

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18433

研究課題名(和文)疾患特異的な質的变化を示す腫瘍マーカーペプチドの探索

研究課題名(英文)Identification for tumor marker peptides showing qualitative changes

研究代表者

増石 有佑(Masuishi, Yusuke)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20626767

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)：健常者と癌患者を区別することが出来るヒト血清中のCEAペプチドの探索を目的とした。CEA濃度が高い大腸癌患者血清を用いてIP-MRM法の条件検討を行った。その結果、ヒト血清において定量測定可能な8種類ペプチドを選定し、MRMトランジションを作成した。CEA濃度が10-20ng/ml程度のわずかに高値の検体をIP-MRMの測定対象とした(大腸癌3例、肺癌2例、健常者男性2例、健常者女性3例)。測定した全てのCEAペプチドにおいて癌患者、健常者間での定量差は見られなかったが、AIA-600 とIP-MRMによるCEA濃度の値は同程度であった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to search for CEA peptides in human serum that can distinguish between normal and cancer patients. Optimization of IP-MRM (immunoprecipitation multiple reaction monitoring) was carried out using human serum from colorectal cancer patients with high CEA concentrations. As a result, we selected the eight kinds of peptides and create MRM transition. Next, to verify the qualitative changes of CEA in human serum from colorectal (n=3), lung (n=2) cancer patients and normal (n=5), we used the IP-MRM method. However, there were no significant differences between these groups.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：CEA CEACAM5 MRM IP-MRM

1. 研究開始当初の背景

現在、血清腫瘍マーカーは臨床診断に広く用いられているが、開発当初から指摘されている以下の問題点が未解決である。1)一部の良性疾患で陽性を示すため、癌患者との判別が難しい。2)一部の腫瘍マーカーは臓器特異性が低く、様々な癌患者で上昇するため、どの臓器で癌が発生しているのか判別できない。これらの問題点を解決した新しい診断法の開発が求められており、既存腫瘍マーカーの分子形態の変化(質的变化)を解析することは、精度を高めた新たな診断法の開発に繋がると期待されている。

申請者を含む研究グループは血清中の極微量タンパク質を解析するために、免疫沈降法(IP)を用いて目的タンパク質を濃縮した後、multiple reaction monitoring(MRM)法を行い(IP-MRM法)、0.1-10 ng/ml程度の疾患特異的な腫瘍マーカー候補タンパク質の検出に成功している(Arakawa et al. J Proteome Res 2013)。さらに、様々な血清微量タンパク質に対しIP-MRM法を行い、翻訳後修飾とタンパク質切断フラグメントによる質的变化の解析を行ってきた(図2)。申請者らは本研究を進める中で、すでにCEAのN型糖鎖部位11個、タンパク質切断部位12個を同定することに成功した。これらによるCEAの質的变化を患者血清間で詳細に検証した例はこれまでにないため、新たなCEAの疾患特異的な質的变化の発見が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では既存腫瘍マーカーであるCEAの質的变化を解析することで、腫瘍診断精度を向上させる疾患特異的なマーカーペプチドの探索技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

CEAのIP-MRM法の測定条件の検討

MRMチャンネル構築のために、CEAの抗体を用いたIPを行いCEAを精製する。MRMチャンネル構築のためのCEAの精製は癌患者血清から行うのが最も適していると考えられる。本実験では、CEAの濃度が高い(100ng/ml以上)大腸癌患者血清を数種類選びIPを行った。さらにリニアイオントラップフォーリエ変換質量分析計LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific)を用いて、精製したCEAのトリプシン消化産物に対してLC-MS/MS解析を行った。MASCOT検索を行う際は、切断フラグメント、スプライズバリエーションの検出も行い、質的变化を示す可能性のあるペプチドのMRMチャンネルを構築した。また、N型糖鎖修飾を受けているCEAペプチドを同定するために以下の前処理を行った。トリプシン消化ペプチドを脱塩処理し凍結乾燥を行った後、重酸素水($H_2^{18}O$)中でPNGaseによるグリコアミダーゼ消化を行う。 ^{18}O で標

