

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

「がん検診に有用な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：肝細胞癌の悪性度に関わるタンパク質の血清腫瘍マーカーとしての有用性の検討】プロテオーム解析を用いて同定した肝細胞癌の悪性度に相関するタンパク質について、腫瘍細胞から放出されているタンパク質を抗体を用いてスクリーニングした。【研究2：血清腫瘍マーカー候補としての胃癌腫瘍組織で高発現するタンパク質の同定】胃癌腫瘍組織において正常組織に比べて高発現するタンパク質および構造異常を来たしているタンパク質を蛍光二次元電気泳動法と質量分析法を用いて同定した。

A. 研究の背景と目的

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。そのようなタンパク質は悪性腫瘍症例への特異性が低く、慢性炎症をもつ良性疾患との鑑別に役立たない可能性がある。この問題を解決するためには、症例数を増やし統計的に意味のあるバイオマーカーを検出する試みが行われている。一方、腫瘍細胞に特徴的に発現するタンパク質のうち細胞から放出されるタンパク質は特異性の点から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、悪性腫瘍で異常な発現様式をもつタンパク質を腫瘍組織においてまず見出し、その中から血清腫瘍マーカー候補を同定することを試みている。

B. 研究方法

[研究1] 肝細胞癌の悪性形質に相関することが今までの研究から分かっているタンパク質を対象とした。モノクローナル抗体とウェスタンブロッティングにて7種類の肝細胞癌の培養細胞の上清のスクリーニングを行った。[研究2] 胃癌症例の手術検体を解析対象とした。蛍光二次元電気泳動法および質量分析法（GeLC-MS/MS）を用いて、それぞれ39症例および2

症例の胃癌の腫瘍組織に含まれるタンパク質を網羅的に調べた。正常組織に比べ発現が高いタンパク質、予想しない分子量で発現しているタンパク質などの同定を試みた。

(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

[研究1] 抗体を用いて同定した肝細胞癌の悪性度に関わるタンパク質について、培養細胞の上清をスクリーニングした結果、約120種類のタンパク質を同定した。同定したタンパク質は転写因子など機能的に癌の悪性度に関わる可能性が高いものであり、また、従来のプロテオーム解析の手法ではまず検出できない微量のものばかりだった。とりわけ興味深いことに、いくつかのタンパク質については、培地中に放出されているタンパク質の分子量パターンが細胞内のパターンと異なるものが見受けられた。これらは何らかの翻訳後修飾を伴って細胞外に放出されるようになっている可

能性が考えられる。[研究2] 蛍光二次元電気泳動法で3000種類以上、GeLC-MS/MSでは約4000種類のタンパク質を胃癌の腫瘍組織で観察し、腫瘍組織で高発現しているタンパク質をそれぞれ約130種類、80種類同定した。予想される分子量とは異なる分子量で発現しているタンパク質が多数存在し、中には他の悪性腫瘍で細胞外タンパク質として悪性度に関わることから予後バイオマーカーとして報告されているものもあった。

### 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、細胞外に放出され安定的に存在しているタンパク質が存在することが分かった。そのようなタンパク質の中から癌の発生や進展に関わるものを対象として候補を絞り込んでいくことで、後の検証実験に耐えうるバイオマーカーを開発できると考えている。抗体を用いたアプローチをとる場合、スクリーニングに用いた抗体を血液検体に使用することは技術的には容易である。

抗体や電気泳動を基盤とする技術を用いることで、発現だけではなく構造に異常（分解などの翻訳後修飾の異常）を来しているタンパク質を同定した。候補タンパク質の血清腫瘍マーカーとしての有用性を臨床検体で確

認することが次の課題である。

## E. 結論

腫瘍組織において、異常な発現レベルを示すタンパク質、悪性度と相関するタンパク質、構造異常を来たしている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は現時点では順調に進んでいる。得られた成果の臨床検体での検証実験が次の課題である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Uhlén M, Oksvold P, Algenäs C, Hamsten C, Fagerberg L, Klevebring D, Lundberg E, Odeberg J, Pontén F, Kondo T, Sivertsson A. Antibody-based Protein Profiling of the Human Chromosome 21. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Mar;11(3):M111.013458.
2. Morofuji N, Ojima H, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Asahina D, Ushigome M, Hiraoka N, Nagino M, Kondo T. Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J Proteomics*. 2012 Feb 16;75(5):1577-89.
3. Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *J Proteomics*. 2012 Feb 2;75(4):1401-10.
4. Kikuta K, Kubota D, Saito T, Orita H, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Katai H, Shimada Y, Toyama Y, Sato K, Yao T, Kaneko K, Beppu Y, Murakami Y, Kawai A, Kondo T. Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor. *J Proteomics*. 2012 Feb 2;75(4):1089-98.
5. Hosako M, Muto T, Nakamura Y, Tsuta K, Tochigi N, Tsuda H, Asamura H, Tomonaga T, Kawai A, Kondo T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics*. 2012 Jan 4;75(3):833-44.
6. Kubota D, Orita H, Yoshida A, Gotoh M, Kanda T, Tsuda H, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Pfetin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol*. 2011 Oct;41(10):1194-202.
7. Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer*. 2011 Oct

