

別紙3

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
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、標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)の手法を用いて、本研究事業分担者の本田一文博士らが見出した膵臓がんバイオマーカー候補タンパク質群の一斉絶対定量系を構築し、膵がん判別診断マーカーとしての評価を行うことを目的とした。本年度は昨年度までに、正常検体と比較して膵がん血漿検体で高値傾向が示されたバイオマーカー候補タンパク質2分子の有用性を評価するために、解析検体数を増加させて定量解析を行った。これらのマーカー候補分子について、膵がん以外の難治がんにおける応用性を評価した。さらにサンプル前処理のばらつきを最小限に抑え、かつ多検体の一斉定量解析を目的として、1日192検体の血漿前処理を可能とする自動分注ロボットのプログラム調整を実施し、マイクロLCを用いてLC-MS/MS分析を10 min以内に最適化することで、1,000例以上の検体の定量解析を実現した。その中の健常者38例、膵がん患者101例の解析結果から、昨年度同定した2つのマーカーの内、1つのマーカーがStage IIの早期から膵がん患者で有意に上昇していることが明らかとなり、早期膵がんマーカーとしての有用性が示唆された。本マーカーは胆道がん患者でも有意に上昇しており、胆道がんマーカーとしても有用である可能性が示された。

A. 研究目的

多層オミクス解析で同定されたがんバイオマーカー候補タンパク質の定量的検証は、タンパク質ごとに特異的抗体を必要とするELISA法に依存し、ハイスループットな複数分子の一斉定量は困難であった。昨年度までに、我々が開発した「標的絶対定量プロテオミクス(Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP)」の技術(Kamiie et al., *Pharm Res* 25:1469-1483(2008))を膵がんバイオマーカーの絶対定量解析に応用し、その有用性を評価することに成功した。しかし、本技術を多検体に対して適応する場合、サンプル前処理の高精度化及び高速化が課題として残された。そこで本研究では、QTAPに自動化及びハイスループット化技術を導入し、昨年度までに膵がん血漿検体で高値が認められたバイオマーカー候補タンパク質2分子について、1,000例以上の検体の定量解析によって有用性を評価するとともに、ほかの難治がんへの応用性の評価することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、昨年度までに同定した膵がんマーカー候補2分子に対して、血漿前処理を可能とする自動分注ロボットのプログラム調整を行い、定量質量分析を高速化した。さらに、確立した手法を用いて膵がん患者(38例)及び健常者(101例)を含む1000例以上の血漿(1 µL以下)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。血漿サンプルの解析は、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 スループット性の高いがんバイオマーカー候補定量法の確立

多検体の一斉高速定量解析を実現するために、1) 血漿前処理の自動化、2) LC-MS/MS定量分析の高速化を行った。具体的には、サンプル血漿前処理を連続的にかつ、ばらつきを最小限に抑えて自動化できるように自動分注ロボットのプログラム調整を行い、1日に192検体の前処理を可能とした。さらにLC-MS/MS定量解析については、マイクロLCを用いることで、通常は1検体1~2時間を要する分析時間を、1検体10 min以内に行えるよう最適化した。

確立した方法を用いて、膵がんマーカー候補分子の定量標的ペプチド3分子について絶対定量を行った結果、同一の市販血清をn=96で前処理及び定量分析した場合のば

らつき (%CV)は10%以内であった。以上から、高精度かつハイスループットな膵がんマーカー定量法を確立した。

② 膵臓がんバイオマーカー候補の多検体定量解析

①で確立した方法を用い、膵臓がん患者(38例)及び健常者(101例)を含む1000例以上の血漿について、昨年までに同定した膵臓がんバイオマーカー候補の3つの定量標的ペプチドの絶対定量解析を行った。その結果、いずれの血漿中ペプチド存在量も膵がん由来血漿検体では、健常者に比べ有意に($p < 0.05$, student t-test)上昇していた。さらに、ROC(Receiver Operating Characteristic)解析の結果、これらの候補タンパク質については、膵がん識別診断マーカーとして有用であることが示された。特に、1分子についてはStage IIの早期から膵がん患者で有意に上昇していることが明らかとなったことから、早期膵がんマーカーとしての有用性が示唆された。本マーカーはその他にも肝がん(12例)、十二指腸癌(10例)、胆道がん(24例)等の癌でも健常者に比べて有意に上昇しており、膵臓がん以外の難治性がんに対しても有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

