

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390154
 研究課題名（和文）多戦略的プロテオーム・ペプチドーム解析による消化器癌の早期診断法の開発と実用化
 研究課題名（英文）Development of early diagnostic markers for gastrointestinal and hepatobiliary cancers by multi-strategic proteome analyses
 研究代表者
 野村 文夫（NOMURA FUMIO）
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号：80164739

研究成果の概要（和文）：多戦略的プロテオーム・ペプチドーム解析による消化器癌を対象としたバイオマーカー探索を行った結果、膵癌の新しい血清予後マーカーと原発性肝細胞癌のあらたな病理診断マーカーの検出と同定に成功した。さらに発癌促進的にはたらく習慣飲酒の新しいバイオマーカーを同定した。また、血清ペプチドーム解析を臨床検査へ応用する際に必須な検体のプレアナリシスの基礎的検討を行い、共通のプロトコールを確立することができた。

研究成果の概要（英文）：

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：蛋白質・プロテオーム・癌・臨床・検査医学

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代に入り、ゲノムに対応する用語として、トランスクリプトーム、プロテオームさらにはペプチドーム、メタボロームが登場している。DNAチップなどを用いた網羅的 mRNA 発現解析（トランスクリプトーム解析）がこれまでに盛んに行われてきた。しかし、1)細胞内での mRNA 発現量とタンパク質産生量とは必ずしも比例しないこと。2)タンパク質の活性は細胞内での局在やプロセッシング、翻訳後修飾など mRNA とは

別のレベルで制御されていることなどから、最終的にはタンパク質レベルの解析が必須であること。3)日常診療で用いられる臨床検体では通常 mRNA は解析の対象となりにくく、プロテオーム解析研究の成果はそのまま診断への応用につながるなど、などの理由から、プロテオミクス研究成果の臨床応用が期待され、国内外の研究者が top-down proteomics および bottom-up proteomics の手法を用いて研究を続けている。

2. 研究の目的

消化器系悪性腫瘍の診断体系をみると、例えば早期胃がんではX線検査や内視鏡検査を駆使した早期診断体系が確立している。肝がんではハイリスクグループを絞り込んだ上での検査体制が組まれているが、最終診断において病理組織学的検査に頼る場合も少なくない。また、膵がんにおいてはハイリスクグループを特定しにくいことに加え、根治治療が可能な無症状期の診断は困難であり、従来の診断法とは全く別の観点から新しい疾患マーカーを探索する必要がある。

本研究は複数のプロテオーム解析技術を独自に組み合わせた網羅的なプロテオーム・ペプチドーム解析法を駆使して、肝臓がん、膵がん患者から得られた血清、腫瘍組織、をターゲットとして、新しい疾患関連タンパク質・ペプチドを検出・精製・同定することを目的とする。また、これらのマーカー候補を臨床検査に応用するための基礎データとして、プレアナリシスの影響も明らかにする。

3. 研究の方法

発現プロテオーム解析の手法は分析にゲルを用いるか否かに基づき、gel-based と gel-free に分けられ、本研究でも両者を併用した。以下概要を示すが、個々の方法については研究成果に含めて示す。

Gel-based の方法として従来の蛋白質の二次元電気泳動 (2-DE) を応用した蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動法 (2D-DIGE, Ettan™ DIGE) を用いた。この方法は二種類の蛋白質試料を異なる蛍光試薬であらかじめ標識してから混合し、一枚のゲルで泳動するもので、二種類の試料内の相対的タンパク量を精密に比較できることが特徴である。このアプローチにより、蛋白質の検出感度が上がり、ディファレンシャル解析が再現性よくできるようになった。

Gel-free の網羅的なプロテオーム解析法の代表例である SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization) を先ず利用した。本システムは TOF-MS を原理とするプロテインチップシステム® (Bio-Rad) はプロテインチップ、質量分析計およびデータ解析コンピュータからなる。さらにチップの代わりに磁気ビーズを用い、質量分析部分を MALDI-TOF/TOF として MS プロファイルの解析ソフトと組み合わせたクリンプロットシステム™ (Bruker Daltonics) も併用した。

