

201019009A

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

がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成23(2011)年 5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

がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発

平成 2 2 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 2 3 (2 0 1 1) 年 5 月

別添 2

I. 総括研究報告

- がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
山田哲司、関根茂樹、近藤 格、佐藤雄一
菊池正二郎、島原政司、弦間昭彦、藤田茂之、土田明彦、
中森正二、井岡達也、八木原一博、西洋孝

II. 分担研究報告

1. 「プロテオーム解析技術 2DICAL による血中腫瘍マーカーの開発」・ 8
山田哲司、尾野雅哉
2. がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発・・・・・・・・・・・・ 16
近藤 格
3. 早期大腸がん症例における血清中ダーモカインの解析・・・・・・・・ 21
菊池正二郎
4. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
佐藤雄一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

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22年度総括研究報告

研究代表者 山田哲司 国立がん研究センター研究所 上席副所長

研究要旨

がんの治療成績の向上のためには、無症状の段階でのがんを発見し、早期に治療を開始することが最も有効であることは論を待たない。しかし現状ではがん検診の受診率が充分でなく、また膵がんのように検診方法が確立していない疾患も多い。

本課題ではがん検診のプレスクリーニングに応用できるような新規の血液腫瘍マーカーを開発することを目的として研究を行った。精密ながん検診を行うべき症例を、検診者の負担が少ない簡易な方法により効率良く絞ることが出来れば、がんの早期発見・治療成績の向上につながると考えられる。

【プロテオーム解析に特化した血清・血漿バンクの構築】

血漿・血清のタンパク質は採血や保存状況によってはしばしば不安定であり、腫瘍マーカー開発のためには、タンパク質解析用に厳密に管理された検体バンクが必要である。本課題では多施設共同研究により膵がん、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、および健常者より血漿・血清検体を同一の採血・保存方法で約1500例を越す血清・血漿検体を収集し、腫瘍マーカーの探索・検証に使えるよう整備した。さらにバンクの拡充を現在続けている。

【新規プロテオーム解析基盤技術の開発】

1. 血漿タンパク質の網羅的解析技術の確立

タンパク質の標識なしで、理論上無制限の数の臨床検体が比較定量解析の出来る独自の質量分析技術 2DICAL (Two Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and Mass Spectrometry) 法を開発した(特許出願中)。東レ株式会社との共同研究で中空糸膜による血漿タンパク質の濃縮技術を取り入れ、低濃度の血漿タンパク質を高感度に解析できるようにした。

2. 血漿タンパク質マイクロアレイ技術の確立

日立ハイテクノロジーズ社との共同研究で逆相担体をコートしたスライドガラス上にタンパク質を高密度に定量スポットするアレイ化技術(reverse phase protein array: RPPA)を開発し、スライドガラス1枚で6144検体の定量解析が可能になった。がん患者と対照者の血漿をランダムにスポットした膵がん血漿アレイと大腸がん血漿アレイを作成した。

【新規プロテオーム解析技術で同定した腫瘍マーカー】

1. 高分解能質量分析による膵がん患者の血漿タンパク質プロファイル

従来より報告している8765と17252 m/zのマーカートンパク質が、いずれもアポリポ蛋白の異なる翻訳後修飾に起因することをつきとめた。国内7施設とドイツ1施設の共同研究で収集した4つの独立したコホート1314例の検体を用い、二つの研究施設で独立した検証実験を行った。いずれも病期I期の症例を含めてROC (Receiver Operator Characteristics)解析でAUC (Area Under the Curve)値0.88以上の精度で膵がんが検出できた。無症候の集団における膵がんの簡易なプレスクリーニング法として応用可能性があると思われる。

欧州で特許が成立し(特許番号:1870711)、さらに東レ株式会社との共同研究でアポリポ蛋白A2の翻訳後修飾特異的な抗体が作成できたことで、臨床応用が期待される。

