

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使用する。また、今回の研究で構築できた残余髄液の研究利用についても、平成24年3月に当センター倫理委員会で承認を受けた。

C. 研究結果

(1) 髄液採取体制の整備

担当医が診療上必要な検査として髄液検査を行う場合、主治医の要請に応じ常にコーディネータが髄液検査に立ち会う体制を整備した。コーディネータは研究の説明と同意を得る時点から関与し、採取後はただちに氷冷して臨床検査部へ運搬する。運搬された髄液の一部で細胞数、タンパク量などの一般的な検査を臨床検査部で行い、残りを遠心・分注して、匿名化を行ってのち、TMCバイオリソース管理室の超低温フリーザーに保存する。

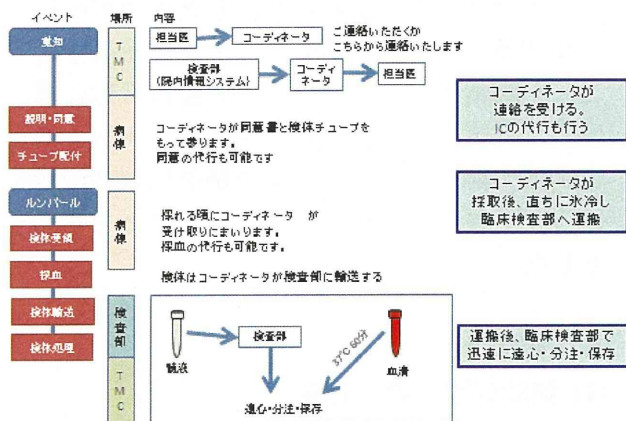


図1. 髄液検体の研究用保存プロトコルと体制確立

表1. 液検体の内訳 (2011年12月末現在)

分類	内訳	検体数	症例数	測定数
精神疾患 (159症例)	統合失調症	88 (37)	63	22
	気分障害	71 (28)	72	17
	健常対照	54 (30)	48	13
	その他	3	3	0
神経内科疾患 (69症例)	パーキンソン病	7	7	5
	脊髄小脳変性症	2	2	2
	正常圧水頭症	31	24	1
	多発性硬化症関連	14	14	0
	その他(認知症等)	22	22	2
小児神経疾患 (20症例)	てんかん	11	11	0
	精神遅滞	5	5	0
	その他	4	4	0
Total		312	275	62

実際の髄液検体の利用に関しては、プロテオーム研究(当研究テーマ)に加えて、神経研究所やそれ以外の研究者へ提供される。2011年12月までの集計では、症例数275例(検体数312例)となっている。

(2) 髄液採取時の食事の影響

同一患者の前日22時以降絶食(朝食抜き、午前10時採取)と昼食後(午後2時採取)の髄液タンパク質を比較したところ、同定できた約550種のタンパク質のうち、2倍以上の変動を示したものは75種(13.6%)で、そのうち64種(変動したタンパク質の85%)が絶食時に低下していた。1.7倍以上の変動にすると142種(25.8%)にもなり、そのうち128種(変動したタンパク質の90%)が低下していた。絶食により全体の25%ものタンパク質が6割以下の量に減少していたことになる。

D. 考察

髄液は中枢神経の様子を鋭敏に反映していると想定され、実際これまでの本研究で脳特異的な数多くのタンパク質が同定されてきている。本研究の目的は血液に比較して少ないタンパク量しかない髄液を対象にするために微量測定系を確立することにあるが、その意味では2mLの髄液からcICAT法で測定する方法論はすでに確立できている。しかしながら、微量であるが故に、その測定結果に影響する種々の要因をしらべ、最適な検体採取条件を決めることは結果の解釈を行う際に重要になる。

その意味で昨年本研究で明らかにした採取後の検体の取扱、とくに氷冷して運搬し、直ちに遠心し細胞成分を除去し、小分けして-80℃に保存することは室温での変化を最小限に防ぐ方法として重要と判断した。そのため、同じ操作で処理する検体を数多く収集するために、国立精神・神経医療研究センターでは病院各診療科、臨床検査部と連携して、その手順を確立した。特に、研究利用に關す

る検体の取扱に関しては、トランスレーショナル・メディカルセンター臨床開発部にバイオリソース管理室を設置し、コーディネータの配置、IC取得、匿名化作業の実施などを一括して行うシステムを構築した。このシステムで採取された研究用髄液はプロテオーム研究ばかりでなく、small RNA解析やメタボローム研究にも十分利用可能であり、その付加価値は高い。

絶食にして髄液を採取して用いている論文を目にしたことから、食事の影響に関して調べてみた。一例の結果であっても、同定できた約550種のタンパク質の約25%が食事で増加する（絶食で低下する）ということを見出した。この事実は、被験者数を増加させて検討を行うことでさらにその意味が確実になるとともに、髄液タンパク質の日内変動を調べる研究へと発展できる可能性がある。具体的に日内変動の研究が可能かどうか検討したい。

しかし、この発見のもっとも重要な点は髄液採取時の記載に食事の時間を入れるべきであるという事である。結果の解釈はこの点を踏まえて行うことが肝要である。

E. 結論

髄液をもちいた微量タンパク質の測定法はほぼ確立した。その上で、検体の採取後の処理法を確定し、ほぼ均一の品質をもつ髄液を研究用に確保するシステムを病院と連携して確立した。また、食事による変動が比較的大きいことを見だし、さらにその点の検討を今後行うこととした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Namba, T., Ming, G.L., Song, H., Waga, C., Enomoto, A., Kaibuchi, K., Kohsaka, S., & Uchino, S. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the

adult hippocampus via /Disrupted-In-Schizophrenia 1/ (DISC1). *J Neurochem* **118**, 34-44 (2011).

2. Waga, C., Okamoto, N., Ondo, Y., Fukumura-Kato, R., Goto, Y., Kohsaka, S., Uchino, S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet* **21**, 208-11 (2011)
3. Kondo, S., Kohsaka, S., Okabe, S. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Mol Brain* **4**, 27 (2011).

G-2. 学会発表

(国際学会)

1. Uchino, S., Waga, C., Asano, H., Kohsaka, S. Kinetic study on DNA methylation of autism susceptibility gene, SHANK3, in the developing brain. The 23rd Biennial Meeting of ISN/ESN Joint Meeting. Athens, Greece, 8.28-9.1, 2011

(国内学会)

1. 大澤圭子、佐柳友規、中村泰子、鈴木恵里、高坂新一：アデノシンシグナルによるミクログリアの突起伸長調節
第34回日本神経科学大会、横浜、9.17, 2011
2. 浅野弘嗣、和賀央子、土屋明子、内野茂夫、高坂新一：発達過程のマウス大脳皮質におけるSHANK3新規バリエーションの遺伝解析
第34回日本神経科学大会、横浜、9.17, 2011
3. 大澤圭子、佐柳友規、中村泰子、鈴木恵里、井上和秀、高坂新一：アデノシン受容体A3を介したミクログリア突起伸長調節
第54回日本神経化学会、金沢、9.27, 2011

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし
H-3. その他
なし

新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来 DNA の研究

研究分担者 加藤菊也 大阪府立成人病センター 研究所長

研究協力者 宮本泰豪 大阪府立成人病センター免疫部門

研究要旨

本研究では、癌の詳細な糖鎖構造解析を行うことで新規の癌特異的糖鎖抗原を発見し、それらの糖鎖腫瘍マーカーとしての臨床応用への可能性を検討することを目的とする。大腸癌および膵臓癌の糖脂質の詳細な構造解析を行うことにより、新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAca2-6(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (α2-6 sialylated Type 1H, ST1H)の存在を見出した。このST1H 抗原はルイス型陰性の大腸癌や膵臓癌にのみ発現が認められ、ルイス型陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。そこで今年度は、ELISA 法などを用いた臨床応用に向けて、ST1H を認識する単クローン抗体を作成し、それらの特異性などを検討した。3000 を超えるクローンをスクリーニングし、ELISA にて ST1H を特異的に認識する 11 種類のクローンを得た。ただし、これらのクローンは癌組織を用いた免疫組織学法では陽性シグナルを得ることができなかった。今後は、これらの抗体の詳しい性状を調べ、血清 ELISA に使用できるか否かを検討するとともに、ST1H を検出する他の方法も検討する必要がある。また、膵臓癌、前立腺癌の糖鎖構造解析において、一部の症例の癌細胞中に、多量の遊離糖鎖が蓄積していることが判明した。詳細な構造を解析した結果、complex-type の N 型遊離糖鎖である NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manα1-4GlcNAc が最も多く存在していた。遊離糖鎖のマーカーとしての意義も検討を要する。

