

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19390330
 研究課題名（和文）プロテオーム解析を用いた癌特異的マーカー蛋白質・抗体の網羅的探索と検出系の開発
 研究課題名（英文）Discovery of cancer related marker proteins and antibodies using proteomic approaches and development of detection method
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：朝長 毅（Takeshi Tomonaga）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：80227644

研究成果の概要：

本研究では、種々の消化器癌の臨床検体を用い、最新のプロテオーム解析技術を駆使して消化器癌の早期診断、再発予測に有用な新しい腫瘍マーカーを発見した。その1つが膵癌の予後予測に有用な apolipoprotein C1 であり、もう1つが肝癌の早期診断に有用な Clathrin Heavy Chain と Formiminotransferase Cyclodeaminase である。また本研究では、血中の微量タンパク質を検出する独自の方法を開発し、大腸癌の早期診断マーカー候補タンパク質も同定した。今後さらに有望なバイオマーカーが見つかることが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
平成20年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：プロテオーム、ペプチド、がん、腫瘍マーカー、診断

1. 研究開始当初の背景

癌の早期発見や病態の把握に有用な血中や尿中に存在する新しい腫瘍マーカーを見つけるには、遺伝子の最終産物であるタンパク質を調べることが必須である。従来の早期癌のスクリーニング検査として、いくつかの血清腫瘍マーカーが用いられているが、これらのマーカーはいずれも進行癌では陽性率が高いものの、早期癌の検出率は非常に低い。したがって、新しい腫瘍マーカーの開発は急務であり、そこで威力を発揮するのが血液、尿、組織などの臨床検体中のタンパク質を網

羅的に調べるプロテオーム解析である。

（国内外の研究動向及び位置づけ）

近年、国内外でプロテオーム解析を用いた癌の診断法に関する報告が数多くみられるようになったが、そのきっかけとなったのは、米国癌研究所の Liotta らによる下記の論文である。

Petricoin EF et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet 2002.

この論文ではプロテインチップシステム

(サイファージェン社)を用いて卵巣癌の患者血清を解析した結果、ほぼ 100%の感度特異度で卵巣癌の診断ができるという画期的なものであった。その後種々の癌に関する同様な研究が国内外から相次いで報告され、現在腫瘍マーカーの開発手法として臨床材料を用いたプロテオーム解析は主流になりつつある。国内では我々のグループと国立がんセンターのグループが上記と同様の手法を用いてそれぞれスキルス胃癌と膵癌を非常に高精度で診断ができると報告してきた(日本癌学会発表 2005、日経新聞記事 2005 年 9 月) (日本癌学会発表 2005、Cancer Res. 2005、日経新聞記事 2005 年 9 月、朝日新聞記事 2006 年 9 月)。ただ、これらの研究成果がすぐ臨床応用に結びつくかというところにはまだクリアしなければいけない問題が多い。例えば、上記の解析は質量分析計を用いたものであり、精度や再現性に問題があることが現在でも指摘されているため、器械の性能のさらなる技術革新が必須である。また、高価で熟練を要する質量分析計はこの医療機関でも扱える技術ではないという汎用性の問題もある。以上の問題点を解決するためには、いかに正確で汎用性の高い癌の診断方法を開発し、それをいち早く診療の場に応用するかが必須である。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオーム解析技術を用いて以上の点を明らかにする予定である。

- 1) ヒト固形癌、その中でも特に消化器癌を対象に早期診断や病態把握に有用なマーカーの探索を行う。
- 2) 1次スクリーニングとして人間ドックなどの検診の場で利用できる ELISA や抗体・抗原アレイなどの簡便なアッセイ系の構築、および2次スクリーニングとして質量分析計を用いた検査法を開発する。

3. 研究の方法

1. 正確な臨床情報が付加された「高品質な」検体の収集と保存

プロテオームでは解析の対象となる臨床検体が正確な診断の下に採取され、適切に保存されていることが不可欠である。申請者は千葉大学病院検査部准教授も併任しており、血清、血漿、尿などの豊富な臨床検体を扱える立場にある。また、当大学で癌診療を行っている講座と連携し、正確な臨床情報が付加された検体を収集している。さらに、プロテオーム解析は検体の保存条件にかなり影響されるので、検体採取から保存まで一定の条件で厳密に管理している。