2. 血漿フィブリノーゲンの翻訳後修飾

フィブリノーゲンの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見出し、内1箇所を特異的に検出できるモノクローナル抗体を株式会社トランスジェニックとの共同研究で作成した。競合ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)を構築し、合計685例の血漿検体で定量解析中を行い、その臨床応用可能性を明らかにした。

国内で特許が成立し(特許番号:4319700)、新規診断法として現在ライセンスを進めている。

3. 大腸がんの新規腫瘍マーカーの開発

大腸がん31例と年齢・性別を一致された対照者59名(合計90名)の血清検体例を用い、2DICAL法にてプロテオーム解析を行い、complement component C9がステージI期の症例でも有意に($P=3.02 \times 10^{-3}$)増加することを見出した。さらに大腸がん115例、対照者230名の血清を高密度にスポットした大腸がん血漿マイクロアレイを用いて、診断有用性を検証した。C9は既存の腫瘍マーカー

である carcinoembryonic antigen (CEA) に比べより早期の症例でも上昇することから、検診への応用可能性があると考えられた。

4. 中空糸膜による前処理を用いた定量質量分析による膵がんの新規腫瘍マーカーの開発

中空糸膜によるサンプル分画技術を用いて膵がん患者の血漿タンパク質を濃縮し、2DICAL 法による定量質量分析で血漿中の炎症性サイトカイン CXC Chemokine Ligand 7 (CXCL7) が膵がん症例で有意に ($P=5.0 \times 10^{-5}$) 低下することを見出した。独立した検証コホート (膵がん 140 例、健常者 87 例) でも早期症例を含めて判別能は $AUC=0.85$ と良好であった。CA19-9 と組み合わせることで判別能を有意に改善し ($AUC=0.96$)、CA19-9 の診断性能を補完する新たな腫瘍マーカーであると考えられた。

5. 高密度アレイによる新規膵がん腫瘍マーカーの探索

Abnova 社との共同研究で 1197 種のモノクローナル抗体を得、膵がん患者 164 例と健常者 102 例の血漿をスポットしたマイクロアレイで直接スクリーニングし、 AUC 値 0.80 以上の成績を持つ血漿タンパク質を 33 種同定した。

それらのうち AUC 値がそれぞれ 0.897、0.883、0.864 で、 P 値が 3.44×10^{-30} 、 1.04×10^{-29} 、 2.07×10^{-27} と統計学的に最も高い有意差を示した 3 種の血漿タンパク質については、臨床応用性が高いと判断し、Abnova 社とともに ELISA の構築と特許出願を進めている。

6. 早期大腸がん症例における血清中ダーモカインの解析

ダーモカイン (以下 DK) の ELISA を構築し、大腸がん 130 症例で血清中濃度測定を行った。早期大腸がん症例 (Tis/T1, 33 症例) における感度は DK : 28.6% / 36.8%、DK/CEA/P53 自己抗体/CA19-9 の 4 項目測定 : 64.3%/57.9% となった。DK 単独では特異度 : 92.0%、 $AUC:0.75$ 、 $P=0.037$ であり早期がんに対する血清診断マーカーとして有用性を認めた。免疫組織染色では早期大腸がんでは DK が強発現しており、ELISA の結果を裏付ける結果であった。

【分担研究者】

関根茂樹

国立がん研究センター研究所ユニット長

近藤格

国立がん研究センター研究所分野長

佐藤雄一

北里大学 教授

菊池正二郎
兵庫医科大学 講師

島原政司
大阪医科大学 教授

弦間昭彦
日本医科大学 教授

藤田茂之
和歌山県立医科大学 教授

土田明彦
東京医科大学 准教授

中森正二
大阪医療センター 診療統括部長

井岡達也
大阪府立成人病センター 副部長

八木原一博
埼玉県立がんセンター 医長

西 洋孝
東京医科大学 講師

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18年から20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21年度以降は対象を膵以外の臓器にも範囲を拡げ、新たな腫瘍マーカーの探索を行った。

B, 研究方法

各地のがん医療の中核となる医療機関が参加する多施設共同研究により同一の採血、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ている。この検体などを用いて新規腫瘍マーカーを探索・検証した。