4. 研究成果

(1) 膵がん患者術前後の血清プロテオーム解析による新しい予後マーカーの検出と同定 (Oncogene 2008; 27:2810-2822)

膵癌は消化器系の悪性腫瘍の中でも、とくに早期診断が困難であり、従来の血清腫瘍マ

ーカーの早期癌における陽性率は低い。そこで表面増強レーザー脱離イオン化 (SELDI) と飛行時間型質量分析計 (TOF MS) を組み合わせた SELDI-TOF MS によるあたらしい腫瘍マーカーの探索を試みた。外科的切除が施行された膵癌 20 症例の術前・術後 (2 週以降) のペア血清における蛋白質・ペプチドの比較発現解析を行ったところ、計 85 のピークでその強度に変化がみられた。その中で、とくに発現量が多く、また術前後の変化が際立っていたのは 6.6 kDa と 6.4 kDa の 2 つであった (図 1)。

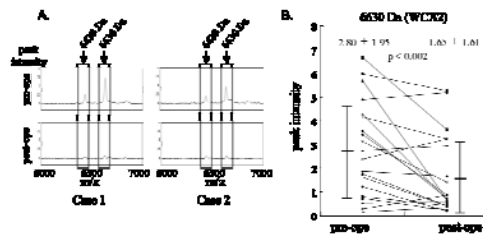


図1 膵癌術前後血清のSELDI-TOF MS解析

そこでこれらのピークを対象に、複数の HPLC ステップによる部分精製の後、アミノ酸配列を決定した結果、6.6 kDa は mature type のアポリポ蛋白 C-1、6.4 kDa はその N 末端の二つのアミノ酸が欠損する truncated form であることがわかった。さらに、膵癌患者の術前後における血清 Apo-C1 レベルの変化が膵癌細胞由来であることを確認するために、膵癌組織と非癌部組織における Apo-C1 の蛋白質および mRNA の発現レベルを比較したところ、いずれも癌部において著明に発現が増加していることが確認された。また、プロテオーム解析の対象とした膵癌症例を Apo C-1 高値群と低値群に分けて、生存曲線を比較したところ、高値群であきらかに予後不良であることがわかった (図 2)。

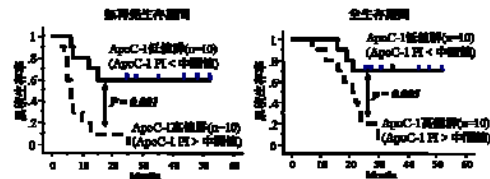


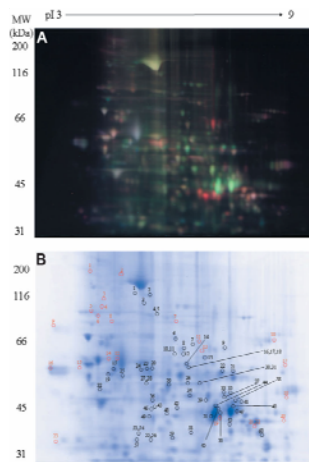
図2 ApoC-1 peak intensity 低値群と高値群における生存曲線

ProteinChip System は臨床検体のプロテオーム解析を可能とした画期的な方法であるが、その解析精度には一定の限界がある。そこで、現在はチップの代わりにビーズを用い、質量分析部もより高性能の MALDI-TOF/TOF を用いて膵癌の新たなマーカー探索を進めると同時に、今後その他の消化器系悪性腫瘍も解析対象としている。

(2)原発性肝細胞癌の病理組織診断に有用なバイオマーカーの開発 (Hepatology 2008; 48:519-530)

原発性肝細胞癌 (HCC) 患者 10 症例の癌部およびその周辺の非癌部組織について、アガロース-2D-DIGE を用いて泳動し、異なった発現を示す蛋白を検索した (図 3)。

