

Figure 4. Intra-day variation in paraxanthine. A. In all patients. At 6:30 AM: 0.75×10^{-3} (95% CI, $0.28\text{--}2.7 \times 10^{-3}$) in patients with cachexia vs. 3.61×10^{-3} ($1.91\text{--}5.48 \times 10^{-3}$) pg/ml in those without cachexia, $p=0.35$; TNF- α : 7.1 (1.2 to 30.2) vs. 3.3 (1.2 to 30.0) pg/ml, $p=0.27$; leptin: 2.4 (1.0 to 9.8) vs. 4.0 (2.0 to 9.9) ng/ml, $p=0.27$, respectively. B. In male patients. IL-6: 15.2 (range, 2.6 to 23.4) in patients with cachexia vs. 9.4 (1.4 to 28.7) pg/ml in those without cachexia, $p=0.57$; TNF- α : 12.4 (1.2 to 29.0) vs. 3.2 (1.4 to 28.6) pg/ml, $p=0.29$; leptin: 2.3 (1.0 to 8.8) vs. 3.45 (2.0 to 2.8) ng/ml, $p=0.34$, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0113259.g004

including lactic acid, alanine, catechol, and paraxanthine. Metabolites with significant differences in intra-day levels on univariate analysis were (fold change in levels in the cohort with cachexia to that without, p -value): at 6:30 AM, catechol (0.70, $p=0.04$) and paraxanthine (0.21, $p=0.006$); at 11:30 AM, valine (0.68, $p=0.01$), proline (0.66, $p=0.049$), p -hydroxybenzoic acid (0.79, $p=0.03$), and paraxanthine (0.16, $p=0.006$); and at 4:30 PM, valine (0.62, $p=0.02$) and paraxanthine (0.13, $p=0.007$). Although differences in levels of paraxanthine were not statistically significant (0.26, $p=0.08$) at 9:30 PM, the levels were clearly lower in the cohort with cachexia at all time points (Figure 4). Of note, the female patient with outlying paraxanthine values in the cohort with cachexia was the study's only heavy drinker of coffee, which is a metabolic substrate of paraxanthine (Figure 3 D).

Serological markers

Median levels of IL-6, TNF- α , and leptin at 6:30 AM didn't differ significantly between the cohorts with and without cachexia, and the observed trends in level fluctuations were similar to those previously reported (Figure 5A) [7] [9]. Because serum serological marker levels in healthy volunteers vary substantially depending on gender and age [21], we analyzed values in men. In the 16 male patients, median levels of IL-6, TNF- α , and leptin at 6:30 AM didn't differ significantly between the cohorts with and without cachexia (Figure 5B). Leptin concentrations during the

day remained lower in the cohort with cachexia than in that without (Figure 6). However, median leptin levels did show substantial intra-day variation; 2.4 (range, 1.0 to 9.8) ng/ml and 1.1 (0.8 to 4.4) ng/ml at 6:30 AM and 11:30 respectively for patients with cachexia ($p=0.003$), and 3.95 (2.0 to 9.9) ng/ml and 3.1 (1.5 to 7.8) ng/ml at 6:30 AM and 11:30 respectively for those without cachexia ($p=0.03$).

Discussion

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome characterized by body weight loss and muscle and adipose tissue wasting and inflammation, and is often associated with anorexia. Abnormalities commonly associated with cachexia include alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism. A substantial amount of research is currently focused on determining the mechanism behind cachexia development, with several factors considered to be putative mediators of cancer anorexia, including hormones (e.g. leptin), neuropeptides, cytokines (e.g. IL-1, IL-6, and TNF- α), and neurotransmitters (e.g. serotonin and dopamine). Here, we examined levels of typical serological factors, such as IL-6, TNF- α , and leptin, and used metabolomics to identify metabolites associated with cachexia in patients with pancreatic cancer and investigate intra-day variations in levels of these metabolites. To our knowledge, this is the first study to analyze cancer cachexia

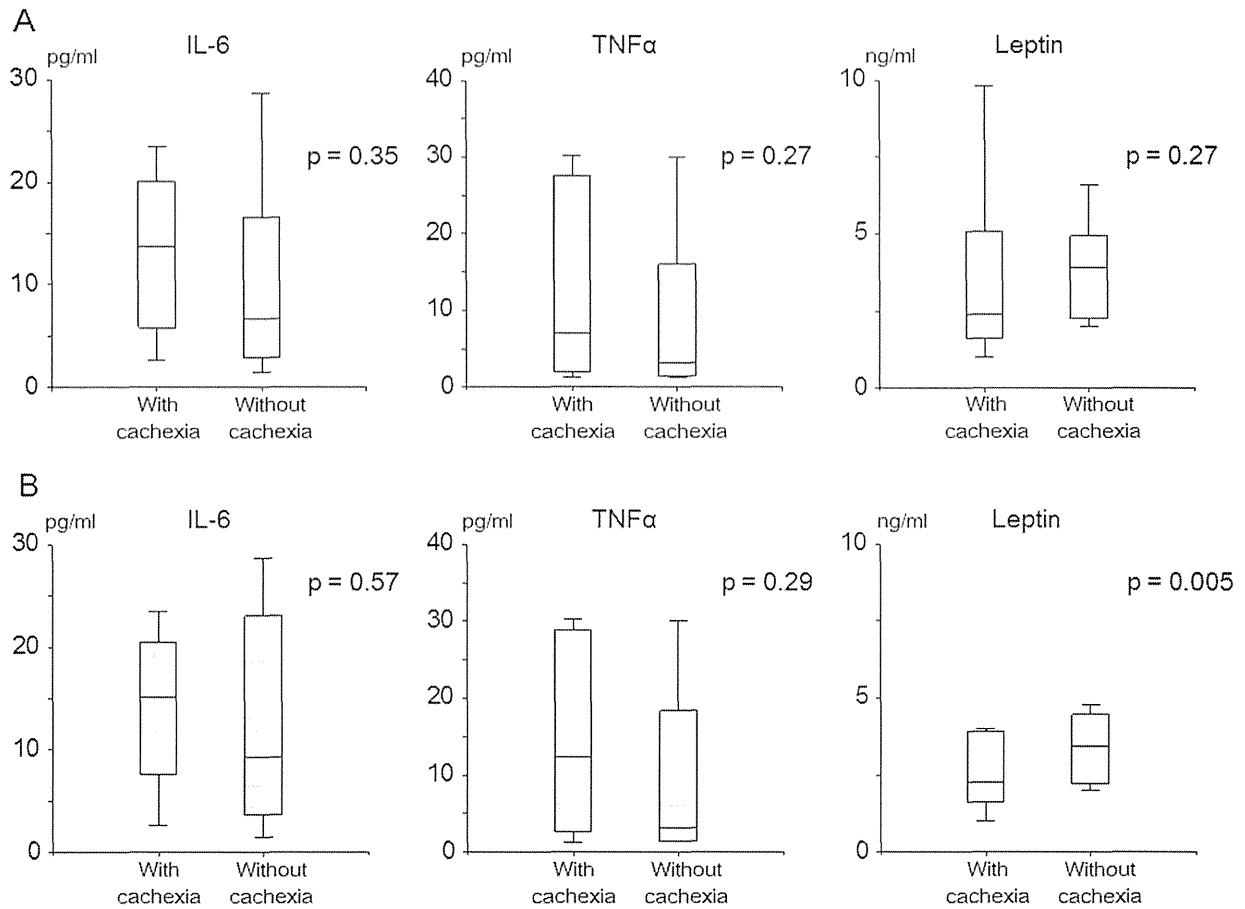


Figure 5. Serological markers between patients with cachexia and those without cachexia. A. In all patients. IL-6: 13.8 (range, 2.6 to 23.4) in patients with cachexia vs. 6.8 (1.4 to 28.7) pg/ml in those without cachexia, $p = 0.35$; TNF- α : 7.1 (1.2 to 30.2) vs. 3.3 (1.2 to 30.0) pg/ml, $p = 0.27$; leptin: 2.4 (1.0 to 9.8) vs. 4.0 (2.0 to 9.9) ng/ml, $p = 0.27$, respectively. B. In male patients. IL-6: 15.2 (range, 2.6 to 23.4) in patients with cachexia vs. 9.4 (1.4 to 28.7) pg/ml in those without cachexia, $p = 0.57$; TNF- α : 12.4 (1.2 to 29.0) vs. 3.2 (1.4 to 28.6) pg/ml, $p = 0.29$; leptin: 2.3 (1.0 to 8.8) vs. 3.45 (2.0 to 2.8) ng/ml, $p = 0.34$, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0113259.g005

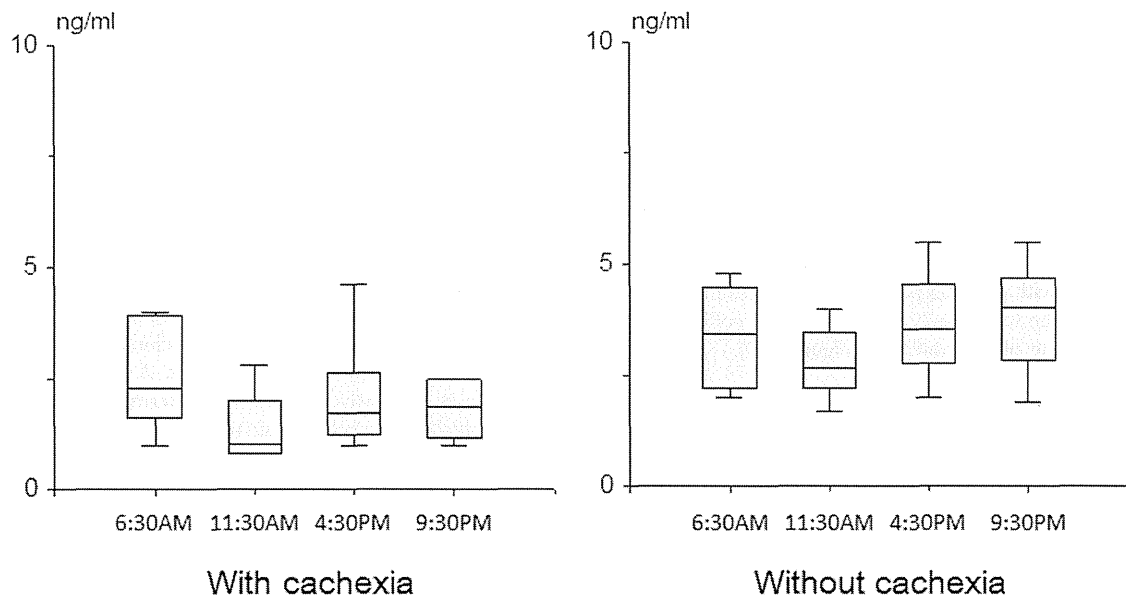


Figure 6. Intra-day variation in leptin.

