

例、前立腺炎患者血漿 6 例、前立腺肥大症患者 22 例、腎癌患者 20 例で測定し、CAI の血中濃度が他の疾患に比べ、前立腺癌患者で有意に上昇していることが示された。特に PSA 濃度が 4-10 ng/ml を示すグレーゾーンの前立腺癌患者で CAI の血中濃度は上昇しており、PSA との組み合わせによる前立腺癌診断能の向上に役立つ可能性が示唆された。また、10 例の前立腺癌原発巣の CAI の発現を免疫染色により検討したところ、CAI 血中濃度が高い患者において組織での免疫染色の強度が強い傾向にあることが認められた。本結果は英文論文にまとめ学術雑誌に掲載した。

C-2. 肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの開発

肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織でリン酸化ペプチドの量を比較すると、173 リン酸化ペプチドが肝細胞癌で 2 倍以上の量的高値を示し、非癌肝組織では 145 リン酸化ペプチドが 2 倍以上の量的高値を示した。量的変動示した 145 リン酸化ペプチドが由来するタンパク質の生物学的な働きを Gene Ontology terms (Biological Process) に従って分類すると、癌で高値を示したタンパク質は核酸転写、mRNA スプライシング、アポトーシス、細胞分裂が認められたのに対し、非癌部肝組織で高値を示したものは糖代謝、薬物代謝、反応にかかわるものが認められ、この結果は癌組織と正常肝組織から予想される細胞機能を正確に反映していると推察された (表 1)。また、肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織間で変化の見られたリン酸化ペプチドの中にはこれまでに報告されたことのないものも存在した。

C-3. 2DICAL のバージョンアップ

バージョンアップした 2DICAL で肝細胞癌組織 54 例、同一症例非癌部肝組織 52 例のデータを解析したところ、同定されたリン酸化ペプチド数が 718 ペプチドから 2,390 ペプチドまで増加した。

D. 考察

2DICAL で血漿前立腺癌バイオマーカーと

して Carbonic Anhydrase I を探索し、多数検体を用いて Carbonic Anhydrase I が前立腺癌患者血漿で上昇していることが検証され。特に PSA 濃度が 4-10 ng/ml を示すグレーゾーンの前立腺癌患者で CAI の血中濃度は上昇しており、PSA との組み合わせによる前立腺癌診断能の向上に役立つ可能性が示唆されたので、論文としてまとめ学術雑誌の掲載に至ることができた。

昨年から開始した肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発は、これまでの血液からの解析と異なり組織からのプロテオーム解析であったが、癌組織と正常肝組織の比較で得られた結果は予想される細胞機能を正確に反映したものであった。本年度は、この組織を利用しリン酸化に特化した解析を、症例数を増やして行ったが、癌組織と正常肝組織間で差のあるリン酸化ペプチドにおおいても予想される細胞機能を正確に反映したものであった。さらに、肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織間で変化の見られたリン酸化ペプチドの中にはこれまでに報告されたことのないものも存在しており、これらのリン酸化ペプチドは肝臓がんのバイオマーカー候補となるだけでなく、肝臓がんの治療標的となる可能性も示唆された。

バージョンアップした 2DICAL は近年急速に発達した質量分析計の想定能力に対応して、同定されたペプチドフラグメントをすべて取り込むことに成功した。しかし、各ピークの定量性に関しては旧来のシステムが勝っており、さらなる改良の余地が認められている。

E. 結論

2DICAL を用いた血漿バイオマーカーの探索、および、多数検体での検証に成功し、本事業での研究成果を上げることができた。本事業のなかで組織からのバイオマーカーの探索法を新しく開発することができ、また、微量タンパク質であるリン酸化ペプチドを用いたバイオマーカー探索も可能にすることができた。その過程で、2DICAL のバージョンアップも行なわれ、今後、微量タンパク質の解析がさらに進

んでいくものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Yokomizo, A., Takakura, M., Kanai, Y., Sakuma, T., Matsubara, J., Honda, K., Naito, S., Yamada, T. & Ono, M. Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Biomark.* **10**, 175-83 (2012).
2. Miyamoto, T., Kitamura, N., Ono, M., Nakamura, Y., Yoshida, M., Kamino, H., Murai, R., Yamada, T. & Arakawa, H. Identification of 14-3-3 gamma as a MIEAP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Sci. Rep.* **2**, 379 (2012).
3. Ono, M., Kamita, M., Murakoshi, Y., Matsubara, J., Honda, K., Miho, B., Sakuma, T., Yamada, T. Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL: 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Int. J. Proteomics* **2012**, Article ID 897412 (2012).
4. 尾野雅哉、紙田正博、松原淳一、村越雄介、山田哲司. プロテオミクス解析システム2DICALを用いたがんバイオマーカー開発. *細胞* **44**, 46-9 (2012).
5. Fukawa, T., Ono, M., Matsuo, T., Uehara, H., Miki, T., Nakamura, Y., Kanayama, H. & Katagiri, T. DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas. *Cancer Res.* **72**, 5867-77 (2012).
6. Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Imada, K., Oda, Y., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S. & Ono, M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol.* **2012**, Article ID 768190 (2012).
7. 尾野雅哉, 紙田正博, 松原淳一 山田哲司: プロテオーム解析によるがん診断と治療への道. *分子消化器病* **9**, 71-6 (2012).
8. Nakano, T., Matsushima-Hibiya, Y., Yamamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Fukuda, H., Ono, M., Takamura-Enya, T., Kinashi, H. & Totsuka, Y. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon.* **63**, 55-63 (2013).
9. Honda, K., Ono, M., Shitashige, M., Masuda, M., Kamita, M., Miura, N. & Yamada, T. Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **43**, 103-9 (2013).
10. Yoneyama, T., Ohtsuki, S., Ono, M., Ohmine, K., Uchida, Y., Yamada, T., Tachikawa, M. & Terasaki, T. Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J. Proteome Res.* **12**, 753-62 (2013).

G-2. 著書・総説

1. 尾野雅哉, 松原淳一, 山田哲司: 血漿を用いた膵癌早期マーカー探索, 中村和行, 西

尾和人, 西村俊秀編, 臨床プロテオミクス
バイオマーカー探索から個別化医療へ, 東
京, 金原出版, pp338-340, 2012

G-3. 学会発表

1. Sakuma T, Ono M, Kuwabara H, Banno M, Kamita M, Yamada T: Wonder 3: A new computer algorithm for modified protein identification utilizing MS3 multi-tandem mass spectrum. 60th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics 平成 24 年 5 月 22 日 (Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada)
2. 紙田正博, きょう建生, 酒井義人, 伊藤研悠, 渡邊 研, 原田 敦, 新飯田俊平, 山田哲司, 尾野雅哉: 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 2012 年大会 平成 24 年 7 月 27 日 (日本科学未来館、東京都)
3. Kamita M, Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M: A New Diagnostic Biomarker for Prostate Cancer Patients Detected by 2DICAL. HUPO2012 11th Annual World Congress 平成 24 年 9 月 9 日 (Hynes Convention Center, Boston, USA)
4. 高倉美智子, 横溝 晃, 紙田正博, 宮永晃彦, 渡邊隆文, 鄭 基晩, 山田哲司, 内藤誠二, 尾野雅哉: PSA グレーゾーン値前立腺癌患者の新規診断マーカー 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 21 日 (ホテルロイトン札幌、札幌市)
5. 尾野雅哉: プロテオームのがん診断と治療への応用. 生命医薬情報学連合大会 平成 24 年 10 月 17 日 (タワーホール船堀、東京都)
6. きょう建生, 紙田正博, 東 祥子, 伊藤研

悠, 酒井義人, 五十嵐文子, 渡邊 研、山田哲司, 尾野雅哉, 原田 敦, 新飯田俊平: プロテオミクスを基盤とした脊柱管狭窄症肥厚靱帯のタンパク質局在. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 平成 23 年 10 月 26 日 (名古屋国際会議場、名古屋市)

