#### 研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 4 年 6 月 1 4 日現在

機関番号: 17601

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2018~2021

課題番号: 18K08148

研究課題名(和文)超高感度尿中シェディング産物網羅的解析を応用した早期肺癌診断マーカーの探索研究

研究課題名(英文) Exploratory study of urinary shedding products as a biomarker for lung cancer

#### 研究代表者

松元 信弘 (Matsumoto, Nobuhiro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号:70418838

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):本研究の目的は、発見が困難な根治可能な肺癌のうち、早期肺扁平上皮癌を対象に、尿中に存在するシェディング物質の網羅的解析によって新規の診断マーカーを探索することである。癌細胞に由来する過剰な酵素活性により異常切断を受けた断片(シェディング物質)を複数同定し、腫瘍マーカーとしての臨床的意義を解析した。扁平上皮癌患者と健常者の尿を用いて検討した結果、ROC-AUC > 0.6の基準を満たすマーカー候補を58種同定した。別に回収した肺扁平上皮癌の尿中シェディング物質を解析した結果、早期および進行期肺扁平上皮癌の両者で発現が亢進している蛋白質断片として、分子量約1800のシェディング物質Xが同定さ れた。

研究成果の学術的意義や社会的意義 我が国における肺癌の死亡数は年間約7万人を超え、悪性腫瘍による死亡数の多くを占める。尿は最も簡便に得られる生体試料で、癌早期発見を目的とする検診の効率化には最適の検体である。非侵襲的に回収が可能な生体試料である尿を用いて、新規のがん検診法を確立することは、検診の受診促進に貢献できる。本研究で得られた成果を用いて、早期肺癌の検出技術の向上を目指す。

研究成果の概要(英文): The purpose of this study was to search for novel diagnostic markers by comprehensive analysis of shedding substances in urine for detecting of early-stage squamous cell lung cancer. We identified several fragments (shedding substances) that were abnormally cleaved by excessive enzyme activity derived from cancer cells, and analyzed their clinical significance as tumor markers. We identified 58 candidate markers that met the criteria of ROC-AUC > 0.6 in urine from patients with lung squamous cell carcinoma. Analysis of urinary shedding material from separately collected lung squamous cell carcinomas identified shedding material X, with a molecular weight of approximately 1800, as a protein fragment that is upregulated in both early and advanced stage lung squamous cell carcinomas.

研究分野:呼吸器

キーワード: 肺癌 扁平上皮癌 シェディング マーカー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に ついては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

#### 1.研究開始当初の背景

我が国における肺癌の死亡数は、悪性腫瘍による死亡の多くを占める(男性:1位、女性:3位)、肺癌による死亡が多い原因として、現在の検診法では肺癌の早期発見が困難であることが挙げられる。肺癌の中でも、肺扁平上皮癌は中枢側の気道に発生することから、早期発見は困難であることが多い。

我々は、独自の質量解析技術を用いて、肺癌患者の尿中に存在する、異常なC末端を有する蛋白質断片を網羅的に解析することで、癌特異的プロテアーゼによって生成されたシェディング産物を約1万~2万種同定してきた。この技術を用いて、肺扁平上皮癌で高率に検出されるシェディング産物を同定し、腫瘍マーカーとしての診断特性を検討する。さらには、がん検診へ臨床応用し、非侵襲的に回収が可能な尿を用いた新規の検診法の確立を目指す。

#### 2.研究の目的

本研究の目的は、先行研究で確立した尿中蛋白質断片の網羅的解析技術を用いて、早期発見が 困難な肺癌である肺扁平上皮癌の検出に有用な尿中シェディング産物を同定することである。 本研究は、早期および進行期肺扁平上皮癌の症例および健常者の尿検体を用いて、肺扁平上皮癌 症例で高率に検出されるシェディング産物を同定する。さらに、癌組織が蛋白質の異常断片化を もたらし、癌の検出に有用なシェディング産物が生成するメカニズムを、ヒト由来肺扁平上皮癌 細胞株を用いて検討する。

#### 3.研究の方法

#### 1)尿中シェディング産物の探索

肺扁平上皮癌患者 43 例、健常者 49 例の尿検体を用いて、尿中蛋白質断片の網羅的解析を実施した。尿検体は精製、濃縮後に、還元アルキル化し、H2<sup>18</sup>0 在下でトリプシン消化を行った。その後、脱塩、イオン交換クロマトグラフィーによる精製後、Nano-LC-MALDI-MS / MS により、<sup>18</sup>0 非標識トリプシン消化ペプチドを検出した。得られたペプチド情報を解析することで、正常な構造と不正常な切断に由来する断片を識別した。さらに、不正常な切断を受けたシェディング産物の中から、健常者と肺扁平上皮癌患者の尿検体との比較から、肺扁平上皮癌患者で高率に検出されるシェディング産物を探索した。

#### 2) 癌細胞特異的酵素活性によるシェディング産物の生成メカニズムの検討

ヒト由来肺扁平上皮癌細胞株である RERF-LC-AI と Sq-1 を用いて、不正常な C 末端を有するシェディング産物の生成メカニズムを検討した。12 well dish へ細胞を播種し(細胞数: 0.2 x  $10^6$ )、播種翌日後にシェディングを受ける蛋白質を細胞上清中に添加する。蛋白質を添加 3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後の細胞上清を回収し、MALDI-TOF-MS を用いて蛋白質のシェディング高率を検討した。

#### 4.研究成果

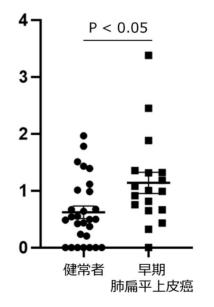
#### 1)尿中シェディング産物の探索について

扁平上皮癌患者 43 症例と健常者 49 名の尿を用いて、シェディング物質の解析を行った結果、ROC-AUC > 0.6 の基準を満たすマーカー候補を 58 種同定した。別に回した Ia 期の肺扁平上皮癌と IV 期肺扁平上皮癌それぞれ 5 例の尿中シェディング物質を解析した結果、IV 期肺癌において高率に検出されるものを 4 種、Ia 期と比較して顕著に減少しているものを 5 種同定した。別途回収した健常者 28 例、早期肺扁平上皮癌 (I-II 期)18 例の尿検体を用いて、シェディング物質の存在比を比較し、早期および進行期の肺扁平上皮癌の両者で発現が亢進しているシェディング物質を探索した。その結果、早期肺扁平上皮癌で高率に検出されるものとして、分子量約 1800 のシェディング物質 X が同定された。

# 2) 癌細胞特異的酵素活性によるシェディング産物の生成メカニズムの検討について

次に、ヒト由来肺扁平上皮癌細胞株である RERF-LC-AI と Sq-1 の培養上清中に、正常構造を有するシェディング物質 X の元蛋白質を添加し、シェディング物質 X が生成されるかを検討した。その結果、添加 3 時間後以降で、シェディング物質 X が生成されることを確認した。同物質が生成されるメカ

## 尿中シェディング物質Xの存在比



ニズムを検討するため、MMP-3 阻害剤、MMP-9 阻害剤を添加したが、同物質の生成は阻害されなかった。

今後は、シェディング物質 X の生成メカニズムの解明とがん検診への応用を目指し、胸部異常陰影を指摘された検診受診者を対象とした臨床試験を実施する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
肺がんの検出方法	国立大学法人宮崎大	同左
	学・大阪大学、中里	
	雅光、松元信弘、他	
産業財産権の種類、番号	出願年	国内・外国の別
特許、PCT/JP2018/21901	2018年	外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6.研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

## 7.科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------