2. プロテインチップシステム、クリンプロットシステムを用いた癌患者血清・血漿の発

現プロテオーム解析

プロテインチップシステムは、タンパク質解析に適した様々な化学的性質を表面に持たせたプロテインチップと飛行時間型質量分析計からなり、そのチップ上に捕捉された多数のタンパク質は質量数別にピークとして分離され、その存在量に応じてピークの高さが変化する。また、クリンプロットシステムは上記のプロテインチップシステムを改良したもので、化学的性質を表面に持たせたビーズにタンパク質を結合させ、より高精度の質量分析計を用いて検体中のタンパク質の量を比較できる。これらの手法を用いて、血清・血漿中のタンパク質の量およびそのパターンを癌患者の術前術後、あるいは患者と正常人の検体間で比較し、違いの見られるタンパク質を検索する。発現に特異的な差異が見られたタンパク質のうち、3kDa 以下の小さなものは直接タンデムマス(MS/MS)で同定することが可能であり、それより大きなものは HPLC や SDS-PAGE によって精製後、アミノ酸配列を決定する。

3. 独自のペプチド抽出法と HPLC を組み合わせた癌患者血清の発現プロテオーム解析

血中には疾患マーカーとなる可能性のある低分子量ペプチドが多数存在するが、アルブミンやグロブリンなどの高分子量キャリアタンパク質が大部分を占めるために、これまでの手法ではそれらのタンパク質が邪魔になって量の少ないペプチドの検出が困難であった。これらのキャリアタンパク質を除去するキットはあるものの、その最も大きな問題点は、高分子量タンパク質の除去に伴いペプチド成分も大きく損失する点である。我々は、血中の低分子量ペプチドを損失することなく高分子量タンパク質を効率よく除去する方法を確立した。この方法と HPLC を組み合わせることで癌患者血清・血漿中に存在する癌特異的ペプチドを単離、同定を行う。

4. 2D-DIGE を用いた癌特異的に発現するタンパク質の解析

上記 2, 3 では患者血中の低分子量ペプチドを対象としていたが、質量分析計では検出困難な高分子量タンパク質にも新しい腫瘍マーカー候補となるタンパク質が存在する可能性が高い。血中には癌細胞から分泌あるいは癌細胞そのものが壊れることで出てくる癌特異的タンパク質があることを考慮して、血清だけでなく、癌手術標本の癌部と非癌部組織から抽出したタンパク質のプロテオーム解析を二次元電気泳動法を用いて行う。従来は比較したいサンプルを別々のゲルに流して、発現量の違いのあるタンパク質を探索していたが、再現性に問題があり、客観

的にタンパク量を比較するのは困難である。最近、比較したい2つの検体を異なる蛍光色素で標識し、1枚のゲルに同時に流して、検体間の蛍光発色量を測定することで両者のタンパク量を定量解析する2D-DIGE法が開発された。この方法により、癌特異的に発現増大または減少するタンパク質を選び出し、ゲル内でのトリプシン消化後、質量分析計を用いてタンパク質を同定する。上記の解析でマーカー候補となったタンパク質に対して抗体を作成し、癌組織での発現をウエスタンブロットや免疫染色で確認する。

4. 研究成果

1. SELDI TOF-MS (プロテインチップ®システム)を用いた膵臓癌の予後予測に有用な腫瘍マーカーペプチドの同定

これまで我々は SELDI TOF-MS (プロテインチップ®システム)を用いて、食道癌などの消化器癌のリスクを高めることが知られている習慣飲酒のマーカーの候補となるペプチドをいくつか見出し、そのうち3つのペプチドについて同定を行い報告した。そのノウハウを生かして、最近我々は、膵臓癌の予後予測に有用なマーカーの同定に成功した。千葉大学臓器制御外科学で手術を施行した69例の膵臓癌患者の術前術後の血清を SELDI TOF-MS (プロテインチップ®: WCX)を用いて比較検討した結果、m/z 6420 と 6630 のピークが術後に比して術前に有意に高いことを見出した(図1)。

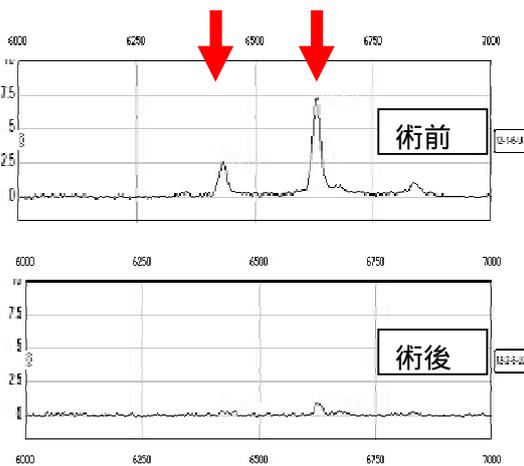


図1 プロテインチップ®システムを用いた膵癌患者血清の解析例

そのピークを、チップと同様の性質を持つ陽イオン交換カラムを使ったFPLCと、その後2段階の逆相HPLCを使って精製し、N末端アミノ酸シーケンスを行った結果、m/z 6630のピークは mature type の apolipoprotein C-1(ApoC-1)、m/z 6420はそのApoC-1のN末端の2アミノ酸が削れたものであることが判明した。ApoC-1はもとも

