

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18427

研究課題名(和文)革新的プロテオミクスによる髄液中の膠芽腫バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of the biomarker in cerebrospinal fluid of glioblastoma by innovative proteomics

研究代表者

古田 拓也 (Furuta, Takuya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20646690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は悪性脳腫瘍のひとつである膠芽腫の早期発見を可能とし、病勢を反映するバイオマーカーを同定することを目的とする。患者由来の髄液を先進的なプロテオミクスによって解析し、これまでに十数種類のバイオマーカー候補タンパク質を同定した。その一部を詳細に解析したところ、腫瘍の血管新生に関わるタンパク質で、膠芽腫のバイオマーカーとしてはこれまでに報告のない新規性の高いものであることを突き止めた。またこのタンパク質は神経膠腫の中でも悪性度の高い膠芽腫に特異的に高発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is establishment of the biomarker that can identify glioblastoma, one of the most malignant brain tumor, early in the disease progression and recurrent stage. We analyzed cerebrospinal fluid derived from patients with the innovative proteomics and identified several biomarker candidate proteins. One of the candidates was involved in tumor angiogenesis and found that it is highly expressed in glioblastoma. This protein has never been reported as a biomarker of glioblastoma. In addition, it was also revealed that this candidate protein was highly expressed specifically in glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：バイオマーカー プロテオミクス 膠芽腫

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 切望される膠芽腫のバイオマーカー  
 いまだ人類が克服できていない疾患の代表である膠芽腫は、飛躍的な治療成績向上のためバイオマーカーの同定が切望されている。膠芽腫の初期治療後には pseudoprogression と呼ばれる病態がしばしば出現し、真の再発との鑑別に難渋することがある。2 者を鑑別し時間の浪費や無用の手術を避けるためにもバイオマーカーの需要は高い。

(2) バイオマーカー探索に関わる問題  
 従来のゲノミクスやプロテオミクスにおいてもバイオマーカーの候補分子を同定することは可能であったが、次の段階で候補分子を絞り込み、バイオマーカーを同定するための個別のタンパク質定量系に問題があった。定量系が全くないタンパク質に関しては抗体を個別に作成する必要があり、抗原タンパク質の作成、免疫による抗体作製、抗体の特異性検討という行程をふむため短くても 1 年程度の期間を要し、動物実験という倫理的問題を有していた。我々が今回用いる革新的プロテオミクスは、質量分析計を格段に応用した技術として開発したものである。標的タンパク質自身を同定・定量するのではなく、標的タンパク質を加水分解酵素によって消化し生成される標的特異的な親水性ペプチド(標的対象ペプチド)を同定・定量する (Kamiie et al. *Pharm Res* 2008) これにより抗体を用いた場合と同等あるいはそれ以上の感度で、膜タンパク質を含め多数の標的タンパク質を一斉定量することが可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では治療前の検体解析を中心とするこれまでのバイオマーカー探索とは異なり脳脊髄液(髄液)を経時的に分析することで病勢を反映、究極的には早期発見を可能とするマーカーを同定することを目的とする。病勢を反映するバイオマーカーの同定は pseudoprogression と真の再発との鑑別を可能にし、前者であれば無用の治療を回避し後者であれば早期の治療介入が実現する。

### 3. 研究の方法

(1) バイオマーカーの抽出  
 血液と比べて含有タンパク質の種類が少なく、血液脳関門よりも腫瘍側で循環する髄液をターゲットとして、治療前後および腫瘍再発時のタンパク質プロファイルを作成する。各採取時点のプロファイルと比較して含有量に著明な差があるタンパク質をマーカー候補として絞り込み、コントロール症例と比較することで膠芽腫の髄液中マーカーを同定する。

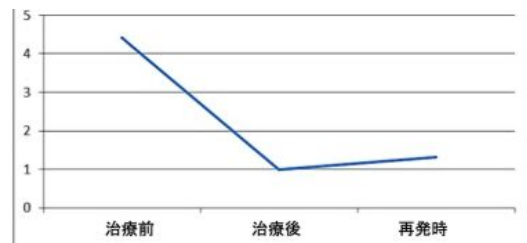
### (2) 候補分子の検証

同定したマーカー分子の局在を免疫組織化学で、機能解析を細胞および動物実験で行い、マーカーとしての妥当性を評価する。具体的には、抽出時に用いた症例とは異なる症例群を用いて免疫組織化学による検証を行うことで抽出されたマーカー候補分子の妥当性を確認する。また、既存の膠芽腫細胞株(T98、U87、U251)および独自に樹立した膠芽腫幹細胞株(KSG01)を用いて、阻害剤投与や発現を変化させて増殖アッセイ、浸潤アッセイを行うことで機能を解析する。膠芽腫の生物学的特性に関与していることが示されれば、動物モデルを使用してその信頼性を担保する。