7. Ono M, Kamita M, Yamada T: A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL. 9th AACR-JCA Joint Conferences 平成 25 年 2 月 22 日 (Hyatt Regency Maui, Maui, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 発明の名称: Novel tumor marker for pancreatic cancer
発明者: 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許番号: 第 EP2182061 号 (欧州)
特許日: 2012 年 10 月 12 日
 - 2) 発明の名称: 液体クロマトグラフィーのデータ補正方法
発明者: 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日: 2012 年 11 月 2 日
特許番号: 第 5119405 号
 - 3) 発明の名称: 修飾 α フィブリノゲンタンパク質またはその免疫原性断片
発明者: 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日: 2012 年 11 月 30 日
特許番号: 第 5140809 号
2. 実用新案登録
なし。
2. その他
なし。

I. 研究協力者

増田 万里 (国立がん研究センター 創薬臨床研究分野)

図 1 2DICAL のバージョンアップ

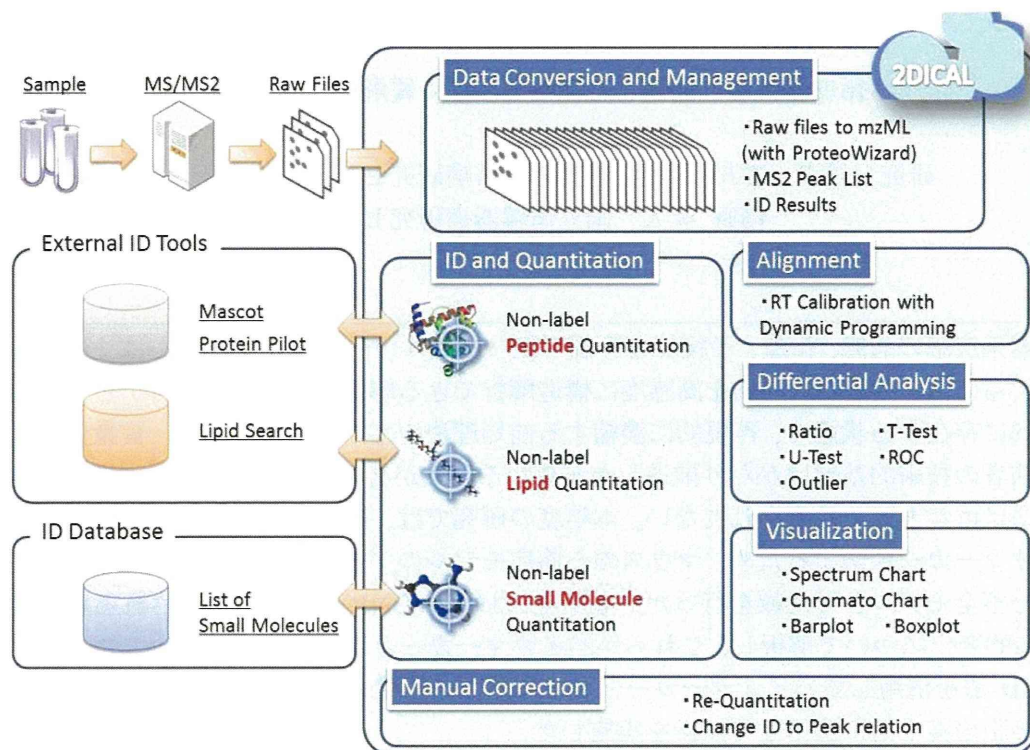


表 1 肝がんリン酸化たんぱく質の分類

肝がんで増加している リン酸化ペプチド		非がん肝組織で増加している リン酸化ペプチド	
GO Description	Count	GO Description	Count
transcription, DNA-dependent	11	small molecule metabolic process	10
regulation of transcription, DNA-dependent	7	transcription, DNA-dependent	7
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	6	regulation of transcription, DNA-dependent	5
nuclear mRNA splicing, via spliceosome	5	glucose metabolic process	5
apoptotic process	4	xenobiotic metabolic process	4
mitosis	4	response to drug	3
nerve growth factor receptor signaling pathway	3	response to organic cyclic compound	3
cell division	3	signal transduction	3
rRNA processing	3	transmembrane transport	3
cell differentiation	3	virus-host interaction	3
positive regulation of transcription, DNA-dependent	3	interferon-gamma-mediated signaling pathway	3
negative regulation of cell proliferation	3	glycogen catabolic process	3
response to unfolded protein	3		
regulation of translational initiation	3		

循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 寒川 賢治 国立循環器病研究センター研究所 所長
南野 直人 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨

循環器系疾患の病態、治療、予後等を評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するには、微量の対象物を高感度に構造解析できる解析系と、対象試料からの標的物質群を生体内に存在する状態で、再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計の進歩により前者の技術的基盤はかなり前進したが更なる改良が必要であり、後者を可能とする有効な前処理法は依然として確立されていない。本年度の研究では、循環器系の最重要疾患である心不全のバイオマーカー探索するため、マウスの心筋症モデルのプロテオーム解析を実施し、イヌ機械的刺激心不全モデルとの比較を行った。心不全におけるBNP研究から推定される糖鎖構造の量的、構造的変化について解析し、これらがバイオマーカーとなる可能性を見出した。また、ETD法とCID法を併用してバイオマーカーとして有望な分子量の大きいペプチド解析法をさらに拡充し、細胞培養上清に適用して解析を実施した。

A. 研究目的

ゲノム遺伝子配列の決定に続き、生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝物などの実験的解析（プロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析）に基づくファクトデータベース構築が大きな目標となっている。細胞や組織が産生し、血液、尿などに多量で存在するたんぱく質、ペプチド、代謝物などを包括的に解析、利用できれば、医薬品や診断法の開発などの各種目的に利用可能な物質を探索、発見する上で極めて有用な情報源となるからである。また、正確な臨床情報を伴った血液、尿などの体液、組織や細胞試料のプロテオーム、ペプチドーム解析を疾患発症から追跡、実施できれば、有用なバイオマーカーを発見でき、病因、病態、治療、予後などの診断、医薬品の開発、評価が可能と期待される。しかし、生体内に存在するたんぱく質、ペプチドは極めて多様な性質を示す物質の混合物であると共に、濃度差が極めて大きいことが解析上の障害となり、ゲノムやトランスクリプトーム解析のような全ゲ

ノムに亘る均一な解析が実施できていない。特に微量たんぱく質やペプチドを生体内の状態で取り出し解析することや、翻訳後修飾を受けた微量たんぱく質の正確な構造情報を得ることは、依然として極めて困難である。本研究では、これまで培ってきた前処理法、解析技術を改良し、循環器疾患患者の細胞、組織、血液などに含まれる微量たんぱく質やペプチドの定量比較、修飾などの構造変化を解析可能とする研究技術を開発して、心不全などの心疾患などの病因、病態、予後などの診断・評価や、これらの疾患の治療や医薬品の効果判定に使用可能なバイオマーカーの発見を目指す。

本年度の研究では、心不全のバイオマーカー探索のため、昨年度のイヌ機械的刺激心不全モデルに続いてマウス心筋症モデルのプロテオーム解析を実施し、それらの比較を行った。心不全における新しいバイオマーカーとして、BNP研究から推定された糖鎖構造の量的、構造的変化についてレクチンアレイ等の手法で解析し、その可能性を検討した。昨年

度より継続している electron transfer dissociation (ETD) 法と collision-induced dissociation (CID) 法を併用した高分子量ペプチド構造解析法について、細胞培養由来の分泌ペプチドを対象に解析を実施しつつ、より高度な構造解析が可能となるように改良を進めた。

B. 研究方法

B-1. マウス心筋症モデルのプロテオーム解析

4C30 マウスは、医薬基盤研究所より提供を受けて、当センター分子生理部と共同で実施した。オスの 12、16、24 週令の 4C30 マウス、及び同週令の野生型マウス各 4 匹から、心臓、血管、血液などを採取した。心臓は秤量後、左心室組織を分離、分割し、液体窒素で凍結保存した。組織収集直前に心エコー検査を行ない (24 週令、EF=13% (4C30) vs. 59%(wt))、組織重量と合わせて心不全の発症、進行を確認した。組織 (約 10 mg) を凍結状態で粉砕化し、加熱処理でタンパク質を変性後、尾野らの開発した 2DICAL 法の手法に従い、デオキシコール酸 (SDC) 在下で Lys-C ペプチダーゼで 3 時間、トリプシンで 20 時間の消化を行った。SDC 除去後、Stage-tip により脱塩濃縮し、ナノ流速液体クロマトグラフィー (nano LC) にて分離、Triple TOF5600 で質量分析を行い、2DICAL ソフトウェアにより非標識の定量プロテオーム解析を実施した。

