

201438020A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業
平成26年度 委託業務成果報告書

癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌
早期診断バイオマーカー開発

業務主任者 植田 幸嗣

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 植田 幸嗣

平成27 (2015) 年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人東京大学が実施した平成26年度「癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発

植田 幸嗣 ----- 1

II. 学会等発表実績 ----- 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 15

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発

業務主任者 植田 幸嗣

国立大学法人東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任准教授

研究要旨：本邦において膵癌は部位別 5 年生存率で常に最下位を推移しており、膵癌の治療成績向上、死亡者数の減少は急務となっている。このため、本研究では根治可能な膵癌病変を早期に発見できる診断技術の開発を目的とする。

本年度は独自に開発した血中エクソソーム高純度精製カラムである Extracellular Vesicle Isolation by Size Exclusion Chromatography on Drip (EV-Second)法を使用して 95 例の血清サンプル（健常者 30 例、膵癌 II 期 15 例、III 期 25 例、IV 期 25 例）からエクソソームを抽出し、LC-MS/MS 分析による網羅的なエクソソームタンパク質定量プロファイリングを実施した。Expressionist データベースサーバーにて、上記解析により同定された 839 エクソソームタンパク質の定量化と統計解析を行い、膵癌の発症、または進行に伴って特異的な量的変動を示すエクソソームバイオマーカー候補分子を選定した。

A. 研究目的

本邦において膵癌は部位別 5 年生存率で常に最下位を推移しており、膵癌の治療成績向上、死亡者数の減少は急務となっている。このため、本研究では根治可能な早期に膵癌病変を発見可能な診断

技術の開発、実用化を最終目標とする。

本研究では特に、あらゆる細胞が分泌する直径数十 nm の小胞、エクソソームを診断に応用する。癌細胞由来エクソソームは血液中から検出可能な「癌細胞レプリカ」と考えられ、次世代の診断薬リソ

ースとして注目されている。生体内エクソソームの統合オミクス解析は全世界的に急速な進展が続いているが、最も根本的な問題として未だ血液からエクソソームを高純度に単離する標準技術がない。既存の超遠心沈降法では多量の血清タンパク質の混入が避けられず、かつ処理に多大な時間を要し、再現性も低いため多検体分析に耐えられない。

一方で研究代表機関はこれまでに、エクソソーム捕捉抗体モノリスチップやワンステップエクソソームゲル濾過カラムなど独自の生化学精製法を開発し、高速に再現性良く、かつ大変純度の高いエクソソームの単離精製を可能にしている。これらの実績を踏まえ本研究では、健常者、ステージ I~IV 膵癌患者血清からエクソソームを抽出し、超高感度 LC/MS 分析によるエクソソームタンパク質の網羅的な発現解析から、膵癌の発症、または進行に伴って特異的な量的変動を示すエクソソームバイオマーカー候補分子を同定する。

さらにこれまでの研究で臨床診断を見越したハイスループット定量法であるエクソソームサンドイッチ ELISA の開発も完了しているため、続く検証フェーズにて診断前血清を含む独立した血清セットをエクソソームサンドイッチ ELISA で測定し、真に膵癌の早期診断に有効な分子を決定する。また、シングルマーカーでは早期症例の検出感度が不十分である可能性もあるので、個々の検証試験で有効性が示されたマーカー全てを活かした質量分析マルチマーカー診断法の構築も

目的とする。

B. 研究方法

a. 血中エクソソームの単離精製

95 症例（健常者 30 例、膵癌 II 期 15 例、III 期 25 例、IV 期 25 例）の血清サンプル各 200 μ l を 0.45 μ m Spin-X filter (Corning, New York, U.S.) で濾過し、直径 450 nm 以上の構成物を除去したサンプルを使用した。

EV-Second カラムの PBS 保存液を流しきり、血清サンプル 200 μ l、PBS 1000 μ l の順に自然落下でカラムにロードした。回収用 1.5 ml チューブをセットし、PBS 300 μ l を自然落下で通過させ、これをエクソソーム画分として回収した。回収されたエクソソーム懸濁液は即座に減圧遠心機にて完全乾燥し、次のトリプシン消化に供した。

EV-Second カラムの処理再現性試験においては、異なる 6 本のカラムに同一血清試料 200 μ l ずつをロード後に PBS を 800 μ l 通過させ、その時点から PBS 100 μ l ごとに 12 フラクションを回収した。

b. 質量分析用サンプル前処理

乾燥したエクソソームサンプルに [phase transfer surfactant (PTS) buffer (GL サイエンス, Tokyo), 50 mM HEPES-NaOH (8.0), 10 mM Dithiothreitol] 40 μ l を添加して再溶解した後、100°C、10 分間還元反応を行った。さらに Iodoacetamide 終濃度 25 mM を添加し、室温、暗所で 45 分間システイン残