われわれは、昨年度までに350例以上の血漿検体をマイクロアレイした逆相血漿アレイ(reverse phase

plasma array:RPPA)の開発を行ってきた。本年はこの基盤技術を利用し、他の方法で抽出された血漿診断マーカー候補の診断学的有用性を検証した。

(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、各施設で倫理委員会あるいはそれに相当する組織による審査を受け、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

大腸がんの腫瘍マーカー開発

大腸がん患者と健常者血漿に対するショットガンプロテオミクス解析から、健常者に比べて膵がん患者で発現が上昇する血漿診断マーカー候補のapolipoprotein AI (apo AI)と complement 9 (C9)を見出した。本マーカー候補の診断学的有用性を検証する目的で、大腸がん(n=115)、健常者(n=130)の血漿がマイクロアレイされているRPPAを用いて検証した。RPPAを用いた検証研究では、apo AIとC9のAUC(area under curve)は、それ

ぞれ0.62と0.73となり、C9はapo AIに比べて多数症例でもAUCが0.70を超える精度を維持していた。C9は健常者に比べて早期大腸がん患者でも有意な上昇が認められ(p<0.01)、病期の進行にともない上昇した。

さらに上記の症例とは別に前向きなコホートとして収集された検体(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開発研究班」:国立がん研究センター山田班コホート)で作製されたRPPAを利用して診断学的有用性を検討した。C9のAUCは0.80となり、既存の大腸がん血漿腫瘍マーカーである

carcinoembryonic antigen (CEA)をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で計測したときのAUC 0.76に比べて高値であった。C9(RPPA)とCEA(ELISA)を最適化した組み合わせでは、AUCが0.85とさらに上昇した。

膵がん血漿診断マーカー

膵がん患者と健常者血漿に対するショットガンプロテオーム解析から健常者に比べて膵がん患者で減少する血漿診断マーカー候補のCXC chemokine ligand 7 (CXCL7)を見出した。本診断マーカーの診断学的有用性を確認する目的で、膵がん(n=140)、慢性膵炎患者(n=10)および健常者(n=87)の血漿がマイクロアレイされたRPPAを用いて検証した。RPPA(国立がん研究センター山田班コホート)の結果では膵がんと健常者を判別するためのAUCが0.85となり、高値で

検証された。CXCL7 (RPPA) と CA19-9 (ELISA) を最適化した組み合わせでは、AUC が 0.961 とさらに上昇した。

膵がん組織マイクロアレイ (tissue microarray :TMA) と抗体ライブラリーによる膵がん血漿診断マーカーの開発

膵がんの組織マイクロアレイ (tissue micro array: TMA) を国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野が所有する抗体ライブラリーを用いて免疫染色し、健常膵管には発現が認められないが、膵がん細胞に発現する抗原を同定し、その抗原の血漿内での発現を RPPA (国立がん研究センター山田班コホート) で評価した。1021 種類の抗体で構成された抗体ライブラリーから膵がん患者と健常者血漿を AUC 0.80 以上で判別する抗原を 2 種類抽出した。そのうちの 1 種類の抗原 (抗原 A) は、AUC 値が単独で 0.897 と高値を示した。抗原 A の組み換えタンパク質とペプチド抗原を作製し、先述の抗体とは別のエピトープを持つマウスモノクローナル抗体とラビットポリクローナル抗体を数種類作製し、サンドウィッチ ELISA 検出系の構築を行っている。

Apolipoprotein AII ヘテロダイマーを用いた早期膵がん患者の検出

本研究班では、膵がん患者と健常者血漿のトップダウンプロテオミクス解析の結果から apolipoprotein AII ヘテロダイマー (apo-AII ATQ/AT 分

子量 17269 Da) が膵がん患者で減少することを見出している (4)。Apo-AII ATQ/AT の簡便な検査系を構築する目的で、apo-AII ATQ と apo-AII AT に特異的に反応するラビットポリクローナル抗体を作成した。現在サンドウィッチ ELISA 法による検出系を構築している。

