

201438098A

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

がん細胞が生成する尿中蛋白質断片の検出を応用した
肺腺癌早期診断システム樹立に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 中里 雅光

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働科学研究委託費による委託業務として、国立大学法人宮崎大学が実施した平成26年度「がん細胞が生成する尿中蛋白質断片の検出を応用した肺腺癌早期診断システム樹立に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

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

がん細胞が生成する尿中蛋白質断片の検出を応用した
肺腺癌早期診断システム樹立に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 中里 雅光

平成27(2015)年 3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

がん細胞が生成する尿中蛋白質断片の検出を応用した -----	1
肺腺癌早期診断システム樹立に関する研究	
中里 雅光	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 臨床試験の施行と総括、研究計画の統括 -----	9
中里 雅光	
2. 尿中蛋白質断片の質量および構造解析 -----	1 3
高尾 敏文	
3. 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行 -----	1 7
清水 英治	
4. 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行 -----	2 1
西岡 安彦	
5. 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行 -----	2 5
青景 圭樹	
6. 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行 -----	2 9
柳 重久	

III. 学会等発表実績 -----	3 3
--------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

成果報告（総括）

がん細胞が生成する尿中蛋白質断片の検出を応用した 肺腺癌早期診断システム樹立に関する研究

業務主任者 中里雅光 宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野 教授

研究要旨 研究代表者らは、独自の N 末端ペプチド選択的単離法と安定同位体標識法を駆使し、尿中に排出される蛋白質断片を高感度で網羅的に構造解析できる手法を確立している。研究代表者らは上述の手法を用い、従来の肺腺癌マーカーである血清 CEA と比較して飛躍的に高精度である 2 種類の新規尿中マーカー、蛋白質断片 A、蛋白質断片 B をすでに発見している。本研究の目的は、これらの 2 種類の新規尿中マーカーについて、肺腺癌早期診断における有効性を多面的かつ前向きに検証し、検診への導入を目指した高精度の非侵襲的肺腺癌早期診断技術を確立することである。本年度は本研究計画の 5 つのアーム全ての研究プロトコルを確定し、5 つの分担研究施設の倫理委員会での承認を得て、平成 26 年 10 月 28 日より患者登録を開始した。平成 27 年 3 月 10 日現在、合計で 184 名の臨床情報と血清と尿検体収集と、7 名の I 期肺腺癌症例の肺癌組織試料収集を終了した。この症例数は 26 年度の目標症例数を満たす進行度であり、順調に臨床研究を進捗している。新規尿中マーカーの解析プロトコルに関して、本年度は、本法を改良し一連の分析に要する時間を短縮し、大幅なスピードアップ (7 検体/12 日から 28 検体/5 日)に成功した。これまでに 28 検体の新規尿中マーカーの測定が終了し、解析を進めている。また、新規がん診断マーカー候補として 16 種類の蛋白質断片を同定しているが、それらに対するポリクローナル抗体を作成した。その内、6 種についてその特異性を確認した。さらに本年度は、肺腺癌予後予測マーカー発現に関して、TTF-1 発現の解析プロトコルを確立した。

中里雅光・宮崎大学 教授
高尾敏文・大阪大学 教授
清水英治・鳥取大学 教授
西岡安彦・徳島大学 教授
青景圭樹・国立がん研究センター東病院 医員
柳 重久・宮崎東病院 呼吸器内科医師

A. 研究目的

本研究の目的は、研究代表者らが発見した 2 種類の新規尿中マーカーについて、肺腺癌早期診断における有効性を多面的かつ前向きに検証し、検診への導入を目指した高精度の非侵襲的肺腺癌早期診断技術を確立することである。

肺癌は悪性腫瘍死亡数の第一位である。鋭敏かつ非侵襲的な早期診断マーカーがないことが、根治可能な肺癌の発見を遅らせている大きな要因である。癌細胞から特異的に産生されるプロテアーゼは、癌細胞と線維芽細胞等の癌微小環境構成細胞に発現する受容体や接着分子および増殖因子を切断し、癌進展を統制している。切断される基質は、種類のみならずその切断部位も多様であるが、通常のプロテオミクス技術では切断部位まで特定できない。研究代表者らは、独自の N 末端ペプチド選択的単離法 (特願 2008-028091) と安定同位体標識法を駆使し、尿中に排出される蛋白質断片を高感度で網羅的に構造解析できる手法を確立している。研究代表者らは網羅的質量解析を基盤とする上述の手法を用

い、従来の肺腺癌マーカーである血清CEAと比較して飛躍的に高精度である2種類の新規尿中マーカーをすでに発見している。これらのマーカーは感度89%、特異度93%と感度86%、特異度88%であり、従来の肺腺癌マーカーの血清CEA(感度47%、特異度89%)と比べ、飛躍的に高精度であった。

本研究は、生体内酵素的切断反応検出システムという独自の手法で癌生物学に迫るもので、科学・技術的な波及効果が高い。生体内での細胞生物学的特性と分子動態に関する知見を全く新しい切り口から得ることが可能であり、多くの難治性疾患の病態解明へ応用できる。尿は最も簡便に得られる生体試料で、従来の胸部CT検診と比較し侵襲がない。本研究の遂行により、肺癌に対し簡便で幅広く実施できる早期診断法の開発が期待できる。

B. 研究方法

5施設の呼吸器内科と呼吸器外科の症例を対象に、試料収集と臨床情報収集を行う。2つの新規尿中マーカーを測定し、肺腺癌診断での精度を検証する。肺癌罹患ハイリスク群を対象に、新規尿中マーカーと既存マーカーとの肺癌早期診断陽性率を比較する。早期肺腺癌症例の手術検体を用い、既知の予後予測マーカーと治療効果予測マーカーと新規尿中マーカーとの関連を検討する。並行して、新規尿中マーカーに対するエンザイムイムノアッセイ(EIA)による迅速診断法の開発のため、抗体を作成し特異度と感度を検証する。