- 1;117(19):4396-405.
8. Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, Sugihara Y, Sakamoto K, Kobori Y, Palmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, Tanaka H, Mizushima H, Fujita S, Kondo T. Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteomics*. 2011 May 16;74(6):858-73.
  9. Suehara Y, Tochigi N, Kubota D, Kikuta K, Nakayama R, Seki K, Yoshida A, Ichikawa H, Hasegawa T, Kaneko K, Chuman H, Beppu Y, Kawai A, Kondo T. Secernin-1as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics. *J Proteomics*. 2011 May 16;74(6):829-42.
  10. Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*. 2011;78(1):1-9.
  11. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:780836.
  12. Hagiwara T, Saito Y, Nakamura Y, Tomonaga T, Murakami Y, Kondo T. Combined use of a solid-phase hexapeptide ligand library with liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis for intact plasma proteomics. *Int J Proteomics*. 2011;2011:739615.
- ## 2. 学会発表
1. 近藤 格 A linkage application of multi-dimensional chromatography, solid-phase peptide ligand library, two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry towards plasma biomarker development. H P L C 研究会、ブタペスト・ハンガリー
  2. プロテオーム解析によるがんバイオマーカー解析 (シンポジウム)、日本プロテオーム学会、新潟
  3. 近藤 格 SOLID-PHASE HEXAPEPTIDE LIGAND LIBRARY WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TWO-DIMENSIONAL DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS FOR INTACT PLASMA PROTEOMICS. ヒトプロテオーム機構年会、ジュネーブ、スイス
  4. 近藤 格 Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine. 東・中央ヨーロッパプロテオーム学会、プラハ、チェコ
  5. 近藤 格 Proteomic Study of Malignant Pleural Mesothelioma by Laser Microdissection and Two-dimensional

Difference Gel Electrophoresis: Cathepsin D as a Novel Candidate for a Differential Diagnosis Biomarker. 結合組織腫瘍学会、シカゴ、米国

したバイオマーカー開発のためのプロテオーム解析」

6. 近藤格 Proteomics application for sarcoma : The symposium of therapy and diagnosis of bone and soft tissue neoplasm in upper extremity. 手外科研究所、上海、中国
7. 近藤格 Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine. 日本癌学会学術総会、名古屋
8. 近藤格 プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー解析、日本臨床検査学会、岡山

## 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：「APC-binding protein EBIを用いた大腸癌の診断、治療法」

①発明者：近藤格、藤田伸、谷口浩和、杉原豊

②出願日：2011年4月21日

③出願番号：特願2010-094972

④出願人：国立がん研究センター、バイオマトリックス研究所

⑤発明の内容の概略：大腸癌の診断、治療法の開発に有用なタンパク質を見出した。

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3. その他

菊田一貴 日本プロテオーム学会奨励賞  
「骨肉腫、Ewing 肉腫の個別化医療を目指

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	教授

研究要旨

肺癌患者の抗癌剤シスプラチンの感受性を予測するマーカーを獲得する目的で、肺腺癌2株、大細胞性神経内分泌肺癌細胞株2株のシスプラチン耐性株を樹立し、それらのシスプラチン感受性である親株のそれぞれと二次元電気泳動法でタンパク質の発現を比較した。その結果、それぞれの両細胞株間で発現量が1.5倍以上増減しているスポットは計359個確認され、そのうち217個(83.0%)のタンパク質名が同定された。その中で、4種細胞株全てでそれぞれの親株に比してシスプラチン耐性株で発現量は亢進していた、ミトコンドリアにある hydroxyl-coenzyme A dehydrogenase/ 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase/ enoyl-coenzyme A hydratase alpha subunit (HADHA)に注目した。さらに、プラチナ製剤を含む抗癌剤で治療を行った肺癌患者の治療前生検組織を抗HADHA抗体で免疫染色したところ、検討した全症例( $p = 0.00367$ )、非小細胞性肺癌( $p = 0.002$ )、小細胞性肺癌( $p = 0.038$ )、肺腺癌( $p = 0.008$ )で抗癌剤が奏功した患者に比して抵抗性を示した患者で有意に発現が亢進していた。以上より、HADHAはプラチナ製剤の治療感受性予測に湯様なマーカーである可能性がある。一方、6型中間径フィラメントであり、中枢神経系細胞の幹/前駆細胞で発現が認められる nestin の発現と大細胞性神経内分泌肺癌の臨床病理学的因子との関連性を免疫組織化学的に検討した。その結果、30例中8例で、その腫瘍細胞の細胞質で発現が認められた。Nestinの発現は年齢、性別、喫煙、p-TNM stage、腫瘍径、リンパ節転移の有無、TTF-1の発現とは無関係であった。しかし、Ki-67 labeling indexとは有意の相関性が認められた( $p = 0.012$ )。また、nestin陽性群は陰性群に比して、有意に予後不良であった( $p = 0.016$ )。以上より、Nestinは大細胞性神経内分泌肺癌の切除患者の予後不良因子である可能性が示唆された。

