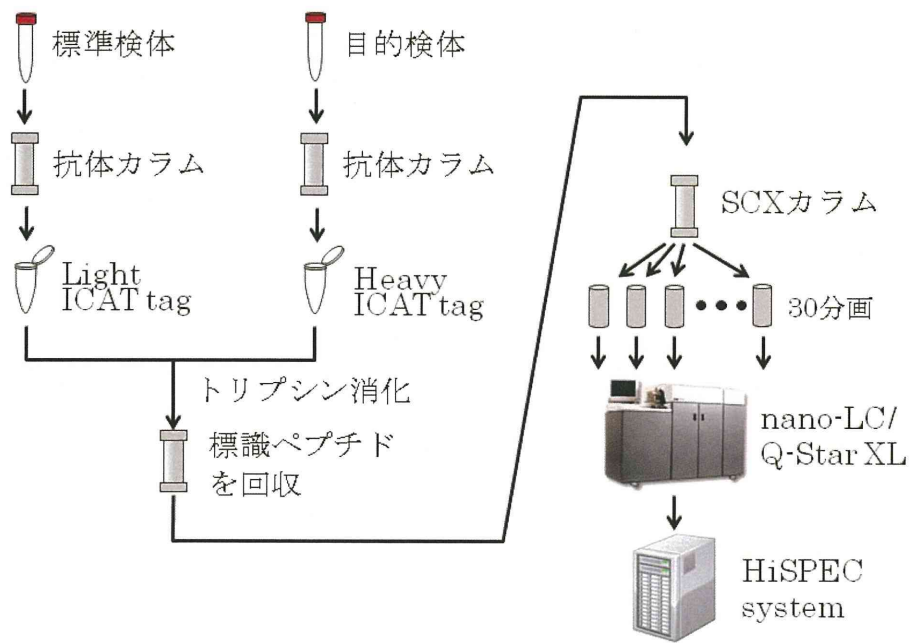


図8 髄液を用いたプロテオーム解析フロー



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(Fu 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、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、膵臓癌、前立腺癌の糖鎖構造解析において、一部の症例の癌細胞中に、多量の遊離糖鎖が蓄積していることが判明した。詳細な構造を解析した結果、complex-type の N 型遊離糖鎖である 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。これらの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 は有望なバイオマーカーとして 20 年近く考えられてきたが、未だ実用化には至っていない。稀少変異を検出する有効な技術がなかったことが原因だが、本研究で十分な感度を持つ方法を開発し、肺癌由来 EGFR 変異検出に応用した。

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(Fu 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(Fu 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 Lea^a (CA19-9)の前駆体である Sialyl Lec^c (DU-PAN-2)が、ルイス陰性の人の CA19-9 に代わる腫瘍マーカーとされている。我々が発見した ST1H は CA19-9 とは異なる合成経路で作成され、かつルイス陰性の人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。また引き続き癌の糖鎖構造解析を実施している中で、一部の膵臓癌細胞と前立腺癌に、遊離糖鎖が異常蓄積していることが判明した。その糖鎖の構造解析も実施した。

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。肺癌は他臓器癌より生検の侵襲性が高く、特に頻回検査や治療後増悪症例の検査は不可能に近い。一方 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 選択のための EGFR 遺伝子検査はほぼ肺癌全症例について行われ、EGFR の活性化変異の検出された症例が EGFR-TKI (ゲフィチニブあるいはエルロチニブ) 適用になる。これらの活性化変異に加え T790M 耐性変異のモニタリングは臨床的に重要と考えられるが、頻回検査のためには非侵襲検査が必須である。これらの目的のため肺癌患者血漿中 EGFR 変異検出を試みた。

B. 研究方法

ST1H モノクローナル抗体の作成：

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

抗体スクリーニング：

抗体のスクリーニングには ELISA 法を用いた。合成した糖脂質を固相化した。ハイブリドーマの上清を 100 µl 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス Immunoglobulin (1,000 倍希釈) を 50 µl 加え、37°C で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ発色基質キットを用いて発色させた。陽性のクローンは限界希釈法で 2nd スクリーニングを行い、目的の抗体を産生するクローンを得た。免疫組織法は、大腸癌、大腸正常粘膜組織からクリオスタットで 10 µm 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。

糖鎖構造解析：

癌細胞、癌組織から脂質成分をクロロフォルム：メタノール溶液で抽出し、DEAE を用いたイオン交換で、中性脂質と酸性脂質を分離した。糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識し(ピリジルアミノ化、PA 化)、C18 逆相カラム及び Amide 順相カラムの 2 種類の HPLC を用いて糖鎖構造を推定する 2 次元糖鎖マッピング法、質量分析法と酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を同定した。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。酵素消化には、β1-4 galactosidase、α2-3 sialyase、β-N-acetyl hexosaminidase、endo-β-galactosidase、α1-3/4 fucosidase などを用いた。

血液中腫瘍由来 DNA 解析

2 種類の技術で検討した。

- 1) BEAMing.
- 2) 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)

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

れている。

C. 研究結果

新規糖鎖腫瘍マーカー

3000 以上のクローンを ELISA にてスクリーニングし、11 種類の陽性クローンが得られた。2 種類が IgM で 9 種類が IgG であった。これらのクローンは、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。

膵臓癌、前立腺癌の糖脂質の構造解析を実施している際に、N 型糖鎖のシアル酸(Neu5Ac)付加遊離糖鎖が正常細胞にはほとんど認めないが、癌細胞には蓄積されていることを見出した。5 種類の糖鎖を検出、構造決定した。その結果すべて complex-type の N 型の遊離糖鎖であり、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。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。

血液中腫瘍由来 DNA

- 1) BEAMing による解析結果。活性化変異は全 44 症例中 32 例 (72.7%, 95%CI 58.0-83.6%)、耐性変異は治療後増悪症例 23 例中 10 例 (43.5%, 96% CI 2.5.6-53.4%) 検出できた。耐性患者の約半数でこの変異が検出されるため、成功率は 90%近いといえる。
- 2) 次世代シーケンサーによる解析結果。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。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。膵臓癌と前立腺癌では Neu5Ac 付加された N

型の遊離糖鎖、さらに前立腺癌では、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。今後はそれらの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 と次世代シーケンサーともに実用化に向けて有望な結果が得られた。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、次世代シーケンサーを用いた方法で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。Neu5Ac や 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。次世代シーケンサーを用いた方法は汎用性があるため、他のがん遺伝子がん抑制遺伝子についても応用可能と考えられる。