B-2. 心不全の発症・重症化と組織における糖付加との関連解析

心不全モデルとしては、Dahl salt-sensitive (SS) rat を使用した。6 週令のオスラットに 8%の高張食塩水(HS 群)、あるいは 0.3%の低張食塩水を 6 週から 10 週間投与し、血圧上昇により不全を発症させ、12 週令、16 週令で組織、血液を採取した。血圧、心エコー、心重量、肺重量、ANP、BNP などの遺伝子発現量やペプチド量にて心不全の発症、進行の評価を行った。ヒト心不全

症例のデータベース情報など基準に、関連が推定される N-glycan、O-glycan、O-GlcNAc の合成、付加に関わる遺伝子の発現量を、左心室組織を用いて qPCR 法で測定した。一部酵素については、ELISA 法でタンパク質の変動を確認した。レクチンアレイにて、Dahl SS rat の左心室抽出物中のタンパク質に含まれる糖鎖構造の全体的な変化を評価した。有意な糖鎖構造の変動に関わると推定される酵素の代表例については、qPCR 法や Western blot 法にて変動の有無を確認した。

B-3. 培養細胞株上清中の大分子量ペプチドの解析

組織抽出物、血液のみならず、培養細胞株の上清においても低分子量ペプチド (<5KDa) は少なく、高分子量側へ移行するにつれてペプチド量は増加し、高分子量ペプチドは一次切断部位を記録することが多いことを、これまでの研究により確認している。そのため、バイオマーカーになりうる高分子量ペプチドの配列や構造の決定は重要な課題であるが、分子量が 5 KDa を超えるペプチドの配列や構造の決定は困難である。そこで、分子量が 5 KDa を超えるペプチドを多量に含むヒト由来培養細胞株の上清を解析対象とし、昨年度に引き続き高分解能・高精度の質量分析計を用いてペプチド構造解析の検討を行い、従来法である CID 法と新しい ETD 法を比較しつつ効率的な構造決定法、同定法について検討を進めた。試料は、nano LC で分離し、Orbitrap-ETD 質量分析計で測定し、データ解析は Mascot 検索ソフトウェアを用い、すべてのデータについて実験者が実スペクトルの確認をおこなった。

(倫理面への配慮) 動物実験については、当センター動物実験委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

C-1. マウス心筋症モデルのプロテオーム解析

24 週令の 4C30 マウスにおいては、心筋症発症後の時間経過に従い重度な心不全状態にあることを確認した。同定タンパクの内、有意な上昇及び減少を示したタンパク質はそれぞれ 186、145 であった。線維化の亢進を示すペリオスチンをはじめとする細胞外マトリックス、細胞膜裏打ち構造や中間系フィラメントタンパク質、ER ストレス関連タンパク質、ヘパラン硫酸タンパク質等の上昇が認められた。一方、減少タンパク質の変動がより顕著であり、特にエネルギー代謝に関わる解糖系、TCA 回路では、Hexokinase-1 以外の多くの酵素が大きく減少していた。心筋の主要エネルギー源である β 酸化経路においても、主要酵素群の減少は非常に明確であった。また、筋収縮に関わるタンパク質やその制御に関わるカルシウム制御タンパク質にも減少が認められた。しかし、イヌ機械的刺激心不全モデルと共通した増加及び減少タンパク質はそれぞれ 44、18 と限定的であった。

C-2. 心不全の発症・重症化と組織における糖付加との関連解析

心不全モデルとして、12 週令(発症期)および 16 週令(確立期)の時点での HS 群、LS 群の比較を行った。各群における血圧、心エコー、心重量、肺重量の測定結果は、心不全の発症、確立を明確に示した。左心室組織において、心不全を発症する HS 群では著しい ANP の遺伝子発現、ペプチド量の上昇が認められ、BNP、MMP2 も有意に上昇し、その上昇率は遺伝子により 12 週と 16 週で異なっていた。同時に、GALNT 類をはじめとする O-glycan 合成酵素系の上昇が認められ、2 種については 12 週→16 週、LS→HS 群での上昇を ELISA 法で確認した。レクチンアレイでは、ハイマンノース型 N-glycan の減少、コアフコースの減少、シアル酸の減少などが認められた。この結果も踏まえてタンパク質を選択し、再度 qPCR 法や Western blot 法にて発現量を測定した結果、O-glycan 合成酵素系を中心に 5 種の酵素において 12 週

→16 週、LS→HS 群で有意な増加を示すことが確認できた。

C-3. 培養細胞株上清中の大分子量ペプチドの解析

神経内分泌細胞株培養上清のペプチド画分を分泌ペプチドーム解析の手法により回収し、ゲルろ過法により分離した画分を順次解析にした。タンデム質量分析に関わる様々なパラメータの最適化した結果、価数で 14 価にまでの範囲で解析が実施可能で、分子量 15,000 Da のペプチドまで同定でき、CID 法、ETD 法により同定できたペプチド数は、約 800 と約 570 (重複なし)であった。両開裂法での重複同定ペプチド数は約 400 であり、両法の併用により同定ペプチド総数は 1000 近くに達し、半数以上が分子量 3000 Da 以上であった。同定数では CID 法が勝ったが、ETD 法では、配列全体にわたりペプチド鎖の開裂がおきる結果、リン酸化修飾を受ける残基が明確に同定された。しかし、ETD 法では、質量電荷比が 1000 を超える分子の開裂の効率が低下する点が CID 法との顕著な違いとして観察された。また、高分子量ペプチドの配列決定について、従来よりも 3-10 倍程度の高感度化を達成した。

D. 考察

4C30 マウス心筋症モデルのプロテオーム解析の結果より、解糖系・TCA 回路だけではなく β 酸化経路においてもほとんどの酵素が減少しており、エネルギー代謝が非常に低下した状態にあった。この結果は、別途行ったハムスター心筋症モデルの代謝変化と非常に類似しており、代謝系酵素群の発現低下が極めて顕著であるため、この現象が単なる結果ではなく、病態の発症や基礎代謝変化を誘導する可能性も示唆された。また、ミトコンドリア酵素系の変化より、酸化ストレスの増大も推定される。線維化に関わる細胞外マトリックス、細胞裏打ち構造、筋収縮関連のタンパク質の変化も認められるが、上記の代謝系タンパク質の変化より軽度であった。イ

又機械的刺激心不全モデルとの共通性が少ない点は、発症原因や時間経過によると推定される。一方、代謝系酵素群に変化が大きい点は、がん細胞で報告されているエピゲノム変化に基づく遺伝子発現変動による代謝経路の変化を推察させるもので、今後、循環器系、特に心臓においては、発症・増悪機序として検討が必要と考えられる。上記の代謝系酵素群の変化を血中測定することは難しいが、産生される代謝物濃度をバイオマーカーとする可能性については検討の余地があると考えられる。

Dahl SS rat を使用した心不全モデルにおいて、心不全の発症、進行に伴い ANP や BNP 発現量が増加し、それとほぼ並行してハイマンノース型 N-glycan、シアル酸などの減少、O-glycan 合成酵素系の発現増加が認められた。これらの結果より、心不全の発症・重症化に伴う BNP の分子型の変動、つまり proBNP への O-glycan 付加の増加、それに伴う活性型 BNP-32 分子への変換阻害が、心不全状態の心室組織で起こる一般的現象である可能性が支持され、当初の推論が正しいことが明らかとなった。この事実は、BNP においては、組織あるいは血中の O-glycan 付加 proBNP の測定、あるいは proBNP/BNP-32 比の測定がより詳細な心不全病態評価を可能とする可能性があることを示すと共に、心不全の発症により糖鎖合成酵素系や脱離酵素系に変動が起こりタンパク質の糖鎖修飾が変化、変動するため、糖鎖修飾の変動を標的とした新たな心不全マーカーの開発が可能であることを示唆すると考えられる。

