

の初発胃癌患者と、同時期に受診し、性・年齢を頻度により適合させた 1,462 名の非がん対照者を用いた症例対照研究を実施した。

受診時に自記式の質問票により、喫煙状況、飲酒状況、糖尿病の既往、緑茶摂取、胃癌の家族歴等の交絡要因を参加者より聴取している。また同時に提供を受けた血液検体より DNA を抽出し、IGF-1 遺伝子多型の測定に用いた。組織型に関する情報は、病理情報に基づく。

検討対象: IGF-1 遺伝子多型は、国際ヒト HapMap 計画の公開データベースを元に、Minor allele frequency が日本人で 30%以上、かつ、連鎖不平衡状態の指標であるハプロタイプ R-square 値 0.95 を満たす rs574214, rs6214, rs1520220, rs6539035, rs4764887, rs2288378, rs2195239, rs12423791, rs2162679, rs5742612 の 10 遺伝子座を選択した。遺伝子多型の測定方法は TaqMan 法を用いた。

関連の指標として非条件付き多変量ロジスティック回帰モデルを用いたオッズ比とその 95%信頼区間を用いた。多変量解析モデルには、前記の交絡要因を調整因子として投入した。対照群において、各遺伝子座の Hardy-Weinberg 連鎖不平衡からの解離を検討し、当該遺伝子座が統計的に有意に乖離している場合には検討項目より除外した。

2) 胃癌の予後に対する IGF-1 遺伝子多型の影響を検討する研究

1) の検討に用いた症例のうち、430 名の治癒的胃切除術をされた症例のみを用いた予後解析を行った。

患者の基礎的な予後因子の情報は臨床データより取得した。手術後の補助的化学療法、術後臨床病期(胃癌取り扱い規約による)、無再発生存期間が、性、年齢、糖尿病の既往歴、病理組織型に加えて収集された。

遺伝子多型は、1) の研究で検討された 10 遺伝子座の情報をそのまま用いた。

統計解析は、無再発生存をエンドポイントとした。多変量比例ハザードモデルならびに Kaplan-Meier 曲線により、各遺伝子多型のエンドポイントに対する影響を検討した。また、臨床要因による予後との交互作用も探索的に検討した。

(倫理面への配慮)

この研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき計画され、愛知県がんセンター

のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて「初診患者を対象とした癌遺伝子多型と環境要因の——交互作用の研究」として承認を受けている。実施においては、研究対象者よりインフォームド Consent を行った上で安全に実施された。

C. 研究結果

1) 胃癌の罹患リスクに対する IGF-1 遺伝子多型の影響を検討する研究

性、年齢に症例対照間の分布の差は認められなかった。一方、喫煙者、胃癌の家族歴が症例群で対照群に比べて多かった。緑茶、糖尿病既往歴は両群に差は認められなかった。

検討された 10 遺伝子座のうち、rs6214, rs6539035, rs12423791, rs2162679 の 4 座は Hardy-Weinberg 平衡との有意な解離を認めたため、以後の検討から除外した。残る 6 座のうち、統計的に有意な関連を示したのは、rs1520220, rs4764887 の 2 座であった(表 1)。両者の間の連鎖不平衡は $D' = 0.94$ 、 $R-squared = 0.35$ であった。アレル毎モデルにおいて rs1520220 はオッズ比が 1.14 (95%信頼区間: 1.00-1.30)、rs4764887 は 1.18 (1.02-1.36) であった。2 座のリスクアレル数による解析では、リスクアレル数が増えるほどリスクが有意に上昇することが示されている(傾向 p 値 = 0.019、表 2)。性、喫煙歴、胃癌家族歴、糖尿病既往歴、組織型のいずれも、この 2 遺伝子座の影響を統計的に有意に修飾するものではなかった。

2) 胃癌の予後に対する IGF-1 遺伝子多型の影響を検討する研究

対象者のうち 345 名が I/II 期、85 名が III/IV 期であった。全体に対する 5 年無再発生存率は 85.3 (95%信頼区間: 81.4-88.5) であった。

10 遺伝子座のうち、rs1520220, rs2195239 の 2 座が統計的に有意な関連を示した。比例ハザードモデルによる多変量調整のハザードは、rs1520220 が 0.65 (0.44-0.98)、rs2195239 が 0.64 (0.44-0.94) であった。両遺伝子座の間には強い連鎖不平衡が認められたため ($D' = 0.96$, $R-squared = 0.75$)、以後の解析は rs1520220 を用いた検討とした。

Rs1520220 と各臨床情報との間での交互作用を検討した示したものを表に示す。統計学手に有意な交互作用を示したのは臨床病期のみであった(表 3)。rs1520220 の影響は、病期 I/II では明らかではないが、病期 III/IV では明確な差を示した(図 A,B)。

D. 考察

本研究では、IGF-1 遺伝子多型の胃がん罹患、胃がん治療後の予後に対する影響を検討した。rs1520220 が罹患、予後いずれにも関連を示していることが興味深い。Rs1520220 の G-allele はこれまでに体内での IGF-1 濃度が少なくなるという報告がなされており、G-allele で予後が改善し、罹患リスクが下がるという結果は、IGF-1 が胃がん発生から進展を通じて重要な働きを果たしていることを示唆する。

現在臨床では IGF-1 を対象とした分子標的薬が登場しており、本研究の結果は胃がんへのその可能性ならびに、本多型の薬剤効果への修飾効果を示唆しているかも知れない。

E. 結論

本研究により、rs1520220 が、胃がんの罹患、予後いずれにも関連を示していることがわかり、胃がんの高危険群の捕捉のための遺伝的マーカーのひとつの候補となる可能性が示唆された。

今後生物学的、臨床的両面から更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Association between insulin-like growth factor-1 polymorphisms and stomach cancer risk in a Japanese population.