基のアルキル化を行った。アルキル化反応を Dithiothreitol 終濃度 10 mM 添加でクエンチし、[50 mM HEPES-NaOH (8.0)] 160 μ l を添加して界面活性剤を希釈した。これらのサンプルに Trypsin GOLD (Promega, Fitchburg, Wisconsin) 20 ng を加えて消化反応を恒温シェイカー内で 37°C、12 時間行った。消化後のペプチドサンプルを Oasis HLB 固相抽出プレート (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) で脱塩精製し、減圧遠心機で完全乾燥した。乾燥ペプチドサンプルを [2% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid] 40 μ l に再溶解し、次の質量分析に供した。

c. 質量分析

血清エクソソームタンパク質消化物の質量分析には LTQ-Orbitrap-Velos 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, Massachusetts) に Ultimate 3000 RSLC nano flow HPLC (Thermo Fisher Scientific 社) を接続した LC-MS/MS システムを使用した。ペプチド分離用のカラムには 75 μ m x 150 mm ESI sprayer tip packed with 3 μ m C18 resin (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) を用い、溶媒 A [0.1% ギ酸]、溶媒 B [70% acetonitrile, 0.1% ギ酸]、流速 250 nl/min の条件で分離を行った。

取得した質量分析データは Proteome Discoverer 1.4 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を使用して SwissProt データベースに対してタンパク質同定検索を実施した。データベース

検索に使用したパラメータは以下のとおりである。Enzyme Name = Trypsin, Precursor Mass Tolerance = 5 ppm, Fragment Mass Tolerance = 0.8 Da, Dynamic Modification = Oxidation (Met), and Static Modification = Carbamidomethyl (Cys).

d. 定量解析、統計解析

前項の質量分析によって得られたデータは Expressionist Refiner MS ソフトウェア (Genedata, Basel, Switzerland) 上でノイズ除去、保持時間補正 (アライメント)、ピークシグナル検出、同位体クラスター認識を経て、全検出ペプチドに対するサンプル間相対定量値を求めた。

二群検定 (Student's t-test)、主成分分析 (PCA) は Expressionist Analyst ソフトウェア (Genedata) を用いて実施した。Box plot の作図には R ソフトウェア (Version 2.15.1) を使用した。Gene ontology 解析には DAVID database version 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を使用した。

(倫理面への配慮)

提供を受けた血清サンプルの収集に関しては、プライバシーに関する遵守事項、同意しない場合でも不利益を受けないこと、同意した場合でも随時これを撤回できること、被験者の人権保護など必要な事項について被験者に十分説明し患者本人からプロジェクトの趣旨や内容に十分な理解を得た上でインフォームドコ

ンセントを文書で取得し、採血の手続きが行われた。

採取、凍結したサンプルは匿名化が行われ、個人情報（氏名、住所、生年月日）は同病院外には一切漏出しないよう管理されている。匿名化された試料は、臨床情報（年齢、性別、治療歴、各種バイオマーカーの値など）のみ付加された状態で提供され、 -80°C で保管されている。これら臨床検体の提供、本研究への使用に関しては、倫理審査委員会による承認を得た上で実施された。

C. 研究結果

図 1 に示すフローチャートに従って 95 症例の血清からエクソソームを単離し、含有タンパク質をトリプシン消化した後 LC-MS/MS 分析に供した。エクソソームの単離には図 2 に示す自作のゲル濾過オープンカラム EV-Second を使用した。また、多検体処理用に専用カラムラックも製作して使用した。本カラムについて、ランダムに選んだ EV-Second カラム 6 本を用いた精製再現性試験の結果を図 3 に示す。血清フリータンパク質の溶出を示す Bradford アッセイ定量曲線と、エクソソームの溶出を示す CD9-CD9 エクソソームサンドイッチ ELISA 定量曲線が明確に分離されていることから、非常に高純度な血中エクソソーム単離が達成できていることが分かる。また、6 カラム由来溶出曲線のパターンが良く一致していることから精製再現性も十分であると評価することができる。

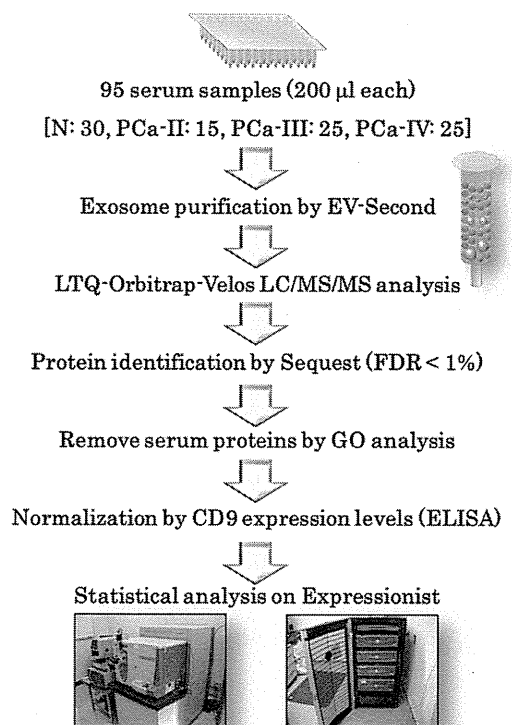


図 1 膵癌エクソソームバイオマーカースクリーニングフローチャート。

計 95 サンプル由来質量分析データの Sequest データベース検索を行った結果、重複を除く 19,376 ペプチド、839 タンパク質が同定された ($\text{FDR} < 1\%$)。これら同定タンパク質の中から、血清フリータンパク質の混入と考えられる分泌タンパク質を Gene ontology 情報をもとに除外した。この結果得られた 621 タンパク質を統計解析によるバイオマーカースクリーニングに使用した。これらのタンパク質定量値は Expressionist RefinerMS ソフトウェアにて図 4 のように二次元展開されたペプチドマップから求めた。特定のタンパク質を構成する全ペプチドシグナル強度（イオンカウント）の総和をそのタンパク質の定量値とした。