図3 2D-DIGEによる肝癌組織と非癌部組織の比較プロテオーム解析



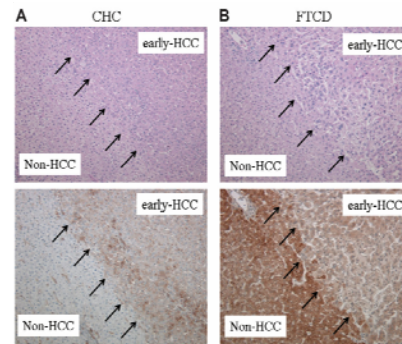
解析後のゲルを CBB 染色して可視化後、スポットを切り出してトリプシンで消化し、LC-MS/MS 分析により蛋白を同定した。蛋白の発現量および局在の確認を行うためにイムノプロットおよび

免疫組織化学染色を行った。異なった発現を示したスポットのうち 83 種の蛋白が同定された。このうち今まで HCC との関連が詳細に検討されていない蛋白を中心にイムノプロット法による発現傾向の確認を行った結果、HCC において特に clathrin heavy chain (CHC) の発現上昇と forminotransferase cyclodeaminase (FTCD) の発現低下が際立っていた。CHC および FTCD の臨床的有用性を確認するために、tissue micro array を入手して HCC83 例および非 HCC68 例の免疫染色性を確認した結果、HCC 診断のための感度・特異度はそれぞれ 51.8%・95.6%, 61.4%・98.5%であった。さらに、良性の結節・腫瘍との鑑別が困難とされる early-HCC 症例について検討した結果、感度・特異度はそれぞれ 41.2%・77.8%, 44.4%・80.0%であった。

今回我々はアガロース 2D-DIGE を用いて 83 種の異なった発現を示す蛋白を同定し、そのうち特に際立った変化が認められた 2 種類の蛋白について特異的な抗体を用いた発現確認を行った。さらにパラフィン切片で良好な染色性を示した CHC および FTCD について、組織診断マーカーとしての有用性を検討した。その結果、進行型 HCC のみならず、病理学的診断の困難な early-HCC についても非癌部と異なった発現を示すことが確認された (図 4)。

従って CHC および FTCD は組織診断マーカーとして有用であると考えられた。

図4 CHCおよびFTCDに早期肝癌組織の免疫染色



(3)磁気ビーズと MALDI-TOF MS を組み合わせた ClinProt™ system による習慣飲酒マーカーの検出と同定

(Proteomics Clin Appl 2009;821-828)

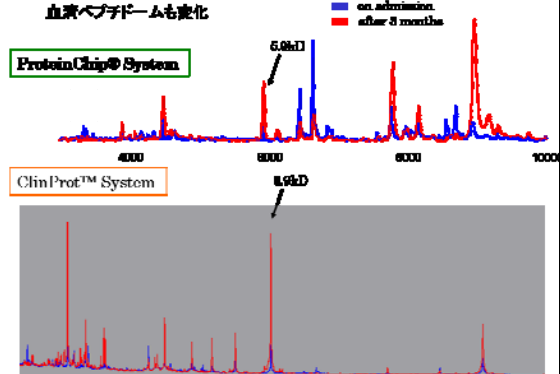
我々は MALDI-TOF MS を応用した SELDI-TOF MS を原理とするプロテインチップシステムを用い、アルコール依存症 (DSMIV) 患者血清検体で新たな飲酒マーカーの探索を行った結果、3つのピーク (5.9kD, 7.8kD, 28kD) で変化が見られ、それぞれ fibrinogen α C chain の分解産物(5.9 kDa)、Apo AII の分解産物(7.8 kDa)、Apo AI (28 kDa) と同定したことを報告した (Proteomics. 2004, 4:1187-95)。これらのうち特に 5.9kD の fibrinogen α C chain の分解産物が健診受診者において、 γ -GTP のノンリスポンダーの検出に有効なことを示した (Alcohol Clin Exp Res. 2007, 31:22S-26S)。今回は 6.0kDa 以下のペプチドに注目し ProteinChip® system と ClinProt™ system の比較検討を行い、新たな飲酒マーカーの探索を行った。

断酒目的で入院したアルコール依存症患者計 16 名の入院時、3 ヶ月後の血清検体を用いた。プロテオーム解析は①表面増強レーザー脱離イオン化 (SELDI) と飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) を組み合わせた ProteinChip® system (Ciphergen 社) ②磁性ビーズと MALDI-TOF/TOF 質量分析計を組み合わせた ClinProt™ system (Bruker Daltonics 社)。従来の飲酒マーカーである γ -GTP の測定は、シカリキッド γ -GT J (関東化学株) を用いて行った。