doi:10.1371/journal.pone.0113259.g006

文献

- 1) Legrain, P. et al. : The human proteome project : current state and future direction. *Mol. Cell Proteomics*, **10**(7) : M111.009993, 2011.
- 2) Honda, K. et al. : Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **43**(2) : 103-109, 2013.
- 3) Makawita, S. and Diamandis, E. P. : The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches : current strategies for candidate verification. *Clin. Chem.*, **56**(2) : 212-222, 2010.
- 4) Ahrens, C. H. et al. : Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**(11) : 789-801, 2010.
- 5) Hause, R. J. et al. : Targeted protein-omic methods are bridging the gap between proteomic and hypothesis-driven protein analysis approaches. *Expert Rev. Proteomics*, **8**(5) : 565-575, 2011.
- 6) Kuno, A. et al. : Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray : a new strategy for glycan profiling. *Nat. Methods*, **2**(11) : 851-856, 2005.
- 7) Nishizuka, S. et al. : Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(24) : 14229-14234, 2003.
- 8) Liotta, L. A. et al. : Protein microarrays : meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell*, **3**(4) : 317-325, 2003.
- 9) Paweletz, C. P. et al. : Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene*, **20**(16) : 1981-1989, 2001.
- 10) Goshima, N. et al. : Human protein factory for converting the transcriptome into an *in vitro*-expressed proteome. *Nat. Methods*, **5**(12) : 1011-1017, 2008.
- 11) Matsumoto, T. et al. : Anti-HuC and-HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Int. J. Oncol.*, **40**(6) : 1957-1962, 2012.
- 12) Uhlen, M. et al. : A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, **4**(12) : 1920-1932, 2005.
- 13) Yamada, T. : Reverse phase protein array : a tool for signaling pathway profiling in the era of genome resequencing. *Dig. Dis. Sci.*, **59**(5) : 895-896, 2014.
- 14) Kobayashi, M. et al. : CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer. *PLoS One*, **7**(3) : e33952, 2012.
- 15) Matsubara, J. et al. : Survival prediction for pancreatic patients receiving gemcitabine treatment. *Mol. Cell Proteomics*, **9**(4) : 695-704, 2010.
- 16) Murakoshi, Y. et al. : Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci.*, **102**(3) : 630-638, 2011.
- 17) Ono, M. et al. : Biomarker Discovery of pancreatic and gastrointestinal cancer by 2DICAL : 2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry. *Int. J. Proteomics*, **2012** : 897412, 2012.

* * *

with consideration to the influence of intra-day variation of metabolite levels.

Metabolomics analysis identified some metabolites whose levels differed significantly in patients with cachexia from levels in those without. While speculating as to why levels of a substantial number of metabolites differed markedly by time of sample collection is difficult in the present study, we did find that levels of paraxanthine remained lower in the cohort with cachexia than in that without throughout the day. Paraxanthine, the dimethyl derivative of xanthine, is the preferential path of caffeine metabolism in humans. Paraxanthine cannot be synthesized as a natural plant product and is seen only as a natural metabolite of caffeine in animals. Because paraxanthine, like caffeine, is a psychoactive central nervous system stimulant and increases energy expenditure and lipid turnover, it may be related to the pathogenesis of cancer cachexia or anorexia [22,23]. It remains unclear that the reduction in the levels of paraxanthine is associated with regulation in order to maintain homeostasis of lipid mobilization.

While paraxanthine concentrations were not detectable using the common HPLC assay under fasting conditions in a previous study [23,24], we were able to measure values using a GCMS-QP2010 Ultra in the present study. We did not strictly control caffeine intake in subjects but recognized on post-hoc survey that one patient with outlying values in the cohort with cachexia was a heavy drinker of coffee. The association between paraxanthine level and cachexia should be confirmed in further validation studies.

In agreement with the results of previous studies [9,21,25,26], median IL-6 and TNF- α levels in the cohort with cachexia were nearly double those in the cohort without, and leptin levels in the cohort with cachexia were around half those in the cohort without, albeit without statistical significance. Serum leptin levels in healthy volunteers vary substantially by gender (women tend to have higher values than men), age (elderly tend to have higher values than younger individuals), nutritional status, and body mass index [21]. Wallace et al. demonstrated a significant positive correlation between body fat loss and increase in leptin levels of healthy subjects and cancer patients ($r = 0.731$) [27]. The large inter- and intra-individual variation in levels in the present study suggests that, although leptin is indeed involved in the pathophysiology of cachexia, it cannot serve as a useful marker at one time. Intra-day variation in leptin suggests that leptin level is associated with anorexia and eating behavior in patients with cancer cachexia, as well as amount of body fat [28,29].

Several pharmacological and nutritional approaches to the treatment of cancer cachexia have been evaluated. When nutritional strategies alone were found insufficient for improving cachectic syndrome, pharmacological approaches, such as steroids, methylprogesterone, and ghrelin agonists, to counteract metabolic changes were tried, albeit without success [8]. Development of a successful treatment method will likely require a better understanding of the pathogenesis of cancer cachexia and identification of a dynamic metabolic surrogate marker of pharmacological intervention.

We explored the intra-day variation in metabolites in cancer cachexia by means of metabolomics. Although a major limitation

of this study is the small sample size of cachectic patients with pancreatic cancer, a cohort which included only one female, prominent intra-day variance in serum metabolite levels was demonstrated in pancreatic cancer patients, regardless of cachexia. Metabolomics may be a useful tool in identifying the dynamic metabolic response. However, many metabolites identified by metabolomics showed large intra- and inter-day variations in levels. We therefore believe that metabolomics should be evaluated while taking into account those variations [30]. Although the level of paraxanthine remained significantly lower in the cohort with cachexia throughout the day unrelated to the intra-day variation, we consider that a time-matched method may be necessary to minimize influence of intra-day variation of values due to circadian rhythm in metabolomic research. These findings should be confirmed in further validation studies. The identification of metabolites involved in cancer cachexia will lead to the elucidation of its pathophysiology.

In conclusion, we demonstrated here that levels of some serological markers and metabolites were affected by cancer cachexia. We found that many metabolites exhibited substantial intra- and inter-day variation, suggesting the potential need to pay attention to intra-day variation in these levels in metabolomics research.

Supporting Information

Table S1 List of metabolites detected in subjects' serum using our GC/MS-based metabolomics analysis system.

(DOCX)

Checklist S1 TREND Statement Checklist.

(PDF)

Protocol S1 Clinical Study Protocol (Japanese version).

(DOC)

Protocol S2 Clinical Study Protocol (English version).

(DOC)

Statement from Their Ethics Committee or Institutional Review Board S1.

(PDF)

Acknowledgments

We thank all patients who participated in this study and their families and appreciate the assistance of the staff of the Division of Medical Oncology/Hematology, Gastroenterology, and Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Kobe University Graduate School of Medicine (Hyogo, Japan), and of The Integrated Center for Mass Spectrometry, Kobe University Graduate School of Medicine (Hyogo, Japan).

Author Contributions

N/A. Conceived and designed the experiments: YF TK SN TA MY HM. Performed the experiments: YF TK NC YI MT NK TM SN. Analyzed the data: YF TK MY HM. Contributed reagents/materials/analysis tools: TK SN TA MY. Wrote the paper: YF TK MY HM.

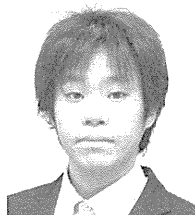
References

1. Tisdale MJ (2009) Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 89: 381–410.
2. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosacius I, Bruera E, et al. (2011) Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 12: 489–495.
3. Fearon KC, Moses AG (2002) Cancer cachexia. *Int J Cardiol* 85: 73–81.
4. Davidson W, Ash S, Capra S, Bauer J, Cancer Cachexia Study G (2004) Weight stabilisation is associated with improved survival duration and quality of life in unresectable pancreatic cancer. *Clin Nutr* 23: 239–247.
5. Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Buchler MW, Friess H, et al. (2008) Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 12: 1193–1201.