研究発表

F-1. 論文発表

1. Shida, K., Misonou, Y., Korekane, H., Seki, Y., Noura, S., Ohue, M., Honke, K. & Miyamoto, Y. Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells. *Glycobiology* **19**(9), 1018-33 (2009).
2. Misonou, Y., Shida, K., Korekane, H., Seki, Y., Noura, S., Ohue, M. & Miyamoto, Y. Comprehensive clinico-glycomic study of 16 colorectal cancer specimens: elucidation of aberrant glycosylation and its mechanistic causes in colorectal cancer cells. *J. Proteome Res.* **8** (6), 2990-3005 (2009).
3. Shirahata, M., Oba, S., Iwao-Koizumi, K., Saito, S., Ueno, N., Oda, M., Hashimoto, N., Ishii, S., Takahashi, J.A. & Kato, K. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. *Cancer Sci.* **100**(1), 165-72 (2009).
4. Yukinawa, N., Oba, S., Kato, K. & Ishii, S. Optimal aggregation of binary classifiers for multiclass cancer diagnosis using gene expression profiles. *IEEE/ACM Trans Comput. Biol. Bioinform.* **6**(2), 333-43 (2009).
5. Goranova, T. E., Ohue, M. & Kato, K., Putative precursor cancer cells in human colorectal cancer tissue. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2**(2), 154-62 (2009).
6. Kato, K. Impact of the next generation DNA sequencers. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2**(2), 193-202 (2009).
7. Kato, K. Algorithm for in vitro diagnostic multivariate index assay. *Breast Cancer.* **16**(4), 248-51 (2009).
8. Otsuka, N., Tsuritani, K., Sakurai, T., Kato, K., Matoba, R., Itoh, J., Okuyama, S., Yamada, K. & Yoneda, Y. Transcriptional induction and translational inhibition of Arc and Cugbp2 in mice hippocampus after transient global ischemia under normothermic condition. *Brain Res.* **1287**, 136-45 (2009).
9. Shida, K., Korekane, H., Misonou, Y., Noura, S., Ohue, M., Takahashi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O. & Miyamoto, Y. Novel ganglioside found in adenocarcinoma cells of Lewis-negative patients. *Glycobiology* **20**, 1594-1606 (2010).
10. korekane, H., Matsumoto, A., Ota, F., Hasegawa, T., Misonou, Y., Shida, K., Miyamoto, Y. & Taniguchi, N. Involvement of ST6Gal I in the biosynthesis of a unique human colon cancer biomarker candidate, alpha2,6-sialylated blood group type 2H

- (ST2H) antigen. *J. Biochem.* **148**, 359-370 (2010).
11. Kuwamoto, K., Takeda, Y., Shirai, A., Nakagawa, T., Takeishi, S., Ihara, S., Miyamoto, Y., Shinzaki, S., Ko, J.H & Miyoshi, E. Identification of various types of α 2-HS glycoprotein in sera of patients with pancreatic cancer: Possible implication in resistance to protease treatment. *Mol. Med. Rep.* **3**, 651-6 (2010).
 12. Taniguchi, K., Uchida, J., Nishino, K., Kumagai, T., Okuyama, T., Okami, J., Higashiyama, M., Kodama, K., Imamura, F. & Kato K. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **17**(24), 7808-15, (2011).
 13. Goranova, T.E., Ohue, M., Shimoharu, Y. & Kato K. Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin. Exp. Metastasis* **28**(5), 427-35 (2011).
 14. Korekane, H., Korekane, A., Yamaguchi, Y., Kato, M., Miyamoto, Y., Matsumoto, A., Hasegawa, T., Suzuki, K., Taniguchi, N. & Ookawara, T. N-Glycosylation profiling of recombinant mouse extracellular superoxide dismutase produced in Chinese hamster ovary cells. *Glycoconj. J.* **28** (3-4), 183-96 (2011).
 15. Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N. & Kaneda, Y. Expression of gangliosides, GD1a and sialyl paragloboside, is regulated by NF-kappaB-dependent transcriptional control of alpha2,3-sialyltransferase I, II and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* **129** (8), 1838-47 (2011).
 16. Yabu, M., Korekane, H., Takahashi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O. & Miyamoto, Y. Accumulation of free Neu5Ac-containing complex-type N-glycans in human pancreatic cancers. *Glycoconj. J.* **30**(3), 247-56 (2013).
 17. Yabu, M., Korekane, H., Hatano, K., Kaneda, Y., Nonomura, N., Sato, C., Kitajima, K., Miyamoto, Y. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology*, in press.
 18. Nomura, M., Shimbo, T., Miyamoto, Y., Fukuzawa, M. & Kaneda, Y. 13-Cis retinoic acid can enhance the antitumor activity of non-replicating Sendai virus particle against neuroblastoma. *Cancer Sci.* **104**(2), 238-44 (2013).
 19. Nakagawa, T., Moriwaki, K., Terao, N., Miyamoto, Y., Kamada, Y., Miyoshi, E. Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. *J Proteome Res* **11**(5), 2798-806 (2012).
 20. Muraoka, S., Kume, H., Watanabe, S., Adachi, J., Kuwano, M., Sato, M., Kawasaki, N., Kodera, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Miyamoto, Y., Kato, K., Tomonaga, T. Strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**(8), 4201-4210 (2012).
 21. Hatano, K., Miyamoto, Y., Mori, M., Nimura, K., Nakai, Y., Nonomura, N. & Kaneda, Y. Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. *PLoS One* **7**(2), e31234 (2012).

F-2. 学会発表

1. 信田京子、是金宏昭、御園生良子、能浦真吾、大植雅之、宮本泰豪: 大腸癌の癌化に伴う糖脂質の構造変化と生合成関連糖転移酵素の解析糖脂質の構造解析、第 29 回日本糖質学会年会(2009 年 9 月、岐阜)
2. Kazuya Taniguchi, Terumasa Yamada, Yo Sasaki, Kikuya Kato: Genetic and epigenetic aberrations in human multiple hepatocellular carcinoma. 第 100 回米国癌学会 (2009 年 4 月、アメリカ・コロラド)
3. Kimiyoshi Nishitani, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Ken Kodama, Masahiko Higashiyama, Kikuya Kato: Detection of EGFR Gene T790M mutation in Non-Small Cell Lung Cancer using an improved version of the BEAMing technology., 第 68 回日本癌学会総会 (2009 年 10 月、横浜)
4. Kyoko Shida, Hiroaki Korekane, Yasuhide Miyamoto: Identification of a Novel Carbohydrate Tumor Marker Candidate Appropriate for Lewis Negative Individual. 25th International Carbohydrate Symposium, (Tokyo, Japan, 1-6 August, 2010)
5. 宮本泰豪、信田京子、能浦真吾、大植雅之、高橋秀典、大東弘明、石川 治: ルイス型陰性の人に適した新規糖鎖腫瘍マーカー候補の同定、第 69 回日本癌学会総会 (2010 年 10 月、大阪)
6. Junji Uchida, Kazuya Taniguchi, Fumio Imamura, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Kikuya Kato: Quantitative detection of the T790M EGFR mutation in circulating tumor DNA of lung cancer patients subjected to EGFR-TKI treatment. 2011 ASCO Annual Meeting (Chicago, UAS, June, 2011)
7. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Kimi Honma, Keita Uchino, Makiko Ono, Masaya Ono, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya. Ribophorin2 stabilizes mutant p53 by suppressing Glycogen Synthase Kinase 3b in breast cancer onset and metastasis. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
8. Yasuhiro Hara, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Takeshi Tomonaga: Proteomic analysis of Bronchioloalveolar carcinoma for discovery of novel biomarkers. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
9. Satoshi Muraoka, Hideki Kume, Jun Adachi, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for Shotgun Proteomics and SRM-based systematic validation of membrane proteins in breast cancer tissues. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
10. Yoji Kukita, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Ryo Matoba, Jun-Ya Kato, Noriko Kato, Ikuko Nakamae, Takeshi Kawabata, Ken Kodama, Kikuya Kato: Genomic characterization of familial lung cancer patients using whole exome-sequencing. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月, 2011.
11. Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Yoji Kukita, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Fumio Imamura and Kikuya Kato: Quantitative detection of the T790M EGFR mutation in circulating tumor DNA of lung cancer patients subjected to EGFR-TKI treatment. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
12. Manabu Kanemoto, Mitsuaki Shirahata, Kazuya Taniguchi, Yoji Kukita, Yoshiki Arakawa, Susumu Miyamoto, Kikuya