研究計画(1) 新規尿中マーカーの肺腺癌における診断精度の検証(平成26-28年度)

肺腺癌200例、非悪性呼吸器疾患150例、他癌腫100例、重喫煙者30例、健常人100例の尿検体を収集する。肺腺癌症例と各群間での新規尿中マーカー値と血清腫瘍マーカー値を測定する。2種の尿中マーカーのROC曲線を作成し

ROC-AUCを算出する。先行研究で得られたカットオフ値を基に感度、特異度、陽性・陰性尤度比を検証する。

研究計画(2) 肺腺癌罹患ハイリスク群を対象とした新規尿中マーカーの早期診断ツールとしての有効性に関する縦断研究(平成26-28年度)

①50歳以上の重喫煙者、②特発性肺線維症症例を対象として、各々参加時と4ヶ月毎に採尿、血清採取を行い、12ヶ月毎に胸部CTを施行する。肺腺癌診断前および診断時での尿中マーカーと血清腫瘍マーカーの陽性率を比較する。目標症例数は各群50例、観察期間は2年とする。

研究計画(3) 小型スリガラス病変に対するサロゲートマーカーとしての新規尿中バイオマーカーの有効性に関する縦断研究(平成26-28年度)

胸部画像上の20mm以下のスリガラス病変症例を対象として、参加時と3ヶ月毎に採尿、血清採取を、参加時と3、6、12、24ヶ月後に胸部CTを施行する。肺腺癌診断前および診断時での尿中マーカーと血清腫瘍マーカーの陽性率を比較する。目標症例数は各群50例、観察期間は2年とする。

研究計画(4) 患者予後とバイオマーカーとしての有効性の検証(平成26-28年度)

肺腺癌80例を対象として診断時に新規尿中マーカーを測定する。観察期間を2年とし予後調査を行う。中央値を基準に尿中マーカー高値群と低値群に群別化し、生存曲線と2年生存率を比較する。肺腺癌手術対象50例の新規尿中マーカーを測定し、術後再発率との相関を検証する。研究計画(5) 予後・治療効果予測マーカーの発現との関連の検証(平成26-28年度)

肺腺癌手術対象50例の術前術後の新規尿中マーカーを測定する。手術検体を用い、既知の予後予測マーカー(TTF-1発現、p16/CDH13プロモーター領域メチル化)と治療効果予測マーカー(EGFRとEML4-ALKの遺伝子変異)との関連を検討する。

・生化学的検証

16種類の蛋白質断片のC末端アミノ酸配列より抗原ペプチドをデザイン、合成し、それらを抗原として、トリ、或は、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作成する(外注)。抗原ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを作成し、免疫終了後に得られた血清1mLを用いて、アフィニティー精製を行う。ELISAにより抗体価を算出した後、8種について、抗原、及び、偽抗原を結合したBSAを用いてウエスタンブロッ

ティング法により特異性を調べる。

・質量分析によるマーカー探索

尿検体を採取し、前処理、分析データ取得、取得データによる統計解析の手順で研究を行う。まず前処理として、尿検体を200～250倍に濃縮し、洗浄を行い、濃縮検体を得る。この濃縮検体の蛋白質定量を行い、得られた値をもとに検体の一部を用いて10 mg/mLの濃度に緩衝液で調整して、その後の分析行程に用いる。分析は、まず試料を還元アルキル化の後に、独自の手法により $H_2^{18}O$ 存在下でトリプシン消化する（ペプチドの安定同位体標識）。脱塩、精製後、iTRAQ (8-plex)によるラベル化を行い、8検体を混合、脱塩、精製した後、蛋白質のC末端由来のトリプシン消化ペプチド(=>蛋白質断片の解析)のみをイオン交換クロマトグラフィーにより分画する。その画分を脱塩、精製後、Nano-LC-MALDI-MS/MSにより測定を行い、C末端由来のトリプシン消化ペプチドのみを独自に開発したプログラム(iSpec)を用いて選別、抽出する。この取得データが統計解析に使用できるだけの条件を満たしているかどうかを、独自のデータベース連動型プログラム(iData)により評価し、採用されたデータのみを用いて統計解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)に則って実施し、各分担研究施設の倫理委員会で研究計画書の内容および実施の適否について、科学的および倫理的な側面が審議・承認された上で行った。

C. 研究結果及びD. 考察

平成26年9月6日に研究代表者及び各研究分担者出席のもと第1回研究推進プロジェクト班会議を開催し、本研究計画の5つのアーム全ての研究プロトコルを確定した。平成26年9月24日に研究代表施設の倫理審査委員会に臨床計画研究を申請したことをスタートとして、全ての研究分担施設の倫理審査委員会に臨床計画研究を申請した。研究代表施設と4つの研究分担施設で全ての研究計画の審査が終了し、

各施設の倫理審査委員会の承認を得た。残りの1つの研究分担施設では1つの研究計画について倫理委員会の審議・承認が終了し、残り2つの研究計画について現在迅速審査中である。平成26年10月28日より患者登録を開始した。平成27年3月10日現在、184名の文書で同意を得た研究対象者に本研究を実施した。184名の臨床情報と血清と尿検体収集と、7名のI期肺腺癌症例の肺癌組織試料収集と臨床情報と血清と尿検体収集を終了した。内訳は、研究計画(1)(肺腺癌例31例、非悪性呼吸器疾患例48例、他癌腫21例、重喫煙者10例、健常者59例)、研究計画(2)(重喫煙者10例、特発性肺線維症症例7例)、研究計画(3)(小型スリガラス病変症例7例)、研究計画(4)(肺腺癌例23例、I期肺腺癌8例)、研究計画(5)(肺腺癌例7例)であった(※症例数は当該年度に宮崎大学、鳥取大学、徳島大学、国立がん研究センター東病院、宮崎東病院で収集を終了した症例数。重喫煙者と特発性肺線維症症例で研究計画(1),(2)に同時参加、肺腺癌症例で研究計画(1),(4),(5)に同時参加あり)。26年度の目標症例数を満たす進行度であり、現在解析を進めている。また、5つの全ての臨床研究において有害事象はなかった。

