

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15626

研究課題名(和文) 転移巣組織とエクソソームの多面的プロテオーム解析による大腸がん転移早期診断法開発

研究課題名(英文) Early diagnosis of colon cancer metastasis by multifaceted proteome analysis of metastatic lesion tissue and exosome

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸がん組織から転移マーカーを探索し、血中エクソソームを用いた転移早期診断法を開発することを目的とした。大腸がん同一患者の原発巣/転移巣12組24検体の膜タンパク質の定量プロテオーム解析による転移マーカーの探索を行い、原発/転移間で発現量に差のある182種類の膜タンパク質を同定した。次に、それらのタンパク質が血中のエクソソームで検出・定量可能かどうか、高感度定量用質量分析計を用いたSRM/MRM法を用いて検討した。その結果、2つのタンパク質が高い精度で転移大腸がんを診断できる可能性が示唆された。これらのタンパク質は、大腸がんの転移マーカーとして有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to explore the metastatic marker from colorectal cancer tissue and to develop an early diagnosis method of metastasis using blood exosome. Quantitative proteomic analysis of membrane proteins in 24 tissues of primary and metastatic lesion in the same patient with colorectal cancer identified 182 potential metastatic biomarker candidate proteins with different expression levels between primary and metastatic lesion. Next, we examined whether these proteins can be detected and quantified in blood exosomes using the SRM / MRM method. As a result, it was suggested that two proteins could diagnose metastatic colorectal cancer with high accuracy. These proteins were considered promising as a metastatic marker of colorectal cancer.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：大腸がん 転移早期診断 エクソソーム プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

転移には、転移先組織におけるがん細胞と微小環境の直接的または液性因子を介した相互作用及びがん細胞の生存シグナルの活性化が重要である (Massague, *Trend in Cancer* 2015)。また、原発巣の一部の細胞が転移能を有すると言われており、転移なしとありの原発巣組織の比較だけでは、有用な転移マーカーは見つからない可能性が高い。従って、大腸がんの原発巣と転移巣組織の比較、特に上記の転移メカニズムに関わる膜タンパク質、分泌タンパク質、リン酸化タンパク質等の解析がマーカー探索に有用であるという着想に至った。大腸がんは、原発巣だけでなく転移巣も積極的に切除する希少ながん種であり、転移マーカーの解析に最適のモデルである。

血中のエクソソームは、細胞間のシグナル伝達として重要な役割を果たしていることが明らかになり、最近では種々の疾患のバイオマーカー研究の対象として脚光を浴びている。エクソソームは細胞から分泌される微小胞であるため、がん細胞由来のエクソソーム中の分子はよいバイオマーカーになると考えられる。そこで我々は、がん組織由来の血中エクソソームタンパク質が、がんの性質を反映する有用なバイオマーカーになると考えた。

我々はこれまで、膜タンパク質、分泌タンパク質及びリン酸化タンパク質の大規模かつハイスループット定量プロテオーム解析法を開発し (J Proteome Res 2012)、乳がんや大腸がんのバイオマーカー候補タンパク質を同定した (厚労科費「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」(H20~24年)、Mol Cell Proteomics 2014)。また、血中エクソソームのプロテオーム解析法の開発も行い、3種類の大腸がん転移マーカー候補を見出した (JST/AMED 次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム「早期診断マルチバイオマーカー開発」(H23~27年)、国際特許出願済)。これらの最先端の技術及び患者検体を駆使して、高精度の転移再発早期診断法の確立を目指す。

2. 研究の目的

大腸がん転移症例の原発巣と転移巣組織の多面的プロテオーム解析から転移マーカー候補を探索、質量分析計を用いて血中エクソソーム中で検出・定量できるマーカーを選定し、術後から再発までの時系列の血液検体を用いて、転移再発早期診断法としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

平成 28 年度は、まず大腸がん転移症例の原発巣と転移巣組織の膜タンパク質、分泌タンパク質、リン酸化タンパク質の定量プロテオーム解析による転移再発マーカーの探索を行い、マーカー候補タンパク質を同定する。

次に、それらのタンパク質が血中のエクソソームで検出・定量可能かどうか、高感度定量質量分析計を用いた SRM/MRM 法を用いて検証する。

平成 29 年度は、血中エクソソームで検出できた大腸がん転移再発マーカー候補について、再発を来した大腸がん症例の術後から再発まで時系列に採取された血液検体を用いて測定し、マーカー候補の中で、画像診断で再発が確認される以前に変動するタンパク質を選定する。再発早期診断に有用と考えられた分子について、機能的に転移に関連があるか検証する。

4. 研究成果

(1) 大腸がん転移症例の原発巣と転移巣組織の膜タンパク質の定量プロテオーム解析による転移再発マーカーの探索

大腸がん同一症例の原発巣と転移巣組織検体から膜タンパク質を抽出、定量プロテオーム解析を行い、大腸がん転移再発マーカータンパク質を探索を行った。

同一患者の原発巣/転移巣 12 組 24 検体の膜画分を調製し、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 種類の膜タンパク質を同定した。