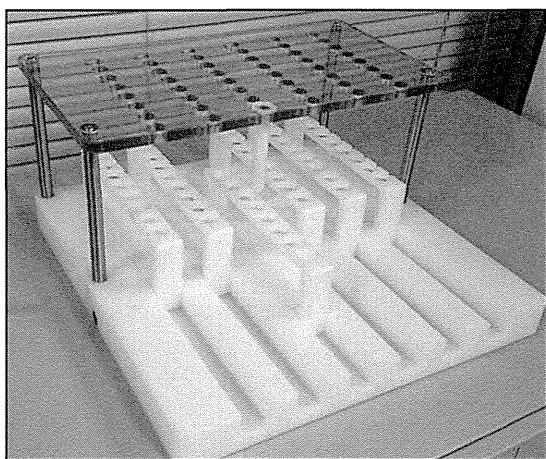
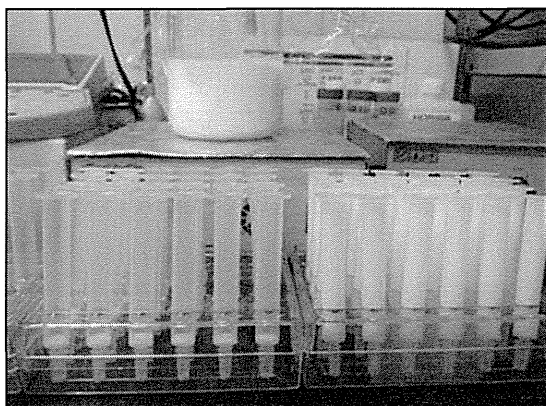
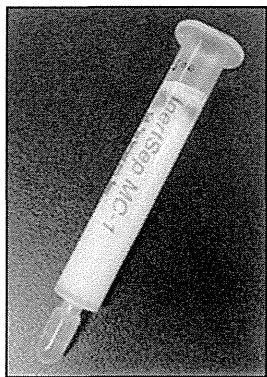


図 2 エクソソーム高純度精製デバイス EV-Second カラムの外観と、充填の様子、および試作した多検体精製用専用カラムホルダー。

また、血中エクソソーム濃度には極めて広い個人差があるため、症例間タンパク質濃度を補正する目的でトリプシン

消化前のサンプルに対して CD9-CD9 エクソソームサンドイッチ ELISA を実施した。CD9 はエクソソームの代表的な表面マーカー分子であり、CD9 の定量値をもって各血清に含まれていたエクソソーム濃度とした。具体的には質量分析にて検出された全タンパク質の中央値を CD9-CD9 エクソソームサンドイッチ ELISA 測定値で除したものを以下の統計解析に用いる最終的なタンパク質相対定量値とした。

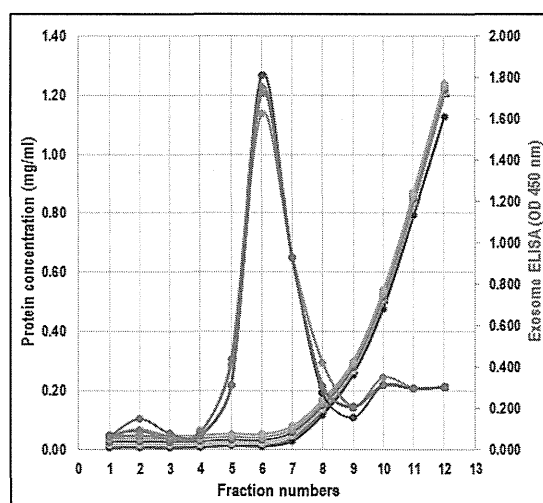


図 3 EV-Second カラムの再現性テスト。CD9-CD9 エクソソームサンドイッチ ELISA 測定値 (OD = 450 nm)、Bradford アッセイ測定値 (mg/ml) を独立した 6 本のカラムで計測した。

CD9 発現量補正後の 621 エクソソームタンパク質定量値を用いて、健常者 30 例と膵癌患者 65 例に対する二群検定 (t-test) を Expressionist Analyst ソフトウェア上で実施した。カットオフ値を $p < 0.05$, fold change > 5.0 とした時に、膵癌患者血中エクソソームで健常

者群よりも有意な発現亢進を示したタンパク質が 5 種同定された。これらエクソソームバイオマーカータンパク質候補定量値を病理群ごとにボックスプロットで示したものが図 5 である。