・生化学的検証

新規がん診断マーカー候補として16種類の蛋白質断片を同定しているが、それらに対して作成したポリクローナル抗体の内、8種について特異性を確認した。その結果、6種について蛋白質断片に特異的に反応することがわかった。

・質量分析によるマーカー探索

新規尿中マーカーのデータ解析プロトコルに関して、データの確実性を向上させるための方法を確立した。また、これまでの分析プロトコルを改良し、一連の分析に要する時間を短縮し、スループットを上げた。具体的には、全ての工程：①試料前処理(尿から蛋白質を単離、定量)、②イオン交換、及び、逆相クロマトグラフィーによる分画、③タンデム質量分析、④蛋白質C末端の網羅的同定を見直し、一連の分析に要する時間をこれまでの7検体/12日・1人から14検体/5日・2人と大幅にスピードア

アップした。本年度は 60 検体の試料調製が終了し、28 検体について上記①～④の分析を終了した。

*分析データの精査法の確立

取得データを統計解析により適切な比較を行うために、データ評価を迅速かつ簡便に行えるようなデータベース連動型新規プログラムを構築した (iData)。別のプロジェクト (次世代がん研究戦略推進プロジェクト) で行った 500 検体の分析データを、作成したプログラムにより数値化、グラフ化などで精査し、次の 2 つの観点によるデータ評価法を考案した。すなわち、(1) 1 アッセイ全体 (7 検体+コントロール検体 1) の評価基準として MS/MS スペクトル及び基準ピーク(113)の評価、(2) そのアッセイにおける個々の成分である各検体についての評価、の 2 点を改良した。具体的に用いる数値は、(1)では、分析された MS/MS スペクトルの本数、プロダクトイオンピークの強度と本数、Mascot 検索での同定蛋白質数、基準となるコントロール検体のレポーターピーク(113)の強度の中央値と強度基準以下のピーク数 (棄却数)、(2)では、各検体のレポーターピーク (114~119、121) の強度の中央値と棄却数、とした。これらの 2 つの観点による評価法により、そのアッセイ全体の是非を決定する MS/MS のデータが十分な質であるかどうかの評価と、さらには、含まれる 7 検体のそれぞれについて、サンプル量が不足していたり、他より過剰でなかったかどうかの評価までを、数字と視覚的なグラフの両方から迅速に行うことができるようになった。

さらに本年度は、肺腺癌予後予測マーカー発現に関して、TTF-1 発現の解析プロトコルを確立した。研究推進プロジェクト班会議の実施に関して、平成 26 年 9 月 6 日 (第 1 回) と平成 27 年 1 月 30 日 (第 2 回) に研究計画の進捗状況の報告並びに円滑な研究推進のための研究推進プロジェクト班会議を実施した。

E. 結論

本研究チームは、新規ペプチドの発見と病態との関連解析ならびに肺癌の癌抑制遺伝子の

役割を報告してきた。研究代表者と研究分担者 (高尾)は、癌細胞のプロテアーゼ活性異常に着目し、独自に開発した N 末端ペプチド選択的単離法 (特願 2008- 028091) を用い、尿中に排泄される癌細胞由来の蛋白質断片を高感度で網羅的に解析できる手法を確立している。

本年度は肺癌の臨床研究に関して多くの実績がある徳島大学呼吸器・膠原病内科と国立がん研究センター東病院呼吸器外科を新たに研究分担施設に加え、本研究事業を加速度的に推進するための研究体制を強化した。本研究計画の 5 つのアーム全ての研究プロトコルを確定し、各分担研究施設の倫理委員会での承認を得て、平成 27 年 3 月 10 日現在、184 名の臨床情報と血清と尿検体収集と、7 名の I 期肺腺癌症例の肺癌組織試料収集と臨床情報と血清と尿検体収集を終了した。26 年度の目標症例数を満たす進行度で順調に臨床研究を進捗しており、現在解析を進めている。

飛躍的に高精度な肺癌早期診断システムの樹立は、根治可能な患者数の増加と肺癌死亡数の大幅な減少に貢献することが期待でき、医療成果としての社会貢献は極めて大きい。安全で簡単に採取できる尿検体による検診は、受診率の大幅な向上が期待できる。現在、新規尿中マーカー解析の事業化について企業への導出を進め、新規マーカーの特許について知財戦略支援関連部局と協議している。

F. 健康危険情報

特記事項無し。

G. 研究発表

1. Oda K, Ishimoto H, Yamada S, Kushima H, Ishii H, Imanaga T, Harada T, Ishimatsu Y, Matsumoto N, Naito K, Yatera K, Nakazato M, Kadota JI, Watanabe K, Kohno S, Mukae H.: Autopsy analyses in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 15: 10. (2014)
2. Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M.: Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the