6. Nagaya N, Kojima M, Kangawa K (2006) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia. *Intern Med* 45: 127–134.
7. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Busquets S (2012) Mechanisms and treatment of cancer cachexia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.
8. Argiles JM, Stemmler B (2013) The potential of ghrelin in the treatment of cancer cachexia. *Expert Opin Biol Ther* 13: 67–76.
9. Gupta SC, Kim JH, Kannappan R, Reuter S, Dougherty PM, et al. (2011) Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Exp Biol Med (Maywood)* 236: 658–671.
10. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 26: 51–78.
11. Yoshida M, Hatano N, Nishiumi S, Irino Y, Izumi Y, et al. (2012) Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *J Gastroenterol* 47: 9–20.
12. Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, et al. (2010) Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics* 6: 518–528.
13. Liu AC, Lewis WG, Kay SA (2007) Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nat Chem Biol* 3: 630–639.
14. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195: 187–198.
15. Tsoli M, Robertson G (2013) Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. *Trends Endocrinol Metab* 24: 174–183.
16. Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, Klein S, Smith CH, et al. (1996) Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem* 42: 942–946.
17. Tajima S, Kazuyo T, Hayashi T, Odagiri E, Demu R (1998) Clinical evaluation of human leptin radioimmunoassay kit. *Igaku and yakugaku* 40: 775–782.
18. Takemura M, Seishima M, Saito K, Noma A, Shinoda J, et al. (1996) Evaluation of interleukin-6 (IL-6) measurement by highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay. *Igaku and yakugaku* 36: 1071–1076.
19. Tsugawa H, Bamba T, Shinohara M, Nishiumi S, Yoshida M, et al. (2011) Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis. *J Biosci Bioeng* 112: 292–298.
20. Tsugawa H, Tsujimoto Y, Arita M, Bamba T, Fukusaki E (2011) GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics* 12: 131.
21. Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Mura L, Massa E, et al. (2001) Serum values of proinflammatory cytokines are inversely correlated with serum leptin levels in patients with advanced stage cancer at different sites. *J Mol Med (Berl)* 79: 406–414.
22. Hetzler RK, Knowlton RG, Somani SM, Brown DD, Perkins RM, 3rd (1990) Effect of paraxanthine on FFA mobilization after intravenous caffeine administration in humans. *J Appl Physiol* 68: 44–47.
23. Acheson KJ, Gremaud G, Meirim I, Montigon F, Krebs Y, et al. (2004) Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? *Am J Clin Nutr* 79: 40–46.
24. Perera V, Gross AS, McLachlan AJ (2010) Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomed Chromatogr* 24: 1136–1144.
25. Dulger H, Alici S, Sekeroglu MR, Erkog R, Ozbek H, et al. (2004) Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with gastrointestinal cancer. *Int J Clin Pract* 58: 545–549.
26. Maccio A, Madeddu C, Gramignano G, Mulas C, Floris C, et al. (2012) A randomized phase III clinical trial of a combined treatment for cachexia in patients with gynecological cancers: evaluating the impact on metabolic and inflammatory profiles and quality of life. *Gynecol Oncol* 124: 417–425.
27. Wallace AM, Sattar N, McMillan DC (1998) Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. *Clin Cancer Res* 4: 2977–2979.
28. Inui A (1999) Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides—mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci* 22: 62–67.
29. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A (2013) Cancer cachexia—pathophysiology and management. *J Gastroenterol* 48: 574–594.
30. Nishiumi S, Kobayashi T, Ikeda A, Yoshie T, Kibi M, et al. (2012) A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS One* 7: e40459.

臨床材料を用いたアレイ基盤プロテオミクスを用いた 創薬標的・バイオマーカーの開発

Discovery of the biomarkers and therapeutic targets for cancer by array-based proteomics



小林 信(写真) 山田哲司 本田一文

Makoto KOBAYASHI, Teshshi YAMADA and Kazufumi HONDA

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野

© Global Human Proteome Project が掲げるプロテオーム研究戦略として、質量分析基盤、抗体基盤、データベース・バイオフィオマティクス基盤プロテオミクスが位置づけられている。なかでも抗体基盤プロテオミクスは、疾患の原因究明や個別化医療に向けたバイオマーカー探索において有用であると報告されている。しかし、バイオマーカー候補タンパク質を多数検体で迅速に検証するための技術基盤はいまだ整備されておらず、探索から検証にかけて律速である問題も明らかになっている。そこで本稿では、創薬標的・バイオマーカー探索から検証までをスムーズにつなげるプラットフォームとして、著者らが行っている質量分析基盤と抗体基盤の両プロテオミクスを融合したアレイ基盤プロテオミクス解析について紹介する。



血漿バイオマーカー、プロテインマイクロアレイ、抗体基盤プロテオミクス

Global Human Proteome Project (HPP) (<http://www.hupo.org/research/hpp/>) が the Human Proteome Organization (HUPO) のプロジェクトとして立ち上がり、国際的な協力体制が組織されてきた。HPP が掲げるプロテオーム研究戦略の 3 本の柱として、質量分析基盤 (mass spectrometry-based proteomics)、抗体基盤 (antibody-based proteomics)、データベース・バイオフィオマティクス基盤プロテオミクス (knowledge-based proteomic) が位置づけられ、ヒトプロテオーム解明に向けた道筋が示されてきている¹⁾。疾患原因、治療標的・病態診断・個別化医療のためのバイオマーカー探索にも上記戦略は有効で、一定の成果が示されつつある²⁾。近年、臨床材料を利用したプロテオミクス解析が可能になり、がん研究分野では腫瘍組織、血清、血漿、尿、髄液や関節液などの臨床検体を利用した包括的な解析が行われている。

創薬標的としての信頼性やバイオマーカーとしての有効性を証明するためには、多数の臨床検体

を用いた検証作業が必須である。質量分析基盤による臨床材料の解析により比較すべき検体間で変動するタンパク質の同定が容易になってきたが、一方で候補タンパク質を多数検体で迅速に検証するためのプラットフォーム整備がいまだに十分でないことから“探索から検証”の過程における律速が問題となっている³⁾。

とくにバイオマーカー候補を臨床現場に持ち込むためには検査の簡便性と標準化が強く求められ、その後の開発を進めるうえで抗体などによる特異プローブの開発が重要となる⁴⁾。そこで本稿では、3つの基盤のうち質量分析基盤と抗体基盤プロテオミクスを融合させ、創薬標的やバイオマーカー探索から検証までシームレスにつなぐプラットフォームとしてアレイ技術を応用したプロテオーム解析 (array-based proteomic, アレイ基盤プロテオミクス) を紹介する。



プロテインマイクロアレイ法

抗体基盤プロテオミクス解析を迅速かつコスト

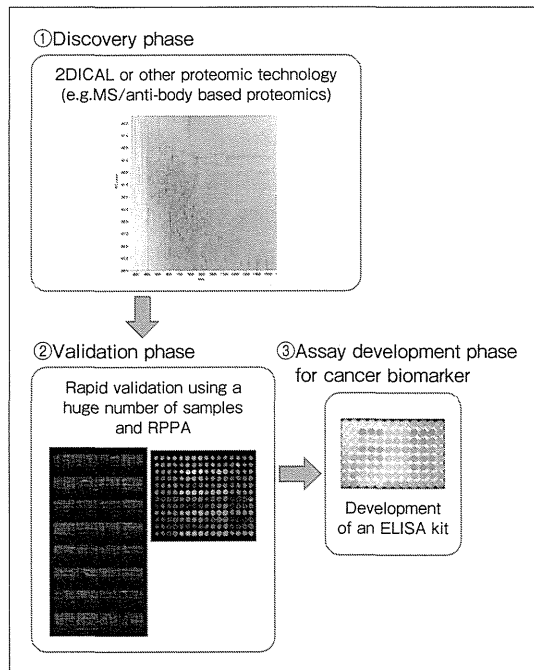


図 1 血漿バイオマーカー開発の全体像²⁾
 バイオマーカー開発は大きく3層構造をしており、2DICAL法を用いたDiscovery phaseにより候補タンパク質を件検出後、384例の血漿を用いたRPPA法によるValidation phase、診断キット開発を行うAssay development phaseに分けられる。

ベネフィット(実験労力, 検体量, 実験費用)よく解析するための方法として、アレイ基盤プロテオミクスは発展を遂げてきた。

アレイ基盤プロテオミクスの概念は、抗体などの特異プローブを用いたタンパク質の発現を迅速に解析するための方法として1990年代から2000年代前半にかけて独立した研究グループからprotein microarray法として報告された⁵⁾。この方法はおもに単一の抗原タンパク質や抗体をガラス基板上に固相化後に目的の抗体、または抗原を反応させて測定を行うforward-phase protein array (FPPA)法と、血清・血漿や細胞株・組織からのタンパク質抽出物など、複数のタンパク質が混在しているサンプルを固相化するreverse-phase protein array (RPPA)法から構成されている⁶⁻⁸⁾。

臨床サンプルを用いたprotein microarray法は2001年、Pawelecら⁹⁾により報告されて以来、飛躍的な発展を遂げてきた。彼らは、食道がん患者を対象にLaser Capture Microdissection法と

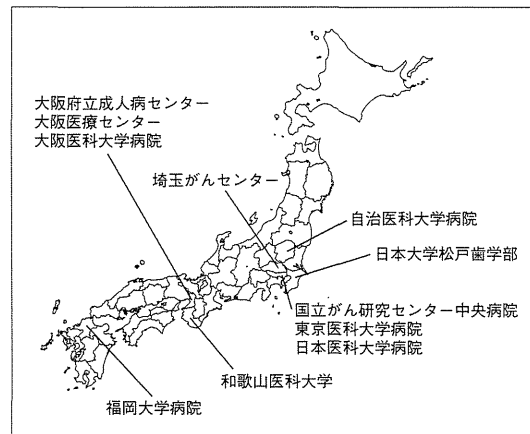


図 2 プロテオーム研究用多施設共同血液試料バイオバンク

第三次対がん総合戦略事業“がん検診に有用な腫瘍マーカー開発-山田班-”により1,700例強の血清・血漿検体が収集された。

RPPA法を組み合わせ、がん部・前がん病変部と間質細胞からタンパク質を抽出後、ガラス基板上において抗原抗体反応を行った。その結果、腫瘍細胞の浸潤先端部においてprotein kinase Bのリン酸化が亢進される一方、アポトーシス経路のリン酸化とextracellular signal-regulated kinaseのリン酸化が減少することを報告している。また、近年FPPA法はがん患者血清中の腫瘍関連自己抗体の多検体測定にも応用されており、北里大学の佐藤らによりPVDFメンブレンに精製タンパク質をドットして自己抗体解析を行う実験系が整備された。

