

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06865

研究課題名(和文)大腸癌同一症例原発/転移組織を用いたプロテオーム解析による血中転移マーカーの開発

研究課題名(英文) Biomarker discovery of colorectal cancer metastasis from cancer tissues and verification in plasma exosomes by targeted proteomics.

研究代表者

白水 崇 (Shiromizu, Takashi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト・協力研究員

研究者番号：00582678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌の血中診断マーカー開発の為、臨床組織を用いたプロテオーム解析によるマーカー候補の探索と、血中エクソソーム画分での評価を行った。マーカー候補探索では、同一患者の原発巣/転移巣組織から膜画分を調製し、TMT10plexによる定量プロテオーム解析により4967タンパク質と、原発/転移間で発現量に差のある182の膜タンパク質を同定した。これらの同定された候補分子の中から、血漿サンプルからエクソソーム画分において、SRM(Selected Reaction Monitoring)法による検証解析を行った。本研究で探索/検証された候補分子からは、診断マーカーの開発や創薬ターゲットの創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Early detection of colorectal cancer (CRC) metastasis is crucial to improve the prognosis. Although, the numerous research elucidate the mechanism of CRC metastasis, the effective biomarker have not yet been established. Recent advances in target proteomics have enabled high-throughput verification of hundreds of biomarker candidate proteins. Within the past few years, extracellular vesicle (EV) have emerged as important mediators of intracellular communication and to play the pathologic role in several disease including cancer. In this study, we aimed to verify CRC biomarker candidate proteins in EVs from CRC patient blood by a targeted proteomic method called selected reaction monitoring (SRM). As the result of quantitative proteomic analysis, 4967 proteins were identified and 182 proteins were differentially expressed between metastatic and non-metastatic cancer tissues. Then, we verified these marker candidate proteins in EVs from CRC patient blood by SRM analysis.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：大腸癌 バイオマーカー プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の治療においては、転移が予後を規定する重要な因子であり、転移を予測・診断できるバイオマーカーの開発は重要である。しかしながら、癌転移の分子メカニズムは複雑であり、症例における個人差も大きい。近年の基礎医学的な研究により、癌転移の分子メカニズムは次第に明らかになりつつあり、大腸癌においても、転移に関わる重要なシグナル経路についての解析は、相次いで報告されているが、転移は原発巣からの遊走離脱から血管への侵入、遠隔組織への定着と増殖など、多くの生物学的過程が含まれており、単一のシグナル経路の解析から転移を予測することは困難であった。この様な状況において、細胞内のシグナル全体を対象としたオミックス研究によるマーカー候補の探索は有望であり、大腸癌においても報告されているが、幾つかの転移関連因子を同定するとどまり、大腸癌転移の診断に有効なバイオマーカーは開発されていない。

2. 研究の目的

(1)大腸癌同一症例の原発巣および転移巣組織を用いたマーカー候補分子の探索

同一の患者より採取した大腸癌原発巣および肝転移巣組織から細胞膜画分タンパク質の抽出を行う。抽出した膜タンパク質は、安定同位体標識による定量プロテオーム解析を行い、原発巣と転移巣間で発現量に変化のあるタンパク質を網羅的に解析する。マーカー候補分子の絞り込みは、プロテオーム解析で得られた大規模データを用いたジーンオントロジー解析やパスウェイ解析などバイオインフォマティクス技術により行う。

(2)臨床組織を用いた SRM 法によるマーカー候補の検証

プロテオーム解析により同定されたマーカー候補タンパク質の検証は、一般的には特異抗体を作成して行われる。しかし、大規模解析によって得られた多数のマーカー候補に対して抗体を作成するのは時間と費用の面で難しい。そこで、抗体に代わる検証法として、三連四重極型質量分析計を用いた SRM(Selected Reaction Monitoring)法を用いる。この手法では、抗体に比べ安価で、しかも一度に百以上のペプチドを定量できるという利点がある。さらには多数の臨床検体に対してハイスループットにペプチドを定量することが可能である。