Ennishi D, Shitara K, Ito H, Hosono S, Watanabe M, Ito S, Sawaki A, Yatabe Y, Yamao K, Tajima K, Tanimoto M, Tanaka H, Hamajima N, Matsuo K.

Cancer Sci. 2011 Dec;102(12):2231-5.

2) Genetic polymorphism of IGF-I predicts recurrence in patients with gastric cancer who have undergone curative gastrectomy.

Shitara K, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ito H, Hosono S, Watanabe M, Tajima K, Tanaka H, Muro K, Matsuo K.

Ann Oncol. 2012 Mar;23(3):659-64.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1.IGF-1 遺伝子多型と胃がんリスクとの関連 (Per allele model)

				Model 1†			Model 2‡		
				OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
rs5742714: risk allele (C) frequency in control subjects = 0.219									
Case/control	CC	CG	GG	1.02	0.88- 1.19	0.76	1.02	0.87-1.19	0.82
	38/81	238/479	427/902						
rs1520220: risk allele (C) frequency in control subjects = 0.50									
Case/control	GG	GC	CC	1.13	0.99- 1.29	0.052	1.14	1.00-1.30	0.05
	148/361	357/728	198/373						
rs4764887: risk allele (G) frequency in control subjects = 0.717									
Case/control	AA	AG	GG	1.18	1.03- 1.36	0.021	1.18	1.02-1.36	0.027
	45/132	260/563	398/767						
rs2288378: risk allele (A) frequency in control subjects = 0.215									
Case/control	AA	AG	GG	1.02	0.88- 1.19	0.77	1.02	0.87-1.19	0.83
	36/80	236/469	431/913						
rs219523: risk allele (G) frequency in control subjects = 0.546									
Case/control	CC	CG	GG	1.11	0.98- 1.27	0.096	1.11	0.98-1.27	0.11
	127/312	346/703	230/447						
rs5742612: risk allele (T) frequency in control subjects = 0.703									
Case/control	CC	CT	TT	1.07	0.96- 1.23	0.38	1.06	0.92-1.22	0.82
	55/133	289/602	359/727						

†Crude model. ‡Adjusted for sex, age, smoking status, history of diabetes and family history of gastric cancer.

CI, confidence interval; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

表2. rs1520220 とrs4764887 のリスクアレル数と胃がんリスクとの関連

Number of risk alleles†	0	1	2	3	4	Trend
Case	42	69	229	170	193	
Control	124	164	476	337	361	
Univariate analysis (OR)	1	1.24	1.42	1.49	1.58	1.1
95% CI	Ref	0.79-1.95	0.97-2.08	1.00-2.21	1.07-2.33	1.02-1.18
P-value	-	0.34	0.073	0.048	0.022	0.018
Multivariate analysis (OR)‡	1	1.22	1.36	1.44	1.55	1.1
95% CI	Ref	0.78-1.92	0.92-2.01	0.97-2.15	1.05-2.31	1.02-1.18
P-value	-	0.39	0.12	0.07	0.029	0.019

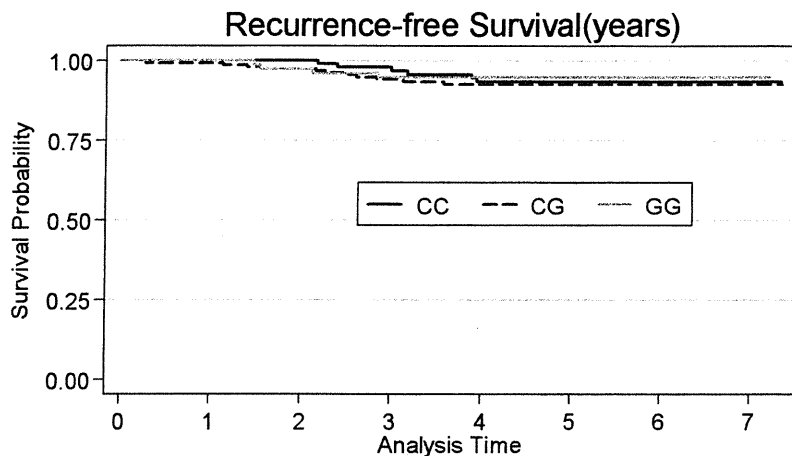
†Risk alleles are C in rs1520220 and G in rs4764887, and number of risk alleles indicates the total number of risk alleles in two loci. ‡Adjusted for sex, age, smoking status, history of diabetes and family history of gastric cancer. CI, confidence interval; OR, odds ratio; Ref, reference.