血液中に存在する腫瘍細胞由来遊離 DNA は腫瘍マーカーとして大きな可能性を持っているが、微量であるため検出が難しい。このため現在最も高感度と思われる BEAMing 法を確立し、肺がん由来の EGFR 変異検出を試みた。EGFR-TKI 適用患者を決めるため変異検査は進行肺がんでは必須だが、生検による腫瘍採取は技術的に難しく、血液検査等の非侵襲性検査は臨床上の有用性が極めて高い。原発巣で EGFR 変異を確認した患者 44 症例の血液で検証したところ、活性化変異が 72.7%、耐性変異がおおよそ 87%の患者で検出できた。これはは実用化に向けて有望な結果である。今後検出装置を次世代シーケンサーにかえて検証試験を行う予定にしている。

A. 研究目的

細胞は癌化に伴い細胞表面の糖鎖構造が変化する。変化した糖鎖の一部は、癌で発現するが、正常細胞では発現が認められず、癌特異的糖鎖抗原に分類される。また癌特異的糖鎖抗原には癌の転移や浸潤などに関与するものがあることが判明するとともに、腫瘍マーカーとしても広く用いられている。もっとも有名なものが Sialyl Le^a (CA19-9)である。そのため、新たな癌特異的糖鎖抗原の発見は、癌での糖鎖の役割のより深

い理解と、新規の腫瘍マーカーの開拓が期待される。そこで我々は、糖脂質の構造を高精度、高感度に解析する技術を確立し、癌の詳細な糖鎖構造解析を行うことで、新規の癌特異的糖鎖抗原の発見を目指した。大腸癌 60 症例、膵臓癌 5 症例の糖鎖構造解析が終了している。その結果、2007 年に新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAca2-6(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, (Sialyl Type2H, ST2H)を、2009 年にはさらに ST2H と異性体である新規の癌特異的糖鎖抗

原 NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, (Sialyl Type1H, ST1H)を発見した。ST2Hは約半数の癌に発現を認めたのに対し、ST1Hは、ルイス型の血液型が陰性の患者の癌にのみ発現を認めた。ルイス型は、人口の約10%の人が陰性で、ルイス酵素遺伝子(Le)に変異があり、ルイス型関連糖鎖が合成できない。そのため、ルイス陰性の人には Sialyl Le^a (CA19-9)を合成できないため、血清 CA19-9は0で、マーカーとしての意味を持たない。しかし、Sialyl Le^a (CA19-9)の前駆体である Sialyl Le^x (DU-PAN-2)が、ルイス陰性の人々の CA19-9に代わる腫瘍マーカーとされている。我々が発見した ST1Hは CA19-9とは異なる合成経路で作成され、かつルイス陰性の人々の癌にのみ発現する可能性が極めて高く、DU-PAN-2と相乗的にルイス陰性の人々に対する腫瘍マーカーとなる可能性が大である。そこで、ST1Hの腫瘍マーカーへの臨床応用に向けて、ST1Hを特異的に認識する単クローン抗体を作成し、その抗体の特異性などを調べ、血清 ELISA などへの適応を検討する。また引き続き癌の糖鎖構造解析を実施している中で、一部の膀胱癌細胞に、遊離糖鎖が異常蓄積していることが判明した。その糖鎖の構造解析も実施した。

上記研究と平行してこれまで微量の変異遺伝子を検出する技術の開発を行ってきた。本年度になって血液中に微量存在する腫瘍細胞由来の遊離 DNA の検出に成功した。この技術

(BEAMing)を用いて肺がん患者の血液中の EGFR 変異検出を試みた。イレッサ、タルセバのような EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI)は EGFR 活性化変異のある肺がんにのみ奏功する。従って変異検査は肺がんの抗がん剤治療のため必須であるが、生検による腫瘍組織採取は困難な症例がある。また、EGFR-TKI 治療により必ず耐性が発生するが、その半数は T790M という EGFR 上の耐性変異による。耐性症例の生検は極めて困難で、特に複数回検査は不可能といってもよい。これらの問題を解決するために血液中肺がん由来 DNA からの EGFR 変異検出を試みた。

B. 研究方法

(1) ST1H モノクローナル抗体の作成：

マウスの免疫に用いる糖鎖抗原はリポソーム法を用いて作成した。マウス 1 匹あたり合成した糖脂質 ST1H, 35 μ g を用いた。免疫したマウスの脾細胞と、ミエローマ P3-X63Ag8.653 を、PEG を用いて融合させ、HAT 培地(S-Clone CM-B+HAT)で選択した。

(2) 抗体スクリーニング：

抗体のスクリーニングには ELISA 法を用いた。glycolipid (2 μ g)、egg yolk phosphatidylcholine (20 μ g)-cholesterol (10 μ g) を 2 ml ethanol で溶解し、20 μ l per well ずつ 96 穴の ELISA plate に加え、室温で 2-3 時間放置し、乾燥させて、固相化した。ハイブリドーマの上清を 100 μ l 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス Immunoglobulin (1000 倍希釈)を 50 μ l 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ発色基質キットを用いて発色させた。陽性のクローンは限界希釈法で 2nd スクリーニングを行い、目的の抗体を産生するクローンを得た。免疫組織法は、大腸癌、大腸正常粘膜組織からクリオスタットで 10 μ m の切片を作成し、アセトンあるいは 4%パラフォルムで固定し、ABC 法を用いて発色した。

(3) 糖鎖構造解析：

癌細胞、癌組織から脂質成分をクロロフォルム：メタノール溶液で抽出し、DEAE を用いたイオン交換で、中性脂質と酸性脂質を分離した。糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識し(ピリジルアミノ化、PA 化)、C18 逆相カラム及び Amide 順相カラムの 2 種類の HPLC を用いて糖鎖構造を推定する 2 次元糖鎖マッピング法、質量分析法と酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を同定した。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。酵素消化には、 β 1-4 galactosidase、 α 2-3 sialyase、 β -N-acetyl hexosaminidase、endo- β -galactosidase、 α 1-3/4 fucosidase などを用いた。

(4) 血液中肺がん由来 DNA の EGFR 変異検出
 検出に採用した BEAMing (beads, emulsion, amplification, magnetics)は、エマルジョン PCR を用いて個々のマイクロビーズに一分子由来の PCR 産物を固定、変異部位を蛍光標識後、ビーズをフローサイトメトリーで検出する技術であり、正常分子 1 万個中 1 個の変異分子を検出できる。前年度までの研究により、0.01%から 10%までの定量性を確認している。また、0.01%までの変異アレルを検出できることを確認している。

(倫理面への配慮)

上記研究はすべて、大阪府立成人病センターに設けられた倫理審査委員会において既に承認されている。

C. 研究結果

3000 以上のクローンを ELISA にてスクリーニングし、11 種類の陽性クローンが得られた。2 種類が IgM で 9 種類が IgG であった。これらのクローンは、ST1H の異性体である ST2H、SLe^x、SLe^a は認識しなかった(図 1)。

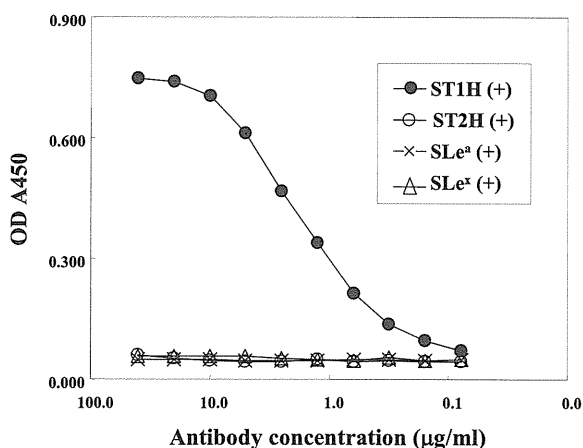


図 1. ELISA を用いた ST1H 抗体の特異性の検討

ELISA のほかに免疫組織化学を用いて、これらのクローンをさらに検討した。サンプルには、ST1H の発現が確認されているルイス型陰性の大腸癌組織、正常大腸組織を用いた。これらの凍結切片を作成し、11 種類のハイブリドーマの

上清と反応させ、通常の ABC 法にて発色させた。その結果、どのクローンからも陽性シグナルを得ることができなかった。

大腸癌、膵臓癌、前立腺癌の糖脂質の構造解析を実施している際に、N型糖鎖のシアル酸 (Neu5Ac)付加遊離糖鎖が正常細胞にはほとんど認めないが、癌細胞には蓄積されていることを見出した。5 種類の糖鎖を検出、構造決定した。その結果すべて complex-type の N 型の遊離糖鎖であり、NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1 が最も多く、ついで NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6Manβ1-4GlcNAcβ1 が多かった。遊離糖鎖の量を、糖脂質糖鎖と比較すると、大腸癌細胞の遊離糖鎖は、糖脂質と比較するとその量は極めて少ない。一方、膵臓癌や前立腺癌では約半数の症例では、糖脂質よりも桁違いに多くの遊離糖鎖が蓄積していた。

