

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）（斎藤豊班）
研究課題名：「消化管がんに対する特異的蛍光内視鏡の開発とその臨床応用」
（分担）研究報告書

「早期がんの特異的な膜タンパク抗原の探索」

担当責任者 尾野雅哉

国立がん研究センター研究所・創薬臨床研究分野・ユニット長

研究要旨

われわれが開発した 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry(LC/MS))はハイスループットなショットガンプロテオミクス解析手法である。2DICAL を用い大腸がん診断用抗体蛍光プローブを作成可能な大腸がん特有のタンパク質（特に、膜タンパク質および特異酵素）を探索することを目的に本分担研究を行っている。本年度は 2DICAL を改良し、タンパク質の同定精度と検索タンパク質のデータ視認性を高め、2DICAL で得られるタンパク質 big data から、効率的に特異的タンパク質抗原を検出する手法として、新規のパスウェイ解析法を導入した。

A, 研究目的

国立がん研究センター中央病院消化管内視鏡科の内視鏡生検検体を、創薬臨床研究分野で独自に開発したプロテオーム解析技術 2DICAL(2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry(LC/MS))にて解析し、大腸がん診断用抗体蛍光プローブを作成可能な大腸がん特有のタンパク質（特に、膜タンパク質および特異酵素）を探索することを目的とする。

B, 研究方法

1) 倫理要件を満たした大腸内視鏡生検材料を用いる。大腸内視鏡で正常粘膜、腺腫、癌を採取し、直後にサンプルチューブに移し、-80度で保存する。サンプル処理時に解凍し、メタノールで固定する。プロトコールにのっとた方法でサンプルをトリプシン処理し、質量分析計で質量データを取得する。質量データを 2DICAL にて解析

し、プロテオームデータファイルを獲得する。正常粘膜、腺腫、癌で変化するタンパク質を同定し、個々の変化、並びに、パスウェイでの変化から、正常粘膜に対して腺腫、癌で特異的に変化するタンパク質を同定する。

2) プロテオーム解析に当たっては、技術の進歩に対応して、随時、2DICAL を改良する。プロテオーム解析から得られる網羅的データを解析するために、既存のパスウェイなどを利用した解析ソフトウェアを利用し、より高い精度で大腸がん診断用抗体蛍光プローブを作成可能な大腸がん特有なタンパク質を探索する。

(倫理面への配慮)

国立がん研究センターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が漏出することが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮した患者より得られた生検検体を用いる。

C、研究結果

本研究に先立つ研究班で、正常粘膜 17 例、腺腫 17 例、大腸癌 15 例の生検材料を用いて、質量分析計で質量データを取得し、プロテオームデータファイルの獲得が行われている。その解析により、5975 タンパク質が検出され、正常粘膜、腺腫、癌におけるタンパク質量の変動を 9 パターンに分類して比較検討することが可能であった。統計学的手法を用いて腺腫の段階から変動するタンパク質を選別し、複数の変動タンパク質を同定することができた。本年度は、これらのデータを用いて、質量分析計で生成されるペプチドデータから、より効率よくタンパク質の量的変動を取得するために新しくプログラムを開発し、システムとして稼働させた。さらに、既存のソフトウェアであるクロスパスを用いて、正常粘膜、腺腫、癌で特異的に変化するパスウェイから、高い精度での大腸がん診断用抗体蛍光プローブを作成可能な大腸がん特有のタンパク質を探索するシステムを導入したが、本年度は、2DICAL で得られたプロテオームデータファイルをクロスパスで効率よく解析できるプログラムの開発を行った。

D、考察

一つの生検材料からのプロテオームプロファイルの解析は困難であることが予想されたが、2DICAL を用いることにより、十分なプロテオームデータが確保され、正常粘膜、腺腫、癌のプロテオームを比較解析できることも明らかとなった。このシステムを用いることにより、当初の目的である大腸がん診断用抗体蛍光プローブが作成可能な大腸がん特有のタンパク質（特に、膜タンパク質および特異酵素）の探索を進めることは可能であるが、システムには改

善の余地があるため、本年度は、質量分析計で測定されたデータの解析精度を高め、網羅的なプロテオームデータの活用が可能なシステムの開発に傾注した。いくつかのアプリケーションを開発し、これまでの解析例に応用することが可能であることは確認できたが、システムとして完成するためには、さらなる症例を解析し、検証を進めていく必要がある。これらは来年度の研究の重要な課題として取り組む必要がある。

E、結論

- 1、大腸生検材料から 2DICAL を用いて、正常粘膜、腺腫、癌で変動するタンパク質を同定することが可能であった。
- 2、より高い精度での大腸がん診断用抗体蛍光プローブを開発するためには、解析システムのさらなる改良や網羅的情報を解析する既存の方法の導入が必要である。
- 3、来年度は、新規の臨床材料の解析を進め、改良された解析システムと新規に導入されたシステムを用い、大腸がん診断用抗体蛍光プローブを作成可能な大腸がん特有のタンパク質を探索する。

