Amino Acids, Peptides, and Proteins、ウィーン、オーストリア
6. 「Nucleophosmin as a prognostic biomarker of Ewing sarcoma revealed by proteomics」Human Proteome Organization VIII World Congress、トロント、カナダ
7. 「Cancer proteomics for biomarker development」第68回日本癌学会、横浜
8. 「プロテオーム解析によるがんバイオマーカー開発」第42回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、横浜
9. 「プロテオーム解析によるがんバイオマーカー開発」第82回生化学会シンポジウム、神戸
10. 「プロテオーム解析によるがん術後の転移再発を予測するためのバイオマーカー開発」創薬イノベーションフォーラム、東京
11. 「10,000枚の2D-DIGEから学ぶこと」日本プロテオーム機構第7回大会、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許出願

1) 発明の名称：「ペロキシレドキシシ2の使用、骨肉腫の化学療法奏効性の予測方法及び検査試薬キット」

- ①発明者：近藤格、菊田一貴、川井章、廣橋説雄
- ②出願日：2009年9月15日
- ③出願番号：特願2009-213605
- ④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2) 発明の名称：「セセルニン- 1の使用、滑膜肉腫の予後予測方法及び検査用試薬キット」

- ①発明者：近藤格、川井章、末原義之
- ②出願日：2010年12月16日
- ③出願番号：特願2009-285045
- ④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

3) 発明の名称：「CapGをマーカーとする悪性腫瘍の予後予測検査方法」

- ①発明者：近藤格、尾島英知、諸藤教彰
- ②出願日：2010年3月30日
- ③出願番号：特願2010-076804
- ④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

### 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

「プロテオミクス手法を用いた腫瘍マーカー候補の獲得とその応用について」

	氏名	所属	職名
分担研究者	佐藤雄一	北里大学	准教授

### 研究要旨

様々なプロテオーム手法を駆使して、腫瘍マーカー獲得を行っている。腫瘍細胞を直接免疫する、所謂ランダム免疫法で肺腺癌の新しいマーカーとなる RACK-1 に対する単クローン性抗体を樹立した。大細胞性神経内分泌肺がん培養上清中から神経細胞や神経内分泌細胞由来の VGF タンパク質由来のペプチド断片を見出した。がん患者の体液を効率良く HPLC で分画し、それぞれを二次元電気泳動する方法で、アストロサイトーマ患者の髄液から腫瘍の grade に伴って陽性率が減少し、患者の予後とも相関する gelsolin タンパク質を見出した。また、膀胱癌患者血清からは患者の無再発生存率と有意の相関性を有する S100A8, S100A9 タンパク質を獲得した。腫瘍細胞の二次元電気泳動法により、大細胞性神経内分泌肺がん小細胞性肺がん cytokeratin8, 9, 18, 19 の発現程度が異なることを見出し、多数例の免疫染色の結果、これらの発現は両者の鑑別に有用であることを見出した。また、孤立性大腸がん比して潰瘍性大腸炎関連がん発現が亢進しているタンパク質として、HSP47 を同定した。さらに、免疫染色により、潰瘍性大腸炎関連がん組織で発現が亢進していることを確認した。

#### A, 研究目的

我々の最終目標は低侵襲性で患者への負担の少ない体液（血液、尿）を対象としたがん診断法の確立である。その目的のため、抗体ベースアプローチ（ランダム免疫法による腫瘍特異的単クローン性抗体の作製、がん患者血清、尿中の腫瘍関連自己抗体の解析）とプロテオーム・ペプチドームベース

アプローチ（腫瘍組織、細胞株、患者血清、尿、培養上清中の二次元電気泳動法を基本とした腫瘍関連タンパク質やペプチドの解析）により、患者血清中の新規の診断マーカー、腫瘍の組織亜型や臨床病期に関連したマーカー、抗癌剤感受性予測マーカーを網羅的に獲得することを第一の目的としている。さらに、獲得したマーカー候