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前向きに採取して輸送・保存した検体を用いことにより、バイアスのないより信頼性の高い腫瘍マーカーが得られたものと思う。今後症例数を増やして解析するとともに、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

膵がん、大腸がんで早期症例の検出が可能で検診応用可能性のある腫瘍マーカーの候補が得られた。遠隔地を含む大小規模に係らず全国のどの医療施設でも、被験者の負担が少なく、非侵襲的に得られる血清あるいは血漿を検体に用い、精密検診を行うべき症例を効率良く絞ることができれば、安全にがんの早期発見率を向上させるのみならず、検診費用の削減や地方へ

の均てん化も期待できる。また、国際がんバイオマーカーコンソーシアム (ICBC, International Cancer Biomarker Consortium)へ参加する唯一の日本チームとして活動し、国際的にも評価が得られた。

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

「プロテオーム解析技術 2DICAL による血中腫瘍マーカーの開発」

	氏名	所属	職名
研究代表者	山田哲司	国立がん研究センター研究所	分野長
研究協力者	尾野雅哉	国立がん研究センター研究所 創薬臨床研究分野	ユニット長

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)) 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、膵がん血漿腫瘍マーカー、及び、大腸がん血清腫瘍マーカー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。

大腸がんはがんによる死亡原因として、男性では第3位、女性では第1位を占めているが、2015年には両者とも第1位になると予測されている。大腸がんは病期の早い段階での外科切除による治癒成績が極めて高いことに反して、このように死亡数が多い現状は、治癒が望める段階での発見が不十分であることが一因である。

大腸がん診断にあたっては、便潜血反応が有用であり、大腸がん死亡リスクを軽減するというエビデンスもみられるが、すべての大腸がんをカバーすることはできない。注腸造影や内視鏡検査により、がん発見精度は著しく改善するが、スクリーニング検査としては対費用効果が障害となり、より簡便で精度の高い診断法の開発が期待される。

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。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))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、すでに、膵がん、子

宮体がん等の血中腫瘍マーカーを開発してきたが、本研究では更なる前処理技術を導入して前述のがんに対する新規の血中腫瘍マーカー開発研究を行った。

B. 研究方法

1) 2DICALによるプロテオーム解析
われわれが開発した2DICALを用いて、腫瘍マーカー探索を行った。

2DICAL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を基本とする。この手法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解析をショットガンプロテオミクスで可能にした。同時にサンプル(S)をもうひとつの次元ととらえれば、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ができ、多数検体間の定量比較も可能としている。

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

本研究班で収集された膵がん患者血漿および健常者血漿それぞれ24症例、21症例の計45症例を2DICALによる

解析対象とした。東レ中空糸膜によって、血中に大量に存在するアルブミンを含めた高分子領域のたんぱく質を除去し、質量分析計での解析効率を高めた。抽出画分にトリプシン 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 2 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 2 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

3) 大腸がん血漿腫瘍マーカーの開発

大腸がん 31 症例、健常者 59 症例の血漿を対象とし、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、前記と同様に 2DICAL での解析を行った。

(倫理面への配慮)

国立がん研究センター、その他連携各施設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検体を用いた。

C. 研究結果

1) 膵がん血漿腫瘍マーカー

2DICAL で検出された 53009 ピークの中から、膵がん患者で減少し、膵がん患者群と健常者群間で AUC が 0.84、Mann-Whitney U 検定で $p=0.00005$ の有意差を示すピークが CXC Chemokine Ligand 7 (CXCL7) に由来するペプチドであった。

この結果を本研究班で収集された 237 例の血漿検体を用い、本研究室が独自に開発した reverse-phase protein microarray (RPPM) を用いて検証した。

このコーホートでは、膵がんでは病期 I, II を含めたものでも、健常者と比べ、有意に CXCL7 が減少していた ($p < 0.0001$)。特に、CXCL7 は CA19-9 と独立した因子であり、CXCL7 と CA19-9 を組み合わせることにより、膵がん患者群と健常者群間の AUC 値が 0.961 と著しく改善した。