と血中に存在するタンパク質であるが、膵臓癌組織を抗ApoC-1抗体を用いてウエスタンブロットおよび免疫染色を行った結果、正常の膵管細胞ではApoC-1の発現がほとんど見られないのに対して、膵臓癌細胞ではApoC-1が強く発現していた。さらに、数種類の膵臓癌培養細胞の培養上清を調べた結果、ApoC-1が培養上清に分泌されていることを見出した。これらの結果からApoC-1は膵臓癌細胞で産生され、それが血中に分泌されていることが示唆された。膵臓癌患者血中のApoC-1の臨床的意義を検討するために、ApoC-1レベルと5年生存率との関係を調べたところ、驚くべきことにApoC-1レベルの低い群では高い群に比して5年生存率が有意に高いことがわかった(図2)。この結果は血中ApoC-1の値によって膵臓癌患者の予後予測が可能であることが示唆され、術後の抗がん剤などの治療法の選択に有用であると考えられた(Oncogene 2008)。

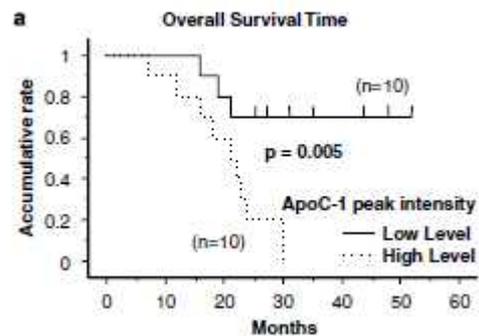


図2 膵臓癌患者血清中のApoC-1レベルと5年生存率との関係

2. 独自のペプチド抽出技術を用いた大腸癌腫瘍マーカー候補ペプチドの同定

プロテオーム解析技術がどんどん進歩するとともに、がんをはじめとする様々な疾患の診断に有用な疾患マーカーが次々と発見されると期待されているが、現実には新規疾患マーカーとして臨床応用されているものは皆無である。その理由として、血中の微量なタンパク質が検出できていないという点があげられる。例えば、血清中のタンパク質はアルブミンやグロブリンなどのメジャータンパク質と言われるものが99%を占め、残りの1%に有望な疾患マーカー候補のタンパク質やペプチドが含まれていると考えられる。その多量に存在するメジャータンパク質を除去するための色々な方法が開発されているが、まだまだ満足いく方法はとはなっていない。また、血中のアルブミンは色々なタンパク質のキャリアタンパク質であるため、アルブミンを除くとそれに結合している多くのタンパク質も除かれてしまう。我々は、

この問題を解決するために、これらのアルブミンに結合しているペプチドは除去せずに高分子量タンパク質だけを除いて、血中の低分子量ペプチドを効率よく抽出する方法を確立した(特願 2007-206602)。従来行われているアセトン沈殿法(A法)や限外ろ過法(F法)ではアルブミンを初めとした高分子量タンパク質の除去にともない、ペプチド成分の大部分が除去されていたが、これに対して我々の抽出法では、高分子量タンパク質は若干残っているが分子量約20,000以下のペプチド成分が効率よく抽出されていた。この方法で種々のがん患者および健康人の血清からペプチドを抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分画後、それぞれのフラクションを高精度質量分析計を用いてがん患者と健康人で比較することにより、癌患者血清中に存在する特異的ペプチドを単離、同定を行った。その結果、これまで大腸癌患者血清中に特異的に存在するペプチドをいくつか同定し、特許出願した(図3)〔特許:特願 2007-206602〕。