- development of lung adenocarcinoma in mice. *Eur J Pharmacol*, 743: 1-10 (2014)
3. Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Mogami S, Yamada C, Iizuka S, Hattori T, Nakazato M: Rikkunshito ameliorates cachexia associated with bleomycin- induced lung fibrosis in mice by stimulating ghrelin secretion. *Nutr Res*, 34: 876-85 (2014)
 4. Matsumoto N, Miki K, Tsubouchi H, Sakamoto A, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Yoshida M, Souma R, Ishimoto H, Yamamoto Y, Yatera K, Yoshikawa M, Sagara H, Iwanaga T, Mukae H, Maekura R, Kimura H, Nakazato M, Kangawa K.: Ghrelin Administration for Chronic Respiratory Failure: A Randomized Dose-Comparison Trial. *Lung*, in press (2015)
 5. 柳重久、坪内拡張、中里雅光.: 呼吸器疾患における PTEN の役割. *Annual Review 呼吸器* 2015, 107-118 (2015)
 6. Yamamoto H, Awada C, Matsumoto S, Kaneiwa T, Sugimoto T, Takao T, Kikuchi A.: Basolateral secretion of Wnt5a in polarized epithelial cells is required for apical lumen formation. *J Cell Sci*, 128: 1051-1063 (2015)
 7. Kurai J, Watanabe M, Tomita K, Yamasaki HS, Shimizu E.: Influence of Asian dust particles on immune adjuvant effects and airway inflammation in asthma model mice. *PLoS One*, 9: e111831 (2014)
 8. Sakamoto T, Kodani M, Takata M, Chikumi H, Nakamoto M, Nishii-Ito S, Ueda Y, Izumi H, Makino H, Touge H, Takeda K, Yamasaki A, Yanai M, Tanaka N, Igishi T, Shimizu E.: A novel point-of-care system for high-speed real-time polymerase chain reaction testing for epidermal growth factor receptor mutations in bronchial lavage fluids after transbronchial biopsy in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*, 46: 1473-1480 (2015)
 9. Takata M, Chikumi H, Matsunami K, Kodani M, Sakamoto T, Hashimoto K, Nakamoto M, Okada K, Kitaura T, Matsumoto S, Kurai J, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E.: A new rapid method for detecting epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 33: 1040-1048 (2015)
 10. Izumi H, Touge H, Igishi T, Makino H, Nishii-Ito S, Takata M, Nakazaki H, Ueda Y, Matsumoto S, Kodani M, Kurai J, Takeda K, Sakamoto T, Yanai M, Tanaka N, Nirodi C, Shimizu E.: Favorable effect of the combination of vinorelbine and dihydropyrimidine dehydrogenase-inhibitory fluoropyrimidine in EGFR-mutated lung adenocarcinoma: retrospective and in vitro studies. *Int J Oncol*, 46: 989-998 (2015)
 11. Watanabe M, Kurai J, Shimizu E.: Definition of Asian dust particles. *Environ Res*, 134: 188-189 (2014)
 12. Hanibuchi M, Kim SJ, Fidler IJ, Nishioka Y.: The molecular biology of lung cancer brain metastasis: an overview of current comprehensions and future perspectives. *J Med Invest*, 61: 241-253 (2014)
 13. Nishioka Y.: Physician scientists in respiratory medicine. *Respir Investig*, 52: 279 (2014)
 14. Tanaka M, Koike R, Sakai R, Saito K, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Hara M, Kawaguchi Y, Tohma S, Takasaki Y, Dohi M, Nishioka Y, Yasuda S, Miyazaki Y, Kaneko Y, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Miyasaka N, Harigai M.: Pulmonary infections following immunosuppressive treatments during hospitalization worsen the short-term vital prognosis for patients with connective tissue disease-associated interstitial pneumonia. *Mod Rheumatol*, Dec 15: 1-6 (2014) [Epub

ahead of print]

15. Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T.: Early Growth Response 4 Is Involved in Cell Proliferation of Small Cell Lung Cancer through Transcriptional Activation of Its Downstream Genes. *PLoS ONE*, 9: e113606 (2014)
 16. Ogawa H, Ledford JG, Mukherjee S, Aono Y, Nishioka Y, Lee JJ, Izumi K, Hollingsworth JW.: Surfactant Protein D Attenuates sub-epithelial fibrosis in allergic airways disease through TGF- beta. *Respir Res*, 15: 143 (2014)
 17. Sato S, Hanibuchi M, Fukuya A, Yabuki Y, Bando H, Yoshijima T, Goto H, Ogawa H, Nishioka Y.: Idiopathic Pleuroparenchymal Fibroelastosis is Characterized by an Elevated Serum Level of Surfactant Protein-D, but Not Krebs Von Den Lungen-6. *Lung*, 192: 711-717 (2014)
 18. Aono Y, Kishi M, Yokota Y, Azuma M, Kinoshita K, Takezaki A, Sato S, Kawano H, Kishi J, Goto H, Uehara H, Izumi K, Nishioka Y.: Role of PDGF/PDGFR axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 51: 793-801 (2014)
 19. 西岡安彦.: 抗酸菌症肺炎. 今日の治療指針 330 (2015)
 20. 岸潤、河野弘、西岡安彦.: 強皮症. 最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC, 85: 34-41 (2014)
 21. 西岡安彦.: COPD 診療の現状と徳島県での取り組み. 阿南医報 175: 20-21 (2014)
 22. 西岡安彦.: 肺線維症と増殖因子シグナル. 呼吸と循環 62:873-878 (2014)
 23. 西岡安彦.: 新薬治療薬の開発状況と将来展望. 日本医師会雑誌 143:1011 (2014)
 24. Yamada E, Ishii G, Aramaki N, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Kojima M, Nagai K, Ochiai A.: Tumor-size-based morphological features of metastatic lymph node tumors from primary lung adenocarcinoma. *Pathology International*, 64: 591-600 (2014)
 25. Suzuki S, Ishii G, Matsuwaki R, Neri S, Hishimoto H, Yamauchi G, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Kohno M, Nagai K, Ochiai A.: Ezrin-expressing lung adenocarcinoma cells and podoplanin positive fibroblasts from a malignant microenvironment. *J Cancer Res Clin Oncol*, 141: 475-484 (2014)
 26. Hattori A, Suzuki K, Aokage K, Mimae T, Nagai K, Tsuboi M, Ochiai A.: Prognosis of lung cancer patients with a past history of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 44 : 1088-1095 (2014)
 27. Tsubokawa N, Mimae T, Aokage K, Hattori A, Suzuki K, Nagai K, Tsuboi M, Okada M, Surgical outcome of non-small cell lung carcinoma in patients previously treated for gastric cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, 30: 1-5 (2014)
 28. Matsuwaki R, Ishii G, Zenke Y, Neri S, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Fujii S, Kondo H, Goya T, Nagai K, Ochiai A.: Immunophenotypic features of metastatic lymph node tumors to predict recurrence in N2 lung squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 105: 905-911 (2014)
 29. Neri S, Yoshida J, Ishii G, Matsumura Y, Aokage K, Hishida T, Nagai K.: Prognostic impact of microscopic vessel invasion and pleural invasion in non-small cell lung cancer. *Ann Surg*, 260: 383-388 (2014)
2. 学会発表
 1. 飯塚正一、柳重久、坪内拡張、十枝内厚次、最上祥子、山田ちひろ、服部智久、中里雅光.: ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおけるグレリンを介した六君子湯