表3. rs1520220 と各種臨床情報との間の交互作用の検討(胃がん 430 例)

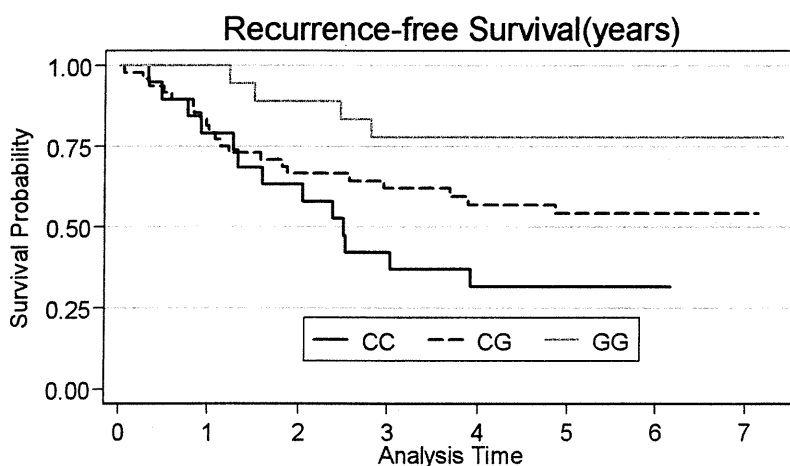
Variant (rs)	Characteristic	Major Homozygote /Heterozygote/ Minor homozygote	Multivariate analysis (per allele)			
			HR	95% CI	P*	
rs1520220	Stage	I-II	105/161/179	1.07	0.58-1.98	0.01
		III-IV	19/48/18	0.41	0.24-0.70	
	Gender	Male	87/153/77	0.67	0.40-1.11	0.53
		Female	36/56/20	0.53	0.25-1.13	
	Age	<60	69/111/49	0.53	0.30-0.94	0.881
		≥60	55/98/48	0.64	0.36-1.15	
	Pathology	Diffuse	69/122/46	0.52	0.32-0.84	0.766
		Intestinal	55/87/51	0.76	0.34-1.69	
	Adjuvant	No	120/196/88	0.66	0.41-1.05	0.374
		Yes	4/13/9	0.47	0.19-1.20	
	Diabetes	No	110/196/90	0.53	0.34-0.80	0.092
		Yes	14/13/7	0.64	0.08-5.16	

図病期別に層別した rs1520220 の生存への影響(胃がん 430 例)

A 病期Ⅲ



Number at risk		0	1	2	3	4	5	6	7
CC	105	104	102	88	78	52	20	1	
CG	161	160	155	128	96	66	23	2	
GG	79	79	76	66	54	46	13	1	



Number at risk		0	1	2	3	4	5	6	7
CC	19	15	12	8	6	5	1	0	
CG	48	39	31	27	22	21	8	1	
GG	18	18	16	13	12	10	3	1	

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業) (がん関係研究分野)
(分担) 研究報告書

「プロテオーム解析に関する研究」

分担研究者 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。2DICAL を用い膀胱がん発症危険因子を膀胱がん発症前血液サンプルから探索するとともに、2DICAL で発見してきた各種腫瘍マーカーを既存の臨床検査手法や質量分析計を用いた新規の測定手法(MRM(Multiple Reaction Monitoring))により検証することを目的に本分担研究を行っている。本年度は水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対するサンドイッチアッセイ構築とMRMによる多数検体による測定を行った。

A. 研究目的

2DICAL は、複数のスペクトラムからなる液体クロマトグラフィー質量分析計(LCMS)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、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、LCMS 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。本研究では、本技術を用いて新規の膀胱がん危険因子を膀胱がん発症前血液サンプルから探索するとともに、2DICAL で発見してきた各種腫瘍マーカーを既存の臨床検査手法や質量分析計を用いた新規の測定手法(MRM(Multiple Reaction Monitoring))により検証することを目的とする。

B. 研究方法

1) 膀胱がん発症危険因子の探索

約6万人のコホートより発症している約 140 例の膀胱がん症例の発症前検体を、膀胱がん発症危険因子探索の対象とする。この血液検体に対して対照、検証となる膀胱がん患者や健常者、慢性膀胱炎患者等の血液検

体は採血・保存方法を標準化し、人間ドックや歯科の受診症例を含めて収集するとともに、すでに収集された検体で、倫理的要件を満たすものも解析対象とする。これらの血液検体を用いて、膵がん症例の発症前検体とその他の検体のプロテオームを2DICALによって比較解析し、膵がん発症危険因子の探索を行う。

2) 腫瘍マーカー実用化に向けた技術開発

2DICAL で発見された腫瘍マーカー候補である水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対して、サンドイッチアッセイ系の構築を行い、多数検体を用いた検証実験を行う。[サンドイッチアッセイ系の構築は宮本博士の分担研究報告を参照]

2DICAL で発見された腫瘍マーカー候補である水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質で特異抗体が得られなかったペプチド部位に対してはMRMを用いて検証実験を行う。[MRMの絶対定量系の構築や、血液検体の前処理方法及び分離条件の最適化に関しては、寺崎博士、大槻博士らの分担研究報告を参照]