2) 大腸がん血漿腫瘍マーカー

2DICAL で検出された 94803 ピークの中から、大腸がん患者で上昇し、大腸がん患者群と健常者群間で AUC が 0.75 以上、Mann-Whitney U 検定で $p < 0.0001$ の有意差を示すピークが Complement component 9 (C9) に由来するペプチドとして複数の配列がヒットした。

この結果を大腸がん患者 115 例とそれに性別、年齢を一致させた 230 例の健常者の血漿検体を用い、前述の RPPM を用いて検証した。C9 は大腸がん患者では健常者に比較し、有意に上昇しており ($p = 1.43 \times 10^{-12}$)、病期 I, II の早期においても、有意に上昇していた

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、小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の領域であった。われわれが開発した 2DICAL 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、膵がんや大腸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血漿腫瘍マーカーである CXCL7 は、以前に行われた前処理法では発見できなかったものであり、東レ中空糸膜を用いた新しい前処理法の成果と考えられる。血中の豊富なたんぱく質によって隠されていた物質が質量分析計でみえることになったことで、新しいバイオマーカーが発見されることが明らかになり、前処理法を工夫することによりさらに新しいバイオマーカーが発見できる可能性が広がった。

また、大腸がんのバイオマーカーとして見つかった C9 は、I, II 病期の膵がんや大腸がんの上昇することより、大腸がんの早期発見に有用である可能性が示された。C9 を腫瘍マーカーとして用いるという概念はこれまでになく、血液のプロテオミクス解析により、既知の物質の新しい役割が明らかになる可能性も示唆されている。

E. 結論

- 1、 2DICAL を用い、新規の膵がん、大腸がん血漿腫瘍マーカーの開発に成功した。

2、 血液の前処理を工夫することにより、プロテオミクスによる新規のバイオマーカー開発が行える可能性が明らかとなった。

3、 新規血漿腫瘍マーカーは早期のがん発見に有用であ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

(2010年4月1日から2011年3月31日まで)

1、 論文発表

1) Matsubara J, Ono M, Yamada T. et.al. Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment Molecular Cellular Proteomics. 9(4): 695-704. 2010.

2) Satow R, Ono M, Yamada T. et.al. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in Xenopus axis formation. Journal of Biological Chemistry. 285(34): 26289-94. 2010.

3) Shitashige, Ono M, Yamada T. et.al. Traf2- and Nck-interacting kinase is

essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. Cancer Research. 70(12): 5024-33. 2010.

4) Ono M, Yamada T et.al. Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 20(1):160-71. 2011.

5) Miyamoto Y, Ono M, et.al. Possible Existence of Lysosome-Like Organella within Mitochondria and Its Role in Mitochondrial Quality Control. PLoS ONE. 6(1):e16054. 2011.

6) Murakoshi Y, Ono M, Yamada T. et.al. Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. Cancer Science. 102(3): 630-8. 2011.

7) 尾野雅哉、山田哲司 他 血漿・血清プロテオミクス解析による診断、副作用、予後マーカーの開発 小田吉哉、長野光司編 創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析 pp90-96. 羊土社 東京 2010