(3)血中エクソソーム画分で検出・定量できるマーカーの探索

臨床組織において同定、検証されたマーカー候補タンパク質を、診断マーカーとして実用化するため、血液検査で利用できるマーカーの探索を行う。未処理の血液サンプルには

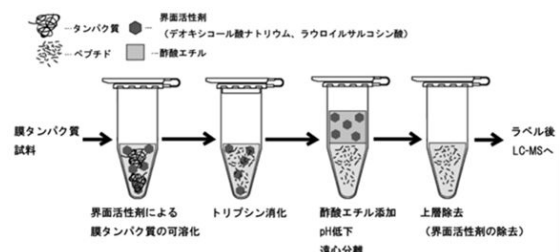
アルブミンやグロブリンなど、少数のタンパク質が大過剰に存在し、マーカー候補タンパク質が分泌されていたとしても、相対的に微量なため検出・定量を行うのは非常に困難である。細胞内にあるシグナル分子が細胞外に放出される際に、エクソソーム等の細胞内小胞系に輸送された後に分泌される経路をとるものも多い。そのような小胞系は血中遊離の夾雑タンパク質と分離することができるので、バイオマーカー検出のターゲットとしては有望である。また、臨床組織の膜タンパク質から同定された候補分子の中には、血中エクソソーム画分に分泌されているものもあると予想できる。そこで、検体組織での検証されたマーカー候補分子の中から、血中エクソソーム画分でも定量できるものがあるか、血漿サンプルから分離したエクソソーム画分を用いた検証を行う。評価のために使用するサンプルはがん研有明病院で採取された血漿検体を用いる。この検体は術前術後から再発に至るまで、経時的に採取・保存されているので、診断マーカーの評価のためには理想的なサンプルである。エクソソーム画分に対して評価する。この検証も、SRM 法により、多検体に対してハイスループットに行う。

3. 研究の方法

(1)同一症例大腸癌原発/転移巣の膜タンパク質を用いた大規模定量プロテオーム解析

膜画分タンパク質の抽出と消化

大腸癌の原発巣および転移巣の臨床組織から膜画分タンパク質を分離し、プロテオーム解析用サンプルを調製する。難溶性の膜画分からタンパク質を抽出と消化するには、相間移動溶解法(Phase Transfer Surfactant : PTS 法)を用いる(図1)。難溶性の膜画分タンパク質は界面活性剤としてデオキシコール酸ナトリウムやラウロイルサルコシン酸を含む溶液で可溶化し、トリプシンで消化する。その後、酢酸エチルを加え、酸性条件にすることで界面活性剤を除去する。脱塩精製して得られたペプチドを回収し、プロテオーム解析用のサンプルとする。



(図1)PTS法を用いた膜タンパク質画分の調製

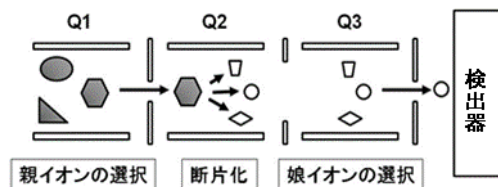
安定同位体標識による、定量プロテオーム解析

原発巣/転移巣の間でタンパク質の発現量を比較するため、安定同位体標識試薬(TMT10 plex: Thermo scientific)を用いた定量プロテオーム解析を行う。TMT 試薬でラベルした

ペプチドをイオン交換クロマトグラフィーと質量解析計にオンライン接続した逆相クロマトグラフィーで二次元分画する。二次元分画する事により、微量ペプチドの同定が可能になる。ペプチドの同定に質量解析計 Q Exactive(Thermo scientific)を用いる。