CID 法で同定できないペプチドの存在は従来より懸案となっており、ETD 法が CID 法の弱点を相補しうる技術として有望であることが示された。また、ETD 法はリン酸化、硫酸化、糖鎖付加、ヒドロキシル化をはじめとする修飾構造の決定にも有用であり、これらの構造にも基づくバイオマーカー探索へも大きく道を拓くものである。しかし、

分子量 7,000 を超えるペプチドの翻訳後修飾残基の確実な同定には依然として課題が残り、ハードウェア面を含めて ETD 法のさらなる改良が必要である。なお、高分子量ペプチドの同定ペプチド総数は約 1,000 に達したが、質量分析の論文では最も網羅性のあるデータとなっている（発表論文参照）。

これらの成果を有効に組み合わせ、心不全をはじめとする循環器疾患で、微量タンパク質やペプチド、リン酸化や糖鎖修飾の変動を基盤とした新しいバイオマーカー探索が可能となると考えられる。

E. 結論

マウス心筋症モデルの左心組織のプロテオーム解析より、解糖系、 β 酸化系などのエネルギー代謝系酵素群の顕著な減少が明確となった。これらのタンパク質の現象は、収縮機能やカルシウム制御系の減少と共に又機械的刺激心不全モデルと共通するが、ハムスターの心筋症モデルとより強く相関し、細胞内濃度も高いため、バイオマーカーとして利用できる可能性もある。更にこのような著しい代謝系酵素群の減少は、発症や病態形成の基盤となる可能性も示唆するものである。心不全患者血中の BNP の糖鎖付加に基づく分子型変動から研究を開始した、心不全における糖鎖構造の変化と合成、付加酵素の変動においても、これらがかなりの普遍性を持つ病態変動であることが確認され、今後の重要な研究領域であると考えられる。これまでのペプチドーム解析結果より、高分子量ペプチドが全ペプチドームの主体であり、生成時の一次切断部位情報などを保持する割合が高いことが示されていたが、従来の解析技術では研究の対象外であった。新しい ETD 法などの開裂法の導入、14 価までの多価イオン解析などにより、高分子量ペプチドや低分子量たんぱく質の同定効率を大きく向上をさせることができた。その結果、最大で分子量 15,000Da までのペプチドが同定可能となり、かつ複数のリン酸化やヒドロキシル化

等の修飾ペプチドについても、その修飾構造と修飾部位を高い確率で決定可能となった。プロテオームによる分解を抑制した試料調製系と組み合わせることにより、前駆体たんぱく質からペプチドへ変換される際の切断部位、疾患による特異的な切断部位、酵素の活性化部位などの同定に応用可能であり、ペプチドや切断部位を起点とするバイオマーカー同定上、大きな利用価値があると考えられる。これらの技術や情報を有効に組み合わせることにより、バイオマーカー探索研究を推進できると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Sasaki, K., Osaki, T. & Minamino, N. Large-scale identification of endogenous secretory peptides using electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 700-9 (2013).
2. Nishikimi, T., Okamoto, H., Nakamura, M., Ogawa, N., Horii, K., Nagata, K., Nakagawa, Y., Kinoshita, H., Yamada, C., Nakao, K., Minami, T. Kuwabara, Y., Kuwahara, K., Kangawa, K. Minamino, N. & Nakao, K. Direct immunochrominoluminescent assay for proBNP and total BNP in human plasma: proBNP and total BNP levels in healthy individuals and heart failure patients. *Plos One*, **8**, e53233 (2013).

G-2. 学会発表

1. 南野直人: ペプチドーム探索, 第9回GPCR研究会 (H24年5月, 東京)
2. K. Sasaki, Y. Ueta, N. Minamino: VGF-derived peptides identified by mass spectrometry and their functions.

International Symposium: Frontiers in Biologically Active Peptides, the 3rd Meeting of the Japan Branch of the International Neuropeptide Society (平成24年9月, 小倉)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

I. 研究協力者

朝長 毅 (医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンター)

佐々木一樹, 錦織充広, 八木寛陽 (国立循環器病研究センター研究所分子薬理部)、若林繁夫、岩田裕子 (同研究所分子生理部)、北風政史, 朝倉正紀 (同研究開発基盤センター臨床研究部)

精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究

研究分担者 高坂 新一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所長

研究要旨

本研究では精神疾患（統合失調症、気分障害など）、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）患者由来髄液の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的としている。本年度は、当初から進めてきた初期量 2ml をさらに減少させることを目的に測定法の改良を試みた。初期髄液タンパク質の濃度が低いほど同定タンパク質数が多い事実から、最適な濃度として 30 mg/dl（2 ml なのでタンパク量は 0.6 mg）を見いだした。また、初期タンパク量が多いと同定タンパク数が少ない事実は、抗体カラム IgY のみでは大量に存在する血漿タンパク質が十分除去できていないことを意味し、その事実をトランスフェリンとアルブミンで確認し、その両者を除去できる GBC スピンカラムを抗体カラムに加えることで、同定タンパク質数を増加させることに成功した。これらの改良法とさらに高感度の ABsciX で測定することで、1,000 近くのタンパク質が自動検出できることを確認した。すでに多数の高品質の髄液検体が集積している統合失調症、双極性障害、大うつ病、パーキンソン病などにおいて、この測定系を応用することで、新たな疾患バイオマーカーや創薬標的が見いだされるものと期待できる。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。

神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。

これまでの血漿と髄液を用いた cICAT 法での研究から、髄液を用いた解析では中枢神経特異的な蛋白質が多数同定されており、その有用性が明らかにできた。また臨床的に利

用可能な髄液 2ml からのプロテオーム解析技術の開発も行った。

今年度は、当初から進めてきた初期量 2ml をさらに減少させることを目的に前処理法を検討した。これにより再現性確認、他のオミックス解析などのために貴重な髄液検体をさらに有効利用することが可能になると期待できる。

B. 研究方法

B-1. 初期髄液量と同定タンパク数の検討

髄液中のたんぱく質濃度とこれまで行ってきた QSTAR による cICAT 法タンパク同定法（図 1）による同定たんぱく質数の関係を調べた。また、QSTAR 質量分析において、アルブミンの総ペプチドカウントとタンパク同定数を比較した。

B-2. タンパク同定数の高かった測定条件の検討

初期量 2 ml として、30 mg/dl（タンパク量 0.6 g）の 10 例と 60 mg/dl 以上（タンパ

ク量 1.2~2 g) の 10 例での同定タンパク数を比較した。

B-3. 抗体カラム処理後のタンパク成分の再検討と新たな処理法の導入

初期髄液タンパク量を 0.6 g にすることで同定タンパク数が増加したが、その際同定タンパク質の検討により抗体カラムで除去されるべきタンパク質が大量に残っているかどうかをみるために、トランスフェリンの濃度を ELISA 法で測定した。

さらに、トランスフェリンとアルブミンの除去を目的にして、GBC カラムを単独で、または抗体カラム IgY と組み合わせる前処理をおこなって、トランスフェリンの濃度を測定した。また、抗体カラム IgY のみと IgY+GBC カラム処理でのタンパク同定数を比較した。

(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

C-1. 初期髄液量と同定タンパク数の検討

初期髄液量は 2 ml と固定していたが、そのタンパク濃度は 28 mg/dl ~108 mg/dl と大きな変動があったが、約 60 回の質量分析計での測定の結果を見ると明らかな逆相関 ($R=-0.51$) を認めた。すなわち、初期のタンパク量が多いほど同定タンパク質数が少ないという結果であった (図 2)。

C-2. タンパク同定数の高かった測定条件の検討

さらに、質量分析の結果で、アルブミンの total peptide count と同定数を比較すると、アルブミン残量が多いほど同定タンパク数が少ない傾向を認めた ($R=-0.21$)。すなわち、

抗体カラムで除去できていないアルブミンなどの血漿に大量に存在しているタンパクが同定タンパク数の低下に寄与していると考えられる。

これら 2 つの結果から、初期量のタンパク量はできるだけ少なくした方がよく、またアルブミン等のタンパク質の除去をさらに徹底させるべきであるということを示唆している (図 3)。

そこで、初期髄液量を 2ml という容量ではなく、0.6mg という重量で統一することに意味があるかないかを調べるために、30 mg/dl の 2 ml (0.6mg と表示) と 60 mg/dl 以上 2ml (2 ml と表示) のそれぞれ 10 例で同定タンパク質数を比較したところ、明らかに初期タンパク質量が少ない方 (0.6 mg) が優位に同定タンパク質数が多かった ($p < 0.0001$) (図 4)。