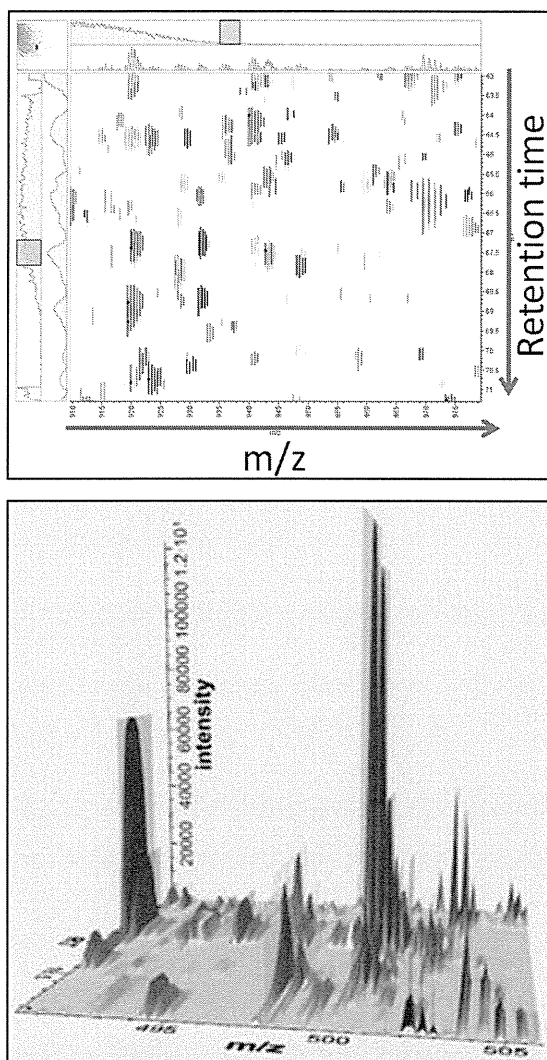


図 4 Expressionist RefinerMS ソフトウェアによる全タンパク質定量。質量電荷比 (m/z) と HPLC 溶出時間 (Retention time) の二次元展開マップ (上段)、イオン強度 (Intensity) 情報を加えた三次元展開マップ (下段)。

ここで同定されたバイオマーカー候補タンパク質は全てステージ II 膵癌患者血清においてもエクソソーム上発現量が健常者と比較して有意な上昇傾向を示しており、有望な膵癌早期診断バイオマーカーである可能性が示唆された。また、P00197、P00288 の 2 タンパク質については細胞膜貫通ドメインを持った膜タンパク質であることが知られており、エクソソームにおいてもその膜上に出出して発現していると考えられる。従って、これらは研究代表者らがこれまでに開発した高速、高感度エクソソーム表面マーカー定量法であるエクソソームサンドイッチ ELISA 法で粗血清から直接定量可能であることが想定され、より体外診断薬としての応用に適したバイオマーカーシーズであると言える。

D. 考察

従来の超遠心法や密度勾配遠心法では多量の血清タンパク質を含む低純度なエクソソーム画分しか取得することができず、血中エクソソームに含まれるタンパク質の正確な構成成分や量を網羅的に知ることは極めて困難であった。これに対して本研究で使用した EV-Second カラムは、サイズ排除の原理に基づいてエクソソームが持つ直径数十~100 nm の粒子を最も良く分離できるようにデザインしたのに加え、弱い疎水性相互作用の影響で血清フリータンパク質の溶出をさらに遅らせ、エクソソーム画分の溶出をシャープにする効果もある。本カラムの使用

により図 3 に示すような血中エクソソームの高純度精製が始めて可能になり、再現性も十分であることから 95 症例由来の網羅的エクソソームプロテオーム解析結果の信頼性は非常に高いものと考えられる。

EV-Second カラム精製は血清や血漿に特別な試薬や変性を何も加えることなく、精製品は生理的な形態を保ったまま PBS に懸濁された状態で回収される。従って、本カラムは臨床検体由来エクソソームのプロテオーム解析だけではなく、miRNA など核酸の網羅的分析や電子顕微鏡観察、さらには回収したエクソソームを培養細胞や動物に投与することも可能である。

これらの高い性能と広い汎用性から、本カラムは GL サイエンス株式会社にライセンスして市販されることが決定した (型番 5010-21390、5010-21392、ラック 5010-50450)。手作業でのカラム充填から工場生産に切り替えたことで製品品質の安定化を図ることが可能となり、今後のより大規模なバイオマーカー検証試験や臨床応用を見据えた検査キット作成にも資すると考えられる。

図 5 で同定された 5 種のバイオマーカー候補分子は細胞接着に関わるタンパク質 2 種、代謝関連酵素タンパク質 1 種、NF κ B シグナル関連タンパク質 1 種、細胞形態形成関連タンパク質 1 種から構成されていた。P00197 や P00693 のように病期の進行に伴って定量中央値の上昇が観測されるタンパク質は、膵癌の発症や進行にも重要な役割を果たしている可能性が