Kato: The diagnosis for glioma by IDH1/2 mutation and the correlation with other genetic and epigenetic alteration. 第 70 回 日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月, 名古屋)

13. Yoji Kukita, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Ryo Matoba, Jun-Ya Kato, Noriko Kato, Ikuko Nakamae, Takeshi Kawabata, Ken Kodama, Kikuya Kato: Genomic characterization of familial lung cancer patients. 12th International Congress of Human Genetics/61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Montreal, Canada, October, 2011)
14. Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Yoji Kukita, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Fumio Imamura and Kikuya Kato: Quantitative detection of the EGFR activating and resistance mutations in plasma DNA of Lung cancer patients. Molecular Targets and Cancer Therapeutics 2011 (San Francisco, USA, November, 2011)
15. Yabu Masahiko, Korekane Hiroaki, Sato Chihiro, Kitajima Ken, Miyamoto Yasuhide: Accumulation of free sialylated complex-type *N*-glycans in human cancers: Specific occurrence of free KDN-containing *N*-glycans in prostate cancers. 第 85 回日本生化学会 (2012 年 12 月, 福岡)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称: 腫瘍マーカー、それに対する抗体、その検出キット及び検出方法

出願番号: 特願 2010-041859

出願日: 2010 年 2 月 26 日

出願人: 地方独立行政法人大阪府立病院機構

発明者: 宮本泰豪

- 2) 発明の名称: 血中 DNA の定量的検出による悪性新生物の病勢の進行を評価する方

出願番号: 特願 2011-109498

出願日: 2011 年 5 月 16 日

出願人: 地方独立行政法人大阪府立病院機構

発明者: 加藤菊也、今村文生、谷口一也

熊谷 融、内田純二、西野和美

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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

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

研究要旨

血清検体をもちいた MALDI-TOF MS によるペプチドーム解析におけるプレアナリシスについて検討し、至適な採取・保存条件を確立した。この条件下で採取された血清試料を用いて、慢性血栓性肺高血圧症のバイオマーカー探索をおこなった。血清・血漿を用いたプロテオーム解析においては、abundant proteins を除去していわゆる deep proteome を探索することが必要である。Immunodepletion により abundant proteins を除去し、逆相 HPLC により fractionation した試料を 1D または 2D の SDS-PAGE により分離するいわゆる three-step method を用いてアルコール依存症に関連する血清マーカーの探索を行った。three-step 法では abundant proteins と結合しているペプチド類も同時に失われる可能性があることが難点である。そこで abundant protein と結合しているペプチドも含めた血清ペプチド抽出法を開発した。

血清をもちいたバイオマーカー探索では発現プロテオミクスだけでなく自己抗体からのアプローチも必要である。原発性肝細胞癌 (HCC) の新しい腫瘍マーカーの探索の一つのアプローチとして肝癌組織で高発現蛋白質に対する血中自己抗体の検出を試みた。予備検討の結果に基づき Ku86 抗体に焦点をあてた。健常人、肝硬変に比して、血清 Ku86 抗体レベルは HCC で有意に上昇していた。Stage I, II の HCV に起因する HCC においてその陽性率は従来のマーカーである AFP, PIVKA-II を上回っていた。ROC 解析においても Ku86 の優位性を確認することができた。

一方、疾患マーカー探索ではいわゆる proximal fluid を対象とした探索も重要である。そこで歯周疾患の状態を最もよく反映する体液である歯肉溝滲出液 (Gingival Crevicular Fluid: GCF) を用いて、その採取方法、蛋白抽出法を確立し、正常 GCF および歯周疾患における GCF バイオマーカーの探索を行った。

A. 研究目的

血清・血漿バイオマーカー候補を多施設の多数検体を用いてバリデーションを行う場合は検体採取とプロセッシング、保存の条件を一定にすることが求められるので、まずこの点についての具体的な知見を集積することとした。血清・血漿プロテオーム解析において、abundant proteins を除去したのち、分画し、さらに蛋白電気泳動などで解析することを試みた。一方、abundant proteins を除去する際にこれらの蛋白質に結合しているペプチド類が同時に失われてしまうので、これらのペプチドを回収する

ことも試みた。これらの方法を用いて、慢性血栓性肺高血圧症、習慣飲酒マーカーの探索を行った。また proximal fluid として歯肉溝浸出液を用いた歯周病マーカーの探索もおこなった。最後に、発現プロテオミクスに加えて、組織レベルで高発現が見られる蛋白質に対する血清自己抗体の診断的意義について原発性肝細胞癌を例として検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 血清ペプチドーム解析におけるサンプル調整の至適条件に関する検討

MALDI-TOF MS によるペプチドーム解析

におけるプレアナリシスの検討では Bruker Daltonics 社の ClinProt™ システムを用いた。血清検体は健常人ボランティア 7 名(男性 5 名、女性 4 名、29 歳~47 歳)から採取したものである。早朝空腹時に採血し、1 時間室温で静置した後、1,500G で 10 分間遠心し、分注・保存した。再現性に加えて、プレアナリシス変動要因として血清を遠心分離するまでの時間の影響、凍結融解の回数について検討した。

(2) differential solubilization 法による血清ペプチドの調整

血清 20 μ l と可溶化液 (7M urea, 2M thiourea, 20 mM DTT) 40 μ l を混和したのち氷冷した acetone 180 μ l に滴下し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間 mixing を続けた。その後、19000G で遠心 (4 $^{\circ}$ C) し、その沈殿物に抽出液 (70% CAN, 12mM HCl) を 400 μ l 加えて、4 $^{\circ}$ C で 1 時間 mixing した後、19000G で再度遠心 (4 $^{\circ}$ C) し上清を回収して凍結乾燥し、ペプチド抽出物とした。本抽出法は以下 differential solubilization 法(DS 法)と呼ぶ。DS 法による抽出物を 0.1% TFA に溶解後、逆相 HPLC により 60 分画に fractionation した後、各分画を MALDI-TOF MS (UltraFlex II, Bruker Daltonics) により解析した。