- の摂食調節作用。
第 35 回日本肥満学会。宮崎。2014.10.24
2. 清水英治.: 合併症を有する肺癌治療。第 55 回日本肺癌学会。京都。2014.11.14
 3. Yasuhiko Nishioka, Shuichi Abe, Seidai Sato, Yoshinori Aono, Hisatsugu Goto, Masami Kishi, Terumi Yoshijima, Hiroyasu Okazaki, Masaki Hanibuchi.: Role of human fibrocytes in regulating pulmonary fibrosis: comprehensive analysis of their gene expression profile and growth factor production.
The 18th International Colloquium on Lung and Airway Fibrosis (ICLAF). Mont-Tremblant, Quebec Canada. 2014.9.23
 4. 西岡安彦.: がん免疫療法の過去と未来: エビデンスが示した新たな可能性。第 62 回日本口腔学会 中国・四国地方部会 (特別講演)。徳島。2014.10.25
 5. Hiroshi Kawano, Junko Morimoto, Yasuhiro Mouri, Hitoshi Nishijima, Yasuhiko Nishioka, Mitsuru Matsumoto.: Unexpected disturbance of the development of medullary thymic epithelial cells at immature stages by the long-term ablation of mature Aire-expressing cells。第 43 回日本免疫学会学術集会。京都。2014.12.10
 6. 柿内聡司、大塚憲司、佐藤正大、西條敦郎、坂口暁、後東久嗣、埴淵昌毅、西岡安彦.: 当院における間質性肺炎合併肺癌の治療の現状。第 55 回日本肺癌学会学術集会。京都。2014.11.16
 7. 櫻田功、柿内聡司、田島壮一郎、寺岡和彦、中村敏己、川添和義、西岡安彦、楊河宏章、水口和夫.: 肺癌薬物療法における薬剤性間質性肺炎の発症とそのリスク因子の解析。第 55 回日本肺癌学会学術集会。京都。2014.11.15
 8. 加藤幸成、金子美華、小笠原諭、西岡安彦.: がん特異的抗ポドプラニン抗体の樹立。第 73 回日本癌学会学術総会。横浜。2014.9.27
 9. 後東久嗣、三橋惇志、西條敦郎、柿内聡司、埴淵昌毅、上原久典、矢野聖二、西岡安彦.: ベバシズマブに対する獲得耐性メカニズムとしての線維細胞 (fibrocytes) の役割。第 73 回日本癌学会学術総会。横浜。2014.9.27
 10. 坂口暁、後東久嗣、大串文隆、葉久貴司、兼松貴則、浦田知之、柿内聡司、埴淵昌毅、曾根三郎、西岡安彦.: 高齢者進行 NSCLC 患者を対象として PRO 評価を取り入れた TS-1 療法の臨床第 II 相試験。第 52 回日本癌治療学会学術集会。横浜。2014.8.28
 11. 大塚憲司、後東久嗣、葉久貴司、兼松貴則、浦田知之、柿内聡司、埴淵昌毅、大串文隆、曾根三郎、西岡安彦.: 高齢者進行非小細胞肺癌患者を対象として PRO 評価を取り入れた TS-1 療法の臨床第 II 相試験。第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会。福岡。2017.7.18
 12. Hishida T, Yoshida J, Aokage K, Nagai K.: Post-operative origo-recurrence of non-small cell lung cancer: clinical features and survival. 2014 Jun 15-18. 22nd European Conference on General Thoracic Surgery. Copenhagen-Denmark
 13. Aokage K, Okada N, Suzuki K, Suzuki S, Tsubokawa N, Mimae T, Hattori A, Hishida T, Yoshida J, Tsuboi M.: Influence of gastrointestinal tract cancer History on the outcomes of lung cancer surgery: extended inclusion criteria for clinical trials. 2014 Sep 26-30. European society for medical oncology 2014. Madrid, Spain
 14. 青景圭樹.: 高齢者肺癌の外科治療についての問題点と展望。第 55 回日本臨床外科学会総会。2014.11.20-21
 15. 青景圭樹、岡田守人、鈴木健司、野村尚吾、鈴木繁紀、坪川典史、見前隆洋、服部有俊、永井完治、菱田智之、吉田純司、坪井正博.: 胃腸管癌の既往を有する肺癌手術例の予後-肺癌外科臨床試験における適応拡大にむけて-。第 55 回日本肺癌学会学術集会。2014.11.14-16。
 16. 後藤真輝、菱田智之、内藤雅仁、荒牧直、