(1) 血液中肺がん由来 DNA の EGFR 変異検出
 肺癌患者の血漿 DNA から癌由来 EGFR 変異を BEAMing で検出可能かどうか調べるために次の 2 群の進行肺癌 (III 及び IV) 症例を検討した。なお、すべての症例は生検で EGFR 活性化変異があることを確認している。

1) EGFR-TKI 治療後増悪症例 (progressive disease, PD) 2 3 例。EGFR-TKI への耐性を獲得した、と考えられる。約半数に T790M 変異がある、と予想される。

2) EGFR-TKI 治療前症例 2 1 例。

これらの症例の解析結果から活性化変異は全 4 4 症例中 3 2 例 (72.7%, 95%CI 58.0-83.6%)、耐性変異は治療後増悪症例 2 3 例中 1 0 例

(43.5%, 96% CI 2.5.6-53.4%) 検出できた。耐性患者の約半数でこの変異が検出されるため、成功率は 90%近いといえる。また、活性化アレルの中で耐性変異を持つものの割合は 13.3% から 94%であった。これらは実用化に向けて有望な結果である

D. 考察

ST1H は、DU-PAN-2 と同様に、Lewis 陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。さ

らに、ST1HはDU-PAN-2とは異なる経路で合成されると考えられたため、DU-PAN-2との相乗効果が期待できる。そこでST1Hの腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性を検討するために、ST1Hを認識する単クローン抗体の作成し、その特異性などを検討した。得られた11種類のクローンをELISAで検した結果、他の異性を全く認識しなかったため、きわめてST1Hに対して特異性が高いと思われる。しかし、免疫組織学法では、ST1Hを発現している癌組織で陽性シグナルが得られなかったことから、実用性に疑問が残り、更なる検討を要する。また、抗体以外の検出方法も検討する必要がある。膵臓癌、前立腺癌で、多量のcomplex-typeのN型の遊離糖鎖が蓄積されていることが明らかとなった。構造も明らかとなったため、マーカーとしての有効性を検討する必要がある。

BEAMingによる血中肺癌由来DNAの解析により、活性化変異は7割以上の進行癌症例で、耐性変異はEGFR-TKI治療後耐性症例の9割近くで検出できた。実用化に向けて有望な結果であり、前向き試験で検証を行うことになっている。この前向き試験では検出にはフローサイトメトリーは用いず次世代シーケンサーPGMを用いる予定である。特に現在この研究分野で重要な問題になってきているのは、T790Mに対するEGFR-TKIである。これらの薬剤の臨床試験のためにはT790Mのアッセイが必須だが、生検では殆ど不可能に近い。上記の方法のみが問題解決に役立つと考えられる。

E. 結論

Lewis陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性があるST1Hを認識する単クローン抗体が得られたが、さらなる検討が必要である。癌に蓄積する遊離糖鎖の検出方法を確立し、マーカーとしての有用性の検討が必要である。

血液検体からのEGFR変異検出については実用化に十分期待が持てる結果が得られた。とくに、T790M変異に対する新しいEGFR-TKIが研究開発の焦点になっており、その為の患者選択に必須の診断法になる、と期待できる。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
論文発表

1. Hatano, K., Miyamoto, Y., Mori, M., Nimura, K., Nakai, Y., Nonomura, N. and Kaneda, Y. Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. *PLoS One* 7, (2), e31234 (2012).
2. Taniguchi, K., Uchida, J., Nishino, K., Kumagai, T., Okuyama, T., Okami, J., Higashiyama, M., Kodama, K., Imamura, F. & Kato K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 17, 7808-15, (2011).
3. Goranova, T.E., Ohue, M., Shimoharu, Y. & Kato K. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin. Exp. Metastasis* 28, 427-35 (2011).
4. Korekane, H., Korekane, A., Yamaguchi, Y., Kato, M., Miyamoto, Y., Matsumoto, A., Hasegawa, T., Suzuki, K., Taniguchi, N. & Ookawara, T. N-Glycosylation profiling of recombinant mouse extracellular superoxide dismutase produced in Chinese hamster ovary cells. *Glycoconj J* 28, 183-96 (2011).
5. Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N. & Kaneda, Y. Expression of gangliosides, GD1a and sialyl paragalboside, is regulated by NF-kappaB-dependent transcriptional control of alpha2,3-sialyltransferase I, II and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. *Int J Cancer* 129, 1838-47 (2011).

学会発表

1. Junji Uchida, Kazuya Taniguchi, Fumio Imamura, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Kikuya Kato. Quantitative detection of the T790M EGFR

- mutation in circulating tumor DNA of lung cancer patients subjected to EGFR-TKI treatment. 2011 ASCO Annual Meeting (Chicago, UAS, June, 2011)
2. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Kimi Honma, Keita Uchino, Makiko Ono, Masaya Ono, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya. Ribophorin2 stabilizes mutant p53 by suppressing Glycogen Synthase Kinase 3b in breast cancer onset and metastasis. 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月, 名古屋)
 3. Yasuhiro Hara, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Takeshi Tomonaga. Proteomic analysis of Bronchioloalveolar carcinoma for discovery of novel biomarkers. 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月, 名古屋)
 4. Satoshi Muraoka, Hideki Kume, Jun Adachi, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga. A strategy for Shotgun Proteomics and SRM-based systematic validation of membrane proteins in breast cancer tissues. 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月, 名古屋)
 5. Yoji Kukita, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Ryo Matoba, Jun-Ya Kato, Noriko Kato, Ikuko Nakamae, Takeshi Kawabata, Ken Kodama, Kikuya Kato. Genomic characterization of familial lung cancer patients using whole exome-sequencing. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10月, 2011.
 6. Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Yoji Kukita, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Fumio Imamura and Kikuya Kato. Quantitative detection of the T790M EGFR mutation in circulating tumor DNA of lung cancer patients subjected to EGFR-TKI treatment. 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月, 名古屋)
 7. Manabu Kanemoto, Mitsuaki Shirahata, Kazuya Taniguchi, Yoji Kukita, Yoshiki Arakawa, Susumu Miyamoto, Kikuya Kato. The diagnosis for glioma by IDH1/2 mutation and the correlation with other genetic and epigenetic alteration. 第70回日本癌学会学術総会 (2011年10月, 名古屋)
 8. Yoji Kukita, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Ryo Matoba, Jun-Ya Kato, Noriko Kato, Ikuko Nakamae, Takeshi Kawabata, Ken Kodama, Kikuya Kato. Genomic characterization of familial lung cancer patients. 12th International Congress of Human Genetics/61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Montreal, Canada, October, 2011)
 9. Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Yoji Kukita, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Fumio Imamura and Kikuya Kato. Quantitative detection of the EGFR activating and resistance mutations in plasma DNA of Lung cancer patients. Molecular Targets and Cancer Therapeutics 2011 (San Francisco, USA, November, 2011)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 発明の名称: 血中DNAの定量的検出による悪性新生物の病勢の進行を評価する方法
 出願番号: 特願 2011-109498
 出願日: 2011年5月16日
 出願人: 地方独立行政法人大阪府立病院機構
 発明者: 加藤菊也、今村文生、谷口一也、熊谷融、内田純二、西野和美

血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究
血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用

研究分担者 野村文夫 千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学 教授
千葉大学医学部附属病院 検査部長・遺伝子診療部長

1. MALDI-TOF MS による慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者血清のプロテオーム・ペプチド解析

研究要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（以下 CTEPH）は、肺動脈内が器質化した血栓により閉塞し肺高血圧症を呈する疾患である。現行の診断方法には高コスト、侵襲性の高さなど問題があり、簡便な血清マーカーの開発が望まれている。そこで血清ペプチドの網羅的解析を行い、CTEPH 診断のための新規血清マーカー探索を行った。千葉大学医学部附属病院呼吸器内科を受診した 34 人の CTEPH 患者を対象に、Burkar Daltonics 社の ClinProt™ システムを用いて、MALDI-TOF MS による血清プロテオーム・ペプチド解析を行った結果、2989Da のフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドが CTEPH の血清マーカーとなる可能性が示された。

A. 研究の背景と目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（以下 CTEPH）は、肺動脈内が器質化した血栓により閉塞し肺高血圧症を呈する疾患である。平成 18 年度の日本の治療給付対象者はおよそ 800 人と比較的可成りまれな疾患であり、女性に多いとされる。CTEPH の初発症状は労作時の息切れや動悸、胸痛など非特異的なものであり、診断に至るためにはまずこの疾患を疑うことが必要である。CTEPH を疑った場合には、まず肺血流シンチグラフィを施行し、血流欠損を認める場合には、更に CT や MR angiography および肺血管造影検査、右心カテーテル検査を行い、診断に至る。しかしこれら各種検査の特殊性、高コスト、侵襲の高さなどから、簡便な血清マーカーの開発が望まれている。そこで、MALDI-TOF MS による血清ペプチドの網羅的解析を行い、CTEPH 診断のための新規血清マーカー探索を行った。