(3) MALDI-TOF MS による慢性血栓塞栓肺高血圧症患者血清のプロテオーム・ペプチドーム解析

2005 年 10 月から 2010 年 2 月までに、千葉大学医学部附属病院呼吸器内科を受診した 34 人の CTEPH 患者を対象とした。全例で肺換気血流シンチグラフィー、右心カテーテル検査および肺動脈造影検査を行い、確定診断を得た。CTEPH 患者の定義は、平均肺動脈圧が 25mmHg 以上、肺動脈楔入圧が正常(12mmHg 以下)であり、有効な抗凝固療法を行っているにもかかわらず 6 ヶ月以上の労作時息切れが続いているものとした。34 人の患者を、探索群 9 人と検証群 25 人に無作為に割り付けた。また各々の群に対し年齢・性別を一致させた健常対照者 34 人(探索群 9 人、検証群 25 人)の血清を用意した。

検証群では、他疾患を有する患者血清 20 例(肺癌患者 8 例、深部静脈血栓症患者 3 例、急性肺動脈血栓塞栓患者 3 例、慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症にて外科的治療を受け肺動脈圧の正常化した患者 6 例)との比較も行った。34 人の CTEPH 患者(男性 12 人、女性 22 人)の血清が解析された。解析には Bruker Daltonics 社の ClinProt™ システムを用いた。

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

独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターに治療目的で入院したアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用いた。入院までの飲酒量はすべての症例でエタノール換算 100 g/日以上であった。手順は、患者血清から Multi Affinity Removal Column (Agilent Technologies, CA, USA) を用い主要 6 タンパク質 (albumin, IgG, anti-trypsin, IgA, transferrin, haptoglobin) を除去した後、脱塩・濃縮後、HPLC により分画した 40 フラクションを SDS-PAGE (DRC Co, Tokyo, Japan) を行い、銀染色 (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japan) した。タンパク質発現の違いを Total Lab TL120 software (Shimadzu Co, Kyoto, Japan) で数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。

(5) 歯肉溝滲出液のプロテオーム解析による歯周疾患マーカーの探索

健常人 5 名、軽度~中等度歯周疾患 6 名、重度歯周疾患 5 名を GCF の採取対象とした。臨床データを基にして GCF の採取部位を選択した。また質量分析精度向上のため唾液混入の可能性の少ない部位を優先した。GCF の採取にはペーパーポイント Absorbent paper points (ZIPPERER®, Munich, Germany) を用いた採取法を試みた。簡易防湿後、ペーパーポイントを歯肉縁下に 30 秒挿入した。挿入の深さは約 2 mm 程度とした。その後ペーパーポイントを除去後、30 秒後に再び同一部位にペーパーポイントを 30 秒挿入。この操作を 10 回繰り返し 10 本採取した。得られたサンプルは直ちに -80 $^{\circ}$ C にて保管した。

GCF のプロテオーム解析はアガロース二次電気泳動法を用いたゲルベースの方法及びショットガン法によった。

(6) プロテオーム解析により見出された原発性肝細胞癌組織高発現蛋白質に対する血中自己抗体の診断的意義

対象は2008年1月から2010年12月の間に千葉大学医学部附属病院消化器内科を受診した計113名のC型肝炎ウイルスに起因するHCC(Stage I、N=28 および Stage II、N=30を含む)、143名のC型肝炎ウイルス関連肝硬変患者、50名の慢性肝炎患者である。プロテオーム解析により肝癌組織における高発現している蛋白質に対する血中自己抗体の検出の有無を予備検討として行った結果より、血中Ku86抗体に焦点をあて、各種慢性肝疾患における同自己抗体の検出率を検討した。

C. 研究結果

(1) 血清ペプチドーム解析におけるサンプル調整の至適条件に関する検討

血清ペプチドームプロファイルに最も大きな影響を与えたのは clotting time、すなわち採血から血清分離までの時間であった(図1)。複数の施設で採取された血清試料を用いた検討の場合は、絶食の有無、採血から血清分離までの時間、保存条件などにより影響を受けるマーカーが少なくないことを考慮するべきである。

(2) differential solubilization 法による血清ペプチドの調整

図2にDS法により得られたペプチド抽出物の Tricine-SDS-PAGE パターン(レーン1)を従来法である有機溶媒沈殿法(レーン2)、限外濾過法(レーン3)および未処理血清と比較して示した。従来法に比し、低分子量蛋白質やペプチドの抽出効率が良好であり、高存在量の4つのペプチドの抽出効率の定量的比較においてもDS法が最も優れていた。本法で最も期待されるのはアルブミンやグロブリンなどのいわゆる abundant proteins と結合している低分子量蛋白質やペプチドを回収できることである。そこで同一血清10 μ l中のペプチド

を3種類のペプチド抽出法およびアルブミン/IgG除去法により処理したのちに分析した。図3に示すRP-HPLCの分画a-dをMALDI-TOF MSにより解析すると図4に示すようにアルブミン/IgG除去法では検出されていないピークが多数検出できていることが確認された(図3及び4)。

(3) MALDI-TOF MSによる慢性血栓性肺高血圧症患者血清のプロテオーム・ペプチドーム解析

MALDI-TOF MSを用いて作成された、探索群のCTEPH患者と健常対照者血清のペプチドプロファイルの比較において、14ペプチドのピーク強度で有意差を認めた。CTEPH患者血清で、6つのピーク強度が増強、8つのピーク強度が減弱を示した。検証群でも有意差の再現性が確認できたのは4ペプチドであった(m/z 2970, m/z 2989, m/z 7760, m/z 9262)(表1)。うち、2つのピーク(m/z 2970, m/z 2989)はCTEPH患者血清で増強を認め、残りの2つ(m/z 7760, m/z 9262)は減少した。

検証群で確認された2群間で有意差を認める4つのペプチドのピーク強度について、CTEPH患者を健常対象者から鑑別する有効性の評価のためにROC解析を行った。その結果 m/z 2989のペプチドが最も高いAUCを示した。カットオフ値61.0 μ mol/Lとすると感度0.51、特異度0.82であった。そこでAutoFlex® II質量分析計のリフレクトロンモードを用いて m/z 2989のペプチドの同定を行ったところ、フィブリノゲンA α 鎖の断片であることが判明した。アミノ酸配列はKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPVであった。