C-3. 抗体カラム処理後のタンパク成分の検討と新たな処理法の導入

初期髄液量を 0.6 mg にすることで一定の効果は得られたが、1 で明らかになった血漿大量タンパクの除去不全に対処するために、トランスフェリン、アルブミン、IgG を除去できるスピнкаラム (GBC カラム、コスモバイオ) をこれまでの抗体カラム IgY に加えてみたところ、質量分析結果におけるトランスフェリンとアルブミンの total peptide count が著しく低下し、これらのタンパク質が十分除かれていることが判明した ($n=3$) (図 5)。

また、処理前の髄液、抗体カラム IgY のみ、GBC カラムのみ、抗体カラム IgY と GBC スピнкаラムの組み合わせ、さらに IgY と GBC スピнкаラム 2 回処理をしたもので、トランスフェリンの濃度を ELISA 法にて測定した。結果は、抗体カラム IgY+GBC スピнкаラムにて、十分血漿タンパク質の除去ができることが判明した (図 6)。

この結果を踏まえて、抗体カラム IgY+GBC スピнкаラム 1 回の処理法を採用したところ、同定タンパク数の明らかな増加

をみた (図 7)。

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。

前処理から質量分析までの行程におおよそ1ヶ月かかり、一度に3検体程度しか処理できないファシリティにおいて、60回にも及ぶ前処理及び質量分析の結果を得ていた。そのデータを踏まえて、さらに同定数を増加させる目的で検討を行った (図 7)。

最初にわかったことは初期髄液タンパク質の濃度が低いほど同定タンパク質数が多い事実である。この知見は、アルブミンのペプチドカウントが多い検体で同定タンパク質数が少ない事実と相まって、抗体カラム IgY では除去できていない血漿タンパク質が悪影響している可能性が示唆された。

そこで、まず当初から行ってきた初期量 2 ml をタンパク濃度測定の上で、0.6 mg (30 mg/dl) の重量に合うように変更することで、同定タンパク数を平均 260 個から平均 340 個への大幅な増加をもたらすことを見いだした。さらに、タンパク量の過剰は血漿タンパク質が十分に除去されていない可能性を考えて、質量分析結果を見直したところ、アルブミンとトランスフェリンのペプチドカウントが抗体カラム IgY 単独では比較的高く、それらを除去する新たな GBC スピンカラムを加えることで著しくカウントが低下することを見いだした。

具体的にトランスフェリンを対象に抗体カラム IgY と GBC スピンカラムの処理を変えた実験を行い、これらを組み合わせた方式が十分な除去率を示した。これらの結果を踏まえて、抗体カラム IgY に加えて、GBC スピンカラム処理を行うことをルーチンとすることとした。その結果、常に 330 強の微量タン

パク質が同定できる系を確立した。

さらに、平成 24 年度に導入した ABSciX5600 を用いた質量分析を行うと、同定タンパク数が一挙に 1,000 近くまで増加することが明らかになっている。

E. 結論

髄液を用いた微量タンパク質の測定法を確立した。特に、初期髄液量をタンパク量として 0.6mg にすること、前処理に抗体カラム IgY に加えて GBC カラム処理を行うことで、QSTAR ではコンスタントに 350 近くのタンパクを自動同定できるようになり、さらに ABSsciX5600 を用いると 1,000 近くのタンパク質を自動で同定できるように改良できた。

これらの測定を多数の髄液が集積できている統合失調症、双極性障害、大うつ病、パーキンソン病、などに応用することで、新しい疾患バイオマーカーや創薬標的が同定されるものと期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Katayama, T., Kobayashi, H., Okamura, T., Yamasaki-Katayama, Y., Kibayashi, T., Kimura, H., Ohsawa, K., Kohsaka, S. & Minami, M. Accumulating microglia phagocytose injured neurons in hippocampal slice cultures: Involvement of p38 MAP kinase. *PLoS One*. 7 (7): e40813 (2012).
2. Gonda, Y., Andrews, W. D., Tabata, H., Namba, T., Parnavelas, J. G., Nakajima, K., Kohsaka, S., Hanashima, C. & Uchino, S. Robo1 regulates the migration and laminar distribution of upper-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, **23**(6), 1495-1508 (2013).

- | | |
|--|----------------------|
| <p>3. Ichimiya, T., Yamamoto, S., Honda, Y., Kikuchi, R., <u>Kohsaka, S.</u> & Nakajima, K. Functional down-regulation of axotomized rat facial motoneurons. <i>Brain Res.</i> 1507: 35–44 (2013).</p> <p>4. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. & <u>Kohsaka, S.</u> Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. <i>Glia</i> 61(1): 47-54 (2013).</p> | <p>3. その他
なし</p> |
|--|----------------------|

G-2. 学会発表

(国際学会)

1. Kotajima H, Nakamura Y, Tsuchiya A, Suzuki E, Uchino S, Kohsaka S.: Ethopharmacological and gene expression analyses in the mouse in response to prenatal exposure to valproic acid. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Kobe, Japan, 9.29-10.2, 2012.

(国内学会)

1. 松下雄一, 高坂新一, 中嶋一行: ミクログリアによる GDNF の産生/分泌の調節. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.18, 2012
2. 石川理絵, 金 亮, 難波隆志, 高坂新一, 内野茂夫, 喜田 聡: メマンチン投与による成体海馬神経新生の促進と記憶形成能力との関係性の解析. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.19, 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