D. 考察

本研究ではQTAP技術に対し、新たに自動分注ロボットとマイクロLCを導入することによって、高精度かつハイスループットなタンパク質定量法を確立した。従来から、バイオマーカータンパク質の定量的な検証に用いられてきたELISA法はスループット性が高いとの利点がある一方で、一度の測定で1分子のみしか定量ができないとの欠点も存在していた。そこで、本研究ではQTAP技術の欠点であったスループット性の低さを解決し、複数のマーカーの同時定量を実現することで、ELISA法の欠点も同時に克服した。すなわち、本研究成果は、QTAP技術を用いた次世代の臨床診断への基盤を築いたといえる。本研究で同定されたバイオマーカー候補タンパク質に対しては、膵がんの早期診断に応用可能と考えられ、ハイスループット定量技術を用いた実用化が強く望まれる。さらに、複数のマーカータンパク質を同時に組み合わせて一斉に絶対定量することで、より高い精度で膵がんを早期に識別診断することにつながると期待される。

E. 結論

従来のQTAP技術に、自動化及びスループット化を導入し、新たな多検体血漿バイオマーカー定量法を確立した。昨年度同定したバイオマーカー候補タンパク質のうち、1つのマーカーが膵がんの初発段階Stage IIから上昇しており、早期診断マーカーとしての有用性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

Yoneyama T., Ohtsuki S., Ono M., Ohmine K., Uchida Y., Tachikawa M., Terasaki T., LC-MS/MS-based quantification of proline-hydroxylated α -fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. 日本薬物動態学会第28年会、2013年10月11日、東京

米山敏広、大槻純男、尾野雅哉、内田康雄、立川正憲、寺崎哲也:自動前処理ロボットと質量分析を用いた迅速な膵臓癌マーカー候補タンパク質の定量法開発、第52日本薬学会東北支部大会、2013年、10月20日、仙台

寺崎哲也:定量的標的絶対プロテオミクスに基づく癌化学療法の新展開(特別講演)、公益社団法人・日本薬剤学会主催 APSTJ WG 2025 シンポジウム「バイオとナノが拓く医療イノベーション」、2013年12月13日、東京

米山敏広、大槻純男、尾野雅哉、内田康雄、立川正憲、寺崎哲也:前処理自動化と質量分析を組み合わせたハイスループットMRM法の開発、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本

Ohtsuki S.: Metabolomics-like proteomics: quantitative targeted proteomics for diseases and pharmacokinetics. Indo-US Symposium on Mass Spectrometry Based Metabolomics in Disease Biology, Trivandrum, India, 23-24 Jan, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) なし

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、質量分析計を用いて、膵臓がん患者における血清メタボローム解析を実施し、感度の高く、かつ、早期発見可能なバイオマーカーを探索した。

A. 研究目的

本分担研究では、膵臓がん患者、ならびに、健常者の血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）を、液体クロマトグラフ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候補を見出すことを目的とした。

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者の血清を収集した。血清からメタノールを用いて脂質、ならびに、脂溶性代謝物（脂質代謝物）を抽出し、液体クロマトグラフ質量分析計による脂質代謝物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、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

平成25年度は、平成24年度に構築した液体クロマトグラフ質量分析計による脂溶性代謝物（脂質代謝物）網羅的解析システムを用いて、膵臓がん患者の血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）を分析した。はじめに、ヒト血清分析において、209種類の代謝物が安定に検出できることを確認した。続いて、これらの血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）について、膵臓がん患者35名、ならびに、健常者35名の血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）を分析し、膵臓がん患者におけるバイオマーカー探索を実施した。膵臓がん患者と健常者の血清中代謝物レベルの変動について統計学的評価を行い、その結果、膵臓がん患者では、健常者と比較して、アラキドン酸、ラウロイルカルニチン、99種類のリン脂質の減少、ならびに、オクタデセノイルカルニチンが増加することを確認した。

D. 考察

本研究により、いくつかの血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）が、膵臓がん患者の発見に有用である可能性が示された。すなわち、今回、確認できた有意に変動する脂溶性代謝物（脂質代謝物）は、膵臓がんマーカー候補として考えられる。今後、多施設共同研究によって採取条件を統一した大規模な前向き検体収集を行い、他の膵疾患や他臓器がんと比較も含めて厳格な検証試