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

アルコール性肝硬変患者8名(入院時・入院後8週間・計16サンプル)からMulti Affinity Removal Columnを用い主要6タンパク質を除去した後、HPLCにより分画した40フラクションをSDS-PAGEを行い、銀染色した。タンパク質発現の違いはTotal Lab TL120

software で数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。その結果、 $p < 0.05$ と有意な違いを 27 バンドでみられた。24 バンドが入院時検体において入院 8 週後検体に比して増加していたのに対し、3 バンドでは入院時に比し、入院 8 週後に増加した。Mann-Whitney test により $p < 0.01$ と有意に発現量の違いが見られた 6 バンドを同定した結果、入院時に増加していたバンドは、Alpha2-HS glycoprotein (M.W. 35641, pI 5.20, Mascot Score 112, Sequence coverage 8%)、Apolipoprotein A-I (M.W. 28061, pI 5.27, Mascot Score 1049, Sequence coverage 70%)、Glutathione peroxidase 3 (M.W. 25489, pI 8.20, Mascot Score 82, Sequence coverage 6%)、Heparin cofactor II (M.W. 57034, pI 6.41, Mascot Score 161, Sequence coverage 5%)、Pigment epithelial-derived factor (M.W. 46300, pI 5.84, Mascot Score 491, Sequence coverage 22%) であり、入院後 8 週間に増加したバンドは、Apolipoprotein C-III (M.W. 8759, pI 4.72, Mascot Score 118, Sequence coverage 24%) であった(表 2)。これらのうち Pigment epithelial-derived factor(PEDF)のタンパク質発現量変化とアルコール性肝障害との関連性は報告されていないので、PEDF に関してさらに検討した。飲酒マーカー探索に用いたアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用い、PEDF の蛋白発現量変化をウエスタンブロット法で検証した。入院時と断酒 8 週間後では、 7.68 ± 0.15 vs 6.08 ± 0.16 ($p < 0.05$) と有意な違いが認められた(図 5)。入院時の α -GTP は 2 症例で正常域にとどまり、いわゆる non-responder と考えられたが、これら 2 症例においても変化が認められた。

(5) 歯肉溝滲出液のプロテオーム解析による歯周疾患マーカーの探索

健常人 5 名より得られた GCF と歯肉辺縁唾液をアガロース 二次元電気泳法で比較した。GCF に高発現している 8 つのスポットを検出した(図 6)。続いてこのスポットのタンパク質

同定をおこなった。これらのスポットからは ApoA-I、酸化ストレスに関与するタンパク質 SOD1 および抗菌ペプチド DCD が同定された(表 3)。健常人 GCF のショットガン法による網羅的解析を行ったところ、327 のタンパク質が同定された。また、同定された GCF 中のタンパク質の機能を Gene Ontology により解析した。GCF 中には歯肉線維芽細胞と比較すると刺激応答の機能を司るタンパク質や免疫応答に関与するタンパク質が歯肉線維芽細胞より多数含まれていることが明らかになった(図 7)。このことから GCF には歯周疾患に関与するタンパク質が数多く存在する事が示唆された。同定された 327 のタンパク質には歯周組織破壊に関与していると思われるタンパク質、細胞骨格系タンパク質、免疫係に関与するタンパク質等が含まれていた。更には歯周疾患との関連性が未知なものも確認された。

(6) プロテオーム解析により見出された原発性肝細胞癌組織高発現蛋白質に対する血中自己抗体の診断的意義

図 8 に健常人、肝硬変(LC)、HCC、慢性肝炎(CH)血中 Ku86 抗体レベルを示した。健常人、慢性肝炎、肝硬変に比し HCC において Ku86 抗体は明らかに高値を示した。また、従来から HCC の腫瘍マーカーとして測定されている AFP、PIVKA-II と Ku86 抗体の陽性率を比較すると Stage I、Stage II いずれにおいても Ku86 抗体の陽性率が最も高かった(図 9A)。ROC 曲線においても Ku86 抗体の優位性を確認することができた(図 9B)。

D. 考察

血清プロテオーム・ペプチドーム解析によるマーカー探索およびマーカー候補のバリデーションにおいて複数施設の検体を用いる場合にはプレアナリシスの影響を考慮にいたれた共通のプロトコールに基づいて実施することが不可欠である。今回の検討結果に基づいて以下のプロトコールで実施することとした。

1) 早朝空腹時採血とし、採血は座位でホルダーを用いた真空採血による。

2) 血清を採取するスピッツは徳山積水化学工業のインセパック II-D カバ(6 ml)のスピッツを使用する。

3) 遠心までには最低 30 分間室温で静置する。遠心は 2 時間以内に 1,500G で 10 分間、室温で実施

4) 遠心後、住友ベークライド社スミロンプロテオセーブ SS1.5ml チューブ 3 本に分注する。

5) 分注したサンプルはそのまま -80℃ のフリーザーに保存する。

6) サンプルの凍結融解の回数は少ないことが望ましいが、2 回までは許容できる。

このようなプロトコールを統一した検体を対象に MALDI-TOF MS (ClinProt system) をもちいて慢性血栓塞栓性肺高血圧症におけるバイオマーカーの探索を試みた。慢性血栓塞栓性肺高血圧症(以下 CTEPH) は、肺動脈内が器質化した血栓により閉塞し肺高血圧症を呈する疾患である。平成 18 年度の日本の治療給付対象者はおよそ 800 人と比較のまれな疾患であり、女性に多いとされる。CTEPH の初発症状は労作時の息切れや動悸、胸痛など非特異的なものであり、診断に至るためにはまずこの疾患を疑うことが必要である。CTEPH を疑った場合には、まず肺血流シンチグラフィを施行し、血流欠損を認める場合には、更に CT や MR angiography および肺血管造影検査、右心カテーテル検査を行い、診断に至る。しかしこれら各種検査の特殊性、高コスト、侵襲の高さなどから、簡便な血清マーカーの開発が望まれている。今回見出されたマーカーは本疾患を疑う際の一助となる可能性がある。

血清プロテオーム解析においてはいわゆる abundant proteins が大部分を占めるので、deep proteome の探索のためには様々な前処理が必要となる。abundant proteins を immunodepletion により除去したのち、HPLC により分画し、さらに電気泳動による分離する方法を用いた。習慣飲酒量を反映するいわゆる飲酒マーカーとして血清 γ -GTP、糖鎖欠損トランスフェリンなどがよく知られているが、感度・特異度において十分とは言えない。そこで

血清の abundant proteins の除去後に HPLC による分画を行い、各フラクションの SDS-PAGE を行う Three-Step プロテオーム解析により新たな飲酒マーカーの探索を試みた結果、pigment epithelial-derived factor (PEDF) を同定した。その変化は γ -GTP ノンリスポンダーにおいても見られた。今回の検討は主としてアルコール性臓器障害患者を対象としたものであり、今後健診受診者のようなより少量の習慣飲酒者の検出にも適用できるかどうか検討が必要となる。

Abundant proteins を除去する手段は広く用いられているが、同時にそれらの蛋白質と結合しているペプチド類が除去されてしまうことになるので、abundant proteins と結合しているペプチドを回収することが必要となる。そこで北里大学の小寺・川島らが開発した方法を検証し、その有効性を確認することできた。