識されたAsn-Aspの変換をMASCOT検索することでCEAのN型糖鎖修飾部位の同定を行った。MRM解析にはターゲットプロテオミクスのデータ解析ソフトウェアとして世界標準となりつつある「Skyline」(Brendan MacLean¹, et al. BIOINFORMATICS 2014)を使用した。本研究ではSILAC標識されたCEAを含む培養上清を内部標準とした。HEK293細胞株にCEA発現プラスミドをトランスフェクションし培養上清中にCEAを発現させた。

各種がん患者血清に対してCEAのIP-MRM測定

がん患者血清および健常者血清に対して、三連四重極型質量分析装置QTRAP 5500 (AB SCIEX)を用いてCEAのIP-MRMを行った。本研究で用いた血清はAIA-600 (東ソー)で事前にCEA濃度の測定を行った。CEA濃度が10-20ng/ml程度のわずかに高値の血清検体をIP-MRMの測定対象とし、(大腸癌3例、肺癌2例、健常者男性2例、健常者女性3例)これらを区別することが可能なペプチドの探索を行った。本研究ではSkylineソフトウェアを用いて各検体におけるCEAペプチドの絶対定量を行った。

4. 研究成果

大腸癌患者血清に対し、CEAのIPを行った。さらに還元アルキル化およびトリプシン消化を行った後、Orbitrap Velosを用いてCEAの質量分析を行った。その同定結果からMRMトランジションを設定し、QTRAP 5500を用いてCEAのMRMを行った。その結果、IP-MRM法にてヒト血清から定量測定可能な8種類のCEAペプチドが明らかになった。8種類のペプチドのうち5種類のペプチドは糖鎖修飾を受けているペプチドであった。その多くは報告がこれまでされていない新規の糖ペプチドであった(図1)。ヒト臍

SDLVNEEATGQFR - m/z(Da) 734.8436⁺⁺
 LQLSNGNR - m/z(Da) 452.7403⁺⁺
 TLTLFNVTR - m/z(Da) 534.3027⁺⁺
 CETQNPVSAR - m/z(Da) 581.2695⁺⁺
 LQLSNDNR - m/z(Da) 481.7430⁺⁺
 TLTLLSVTR - m/z(Da) 502.3109⁺⁺
 NSGLYTCQANNNSASGHSR - m/z(Da) 642.9463⁺⁺⁺
 AYVCGIQNSVSANR - m/z(Da) 771.3668⁺⁺
 N: N型糖鎖修飾を受けているアスパラギン
 C: カルバミドメチル化システイン

図1 MRMで定量可能であったCEAペプチド

帯血由来CEA標準品を用いたCEAのIP-MRMではCoverageが50.28%、N型糖鎖部位11個、タンパク質切断部位12個を同定することに成功した。しかしこれらの新たなCEA由来ペプチドは、血清からの

IP-MRMにて安定して定量を行うことが出来なかった。さらに血清中のCEAにおける新規のタンパク質翻訳後修飾を探索するためにチタニアビーズを用いたリン酸化ペプチド解析およびGPIアンカー修飾部位の解析を行ったが、リン酸化ペプチドおよびGPIアンカー型ペプチドは同定されなかった。この結果から、血清中におけるCEAはC末端部位が切断されていると推測できる。