(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患者、健常者より得られた血漿検体を用いた。

C、研究結果

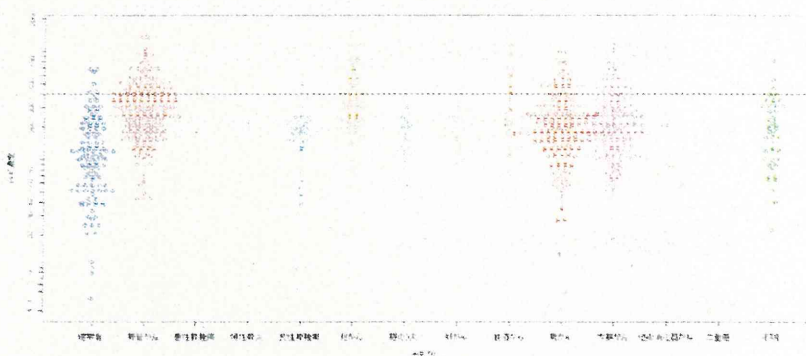
1) 膵がん発症危険因子の探索

本年度は協力施設での倫理審査を行った。

2) 腫瘍マーカー実用化に向けた技術開発

水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対して、サンドイッチアッセイ系の構築のため、トランスジェニック社が開発したサンドイッチ ELISA 測定キットを用い

て[測定器キット開発に関しては宮本博士の分担研究報告を参照]、膵管がん 222 例を含む各種がん、他疾患 および、健常者計 1006 例の血漿水酸化プロリン α -フィブリノーゲンの濃度を測定した。膵管がん患者では健常者に比べ有意に濃度が増加していたが ($p=3.77E-16$, $ttest$)、慢性膵炎、良性膵腫瘍患者、胆嚢炎は健常者と比べ有意差を認めなかった。各種がんでは、健常者と比較し有意差があるものが多く、特に食道がん、胆道がんでは大きな差を認めた(図)。



水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質で特異抗体が得られなかったペプチド部位を、上記抗体が認識できるペプチド部位とともにMRMを用いて100例規模の臨床検体解析を行ったところ、このペプチド部位の水酸化プロリン修飾体は膵がん患者で上昇していた。[本研究結果の詳細は寺崎博士、大槻博士らの分担研究報告を参照]

D、考察

水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対するサンドイッチ ELISA キットにより、血漿水酸化プロリン α -フィブリノーゲンの濃度を多数検体で測定した結果、膵がん患者では健常者と比較して有意な濃度上昇が認められた。それに対し、慢性膵炎、良性膵腫瘍、胆嚢炎患者では、健常者との有意差が認められなかった。これにより、HP-FGA 測定キットが、膵がん特異的な診断用キットとなる可能性が示された。

水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質の水酸化修飾されたペプチド部位をMRMで測定した結果、

翻訳後修飾体を非標識体と区別して、少量の血漿から同時にかつ特異的に測定することが可能であった。また、多数症例を測定する技術も開発され、質量分析装置による血液タンパク質濃度測定が臨床応用できる可能性が示唆された。

E. 結論

- 1、水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対するサンドイッチ ELISA 測定キットの開発に成功した。
- 2、MRMによる絶対定量系の構築、血液検体の前処理方法及び分離条件を最適化に成功した。
- 3、2DICAL を用いた膵がん発症危険因子の探索を開始した。

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 γ as a Micap-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.* in press 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 Research2011、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/プロテオミクスセミナー、講演、2011年11月、大阪
- 11) 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
- 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
- 3、その他
- なし

別添4

厚生労働科学研究費補助金(研究事業)

分担研究報告書

血液検体のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析に基づく、膵がん・肺がん等の高危険度群の捕捉のためのバイオマーカーの同定

-逆相血漿マイクロアレイによる膵がん血漿診断マーカーの開発-

-ApoAII ホモダイマーC末端修飾体早期膵がん診断マーカーキットの開発-

-血漿・血清診断マーカーのためのバイオバンク構築-

研究分担者

本田一文 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

鄭基晩 東レ株式会社先端融合研究所 主任研究員

金田 隆 日本大学 松戸歯学部 放射線学講座 教授

加藤仁夫 日本大学 松戸歯学部 インプラント学講座 准教授

研究要旨 早期膵がんを検出する血漿診断マーカーを開発し、膵がんの死亡率の改善を目的とする。膵がんのトランスクリプトームデータから、膵臓がんに特異的に発現する mRNA 抽出し、国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野で開発された逆相血漿マイクロアレイ(reverse phase plasma microarray, RPPA)と抗体ライブラリーを用いて、24種類の血漿診断マーカー候補を絞り込んだ。そのうち2種類の抗原に対してサンドウィッチ enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA)の構築を完了した。ApoAII ホモダイマーC末端が膵がん患者の血液中で特殊な修飾を受けることを発見し、診断キットの開発を行った。日本大学松戸歯学部と協力してプロテオーム解析に適した血漿・血清バイオバンクの基盤整備を行った

A. 研究目的

早期膵がんを低侵襲な方法で検出する血漿バイオマーカーは、膵がん死亡率を改善すると考えられる。本研究の目的は、血漿・血清を用いて早期膵がんを診断するバイオマーカーを開発することである。