図1 cICAT法

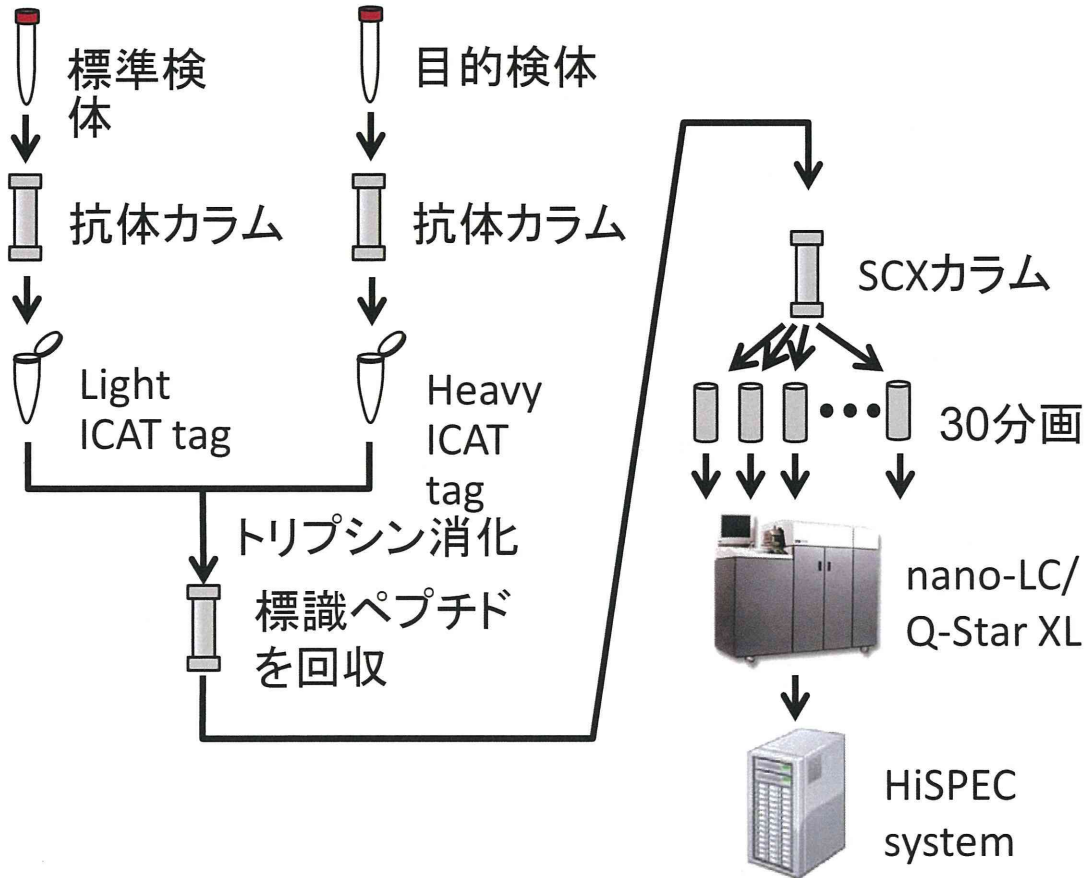
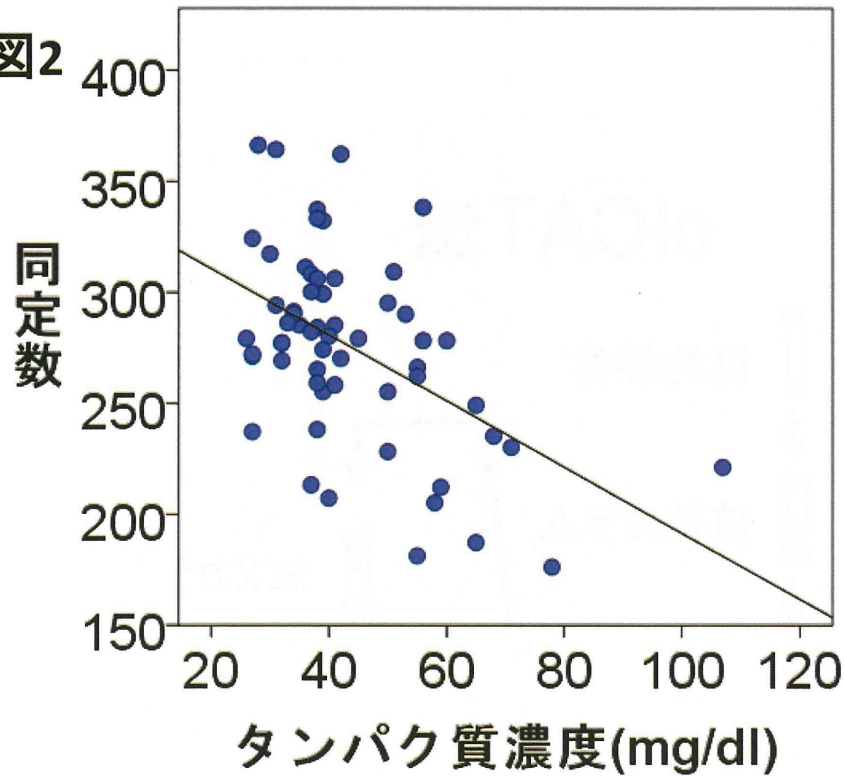
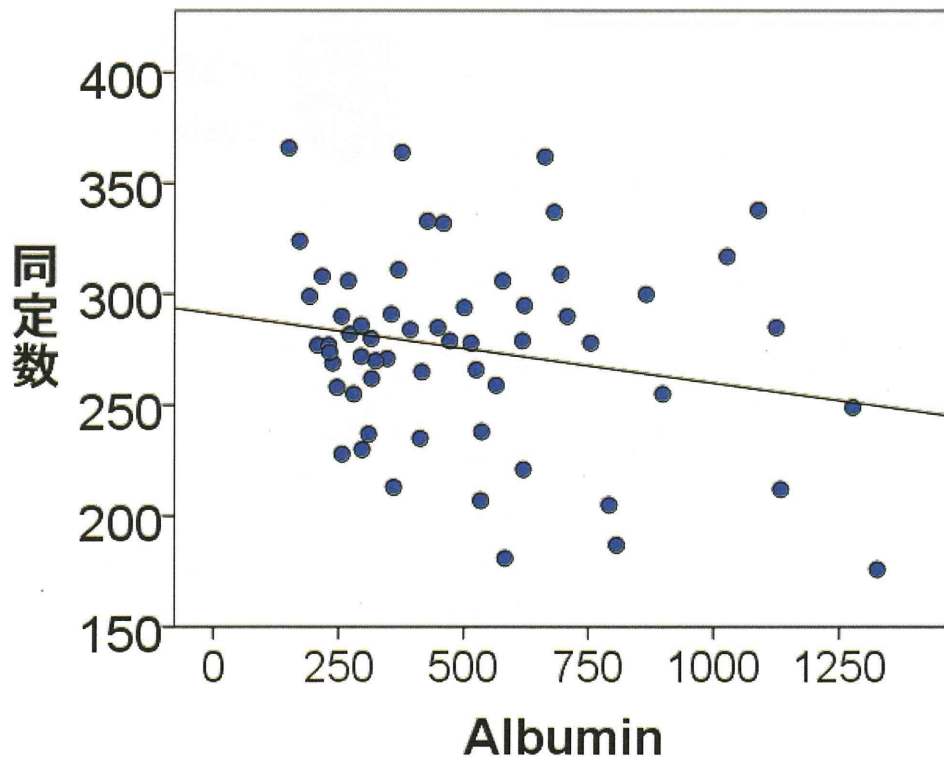


図2



$R=-0.51$
 $P<0.001$
(Pearson)

図3



$R=-0.21$
 $P=0.11$
(Pearson)