B. 研究方法

（対象）2005 年 10 月から 2010 年 2 月までに、千葉大学医学部附属病院呼吸器内科を受診し

た 34 人の CTEPH 患者を対象とした。全例で肺換気血流シンチグラフィ、右心カテーテル検査および肺動脈造影検査を行い、確定診断を得た。CTEPH 患者の定義は、平均肺動脈圧が 25mmHg 以上、肺動脈楔入圧が正常(12mmHg 以下)であり、有効な抗凝固療法を行っているにもかかわらず 6 ヶ月以上の労作時息切れが続いているものとした。34 人の患者を、探索群 9 人と検証群 25 人に無作為に割り付けた。また各々の群に対し年齢・性別を一致させた健常対照者 34 人(探索群 9 人、検証群 25 人)の血清を用意した(表 1)。また、検証群では、他疾患を有する患者血清 20 例(肺癌患者 8 例、深部静脈血栓症患者 3 例、急性肺動脈血栓塞栓患者 3 例、慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症にて外科的治療を受け肺動脈圧の正常化した患者 6 例)との比較も行った(表 1)。34 人の CTEPH 患者(男性 12 人、女性 22 人)の血清が解析された(表 1)。CTEPH 患者の中で、4 人が悪性疾患、8 人が抗リン脂質抗体症候群、13 人が深部静脈血栓症を有していた。すべての CTEPH 患者と他疾患を有する患者のうち肺癌を除く患者は、ワルフ

表1. 本研究への参加者の詳細

探索群	人数	年齢 (平均 ± SD)	性別 (男性:女性)	平均肺動脈圧 (mmHg) (中央値(範囲))	肺血管抵抗 (dyne·sec·cm ⁻⁵) (中央値(範囲))
健常対象者	9	56.9 ± 9.7	2:7	—	—
CTEPH患者	9	56.9 ± 14.8	2:7	48 (37-55)	888.5 (439.0-1558.7)
検証群	人数	年齢 (平均 ± SD)	性別 (男性:女性)	平均肺動脈圧 (mmHg) (中央値(範囲))	肺血管抵抗 (dyne·sec·cm ⁻⁵) (中央値(範囲))
健常対象者	25	58.6 ± 12.2	10:15	—	—
CTEPH患者	25	58.5 ± 10.7	10:15	47 (26-65)	853.24 (322.8-1607.7)
他疾患患者	20	65 (36-80)	9:11	—	—

ァリンによる抗凝固療法を受けていた。

今回の解析に参加したすべての患者、健常者において、書面による説明と同意を得た。

(解析手法) Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (以下 MALDI-TOF/TOF MS) の原理を用いた、Bruker Daltonics 社の ClinProt™ システムを用いた。ペプチドの同定には AutoFlex® II 質量分析計のリフレクトロンモードを用いて行った。はじめに探索群において、2 群間で相違のあるペプチドを選定し、検証群においてそれらの結果の検証を行った。検証群で確認された複数のペプチドのうち、最も効率よく CTEPH 患者を鑑別できるペプチドを選定し、リフレクトロンモードを用いて同定した。

(絶対定量)

同定されたペプチドに対し、安定同位体を用いた数 Da(ダルトン)だけ質量の大きいペプチドを人工的に作成し、患者血清に 50fmol/μL 相当を添加する。その後、先ほどと同様に弱イオン交換磁気ビーズ処理を行った後、AutoFlex® II 質量分析計で測定を行う。目的のペプチドのピークと安定同位体標識ペプチドのピークとの比から、血中濃度を求めた。

(臨床データとの比較)

測定された CTEPH 患者の血清中のペプチド濃度と各種臨床パラメーターとの比較を行った。用いられた臨床パラメーターは、年齢、性別、肺血管抵抗(PVR)、平均肺動脈圧、心係数(CI)、動脈血酸素分圧(mPpa)、6 分間歩行距離(6MWT)、慢性心不全の NYHA 分類(NYHA)、白血球数、免疫グロブリン G(Ig-G)、D-ダイマ

ー(DD)、第 8 凝固因子(F8)、フィブリノゲン、プラスミノゲン、α-2-プラスミノゲンインヒビター、トロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)、プラスミン-α2 プラスミノゲン複合体(PIC)、CRP、BNP を選

択した。

(統計処理)

個々のピークの単変量解析には Mann-Whitney U test を用いて、 $p < 0.05$ を有意とした。各種ピークのマーカーとしての有効性の評価には ROC 解析を用いた。臨床パラメーターとのペプチドとの関連の評価には、パラメトリックデータには Pearson の相関検定を、ノンパラメトリックデータには Spearman の相関検定を行った。すべての解析には JMP® 7.0.2 (SAS Institute Inc., US)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は千葉大学医学研究院の倫理委員会の承認を得て実施し、被験者より同意が得られ

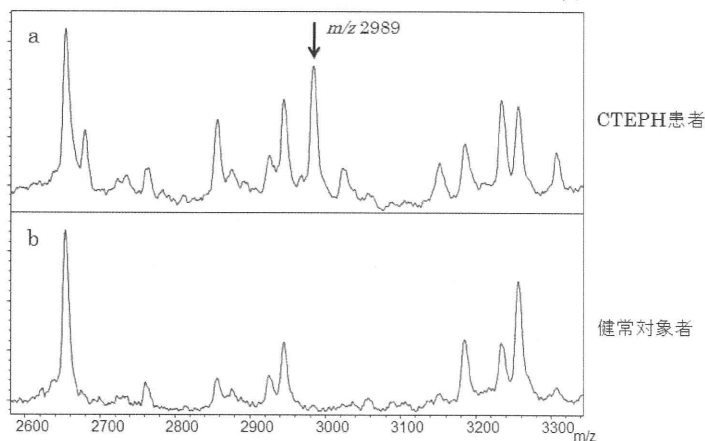


図1 CTEPH と対照群におけるMSスペクトラムの比較

た検体を用いた。

C, D, E. 研究結果, 考察および結論

(CTEPH 患者血清における MALDI-TOF MS 解析)

MALDI-TOF MS を用いて作成された、探索群のCTEPH患者と健常対照者血性のペプチドプロファイルの比較において、14ペプチドのピーク強度で有意差を認めた。CTEPH患者血清で、6つのピーク強度が増強、8つのピーク強度が減弱を示した。図1は、2群のペプチドプロファイルを比較した1例である。この図では健常対象者血性と比較しCTEPH患者血清で $m/z2989$ のピークが増強している。

次に、探索群で差を認めた14ペプチドのピークについて、検証群でも有意差の再現性が確認できたのは4ペプチドであった($m/z2970$,

No.	CTEPH患者で 上昇(↑) 又は減少(↓)	m/z	P	検証群で有意差を 確認されたピーク(○)
1	↓	2081	<0.05	
2	↓	2104	<0.01	
3	↑	2209	<0.05	
4	↓	2659	<0.01	
5	↑	2861	<0.01	
6	↑	2951	<0.01	
7	↑	2970	<0.01	○
8	↑	2989	<0.01	○
9	↓	2048	<0.01	
10	↓	4085	<0.01	
11	↓	4203	<0.01	
12	↓	4243	<0.01	
13	↓	7760	<0.01	○
14	↓	9282	<0.01	○

$m/z2989$, $m/z7760$, $m/z9262$)(表2)。うち、2つのピーク($m/z2970$, $m/z2989$)はCTEPH患者血清で増強を認め、残りの2つ($m/z7760$, $m/z9262$)は減少した。

(ペプチドの同定)

検証群で確認された2群間で有意差を認める4つのペプチドのピーク強度について、CTEPH患者を健常対象者から鑑別する有効性の評価のためにROC解析を行った。その結果 $m/z2989$ のペプチドが最も高いAUCを示した(図2、表3)。カットオフ値 $61.0 \mu\text{mol/L}$ とすると感度0.51、特異度0.82であった。そこでAutoFlex® II質量分析計のリフレクトロンモードを用いて $m/z2989$ のペプチドの同定を行ったところ、フィブリノゲンA α 鎖の断片であることが判明した。アミノ酸配列は

KMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPVであった(図3)。

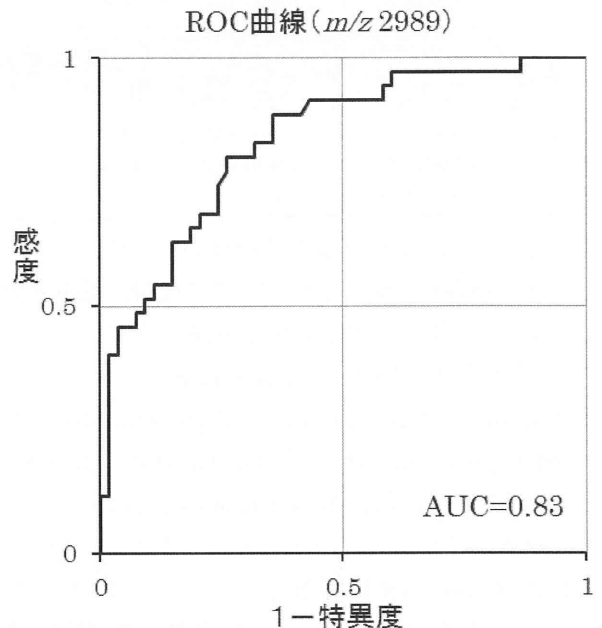


図2. CTEPH診断における $m/z2989$ ペプチド値のROC解析

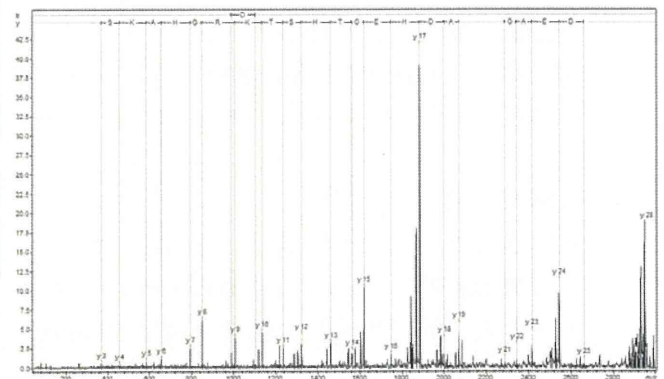


図3. $m/z2989$ のペプチドのアミノ酸配列

(安定同位体標識ペプチドを用いた絶対定量)
 $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ を用いて10Da重くしたアルギニンおよび $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ を用いて8Da重くしたリシンを用いて18Daだけ重いフィブリノゲンA α 鎖の安定同位体標識ペプチドを合成した。合成ペプチド50fmol/ μL 相当を血清に添加し、弱イオン交換磁気ビーズ処理を行った後、AutoFlex® II質量分析計で測定を行った。血性由来のフィブリノゲンA α 鎖および安定同位体標識された合成フィブリノゲンA α 鎖のピーク強度の比から、血清フィブリノゲンA α 鎖濃度を求めた(図4)。血清中フィブリノゲンA α 鎖濃度の中央値および四分位範囲(fmol/ μL)は健常対照

者血清、他疾患を有する患者血清、CTEPH 患者血清で、それぞれ 37.1(30.9-52.9)、38.5(26.4-57.9)、63.9(37.35-96.9)であった。CTEPH 患者血清ではほか 2 群と比較して有意に高値を示した($p < 0.01$)。

(CTEPH 患者の各種臨床パラメーターとの比較)

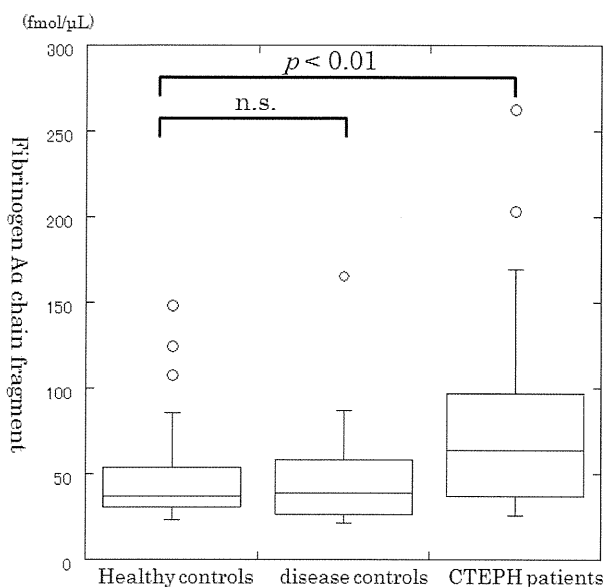


図 4. 各群における血清フィブリノゲン A α 鎖断片ペプチド (m/z2989) レベル

CTEPH 患者の各種臨床パラメーターとフィブリノゲン A α 鎖断片濃度との比較において、有意な相関を示したのは TAT($p = 0.031$ 、正の相関)のみであった。また PIC が負の相関の傾向を示した($p = 0.073$)。そのほかのパラメーターは相関を示さなかった(図 5)。

(考察) heart-type の脂肪酸結合タンパク CTEPH のバイオマーカーとして、DD、BNP、CRP、heart-type の脂肪酸結合タンパクなどが報告されている。しかし、これまでの報告されたバイオマーカーは多くの他疾患でも陽性を示すため特異度が低く、バイオマーカーとしての信頼度は決して高くはない。さらに、これまでプロテオミクス手法を用いた CTEPH のバイオマーカー検索の報告はない。そこで我々は ClinProt™ システムによる CTEPH のバイオマーカーの検索を行った。今回解析は限られた疾患群ではあったが、

CTEPH の診断においてフィブリノゲン A α 鎖断片は優れた特異度を示した(カットオフ値 61.0 $\mu\text{mol/L}$ で感度 0.51、特異度 0.82)。

質量分析計による血性や血漿の解析において、異なる部位や長さのフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドの報告がなされている。例として乳癌のマーカー候補としての 4.2kDa と 5.35Da のフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチド、乳癌の病期マーカーとしての 2.35kDa と 2.66kDa のフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドなどがあげられる。

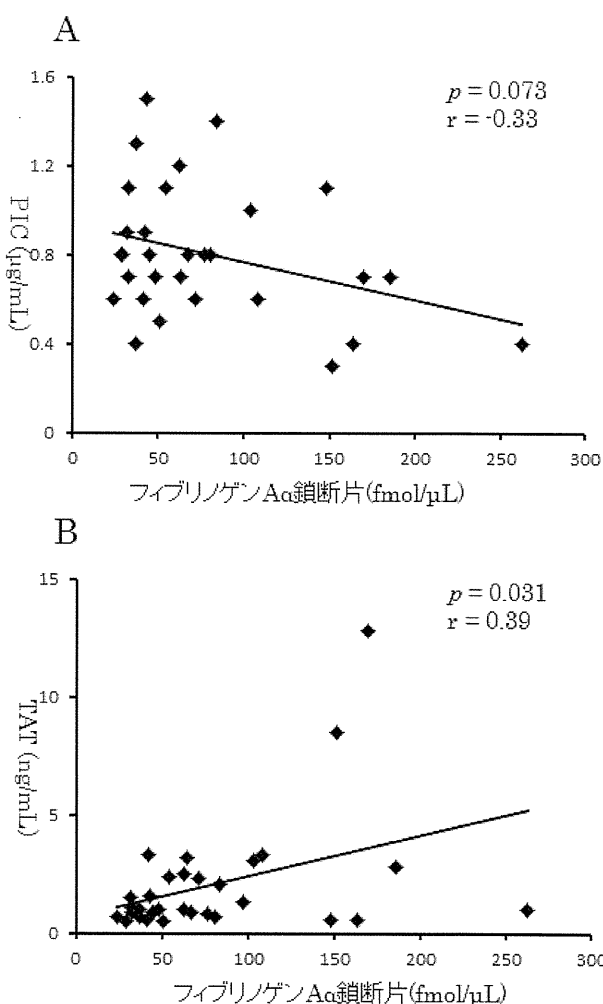


図 5. CTEPH 患者における血清フィブリノゲン A α 鎖断片ペプチド (m/z2989) レベルと各種臨床パラメーターとの比較

我々の研究室でも、アルコール多飲者のマーカーとして 5.9kDa のフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドの報告を行っているが、今回我々が報告した 2989Da のフィブリノゲン A α 鎖断片ペ

プチドは、血清マーカーとしての報告は初めてである。

次のステップとしてフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドの濃度測定のため、安定同位体標識ペプチドを用いた絶対定量を行った。我々の、予備実験では安定同位体標識ペプチドを用いた絶対定量の日差変動係数と日内変動係数が各々4.05%、10.4%であるのに対し、ピーク強度のみによる日差変動係数と日内変動係数は各々6.7%、16.3%であった。安定同位体標識ペプチドを用いる方法は絶対定量ができるのみでなく、測定誤差の減少にも有効であった。我々は、さらに患者血清中のフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチド濃度と各種臨床パラメーターとの比較を行った。フィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドは肺高血圧の重症度の指標となる項目(PVR, mPpa, NYHA, 6MWT)や炎症(WBC, CRP, Ig-G)との相関を示さなかったが、PIC と