験を行う必要がある。このような厳格な評価により、代謝物バイオマーカー候補が発見されれば、その対象代謝物の分析システムのオートメーション化なども検討し、実用化に向けた研究・開発へと進展していける可能性がある。また、膵臓がんの場合、特に、早期の段階での発見が重要であるが、早期すい臓がん患者血清の収集は、困難を極め、収集検体数は他のステージと比較して少なかった。そのため、今後は、多施設共同研究などを行うことで、早期すい臓がん患者血清の収集を行い、早期すい臓がんに対する検証も重要である。

E. 結論

平成25年度は、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂溶性代謝物（脂質代謝物）網羅的解析システムによって、膵臓がん患者に特異的な変化を示す血清脂溶性代謝物（脂質代謝物）を新たに明らかにできた。これらの結果から、血清メタボロミクスを用いた診断的手法は、脂溶性代謝物（脂質代謝物）を分析ターゲットとした場合でも、膵臓がん患者を発見できる可能性を持つ有用な方法であることが確認できた。今後、ステージ別での評価や他施設検体での検証試験など、さらに詳細な検討も必要であるが、血清メタボロミクスは、膵臓がん患者を発見できるスクリーニング法となることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) Kobayashi T. et al., Serum metabolomics as the diagnostic application for early diagnosis of pancreatic cancer. Orlando, USA. AGA-DDW2013. 2013.5.18-21.

2) Kobayashi T. et al., Serum Metabolomics as a Screening Method for Pancreatic Cancer. HUP012th Annual World Congress. Yokohama, Japan. 2013. 9.14-18.

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

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構築したサンドイッチ ELISA 測定キットをコホート研究サンプルを用いた測定に向けて作製し、分担研究者へ提供した。

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]とがん疾患との相関を検討する目的で使用する測定 ELISA キットの作製と提供

B. 研究方法

膵がん症例 170 検体、対照症例 340 検体の測定を行う目的で、ヒト水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン α 測定 ELISA キットを作製した。[分担研究報告：プロテオーム解析(尾野)の項を参照]

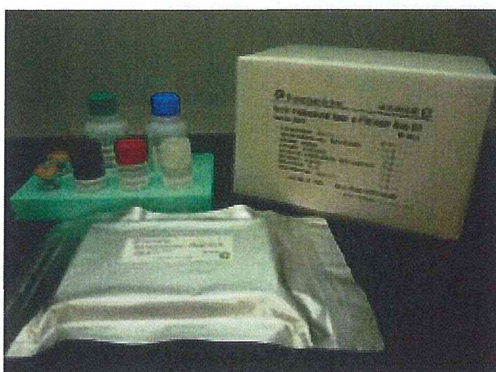
C. 研究結果

結果、膵がんの早期診断が可能な有意差は認められなかった。また、詳細な（因子年齢、性別、地域差、喫煙、飲酒、糖尿病、運動）などでスクリーニングをかけたが関連性について有意な差は見いだされなかった。

D. 考察

現段階で膵がんの早期診断に関する有効なデータは得られていない。一方、本ターゲットは研究用試薬としての販売を開始[図]しており、更なる知見の収集と将来的な診断薬化を目指し、今後も臨床検体の測定を継続する。

図：HP-FGA 測定用キット



E. 結論

ヒト血漿中 HP-FGA を特異的に測定可能なサンドイッチ ELISA キットの構築および製品化に至り、研究を推し進める上での有効なツールとした。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

特記事項無し

2. 学会発表

特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

発明の名称：「酸化修飾タンパク質またはポリペプチドに対する高特異性モノクローナル抗体」

発明者：能勢博、橋口朋代、尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

特許日：2009年6月5日

特許番号：第4319700号

特許権者：株式会社トランスジェニック、国立がん研究センター総長

2. 実用新案登録

特記事項無し

3. その他

特記事項無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
緒方広子、 土屋直人	血中エクソソーム中の microRNAによるがんの 診断	落谷孝広	細胞工学	学研メディカル 秀潤社	東京	2013	85-90