肺癌の血清診断マーカー獲得のため、肺腺癌細胞株A549を免疫源にランダム免疫法で単クローン性抗体を獲得した。樹立した抗体の中から、免疫染色法によ

り免疫に用いた肺腺癌細胞株の細胞膜にのみ強い発現の認められる抗体を選択し、免疫沈降法により CAXII を認識する抗体である事を確認した。血清診断への有用性の検討のため、70 例の肺癌患者血清と 30 例の健常人血清中の CAXII の発現程度を dot blot 法で検討した。その結果、健常人血清に比して肺癌患者では有意に発現量が亢進していた ( $p < 0.0001$ )。ROC 解析の結果では AUC は 0.794、特異性 70.0%、感度 82.9% で健常人から肺癌患者を選択出来ること、肺癌患者内では腺癌に比して扁平上皮癌で有意に発現量が高いこと ( $p = 0.035$ ) が明らかになった。また、扁平上皮癌では低分化型に比して中分化、高分化型で有意に発現量が高値であった ( $p = 0.027$ )。さらに別の 26 例の肺癌患者、30 例の健常人血清を用いた検討でも同様に有意差が認められた ( $p = 0.030$ )。血清中の CAXII の発現量は健常人から肺癌患者を鑑別するのに役立つ可能性がある。

#### A. 研究目的

我々の最終目標は低侵襲、非侵襲性に患者から採取できる体液（血液や尿）を利用し、がんの早期診断や抗癌剤等の感受性を予測する分子を同定し、それらを用いたがん診断法の確立にある。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 (*Lung Cancer* 69(1): 54-9, 2010, *PLoS ONE* 7(3): e33952, 2012)、がん患者血清、尿中の腫瘍関連自己抗体の解析 (*Int J Oncol*, 40: 1957-62, 2012) 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 *Br J Cancer* 101(3): 492-7, 2009, *Asian Pacific J Cancer Prev* 12(12): 3457-63, 2011、細胞株 *Pathol Int* 60(2): 71-7, 2010、患者血清 *Cancer Genomics & Proteomics* 7(4): 181-9, 2010、尿、髄液 *Pathol Int* 59(11): 797-803, 2009、培養上清中 *Int J Biol Markers* 24(4): 282-5, 2009 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対しては、多数例の腫瘍組織、患者血清、尿等を用いて、有用性を確認し、これら分子を用いた診断法を確立することを第二の目的としている (*Anticancer Res* 30(1): 265-9, 2010, *Eur J Dermatol* 20(3): 283-8, 2010, *Chest* 139(4): 862-9, 2011, *Lung Cancer* doi: 10.1016/j.lungcan.2012.03.025)。

#### B. 研究方法

①大細胞性神経内分泌肺癌 (LCNEC) 由来細胞株 LCN1 と LCN2, 肺腺癌 (AD) 由来細胞株 A549 と LC2Ad を 25ng/ml から徐々に濃度を上げていく方法で最終的に 3, 200ng/ml で生育する細胞株を樹立し、1 年以上安定して継代して

いる。これら細胞株と元の感受性親株とをそれぞれ二次元電気泳動法でタンパク質の発現プロファイリングを比較検討した。それぞれで発現量に1.5倍以上相違のあるスポットを切り出し、in gel digestion 後、質量分析装置を用いてタンパク質名を同定した。4つ全ての細胞株で発現量の相違のあったタンパク質に関して、抗体を購入し、プラチナ製剤を基本とした多剤併用療法で治療を行った肺癌患者の治療前の生検組織を免疫染色した。RECISTによる治療効果判定を基に、染色性と抗癌剤感受性との関連性を検討した。

②連続的に外科的摘出された30例の大細胞性神経内分泌肺癌(LCNEC)の10%ホルマリン固定・パラフィン包埋組織を用いて、nestinの発現を免疫組織化学的に検討した。

③A549細胞を免疫源にランダム免疫法で樹立した抗CAXII単クローン性抗体の肺癌血清診断への応用を目指し、肺癌患者血清、健常人血清におけるCAXIIの存在量をdot blot法で検討した。

(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な

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

①4種それぞれのシスプラチン耐性株と感受性の親株のタンパク質発現を二次元電気泳動法で比較検討した結果、1.5倍以上相違のあるものはLCN1cisで発現亢進は54スポットで減少は33スポット、LCN2cisでは発現亢進は55スポットと減少は39スポット、A549cisでは発現亢進は69スポットと減少は60スポット、LC2Adcisでは発現亢進は28スポットと減少は21スポットと、4細胞株併せてシスプラチン耐性株での発現亢進は206スポットと減少は153スポットであった。この359スポットのうち298スポット(83%)のタンパク質名が明らかとなり、217個の異なるタンパク質であることが確認された。2つの細胞株以上で同じような増減をする25のタンパク質が確認され、その中で4つのシスプラチン耐性株の全てで発現量が亢進していた **hydroxyl-coenzyme A dehydrogenase/ 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase/ enoyl-coenzyme A hydratase alpha subunit (HADHA)**に注目した。用いた4つずつ計8個の細胞株における発現を免疫染色法、免疫ブロット法により確認したところ、二次元電気泳動法の結果と同様にシスプラチン耐性株で発現の亢進が認められた。肺癌組織を用いた同様の検討でも肺癌組織では非腫瘍性末梢肺組織に比して発現