彼らは、小細胞性肺癌患者血清中から検出した抗HuC自己抗体が新規神経内分泌肺癌鑑別マーカーとして有用であることをdot blot法を用いて示している^{10,11)}

血液バイオマーカー迅速検証プラットフォームホームとして血漿マイクロアレイの意義

臨床検体を用いたRPPA法は、タンパク質リン酸化解析、血清・血漿内タンパク質量比判定、組織マイクロアレイによるタンパク質局在判定と発現解析に応用されてきている^{12,13)}。著者らの研究グループではそのなかからとくに血清・血漿をサンプルに用いたRPPA法に着目し、新規バイオ

マーカー候補タンパク質の探索とその有用性評価を行い、報告した¹⁴⁻¹⁶⁾。当研究室が進める血清・血漿マイクロアレイ法によるバイオマーカーの探索・検証法を紹介する。

著者らは血清・血漿を、濃度を変えて4段階に希釈し、サンプルごとに4重測定、合計384サンプル・6,144スポットを1枚のガラス基板にマイクロアレイする血清・血漿マイクロアレイ技術を開発した。検体希釈からアレイプリンターによるガラス基板へのマイクロプリント、高解像度アレイスキャナーによる連続画像解析までを自動化し、ハイスループット解析を実現化した。

Matsubaraら¹⁵⁾は膵がんに対するゲムシタピン奏効性予測マーカーの探索を目的に、国立がん研究センター研究所で開発されたショットガンプロテオミクス法であるtwo-dimensional image converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry (2DICAL)法¹⁷⁾を用いて少数例の膵がん血漿検体から探索を行い、予後予測因子候補として α_1 -antitrypsinを見出した。そこで304例の膵がん血漿に対するRPPAを作製し、 α_1 -antitrypsin特異抗体を用いて抗原量の測定を行った。 α_1 -antitrypsinがゲムシタピン単剤療法を施行した膵がん患者の予後因子となることを見出した。また、Murakoshiら¹⁶⁾も大腸がんの早期診断マーカー探索を目的として20例ごとの大腸がん患者と健常人血清間を2DICALによって比較解析し、component of complement 9(C9)を見出した。C9の診断学的有用性を検証する目的で345例の大腸がん患者と健常人から採血された血清がマイクロアレイされたRPPAを作製し、C9特異抗体を用いて血清内のタンパク質発現を解析した。C9はI期大腸がんの血清中でも発現の亢進が確認でき、早期診断マーカーとしての有用性が示唆された。

以上述べてきたように、著者らの研究グループではショットガン質量分析法とRPPA法を組み合わせるバイオマーカーの探索から検証までをシームレスにつなぐプラットフォームとして利用している。このプラットフォームの特徴は、少数の血液試料から比較群間で変動するタンパク質群を探索から多数症例での検証の迅速がはかれるだけで

なく、少ないタンパク量で同一品質の解析ツールを一度に大量に生産できることから、臨床検体のむだ遣いが極力抑えられ、解析プローブ(抗体)の最適化や抗体による網羅的解析、特異抗体のスクリーニングなどに威力を発揮する。さらに、見出されたバイオマーカー候補を実用化に向けて、開発早期から多数の患者検体による臨床性能の評価が可能になり、開発プロジェクトのgo or non-goをいち早く判断するツールとして利用価値が高い(図1)。

バイオマーカー臨床性能検証に向けた臨床検体バイオバンクの構築

バイオマーカー実用化に向けてもっとも問題になるのは、複数の医療機関からバイアスなく収集された良質な検体で検証できるかどうかである。個別マーカーの検証研究のたびに、多施設の研究機関から検体を収集し検証を行うのは効率が悪い。実用化をめざした検証研究に利用できるリソースバンクの構築が望まれる。国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野では、国内の11医療機関からバイオマーカー検証研究に利用するためのバイオバンクの構築を進めており、プロテオーム研究に耐えうる偏りのない同一プロトコルで回収された口腔がん、肺がん、食道がん、胃がん、膵がん、胆道がん、肝細胞がん、大腸がん、卵巣がん、健常人などの血清と血漿を2,000検体以上集積し、RPPAとして保存しており、検証研究のためのバイオリソースとして有効に活用している(図2)。

おわりに

以上、臨床材料を用いたアレイ基盤プロテオミクスの活用法について紹介してきた。アレイ基盤プロテオミクスは質量分析基盤や抗体基盤プロテオミクスと親和性が高く、それら基盤技術と組合すことによって創薬標的や病態診断・個別化医療バイオマーカーの探索や検証研究に期待が寄せられている。さらに、今後はプロテオームバイオバンクと連動し、国内外で見出された新規バイオマーカー候補の臨床性能評価のためのツールとしての発展が望まれる。

膵癌治療 up-to-date 2015

監修 ▶ 跡見 裕 杏林大学 学長

編集 ▶ 海野 倫明 東北大学 消化器外科学分野 教授

土田 明彦 東京医科大学 消化器・小児外科学分野 主任教授

1

プロテオーム解析による膵癌診断方法の開発

*三浦 奈美, 紙田 正博, 本田 一文, 山田 哲司

(*国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野)

Key words : プロテオーム解析, バイオマーカー, アポリポタンパク質

はじめに

膵癌は日本において年間約 30,000 人が罹患し, 約 29,000 人が死亡するもっとも生命予後が不良な固形癌の一つである¹⁾。膵癌が難治癌である理由の一つに, 早期膵癌の発見の困難さがあげられる。膵癌の年間の罹患患者数と死亡者数がほぼ同数である理由は, 膵癌と診断される患者の多くが進行した臨床病期であるため, 手術適応がなく不幸な転帰をたどるものと考えられる。早期膵癌を発見する効率の良い方法が開発されれば, 膵癌の死亡率の改善が望めるものと思われる。

膵癌の診断には Computed Tomography (CT) や Magnetic Resonance Imaging (MRI) などの画像診断が利用されるが, 早期膵癌の発見を目的に, 1 次スクリーニングとして造影 CT や MRI を行うことは効率が悪い。しかしながら, 早期膵癌患者のほとんどは無症候であるため, 適切な画像診断を必要とする患者群を適切に見極めることはできない。よって, 血液検査などの非侵襲的な方法を用いて, 早期膵癌罹患患者や膵癌発症危険疾患患者を濃縮することができれば, その後に画像検査などを用いることによって, 早期膵癌の効率的な発見に貢献するものと考えられる。

近年のバイオテクノロジーの発展により, さまざまな生体内分子の発現プロファイルを解析できるようになった²⁾。その中で, タンパク質の発現情報の全体像を捉えるプロテオーム解析は, 多数のタンパク質の一斉分析を可能とした。プロテオーム解析技術を応用し, 癌の早期発見に資する血清・血漿バイオマーカーの探索が試みられている³⁾。

I. プロテオーム解析

プロテオーム解析とは, タンパク質の網羅的解析のことである。近年, タンパク質の質量分析法の向上 (mass spectrometry based proteomics)⁴⁾, 抗体の網羅的作製と抗体ライブラリーの整理 (antibody based proteomics)⁵⁾, タンパク質発現情報やシグナルネットワークを含むタンパク質データベースの充実化 (knowledge based proteomics) により^{4,6)}, 生体試料のプロテオーム解析から多くの情報を得ることが可能になってきている⁷⁾。その中でも, 血清・血漿試料によるプロテオミクス解析は疾患バイオマーカー探索に向けて注目を集めている。

■ 癌バイオマーカー探索を目指したプロテオーム解析のための血清・血漿試料

血清・血漿試料が腫瘍マーカー探索ターゲットとして着目される理由は, サンプルングが採血を行うだけで

よく、迅速かつ低侵襲で検査することができるからである。しかしながら、血清・血漿を用いたプロテオーム解析にはいくつかの技術的困難がある。① 血清および血漿のタンパク質組成は非常に複雑で、濃度分布が幅広い。血清および血漿における存在量上位 10 位タンパク質（アルブミン、IgG、トランスフェリン、フィブリノーゲン、補体 C3、 α_1 アンチトリプシン、IgA、 α_2 マクログロブリン、IgM、ハプトグロビン）で、血清総蛋白の約 90% を占めている。これらは mg/mL 範囲の濃度であり、その他の多くの血清および血漿タンパク質は数 $\mu\text{g/mL}$ から数 pg/mL の濃度である⁸⁾。mg/mL から pg/mL に分布するタンパク質を同一分析で解析する技術はいまだ確立されておらず、各濃度範囲を分析するための解析技術やタンパク質の分画法の開発が行われている。② 血清および血漿に含まれるタンパク質は、腫瘍細胞から産生されたタンパク質のみならず、さまざまな組織から放出されるタンパク質や、その他の生理的状態によるタンパク質（例えば、炎症性タンパク質）も含まれる。したがって、血清および血漿を試料として用いるには、サンプルの前処理を行うことや高感度の測定方法が必要になる。

2 プロテオーム解析の方法

プロテオーム解析には、タンパク質の大規模同時分離、高効率かつ高感度同定技術、バイオインフォマティクスによる大規模解析が必要である。近年、タンパク質に対する質量分析技術が向上し、下記示す解析の流れが確立されてきた²⁾。本総説では詳細な技術論は割愛する。詳細に興味があるかたは、記載した文献の参照をお勧めする⁹⁾。