あり、今後の独立検体セットを用いた検証試験と共に個別の機能解析基礎実験も並行して実施する予定である。

E. 結論

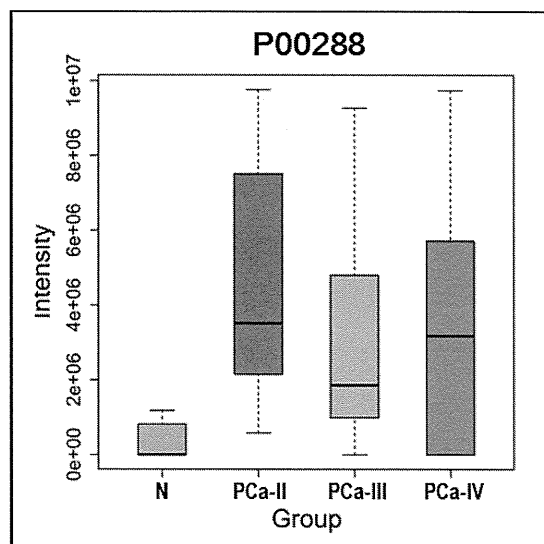
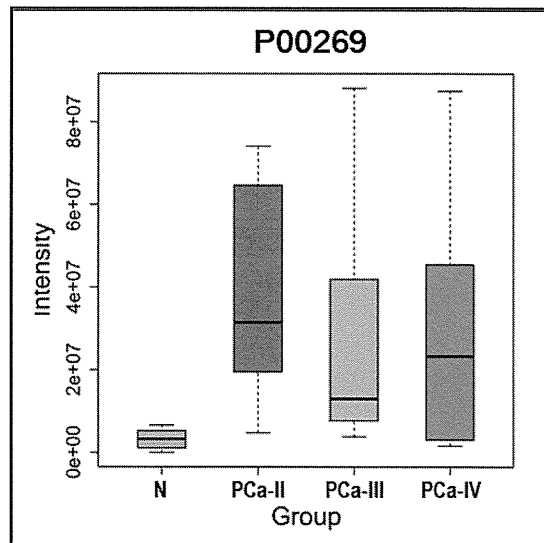
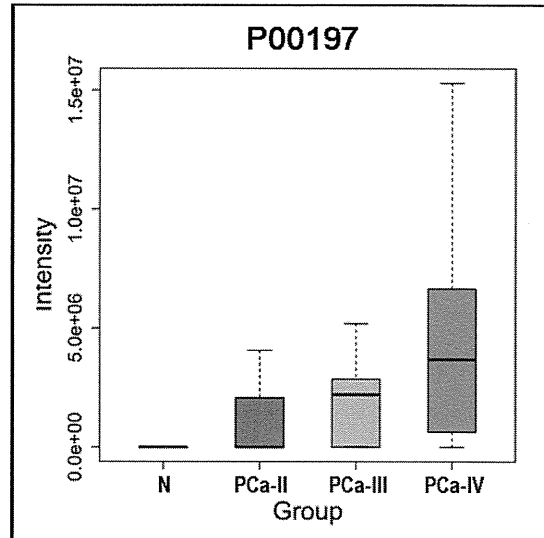
健常者 30 例、膵癌ステージ II15 例、膵癌ステージ III25 例、膵癌ステージ IV25 例の血中エクソソームタンパク質プロファイリングにより、5 種の早期膵癌診断マーカー候補タンパク質を同定することに成功した。しかしながら、LC-MS/MS 分析では検出された全ペプチドのアミノ酸配列決定が可能なわけではなく、むしろ大半が未同定のままとなっている。その原因はサンプルの複雑性に比して質量分析計自体のスキャンスピードが足りない場合、ペプチド量が少なく十分なクオリティーの MS/MS スペクトルが得られない場合など様々である。

これら未同定ペプチドの中にもバイオマーカー候補分子が含まれる可能性は大いにあるため、今後は 2D-LC-MS/MS を用いた高深度タンパク質同定解析を実施してさらなる解析の網羅性向上を目指す。具体的にはエクソソームタンパク質のトリプシン消化物をイオン交換カラムや塩基性逆相カラムで前分画して複雑性を低減した後に LC-MS/MS 分析を行う予定である。

本研究で同定された膜タンパク質バイオマーカー候補 2 種については、市販抗体を入手し、エクソソーム表面抗原である CD9 とのエクソソームサンドイッチ ELISA の構築を目指す。当 ELISA 系が完成

すれば、慢性膵炎など良性疾患も含む独立症例セットを用いた検証試験を行い、特にステージ I、II 膵癌の診断感度、特異度を正確に評価する。エクソソームに内包されていると考えられる 3 タンパク質についてはエクソソームサンドイッチ ELISA では測定する事ができないため、途中で溶解のステップを加えた改良型エクソソームタンパク質 ELISA システムを構築予定である。