- 青景圭樹、吉田純司、石井源一郎、坪井正博.: 食道癌治療後の肺結節に対する外科的切除の意義. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
17. 秦 一倫、青景圭樹、大松広伸、山本修司、石井源一郎、永井完治、菱田智之、吉田純司、坪井正博.: 胸部薄切りCTにおける肺結節の新たな三次元定量解析法. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
18. 三好智裕、吉田純司、荒牧 直、松村勇輝、青景圭樹、菱田智之、坪井正博、小林剛、蝶良伸一、勝原慎介、笠井聡、笹野泰彦、永井完治.: 胸部X線画像における新しい骨抑制画像技術の肺結節影検出に対する有用性. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
19. 関原圭吾、青景圭樹、清水 恵、荒牧 直、内藤雅仁、永井完治、菱田智之、吉田純司、坪井正博.: 高齢者肺癌に対する縮小手術の適応拡大の可能性. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
20. 清水 恵、吉田純司、石井源一郎、三好智裕、山田英司、内藤雅仁、荒牧 直、永井完治、青景圭樹、菱田智之、坪井正博.: 右上葉原発性肺癌に対する気管分岐下リンパ節郭清. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
21. 荒牧 直、坪井正博、石井源一郎、山田英司、清水 恵、三好智裕、内藤雅仁、青景圭樹、菱田智之、吉田純司、永井完治.: 性別による病理病気 I 期肺扁平上皮癌の予後の検討. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
22. 内藤雅仁、吉田純司、荒牧 直、清水 恵、青景圭樹、菱田智之、坪井正博.: 完全切除を施行した非小細胞における肺全摘と気管支形術の比較. 日本肺癌学会学術集会. 2014.11.14-16.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 1. 新規がん診断マーカーとその検出技術
出願予定：2015年6月
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

成果報告（業務項目）

臨床試験の施行と総括、研究計画の統括

担当責任者	中里雅光	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	教授
研究協力者	松元信弘	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	助教
研究分担者	有村保次	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	助教
研究分担者	坪内拓伸	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	助教

研究要旨 研究代表者は研究分担者とともに、独自に開発した蛋白質の網羅的末端構造解析法を用い、肺腺癌で特異的に検出される新規尿中腫瘍マーカー候補、蛋白断片 A、蛋白断片 B を同定した。本研究は、肺腺癌の診断における 2 種の尿中腫瘍マーカーの有効性を前向きかつ多面的に検証し、肺腺癌診断への臨床応用を促進することが目的である。本研究は 5 施設の呼吸器外科と呼吸器内科の症例を対象とした多施設共同研究であり、本年度は 5 つのアーム全ての研究プロトコルを確定した。全ての研究計画について本学の倫理審査の承認を得て、平成 26 年 10 月 28 日より患者登録を開始した。本学では 93 名の臨床情報と血清と尿検体収集を、1 名の I 期肺腺癌症例の肺癌組織試料収集と臨床情報と血清と尿検体収集を終了した。さらに本年度は、肺腺癌予後予測マーカー発現に関して、TTF-1 発現の解析プロトコルを確立した。

A. 研究目的

研究代表者は研究分担者(高尾)とともに、独自に開発した蛋白質の網羅的末端構造解析法を用い、肺腺癌で特異的に検出される 2 種類の新規尿中マーカー、蛋白断片 A、蛋白断片 B を発見した。これらのマーカーは感度 89%、特異度 93% と感度 86%、特異度 88% であり、従来の肺腺癌マーカーの血清 CEA (感度 47%、特異度 89%) と比較して、飛躍的に高精度であった。本研究の目的は、これらの新規尿中マーカー候補について、肺腺癌早期診断における有効性を多面的かつ前向きに検証し、検診への導入を目指した高精度の非侵襲的肺腺癌早期診断技術を確立することである。

B. 研究方法

本研究は 5 施設の呼吸器外科と呼吸器内科の症例を対象とした多施設共同研究である。

研究計画(1) 新規尿中マーカーの肺腺癌における診断精度の検証 (平成 26-28 年度)

肺腺癌 200 例、非悪性呼吸器疾患 150 例、他癌腫 100 例、重喫煙者 30 例、健常人 100 例の尿検体を収集する。肺腺癌症例と各群間での新規

尿中マーカー値と血清腫瘍マーカー値を測定する。2 種の尿中マーカーの ROC 曲線を作成し ROC-AUC を算出する。先行研究で得られたカットオフ値を基に感度、特異度、陽性・陰性尤度比を検証する。

研究計画(2) 肺腺癌罹患ハイリスク群を対象とした新規尿中マーカーの早期診断ツールとしての有効性に関する縦断研究 (平成 26-28 年度)
① 50 歳以上の重喫煙者、② 特発性肺線維症症例を対象として、各々参加時と 4ヶ月毎に採尿、血清採取を行い、12ヶ月毎に胸部 CT を施行する。肺腺癌診断前および診断時での尿中マーカーと血清腫瘍マーカーの陽性率を比較する。目標症例数は各群 50 例、観察期間は 2 年とする。

研究計画(3) 小型スリガラス病変に対するサロゲートマーカーとしての新規尿中バイオマーカーの有効性に関する縦断研究 (平成 26-28 年度) 胸部画像上の 20 mm 以下のスリガラス病変症例を対象として、参加時と 3ヶ月毎に採尿、血清採取を、参加時と 3、6、12、24ヶ月後に胸部 CT を施行する。肺腺癌診断前および診断時での尿中マーカーと血清腫瘍マーカーの陽性率