量が亢進していた。また、その発現は細胞質に認められた。さらにプラチナ製剤を基本とした多剤併用療法で治療を受けた肺癌患者の治療前生検組織 46 例を免疫染色した。その結果、CR, PR 症例を治療奏功群、SD, PD を治療非奏功群とした場合、検討した全症例 ( $p = 0.00367$ )、非小細胞性肺癌 ( $p = 0.002$ )、小細胞性肺癌 ( $p = 0.038$ )、肺腺癌 ( $p = 0.008$ ) で抗癌剤が奏功した患者に比して治療非奏功群の患者で有意に発現が亢進していた。

②nestin の発現は LCNEC の 30 例中 8 例 (26.7%) で、腫瘍細胞の細胞質に認められた。nestin 陽性と陰性腫瘍間で形態学的な相違は認められなかった。Nestin の発現は、腫瘍間質の血管内皮細胞や線維芽細胞にも認められた。臨床病理学的に nestin の発現は Ki-67 labeling index と有意の相関性が認められたが ( $p = 0.012$ )、その他の因子との有意の相関性は見られなかった。予後との関連性では、3 年生存率で nestin 陰性グループは 55% であったのに比して nestin 陽性グループでは 25% と有意に低下していた ( $p = 0.016$ )。Nestin は LCNEC での切除患者の予後不良因子である可能性が示唆された。

③肺腺癌細胞株 A549 を免疫源にランダム免疫法で単クローン性抗体を作製した。その中で、免疫に用いた A549 細胞の細胞膜に強い染色性を示し、その他の組織型由来の肺癌細胞株に反応性を示さなかった抗体に注目し、その抗原タンパク質を免疫沈降法によ

り同定した。その結果、CAXII を認識する抗体である事が確認された。肺癌組織を免疫染色したところ、様々な組織型の腫瘍組織の細胞膜に陽性を示し、腺癌特異的でないことが明らかとなった。肺癌患者と健常人血清中の CAXII の発現量を解析したところ、有意に肺癌患者血清中で高値を示すことが分かった ( $p < 0.0001$ )。肺癌患者内では、腺癌 (AD) に比して扁平上皮癌 (SCC) で発現量が有意に高く ( $p = 0.03$ )、SCC でも低分化型に比して中分化、高分化型で有意に高い傾向を示した ( $p = 0.027$ )。ROC 解析では健常人に比して肺癌患者では AUC 0.794、特異度 70.0%、感度 82.9% で鑑別出来ることが明らかとなった。さらに別の 26 症例の肺癌患者と 30 例の健常人の血清を用いた検討においても、両者を有意に鑑別出来ることを証明した ( $p = 0.030$ )。

#### D, 考察

腫瘍の早期診断マーカーの獲得に向けた様々な試みを種々のプロテオミクス手法を駆使して行っているが、癌患者の予後を改善するには、早期発見と同時に適切な抗癌剤の選択も重要な課題であり、幾つかの方法で試みている。今回はその一つとして、肺癌細胞株を抗癌剤の濃度を徐々に上げていく方法で、高濃度の抗癌剤で安定して生育する細胞株を樹立した。その後、それぞれの抗癌剤感受性の親株とのタンパク質の発現プロファイリングを二次元電気泳動法で比較した。

元々同じ細胞株であるので、抗癌剤耐性に関与したタンパク質の発現のみが変化している可能性があり、両者を比較することにより抗癌剤感受性を予測する可能性のあるマーカータンパク質を検索できる。実際、その方法でHADHAを見出した。見出した分子に対する抗体を購入し、抗癌剤治療前の肺生検材料を免疫染色したところ、抗癌剤が効いたPR群では発現が見られないが、効果のなかったSD, PD群では細胞質に発現が認められ、この分子のプラチナ製剤への感受性が治療前に予測出来る可能性が示唆された。さらに、多数例の症例を用いた検討や、患者血清を用いた治療感受性予測が可能か否かの検討を行う予定である。

神経幹細胞マーカーであるNestinは毛包幹細胞にも発現しており、多分化能を有することを報告してきた(*Cell Cycle* 8: 1-2, 2009)。また、毛包腫瘍のマーカーとなり得ること(*Eur J Dermatol* 18: 518-23, 2008)や末梢神経の損傷修復に重要な役割を担っていることを報告してきた(*J Cell Biochem* 107: 1016-20, 2009, *J Dermatol* 39: 33-38, 2012)。また、悪性黒色腫やNSCLCにおいてnestinの腫瘍細胞における発現は、予後不良因子であることを報告してきた(*Eur J Dermatol* 20(3): 283-288, 2010, *Chest* 139(4): 862-869, 2011)。今回、肺癌の中でもLCNECを対象に同様の検討を行った。その結果、LCNECにおいても予後不良のマーカーであることを証明した。その他の腫瘍にお