最終的に非侵襲的で安価に行える血清診断にて初期膵癌の検出やリスク診断までもが可能になれば、膵癌による死亡率は劇的に改善されると期待できる。



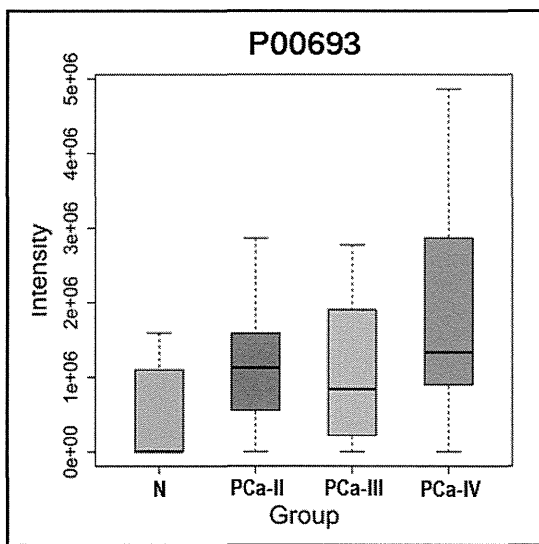
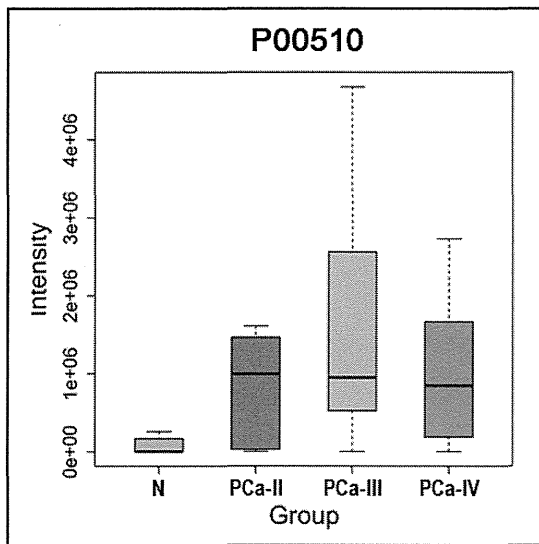


図5 膵癌エクソソームバイオマーカー候補分子5種の質量分析定量結果。左のボックスから健常者30例、膵癌ステージIII15例、膵癌ステージIII25例、膵癌ステージIV25例の定量値を表す。各ボックス中の太横線は中央値を表す。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy.

Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Naomi Saichi, Risa Fujii, Yoshihisa Yamano, Koji Ueda.

Annals of Clinical and Translational Neurology

2015; 2 (3); 231-240.

2. Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for γ -H2AX production and DNA repair.

Kenbun Sone, Lianhua Piao, Makoto Nakakido, Koji Ueda, Thomas Jenuwein, Yusuke Nakamura, Ryuji Hamamoto

Nature Communications

2014; 5; 5691-56.

3. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes.

Koji Ueda, Nobuhisa Ishikawa, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Hidewaki Nakagawa

Scientific Reports

2014; 4; 6232.

4. SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation.

Ryuji Hamamoto, Gouji Toyokawa, Makoto Nakakido, Koji Ueda, Yusuke

Nakamura

Cancer Letters

2014; 351(1):126-33.

5. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.

Takashi Fujitomo, Yataro Daigo, Koichi Matsuda, Koji Ueda, Yusuke Nakamura

International Journal of Oncology

2014; 45(1):147-56.

2. 学会発表

国際会議

1. Circulating exosomes as new biomarker resources for lung cancer.

K. Ueda

9th Early Detection Research Network (EDRN) Scientific Workshop

9/Sep/2014 (MD, USA)

2. Proteome-wide profiling of serum exosomes for identification of scirrhous gastric cancer biomarkers.

Koji Ueda, Isamu Hoshino, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Hisahiro Matsubara, and Sumio Sugano

13th Human Proteome Organization World Congress

6/Oct/2014 (Madrid, Spain)

国内会議

1. Proteome-wide analysis of circulating extracellular vesicles for cancer early detection.

Koji Ueda, Isamu Hoshino, Naomi Saichi, Risa Fujii, Hisahiro Matsubara, and Sumio Sugano

第73回日本癌学会学術総会

25/Sep/2014 (横浜)

2. Development of Exosomal Biomarkers for Scirrhous Gastric Cancer.

Koji Ueda, Risa Fujii, Naomi Saichi, Isamu Hoshino, Hisahiro Matsubara, Sumio Sugano

日本プロテオーム学会 2014 年会

15/Jul/2014 (つくば)

3. Comprehensive proteome profiling of circulating extracellular vesicles for development of cancer biomarkers.

K. Ueda

第一回日本細胞外小胞学会 (JSEV) 年会

27/Aug/2014 (広島)

4. Proteome-wide Profiling of Circulating Exosomes: For Cancer Diagnosis, Treatment, and DDS.

K. Ueda

第一回トランスオミクス研究会

5/Dec/2014 (仙台)

5. 血中エクソソームの定量プロテオーム解析による腫瘍マーカー開発.

K. Ueda

第 10 回日本臨床プロテオーム研究会

10/May/2014 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. ヒト T リンパ好性ウイルス-1 (HTLV-1) 関連脊髄症 (HAM/TSP) の検査方法、及び検査用キット

発明者 植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

日本出願番号 特願 2014-226719

日本出願日 2014/11/7

出願国 日本

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目 「癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発」

機関名 国立大学法人 東京大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Circulating exosomes as new biomarker resources for lung cancer	Koji Ueda	9th Early Detection Research Network (EDRN) Scientific Workshop (MD, USA)	9-Sep-14	国外
Proteome-wide profiling of serum exosomes for identification of scirrhous gastric cancer biomarkers	Koji Ueda, Isamu Hoshino, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Hisahiro Matsubara, and Sumio Sugano	13th Human Proteome Organization World Congress (Madrid, Spain)	6-Oct-14	国外
Proteome-wide analysis of circulating extracellular vesicles for cancer early detection	Koji Ueda, Isamu Hoshino, Naomi Saichi, Risa Fujii, Hisahiro Matsubara, and Sumio Sugano	第73回日本癌学会学術総会（横浜）	25-Sep-14	国内
Development of Exosomal Biomarkers for Scirrhous	Koji Ueda, Risa Fujii,	日本プロテオーム学会2014年会（つ	15-Jul-14	国内