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saeki N, <u>Yoshida T</u> , et al.	Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study	Cancer Sci.	104	1-8	2013
Fujita T, <u>Yoshida T</u> , et al.	Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice.	Cancer Sci.	104(2)	214-222	2013
Takahashi H, <u>Yoshida T</u> , et al.	Identification of a candidate single-nucleotide polymorphism related to chemotherapeutic response through a combination of knowledge-based algorithm and hypothesis-free genomic data	J Biosci Bioeng.	116(6)	768-773	2013
Takahashi H, <u>Yoshida T</u> , et al.	Macrophage migration inhibitory factor and stearyl-CoA desaturase 1: Potential prognostic markers for soft tissue sarcomas based on bioinformatics analyses	PLoS ONE.	8(10)	e78250	2013
Udagawa T, <u>Yoshida T</u> , et al.	Vascular endothelial growth factor-D-mediated blockade of regulatory T cells within tumors is induced by hematopoietic stem cell transplantation	J Immunol.	191(6)	3440-3452,	2013
Oike T, <u>Kohno T</u> , et al.	A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1	Cancer Res.	73	5508-5518	2013
<u>Kohno T</u> , et al.	RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy	Cancer Sci.	104	1396-1400	2013
Suzuki T, <u>Kohno T</u> , et al.	Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels	Mol Cell Biol.	33	2402-2412	2013

Mizukami T, Kohno T, et al.	Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma	J Thoracic Oncol.	9	622-630	2014
Ogata-Kawata H, Tsuchiya T, et al.	Circulating exosomal miRNAs as biomarkers of colon cancer	Plos One.	9(4)	e92921	2014
Zheng W, Iwasaki M, et al.	Common genetic determinants of breast-cancer risk in East Asian women: a collaborative study of 23 637 breast cancer cases and 25 579 controls	Hum Mol Genet.	22	2539-2550	2013.
Shi J, Iwasaki M, et al.	New breast cancer risk variant discovered at 10q25 in East Asian women	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.	22	1297-1303	2013
Pandey JP, Iwasaki M, et al.	IGKC and FcγR2 genotypes and humoral immunity to HER2 in breast cancer	Immunobiology	219	113-117	2014
Kuchiba A, Iwasaki M, et al.	Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women	Br J Cancer			(in press)
Ito H, et al.	Time to first cigarette and lung cancer risk in Japan	Ann Oncol.	24(11)	2870-2875	2013
Matsuo K, Ito H, et al.	The aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism interacts with alcohol drinking in the risk of stomach cancer	Carcinogenesis	34(7)	1510-1515	2013
Pelucchi C, Ito H, et al.	The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation	Eur J Cancer Prev.			2014
Honda K, Ono M, et al.	Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine	Jpn J Clin Oncol.	43	103-109	2013
Nakano T, Ono M, et al.	ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from Streptomyces coelicolor	Toxicon	63	55-63	2013
Makuuchi Y, Ono M, et al.	Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy	Cancer Sci.	104	1045-1051	2013

Singh S K, <u>Ono M</u> , et al.	GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy	Nat Commun	4	1830	2013
Takahashi R, <u>Ono M</u> , et al.	Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3beta	Scientific reports	3	2474	2013
Yoneyama T, <u>Ono M</u> , et al.	Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis	J Proteome Res.	12	753-762	2013
Masuda M, <u>Ono M</u> , et al.	Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling	Mol Cell Proteomics		Epub ahead of print	2014
Kobayashi E, <u>Ono M</u> .et al.	MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma	Oncology	86	94-103	2014
Matsukawa S, <u>Ono M</u> .et al.	Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma	Cancer Med.	3	349-361	2014
Taira N, <u>Ono M</u> , et al.	Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage	Proc Natl Acad Sci U S A	111	717-722	2014
Miyanaga A, <u>Honda K</u> , et al.	Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours	Ann Oncol.	24(1)	84-90	2013
Noro R, <u>Honda K</u> , et al.	Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification	Ann Oncol.	24(10)	2594-2600.	2013
Watabe Y, <u>Honda K</u> , et al.	Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma	Cancer Med.		10.1002/cam4.214.	

Asamura H, et al.	Radiographically determined noninvasive adenocarcinoma of the lung: Survival outcomes of Japan Clinical Oncology Group 0201	J Thorac Cardiovasc Surg	146(1)	24-30	2013
Kobayashi T, Yoshida M, et al.	A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer	Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	22(4)	571-579	2013