次に多数の大腸癌患者血清、肺癌患者血清および健常者血清中のCEA濃度をAIA-600を用いて測定した。CEA濃度が20ng/ml以下の大腸癌患者血清は13例中6例、肺癌患者血清では9例中8例であった。健常者血清では114例中20ng/ml以上のCEA濃度を示す検体はいなかったが、10ng/ml以上の値を示す検体が5例あった。本解析ではCEA濃度が10-20ng/ml程度のわずかに高値の血清検体を測定対象とした(大腸癌3例、肺癌2例、健常者男性2例、健常者女性3例)。本解析では8種類のCEAペプチドの絶対定量を行ったが、CEA濃度が10-20ng/ml程度の検体ではIP-MRM法による安定した定量結果が得られたCEAペプチドは8種類中3種類のみであった(SDLVNEEATGQFR - 733.3495⁺⁺、TLTLFNVTR - 534.3027⁺⁺、TLTLLSVTR - 502.3109⁺⁺)。これらCEAペプチドの絶対定量を行ったが各種癌患者血清と健常者血清間での有意な差は見られなかった(図2)。しかしIP-MRM法による定量結果とAIA-600による定量結果には相関がみられた。

本研究では、IP-MRM法を用いることで微量の腫瘍マーカータンパク質の定量解析に成功した。さらに研究を継続することで、測定対象の分子形態の変化(質的变化)を明らかにする可能性がある。更なる高分解能を持つ質量分析計や新規タンパク質前処理法を用いることで診断精度を向上させるマーカーペプチドの発見は可能だと考えられる。

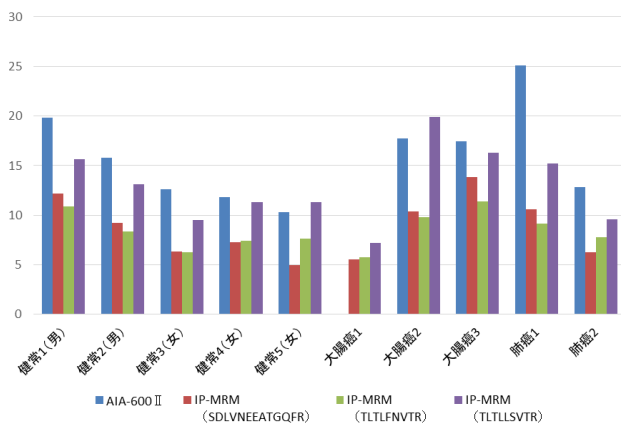


図2 血清中のCEA濃度(ng/ml)

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)
すべて査読有り

1. Masuishi Y, Kimura Y, Arakawa N, Hirano H, Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and ω-sites using TiO₂-based affinity purification followed by hydrogen fluoride treatment. Journal of Proteomics (2016) 139(29):77-83
2. Yusuke Masuishi, Yayoi Kimura, Noriaki Arakawa, Hisashi Hirano, Data for identification of GPI-anchored peptides and ω-sites in cancer cell lines. Data in Brief (2016) 7:1302-1305
3. Arakawa N, Kobayashi H, Yonemoto N, Masuishi Y, Ino Y, Shigetomi H, Furukawa N, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H, Miyagi E. Clinical Significance of Tissue Factor Pathway Inhibitor 2, a Serum Biomarker Candidate for Ovarian Clear Cell Carcinoma. PLoS One. (2016) Oct 31;11(10):e0165609.

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

1. Masuishi Y, Kimura Y, Arakawa N, Hirano H, Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins Profile in Organs HUP0 2016, the 15th Annual World Congress Taipei, Taiwan (2016)
2. 増石 有佐, 木村 弥生, 荒川 憲昭, 平野 久. 各臓器における GPI アンカー型タンパク質発現プロファイル, 日本プロテオーム学会 2016 年大会, 2016 年 7 月, 東京.
3. Masuishi Y, Kimura Y, Arakawa N, Hirano H, Identification method for glycosylphosphatidylinositol anchored proteins and ω-sites using TiO₂-based affinity purification, IV International Caparica Conference on Analytical Proteomics, Portugal (2015)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

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

<http://www.fmu.ac.jp/home/hygiene/index.html/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

増石 有佑 (MASUIISHI YUSUKE)

福島県立医科大学医学部 衛生学・予防医学
講座・助教

研究者番号：20626767

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()