B. 研究結果

1)膵がん組織発現プロファイルを用いた膵がん血漿診断マーカーのスクリーニングとサンドウィッチ ELISAの構築

文献的に報告されている膵がんと健常膵管組織 mRNA 発現プロファイルから膵がんの特異性の高い

mRNA 情報から、抗体を入手できた 130 抗原に対するタンパク質発現プロファイルを RPPA を用いて取得した。浸潤性膵管がんと健常者間で receiver operating characteristic (ROC) 曲線下面積 (area under curve, AUC) で 0.80 以上になる抗原を 23 種類同定した。また、膵がん症例を 48 症例搭載した組織マイクロアレイと 1021 種類の抗体で構成されたライブラリーを用いて、膵がん反応し健常膵管に反応しない抗体を選別後、RPPA で 2 次スクリーニングし細胞膜裏うちタンパク抗原 1 種類を同定した。RPPA の結果では、AUC が 0.89 を超える判別性を示した。

上記 24 種類抗体の免疫源情報を東北大学大学院薬学研究科 寺崎教授の研究グループと共有し、質量分析によるマルチプレックス解析の開発をスタートした (寺崎博士、分担研究報告書参照)。

24 種類の抗原のうち 4 種類の抗原に対して補足用抗体と検出用抗体がペアになるように新しい抗体を数十種類作製し、RPPA で最良なペア抗体をスクリーニングした。優良なペア抗体に対して、サンドウィッチ ELISA 構築に着手した。2 種類抗原では、ELISA 構築が完了し、標準物質による希釈直線試験と血漿・血清を使った添加回収試験が終了した。

2) ApoAII ホモダイマー C 末端修飾体 (ApoAII ATQ/AT) に対するサンドウィッチ ELISA の構築

ApoAII ATQ と ApoAII AT に対する特異抗体の作製が終了した。RPPA と質量分析で抗体の特異性を確認した。サンドウィッチ ELISA の構築に着手した。

3) 血漿・血清診断マーカーのためのバイオバンク構築

分担研究者らは、厚生労働科学研究費補助金 第 3 対がん総合戦略事業の一環として、プロテオーム研究の使用に耐えうる多施設共同研究による血漿・血清検体バンク構築を行ってきた。しかしながら本バイオバンクでは、健常者の検体の収集が十分ではなか

った。そこで、日本大学松戸歯学部金田教授、加藤教授の協力を得て、健常者検体の収集を強化した。

日本大学松戸歯学部および国立がん研究センターの倫理審査委員会の承諾を得て、収集事業に着手した。

C. 平成 24 年度の展開

1) 血漿・血清バイオバンクの検体を使って、サンドウィッチ ELISA の診断学的有用性を確認する。

2) 臨床検査キット開発のために、製品安定化試験等を行う。

3) 日本大学松戸歯学部から収集される検体の臨床情報等を整理し、バンキングを行う。

F. 健康危険情報

特記すべき事項無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Ono M, Kamita M, Murakoshi Y, Matsubara J, Honda K, Yamada T, Banno M, Sakuma T. Biomarker discovery of pancreatic and gastrointestinal cancer by 2DICAL - 2-dimensional image converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry. Int J Proteomics. In press.

2: Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. Histopathology. In press

3: Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T. β -catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. Gastroenterology.

2012 Mar;142(3):572-81.

4: 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 Oct;20(10):2195-203.

5: Ito H, Honda K, Satow R, Arai E, Shitashige M, Ono M, Sakuma T, Sakano S, Naito K, Matsuyama H, Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 Jul;41(7):847-53.

6: Okada H, Tanaka S, Tajima H, Akimoto Y, Kaneda T, Yamamoto H. Schwannoma arising from the sublingual gland *Annals of Diagnostic Pathology* 2012 16; 141-144,

7: Iida T, Sakayanagi M, Svensson P, Komiyama O, Hirayama T, Kaneda T, Sakatani K, Kawsara M. Influence of periodontal afferent inputs for human cerebral blood oxygenation during jaw movements. *Exp Brain Res* 2012. 216 ; 375 - 384,

8: Ogura I, Kaneda T, Mori S, Sakayanagi M, Kato M. Magnetic resonance characteristics of temporomandibular joint disk displacement in elderly patients. *Dentomaxillofacial Radiology*: 2012. 41; 122-125

9: Nakada H, Suzuki S, Sakae T, Tanimoto Y, Kuboyama N, Teranishi M, kato T, Watanabe T, Kimura-Suda H, LeGeros Z R, and Kawai Y. Quantitative and Qualitative Analyses of Low-mineral-diet Ovariectomised Rat Femora Using microscopical Computed Tomography. *Journal*

of Hard Tissue Biology • 20(2)2011. 107-114

学会発表・講演

1: HUPO 10th Annual World Congress and 5th EuPA Annual Scientific Meeting

平成23年9月4-7日(Geneva Palexpo、スイスジュネーブ市)

Honda K, Yamamoto S, Tsuda H, Huang W, Chen W, Yamada T.

Therapeutic target discovery for advanced stage ovarian cancer using proteome-scale antibody screening and quantitative virtual immunofluorescence microscopy

2: 第70回日本癌学会学術総会

平成23年10月5日(名古屋国際会議場、名古屋市)

Yamada T, Honda K, Masuda M, Shitashige M, Ono M.

