

2011/8007A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成24（2012）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 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 2 4 ( 2 0 1 2 ) 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、有吉靖則、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. がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発・・・・・・・・・・ 9

山田哲司、有吉靖則、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

2. 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・・ 12

山田哲司、尾野雅哉

3. がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発・・・・・・・・ 18

近藤 格

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

佐藤雄一

5. 早期大腸がん症例における血清中ダーモカインの解析・・・・ 31

菊池正二郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・ 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

### 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） 「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」

### 平成23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1860例の血清・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のマーカータンパク質が、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  $3.44 \times 10^{-30}$ 、 $1.04 \times 10^{-29}$ 、 $2.07 \times 10^{-27}$  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 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

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

近藤格

菊池正二郎

兵庫医科大学 講師

有吉靖則

大阪医科大学 講師

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である。

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384例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

【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下記症例の血漿・血清検体を同一の採血・保存方法で収集し、大規模な腫瘍マーカーの探索・検証に使えるよう整備した。

健常者・良性疾患	348
浸潤性膵管がん	385

浸潤性膵管がん以外の腫瘍・のう胞	89
膵内分泌腫瘍	9
慢性膵炎	14
胃がん	272
肝がん	84
胆管がん・胆のうがん	58
胆のう炎	87
大腸がん・直腸がん	312
口腔がん	12
肺がん	24
食道がん	43
卵巣がん	11
子宮体がん	2
その他	18
最終病名未登録	177
合計	1860

### 【新規プロテオーム解析基盤技術の開発】

#### 1. 低発現血清・血漿タンパク質の高感度解析技術の確立

東レ株式会社との共同研究で、中空糸膜によるタンパク質の濃縮技術を2DICAL (Two Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and Mass Spectrometry)法(特許出願中、製品化済み)に応用し、低濃度の血清・血漿タンパク質の定量プロテオーム解析を可能にした。

#### 2. 血漿タンパク質マイクロアレイ技術の確立

①逆相担体で被覆したスライドガラスにタンパク質検体を高密度にマイ



クロススポットするアレイ化技術 (reverse phase protein array: RPPA) を開発し、ナノリッターレベルの微量検体で血漿タンパク質の定量を可能にした。

②がん患者と対照者合計 384 例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. 血漿フィブリノーゲンの翻訳後修飾

①膵がん患者で、血漿  $\alpha$  フィブリノーゲンの特定のプロリン残基に、特有の酸化修飾が見られることを見出した。

②この僅かな翻訳後修飾を特異的に検出できるモノクローナル抗体を、高親和性抗体作製技術を持つ株式会社トランスジェニックと共同で開発した。

③合計 685 例の血漿検体を定量解析し、病期 I B 期以上の膵がん症例を検出できることを明らかにした (国内特許成立)。

【実用化状況】

測定キットを構築し、2011 年 12 月 12 日より、まずは研究用試薬として市販することになった。

2. 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

①以前より報告している 17252 m/z の膵がんの早期マーカー (Honda et al., Cancer Res. 2005;65:10613-22、欧州で特許成立) が、片方のペプチド鎖の

C 末よりアミノ酸 1 個が欠失したアポリポ A 2 のヘテロダイマー

(ApoAII-2) であることを突き止めた。

②4 コホート合計 1314 症例で質量分析を行い、病期 I 期を含めて Area Under Curve (AUC) 値 0.9 以上の精度で膵がんが検出できることを証明した。

③正常型と C 末端よりアミノ酸 1 個が欠失したアポリポ A 2 鎖をそれぞれ特異的に検出できる抗体を開発した。

【実用化状況】得られた 2 種類の末端配列特異的な抗体を用いて、現在、東レ株式会社と共同で、ヘテロダイマーを検出できるサンドイッチアッセイを構築している。

3. 細胞骨格タンパク質 T 由来のペプチドフラグメント

①50 例の膵がん切除標本の組織マイクロアレイで、1212 種の抗体をスクリーニングし、細胞骨格タンパク質 T が膵がんで特異的に高発現することを見出した。

②膵がん患者の血中には、このタンパク質の一部がフラグメントとして分泌され、健常者に対し病期 I 期の症例を含めて AUC 値 0.89 で識別できることを明らかにした (特許出願中)。

【実用化状況】フラグメントのアミノ酸残基 1052-1424 を認識するモノクローナル抗体を 2 種、1324-1424 の 1 種を樹立し、現在サンドイッチアッセイを構築中である。