1) 二次元電気泳動によりタンパク質を分離後、ゲル内プロテアーゼ消化し質量分析にてタンパク質の同定する方法¹⁰⁾

2) タンパク質のプロテアーゼ消化したのち、nano Liquid Chromatography (nano LC) で分離しながら、無標識または標識ペプチドを質量分析してタンパク質濃度を測定するショットガンプロテオミクス解析法^{11,12)}

3) 未消化タンパク質を Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) や Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) Time Of Flight (TOF) Mass Spectrometry (MS)¹³⁾ にてタンパク質量比を一斉解析するトップダウンプロテオミクス解析法

4) 解析プローブまたは試料を基板上にアレイし、タンパク質量を定量するタンパク質アレイ法 (forward phase protein array, reverse phase protein array)^{14,15)}

さらに最近では、タンパク質の量比解析のみならず、タンパク質リン酸化などの翻訳後修飾の解析も行われてきている¹⁶⁾。また、安定同位体標識をしたペプチドを合成する技術が確立され、それを内部標準として質量分析装置でタンパク質定量を行う技術 Selected Reaction Monitoring (SRM)/Multiple Reaction Monitoring (MRM) ができるようになってきている¹⁷⁾。

III. 早期肝癌診断用バイオマーカーとしてのアポリポタンパク質 A-II (ApoA II) とアポリポタンパク質 C-III (ApoC III) の翻訳後修飾

次に、実際に国立がん研究センター創薬臨床研究分野で行われた早期肝癌血漿バイオマーカーの開発を紹介する^{18,19)}。

1 トップダウンプロテオミクスによる血漿タンパク質解析法

肝癌患者血漿と健常者血漿の未消化タンパク質を直行型四重極 MALDI-TOF-MS にてトップダウン質量分析を行い、血漿タンパク質のプロファイルをした。このシステムでは 5 μL の血漿から 2,173 種類の低分子量タンパク質 (1,000~30,000 m/z) の検出が可能であった。

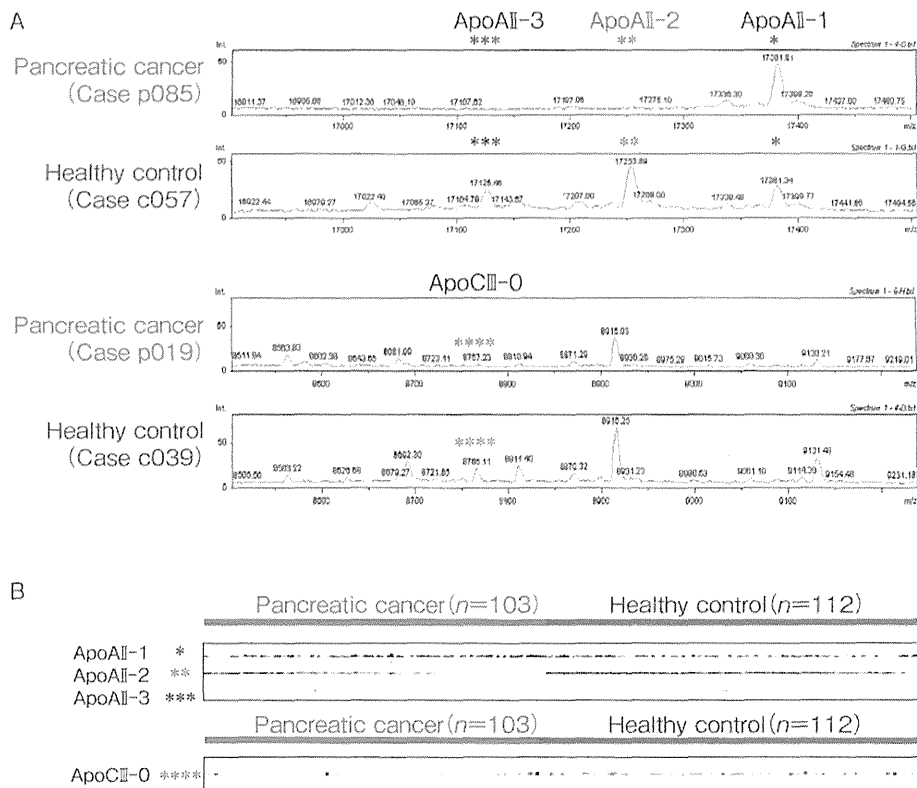


図1 直行型四重極MALDI-TOF-MSによる血漿タンパク質のプロファイリング(学習セット1)
 A: 16,900~17,500 m/z (上段), 8,500~9,250 m/z (下段)の範囲の肺癌患者検体と健常者のマススペクトル。
 B: ApoA IIとApoC IIIマススペクトルのゲルイメージ。
 MSピーク *: ApoA II-1, **: ApoA II-2, ***: ApoA II-3, ****: ApoC III-0
 (文献19より改変して転載)

2 バイオマーカー候補分子の同定

トップダウンプロテオミクス解析を使用し、肺癌患者103検体と健常者112検体(学習セット1)から血漿タンパク質のプロファイルを行ったところ、肺癌患者検体で有意に減少する17,252 m/zのMSピークを見出した($P=1.36 \times 10^{-21}$, Mann-Whitney U-test)(図1A上段)。このピークはタンデムMS解析(MS/MS)から、アポリポタンパク質A-II(ApoA II)ホモ二量体の片側鎖のC末端からグルタミンの欠失したもの(C末端配列-ATQ/-AT: ApoA II-2)であることが判明した(図2)。質量分析プロファイルから循環血漿中のApoA IIには、C末端アミノ酸が異なる5個のアイソフォームがあることを同定した。質量の重い方から、それぞれApoA II-1(C末端配列-ATQ/-ATQ, 17,380 m/z), ApoA II-2(-ATQ/-AT, 17,252 m/z), ApoA II-3(-AT/-AT, 17,124 m/z), ApoA II-4(-AT/-A, 17,023 m/z), ApoA II-5(-A/-A, 16,922 m/z)と名前をつけて区別した(図2)。さらに肺癌患者で統計学的有意差を持って減少し、健常者と肺癌患者間に差がある8,766 m/zのピークを見出した($P=4.35 \times 10^{-14}$)(図1A下段)。このピークはグリコシル化されていないアポリポタンパク質C-III(ApoC III)(ApoC III-0)であることを同定した。

ROC解析(Receiver Operating Characteristic analysis)において、ApoA II-2およびApoC III-0のROC曲線下面積(AUC)はそれぞれ0.877と0.798であったが、ApoA II-2とApoC III-0を組み合わせる(ApoA II-2+ApoC III-0)とAUCが0.903となり、判別率が向上した(図3A)。この結果の検証を行うために、独立した集団で盲検を行ったが、いずれも同様の結果であった。

これまでにこの様なタンパク質を利用したバイオマーカー探索について、しばしば検体の扱い方(採取方法、

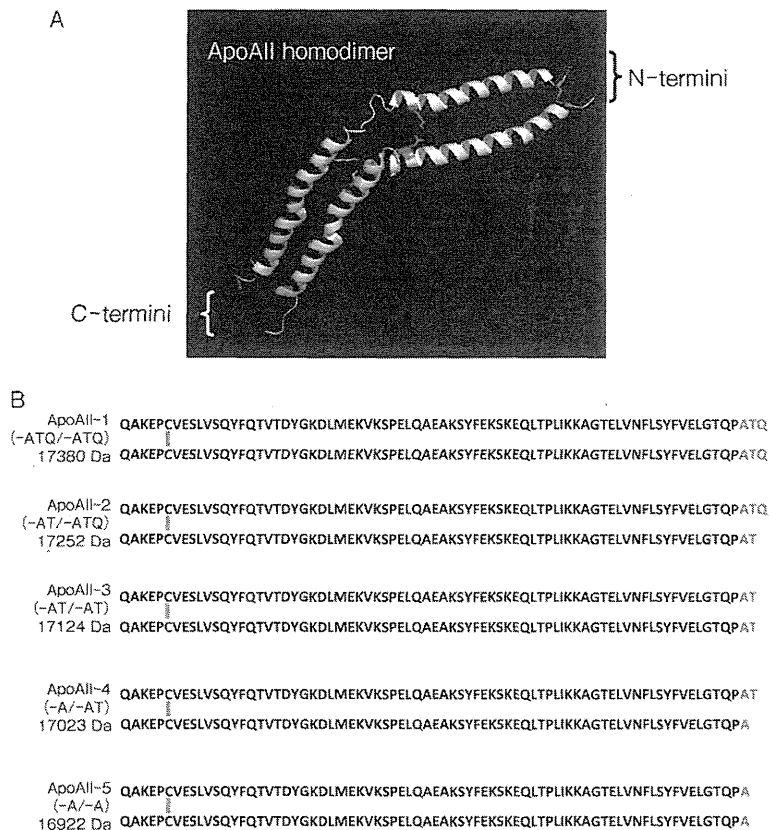


図2 アポリポタンパク質 ApoA II 二量体の構造

A: ApoA II 二量体の立体構造を予測したモデル構造。この予測モデルの作成には、タンパク質立体構造解析ソフト MOE (株式会社菱化システム) を使用した。
 B: 5 種類の ApoA II 二量体のアミノ酸配列とその計算値の分子量。
 (文献 19 より転載)

保存方法、凍結融解方法など)、採取地域や食事などのバイアスによる検証精度の不安定性に関する議論が行われてきた。厚生労働省の第3次対がん総合戦略研究事業の研究課題「がん検診に有用な腫瘍マーカーの開発」において消化器癌患者、良性疾患患者、健常者より血清・血漿検体を同一の採血・保存方法で収集し、タンパク質バイオマーカー探索に活用できうるバイオバンクを構築している。そこで、本バイオバンクの検体を用いて ApoA II-2+ ApoC III-0 の検証実験を行った。ROC 解析の結果は全臨床病期における AUG が 0.919、ステージ I-II、ステージ III-IV に分割した AUG もそれぞれについて 0.920、0.918 であった (図 3B)。