負の相関の傾向($p=0.073$)、および TAT と正の相関($p=0.031$)を示した。血中 PIC 濃度は採血時の線溶活性化の程度を示し、血中 TAT 濃度は採血時の凝固活性化の程度を示している。本研究において測定されたフィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドの血中濃度の高い患者では線溶活性が低下し、また凝固活性が高診している可能性が示唆され、フィブリノゲン A α 鎖断片ペプチドが血性形成と何らかの関連性を持っていることが予想された。

研究協力者

千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学
矢野利章、坂尾誠一郎、笠原靖紀、田邊信宏、
瀧口裕一、巽浩一郎
北里大学理学部物理学科生体分子動力学講座
小寺義男

2. Three-Step プロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証

研究要旨

習慣飲酒量を反映するいわゆる飲酒マーカーとして血清 γ -GTP、糖鎖欠損トランスフェリンなどがよく知られているが、感度・特異度において十分とは言えない。そこで血清の abundant proteins の除去後に HPLC による分画を行い、各フラクションの SDS-PAGE を行う Three-Step プロテオーム解析により新たな飲酒マーカーの探索を試みた結果、Pigment epithelial-derived factor(PEDF)が新たな飲酒マーカーとなる可能性が示された。

A. 研究の背景と目的

これまでに我々は ProteinChip® system を用い、アルコール依存症 (DSM IV) 患者血清検体で新たな飲酒マーカーの探索を行った結果、3つのピーク (5.9kDa, 7.8kDa, 28kDa) で変化が見られ、それぞれ fibrinogen α C chain の分解産物、Apo A II の分解産物、Apo A I と同定したことを報告した。これらのうち特に 5.9kDa の fibrinogen α C chain の分解産物が健診受診者において、 γ -GTP のノンリスポンダーの検出に有効なことを示した。さらに ProteinChip® system では検出しにくい 3.0kDa 以下のペプチドに着目して、磁気ビーズと MALDI-TOF/TOF

MS を組合わせた ClinProt™ System を用い新たな飲酒マーカーの探索を行った結果、4つのピーク (1.4kDa, 1.5kDa, 1.6kDa, 2.6kDa) で変化が見られることを報告した。今回、我々は ProteinChip® system、ClinProt™ System など質量分析計ベースの方法では検出しにくい 10kDa 以上のタンパク質に注目し、Three-Step プロテオーム解析法を用いて新たな飲酒マーカーの探索を行った。

B. 研究方法

新規飲酒マーカーの探索として、独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターに治療目的で入院したアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体

表4 蛋白質同定結果

Spot No.	ID	M.W.	pI	Score	sequence Coverage
1	Alpha2-HS glycoprotein	35641	5.20	112	8%
2	Apolipoprotein A I	28061	5.27	1409	70%
3	Apolipoprotein CIII	8759	4.72	118	24%
4	Glutathione peroxidase 3	25489	8.20	82	6%
5	Heparin cofactor II	57034	6.41	161	5%
6	Pigment epithelial-differentiating factor	46300	5.84	491	22%

を用いた。入院までの飲酒量はすべての症例でエタノール換算 100g/日以上であった。

新規飲酒マーカーの健診レベルの飲酒量評価として、財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニックの人間ドック受診者男性 18 名の血清検体を用いた。飲酒量は、エタノール換算 0 g/日が 6 名、20–50 g/日が 6 名、60 g/日以上が 6 名であった。すべての患者から同意を得た上で行った。

手順は、患者血清から Multi Affinity Removal Column (Agilent Technologies, CA, USA) を用い主要 6 タンパク質 (albumin, IgG, anti-trypsin, IgA, transferrin, haptoglobin) を除去した後、脱塩・濃縮後、HPLC により分画した 40 フラクシオンを SDS-PAGE (DRC Co, Tokyo, Japan) を行い、銀染色 (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japan) した。タンパク質発現の違いを Total Lab TL120 software (Shimadzu Co, Kyoto, Japan) で数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。

SDS-PAGE により有意差が認められたバンドは二次元電気泳動を行いスポット化した。一次元目は、従来からよく用いられる固定化 pH 勾配 (IPG) ゲルに比べて多量のタンパク質を添加でき、IPG ゲルでは分離できない高分子量タンパク質の検出に適しているアガロースゲルを用いた¹⁰⁾。二次元目は SDS-PAGE を行い、CBB 染色をした。有意に発現量の異なるスポットを切り出し、トリプシン (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) によるインゲル消化後、Q-star pulsar i (Applied Biosystems, CA, USA) により MS/MS 測定した。

測定データは Mascot search (Matrix Science, London, UK) を用いタンパク質を同定した。

タンパク質発現量の変化がみられた Pigment epithelial-derived factor (PEDF) をウエスタンブロット法で検証した。主要 6 タンパク質を除去した血清 2μl 相当を SDS-PAGE、PVDF 膜に転写後、ブロッキングをした。一次抗体に Anti-human pigment epithelial-derived factor monoclonal antibody (TransGenic Inc, Hyogo, Japan)、二次抗体に Anti-mouse IgG HRP (MP Biomedicals Cappel, OH, USA) を用い、検出は ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, Tokyo, Japan) を用いた。Total Lab TL120 software により発現量を解析し、有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。

C, D, E. 研究結果, 考察及び結論

アルコール性肝硬変患者 8 名 (入院時・入院後 8 週間・計 16 サンプル) から Multi Affinity Removal Column を用い主要 6 タンパク質を除去した後、HPLC により分画した 40 フラクシオンを SDS-PAGE を行い、銀染色した。タンパク質発現の違いは Total Lab TL120 software で数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。その結果、 $p < 0.05$ と有意な違いを 27 バンドでみられた。24 バンドが入院時検体において入院 8 週後検体に比して増加していたのに対し、3 バンドでは入院時に比し、入院 8 週後に増加した。代表例 (fraction14) を図 6 に示した。

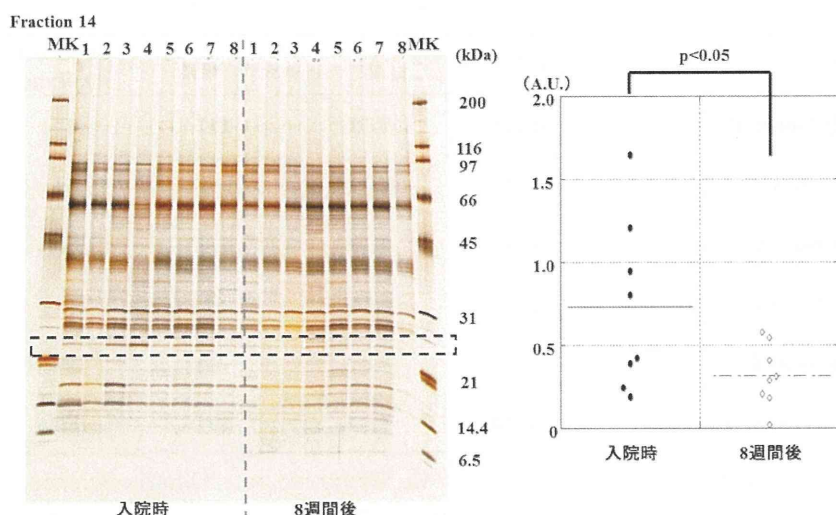


図 6. Three-Step プロテオーム解析法を用いた解析例

Mann-Whitney test により $p < 0.01$ と有意に発現量の違いが見られた 6 バンドを同定した結果、入院時に増加していたバンドは、Alpha2-HS glycoprotein (M.W. 35641, pI 5.20, Mascot Score 112, Sequence coverage 8%)、Apolipoprotein A- I (M.W. 28061, pI 5.27, Mascot Score 1049, Sequence coverage 70%)、Glutathione peroxidase 3 (M.W. 25489, pI 8.20, Mascot Score 82, Sequence coverage 6%)、Heparin cofactor II (M.W. 57034, pI 6.41, Mascot Score 161, Sequence coverage 5%)、Pigment epithelial-derived factor (M.W. 46300, pI 5.84, Mascot Score 491, Sequence coverage 22%) であり、入院後 8 週間に増加したバンドは、Apolipoprotein C-III (M.W. 8759, pI 4.72, Mascot Score 118, Sequence coverage 24%) であった (表 4)。それらのタンパク質濃度は ng/ml ~ mg/ml である。

Apolipoprotein A- I、Alpha2-HS glycoprotein、Apolipoprotein C-III、Glutathione peroxidase 3、Heparin cofactor II は既に習慣飲酒との関連が報告されている。Apolipoprotein A- I はアルコール関連マーカーとして知られており、大規模な研究でもアルコール摂取量と正の相関を示すことが示され、Alpha2-HS glycoprotein は、アルコール性肝硬変患者において、飲酒後約 40% の増加 ($p < 0.05$) を報告し、Apolipoprotein