(2) SRM 法によるマーカー候補の検証

同定されたマーカー候補タンパク質について、臨床検体組織を用いて発現量の変化を検証する方法を確立する。三連四重極型質量解析計 (TSQ Vantage, Thermo Scientific) を用いた SRM 法での検出を試みる (図 2)。SRM 法は、特定の質量の親イオンを選択的に破壊し、生成した娘イオンの中のさらに特定イオンのみを検出するため、複雑なサンプル内から標的とするタンパク質由来のペプチドを高感度に検出することができる。



(図 2) SRM 法を用いた質量分析

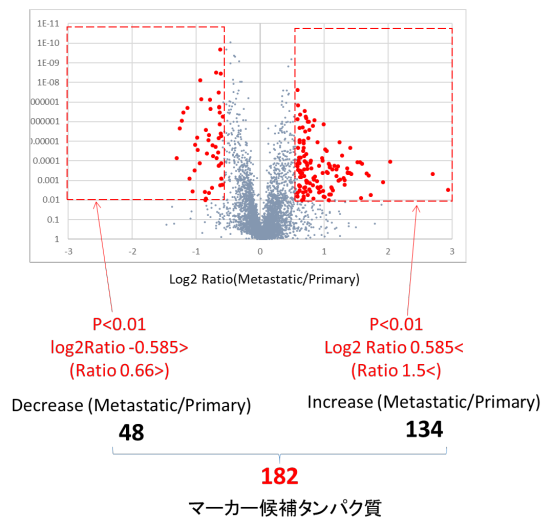
(3) 血中エクソソームでの検出と定量

臨床組織において同定、検証されたマーカー候補タンパク質について、健常者および癌患者から採取した血漿サンプルより調製したエクソソーム画分を用いて検証を行う。エクソソーム画分の調製は、遠心分離とフィルター過により行う。解析は、術前術後から再発までの経時的に分類されたサンプルに対して行い、SRM 法を用いることで多検体をハイスループットに検証する。

4. 研究成果

(1) 臨床組織を用いた大規模定量プロテオーム解析によるマーカー候補の同定

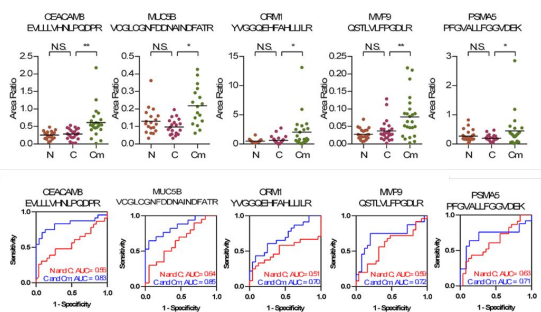
大腸癌患者の原発巣および転移巣 12 組 24 検体の臨床組織より膜画分を調製し、PTS 法によるタンパク質消化を行った。さらに、TMT10plex による定量プロテオーム解析を行った結果、4967 個のタンパク質を同定し、さらに原発巣と転移巣の間で発現量に変化があったタンパク質を 182 個同定した (図 3)。これらの同定された組織の膜由来のタンパク質の中から、エクソソーム画分にも存在するタンパク質を選択するため、臨床血漿および大腸癌培養細胞上清から抽出したエクソソーム画分においても同定されたタンパク質と比較して一次候補となる分子を選択した。さらに、これら同定タンパク質の中から SRM 法に適するターゲットペプチドを選択した。



(図 3) 大腸癌膜画分の TMT10plex 解析結果

(2) マーカー候補タンパク質の SRM 法による血中エクソソーム画分での検証

大腸癌転移関連タンパク質について、血中エクソソーム画分に対する SRM 法により、マーカー候補の絞り込みを行った。健常者、Stage2 の癌患者 (転移なし) および Stage4 の癌患者 (転移あり) 由来の血漿サンプルより、超遠心法による細胞外小胞画分の回収を行い、マーカー候補の SRM 解析を行った。その結果、健常者/転移あり/転移なしのサンプルグループ間で発現量に差のある新規の大腸癌血中診断マーカー候補タンパク質を複数同定した (図 4)。