3 早期膵癌のバイオマーカーとしての ApoA II-2+ApoA III-0

上記のバイオバンク検体において、ApoA II-2+Apo III-0 による膵癌検体の検出感度は 65.8% (160/243) であり、健常者の検出精度は 95% 以上 (97.5% : 115/118) であった。膵癌腫瘍マーカーとして用いられる CA19-9 では、同じ条件において膵癌の検出感度 79.8% (194/243)、健常者の検出精度は 94.9% (112/118) であった (表 1)。AUC は両者ともほぼ同等であった (ApoA II-2+ApoC II-0 : 0.919, CA19-9 : 0.908)。ApoA II-2+ApoC III-0 の膵癌に対する検出感度は CA19-9 と比べると劣っていたが、ApoA II-2 と ApoC III-0 の減少は膵癌の臨床病期に依存せず、I 期膵癌でも計測された。ApoA II-2+ApoC III-0 の I 期膵癌に対する AUC は 0.868 となり、CA19-9 の 0.774 より高い判別率を示した。よって早期の膵癌の検出には、ApoA II-2+ApoC III-0 が CA19-9 よりも有効であると考えられた。さらに、ApoA II-2+ApoC III-0 と CA19-9 を組み合わせた場合、膵

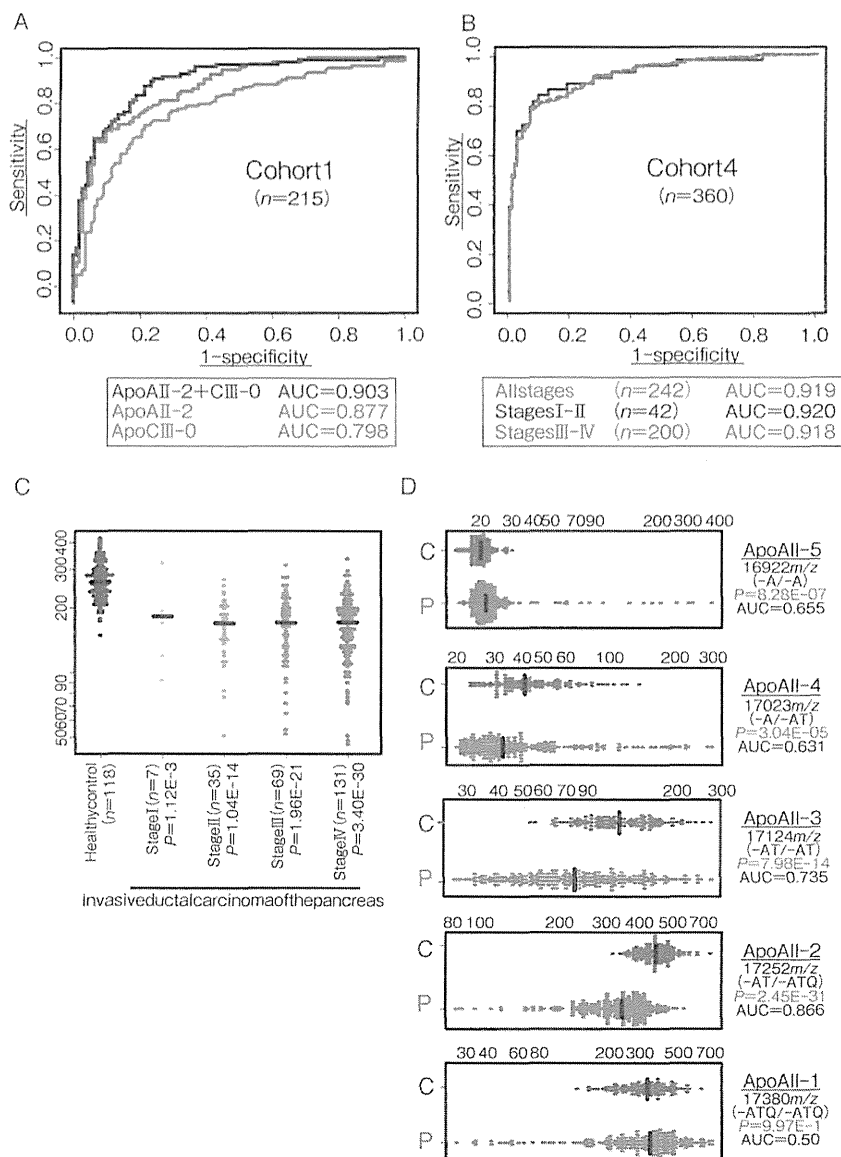


図3 膵癌検体における ApoA II と ApoC III の減少

- A: 学習セット 1 (Cohort 1) における ApoA II-2 と ApoC III-0 の ROC 解析。
- B: 血清・血漿バイオバンク (Cohort 4) における ApoA II-2+ApoC III-0 の臨床病期別の ROC 解析。
- C: Cohort 4 における臨床病期別の ApoA II-2+ApoC III-0 の分布図。黒線はそれぞれの中間値を示す。
- D: Cohort 4 における 5 種類の ApoA II 二量体それぞれの分布図。黒線はそれぞれ
の中間値を示す。健常者検体 (n=128), P; 膵癌患者検体 (n=249)。
(文献 19 より改変して転載)

癌検体の検出感度は 93.4% (160/242) となった。一方で、ApoA II-2 と ApoC III-0 の減少は、食道癌、胃癌、大腸癌でもそれぞれ 36.4% (4/11), 23.9% (34/142), 32.4% (46/142) の頻度で見られ、膵癌に対する特異性は示さなかった (表 1)。

血漿中の ApoA II-2 や ApoC III-0 の減少は膵癌特異的ではないが検査は低侵襲であることから、無症候の早期膵癌や膵炎を始めとした膵癌リスク疾患に対する第一次の検診への応用が考えられる。

表1 消化器疾患における ApoA II-2+ApoC III-0 と CA19-9 の陽性率

	n	ApoA II-2+ApoC III-0 (<189.0 AU)	CA19-9 (>37.0 U/ml)	ApoA II-2+ApoC III-0 or CA19-9
Healthy control	118	2.54% (3/118)	5.08% (6/118)	6.78% (8/118)
Invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas	243 ^a	65.8% (160/243)	79.8% (194/243)	93.4% (227/243)
Other malignant tumor of the pancreas	18	72.2% (13/18)	22.2% (4/18)	83.3% (15/18)
Benign tumor or cyst of the pancreas	37	35.1% (13/37)	8.18% (3/37)	37.8% (14/37)
Chronic pancreatitis	14	78.6% (11/14)	14.3% (2/14)	85.7% (12/14)
Hepatocellular carcinoma	13	69.2% (9/13)	15.4% (2/13)	69.2% (9/13)
Carcinoma of the duodenum	10	70.0% (7/10)	30.0% (3/10)	90.0% (9/10)
Gallbladder or cholangiocellular carcinoma	44	56.8% (25/44)	63.6% (28/44)	81.8% (36/44)
Benign disease of gallbladder or bile duct	21	28.6% (6/21)	14.3% (3/21)	33.3% (7/21)
Esophageal cancer	11	36.4% (4/11)	18.2% (2/11)	36.4% (4/11)
Gastric cancer	142	23.9% (34/142)	16.2% (23/142)	33.1% (47/142)
Colorectal cancer	142	32.4% (46/142)	17.6% (25/142)	40.8% (58/142)
Gastrointestinal stromal tumor	3	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)

^aIncludes one case of unknown clinical stage. Positivity rates higher than 60% are highlighted in boldface. (文献 19 より転載)

4 ApoA II 二量体の翻訳後修飾の意義

膵癌患者検体では、ApoA II-2 の減少は見られるが、アイソフォームである ApoA II-1 の減少は見られなかった (図 3 D)。したがって、ApoA II-2 の減少は、ApoA II タンパク質の産生の減少によるのではなく、何らかの翻訳後の差異によるものであると考えられる。膵癌患者検体において ApoA II-5 の増加が見られたが、それは ApoA II-2 減少による結果の一つであろう。

ApoA II の C 末端切断を検証するため、ApoA II の C 末端-ATQ と -AT のそれぞれの特異的抗体を作製した。これらの抗体と既存の ApoA II 抗体を使用し膵癌患者検体のイムノブロットイングにより、ApoA II の C 末端切断の違いを検出することができた。その検出結果は MALDI-TOF-MS での検出結果と一致した (図 4)。

5 考察

癌細胞から分泌され血液中に循環している腫瘍マーカーの多くは、早期癌では変化がみられないことが多い。CA19-9 も同様で、早期癌における感度不足から、CA19-9 の癌検診への適用を難しくしている。しかしながら、ApoA II-2 と ApoC III-0 は早期癌においても AUC 値 0.85 以上の判別率を持って有効性が確認できた。アポリポタンパク質はおもに肝臓で産生され、ApoA II と ApoC III が癌細胞で産生されるという報告はない。しかしながら、ApoA II-2 と ApoC III-0 は早期を含む膵癌患者において減少していた (図 3 C)。血清のカルボキシペプチダーゼとアミノペプチダーゼ活性によって、さまざまな血清・血漿タンパク質が C 末端および N 末端で切断され、癌特異的なペプチドを産生することが知られている。膵臓では、タンパク質分解酵素のカルボキシペプチダーゼ A を産生しており、早期膵癌患者の血清中でカルボキシペプチダーゼ A の増加があることが報告されている。そのため、ApoA II-2 の分解、減少として早期膵癌の検出が可能なのかもしれない。ApoA II-5 が反比例して増加することはこの考えを支持する。