Gastric Cancer	Naomi Saichi, Isamu Hoshino, Hisahiro Matsubara, Sumio Sugano	くば)		
Comprehensive proteome profiling of circulating extracellular vesicles for development of cancer biomarkers	Koji Ueda	第一回日本細胞外小胞学会 (JSEV) 年会	27-Aug-14	国内
Proteome-wide Profiling of Circulating Exosomes: For Cancer Diagnosis, Treatment, and DDS.	Koji Ueda	第一回トランスオミクス研究会 (東北メディカルメガバンク機構)	5-Dec-14	国内
血中エクソソームの定量プロテオーム解析による腫瘍マーカー開発	Koji Ueda	第10回日本臨床プロテオーム研究会 (新宿)	10-May-14	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別名
A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy	Makoto Ishihara, Natsumi Araya, Tomoo Sato, Naomi Saichi, Risa Fujii, Yoshihisa Yamano, Koji Ueda	Annals of Clinical and Translational Neurology	01/2015	国外
Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for γ -H2AX production and	Kenbun Sone, Lianhua Piao, Makoto Nakakido,	Nature Communications	12/2014	国外

DNA repair.	Koji Ueda, Thomas Jenuwein, Yusuke Nakamura, Ryuji Hamamoto			
Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes.	Koji Ueda, Nobuhisa Ishikawa, Ayako Tatsuguchi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Hidewaki Nakagawa	Scientific Reports	08/2014	国外
SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation.	Ryuji Hamamoto, Gouji Toyokawa, Makoto Nakakido, Koji Ueda, Yusuke Nakamura	Cancer Letters	05/2014	国外
Identification of a nuclear protein, LRR42, involved in lung carcinogenesis.	Takashi Fujitomo, Yataro Daigo, Koichi Matsuda, Koji Ueda, Yusuke Nakamura	International Journal of Oncology	05/2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

RESEARCH ARTICLE

A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy

Makoto Ishihara¹, Natsumi Araya², Tomoo Sato², Naomi Saichi¹, Risa Fujii¹, Yoshihisa Yamano² & Koji Ueda¹

¹Division of Biosciences, Functional Proteomics Center, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Department of Rare Diseases Research, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Japan

Correspondence

Koji Ueda, Division of Biosciences, Functional Proteomics Center, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, CREST hall 1F, Institute of Medical Science, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, Japan, 108-8639. Tel: +81-3-6409-2062; Fax: +81-3-6409-2063; E-mail: k-ueda@ims.u-tokyo.ac.jp

Funding Information

This work was supported by grant-in-aid for Research Project on Overcoming Intractable Diseases from the Ministry of Health Labour and Welfare Japan and grant-in-aid for Young Scientists (B) (23701090) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science & Technology Japan.

Received: 19 November 2014; Accepted: 9 December 2014

doi: 10.1002/acn3.169

Abstract

Objective: Human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1) associated myelopathy/tropic spastic paraparesis (HAM/TSP) is induced by chronic inflammation in spinal cord due to HTLV-1 infection. Cerebrospinal fluid (CSF) neopterin or proviral load are clinically measured as disease grading biomarkers, however, they are not exactly specific to HAM/TSP. Therefore, we aimed to identify HAM/TSP-specific biomarker molecules and establish a novel less-invasive plasma diagnostic model for HAM/TSP. **Methods:** Proteome-wide quantitative profiling of CSFs from six asymptomatic HTLV-1 carriers (AC) and 51 HAM/TSP patients was performed. Fourteen severity grade biomarker proteins were further examined plasma enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assays ($n = 71$). Finally, we constructed three-factor logistic regression model and evaluated the diagnostic power using 105 plasma samples. **Results:** Quantitative analysis for 1871 nonredundant CSF proteins identified from 57 individuals defined 14 CSF proteins showing significant correlation with Osame's motor disability score (OMDS). Subsequent ELISA experiments using 71 plasma specimens confirmed secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) demonstrated the same correlations in plasma ($R = -0.373$ and $R = 0.431$, respectively). In this training set, we constructed a HAM/TSP diagnostic model using SPARC, VCAM1, and viral load. Sensitivity and specificity to diagnose HAM/TSP patients from AC (AC vs. OMDS 1–11) were 85.3% and 81.1%, respectively. Importantly, this model could be also useful for determination of therapeutic intervention point (OMDS 1–3 + AC vs. OMDS 4–11), exhibiting 80.0% sensitivity and 82.9% specificity. **Interpretation:** We propose a novel less-invasive diagnostic model for early detection and clinical stratification of HAM/TSP.