C- III はアルコール依存症においては減少することが報告されており、ともに我々の結果と矛盾は無かった。

Glutathione peroxidase 3 は、健常者に比べてアルコール依存症患者で、Glutathione peroxidase 3 活性が 37% の低下がみられたと報告されており、Heparin cofactor II はアルコール性肝硬変患者で、アルコール性脂肪性肝炎患者、非アルコール性脂肪性肝

炎患者、非アルコール性慢性肝障害患者に比べて、Heparin cofactor II 活性が約 50% の低下がみられたと報告されている。Pigment epithelial-derived factor (PEDF) のタンパク質発現量変化とアルコール性肝障害との関連性は報告されていない。

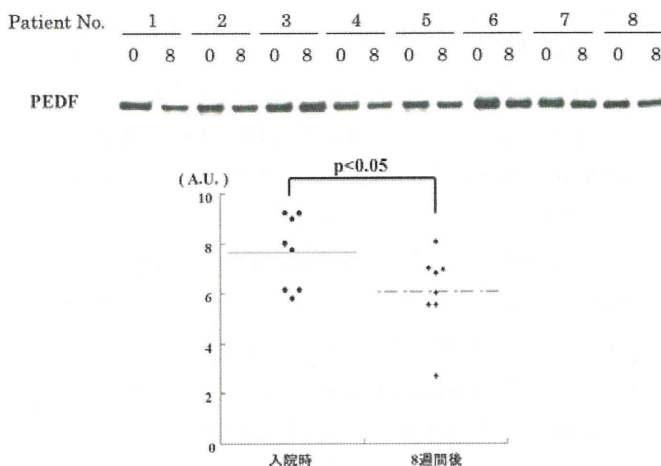


図 7 アルコール性肝硬変患者における入院時、断酒後 8 週間の Pigment epithelial-derived factor 蛋白質発現量変化をウエスタンブロット法で検証。(Total Lab TL120 software で数値化した後、Mann-Whitney test により検定) (0:入院時, 8:断酒後 8 週間)

飲酒マーカー探索に用いたアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用い、PEDF の蛋白発現量変化をウエスタンブロット法で検証した。入院時と断酒 8 週間後では、 7.68 ± 0.15 vs 6.08 ± 0.16 ($p < 0.05$)

と有意な違いが認められた (図 7)。入院時の γ -GTP は 2 症例で正常域にとどまり、いわゆる non-responder と考えられたが、これら 2 症例においても変化が認められた。

さらに PEDF が飲酒量を反映するか評価することを目的に、人間ドック受診者男性 18 名 (エタノール換算 0 g/day : 6 名、20-50 g/day : 6 名、60 g/day 以上 : 6 名) の血清検体から Multi Affinity Removal Column を用い主要 6 タンパク質を除去した後、血清 2 μ l 相当をウエスタンブロット法で行った。0 g/day 群、20-50 g/day 群、60 g/day 以上群では、 3.77 ± 2.23 vs 4.87 ± 1.70 vs 9.00 ± 2.46 であった。0 g/day 群と 20-50 g/day 群の間では $p=0.48$ と有意な違いが認められなかったが、20-50 g/day 群と 60 g/day 以上群の間で $p<0.01$ と有意な違いが認められた (図 8)。

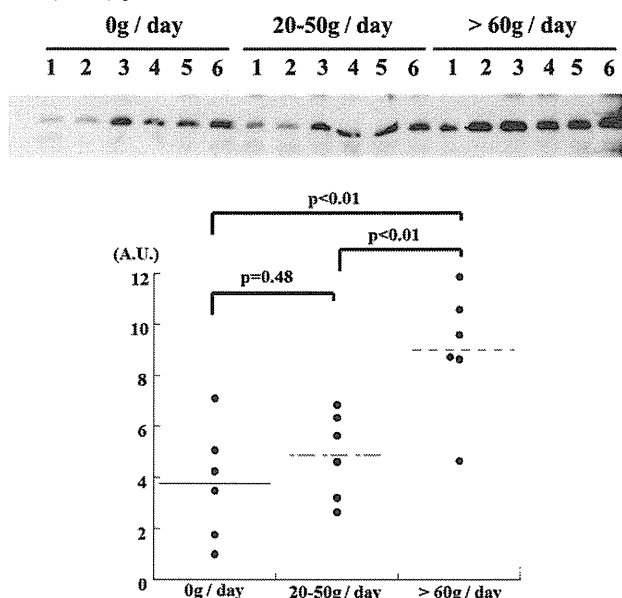


図 8. Pigment epithelial-derived factor の飲酒量の影響をウエスタンブロット法で評価 (Total Lab TL120 software で数値化した後、Mann-Whitney test により検定)

PEDF はセリンプロテアーゼインヒビターのスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、ヒト網膜芽細胞腫細胞において強力な神経分泌活性を有する因子として網膜色素上皮細胞の培養上清から精製され、血管新生抑制作

用を有することが報告されている。

Matsumoto らは健常者、慢性肝炎患者、肝硬変患者、肝硬変を伴う原発性肝細胞癌患者、各 8 名の血清中 PEDF 濃度を ELISA で測定した。健常者、慢性肝炎と比較し、肝硬変患者、肝硬変を伴う原発性肝細胞癌患者で $p<0.01$ と有意に PEDF 濃度の低下がみられたと報告している。アルコール性肝硬変患者において、PEDF が入院時に高く、断酒 8 週間後で低下が見られたこと、そして低下後の血中レベルは健常人とほぼ同様であったこと (テータ示さず) からアルコール性肝硬変患者の入院時の PEDF の上昇は、肝障害の影響ではなく、飲酒の影響であると考えられる。

PEDF が活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) 生成を抑制することは報告されている。アルコールが代謝される過程で ROS が産生される。本研究で見られたアルコール性肝硬変患者の PEDF レベルの上昇は抗酸化能を補うための変化であるかもしれない。

わが国で最も広く利用されている γ -GTP、近年欧米で多用されている糖鎖欠損トランスフェリン (CDT) のいずれも、いわゆるノンリスポンダーが存在することに加え、非アルコール性疾患でも異常値を示す場合がある。すなわち、常習飲酒家のスクリーニングにおいて感度・特異度ともに満足すべきマーカーはなく、他施設共同研究においても γ -GTP 及び CDT の限界が示されている。PEDF の発現量変化が γ -GTP ノンリスポンダーにおいてもみられることから、従来のマーカーと組み合わせることにより常習飲酒者の検出効率が上がると期待される。今後は、今回の手法で見出されたその他のマーカー候補タンパク質の同定をすすめると同時に、PEDF が健診レベルで遭遇する常習飲酒家のスクリーニングに応用できるかどうか検討する予定である。

F. 健康危険情報

総括報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Sogawa, K., Kodera, Y., Satoh, M., Kawashima, Y., Umemura, H., Maruyama, K., Takizawa, H., Yokosuka, O. & Nomura, F. Increased Serum Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor by Excessive Alcohol Consumption- Detection and Identification by a Three-Step Serum Proteome Analysis. *Alcohol Clin Exp Res* **35**, 211-7 (2011).
2. Noda, K., Sogawa, K., Kikuchi, W., Kiyokawa, I., Miura, T., Kojima, R., Katayama, K., Kodera, Y. & Nomura F. Development of a sandwich ELISA for the 5.9-kDa fibrinogen alpha C chain fragment detected by serum proteome analysis. *Proteomics Clin Appl* **5**, 141-6(2011).
3. Kadowaki, M., Sangai, T., Nagashima, T., Sakakibara, M., Yoshitomi, H., Takano, S., Sogawa, K., Umemura, H., Fushimi, K., Nakatani, Y., Nomura, F. & Miyazaki M. Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 1105-15(2011).
4. Yano, T., Sogawa, K., Umemura, H., Sakao, S., Kasahara, Y., Tanabe, N., Kodera, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K. & Nomura, F. Serum level of fibrinogen A α chain fragment increases in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J* **75**, 2675-82(2011).

G-2. 学会発表

1. 佐藤守、高野重紹、石橋真澄、吉富秀幸、西村基、曾川一幸、松下一之、賀川真吾、荷堂清香、宮崎勝、野村文夫、ジェムシタビン耐性ヒト膀胱癌細胞株のプロテオーム解析、第9回日本ヒトプロテオーム機構大会 2011年7月28日 朱鷺メッセ (新潟)。
2. Noda, K., Kikuchi, W., Kiyokawa, I., Miura, T., Kojima, R., Katayama, K., Sogawa, K. & Nomura, F., SERUM FIC5.9 LEVELS AS A

PROMISING BIOMARKER FOR DETECTING LIVER PATHOLOGIES, HUPO 10th Annual World Congress, 2011年9月5日, Geneva, Swiss.