歯周疾患はある種の細菌感染が引き金となって発症すると言われているが、病態のメカニズムには不明な点が多く、歯周疾患における特異性の高い疾患マーカーは報告されていない。歯肉溝滲出液 (Gingival Crevicular Fluid: GCF) は、歯周疾患の状態を最もよく反映する体液であると考えられている。本研究では、GCF をプロテオーム解析に用いるのに適した採取方法およびタンパク質抽出法の確立および歯周疾患マーカーの探索を試みた結果、複数のマーカー候補を見出した。今後多数例での検証が必要である。

原発性肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, 以下 HCC) は本邦における部位別がん死亡数の 4 位である。発展途上国においても死亡率が高い。その死亡率が高い理由の一つとして早期診断が容易でないことがあげられる。HCC の早期診断においては超音波、X 線 CT、MRI などの画像診断が主役を占めている。しかし、画像診断は術者の技量に依存し、また高額な機器を要するためどこでも簡単に実施できるものではない。したがって、HCC の早期診断に有用な血液腫瘍マーカーの開発が求められている。

我々は以前に HCC の癌部・非癌部のプロテオームを 2D-DIGE により比較して、CHC, FTCD などの蛋白質発現量を免疫染色により評価することが HCC の組織診断に有用であることを報告した(Hepatology 2008;48:519-530)。その知見をもとに、HCC で高発現している蛋白質に対する血中自己抗体が HCC の血清診断に利用できるか否かについて検討した。

本研究の結果、血清 Ku86 抗体は HCC の比較的早期に陽性となることが示された。その陽性率は HCC の既存の腫瘍マーカーの AFP, PIVKA-II を上回っていた。今回の検討は C 型肝炎ウイルスに起因する HCC に限っているので、今後その他の要因、すなわち B 型肝炎ウイルス、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)関連 HCC における検討が必要であり、多施設共同研究による確認を行うべきと考える。

E. 結論

血清プロテオーム解析によるバイオマーカー探索とそのバリデーションのために必要な検体採取のプロトコールを作成し、ペプチドーム解析のための検体前処理法を開発した。これらの方法を用いて慢性血栓性肺高血圧症、アルコール性臓器障害マーカーの探索をおこなうと同時に、歯肉溝浸出液を用いた歯周病マーカーの探索も行った。一方、早期がんの診断においては発現プロテオミクスのみの解析には限界があるので、血清自己抗体からのアプローチも行い、原発性肝細胞癌の早期診断に有望な血清自己抗体の検出に成功した。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Umemura, H., Nezu, M., Satoh, M., Kimura, A., Tomonaga, T., Kodera, Y. & Nomura, F. Effects of the time intervals between venipuncture and serum preparation for serum peptidome analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Chim. Acta 406, 179-80 (2009).
2. Kawashima, Y., Fukutomi, T., Tomonaga, T., Takahashi, H., Nomura, F., Maeda, T. & Kodera, Y. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. J. Proteome Res. 9, 1694-705 (2010).
3. Yano, T., Sogawa, K., Umemura, H., Sakao, S., Kasahara, Y., Tanabe, N., Kodera, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K. & Nomura, F. Serum level of fibrinogen A α chain fragment increases in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Circ. J. 75, 2675-82 (2011).
4. Sogawa, K., Kodera, Y., Satoh, M., Kawashima, Y., Umemura, H., Maruyama, K., Takizawa, H., Yokosuka, O. & Nomura, F. Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-steps serum proteome analysis. Alcohol Clin. Exp. Res. 35, 211-7 (2011).
5. Tsuchida, S., Satoh, M., Umemura, H., Sogawa, K., Kawashima, Y., Kado, S., Sawai, S., Nishimura, M., Kodera, Y., Matsushita, K., Nomura, F. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. Proteomics 12, 2190-202 (2012).
6. Nomura, F., Sogawa, K., Noda, K., Seimiya, M., Matsushita, K., Miura, T., Tomonaga, T., Yoshitomi, H., Imazeki, F., Takizawa, H., Mogushi, K., Miyazaki, M. & Yokosuka, O. Serum anti-Ku86 is a potential biomarker for early detection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 421, 837-43 (2012).

F-2. 学会発表

1. 佐藤守、高野重紹、石橋真澄、吉富秀幸、西村基、曾川一幸、松下一之、賀川真吾、荷堂清香、宮崎勝、野村文夫。ジェムシタビン耐性ヒト肝癌細胞株のプロテオーム解析、第9回日本ヒトプロテオーム機構大会 2011年7月28日 朱鷺メッセ（新潟）。
2. Noda, K., Kikuti W., Kiyokawa, I., Miura, T., Kojima, R., Katayama, K., Sogawa, K. & Nomura, F. SERUM FIC5.9 LEVELS AS A PROMISING BIOMARKER FOR DETECTING LIVER PATHOLOGIES, HUPO 10th Annual World Congress, 2011年9月5日, Geneva, Swiss.
3. 三橋暁、パストゥラル エロディ、山崎泰代、リッティアー ショーン、曾川一幸、生水真紀夫、野村文夫、グッデナウ ダイアン。卵巣癌に特異的な代謝プロファイルの同定、第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日
4. Nomura, F., Sogawa, K., Noda, K., Seimiya, M., Matsushita, K., Tomonaga, T. & Yokosuka. O.: DIAGNOSTIC VALUE OF SERUM ANTI-KU86 LEVELS IN THE EARLY DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS-RELATED HEPATO- CELLULAR CARCINOMA. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2011. 2011年11月5日 San Francisco, USA.

G. 知的所有権の取得状況

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

番号：特許公開 2100-117781

出願人：千葉大学・日東紡メディカル(株)
共同出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 研究協力者

曾川一幸、梅村啓史、野田健太、西村基、土田祥央、佐藤守、松下一之

千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学/医学部附属病院検査部・疾患プロテオミクスセンター

矢野利章、坂尾誠一郎、笠原靖紀、田邊信宏、瀧口裕一、巽浩一郎

千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学
小寺義男、川島祐介

北里大学理学部物理学科生体分子動力学講座
横須賀收、今関文夫

千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学
宮崎勝

千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学
丸山勝也

独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センター

瀧澤弘隆

財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニック

朝長毅

医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト

表1 検索群で有意差を認めたピーク

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

表2 蛋白質同定結果

Spot No.	ID	M.W.	pI	Score	sequence Coverage
1	Alpha2-HS glycoprotein	35641	5.20	112	8%
2	Apolipoprotein A I	28061	5.27	1409	70%
3	Apolipoprotein CIII	8759	4.72	113	24%
4	Glutathione peroxidase 3	25439	8.20	32	6%
5	Heparin cofactor II	57034	6.41	161	5%
6	Pigment epithelial-differentiating factor	46300	5.84	491	22%