この新しい結果を臨床に応用する前に、克服すべき弱点がある。現在までのところ、ここで報告したタンパク質修飾は、検出と定量ができるのは質量分析による測定のみである。今回の研究で、ApoA II の C 末端配列-ATQ と -AT をそれぞれ特異的に認識する抗体を作ることに成功した。現在、これらの抗体を用いたサンド

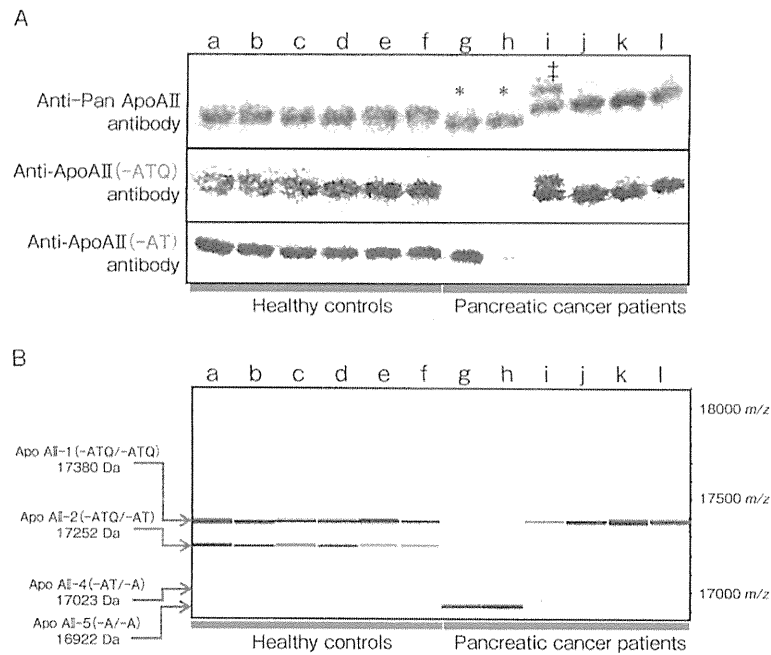


図4 抗体を使用した ApoA II の検出

A: 既存または新規に作製した ApoA II 抗体による、非還元血漿サンプルを用いたイムノプロットング。上段は既存の抗 ApoA II 抗体、中段は抗 ApoA II (-ATQ) 抗体、下段は抗 ApoA II (-AT) 抗体を使用。

B: 直行型四重極 MALDI TOF-MS による結果の 16,900~18,100 m/z の範囲のゲルイメージ。

Lane a-f: 健常者検体, Lane g-l: 膵癌患者検体

(文献 19 より改変して転載)

イッチ Enzyme Linked Immunosolvent Assay (ELISA) 法による ApoA II-2 ヘテロ二量体の検出系を構築中である。ApoA II-2 測定による早期膵癌診断法を臨床現場に導入し、体外診断薬としての実証化試験を計画中である。

参考文献

- 1) Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, et al : Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008 : a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. Jpn J Clin Oncol 2014 ; 44 : 388-396.
- 2) Honda K, Ono M, Shitashige M, et al : Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. Jpn J Clin Oncol 2013 ; 43 : 103-109.
- 3) Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. Nature reviews Cancer 2003 ; 3 : 267-275.
- 4) Fenyo D, Eriksson J, Beavis R : Mass spectrometric protein identification using the global proteome machine. Methods Mol Biol 2010 ; 673 : 189-202.
- 5) Brennan DJ, O'Connor DP, Rexhepaj E, et al : Antibody-based proteomics : fast-tracking molecular diagnostics in oncology. Nature reviews Cancer 2010 ; 10 : 605-617.
- 6) Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al : Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. Nature biotechnology 2010 ; 28 : 1248-1250.
- 7) Legrain P, Aebersold R, Archakov A, et al : The human proteome project : Current state and future direction. Molecular & cellular proteomics : MCP 2011.
- 8) Anderson NL, Anderson NG : The human plasma proteome : history, character, and diagnostic prospects. Molecular & cellular proteomics : MCP 2002 ; 1 : 845-867.
- 9) Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, et al : Clinical proteomics : translating benchside promise into bedside reality. Nature reviews Drug discovery 2002 ; 1 : 683-695.

- 10) Kondo T, Hirohashi S : Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2 D-DIGE) for cancer proteomics. *Nature protocols* 2006 ; 1 : 2940-2956.
- 11) Ono M, Shitashige M, Honda K, et al : Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2006 ; 5 : 1338-1347.
- 12) Chen EI, Yates JR, 3rd. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Molecular oncology* 2007 ; 1 : 144-159.
- 13) Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, et al : The SELDI-TOF MS approach to proteomics : protein profiling and biomarker identification. *Biochemical and biophysical research communications* 2002 ; 292 : 587-592.
- 14) Espina V, Mehta AI, Winters ME, et al : Protein microarrays : molecular profiling technologies for clinical specimens. *Proteomics* 2003 ; 3 : 2091-2100.
- 15) Murakoshi Y, Honda K, Sasazuki S, et al : Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer science* 2011 ; 102 : 630-638.
- 16) Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, et al : Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling* 2010 ; 3 (104) : ra3.
- 17) Yoneyama T, Ohtsuki S, Ono M, et al : Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *Journal of proteome research* 2013 ; 12 : 753-762.
- 18) Honda K, Hayashida Y, Umaki T, et al : Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer research* 2005 ; 65 : 10613-10622.
- 19) Honda K, Okusaka T, Felix K, et al : Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer : protein characterization and multi-institutional validation. *PLoS one* 2012 ; 7 (10) : e46908.

ここまで進歩した胆・膵 EUS をどう使いこなすか

FNA で胆・膵癌を診断するコツ—手技と検体作成の工夫—

良沢 昭銘¹⁾・岩野 博俊¹⁾・田場久美子¹⁾・佐藤 洋子¹⁾
谷坂 優樹¹⁾・須藤 晃佑¹⁾・真下 由美¹⁾・新井 晋¹⁾

要約：胆膵病変は EUS-FNA の主な対象であり、高い診断率が報告されている。EUS-FNA は多くの症例において安全かつ簡便に施行可能であり適切な治療方針を決定するうえで役立つ。しかしながら、その施行に際しては適切な検体採取が困難な状況に遭遇することもある。こういった状況に対処するためには、基本的手技を理解するとともにさまざまな状況における対処法を知っておく必要がある。本稿では、EUS-FNA 手技と検体作成の基本と工夫について概説した。

Key words : EUS-FNA, 膵病変, 胆道病変, rapid on-site cytopathological evaluation

はじめに

Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA: 超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引術) は、EUS を用いて行う針生検である。消化管壁内病変や消化管近傍臓器で、これまで非手術的な組織採取が困難であった病変に対して、コンベックス型やリニア型と呼ばれる EUS を用いることにより、超音波画像下に細胞診・組織診を安全かつ確実に行えるのが特徴である(図 1)。1992 年に Vilmann ら¹⁾により膵病変に対する生検法として報告されたのが始まりであるが、現在ではさまざまな病変に対して用いられている²⁾。本稿では、これらのうち胆膵疾患における EUS-FNA 手技と検体作成の基本と工夫について概説する。

I. 適応と禁忌

一般的に、EUS-FNA の主な適応および目的として、①腫瘍性病変の鑑別診断、②癌の進展度診断 (1)

Tips for Obtaining Adequate Specimens for the Diagnosis of Pancreato-biliary Cancers by EUS-FNA

Shomei Ryozaawa et al

1) 埼玉医科大学国際医療センター消化器内科
(〒350-1298 日高市山根 1397-1)

ンパ節転移や少量の胸・腹水)、③化学/放射線療法施行前の組織学的確認、の 3 点があげられる³⁾。対象病変は EUS で描出され良悪性の鑑別診断が必要なすべての病変となるが、施行にあたっては EUS-FNA が安全かつ容易に実施可能で、今後の治療方針決定に有用な情報を与える場合に限るべきである³⁾。

一方、禁忌としては EUS で病変が明瞭に描出できない場合、穿刺経路上に癌や血管が介在する場合、EUS-FNA により偶発症の発生が強く危惧される場合、などである。

1. 膵疾患

膵病変のうち、良悪性の鑑別が必要な病変が適応となる。さらに良性でも治療方針決定のためにさらなる質的診断、例えば自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP) など病因を明らかにする必要のある場合も適応となる。また、悪性でもさらに治療法決定のために組織型の特定が必要な場合にも適応となる。近年では単なる組織診のみならず、検体を用いた染色体異常の解析や遺伝子異常の解析も試みられている⁴⁾。

一方、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN) や粘液性嚢胞腫瘍 (mucinous cystic neoplasm: MCN) など穿刺により腫瘍播種の危険性が高いと判断される病変は本邦では禁忌とされている³⁾。

2. 胆道疾患

胆道疾患診断に対する EUS-FNA の報告は少ない。

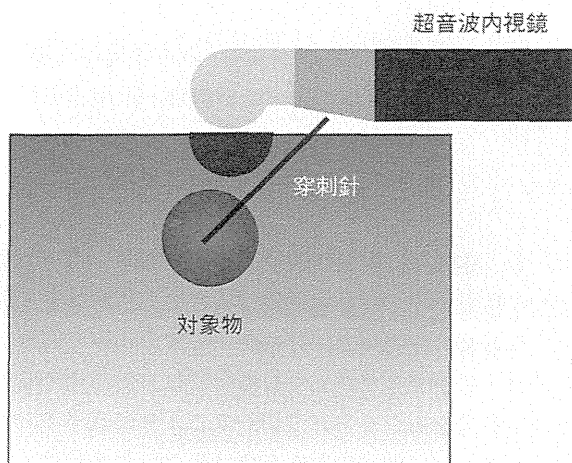


図1 EUS-FNA (超音波内視鏡下穿刺吸引術)
超音波画像下に消化管内から消化管壁内や消化管近傍の対象物を観察しながら安全かつ確実な穿刺が可能である。

胆嚢病変に対する適応としては、胆嚢癌に対する組織学的エビデンスの取得目的、胆嚢癌と慢性胆嚢炎、とくに黄色肉芽腫性胆嚢炎 (xanthogranulomatous cholecystitis: XGC) が鑑別困難な症例に対する確定診断があげられる。また、胆管病変に対する適応として、胆道狭窄症例のうち ERCP 擦過細胞診、生検などが陰性であるが画像診断上で胆管癌が疑われる症例があげられる⁵⁾。さらに乳頭部病変では非露出型乳頭部癌疑いのうち確定診断困難な症例が適応となる。