4. 統合ゲノム・プロテオーム解析で同定された22種の血漿タンパク質正常膵管上皮に比べ有意に膵がんを高発現する遺伝子を、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析データより抽出し、その産物に対する179抗体を膵がん患者と対照者の合計384例の血漿がスポットされた「膵がん血漿アレイ」でスクリーニングし、AUC値0.85以上を示す血漿タンパク質3種、0.80以上を示す19種を同定した(特許出願中)。

【実用化状況】アブノバ社との共同研究で、各タンパク質に対しエピトープの異なる複数のモノクローナル抗体を、工業的な規模で作製中である。

#### 5. CXCL7

中空糸膜によるサンプル分画技術を用いて膵がん患者24例と健常者21例の血漿タンパク質を濃縮し、2DICAL法による比較定量解析で、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。さらに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。

#### 6. アディポフィリン

中空糸膜によるサンプル分画技術を用いて大腸がん患者22例と健常者21例の血漿タンパク質を濃縮し、2DICAL法による比較定量でadipophilin(別名perilipin-2)が病期I期の症例を含めて、有意に( $P=0.0004$ )増加することを見出した。さらに2つの独立した大規模コホート[コホート1(210例)とコホート2(113例)]を解析し、早期診断の腫瘍マーカーとして有用なことを証明した。

#### 7. 補体第9成分

大腸がん31例と年齢・性別を一致させた対照者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が病期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名で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。

#### 8. ダーモカイン

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

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  
「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」

	氏名	所属	職名
研究者代表者	山田哲司	国立がんセンター研究所	部長
研究者分担者	有吉靖則	大阪医科大学	講師
研究者分担者	弦間昭彦	日本医科大学	教授
研究者分担者	藤田茂之	和歌山県立医科大学	教授
研究者分担者	土田明彦	東京医科大学	准教授
研究者分担者	中森正二	大阪医療センター	診療統括部長
研究者分担者	井岡達也	大阪府立成人病センター	副部長
研究者分担者	八木原一博	埼玉県立がんセンター	医長
研究者分担者	西 洋孝	東京医科大学	講師

(順不同)

### 研究要旨

新たな腫瘍マーカーの探索、および検証のために、本研究班では大規模な血液（血漿・血清）の収集を行う。7つの医療機関（埼玉県立がんセンター、日本医科大学病院、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、和歌山県立医科大学病院）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、卵巣がん、肺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する。

### 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

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DKが強発現しており、血清中濃度測定の結果を裏付ける結果であった。

#### 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

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 年度よりは前向きに検体を集め、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行う。

## 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、肺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する。

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 の測定を行う。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する。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 に保存する。

(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書を作成し、参加各施設で倫理委員会あるいは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する。

## C. 研究結果

国立がんセンター総長より添付の研

究計画に許可が得られている。  
本研究にて下記に示す疾患および健常者の血清・血漿を 1860 症例分収集した。下記登録患者の CEA, CA19-9, DUPAN-II は計測し、患者情報とともにデータベースに登録した。

疾患名	症例数
健常者・膵疾患以外の良性疾患	348
口腔がん	12
肺がん	24
食道がん	43
胃がん	272
浸潤性膵管がん	385
浸潤性膵管がん以外の腫瘍・のう胞	89
慢性膵炎	14
十二指腸・小腸がん	11
肝がん	84
胆道・胆のうがん	58
大腸がん・直腸	312
GIST	9
卵巣がん	11
子宮体がん	2
その他	9
最終病名未登録	177
合計	1860

#### 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。新規腫瘍マーカー探索・検証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てきており、本年度は新たな大腸がん血漿腫瘍マーカーを開発することに成功した。

A. 研究目的

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にとらえれば、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) 大腸がん血漿腫瘍マーカーの開発

本研究班で収集された大腸がん患者血漿および健常者血漿それぞれ 22 症例、21 症例の計 43 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 $\mu$ g 5M 尿素 10 $\mu$ l 1M 炭酸水素アンモニウム 2.5 $\mu$ l を加え、MilliQ で計 30 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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

(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、検体の個人情報が出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

### 大腸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、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 0.81 を示し、Mann-Whitney U 検定で  $p=0.0004$  の有意差を示すピークが Adipophilin 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 323 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、大腸がんでは病期 I, II を含めたものでも、健常者と比べ、有意に Adipophilin が上昇しており ( $p<0.0001$ )、CEA に比べ、早期から大腸がん患者で上昇することが認められた。

## 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な領域であった。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。

今回発見された大腸がん血漿腫瘍マーカーである Adipophilin 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、Adipophilin は I, II 病期の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。Adipophilin 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**

(2011年4月1日から2012年3月31日まで)

1、 論文発表

- 1) Ito T, Ono M, Yamada T, et.al. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. *Jpn J Clin Oncol.* 41: 847-53. 2011.
- 2) Matsubara J, Ono M, Yamada T, et.al. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20:

2195-203. 2011.