図4

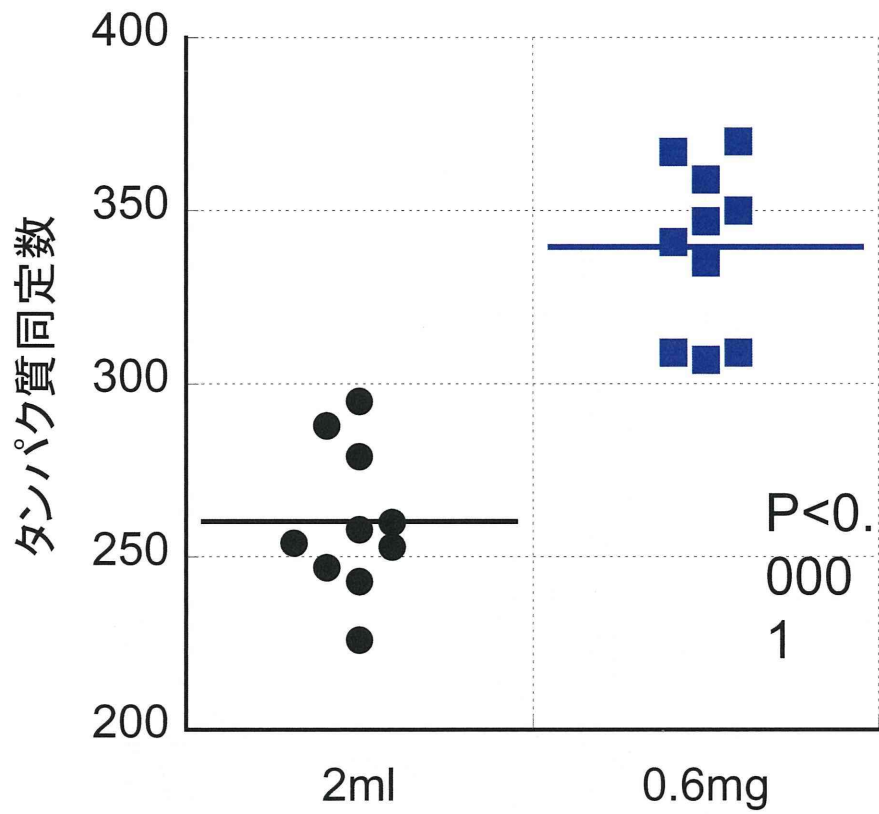


図5

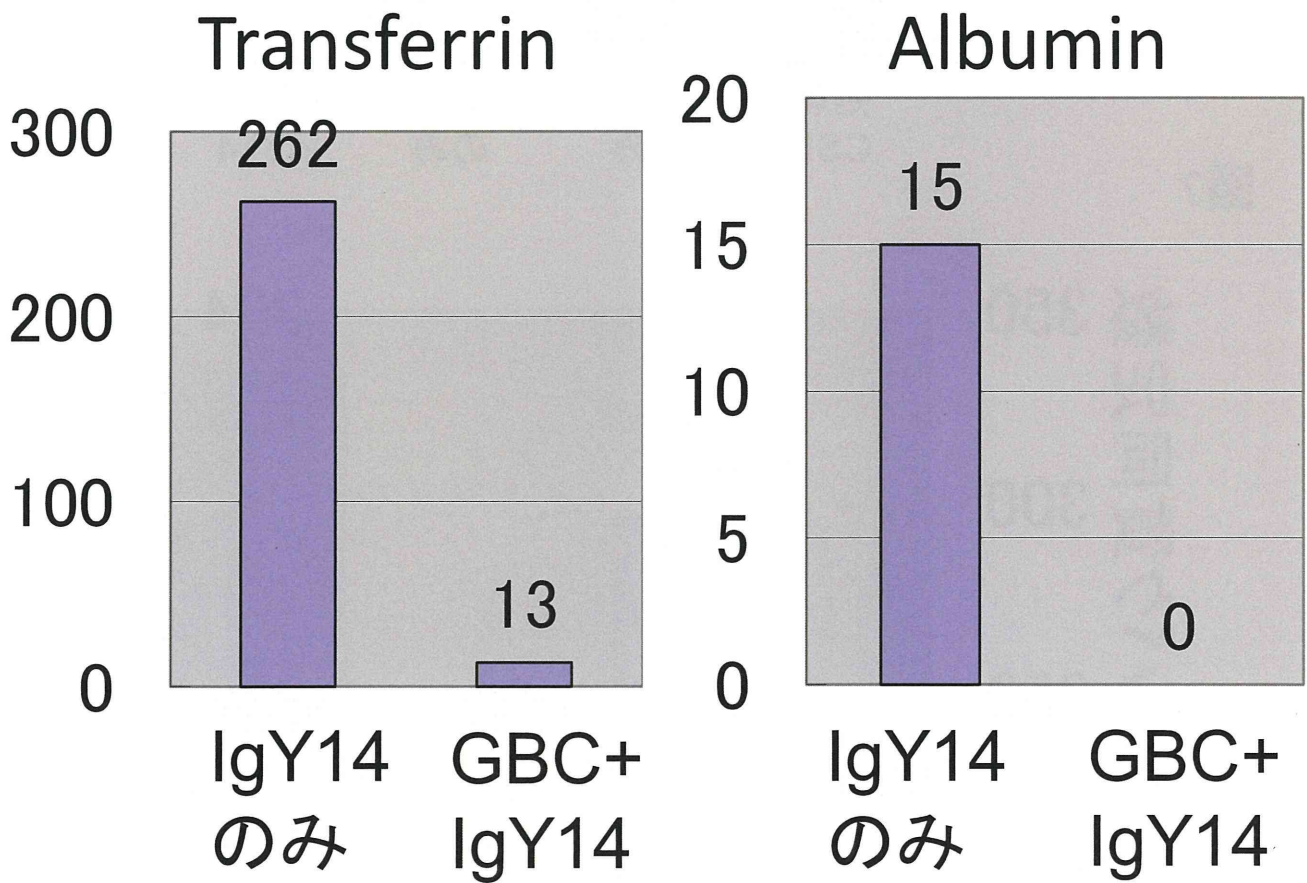


図6

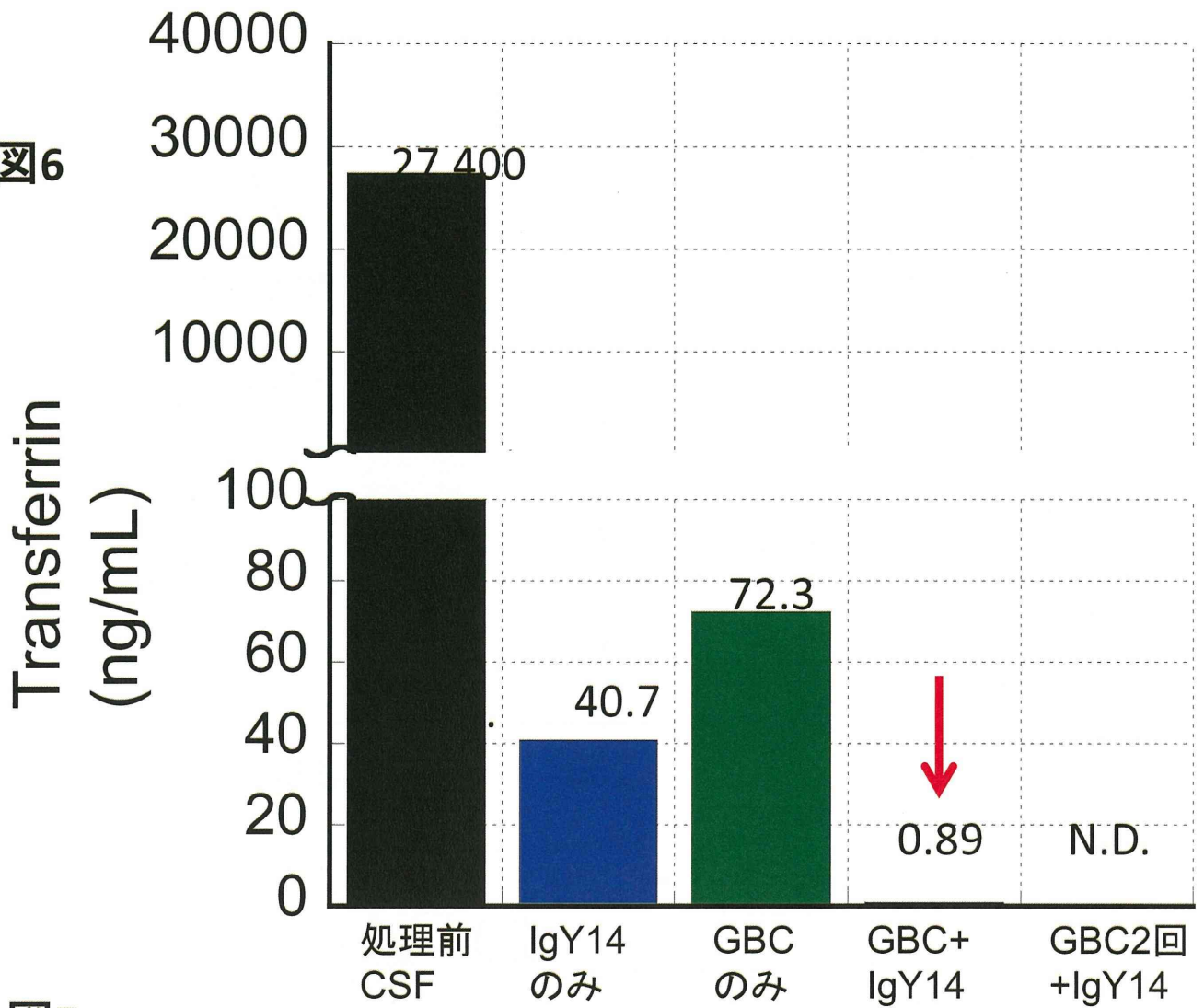
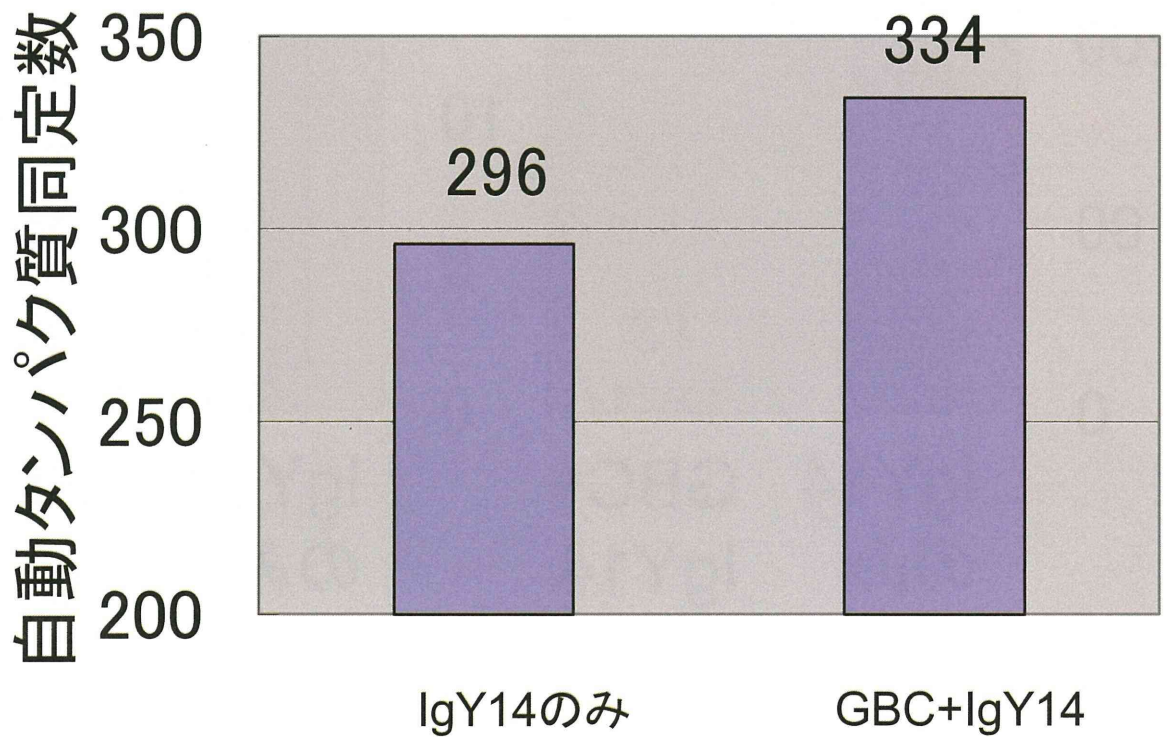