Identifying new therapeutic targets for personalized medicine.

3: 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

平成23年11月7日(神戸大学大学院医学研究科、神戸市)

本田一文

治療戦略決定のための個別化バイオマーカー開発

4: 第30回 日本口腔腫瘍学会 シンポジウム「口腔がんの浸潤:マクロ・ミクロ・モレキュラー」

平成24年1月26日(埼玉県大宮市 大宮ソニックシティ)

本田一文

「がん浸潤転移のメカニズム-アクチニン 4 によるがん浸潤転移に着目して-」

5:Kaneda T, Mori S, Sekiya K, Sakai O, Curtin HD. Benign and malignant tumors in the maxilla and mandible: Imaging features and prognostic implications.

The 18th International congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology, 2011, May 25-29, Hiroshima, Japan

6:Sekiya K, Sekiya K, Mori S, Sakayanagi M, Kato M, Kaneda T, Suemitsu M, Yamamoto H. A study of the characteristic findings of periapical cyst on panoramic radiograph.

The 18th International congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology, 2011, May 25-29, Hiroshima, Japan

7:Mori S, Hara T, Kaneda T, Katsumata A, Fujita H.

The development of image processing for detection of maxillary sinusitis on panoramic radiographs.

The 18th International congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology, 2011, May 25-29, Hiroshima, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1) US 出願番号:US 2012/0058204

Kazufumi Honda, et al., Sep. 7, 2011.

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)

分担研究報告書

血清・血漿検体収集・管理

研究分担者 井上 真奈美

独立行政法人 国立がん研究センターがん予防・検診研究センター 予防研究部 室長

研究要旨

大規模コホート研究の生体試料を用いた膵がんコホート内症例対照研究を実施するために、多目的コホート研究におけるコホート内症例対照研究データセットを確定させた。具体的には、本研究に関する施設内倫理審査委員会の承認を受け、それまでの追跡データを固定させたデータセットを構築、そのデータセットを用いて、膵がん症例群と性、年齢、検体採取時の空腹時間等で1対2マッチした対照群を抽出した。結果として、症例170例、対照340例を抽出し、本研究に用いる膵がんコホート内症例対照研究データセットを作成した。

研究協力者

岩崎 基(国立がん研究センターがん予防・検診研究センター・室長)

津金 昌一郎(国立がん研究センターがん予防・検診研究センター・部長)

A. 研究目的

大規模コホート研究の生体試料を用いた膵がんコホート内症例対照研究を実施するために、多目的コホート研究におけるコホート内症例対照研究データセットを作成する。

B. 研究方法

まず、本研究に関する施設内倫理審査委員会の承認を受けた。その後、2009年12末日までの追跡データを固定させた膵がん症例対照群抽出用データセット(ベースライン時に血液試料の提供を受けている約

4万人)を作成した。そのデータセットを用いて、膵がん発症群と、性、年齢、検体採取時の空腹時間等でマッチした、各症例診断時に膵がんに罹患していない対照群を1対2の比で抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究に関係する各研究集団の取り扱いについては関連倫理指針を遵守する。多目的コホートにおいて収集された既収集試料等を用いて、多層的オミックス技術の活用によるがん予防など健康持続のための包括的研究を実施するため、その研究計画について、多目的コホート研究におけるゲノム試料(ゲノム倫理指針における研究実施前B群及びC群試料等の利用)として、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請し、承認を受けた(承認:2011年8月25日・研究許可:2011年8月30日)。

C. 研究結果・考察

症例 170 例、対照 340 例を抽出し、本研究に用いる
膵がんコホート内症例対照研究データセットを作成し
た。このデータセットを基にして、プロテオーム等のオ
ミックス関連分析及び生体指標の測定を進め、大規
模コホート集団における、各マーカーの有効性を検
討する予定である。

D. 結論

本研究に用いる膵がんコホート内症例対照研究デ

ータセット(膵がん症例 170 例、対照 340 例)を作成し
た。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)

分担研究報告書

膵がんバイオマーカーの定量質量分析

研究分担者 寺崎哲也 東北大学大学院薬学研究科 教授

大槻純男 熊本大学大学院生命科学研究部 教授

(前)東北大学大学院薬学研究科 准教授

立川正憲 東北大学大学院薬学研究科 准教授

内田康雄 東北大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨 本研究では、定量的標的プロテオミクスの手法を用いて、本研究事業分担者らが同定したがんバイオマーカー候補タンパク質群の定量系を構築し、検体中の存在量を特異的かつ正確に定量する事によってマーカーとしての評価を行うことを目的とした。尾野博士が同定した膵がん血清マーカー候補である α -fibrinogen のヒドロキシル修飾体について簡便な前処理法を確立し、Ultra-high-Performance Liquid Chromatography (UPLC)を用いることで、迅速にかつ修飾体と非修飾体を同時に定量する方法を確立した。膵臓癌患者検体 70 例および健常者検体 27 例の血清を定量した結果、健常者と早期膵臓癌間での修飾体タンパク量に有意差が認められた。さらに、CA19-9 陰性早期患者 8 例のうち、6 例は修飾体 α -fibrinogen が陽性であった。以上の結果から、 α -fibrinogen のヒドロキシル修飾体と非修飾体を区別して定量することは、膵臓癌の早期診断に有用であることが示された。さらに、本田博士らが同定した膵がん血清マーカー候補 24 分子について定量用ペプチドの設計を完了した。