を比較する。目標症例数は50例、観察期間は2年とする。

研究計画(4) 患者予後とバイオマーカーとしての有効性の検証(平成26-28年度) 肺腺癌80例を対象として診断時に新規尿中マーカーを測定する。観察期間を2年とし予後調査を行う。中央値を基準に尿中マーカー高値群と低値群に群別化し、生存曲線と2年生存率を比較する。肺腺癌手術対象50例の新規尿中マーカーを測定し、術後再発率との相関を検証する。

研究計画(5) 予後・治療効果予測マーカーの発現との連関の検証(平成26-28年度)

肺腺癌手術対象50例の術前術後の新規尿中マーカーを測定する。手術検体を用い、既知の予後予測マーカー(TTF-1発現, p16/CDH13プロモーター領域メチル化)と治療効果予測マーカー(EGFRとEML4-ALKの遺伝子変異)との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守して実施する。研究開始前に、本学の倫理委員会の審査と承認を得て実施した。

平成26年10月27日 研究計画(1), (4) IRB承認(受付番号2014-155)、平成26年10月31日 研究計画(2) IRB承認(受付番号2014-156)、平成26年10月31日 研究計画(3) IRB承認(受付番号2014-157)、平成26年10月31日 研究計画(5) IRB承認(受付番号2014-159)。

C. 研究結果、およびD. 考察

研究体制発足後間もなく研究代表者及び各研究分担者出席のもと第1回研究会議を開催し、本研究計画の5つのアーム全ての研究プロトコルを確定した。本学では倫理委員会の承認を受け、平成26年10月28日より患者登録を開始した。平成27年3月10日現在、93名の文書で同意を得た研究対象者に本研究を実施した。93名の臨床情報と血清と尿検体収集を、1名のI期肺腺癌症例の肺癌組織試料収集と臨床情報と血清と尿検体収集を終了した。内訳は、研究計画(1)(肺腺癌例10例、非悪性呼吸器疾

患例14例、他癌腫7例、重喫煙者2例、健常者54例)、研究計画(2)(重喫煙者2例)、研究計画(3)(小型スリガラス病変症例2例)、研究計画(4)(肺腺癌例2例、I期肺腺癌1例)、研究計画(5)(肺腺癌例1例)であった(※症例数は当該年度に宮崎大学で収集を終了した症例数。重喫煙者で研究計画(1), (2)に同時参加、肺腺癌症例で研究計画(1), (4), (5)に同時参加あり)。5つの全ての臨床研究において有害事象はなかった。さらに本年度は、肺腺癌予後予測マーカー発現に関して、TTF-1発現の解析プロトコルを確立した。

E. 結論

新規尿中マーカーの肺腺癌における診断精度を検証するために、縦断研究を含めた5つの研究計画を立案し、倫理委員会の承認のもと実施した。本学では合計93名の研究対象者の協力を得て、尿検体と血清と臨床情報の収集を行った。臨床試験は安全に遂行することができた。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告(総括)にまとめて記入。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oda K, Ishimoto H, Yamada S, Kushima H, Ishii H, Imanaga T, Harada T, Ishimatsu Y, Matsumoto N, Naito K, Yatera K, Nakazato M, Kadota JI, Watanabe K, Kohno S, Mukae H.: Autopsy analyses in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 15: 10. (2014)
2. Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M.: Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice. *Eur J Pharmacol*, 743: 1-10 (2014)
3. Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Mogami S, Yamada C, Iizuka S, Hattori T, Nakazato M.: Rikkunshito ameliorates cachexia associated with bleomycin-induced lung fibrosis in mice by stimulating ghrelin secretion.

Nutr Res, 34: 876-85 (2014)

4. Matsumoto N, Miki K, Tsubouchi H, Sakamoto A, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Yoshida M, Souma R, Ishimoto H, Yamamoto Y, Yatera K, Yoshikawa M, Sagara H, Iwanaga T, Mukae H, Maekura R, Kimura H, Nakazato M, Kangawa K.: Ghrelin Administration for Chronic Respiratory Failure: A Randomized Dose- Comparison Trial.

Lung, in press (2015)

5. 柳重久, 坪内拡伸, 中里雅光.: 呼吸器疾患における PTEN の役割.
Annual Review 呼吸器 2015, 107-118 (2015)

2. 学会発表

1. 飯塚正一、柳 重久、坪内拡伸、十枝内厚次、最上祥子、山田ちひろ、服部智久、中里雅光.: ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおけるグレリンを介した六君子湯の摂食調節作用.
第 35 回日本肥満学会. 宮崎. 2014.10.24

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
なし

尿中蛋白質断片の質量および構造解析

担当責任者 高尾 敏文 大阪大学蛋白質研究所、機能・発現プロテオミクス 教授

研究協力者 奥村 宜明 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻生物科学科 准教授

研究要旨 既に尿中から見出している新規がん診断マーカー候補について、肺腺がん患者の尿を用いて有効性を検証する目的で、生化学的データを得るための試料調製を行うと共に、新たなマーカー候補探索のための解析を行った。今年度は、各施設から肺腺がん患者の尿試料 60 検体と健常人の尿試料 36 検体を受理した。その内、60 検体の試料調製が終了し、28 検体の質量分析を終了した。また、新規がん診断マーカー候補として 16 種類の蛋白質断片を同定しているが、それらに対するポリクローナル抗体を作成した。その内、6 種についてその特異性を確認することができた。

A. 研究目的

鋭敏かつ非侵襲的な早期診断マーカーを開発することを目的として、既に尿中から見出しているがんの新規診断マーカー候補について、複数の施設で採取された患者由来の尿に対して生化学的な検証を行うとともに、それらを用いて新たなマーカー候補の探索も同時に行う。