(図 4) SRM 法による転移マーカー候補の検証

(3) 今後の展望

今回同定されたマーカー候補タンパク質については、さらに大規模な臨床検体を用いた検証実験を行うと共に、診断マーカーとしての実用化を達成するために、簡便な検出系の構築を目指す。今回の研究では、エクソソーム画分の調製には超遠心機を用い、マーカーの検出には SRM 法を用いた。これらの装置は臨床現場での運用が難しい為、これらの装置を用いない新たなサンプル調製法やマーカー検出法の構築が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Takashi Shiromizu, Hideaki Kume, Mimiko Ishida, Jun Adachi, Masayuki Kano, Hisahiro Matsubara, and Takeshi Tomonaga. Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. 査読有り Sci Rep. 2017 Oct 6;7(1):12782.doi:10.1038/s41598-017-13092-x.

[学会発表](計8件)

白水崇、石田美海子、足立淳、朝長毅、血中細胞外小胞を用いた新規大腸がんマーカー候補タンパク質の探索とターゲットプロテオミクスによる評価。日本プロテオーム学会 2017 年大会 2017.7.26-28「ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)」

Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga. Proteomic analysis of metastatic colorectal cancer cell and verification by SRM/MRM analysis. 15th Human Proteome Organization World Congress, 2016.9.18-21 「Taipei International Convention Center (台湾・台北)」

白水崇、足立淳、朝長毅、大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析による新規転移因子の探索および SRM/MRM 法による検証。日本プロテオーム学会 2016 年大会 2016.7.28-29「北里大学(東京都・港区)」

Takashi Shiromizu, Mimiko Ishida, Naomi Ohnishi, Risa Fujii, Koji Ueda, Satoshi Nagayama and Takeshi Tomonaga. Targeted proteomic analysis for biomarker discovery of colorectal cancer metastasis from plasma EVs. 5th Annual Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles. 2016.5.4-7「De Doelen Concert and Congress Center (オランダ・ロッテルダム)」

Takashi Shiromizu, Satoshi Nagayama, Takeshi Tomonaga. Proteomic analysis for biomarker discovery in metastatic colorectal cancer tissues and plasma exosomes. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.8-10「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

白水崇、長山聡、朝長毅、第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会、大腸がん同一症例の原発/転移組織の定量プロテオミクス解析による転移マーカー探索および血中エクソソームマーカーへの応用 2015.10.7「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

白水崇、長山聡、朝長毅、大腸癌臨床組織膜タンパク質および血中エクソソームのプロテオーム解析による転移マーカーの探索。第2回日本細胞外小胞学会 2015.8.26-28, 「グランドプリンスホテル広島(広島県・広島市)」

Takashi Shiromizu, Satoshi Nagayama, Takeshi Tomonaga. Biomarker discovery of colorectal cancer metastasis from cancer tissues and verification in plasma exosomes by targeted proteomics. 第13回日本プロテオーム学会 2015.7.23-24, 「くまもと森都心プラザ(熊本県・熊本市)」

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 大腸がんを検出するためのバイオマーカー

発明者: 朝長 毅、白水 崇

権利者: デンカ生研株式会社、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

番号: 特願 2017-129941

出願年月日: 2017 年 6 月 30 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白水 崇 (SHIROMIZU Takashi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所, 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト, 協力研究員

研究者番号: 00582678

(2) 研究分担者

足立 淳 (ADACHI Jun)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所, 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト, プロジェクト研究員

研究者番号: 20437255

(3) 研究分担者

長山 聡 (NAGAYAMA Satoshi)

公益財団法人がん研究会, 有明病院 消化器外科, 医長

研究者番号: 70362499

(4) 連携研究者

朝長 毅 (TOMONAGA Takeshi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所, 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト, プロジェクトリーダー

研究者番号: 80227644