表3 GCFで高発現していたタンパク質

Spot number ^{a)}	Protein name	MW ^{b)}	<i>pI</i> ^{c)}	Score ^{d)}	Sequence coverage ^{e)}	MS/MS ^{f)} (Unique)	Fold increase ^{g)}
1	HP Haptoglobin precursor	46693	6.28	118	7%	4	1.58
	SOD1 Superoxide dismutase	15926	5.7	61	9%	1	
2	ALB ALB protein	45130	5.77	75	3%	1	1.51
	IGL@ IGL@ protein	24777	5.93	52	8%	1	
3	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	557	50%	12	1.77
4	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	713	41%	11	1.77
	IGK@ IGK@ protein	25757	5.94	204	28%	4	
	DCD Dermcidin precursor	11277	6.08	74	10%	1	
5	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	571	41%	11	1.73
6	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	392	43%	11	1.75
	IGKV1-5 IGKV1-5 protein	26218	6.3	136	15%	2	
7	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin precursor	46707	5.37	241	18%	7	1.62
	IGHV3OR16-13	53054	6.46	136	8%	3	
8	ALB Uncharacterized protein ALB	71658	6.33	151	9%	6	1.61

- a) Protein spots were described in Fig 2.
 b) Theoretical molecular mass (Da) based on NCBI BLAST data base
 c) Theoretical *pI* based on Swiss-Prot data base
 d) SEQUEST score of candidate proteins
 e) Sequence coverage of MS/MS analysis of protein
 f) MS/MS unique peptide
 g) Intensity of spots in 2D-PAGE gel of 10 matched samples (GCF versus supragingival saliva) was measured.

図1 採血から血清分離までの時間と血清ペプチドームパターンの関係

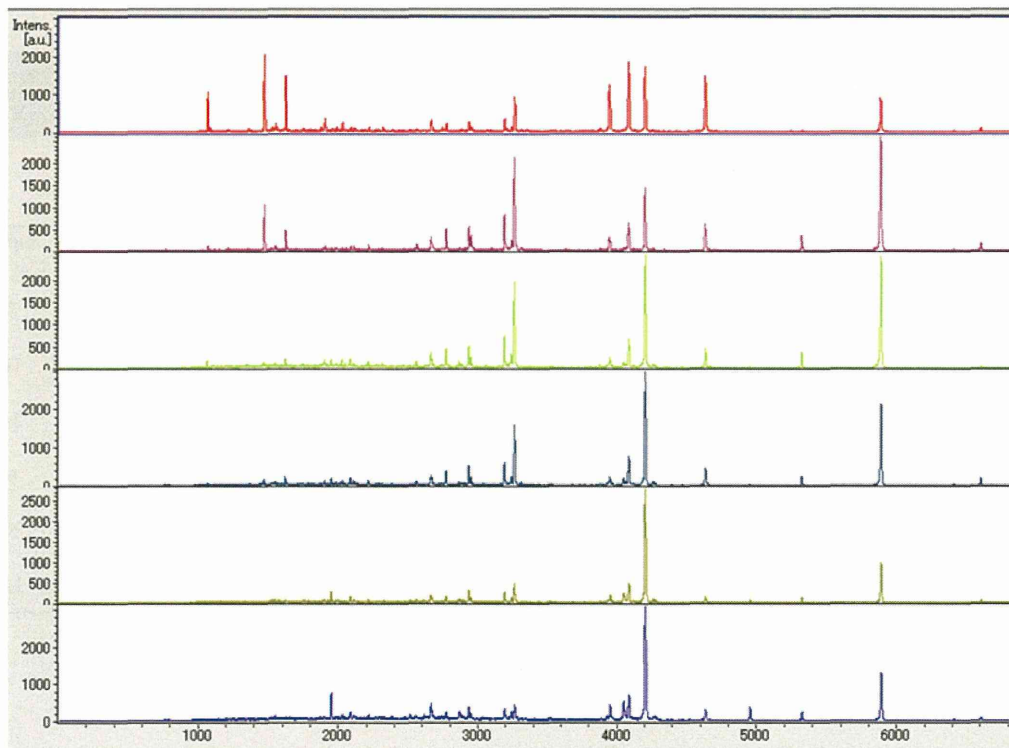


図2 DS法のペプチド抽出効率
 一従来法（有機溶媒沈殿法、限外濾過法）との比較

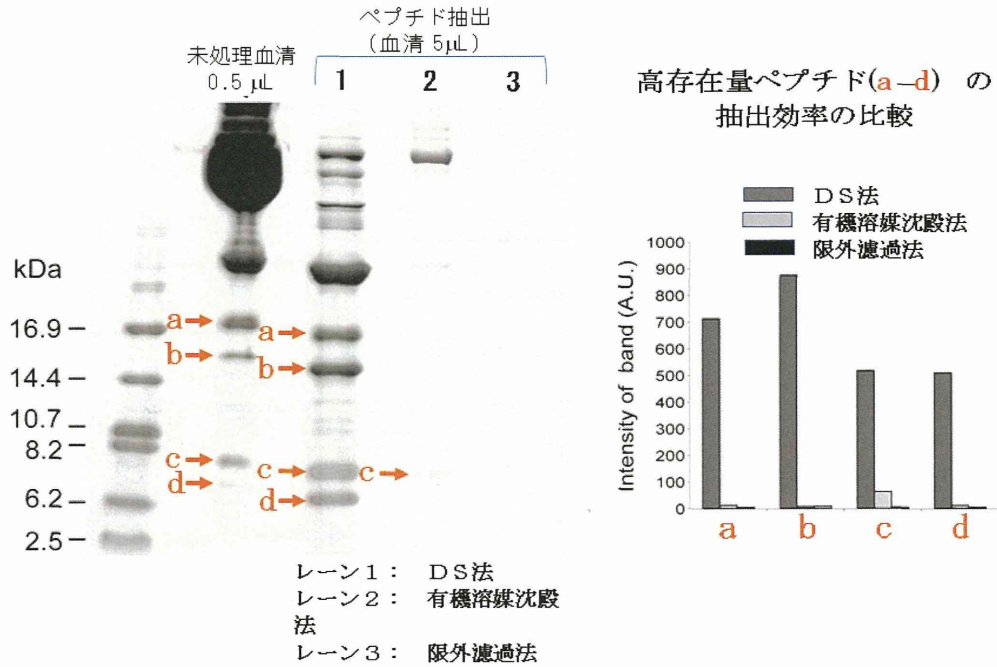


図3 アルブミン/IgG 結合ペプチドの抽出 (1)