ける検討も行っているが、共通してnestin発現腫瘍は分化度が低く、予後不良である傾向があった。Nestinは予後不良症例を選択するのに有用なマーカーとなる可能性がある。

## E, 結論

様々なプロテオミクス手法を組み合わせて、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ている。特に、今回は初診時すでに進行癌であることが多い肺癌者の予後を改良する目的で、抗癌剤感受性を予測する分子の同定を目指した検討を行い、予測に役立つ可能性のある分子を同定した。また、ランダム免疫法を用いた腫瘍の網羅的単クローン抗体作製を行っているが、樹立した抗体の血清診断への有用性を検討する研究を展開した。今後、この方法を用いて他の多数の樹立した抗体の有用性を検討する予定である。

## F, 健康危険情報

なし

## G, 研究発表

### 1、論文発表

**1: Suzuki Y, Yoshida T, Wang G, Togano T, Miyamoto S, Miyazaki K, Iwabuchi K, Nakayama M, Horie R, Niitsu N, Sato Y, Nakamura N.**

Association of CD20 levels with clinicopathological parameters and its

prognostic significance for patients with DLBCL.

*Ann Hematol* (in press, published online, doi: 10.1007/s00277-012-1407-4)

**2: Ryuge S, Sato Y, Jiang S-X, Wang G, Matsumoto T, Katono K, Inoue H, Iyoda A, Satoh Y, Yoshimura H, Masuda N.** Prognostic impact of nestin expression in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung.

*Lung Cancer* (in press, published online, doi: 10.1016/j.lungcan.2012.03.025)

**3: Nakayama M, Sato Y, Iwabuchi K, Mikami T, Okamoto M, Seino S, Okamoto T, Miyamoto S.**

Laminin-5 immunohistochemical mapping for analysis of local extension in hypopharyngeal cancer: A preliminary report.

*Auris Nasus Larynx* 2012 Jun; 39: 301-304.

**4: Matsumoto T, Ryuge S, Kobayashi M, Kageyama T, Hattori M, Goshima N, Jiang S-X, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y.**

Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung.

*Int J Oncol* 2012 Jun; 40(6): 1957-1962.

**5: Amoh Y, Aki R, Hamada Y, Niiyama S, Eshima K, Kawahara K, Sato Y, Tani Y, Hoffman RM, Katsuoka K.**

Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury.

*J Dermatol* 2012 Jan; 39(1): 33-38.

**6: Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, Yanagita K, Nagashio R, Kawakami Y, Goshima N, Jiang SX, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y.**

CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer.

*PLoS ONE* 2012 Mar; 7(3): e33952.

**7: Kageyama T, Nagashio R, Ryuge S, Matsumoto T, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Jiang SX, Saegusa M, Sato Y.**

HADHA is a potential predictor of the response to platinum-based chemotherapy. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012 Apr; 12(12): 3457-3463

**8: Mii S, Amoh Y, Kitasato H, Sato Y, Katsuoka K.**

Nestin expression in Bowen's disease and Y, Bowen's carcinoma associated with human papillomavirus.

*Eur J Dermatol* 2011 Jul-Aug; 21(4): 515-519.

**9: Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Hattori M, Iyoda A, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang S-X, Saegusa M.**

The balance between the expressions of hASH1 and HES1 differs between large cell

neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma of the lung.

*Lung Cancer* 2011 Dec; 74(3): 405-410.

**10: Kobayashi M, Yasuoka Y, Sato Y, Zhou M, Abe H, Kawahara K, Okamoto H.**

Upregulation of calbindin D28k in the late distal tubules in the potassium-loaded adrenalectomized mouse kidney.

*Clin Exp Nephrol* 2011 Jun; 15(3): 355-362.

**11. Iyoda A, Travis WD, Sarkaria IS, Jiang S-X, Amano H, Sato Y, Saegusa M, Rusch VW, Satoh Y.**

Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma.

*Exp Ther Med* 2011 Nov; 2: 1041-1045.

**12: Masunaga A, Sato Y, Kadofuku T, Iwamoto S, Masuda M, Suzuki S, Suzuki T, Miyazaki A, Mitsuya T.**

A case of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin 6 receptor-producing mediastinal mature cystic teratoma with somatic-type malignancy.

*Pathol Int* 2011 Apr; 61(4): 243-247

**13: Ryuge S, Sato Y, Wang GQ, Matsumot T, Jiang S-X, Katono K, Inoue H, Satoh Y, Masuda N.**

Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer.

*Chest* 2011 Apr; 139(4): 862-869.

## 2、学会発表

**1: 佐藤雄一、長塩 亮、鉢村和男、松本俊英、南 尚、小林 信、柳田憲吾、村上友利恵、川上和孝、五島直樹.**

抗体を利用した疾患関連抗原の獲得.

*BIOtech 2012 アカデミックフォーラム* (東京) 2012.4.25-27

**2: 佐藤雄一、長塩 亮、松本俊英.**

抗体を利用した血清腫瘍マーカーの獲得.

平成 23 年度神奈川県受託事業「ライフサイエンス分野振興事業」第 2 回バイオビジネス・スタートアップ (溝の口) 2011.12.20  
[講演要旨集 p3-5]

**3: 三川 隆、堤 寛、佐藤雄一.**

接合菌の分子生物学的分類法と接合菌症診断への応用.