ProteinChip® Software 3.1 及び ClinProTools™ Software 2.0 で解析した結果、1.0k~6.0kDa の領域において signal/noise が 10 以上のピーク数は、ProteinChip® system : 32 ピーク、ClinProt™ system : 52 ピークであり、そのうち入院時・入院後 3 ヶ月において、 $p < 0.05$ と有意に違いがみられたピークは、それぞれ 7 ピーク (飲酒により増加したピーク : 4、減少したピーク : 3)、22

ピーク(飲酒により増加したピーク:4、減少したピーク:18)であった。代表的なピークパターンの変化を図5に示す。

図5 ProteinChip® System および ClinProt™ System による断層前後の血清ペプチドームも変化



ClinProt™ systemにおいて、3000Da以下、peak intensity 5000以上のMS/MS解析可能な4ピークをMS/MS解析しMASCOT検索した結果、1466Da(1.4kDa)はfibrinopeptide Aのfragment、1616Da(1.6kDa)はリン酸化したfibrinopeptide Aのfragment及び2660Da(2.6kDa)はfibrinogen A alpha-chainのfragmentと同定された。

各症例における入院時、入院後3ヶ月の1.4kDa、1.6kDa及び2.6kDaのピーク面積の推移を比較すると、1.4kDaピークでは16症例中13症例(p<0.01)、1.6kDaピークでは15症例(p<0.01)、2.6kDaピークは13症例(p<0.01)と有意に変化を示した。入院時のγ-GTPは4症例で正常域にとどまり、いわゆるnon-responderと考えられたが、これら4症例においても4ピークすべてにおいて変化が認められた。6.0kDa以下のペプチドでは、ProteinChip® systemよりClinProt™ systemでより多くピークが見られたが、両方のシステムでしか検出できないピークも確認した。現在これらのピークの同定を進めている。

(4) 血清プロテオーム・ペプチドーム解析におけるプレアナリシスの検討

(Clin Chim Acta 2009; 406:179-180).

タンパク質を対象とする検査は臨床検査室の主役である。千葉大学医学部附属病院検査部の生化学・免疫検査室における測定対象はタンパク質以外にも、含窒素化合物、脂質、糖、電解質など多岐にわたるが、総項目数(103項目)のうち、解析対象がタンパク質である項目が79項目と圧倒的に多い。血漿タンパク質の特徴はいわゆるabundant proteinsがその大部分を占める点であり、存在量が上位22タンパク質の合計が全体の99%を占め、残りの1%はdeep proteomeと呼ばれる。deep proteomeに存在する未知のバイオマーカーを効率よく探索するために

は、abundant proteinsの除去、ペプチドの選択的回収など多くの工夫が必要と思われる。一方、複数の施設の検体を利用してマーカー探索やバリデーションを実施する場合は、各施設の検体採取とプロセッシング、保存の条件を一定にすることが求められる。また、プロテオーム解析研究を通して見出されたバイオマーカー候補を臨床検査の現場に応用するためにもプレアナリシスの影響を精査することが不可欠である。そこでMALDI-TOF MSを用いた血清ペプチド解析における検体のプレアナリシスについて検討した。

プレアナリシスの検討ではBruker Daltonics社のClinProt™システムを用いた。これは磁性ビーズを用いた前処理とMALDI-TOF MSによる測定を組み合わせた系である。質量分析計は同社のAutoflexII TOF/TOF MSを使い、三種類(WCX:弱陽イオン交換、IMAC-Cu:銅親和性、C8:疎水性)の磁性ビーズを用いた評価を行った。マトリックスには10,000Da以下の分子量領域を対象とするα-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)マトリックスを使用した。ビーズによる血清の前処理からマトリックスとの混合、ターゲットプレートへ滴下して結晶化させるまでの工程は全てロボットで自動化して行った。質量分析はリニアモードで測定を行った。血清検体は健常人ボランティア7名(男性5名、女性4名、29歳~47歳)から採取したものである。早朝空腹時に採血し、1時間室温で静置した後、1,500Gで10分間遠心し、分注・保存した。ピークの検出および強度計算は専用ソフトウェアのClinProtocols 2.1を使用した。なお評価の対象としたのは1,000~10,000Daの範囲であり、S/N>5のピークを有意ととり、ピーク強度の計算には面積値を用いた。再現性に加えて、プレアナリシス変動要因として血清を遠心分離するまでの時間の影響、凍結融解の回数について検討した。