B. 研究方法

・生化学的検証

16種類の蛋白質断片のC末端アミノ酸配列より抗原ペプチドをデザイン、合成し、それらを抗原として、トリ、或は、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作成する（外注）。抗原ペプチドを固定化したアフィニティーカラムを作成し、免疫終了後に得られた血清 1 mL を用いて、アフィニティー精製を行う。ELISA により抗体価を算出した後、8 種について、抗原、及び、偽抗原を結合した BSA を用いてウエスタンブロッティング法により特異性を調べる。

・質量分析によるマーカー探索

尿検体を採取し、前処理、分析データ取得、取得データによる統計解析の手順で研究を行う。まず前処理として、尿検体を 200～250 倍に濃縮し、洗浄を行い、濃縮検体を得る。この濃縮検体の蛋白質定量を行い、得られた値をもとに検体の一部を用いて 10 mg/mL の濃度に緩衝液で

調整して、その後の分析行程に用いる。分析は、まず試料を還元アルキル化の後に、独自の手法により H₂¹⁸O 存在下でトリプシン消化する（ペプチドの安定同位体標識）。脱塩、精製後、iTRAQ（8-plex）によるラベル化を行い、8 検体を混合、脱塩、精製した後、蛋白質の C 末端由来のトリプシン消化ペプチド（⇒蛋白質断片の解析）のみをイオン交換クロマトグラフィーにより分画する。その画分を脱塩、精製後、Nano-LC-MALDI-MS/MS により測定を行い、C 末端由来のトリプシン消化ペプチドのみを独自に開発したプログラム（iSpec）を用いて選別、抽出する。この取得データが統計解析に使用できるだけの条件を満たしているかどうかを、独自のデータベース連動型プログラム（iData）により評価し、採用されたデータのみを用いて統計解析を行う。

（倫理面への配慮）

分析に必需な試料量は 1 回の採尿で得られる尿の一部で十分であり、採取にあたり患者に苦痛を与えることはない。また、試料は全て匿名化された後に送付されており、個人情報の流出はない。

C. 研究結果

・生化学的検証

新規がん診断マーカー候補として 16 種類の蛋白質断片を同定しているが、それらに対して作成したポリクローナル抗体の内、8 種について特異性を確認した。その結果、6 種について蛋白質断片に特異的に反応することがわかった。

・質量分析によるマーカー探索

新規尿中マーカーのデータ解析プロトコルに関して、データの確実性を向上させるための方法を確立した（*参照）。また、これまでの分析プロトコルを改良し、一連の分析に要する時間を短縮し、スループットを上げた。具体的には、全ての工程：①試料前処理（尿から蛋白質を単離、定量）、②イオン交換、及び、逆相クロマトグラフィーによる分画、③タンデム質量分析、④蛋白質 C 末端の網羅的同定を見直し、一連の分析に要する時間をこれまでの 7 検体/12 日・1 人から 14 検体/5 日・2 人と大幅にスピードアップした。本年度は、肺腺がん患者の尿試料 60 検体と健常人の尿試料 36 検体を受理し、60 検体の試料調製が終了し、28 検体について上記①～④の分析を終了した。

*分析データの精査法の確立

取得データを統計解析により適切な比較を行うために、データ評価を迅速かつ簡便に行えるようなデータベース連動型新規プログラムを構築した（iData）。別のプロジェクト（次世代がん研究戦略推進プロジェクト）で行った 500 検体の分析データを、作成したプログラムにより数値化、グラフ化などで精査し、次の 2 つの観点によるデータ評価法を考案した。すなわち、(1) 1 アッセイ全体（7 検体+コントロール検体 1）の評価基準として MS/MS スペクトル及び基準ピーク(113)の評価、(2) そのアッセイにおける個々の成分である各検体についての評価、の 2 点を改良した。具体的に用いる数値は、(1) では、分析された MS/MS スペクトルの本数、プロダクトイオンピークの強度と本数、Mascot 検索での同定蛋白質数、基準となるコントロール検体のレポーターピーク(113)の強度の中央値と強度基準以下のピーク数（棄却数）、(2) では、各検体のレポーターピーク（114～119、121）の強度の中央値と棄却数、とした。これらの 2 つの観点による評価法により、そのアッ

セイ全体の是非を決定する MS/MS のデータが十分な質であるかどうかの評価と、さらには、含まれる 7 検体のそれぞれについて、サンプル量が不足していたり、他より過剰でなかったかどうかの評価までを、数字と視覚的なグラフの両方から迅速に行うことができるようになった。

D. 考察

既に尿中から見出している新規がん診断マーカー候補（次世代がん研究戦略推進プロジェクト）に対して作成した特異抗体を用いて、今年度得られた患者、及び健常人尿について検証を行うとともに、上記分析データの統計解析を行い、新たなマーカー候補の探索も進める予定である。

E. 結論

新規がん診断マーカー候補（16 種類の蛋白質断片）に対するポリクローナル抗体を作成した。その内、現時点で、6 種について特異性を確認した。肺腺がん患者の尿試料 24 検体と健常人の尿試料 36 検体の合計 60 検体の試料調製を終了し、その内、28 検体について蛋白質断片の質量分析を終了した。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告（総括）にまとめて記入。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto H, Awada C, Matsumoto S, Kaneiwa T, Sugimoto T, Takao T, Kikuchi A.: Basolateral secretion of Wnt5a in polarized epithelial cells is required for apical lumen formation.
J Cell Sci, 128: 1051-1063 (2015)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

- | | |
|--------------------------------------|-------|
| 1. 特許取得 | 3.その他 |
| 1. 新規がん診断マーカーとその検出技術
出願予定：2015年6月 | なし |
| 2. 実用新案登録
なし | |