図7



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

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 NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (α 2-6 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。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の作成を行い、昨年度までに 11 種類のクローンを得た。これらクローンの性状を検討した結果、ELISA を用いての合成糖脂質の測定にはきわめて高い特異性を有していた。しかし、免疫組織学法、組織の ELISA では陽性反応を得ることができなかった。今後は、今までと異なる方法での抗体作成を試みる必要がある。また、前立腺癌の糖鎖構造解析において、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 NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc が最も多く存在していた。さらにこれら Neu5Ac 付加された N 型の遊離糖鎖の他に、哺乳類ではその存在比率は極めて低いと考えられている deaminoneuraminic acid (KDN)が付加された N 型の遊離糖鎖が、解析症例 5 症例中 4 症例に蓄積していた。これら KDN 付加された遊離糖鎖のマーカーとしての意義も検討を要する。

血液中腫瘍由来 DNA 研究に関しては、肺癌患者の血漿中 EGFR 変異が次世代シーケンサーによる解析(deep sequencing)で可能かどうか検討した。その結果生検陽性症例の約 60%で検出できた。これは前向き試験での検証を続行できる成績である。

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、前立腺癌 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 NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc, (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^c (DU-PAN-2)が、ルイス陰性の人

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。また昨年度は、一部の膵臓癌細胞に、遊離糖鎖が異常蓄積していることが判明し、その詳細な糖鎖構造を解析、報告した。今年度は、さらに、前立腺癌においてヒトではほとんど存在しないと考えられている KDN と呼ばれるシアル酸ファミリーの一種が付加された遊離糖鎖が異常蓄積していることが判明し、その糖鎖の構造解析も実施した。

以上の糖鎖解析に加え、血漿 DNA 中のがん由来 DNA、いわゆる circulating tumor DNA(ctDNA)の検出方法の開発を当分担研究で行った。プロテオーム解析や糖鎖解析は新奇のバイオマーカーの探索を目的としているのに対し、ctDNA は既知のがんあるいはがん抑制遺伝子の体細胞突然変異を検出する。従って研究対象は質的に全く異なり、血漿 DNA 中の稀少変異検出の方法論確立が主眼となる。昨年度は既存技術で最も高感度と考えられる BEAMing で肺癌患者血漿 DNA 中 EGFR 変異を検出できることを報告した。本年度は次世代シーケンサーで同等の感度で検出可能かどうか検討した。

B. 研究方法

ST1H モノクローナル抗体の解析：

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。ELISA 系の確立は、ビオチン化ラベルした単クローン抗体を作成し、非標識単クローン抗体と、ビオチン標識単クローン抗体とのサンドウィッチ法を用いた。検出にはストレプトアビジン標識 HRP を用いた。

B-1. 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。遊離糖鎖のスタンダード作成には、Sialylglycopeptide を endoglycosidase F2 で消化した後、PA 化を行い、sialydase の部分分解の後、 β 1-4 galactosidase、 β -N-acetyl hexosaminidase、mannosidase と順次酵素反応させた。KDN の構造推定には、Neu5Ac は切断しないが KDN を特異的に切断する KDNase を用いた。また質量分析では、質量 250 のフラグメンテーションを確認した。さらに CMP-KDN を donor として、sialyltransferase を作用させ、スタンダード糖鎖の末端に KDN を α 2-3 あるいは α 2-6 結合で付加させた。

B-2. 血液中腫瘍由来 DNA 解析

次世代シーケンサー Ion Torrent PGM により、血漿 DNA 中の EGFR 断片を PCR 増幅し多数回（100,000 回以上、deep sequencing と呼ぶ）配列決定することにより、稀少変異を検出する。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪府立成人病センター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た検体を用いた。

C. 研究結果

C-1. 糖鎖構造解析

昨年度は 3,000 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、合成糖脂質の ELISA においては、ST1H の異性体である ST2H、SLe^x、SLe^a

は認識しなかった。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。さらに、2 種類の抗体については sandwich ELISA の系を確立した。ST1H の発現が確認できた大腸癌を反応させたが、免疫組織法と同様に、陽性反応は認められなかった。

前立腺癌では、昨年度報告した、シアル酸 (Neu5Ac) 付加遊離糖鎖が、膵臓癌と同様に多量に蓄積していた。これらはすべて complex-type の N 型の遊離糖鎖であり、NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1 が最も多く、ついで NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1 が多かった。興味深いことに、前立腺癌ではこれら Neu5Ac 付加された N 型の遊離糖鎖の他に、哺乳類ではその存在比率は極めて低いと考えられている deaminoneuraminic acid (KDN) が付加された N 型の遊離糖鎖が、解析症例 5 症例中 4 症例に蓄積していた。中でも、骨転移を伴った 1 症例では、転移巣、原発巣ともに、KDN 付加された糖鎖が糖脂質の量を超える量が蓄積していた。Neu5Ac 付加された糖鎖と同様に、KDN が α 2-6 結合で付加された糖鎖が主で、最も多いものの構造は KDN α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1 で、次に、KDN α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1 が多く認められた。

C-2. 血液中腫瘍由来 DNA 解析

検出限界は exon 10 deletion と L858R が 0.01% 以下、L861Q が 0.01%、T790M が 0.05% であった。後ろ向き検体 155 症例 (内血漿 145 症例) を解析したところ、肺生検で exon 19 del が検出された症例 72 症例中 44 症例 (61.6%)、L858R が検出された 44 症例中 32 症例 (57.1%)、

L861Q が検出された 6 症例中 3 症例に検出された。Exon 19 del と L858R の重複変異は 14 例、生検結果と異なっていた症例は 3 例のみであった。T790M は 26 例に認められた。

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。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を作成し、その特異性などを検討した。昨年度に作成された 11 種類のクローンは、合成された糖脂質を用いた ELISA では、ST1H に対して極めて高い特異性を有している。しかし、免疫組織学や組織を使った ELISA では、陽性反応が得られなかった。以上のことは、得られた抗体の実用性が乏しい可能性を示唆する。今後は、免疫源の変更も含めた、抗体作成、スクリーニング法の変更を検討する必要がある。前立腺癌では、今まで報告されていなかった KDN 付加された N 型の遊離糖鎖が多量に蓄積していた。今後はマーカーとしての有効性を検討する必要がある。

血漿中 EGFR 変異に関しては、BEAMing を用いた研究結果よりも若干検出率が落ちるが (BEAMing では 72~73%)、患者集団のちがひによる範囲内である。すでに前向き試験での検証に進んでも良い結果と考えられ、多施設による前向き検証試験を開始している。

E. 結論

ST1H を認識する単クローン抗体の作成方法を再検討する必要がある。KDN 付加された N 型の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。

血漿中腫瘍由来 DNA 解析は前向き検証試験での検証段階に到達している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表