基礎・臨床セミナー4 接合菌と接合菌症  
第 55 回日本医真菌学会学術集会(東京) 2011.11.21-22 [第 55 回日本医真菌学会学術集会プログラム・抄録集 p75, 2011. 11.21]

**4: 佐藤雄一、五島直樹、松本俊英、川上和孝、鉢村和男、前田忠計.**

S5-4 自己抗体を活用した癌関連自己抗体の網羅的解析 シンポジウム 5 疾患プロテオミクス: 診断・創薬

日本ヒトプロテオーム学会 2011 年大会 (新潟) 2011.7.28-29 [日本プロテオーム学会 2011 年大会 (9th JHUPRO) Program/Abstract p70, 2011.07.28]

5: 佐藤雄一、松本俊英、長塩 亮、鉢村和男、南 尚、小林 信、柳田憲吾、村上友利恵、五島直樹、川上和孝。 なし

抗体を利用した腫瘍マーカーの獲得  
*国際バイオ EXPO2011* (東京・台場)  
2011.6.29-7.1

H, 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1、特許出願

1: 佐藤雄一、志水加代

「有機分子と作用物質との反応方法」

特願 2011-269550 2011.12.09

2: 佐藤雄一、長塩 亮、松本俊英、鉢村和男

「肺腺癌を判定するためのデータ検出方法、診断薬、及び診断用キット」

特願 2011-238483 2011.10.31

3: 佐藤雄一、田村学

「組織薄切片パラフィンマスキング方法、及び装置」

特許第 4840695 2011.10.14

4: 佐藤雄一、松本俊英、松本和将

「膀胱癌診断用ポリペプチドマーカー及び膀胱癌診断用キット並びにこれらを使用する方法」

特許出願予定

2、実用新案登録

なし

3、その他

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

「早期大腸がん症例における血清中ダーモカインの解析」

	氏名	所属	職名
分担研究者	菊池正二郎	兵庫医科大学上部消化管外科	講師

研究要旨

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対照となるべき安定した測定系が必要である。そこで独自に構築したサンドイッチ ELISA 法により、早期大腸がん 130 症例における血清ダーモカイン（以下 DK）を測定したところ既存腫瘍マーカーである CEA/CA19-9/p53 自己抗体との 4 項目測定での診断感度は 60.7%であった。実用化に向けてさらに安定した高感度測定系を開発するために、抗体と検出系を変更して、蛍光抗体を用いた高感度検出系を確立することができた。また、京都府立医科大学消化器内科教室との共同研究で早期大腸がん内視鏡切除症例の治療前後での血清収集と匿名化臨床情報収集も行った。また、大腸がん以外の消化器がん患者血清中 DK を約 800 症例で測定したところ、膵腫瘍における血清中 DK 値は IPMN などの嚢胞性膵腫瘍での血清中 DK 高値を認めた。IPMN は手術による治癒が望める膵腫瘍であり、大腸癌と同様に早期診断マーカーとしての有用性が示唆された。

新規分子 G2 の腺がんにおける発現解析も行っている。G2 は DK 同様に重層上皮関連分子でありヒト大腸がん組織において発現する。APC Min<sup>+</sup>/<sup>-</sup>マウスにおける異所性発現を免疫組織学的に解析したところ、早期がんにおける発現を確認した。マウス大腸がん発がんモデルの解析とヒト臨床検体解析を組み合わせることで、発がんリスクの高い腺腫を含めたがん検診マーカーの開発が期待される。

A. 研究目的

大腸がんは早期診断が出来れば内視鏡切除を含む外科的切除で治癒する疾患である。したがって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。

## B. 研究方法

平成 21 年から第 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」の研究分担者として早期大腸がんに対する新しい腫瘍マーカーの開発を行っている。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、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。本研究班ではすでに各地のがん医療の中核となる 7 つの医療機関が参加する班組織により全く同一の採血、輸送、保存プロトコールで、膵がん以外にも胃がん、大腸がん、などの比較的罹患率の高いがんの罹患者、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を収集している。

当該研究者は研究分担者として抗 DK 抗体、抗 G2 抗体を複数作製している。平成 22 年度中には、新しいポリクローナル抗体を使った安定した高感度 ELISA を開発した。これらの抗体の中でプロテオーム解析に使用可能なものがあれば提供して解析に使用する予定である。

また、京都大学物質—細胞統合シス

テム拠点・松井 毅助教と共同で APC +/-マウス大腸がん発がんモデルにおける DK/G2 の発現解析を行っている。このモデルでは腺腫ががん化する際の DK/G2 の発現が解析できる。実際の臨床では腺腫由来の大腸がんが多く、より早期で診断可能となれば、本研究の主旨とも合致する。引き続き APC +/-マウスモデルの結果を参考にしながら DK/G2 の腫瘍マーカーとしての開を進める予定である。

(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を作成し、京都府立医科大学および兵庫医科大学倫理委員会の認可のもと血清と匿名化臨床検体情報の管理を行っている。