II. 使用機器と人員配置

1. 使用機器

EUS-FNA を行う際に必要な器材は、穿刺用超音波内視鏡と超音波観測装置および穿刺針である。穿刺用超音波内視鏡はコンベックス型あるいはリニア型のものであり、各社から市販されている。当施設では、オリンパスメディカルシステムズ社製の GF-UCT260 (観測装置はアロカ社製 ProSound SSD-α10 やオリンパスメディカルシステムズ社製 EU-MEI) を使用している。穿刺針も各社から市販されている。基本的な EUS-FNA 用の穿刺針は、針とスタイレットおよびシースの三重構造になっている (図2)。針の太さについては、19ゲージ、22ゲージ、25ゲージなどがあり、病変の性状や部位によって使い分けられる。通常は22ゲージ (あるいは25ゲージ) が用いられるが、膵頭部病変、膵鉤部病変などでスコープの角度が急峻になるような場合には、25ゲージの穿刺針が適している^{6,7)}。AIP や悪性リンパ腫、サルコイドーシスなどで診断のためより多くの組織検体が必要な場合には19

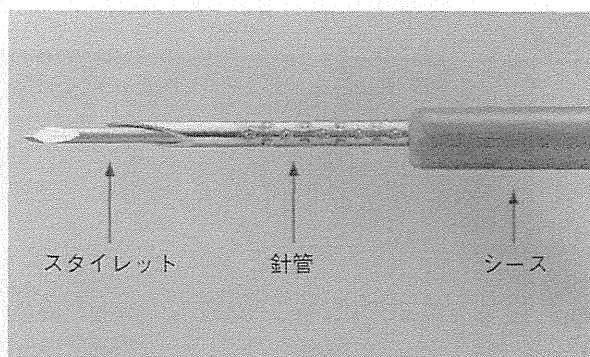


図2 EUS-FNA に用いられる穿刺針
スタイレット、針管、シースの三重構造となっている。

ゲージの穿刺針を用いる。

2. 人員配置

手技を行う際には術者の他に助手が最低2名必要となる。1名は穿刺針の操作補助、もう1名はスコープの保持や観測装置の操作を担当する。さらに、バイタルサインの確認を行う看護師も必要である。

III. 手技の実際

1. 術前、術中、術後処置

欧米の施設では外来で EUS-FNA を行うことが多いが、当施設では通常1泊2日の入院で行っている。穿刺を行う前に、血液検査で出血傾向がないこと、抗血栓薬を内服していないことを確認しておく。

前処置として咽頭麻酔を行ったうえで、塩酸ペンタゾシン (15 mg) 1 A、塩酸ピドロキシジン (25 mg) 1 A を筋注、さらに臭化プリフィニウム (7.5 mg) 1 A あるいはグルカゴン (1 mg) 1 A を筋注する。これらに加えて、通常はミダゾラム (10 mg) 1 A を生理食塩水で薄めて 20 ml としたものを必要量だけ適宜静注し、鎮静下に検査を行っている。経鼻カニューラはあらかじめ装着しておき、パルスオキシメーターで酸素飽和度をモニターし、90%以上を保つよう必要に応じて酸素を投与している。

生検後はフルマゼニル (0.5 mg) 1 A を投与し鎮静解除を行うとともに、抗生剤の点滴投与を行っており、さらに膵病変の穿刺後には蛋白分解酵素阻害薬の点滴投与を行っている。検査後は絶食とし、翌日の血液検査および理学的所見で問題なければ退院とする。

2. 病変の描出と穿刺

穿刺手技については、以下のステップで行われる。

①まず超音波内視鏡を食道、胃、あるいは十二指腸まで挿入して B モード画像で病変を捉え (図3a)、次にカラードプラで穿刺経路に血管が介在しないことを

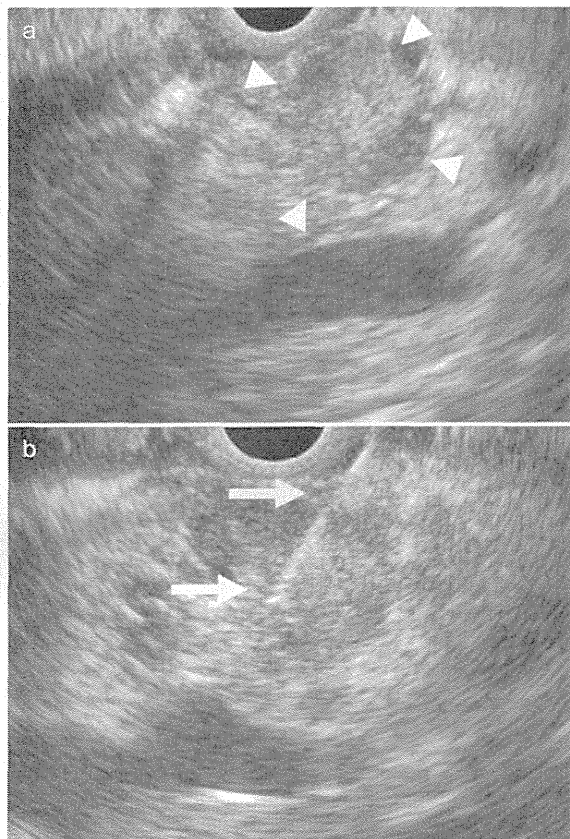


図3 病変の描出と穿刺

a : Bモード画像で病変(矢頭)を捉える。
b : 穿刺針(矢印)を病変に刺入する。

確認する。

②穿刺針のシースが鉗子口から確実に出ていることを超音波画像あるいは内視鏡画像で確認する。鉗子チャンネル内で穿刺針の挿入に抵抗を感じた場合は、無理なく挿入できる場所まで内視鏡の角度を戻す。

③穿刺角度や位置を確認しながら針を穿刺対象の病変の直上まで誘導する。この際にスタイレットを5 mm程抜いておくことにより穿刺針の先端が超音波画像で捉えやすくなり、また鋭利になるため刺入しやすくなる(図4)。

④穿刺方向を定めた後、針を病変に刺入する(図3b)。針が病変内に刺入されたら、穿刺針先端に混入した消化管組織の混入を除去する目的でスタイレットを一旦元の位置に押し戻す。

⑤次に助手にスタイレットを完全に抜去してもらい、穿刺針に20 mlのシリンジを装着し陰圧をかけてもらう。その後、病変内で約20回穿刺針を前後にストロークさせる。なお、穿刺中に血液の逆流がみられる際には陰圧を10 ml/あるいは0 ml/とする。リンパ節など血液成分の多い病変の穿刺では最初から10 ml/あるいは0 ml/としておく。

- ⑥シリンジの陰圧を解除し、針を病変から抜去する。
- ⑦得られた検体を用いて細胞診・組織診を行う。

IV. 穿刺手技の工夫

1. 穿刺時に病変が逃げる場合の対策

病変が硬くて穿刺困難な場合や、病変が胃大彎にあり通常の穿刺針では胃壁が伸展するのみで有効なストロークができないような場合には、針を進めるときには病変をあたかも針で切り取るように素早く、針を戻すときには針が病変から抜け出ないようにゆっくりと行うのがコツである。この時にはneedle sliderとストッパーの間で音が出るほどスピーディに行うことからdoor knocking method⁸⁾と呼ばれる。それでも穿刺が困難な場合にはスプリング装置による自動穿刺機能を有する穿刺針に替えてみると有効な場合が多い。また、内視鏡の吸引ボタンを押しっぱなしにして、消化管粘膜とスコープ先端を密着させておく、あるいはスコープの角度をかけておいて病変を逃さないようにしておく(shovel car method⁹⁾)と、有効な場合もある。

2. 穿刺時に持続陰圧は必要か?

一般的にFNA施行時に持続陰圧をかけると充実性病変では感度が高くなるとされている¹⁰⁾。しかし、血液の混入が多い場合にはすでに述べたように持続陰圧を減らしたり、場合によってはまったく陰圧をかけない方がよい場合もある。また、最近ではとくに25ゲージ穿刺針を用いた場合には、シリンジによる持続陰圧をかけるよりも、穿刺のストロークを行いながらスタイレットを徐々に抜いていくいわゆるslow pull法の方が血液の混入を減少させる結果として検体採取率が高くなるという報告もある¹¹⁾。

3. 穿刺部位は病変の辺縁部が良いのか、中心部が良いのか?

腺癌などで中心部が壊死しているような病変では当然、病変の辺縁を狙って穿刺するべきであるが、通常は中心部および辺縁部から穿刺するようにしている。この場合、数回の穿刺で中心部および辺縁部に分けて穿刺するのが簡便である。しかし、穿刺用超音波内視鏡の扱いに慣れれば、穿刺針を病変に刺入したままスコープを動かしたり、鉗子起上装置で穿刺針の方向を変えることにより、1回の穿刺で中心部および辺縁部から検体を採取することも可能である。この方法はfanning techniqueとして同じ穿刺回数で診断率を上げる方法として報告されている¹²⁾。