(2) 血中エクソソームを用いたマーカー候補タンパク質の検証

大腸がん原発巣と転移巣組織で見つかったバイオマーカー候補タンパク質について、血中エクソソーム中での検出・定量を SRM/MRM 法を用いて行った。また、過去に大腸がんのバイオマーカーとして報告されている 723 種類のタンパク質についても、合わせて血中のエクソソームで検出・定量可能かどうか検討した。SRM/MRM 法は、一度に 100 種類のタンパク質の絶対定量を可能にする技術で、従来抗体を用いて一つずつ定量していたタンパク質を一度に定量できる。また、SRM/MRM 法は抗体が不要のため、これまでよい抗体が入手できないために定量ができなかったタンパク質もすべて定量することが可能である。

計約 160 症例の血清 (健常人約 50 例、早期大腸がん患者約 80 例、進行大腸がん患者約 30 例) を用いて解析した結果、最終的に 5 ペプチド (5 タンパク質) が早期大腸がん患者に比べ、転移大腸がん患者で有意に増加していた (図 1)。

ROC 解析を行ったところ、2 ペプチド (2 タンパク質) が早期大腸がんに比し進行大腸がんでは AUC > 0.8 であった。これらのペプチドは、大腸がんの転移再発マーカーとして有望であると考えられた (図 2) (Shiromizu et al, *Sci Rep* 7, 12782, 2017)。

図1

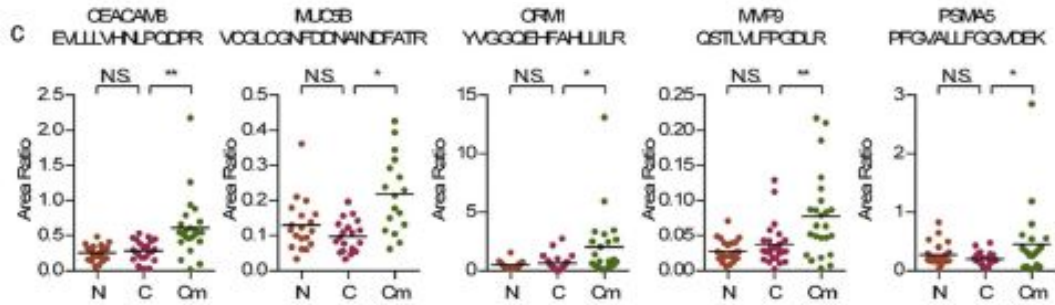
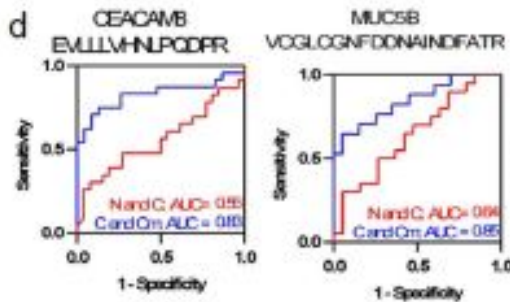


図2



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6件)すべて査読有

Shiromizu T., Kume H., Ishida M., Adachi J., Kano M., Matsubara H., and Tomonaga T. (2017) Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. *Sci Rep* 7, 12782. Doi: 10.1038/s41598-017-13092-x

Fujita K., Kume H., Matsuzaki K., Kawashima A., Ujike T., Nagahara A., Uemura M., Miyagawa Y., Tomonaga T., Nonomura N. (2017) Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep* (IF:5.6) 7:42961. Doi: 10.1038/srep42961

Adachi, J., Hashiguchi, K., Nagano, M., Sato, M., Sato, A., Fukamizu, K., Ishihama, Y., Tomonaga, T. (2016). Improved Proteome and Phosphoproteome Analysis on a Cation Exchanger by a Combined Acid and Salt Gradient. *Anal Chem* 88, 7899-7903. Doi: 10.1021/acs.analchem.6b01232

Adachi J., Narumi R., and Tomonaga T. (2016) Targeted Phosphoproteome Analysis Using Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM). *Methods Mol Biol* 1394, 87-100. Doi: 10.1007/978-1-4939-3341-9_7

Narumi R, Tomonaga T. (2016) Quantitative Analysis of Tissue Samples by Combining iTRAQ Isobaric Labeling with Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM). *Methods Mol Biol* 1355, 85-101. Doi: 10.1007/978-1-4939-3049-4_6

[学会発表](計5件)

Takeshi Tomonaga: Discovery of colorectal cancer biomarker in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. US-Japan Workshop for Cancer Research, 東京, 2018年3月19日

朝長 毅: 臨床検体を用いた創薬標的探索のためのプロテオーム・リン酸化プロテオーム解析～分離と選択の融合～. 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017年12月9日

Takeshi Tomonaga, Takashi Shiromizu, Jun Adachi: Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. 16th Human Proteome Organization World Congress, Dublin Ireland, 2017年9月18日

Takeshi Tomonaga, Takashi Shiromizu, Jun Adachi: Quantitation of putative colorectal cancer biomarker candidates in serum extracellular vesicles by targeted proteomics. 65TH ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis USA, 2017年6月5日

朝長 毅, 白水 崇, 足立 淳: ターゲットプロテオミクスを用いた血清エクソソーム中の大腸がん早期診断マーカー開発と臨床応用. 第65回質量分析総合討論会, つくば, 2017年5月17日

[図書](計0件)

〔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

種類：特許

番号：特願 2017-129941

出願年月日：2017年6月30日

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://www.nibiohn.go.jp/proteome/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)

国立研究開発法人医薬基盤研究所・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

(2)連携研究者

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：703624994