A. 研究目的

オミクス解析で同定されたバイオマーカー候補タンパク質の検証は、特異的抗体の有無に依存し、さらに、ハイスループットな多分子検証は不可能であった。我々が開発した「定量的標的プロテオミクス」の技術(Kamiie et al., *Pharm Res*25:1469-1483(2008))は、アミノ酸配列情報のみから約1か月で定量法の開発し、さらに37分子同

時定量と質量情報に基づく特異性の高い定量を実現した。そこで、本研究では、膵がん血清マーカーとして本研究事業の分担者である尾野博士が比較プロテオミクス(2DICAL)で同定した血清中の α -fibrinogen のヒドロキシル修飾体(Ono M et al., *J Biol Chem*284:29041-29049 (2009))、及び本田博士が同定した24分子について独自タンパク質量技術を用いて定量法を確立し、検体中の存在量と特異的かつ正確に定量する事によってマーカーと

しての評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、マーカー候補分子のアミノ酸配列から独自の選択基準を用いて質量分析を用いたタンパク質定量に適したトリプシン消化ペプチドを選択した。選択した定量ペプチドについて安定同位体標識及び非標識ペプチドを化学合成し、ペプチド溶液濃度をアミノ酸分析によって測定した。

α -fibrinogenヒドロキシル修飾体については、高速液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS)を用いて、膵臓癌患者(70例)及び健常者(27例)の血清(1 μ L以下)中 α -fibrinogenヒドロキシル修飾体(Hyp- α FG1, Hyp- α FG2))及び非修飾体(α FG1, α FG2)を定量解析した。

(倫理面への配慮)

説明文書に記載のある検体の凍結保存及び、タンパク質解析研究への活用に対し同意が得られている検体を対象として、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て解析終了後に凍結保存されている血液検体の余剰分に対し、解析を行った。血清サンプルの解析は、東北大学薬学研究科及び国立がん研究センター研究所倫理委員会の承認のもと、匿名化し、個人への人権の対策をとった上で実施した。

C. 研究結果

① 多検体定量のための、前処理法および測定時間短縮法の確立

多検体定量を行うため、サンプルに試薬を添加していくステップだけで行うことが可能な簡便な前処理法を確立した。さらに、通常のLC-MS/MS法では、1検体あたり120分かかる質量分析を、Ultra-high-Performance Liquid Chromatography (UPLC)を用いることで、1測定を28分に短縮することに成功した。

② 血清中 α -fibrinogenヒドロキシル修飾体及び

非修飾体の定量解析

①で確立した方法を用いて α -fibrinogenヒドロキシル修飾体および非修飾体の膵臓癌検体70例および健常者検体27例の定量解析を行った。健常者とStage IBの早期膵臓癌の血清中修飾体タンパク量には有意差が認められ、またStageI及びIIの早期患者に限れば、既存の膵臓癌マーカーCA19-9で診断できなかった8例のうち、6例は α -fibrinogenで診断可能であった。

③ 膵がん血清バイオマーカーの同時定量法確立
24種の血清バイオマーカー候補分子に対して定量標的ペプチドを設計し、安定同位体標識ペプチド及び非標識ペプチドの合成を行った。アミノ酸分析によってペプチド溶液の濃度を決定し、質量分析の最適化を行った。

D. 考察

本研究によって、タンパク質の翻訳後修飾体を非標識体と区別して、少量の血清から同時にかつ特異的に測定することが可能となり、今後の質量分析装置を用いた臨床診断への基盤を築いたといえる。 α -Fibrinogenを他のがんマーカータンパク質やマーカーとして期待できる複数のタンパク質を同時に組み合わせて測定することによって、より正確に膵臓癌を診断できる可能性がある。また、本研究で用いた質量分析による定量的標的プロテオミクスはオミクス解析で同定した候補分子の評価に非常に有用な系である事が明らかとなった。

E. 結論

質量分析装置を用いて、血清中の α -fibrinogenのヒドロキシル修飾体の絶対濃度を高感度・高精度・迅速に定量する方法を開発し、膵臓癌早期診断マーカーとしての有用性を定量的に明らかとした。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 寺崎哲也、内田康雄、立川正憲、大槻純男、輸送担体・酵素の測定と薬物動態研究への応用、シンポジウムセッション:医薬品開発におけるプロテオミクスの応用:ターゲット探索から修飾解析まで、第15回薬物動態談話会セミナー、2011年8月24-26日、大阪
2. 大槻純男:定量的プロテオミクス(MRM法)によるターゲット探索から創薬研究応用まで、第15回薬物動態談話会セミナー、2011年8月24-26日、大阪
3. 寺崎哲也、質量分析システムを用いたバイオマ