F、健康危険情報

特になし

G、研究発表

1、論文発表

- 1、Taira N., Yamaguchi T., Kimura J., Lu Z. G., Fukuda S., Higashiyama S., Ono M., Yoshida K.
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, 717-22. (2014).
- 2、Matsukawa S., Morita K. I., Negishi A., Harada H., Nakajima Y., Shimamoto H., Tomioka H., Tanaka K., Ono M., Yamada T., Omura K.
Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma.
Cancer Med. 3, 349-61. (2014).
- 3、Kobayashi E., Satow R., Ono M., Masuda M., Honda K., Sakuma T., Kawai A., Morioka H., Toyama Y., Yamada T.
MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma.
Oncology. 86, 94-103. (2014).
- 4、Masuda M., Chen W. Y., Miyanaga A., Nakamura Y., Kawasaki K., Sakuma T., Ono M., Chen C. L., Honda K., Yamada T.
Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling. Mol. Cell. Proteomics. 13, 1429-38. (2014)
- 5、Kagami Y., Nihira K., Wada S., Ono M., Honda M., Yoshida K.
Mps1 phosphorylation of condensin II controls chromosome condensation at the onset of mitosis.
Journal of cell biology. 205, 781-790. (2014).
- 6、Kamita M., Mori T., Sakai Y., Ito S., Gomi M., Miyamoto Y., Harada A., Niida S., Yamada T., Watanabe K., Ono M.
Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis
Proteomics. in press. (2015).
- 7、尾野雅哉
プロテオーム解析システム 2DICAL を用いたバイオマーカー開発。
医学のあゆみ. 251, 984-988. (2014).
- 8、尾野雅哉, 齋藤豊, 山田康秀
LCMS 解析手法 2DICAL を用いた大腸癌関連マーカーの開発。
G.I. Research. 23, 31-37. (2015).
- 2、学会発表
1. 4th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology
平成 26 年 4 月 26 日 (Dalian International Conference Center, Dalian, China)
Ono M.,
Biomarker Discovery of Pancreas Cancer and Gastrointestinal Cancer by 2dical - 2-Dimensional Image Converted Analysis of LC/MS.
2. 62nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics
平成 26 年 6 月 18 日 (Baltimore Convention Center, Baltimore, MD, USA)
Ono M., Kamita M, Kawasaki K, Gomi M, Sakuma T, Otake Y, Sakamoto T, Nakajima T, Matsuda T, Saito Y, Yamada T
Proteomic analysis of biopsy specimen revealed the profiles of

adenoma-carcinoma sequence of colorectal cancer

3. 第10回日本臨床プロテオーム研究会
平成26年5月10日(京王プラザホテル、東京都)
尾野雅哉
2DICAL 解析を基盤としたプロテオーム臨床応用の将来展望
4. 日本プロテオーム学会 2014 年会
平成26年7月27日(つくば国際会議場、つくば市)
本田一文、尾野雅哉、山田哲司、アレイ技術・抗体基盤・質量分析基盤プロテオミクスの融合-がんバイオマーカー探索と検証に向けて-
5. 第73回日本癌学会学術総会
平成26年9月26日(パシフィコ横浜、横浜市)
仁平直江、吉田清嗣、尾野雅哉
新規 p53 関連遺伝子 AREG は DNA 損傷下での microRNA 代謝制御に関わる
6. 第73回日本癌学会学術総会
平成26年9月27日(パシフィコ横浜、横浜市)
加賀美裕也、仁平啓史、尾野雅哉、吉田清嗣
Mps1/TTK は condensin II のリン酸化を介して染色体凝集を制御する
7. 第73回日本癌学会学術総会
平成26年9月27日(パシフィコ横浜、横浜市)
小松正人、吉丸哲郎、尾野雅哉、松尾泰佑、清谷一馬、三好康雄、笹三徳、片桐豊雅

悪性度の高いトリプルネガティブ乳癌における核内 19S-proteasome 関連遺伝子(nPAG1)の役割

8. 第73回日本癌学会学術総会
平成26年9月27日(パシフィコ横浜、横浜市)
笹木有佑、山田康秀、尾野雅哉、紙田正博、赤須孝之
プロテオーム解析で見る StageIII 大腸癌における PIK3CA 遺伝子変異
9. 第73回日本癌学会学術総会
平成26年9月26日(パシフィコ横浜、横浜市)
新井恵吏、高橋順子、坂本裕美、尾野雅哉、宮田彩香、藤元博行、山田哲司、吉田輝彦、金井弥栄
逆行分析前方シミュレーションモデルを用いた腎細胞がんのバイオマーカーならびに治療標的分子の同定

H, 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1、特許
なし
- 2、実用新案登録
なし
- 3、その他
なし