- 3) Yokomizo A, Ono M, Yamada T, et.al. Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Biomark.* In press. 2012.
- 4) Miyamoto T, Ono M, et.al. Identification of 14-3-3 $\gamma$  as a MIEAP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Scientific Reports.* in press 2012.
- 5) Takakura M, Ono M, Yamada T, et.al. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *Cancer.* submitting 2012.
- 6) Ono M, Yamada T, et.al. Biomarker discovery of pancreas cancer and gastrointestinal cancer by 2DICAL - 2-dimensional image converted analysis of LC/MS. *Int. J. Proteomics.* submitting 2012.
- 7) 山田哲司、尾野雅哉、他 がん(腫瘍)マーカー 渋谷正史、湯浅保仁 編 がん生物学イラストレイテッド pp318-24. 羊土社 東京 2011

- 8) 尾野雅哉、山田哲司、他 第9章 研究例 6. 膵癌 1) 血漿を用いた膵癌早期マーカー探索 日本臨床プロテオーム研究会編 臨床プロテオーム 金原出版 東京 出版中 2012
- 2、 学会発表
- 1) 尾野雅哉 山田哲司、他 2DICALによる定量プロテオミクス、日本プロテオーム学会 2011年大会、シンポジウム 口演、2011年7月、新潟
- 2) 紙田正博、尾野雅哉、山田哲司、他 2DICALを用いた腰部脊柱管狭窄症のプロテオーム解析、日本プロテオーム学会2011年大会、一般演題 ポスター、2011年7月、新潟
- 3) 尾野雅哉、2DICALを用いた疾患関連蛋白質の探索法と臨床研究への応用、第15回薬物動態談話会セミナー、講演、2011年8月、大阪
- 4) 尾野雅哉、プロテオームを活用した最先端がん研究、第10期第2回バイオフィナンスギルドセミナー、講演、2011年9月、東京
- 5) 尾野雅哉、山田哲司、他 Identifying new therapeutic
- The discovery of molecular targets for cancer diagnosis and therapy by a proteome platform - 2DICAL、第70回日本癌学会学術総会、口演、2011年10月、名古屋
- 6) 山田哲司、尾野雅哉、他 Identifying new therapeutic targets for personalized medicine、第70回日本癌学会学術総会、口演、2011年10月、名古屋
- 7) 尾野雅哉、2DICALによる新規がんマーカー探索、第11回バイオメディカル研究会、講演、2011年10月、大阪
- 8) 尾野雅哉、プロテオーム解析技術 2DICALを用いた新規がん診断・治療法の開発、神戸大学大学院グローバルCOE 平成23年度神戸大学大学院先端医学シリーズ、講義、2011年10月、神戸
- 9) 下重美樹、尾野雅哉、山田哲司、他 Targeting the WNT signaling pathway、France-Japan Symposium on Cancer Research 2011、口演、2011年11月、東京
- 10) 尾野雅哉、プロテオーム解析技術「2DICAL」を基盤とした質

量分析計による新しいがん診  
断・治療法の開発、メタボロミ  
クス/プロテオミクス 세미나、講  
演、2011年11月、大阪

3、その他  
なし

- 1 1) 尾野雅哉、プロテオーム解析  
技術「2DICAL」を基盤とした質  
量分析計による新しいがん診  
断・治療法の開発、メタボロミ  
クス/プロテオミクス 세미나、講  
演、2011年11月、東京

H、知的財産権の出願・登録状況（予  
定を含む）

1、特許

1) 米国特許

発明の名称：「Tumor marker for  
pancreatic cancer」

発明者：尾野雅哉、山田哲司 他

特許取得日：2011年9月30日

特許番号：US8017732B2

出願人：財団法人ヒューマンサイエン  
ス振興財団

2) 欧州特許

発明の名称：「New Tumor marker for  
pancreatic cancer」

発明者：尾野雅哉、山田哲司 他

特許取得日：2011年12月19日

特許番号：EP2182061A1

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

なし