ーカー評価と臨床応用、Luncheon Seminar, 第26回 日本薬物動態学会年会、2011年11月16-18日、広島

4. 大槻純男:定量的標的プロテオミクスによるファーマコプロテオミクスへの展開、三井情報バイオサイエンスセミナー、2011年11月28日、東京
5. 大槻純男:定量的プロテオミクスを分子生物学のツールとして使うための限界と工夫、ABSCIEXタンパク質定量セミナー、2012年2月9日、大阪
6. 大槻純男:定量的プロテオミクスを分子生物学のツールとして使うための限界と工夫、ABSCIEXタンパク質定量セミナー、2012年2月15日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）
（分担）研究報告書

膵臓がん患者における血清メタボローム解析

研究分担者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学分野・准教授

研究要旨 本分担研究では、膵臓がん患者における血清メタボローム解析を行い、感度の高い早期発見可能なバイオマーカーを探索する。

A. 研究目的

本分担研究では、膵臓がん患者、ならびに、健常人の血清代謝物を、質量分析計を用いて分析し、膵臓がんに対する新規バイオマーカーの発見を目的とした。

B. 研究方法

神戸大学医学部附属病院、あるいは、関連病院にて、膵臓がん患者と健常人の血清を収集した。血清からメタノール・クロロホルムを用いて水溶性代謝物を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボローム解析を実施した。

（倫理面への配慮）

血清収集の際には、文書によるインフォームド・コンセントを行い、承諾を得た。

C. 研究結果

膵臓がん患者血清（20例）、ならびに、健常人血清（19例）中に存在する水溶性代謝物を網羅的に解析した結果、乳酸や2-ヒドロキシ酪酸などが、膵臓がん患者群で、健常人群と比較し有意に上昇することが明らかとなった。本研究では、膵臓がん患者血清や健常人血清の収集も行っており、平成23年度末時点で、膵臓がん患者血清は約80例、健常人血清は約200例の収集が完了した。

D. 考察

血清メタボローム解析の結果、膵臓がんの発症により、様々な代謝物の変動することが明らかとな

った。早期の膵臓がん患者においても、いくつかの代謝物が有意に変動したことから、がん細胞から代謝物が分泌されているのではなく、膵臓がんが生体に存在するという状態が血清中代謝物プロファイルを変動させたと考えられる。

E. 結論

今後、さらに症例数を増やすとともに、水溶性代謝物のみならず、脂溶性代謝物を分析することで、メタボローム解析による早期発見可能な新規診断法の確立を期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

小林 隆ら、血清メタボロミクスを用いた新規膵臓がん診断法. 第6回メタボロミクスシンポジウム. 10月, 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）
（分担）研究報告書

水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン α の測定キット開発に関する研究

研究分担者： 宮本 顕友 株式会社トランスジェニック

品川 真吾 同上

研究要旨

フィブリノーゲン α タンパク質およびポリペプチドに対する抗体作製（研究分担者品川）で得られた抗体を用い、臨床検体中の当該物質が測定可能な診断キットを作製した。具体的には、捕捉抗体としてヒトフィブリノーゲン α を認識する抗体、検出用抗体としてヒトフィブリノーゲン α の水酸化プロリン修飾部位を認識する抗体を用いて、サンドイッチ ELISA 測定系を構築した。

A. 研究目的

ヒト水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン α [HP-FGA]を測定するキットの作製

B. 研究方法

ヒト水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン α に特異的な診断キットの作製

(1) 補足抗体および検出抗体の設定

樹立したヒトフィブリノーゲン α を認識する抗体 (5B7)、およびヒトフィブリノーゲン α の水酸化プロリン修飾部位を認識する抗体(11A5)を用いて、精製 HP-FGA フラクシオンを ELISA 法で測定した。具体的には、固相化または検出抗体として上記抗体2種を用い、精製 HP-FGA の濃度依存的にシグナルが検出され、バックグラウンドが低い組み合わせをサンドイッチ ELISA 法により決定した。

(2) 検出限界の設定

前項の方法で設定した抗体組み合わせを用いてサンドイッチ ELISA を行い、精製 HP-FGA の検出限界を決定した。具体的には、段階希釈した精製 HP-FGA フラクシオンを検出して標準曲線を作成し、検出限界を検討した。

(3) 臨床血漿検体の測定

前項の方法で構築した HP-FGA 測定 ELISA キットを用い、ヒト臨床血漿検体を測定した。測定した 1006 検体には、膵がんのほか、多様な悪性腫瘍・急性炎症の罹患者の血漿が含まれる。[分担研究報告:プロテオーム解析(尾野)の項を参照]

(倫理面への配慮)

臨床血漿検体の収集に係わる対象者へのインフォームド・コンセントおよび個人情報の取り扱いは、検体の保有機関である国立がん研究センター内で厳格に実施・管理された。

また、検体測定後の各種疾患情報を含めた統計処理は、当センターに所属する分担研究者により行われた。よって、当該検体の測定において倫理面での問題はないと判断した。

C. 研究結果

(1) 補足抗体および検出抗体の設定

検討の結果、捕捉(固相化)抗体に 5B7、検出抗体に 11A5 を設定することで、最も良好な検出感度が得られた。

(2) 検出限界の設定

検討の結果、精製 HP-FGA フラクシオンを用いて標準曲線[図 1]を作成した。