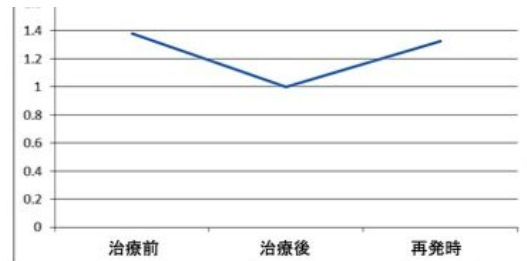
### 4. 研究成果

#### (1) マーカー候補分子の抽出

患者由来の髄液をプロテオミクス SWATH 法によって解析した。治療前、治療後、再発時で高発現、低発現、高発現と変化したものを抽出した。これまでに 11 種類のバイオマーカー候補タンパク質を同定した(図 1、2)。その一部を詳細に解析し、腫瘍の血管新生に関わるタンパク質であり、膠芽腫のバイオマーカーとしてはこれまでに報告のない新規性の高いものであることがわかった。



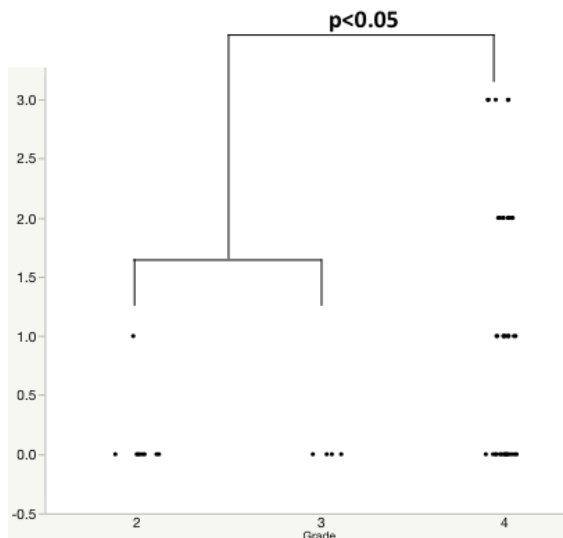
(図 1. 候補分子 1)



(図 2. 候補分子 2)

### (2) 候補分子の検証

同定された分子のうち 1 種類に関して、49 例の膠芽腫 (WHO grade 4) および 18 例の対象標本 (膠芽腫以外の低悪性度神経膠腫: WHO grade 2-3) を用いて免疫組織化学を行ったところ、膠芽腫において発現が有意に上昇していることが明らかになった (図 3)。



(図3. 悪性度と候補分子の発現の相関)  
 また、治療前、治療後、再発時の各時点における腫瘍体積をMRI画像から算出し、この分子の発現変化との相関を解析したところ、腫瘍体積と候補分子の挙動が正の相関を認めました。よってこの分子は膠芽腫の診断マーカーとして有用であることが示唆された。今後、この分子の阻害薬やノックダウンなどによる膠芽腫細胞の挙動変化を増殖アッセイ、浸潤アッセイなどで評価し、マーカーとしての妥当性や治療標的としての可能性を検証する予定である。

### (3) 研究の問題点および展望

他のマーカー候補タンパク質についても同様に解析を平行しているが、免疫組織化学における染色性が安定していない。原因としてはそれらのタンパク質が分泌性であることや生物学的半減期が短いことが考えられた。対応としてはウエスタンブロットによる使用する抗体の見直し、RT-PCRによる遺伝子レベルでの発現との相関解析を検討している。上記の問題点から SWATH 法が免疫組織化学など従来のプロテオミクスよりも微量なタンパク質を高感度に定量できることが改めて明らかになった。さらに症例を増やして解析を進める予定である。

### 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3件)

Domoto T, et al. (3番目) Glycogen synthase kinase-3 is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci.* 107:1363-1372,2016. doi: 10.1111/cas.13028.

Kim SH, et al. (8番目) Serine/Threonine Kinase MLK4 Determines Mesenchymal

Identity in Glioma Stem Cells in an NF- B-dependent Manner. *Cancer Cell.* 29:201-13,2016. doi:

10.1016/j.ccell.2016.01.005.

Chikano Y, et al. (3番目) Glycogen synthase kinase 3 sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1, and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway. *Mol Cancer Ther.* 14:564-74,2015. doi: 10.1158/1535-7163.

[学会発表](計2件)

古田拓也. 革新的プロテオミクスによる膠芽腫バイオマーカー探索. 第33回日本脳腫瘍学会学術集会. 2015年12月6-8日、京都.

古田拓也. 定量プロテオミクスの膠芽腫バイオマーカー同定への応用. 第74回日本脳神経外科学会学術総会. 2015年10月14-16日、札幌.

[図書](計0件)

なし

[産業財産権]

なし

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 拓也 (FURUTA, Takuya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 20646690

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

中田光俊 (NAKADA, Mitsutoshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20334774

大槻純男 (OTSUKI, Sumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：60323036

(4)研究協力者

董 宇 (DONG, Yu)

北林 朋宏 (KITABAYASHI, Tomohiro)