補分子に関しては、多数例の腫瘍組織、患者血清、尿等を用いて有用なマーカーを絞り込み、最終的に有用な診断法を確立することを第二の目的としている。

## B. 研究方法

①腫瘍特異的単クローン性抗体の作製には精製抗原は免疫源とせず、腫瘍細胞や組織を直接免疫源に用いる、所謂ランダム免疫法 (Hirohashi et al. *Gann* 75: 485, 1984) を用いて行い、同じ細胞を免疫染色するスクリーニング方法で抗体を選別している。肺腺がん由来細胞株 A549 を直接免疫源に用い、スクリーニングにも AMeX 固定やホルマリン固定しパラフィン包埋した A549 細胞を免疫染色することにより、腫瘍細胞と反応する単クローン性抗体を作製し、樹立した抗体の肺腺がん (AD) との反応性を免疫組織化学的に検討した。

②神経内分泌肺がんの新たな早期診断マーカーの獲得と同時に大細胞性神経内分泌がん (LCNEC) と小細胞がん (SCLC) を鑑別出来るマーカーの獲得を目指して、無血清培地で維持している LCNEC 由来細胞株 LCN1 細胞から分泌されるペプチドを網羅的に独自の方法で精製し解析した。まず、培養上清は脱塩と濃縮を行い、RP-HPLC 装置を用いて分画した。それぞれの分画で培養上清にのみ見られるペプチドのピークは MALDI-TOF MS と MALDI-TOF/TOF MS で解析した。見出した VGF 分子が LCNEC 細胞だけに存在す

るのか否か確認するために 11 種類の肺癌細胞株を用いて、VGF mRNA の発現を RT-PCR 法で確認した。

③SCLC と LCNEC のタンパク質発現を比較する目的で、SCLC 由来細胞株 N231 と LCNEC 由来細胞株 LCN1 は二次元電気泳動法 (2-DE) 法で比較した。さらに、同定された CK7, 8, 18, 19 に対する抗体を用いて肺がん組織を免疫染色した。

④効率よく血清診断マーカーを獲得するため、膀胱がん (UC) 患者より採取した手術前、後の血清を逆相 HPLC により分画し、それぞれの分画物中に含まれるタンパク質を二次元電気泳動により比較した。見出した S100A8, S100A9 の有用性を多数例の UC 組織を用いて免疫組織化学的に検討した。

⑤アストロサイトーマ患者の髄液を独自の方法で濃縮・精製し二次元電気泳動する方法で、腫瘍の grade に伴って発現量が変化するタンパク質の同定を行った。見出された gelsolin に対する抗体を用いて多数例のアストロサイトーマ組織を免疫染色した。

⑥潰瘍性大腸炎は大腸がん発症の危険性が高いことが知られている。潰瘍性大腸炎関連がん細胞株と孤立性大腸がん由来細胞株におけるタンパク質の発現の相違を二次元電気泳動法で比較した。さらに同定された HSP47 の発現を大腸がん組織で免疫組織化学的に検討した。

(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、北里大学での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問題がないことを確認し、承認を得た後に研究を開始した。

### C. 研究結果

①A549 の細胞質と強く反応する抗体を樹立し、この抗体が認識する抗原タンパク質は receptor of activated C kinase (RACK1)であることを確認した。

さらに、この抗体の肺癌組織における有用性を免疫組織化学的に検討した。その結果、RACK1 の発現は腫瘍細胞と気管支上皮細胞の細胞質に認められた。RACK1 の発現は 123 例中 77 例 (62.6%) の AD、44 例中 3 例 (6.8%) の扁平上皮癌 (SCC)、4 例中 1 例

(25.0%) の大細胞がん (LCC)、7 例全例陰性 (0%) の SCLC、6 例中 3 例

(50.0%) の LCNEC に認められた。また、それぞれの平均染色スコアは 2.9、0.1、0.8、0、1.9 であった。AD の陽性率と平均染色スコアは SCC に比して、統計的有意差を持って高い傾向を示した ( $p < 0.0001$ )。さらに、RACK1 の染色性は臨床病期 ( $p = 0.0042$ )、腫瘍径 ( $p = 0.0074$ )、リンパ節転移 ( $p = 0.0009$ ) と統計的有意差を持って、逆相関していた。RACK1 は肺腺癌の予後因子と相関した新たな腫瘍マーカー