Introduction

The RNA retrovirus human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1) is endemic in Japan, Caribbean basin, Iran, Africa, South America, and the Melanesian islands.¹ Number of infected individuals is currently estimated at around 30 million worldwide,² in which 5% of virus carriers develop HTLV-1 associated myelopathy/tropic spastic paraparesis (HAM/TSP) or adult T-cell leukemia (ATL) after asymptomatic phase of typically over 30 years. Inflammation of spinal cord is a principal symptom of HAM/TSP patients, causing progressive sclerotic,

gait impairment, or urination disorder.³ However, no curative therapy for HAM/TSP has been developed except for anti-inflammatory treatments by INF- α or steroids,⁴ whereas excessive or long-term use of these drugs can increase the risk of adverse events.^{5,6} Hence, the treatment regimens should be carefully managed based on a thorough assessment of disease stage and activity. As for the severity grading of HAM/TSP, Osame's motor disability score (OMDS) is widely used to define disease stages and estimate the rate of disease progression.⁷ Although this scale is helpful to evaluate consequential impairment of motor functions, development of molecular-based

diagnostics has been a major challenge for early detection and adequate therapeutic intervention of HAM/TSP.

To identify HAM/TSP-specific biomarkers, a variety of genomic or proteomic analyses were performed for infected T cells and plasma samples,⁸⁻¹⁰ however, comprehensive investigation for cerebrospinal fluid (CSF) has not been launched in spite of the most fundamental site of HAM/TSP lesion. Therefore, we intended to acquire the first proteome-wide view of CSFs reflecting HAM/TSP-associated alteration of spinal cord microenvironment. Following the statistical identification of severity grade biomarkers from CSFs, we attempted to construct a HAM/TSP diagnostic model using less-invasive plasma specimens.

Subjects and Methods

Participants

CSF specimens (from 51 HAM/TSP patients and six asymptomatic carriers [ACs]) and plasma specimens (from 50 HAM/TSP patients and 55 ACs) were collected in St. Marianna University School of Medicine and kept frozen at -80°C until just before use. The research procedure was explained and written informed consent was obtained from all the patients. This study was approved by the Ethical Committee of the University of Tokyo (approval code 14-1) and the Ethical Committee of St. Marianna University School of Medicine.

LC/MS/MS analysis

The 20 μL each of CSFs was lyophilized and dissolved in 8 mol/L Urea (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in 50 mmol/L ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After reduction with 5 mmol/L tris(2-carboxyethyl)phosphine (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30 min, proteins were alkylated with 25 mmol/L Iodoacetamide (Sigma-Aldrich) at ambient temperature for 45 min. Following fourfold dilution with 50 mmol/L ammonium bicarbonate, proteins were digested with immobilized trypsin (Thermo Scientific, Bremen, Germany) at 37°C for 6 h. Digested samples were then desalted by Oasis HLB $\mu\text{Elution}$ plate (Waters, Milford, MA) and analyzed by liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The peptides were separated on Ultimate 3000 RSLC nano-HPLC system (Thermo Scientific) equipped with 0.075×150 mm C_{18} tip-column (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) using two-step linear gradient comprising 2–35% acetonitrile for 95 min and 35–95% acetonitrile for 15 min in 0.1% formic acid at the flow rate of 250 nL/min. The eluates were analyzed with LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Scientific). Spectra were collected using full MS scan mode over the

mass-to-charge (m/z) range 400–1600. MS/MS was performed on the top 20 ions in each MS scan using the data-dependent acquisition mode with dynamic exclusion enabled.

2D-LC/MS/MS analysis

CSF tryptic digests were resolved in 10 mmol/L ammonium formate (Sigma-Aldrich) in 25% acetonitrile and fractionated with 0.2×250 mm strong cation exchange monolith column (GL Science, Tokyo, Japan). The samples were eluted with the gradient from 10 mmol/L to 1 mol/L of ammonium formate in curve = 3 mode within 70 min using Prominence HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The eluate was separated into 11 fractions and analyzed by LC/MS/MS.

Protein/peptide identification

MS/MS spectra were searched against SwissProt database version 2012_06 (20,232 human protein sequences) using SEQUEST algorithm on ProteomeDiscoverer 1.3 software (Thermo Scientific). Proteins satisfying the false discovery rate (FDR) $<1\%$ by Peptide Validator FDR estimation algorithm on ProteomeDiscoverer was accepted. Gene ontology (GO) term analysis was performed using DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

Label-free quantification analysis

The LC/MS/MS data from 57 CSF samples were imported on the Expressionist server (Genedata AG, Basel, Swiss) and processed along the workflow shown in Figure S1. The four-step Chromatogram Chemical Noise Subtraction was performed, composed of (1) RT structure removal = true, minimum RT length = 2 scans, (2) m/z structure removal = true, minimum m/z length = 6 scans, (3) RT window = 501 scans, quantile subtraction = 90%, and (4) RT structural removal = true, minimum RT length = 2 scans. Data points with intensity <500 were clipped to zero. Again, Chromatogram Chemical Noise Subtraction was performed using chromatogram smoothing = true, RT windows = 5 scans, and estimator = Moving average. After applying Chromatogram Grid with a distance of scan counts = 10, RT variety among 57 samples was normalized by Chromatogram RT Alignment: m/z windows = 11 points, RT windows = 11 scans, gap penalty = 1, RT search interval = 2 min, alignment scheme = pairwise alignment based tree. Peaks were detected by Chromatogram Summed Peak Detection: summation window = 20 scans, overlap = 10, minimum peak size = 6 scans, maximum merge distance = 1 point,