測定系の再現性の評価

まず単一の健常人血清を用いて同時再現性(n=5)と日差再現性(n=5)を求めた。その結果、WCXビーズでは62ピークが検出され、ピーク面積の同時再現性は平均で9.5±5.4(CV±SD)%,日差再現性では13.5±6.7%であった。IMAC-Cuビーズでは59ピークが検出され、同時再現性は平均で8.9±4.4%、日差再現性は12.0±4.6%となり、C8ビーズでは69ピークが検出され、同時再現性は平均で6.3±3.9%、日差再現性は11.2±4.5%であった。特に注目したピークの定量にあたっては安定同位体標識標準を利用することにより、同時再現性、日差再現性ともにさらに改善できることを確認している。

血清を遠心分離するまでの時間の影響

血液を採取してから遠心分離するまでの

時間（以下、clotting time と表記）はMALDI-TOF MSを用いてプロファイリングする際には最も影響を持つ因子とされている。今回の検討において使用した血清は、上述のようにclotting timeを1時間に設定することを基本としたが、この検討をするにあたっては、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間のタイムコースでデータを取得した。解析対象としたのは4人分の血清である。図6に一例を示すように、clotting timeの相違は血清のペプチドプロファイリングに明らかに大きな影響を与えていることが明らかである。

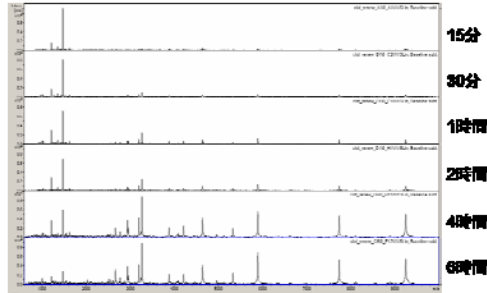


図6 Clotting timeによるスペクトル変化の一例 (IMAC-Cuピース)

次に我々は各ピークを3種類のパターンに分類することを試みた。すなわち、タイプA; 時間経過とともに速やかに低下していくもの、タイプB; 時間経過とともに徐々に上昇してくるもの、タイプC; 最初の30分間は劇的に変化するがその後安定するもの、の3種類である(図7)。

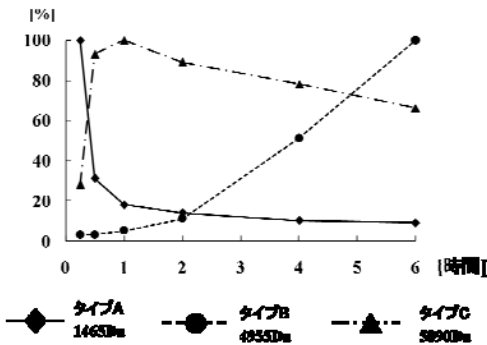


図7: Clotting timeによる変化パターンの分類

タイプCが最も多く、採血してから血清を分離するまでには30分以上は静置する必要があることが示唆された。理想的にはclotting timeをすべての検体で厳密に統一するのが望ましい。しかしながら臨床検体を解析の対象としている以上、特に実際の検査室では実現困難であるため、我々は変化の激しい最初の30分を避け、血清を30分以上2時間以内に遠心分離することで対応している。

凍結融解の回数

凍結融解の繰り返しは血清・血漿を用いたルーチンの検体検査においても注意が必要

とされている。

我々は今回、3人分の血清を氷上の操作で1回から7回までの凍結融解を繰り返し、CVが20%を超えるピークの数のカウントした。その結果、凍結融解3回まではCVが20%を超えるピークの数少なく、4回目以降一挙に増加する傾向にあった。これらの結果から、我々はサンプルを使用する際には凍結融解の回数を極力揃えるようにし、最大2回までとしているが目的のピーク毎にさらに確認することが望ましい。