- 8) 尾野雅哉 腫瘍マーカー温故知新 丸義朗編 がん転移 臨床と研究の羅針盤 pp22-26. 学研メディカル秀潤社 東京 2010
- 2、 学会発表
- 1) 尾野雅哉 2DICAL が拓くプロテオームの新世界、日本ヒトプロテオーム機構 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会、モーニングセミナー、2010 年 7 月、東京
- 2) 松原淳一、尾野雅哉、山田哲司、他 新しい血中低分子タンパク分離濃縮技術を用いた血液前処理法による膵がん診断マーカーの開発、日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会、一般演題 口演、2010 年 7 月、東京
- 3) 増田万里、尾野雅哉、山田哲司、他 高密度逆相タンパクアレイを用いた 95 がん細胞株におけるリン酸化タンパク質の網羅的解析、日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会、一般演題 口演、2010 年 7 月、東京
- 4) 小林紀子、尾野雅哉、山田哲司、他 タンデムマス (MSⁿ) を利用したペプチドおよびタンパク質の翻訳後修飾解析、日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会、一般演題 ポスター、2010 年 7 月、東京
- 5) 高倉美智子、尾野雅哉、山田哲司、他 2DICAL と alphaLISA を用いた血漿腫瘍マーカーの探索と検証、日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会、一般演題 ポスター、2010 年 7 月、東京
- 6) 金川章子、尾野雅哉、他 2DICAL を用いた腎癌血漿バイオマーカーの探索、日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会、一般演題 ポスター、2010 年 7 月、東京
- 7) 宮本崇史、尾野雅哉、他 Identification of Mieap-interacting proteins by IP-2DICAL, L 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年会) 第 6 回

- 日本臨床プロテオーム研究会
連合大会、一般演題 ポスター、
2010年7月、東京
- 8) 平直江、尾野雅哉、他 新規 p53
誘導性アポトーシス関連遺伝子
の同定とその機能解析、日本ヒ
トプロテオーム機構第8回大会
(日本プロテオーム学会2010年
会) 第6回日本臨床プロテオ
ーム研究会 連合大会、一般演
題 ポスター、2010年7月、東
京
- 9) 高橋陵宇、尾野雅哉、他
Identification of drug
resistance-associated
proteins in breast cancer
using 2DICAL、日本ヒトプロテ
オーム機構第8回大会(日本プ
ロテオーム学会2010年会) 第
6回日本臨床プロテオーム研究
会 連合大会、一般演題 ポス
ター、2010年7月、東京
- 10) 松原淳一、尾野雅哉、山田哲
司、他 膵癌の診断バイオマー
カーとしての血中 CXCL7 濃度、
第69回日本癌学会学術総会、口
演、2010年9月、大阪
- 11) 高橋陵宇、尾野雅哉、他 薬
剤耐性制御因子を標的とした新
規がん幹細胞治療法の開発、第
69回日本癌学会学術総会、
English Workshop、2010年9月、
大阪
- 12) 増田万里、尾野雅哉、山田哲
司、他 タンパクアレイを用い
た96がん細胞株のリン酸化タン
パクプロファイリング、第69回
日本癌学会学術総会、ポスター、
2010年9月、大阪
- 13) 高倉美智子、尾野雅哉、山田
哲司、他 定量ショットガンプ
ロテオミクスによる腎細胞癌の
血漿バイオマーカー探索、第69
回日本癌学会学術総会、ポスタ
ー、2010年9月、大阪
- 14) 宮本崇史、尾野雅哉、他
IP-2DICALによるMieap結合タン
パク質の同定、第69回日本癌
学会学術総会、ポスター、2010
年9月、大阪
- 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:「タンパク質の同定装置、
同定方法並びに同定プログラム及び
これを記録したコンピュータ読み取
り可能な記録媒体」
発明者:尾野雅哉、他
出願日:2010年4月1日
出願番号:特願2010-084720
出願人:三井情報株式会社
国立がん研究センター

2)

発明の名称：「大腸癌検出用マーカー
およびそれを用いた大腸癌検出方法」

発明者：尾野雅哉、山田哲司、他

出願日：2010年7月12日

出願番号：特願 2010-156611

出願人：東レ株式会社

国立がん研究センター

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

「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」

	氏名	所属	職名
分担研究者	近藤格	国立がん研究センター研究所	分野長

研究要旨

【研究1：大腸癌腫瘍組織に特異的なタンパク質の血清腫瘍マーカーとしての有用性の検討】昨年度までに同定した、大腸癌の腫瘍組織に過剰発現するタンパク質について、培養細胞の培地中での存在を抗体にてスクリーニングした。また、培地中で安定に存在しているタンパク質について臨床検体を用い、悪性腫瘍症例の血液中で非悪性腫瘍症例と比較して高発現しているものを同定した。