## C. 研究結果

平成 23 年 3 月 31 日時点で内視鏡切除症例血清 521 検体を収集管理している。これまでの解析では血清 DK 陽性率は手術大腸がん症例 (Tis:28.6%, T1:36.8%) に対して内視鏡切除症例 (Tis:10%, T1:33.3%) と内視鏡切除症例 (Tis) では決して高くなかった。しかし、腺腫症例での偽陽性は 10%であり CEA, p53 自己抗体に比較しても低い傾向にあった。また、外科手術症例と同様に既存腫瘍マーカーである CEA/CA19-9/p53 自己抗体との重複陽性例は非常に少なく既存マーカーに DK を加えることで診断感度は改善した。DK は早期大腸がん症例

に対する診断マーカーとしては有用であると思われる。また、膵腫瘍における DK 発現を解析した結果、IPMN などの嚢胞性膵腫瘍での血清中 DK 高値を認めた。既存膵腫瘍マーカーである CA19-9, CEA, DUPAN-2, ST-439, Span-1 などと重複が少なく、これらの血清マーカーとの併用で通常型膵癌の 100%(n=9/9) と IPMN 関連膵癌の 76.5%(n=13/17) が診断可能であった。しかも、DK+CA19-9 の 2 項目血清検査では、前者の 88.9%(n=8/9)、後者の 70.6%(n=12/17) が診断可能であり、嚢胞性腫瘍を含む膵疾患の診断におけるまた、DK+CA19-9 の 2 項目血清検査の有用性が示された (論文投稿中)。

DK と同様に皮膚における重層化関連分子として同定した、新規分子 G2 の膵がんにおける発現解析を開始した。APC min マウスにおける G2 の異所性発現を免疫組織学的に解析したところ、早期がんにおける発現を確認した。現在、G2/GFP のトランスジェニックマウスが完成しており、京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) 発生生物学松井毅助教との共同研究で解析を行っている。

#### D, 考察

これまでの解析結果からは DK、G2 の早期大腸がんにおける発現は確認されており、DK に関しては実験的 ELISA では有効性は確認された。しかしプロテオーム解析における有効性・安定性などは未知数であり、今後の研究課題である。改善すべき点も多いと思わ

れるが、実用化されればこれまでに類を見ない有効な検診プログラムとなることが期待できる。大腸がんの罹患数がわが国のみならず世界的に多いことと併せれば社会的意義は非常に大きい。

#### E, 結論

印環細胞がんや粘液がんなどの特殊型を除けば、単層上皮である腺上皮に腺がんが発生する際には、細胞密度の上昇とともに偽重層が認められる。DK や G2 は重層関連分子であるが、早期腺がんにおけるこれらの分子の異所性発現の解析は発がん初期における新しい腫瘍マーカーの開発につながる可能性があると思われる。

#### F, 健康危険情報

なし

#### G, 研究発表

##### 1, 論文発表

**1: Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer.**

Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E.

J Gastroenterol. 2010

Dec;45(12):1201-11. Epub 2010 Jul 21.

H, 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)



1、特許出願

出願番号 2007-294243 「消化器癌の診断  
方法」 (2007, 11/13 出願)

2、実用新案登録

なし

3、その他

なし

別添5 研究成果の刊行に関する一覧表

**1: Matsubara J, Honda K, Ono M, Sekine S, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Sakuma T, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Tsuchida A, Shimahara M, Yasunami Y, Chiba T, Yamada T.**

Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray.

*Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(10):2195-203.

**2: Hagiwara T, Saito Y, Nakamura Y, Tomonaga T, Murakami Y, Kondo T.**

Combined Use of a Solid-Phase Hexapeptide Ligand Library with Liquid Chromatography and Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis for Intact Plasma Proteomics.

*Int J Proteomics.* 2011;2011:1-11.

**3: Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, Sugihara Y, Sakamoto K, Kobori Y, Palmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, Tanaka H, Mizushima H, Fujita S, Kondo T.**

Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis.

*J Proteomics.* 2011;74(6):858-73.

**4: Koyama T, Sekine S, Taniguchi H, Tsuda H, Ikegami M, Hano H, Kushima R.**

Hepatocyte nuclear factor 4A expression discriminates gastric involvement by metastatic breast carcinomas from primary gastric adenocarcinomas.

*Hum Pathol.* 2011;42(11):1777-84.

**5: Yoshida A, Sekine S, Tsuta K, Fukayama M, Furuta K, Tsuda H.**

NKX2.2 is a Useful Immunohistochemical Marker for Ewing Sarcoma.

*Am J Surg Pathol.* In press.

**6: Ryuge S, Sato Y, Jiang SX, Wang G, Matsumoto T, Katono K, Inoue H, Iyoda A, Satoh Y, Yoshimura H, Masuda N.**

Prognostic impact of nestin expression in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung.

*Lung Cancer.* In press.

**7: Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, Yanagita K, Nagashio R, Kawakami Y, Goshima N, Jiang SX, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y.**

CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer.

*PLoS One.* 2012;7(3):e33952.