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10件) すべて査読有

- Shimada H, Shiratori T, Yasuraoka M, Kagaya A, Kuboshima M, Nomura F, Takiguchi M, Ochiai T, Matsubara H, Hiwasa T. Identification of Makorin 1 as a novel SEREX antigen of esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2009 Jul 15;9(1):232.
- Umemura H, Nezu M, Kodera Y, Satoh M, Kimura A, Tomonaga T, Nomura F. Effects of the time intervals between venipuncture and serum preparation for serum peptidome analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2009 Aug;406(1-2):179-80.
- Yamamoto-Ishikawa K, Suzuki H, Nezu M, Kamiya N, Imamoto T, Komiya A, Sogawa K, Tomonaga T, Nomura F, Ichikawa T. The isolation and identification of apolipoprotein C-I in hormone-refractory prostate cancer using urface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Asian J Androl. 2009 May;11(3):299-307.
- Shimada H, Kagaya A, Shiratori T, Nomura F, Takiguchi M, Matsubara H, Hiwasa T. Detection of anti-CUEC-23 antibodies in

- serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma: a possible new serum marker for esophageal cancer. *J Gastroenterol.* 2009;44(7):691-6.
5. Hattori N, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Shinozaki K, Nomura F, Tomonaga T, Matsushita K, Kodera Y, Sogawa K, Satoh M, Hirasawa H. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock.* 2009Oct;32(4):393-400
 6. Sogawa K, Sato M, Kodera Y, Tomonaga T, Iyo M, Nomura F. A search for novel markers of alcohol abuse using magnetic beads and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl.* 2009 July; 3(7):821-828.
 7. Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine-adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008 Nov;15(11):3157-68.
 8. Shirai Y, Sogawa K, Yamaguchi T, Sudo K, Nakagawa A, Sakai Y, Ishihara T, Sunaga M, Nezu M, Tomonaga T, Miyazaki M, Saisho H, Nomura F. Protein profiling in pancreatic juice for detection of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Hepatogastroenterology.* 2008 Sep-Oct; 55(86-87):1824-9.
 9. Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, Sunaga M, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Otsuka M, Yamamoto M, Nakano M, Miyazaki M, Nomura F. Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology.* 2008 Aug; 48(2):519-30.
 10. Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, Sogawa K, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2008 May 1 ;27(20):2810-22.
- [学会発表] (計6件)
1. 高野重紹、野村文夫他、膵癌早期発見を目指した網羅的血中リン酸化蛋白質測定の意義、第68回日本癌学会学術集会、2009年10月3日、パシフィコ横浜(横浜市)
 2. 野田健太、野村文夫他、質量分析装置を用いた問題飲酒者の診断方法確立の基礎的検討、2009年7月6日、リゾートホテル海辺の果樹園(香南市)
 3. 久我佳菜子、野村文夫他、C型肝炎ウイルス由来の原発性肝細胞癌の高感度バイオマーカー探索、日本ヒトプロテオーム機構第7回大会、2009年7月27日、北里大学薬学部(東京都港区)
 4. 梅村啓史、野村文夫他、MALDI-TOF MS peptide profilingによる血清胃癌マーカーの探索、日本ヒトプロテオーム機構第7回大会、2009年7月27日、北里大学薬学部(東京都港区)
 5. 清宮正徳、野村文夫他、原発性肝細胞癌の新たな免疫組織化学マーカー:CHCおよびFTCD、第67回日本癌学会総会、2008年10月28日、名古屋市
 6. 木村明佐子、野村文夫他、原発性肝細胞癌の新たなマーカー探索へのthree-step血清プロテオーム解析の応用、第67回日本癌学会総会、2008年10月28日、名古屋市
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
野村 文夫 (NOMURA FUMIO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 80164739
 - (2) 研究分担者
朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)
独立行政法人医薬基盤研究所・基盤的研究部
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

(H21より連携研究者)

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：60265733

(H20より連携研究者)

根津 雅彦 (NEZU MASAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90322461

(H20退職)

曾川 一幸 (SOGAWA KAZUYUKI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50436440

(3)連携研究者