【研究2：ペプチドリガンドライブラリーを用いた血清腫瘍マーカー開発の新しい実験方法の開発】血清腫瘍マーカー開発のための新しい実験方法を試みた。血漿サンプルを各種の液体クロマトグラフィーのカラムで分画し、さらにランダムに合成されたペプチドを固相化したビーズを用いて血漿サンプルを分画した。分画したサンプルを蛍光二次元電気泳動法で分離し、分画の効果を調べた。ペプチドリガンドライブラリーによる分画によって濃縮されたタンパク質を質量分析で同定し、疾患バイオマーカーとみなされている微量などが含まれていることを確認した。

研究1：大腸癌腫瘍組織に特異的なタンパク質の血清腫瘍マーカーとしての有用性の検討

A. 研究目的

二次元電気泳動法や質量分析など従来のプロテオーム解析技術を用いて血液を調べると、炎症性疾患でも高値となるようなタンパク質ばかりがバイオマーカー候補として同定される。癌の背景に慢性炎症が存在するため

に避けがたい事態である。一方、そのようなタンパク質は悪性腫瘍症例への特異性が低いことが多い。腫瘍細胞に特徴的に発現するタンパク質あるいは腫瘍細胞が特に高発現するタンパク質が、特異性の点からはバイオマーカー候補としての可能性が高いと考えられる。そのようなタンパク質を同定するために、昨年度までに蛍光二次元電気泳動法やウェスタンブロットティングを用い、大腸癌の腫瘍組織で

高発現するタンパク質を同定した。本年度は、同定したタンパク質の培地中での存在を網羅的に調べ、大腸癌症例の血液サンプルでも高い発現を確認した。

B. 研究方法

蛍光二次元電気泳動法で同定されたタンパク質については、ウェスタンブロット法にて翻訳後修飾を区別しない全タンパク質量として発現差が認められるかどうかを調べた。抗体を網羅的に使用するウェスタンブロット法によって大腸癌腫瘍組織で高発現し、培養上清中でも確認されていたタンパク質について、大腸癌を含むいくつかの悪性腫瘍症例および非悪性腫瘍症例の血漿サンプルにおける発現をELISA法で調べた。

(倫理面への配慮)

手術検体および血液検体などの臨床検体を用いる研究の実施について国立がん研究センターの倫理委員会で承認を得てから実施した。また、診療の過程で得られた残余の臨床検体を医学研究に用いることについて説明を受け同意を証明した症例の検体を使用した。検体は匿名化され個人が特定されることがなく、提供者に不利益がおよばないように配慮した状態で研究は実施された。

C. 研究結果

プロテオーム解析を用いた実験のうち蛍光二次元電気泳動法によって同

定されたタンパク質については、抗体を用いた検証実験で再現されたものが多数あり、ウェスタンブロット法を継続している。ウェスタンブロット法によって同定されたタンパク質については、血漿サンプルにおいて非悪性腫瘍症例に比べて発現が高いタンパク質を同定した。国立がん研究センターに症例について大腸癌の症例数と悪性腫瘍の種類を増やすとともに、多施設の共同研究を行うための倫理委員会の手続きを開始した。

D. 考察

特異性の高いバイオマーカー候補を同定するために、腫瘍組織で高発現するタンパク質に絞ったプロテオーム解析を行っている。従来は細胞内タンパク質だと考えられていたタンパク質であっても、一部のタンパク質は培養細胞の培地中に放出され安定的に存在している、あるタンパク質は血液中でも存在している、といった本研究での知見は血清腫瘍マーカーの開発に一般的に有用であると考えられる。また、このような現象はタンパク質レベルの発現をある程度網羅的に調べて初めてわかることである。

E. 結論

腫瘍組織で高い発現を示すタンパク質をまず同定し、その高発現を特異抗体を用いて血液で調べるというアプローチが有効かどうか、候補タンパク質の検証実験を臨床検体を用いて継続したい。