一である可能性がある。

②MALDI-TOF MS、MALDI-TOF/TOF MS で解析した結果、2つの神経細胞や内分泌細胞に認められる VGF 由来のペプチド断片を見出した。ISH 法の結果、VGF の発現は 8 例中 7 例の LCNEC、SCLC 等の神経内分泌肺がん細胞株で認められた。しかし、AD や SCC 由来細胞株では発現が認められなかった。この分子は、新たな神経内分泌肺がんのマーカーになる可能性がある。

③SCLC と LCNEC 由来細胞株の 2-DE ではそれぞれ 2,000 以上のタンパク質スポットに展開された。両細胞株で発現量に 2 倍以上の相違の認められるスポットは 25 個認められた。その中で、cytokeratin (CK) 7, 8, 18, 19 の発現は SCLC 由来 N231 細胞に比して LCNEC 由来 LCN1 細胞では、それぞれ 4.6 倍、27 倍、17 倍、3.3 倍亢進していた。さらに、この CKs に対する抗体を用いて 81 例の各種肺癌組織における CKs の発現も検討した。その結果、LCNEC におけるそれぞれの CK の陽性率、染色スコアは AD のそれらと類似していた。また、4つの CK のうち 2 つもしくは 3 つ以上でそれぞれの染色スコアが 8 以上の症例は LCNEC でそれぞれ 28 例中 18 例 (64.3%) と 14 例 (50.0%) であり、SCLC では 28 例中それぞれ 1 例 (4.2%) と 0 例 (0%) であり LCNEC と SCLC の間には統計学的有意差が認められた (それぞれ  $p = 0.0000072$ ,  $p = 0.000052$ )。以上の結果より、SCLC と LCNEC は生物学的特徴が異なっており、CK7, 8, 18, 19 は

SCLC と LCNEC の鑑別に有用なマーカーである可能性が示唆された。

④UC 患者血清で手術前に比して、手術後で大きく減少したタンパク質 S100A8 (calgranulin-A, MRP-8)、S100A9 (calgranulin-B, MRP-14) を同定し、これらに対する抗体を用いて 77 例の UC 組織を対象に免疫組織化学的検討を行った。その結果、両タンパク質とも、正常膀胱上皮には発現は認められなかったが、膀胱癌組織では腫瘍細胞の細胞質や核に症例により様々な程度で認められた。また、臨床病理学的因子との関連性では S100A8 タンパク質の発現増加は腫瘍の筋層浸潤、癌特異的生存率と、S100A9 タンパク質の発現増加は腫瘍の病理学的グレードに関連していることが明らかとなった (それぞれ  $P < 0.05$ )。加えて、両タンパク質の発現増加は腫瘍の無再発生存率とも関連していた (共に  $P < 0.05$ )。多変量解析では S100A8 の発現は再発を予測する重要な因子であることが明らかとなった ( $P < 0.05$ )。S100A8、S100A9 は膀胱癌における患者の予後を作用する因子であると考えられる。

⑤腫瘍のグレードの進行に伴って髄液中の発現量が低下する gelsolin 蛋白を同定した。さらに、41 例のアストロサイトーマ症例を用いた免疫染色の結果、gelsolin は腫瘍細胞の核と細胞質に認められ、腫瘍細胞における陽性率はグレードの進行と共に低下していた。また、陽性率が高い群は低い群に比して、予後良好であることが

明らかとなった gelsolin はアストロサイトーマの予後因子の一つとなる可能性がある。

⑥孤立性大腸がん に比して潰瘍性大腸炎関連がんで発現が亢進しているタンパク質として、HSP47 が同定された。さらに、免疫染色により、潰瘍性大腸炎関連がん組織で発現が亢進していることを確認した。

#### 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、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

様々なプロテオミクス手法を駆使して、血中や尿中そして組織診断上有用となる腫瘍マーカーの獲得を行った。それぞれの手法で、幾つかの腫瘍マーカー候補タンパク質、ペプチドが同定された。統計学的有意差を持って組織特異性や臨床病理学的因子との関連性の高いものや、患者の予後と関連するものが含まれていた。今後、その他の獲得済みの腫瘍マーカー候補タンパク質や抗体の有用性を検討していくと共に、これら分子の患者血清や尿中での有用性を検討していく予定で