同一血清 10 μL 中のペプチドを 4種類の方法で処理後に分析
DS法, アルブミン/IgG除去, 有機溶媒沈殿法, 限外濾過法

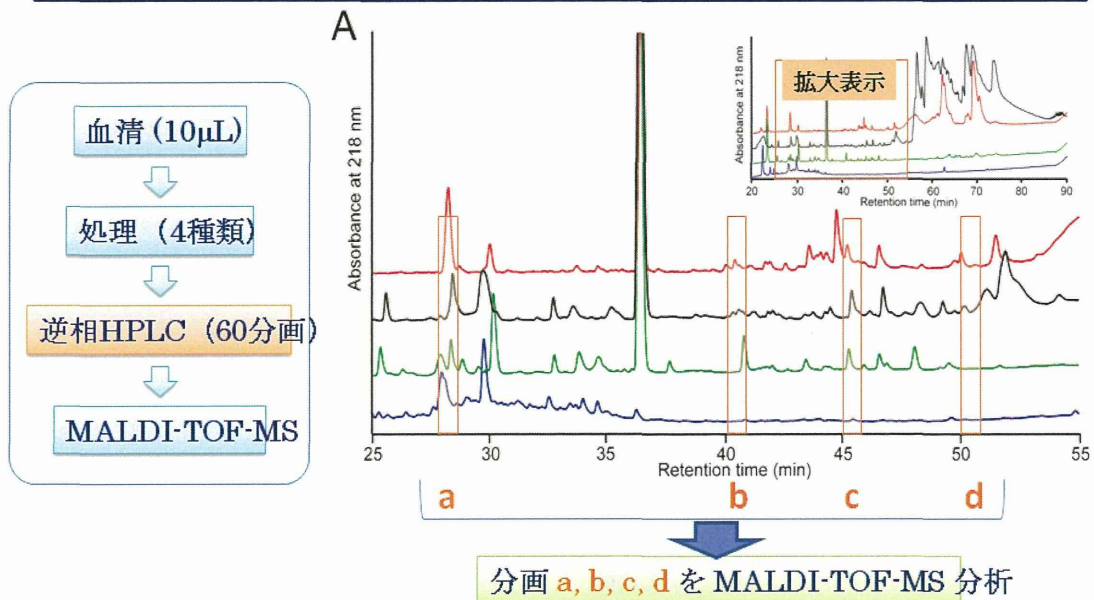


図4 アルブミン/IgG 結合ペプチドの抽出 (2)

同一血清 10 μ L 中のペプチドを 4種類の方法で処理後に分析
DS法, アルブミン/IgG除去, **有機溶媒沈殿法**, **限外濾過法**

▼ : DS法のみで観測されている (アルブミンまたはIgG 結合成分)

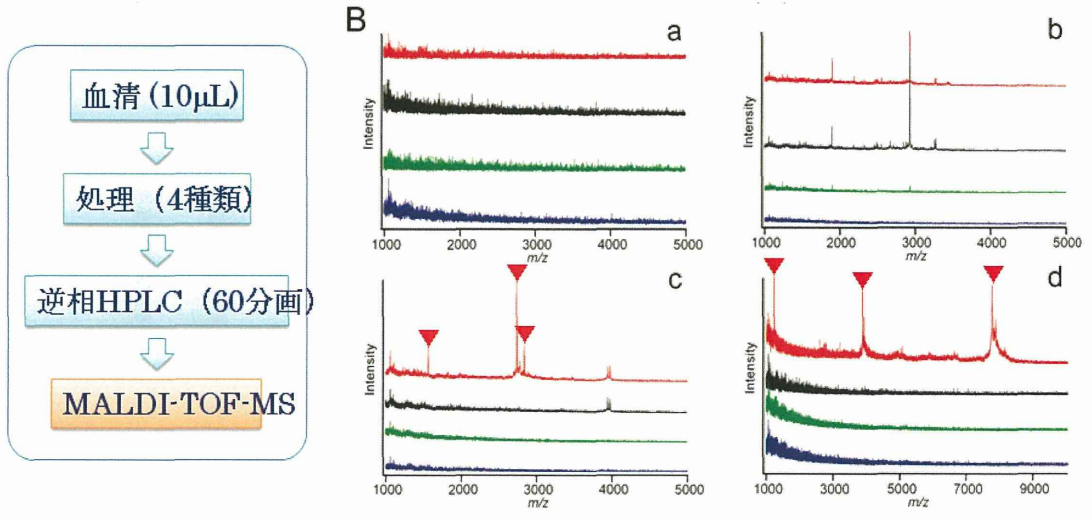


図5.

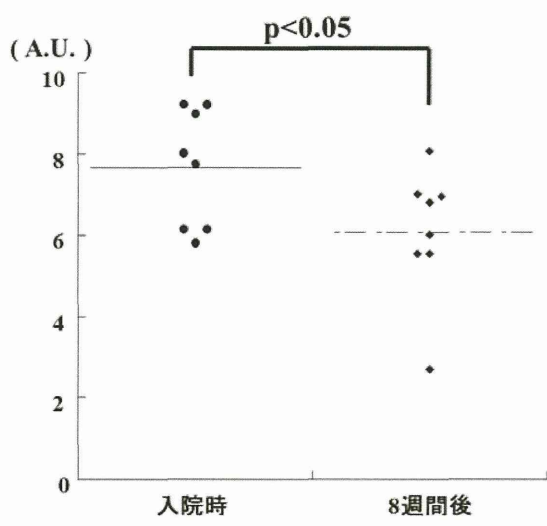
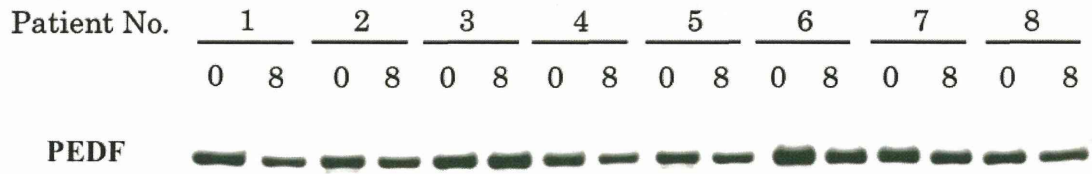


图6.

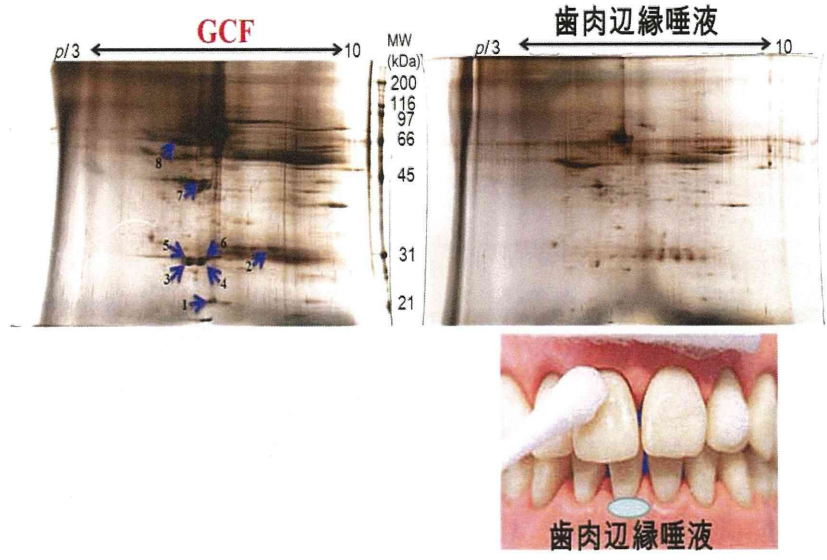


图7.