**8: Kageyama T, Nagashio R, Ryuge S, Matsumoto T, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Jiang SX, Saegusa M, Sato Y.**

HADHA is a potential predictor of response to platinum-based chemotherapy for lung cancer.

*Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(12):3457-63.

## Identification of Adipophilin as a Potential Plasma Biomarker for Colorectal Cancer Using Label-Free Quantitative Mass Spectrometry and Protein Microarray

Junichi Matsubara<sup>1,6</sup>, Kazufumi Honda<sup>1</sup>, Masaya Ono<sup>1</sup>, Shigeki Sekine<sup>2</sup>, Yoshinori Tanaka<sup>7</sup>, Michimoto Kobayashi<sup>7</sup>, Gimran Jung<sup>7</sup>, Tomohiro Sakuma<sup>3</sup>, Shoji Nakamori<sup>8</sup>, Naohiro Sata<sup>11</sup>, Hideo Nagai<sup>11</sup>, Tatsuya Ioka<sup>9</sup>, Takuji Okusaka<sup>4</sup>, Tomoo Kosuge<sup>4</sup>, Akihiko Tsuchida<sup>5</sup>, Masashi Shimahara<sup>10</sup>, Yohichi Yasunami<sup>12</sup>, Tsutomu Chiba<sup>6</sup>, and Tesshi Yamada<sup>1</sup>

### Abstract

**Background:** The aim of this study was to identify a new plasma biomarker for use in early detection of colorectal cancer.

**Methods:** Using the combination of hollow fiber membrane (HFM)-based low-molecular weight protein enrichment and two-dimensional image converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry (2DICAL), we compared the plasma proteome of 22 colorectal cancer patients with those of 21 healthy controls. An identified biomarker candidate was then validated in two larger cohorts [validation-1 ( $n = 210$ ) and validation-2 ( $n = 113$ )] using a high-density reverse-phase protein microarray.

**Results:** From a total of 53,009 mass peaks, we identified 103 with an area under curve (AUC) value of 0.80 or higher that could distinguish cancer patients from healthy controls. A peak that increased in colorectal cancer patients, with an AUC of 0.81 and  $P$  value of 0.0004 (Mann-Whitney  $U$  test), was identified as a product of the *PLIN2* gene [also known as perilipin-2, adipose differentiation-related protein (ADRP), or adipophilin]. An increase in plasma adipophilin was consistently observed in colorectal cancer patients, including those with stage I or stage II disease ( $P < 0.0001$ , Welch's  $t$  test). Immunohistochemical analysis revealed that adipophilin is expressed primarily in the basal sides of colorectal cancer cells forming polarized tubular structures, and that it is absent from adjacent normal intestinal mucosae.

**Conclusions:** Adipophilin is a plasma biomarker potentially useful for the detection of early-stage colorectal cancer.

**Impact:** The combination of HFM and 2DICAL enables the comprehensive analysis of plasma proteins and is ideal for use in all biomarker discovery studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 20(10); 2195–203. ©2011 AACR.

**Authors' Affiliations:** Divisions of <sup>1</sup>Chemotherapy and Clinical Research, and <sup>2</sup>Molecular Pathology, National Cancer Center Research Institute; <sup>3</sup>BioBusiness Group, Mitsui Knowledge Industry; <sup>4</sup>Hepatobiliary and Pancreatic Oncology and Hepatobiliary and Pancreatic Surgery Divisions, National Cancer Center Hospital; <sup>5</sup>Third Department of Surgery, Tokyo Medical University, Tokyo; <sup>6</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto; <sup>7</sup>New Frontiers Research Laboratories, Toray Industries, Kamakura; <sup>8</sup>Department of Surgery, Osaka National Hospital, National Hospital Organization; <sup>9</sup>Department of Hepatobiliary and Pancreatic Oncology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases; <sup>10</sup>Department of Oral Surgery, Osaka Medical College, Osaka; <sup>11</sup>Department of Surgery, Jichi Medical University, Shimotsuke; and <sup>12</sup>Department of Regenerative Medicine and Transplantation, Fukuoka University Faculty of Medicine, Fukuoka, Japan

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention Online (<http://cebp.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Author:** Junichi Matsubara, Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoinkawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. Phone: 81-75-751-4302; Fax: 81-75-751-4303; E-mail: jmatsuba@kuhp.kyoto-u.ac.jp

doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0400

©2011 American Association for Cancer Research.

### Introduction

Colorectal cancer is the second leading cause of cancer deaths in Western countries (1) and is the third leading cause of cancer deaths in Japan, where there were more than 43,000 estimated colorectal cancer deaths in 2008 (2). Treatment of colorectal cancer without metastasis is relatively uncomplicated, and a favorable prognosis can be expected for these patients (3, 4). However, the 5-year survival rate of patients with metastatic colorectal cancer is estimated to be less than 5% (5), underscoring the importance of early detection. The modality used most commonly for colorectal cancer mass screening is fecal occult blood (FOB) test. Three large randomized trials showed that inclusion of FOB in colorectal cancer screening significantly reduces the rates of colorectal cancer mortality (6–8). However, FOB has a relatively high false positive rate (9, 10), and as a result, a large number of healthy individuals receive radiological or endoscopic