3. 三橋暁、パストゥラル エロディ、山崎泰代、リッティアー ショーン、曾川一幸、生水真紀夫、野村文夫、グッデナウ ダイアン。卵巣癌に特異的な代謝プロファイルの同定、第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋国際会議場。
4. Nomura, F., Sogawa, K., Noda, K., Seimiya, M., Matsushita, K., Tomonaga, T. & Yokosuka. O., The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2011. DIAGNOSTIC VALUE OF SERUM ANTI-KU86 LEVELS IN THE EARLY DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS-RELATED HEPATO- CELLULAR CARCINOMA, 2011年11月5日 San Francisco, USA.

H. 知的財産の出願・登録状況

H-1. 特許取得

1. 発明の名称: クラスリン重鎖に対する自己抗体の免疫測定方法、それに用いるキット、及びそれを用いた癌判定方法
公開番号: 特許公開 2011-107064
出願人: 千葉大学・日東紡メディカル(株)
共同出願
2. 発明の名称: クラスリン重鎖とその自己抗体との複合体の免疫測定方法、それに用いるキット及びそれを用いた癌判定方法
公開番号: 特許公開 2100-117781
出願人: 千葉大学・日東紡メディカル(株)

共同出願

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

I. 研究協力者

小寺義男 北里大学理学部生体分子動力学
講座

丸山勝也 独立行政法人国立病院機構久里
浜アルコール症センター

朝長 毅 医薬基盤研究所プロテオームリサ
ーチプロジェクト

瀧澤弘隆 財団法人柏戸記念財団ポース
クエア柏戸クリニック

脳神経系腫瘍に関連する微量タンパク質解析システムの開発
融合プロテオミクスによる悪性グリオーマ幹細胞関連分子群の解析

研究分担者 荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

脳神経系腫瘍の治療標的となりうるバイオマーカーを検索するため、病態組織／細胞を用いた融合プロテオミクスの方法論確立とその検証法を検討している。分子発現差異解析法である iTRAQ（8 Plex）法、2D-DIGE 法、および DNA array を融合的に用いて同一サンプル群を同時に解析し、得られたすべての情報を統合マイニングすることによって、病態において異常に制御されたシグナル伝達経路を特異的に抽出する方法論(iPEACH 法)を確立し、同定されたターゲット候補分子群を、脳神経系腫瘍の臨床サンプルおよび培養細胞における検証実験に供した。本年は、グリオーマ幹細胞(GSC)に焦点をあて、幹細胞様特性維持と分化に関わる分子群の検索と、これらの悪性腫瘍発生に関わる分子群の解析に応用した。グリオーマ患者組織より分離した GSC 11 クローン中、特にマウス頭蓋内移植にて悪性グリオーマを早期に発症する 3 クローンに注目し、血清による分化誘導によって変動する分子群の解析を行った。同定された分子群 (8,471 タンパク質、21,857 mRNA) を iPEACH ソフトウェアによって統合し、GSC の分化誘導における発現変動分子群(上昇 662 個、減少 326 個)の GO 解析によって、特徴づけられた分化誘導時の発現亢進分子群として、細胞外マトリクス(ECM)群および細胞接着関連分子群、発現抑制分子として細胞周期促進因子群等を同定し、生物学的検証実験に供した。また GSC は、幹細胞マーカー CD133、Sox2 の発現と、血清添加による分化誘導時のこれらの減少、及び Astrocyte マーカー GFAP、Neuron マーカー Tuj1、悪性グリオーママーカー CD44 の発現を誘導し、神経幹細胞様の性質とグリオーマ細胞への分化能を有することを明らかにした。また、これらの分子群を独自に開発した全自動 2 次元電気泳動排出転写装置を応用することによって、複数個のマーカー分子の同時検出法を検討し、翻訳後修飾を含めたマーカー分子群の動的発現変化を短時間でとらえる事が可能となった。これらの一連の解析システムは、神経系腫瘍(幹)細胞の新規分化調節治療ターゲット候補分子群の検出・同定に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

病態サンプルを用いて、病態マーカーや創薬の標的となる細胞内異常シグナルネットワークを検索するには、ゲノム解析や mRNA 発現解析、タンパク質の発現解析や特異的翻訳後修飾／相互作用解析などの様々な分子解析結果を統合的に総合評価する事によってはじめて可能となると考えられる。しかし、これらの解析方法論は元来個々に確立されているため、出力されるデータの言語やフォーマットや表示の概念がそれぞれ異なっており、これらを融合

して統合的に評価することは現状では困難である。そこで本研究では、病態関連分子解析を効率的に進めることができる統合マイニング解析プログラム iPEACH の考案を試み、脳神経系腫瘍の機能分子メカニズム解析、バイオマーカー検索等に応用した。また、検証法の一つとして、独自に開発を行った全自動 2 次元電気泳動装置を用いた Western Blotting 法

(Auto2D-WB) を用いて、複数個のマーカー分子の短時間高感度同時検出法を検討し、経時

的な分子の発現変動を定量的に可視化することを試みた。特に今回、悪性グリオーマ組織から樹立した幹細胞の分化と悪性化誘導モデルに注目した。脳神経系腫瘍の中でも悪性グリオーマはほとんどの場合、手術による治癒は不可能であり、術後脳内に残った腫瘍細胞は放射線療法・化学療法に対する反応性、再発などの予後を決める最も重要な因子である。現在のところ、予後を予測できる診断マーカーは存在せず、患者の化学療法感受性を見極める診断法や治療ターゲットの開発は早急に取り組むべき重要な課題とされている。近年、組織細胞由来の幹細胞様癌細胞(GSC)の存在が示され、その濃縮法および樹立法が各地で検討されるようになった。多様に分化するGSCの研究が悪性脳腫瘍再発や、薬剤耐性の謎をとく最も重要な鍵となることが示唆されているが、GSCの純粋分離法や検出に用いるマーカー分子群はもとより、GSCの化学治療耐性機能などに関わる分子群の詳細な情報は非常に限られているため、研究開発は困難を極めている。本研究では、融合型 differential プロテオーム・トランスクリプトーム解析技術 iPEACH を微量な神経系(幹)細胞に最適化して応用開発することによって、GSCの維持と分化に関わる分子群の同定を試みた

B. 研究方法

質量分析を用いた解析には、複数の高感度タンデム質量分析器(nano ESI-QqTOF: Qstar pulsari、QStarElite、MALDI-TOF-TOF:4700、5800、nano ESI-ionTrapQQQ:4000QTRAP、AB Sciex)、および付随する nano レベルのクロマトグラフィー装置(nanoLC:Ultimate 3000、Dionex、DiNa、Map、KYA)、解析ソフト群(ProteinPilot、MASCOT、Analyst QS、MRM/MRM pilot、quant、scheduled、GPS、Progenesis、Decyder、GeneSpringsGP、MANGO、iPEACH等)を用いた。高感度タンデム質量分析器 nanoLC-ESI-QqTOF、nanoLC-MALDI-TOF-TOF は網羅的なペプチドの高感度検出および比較定量/同定用に、さら

に nanoLC-ESI-ionTrapQQQ(QTRAP4000 Applied Biosystems)は高感度定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用した。

高感度同時比較定量解析法として、iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および検証用にMRM(Multiple Reaction Monitoring)法を用いた。又、リン酸化および proteolysis などの翻訳後修飾発現差異解析に関しては、ProQ-Diamond による染色法を併用した 2D-DIGE 法を用いた。mRNA 発現解析は、DNA chip (Human Genome U133 Plus 2.0 Array、affimetrix)を用いた。

生体サンプルとして、ヒトグリオーマ組織より分離樹立した9つのクローンより、グリオーマ幹細胞 GSC03A、GSC03U、GSC07U、ヒト腫瘍組織、組織からの初期培養細胞、および市販の培養細胞を用いた。各組織は病理学的観察からその病態を判定するとともに、解析する組織が腫瘍組織の中心部のみであることを確認した。又、同一のサンプルを同時にタンパク質(iTRAQ、2D-DIGE)と mRNA (DNA array)用に抽出調製して解析に用いた。全ての解析データを iPEACH(特願 2010-81524、PCT/JP2011/58366)を用いて統合した。GO 解析は GeneSpring GX (Agilent Technologies)、ネットワーク解析は KeyMolnet (医薬分子設計研究所)を用いた。抽出された特異的活性化シグナル分子群に対して、各抗体を用いて 1D/2D-Western Blotting 法、組織免疫染色法、各分子に対する siRNA および阻害剤処理による細胞の抗がん剤の感受性の変化を WST 法にて検討した。

検証法の一つとして、全自動 2 次元電気泳動装置を用いた、2 次元 western blotting 法を用いた。

(倫理面の配慮)

本研究では臨床サンプル(腫瘍組織)より genomic DNA、mRNA、タンパク質を抽出し、ゲノム/トランスクリプトーム/プロテオーム解析を検討することから、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究倫理指針」に基づき、熊本大学医学部ヒト遺伝子研究倫理審査委員会の承認を受けている(悪性脳腫瘍の