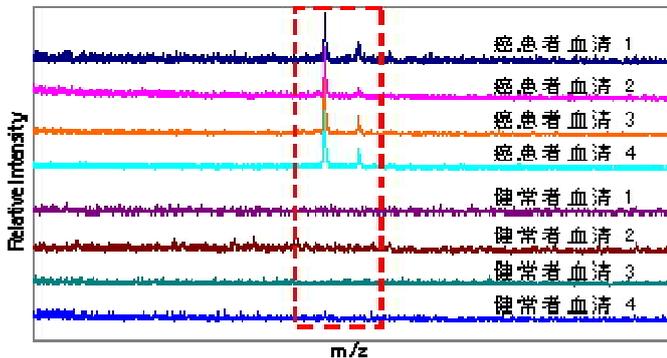


図3 大腸癌患者血清中に特異的に存在するペプチドの検出例

我々はさらに上記で見つかったマーカー候補ペプチド(ターゲットペプチド)の安定同位体標識ペプチドを化学合成し、それを分析対象の血清に一定量添加して、もともと血清中に存在する内在性のターゲットペプチドのピークの高さと比較することで、ペプチドの定量化が可能であることを見出した(図4)。この実験のメリットは、化学合成した安定同位体標識ペプチドと血清中に元々あるターゲットペプチドの化学的な性質が分子量以外は全て等しいことである。したがって、ペプチド抽出時の振る舞い、HPLCの溶出時間ならびに、質量分析計でのイオン化効率と同じである。またターゲットペプチド(図4A)に比べて安定同位体ペプチド(図4B)は分子量がわずかに大きいので質量分析計で測定すると両方のペプチドを同時にダブルピークとして検出できる。これにより、様々な血清中のターゲットペプチドの存在量を、導入した安定同位体標識ペプチドを基準として定量解析することができる。この手法は従来のタンパク質・ペプチドの定量

法であるELISA法に代わるペプチド定量法になると考えられ、癌の早期発見のためのスクリーニングに有用であると考えられる。

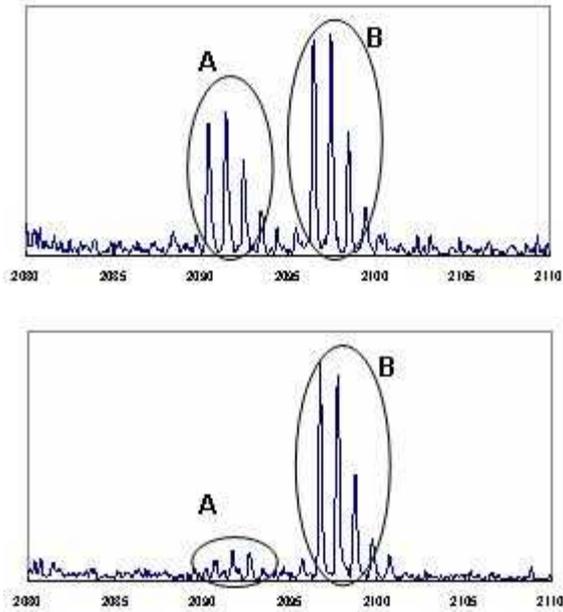


図4 大腸癌患者の手術前後の血清中の内在性ペプチド(A)と安定同位体標識ペプチド(B)(上:手術前、下:手術後)

3. 2D-DIGE法を用いた原発性肝細胞癌の病理診断マーカーの開発

原発性肝細胞癌(HCC)は、特に小さな腫瘍の場合、しばしば良性腫瘍との病理学的鑑別が困難である。近年Glypican-3などのHCCマーカーが報告されているが、その感度・特異度は必ずしも満足のいくものではなく、新たな病理診断マーカーが必要である。我々はHCCの新しい診断マーカー探索を目的として、HCC組織を用いたプロテオーム解析を行い、見つかったマーカー候補蛋白質の有用性を評価した(図5)。肝切除を行ったHCC患者10例の癌部・非癌部組織について、プロテオーム解析によって発現の違いのある蛋白質を解析した結果、HCCにおいてclathrin heavy chain(CHC)の発現増大とformiminotransferase cyclodeaminase(FTCD)の発現低下が認められた。それらの蛋白質についてtissue micro-arrayを用いた免疫染色によりGlypican-3と対比させてHCC診断精度について調べたところ、それぞれ単独ではGlypican-3と同等の感度・特異度が得られ、またそれらのマーカーの組み合わせにより診断精度の向上がみられた。さらに、良性結節と早期肝癌の鑑別について検討した結果、Glypican-3では鑑別ができなかった症例において、CHCまたはFTCDを用いることで鑑別が可能となった症例もみられた。以上の結果より、CHCとFTCDが新しいHCCの診断

マーカーとして、進行型 HCC のみならず病理学的診断の困難な早期肝癌の診断にも有用であることが示唆された (Hepatology 2008)

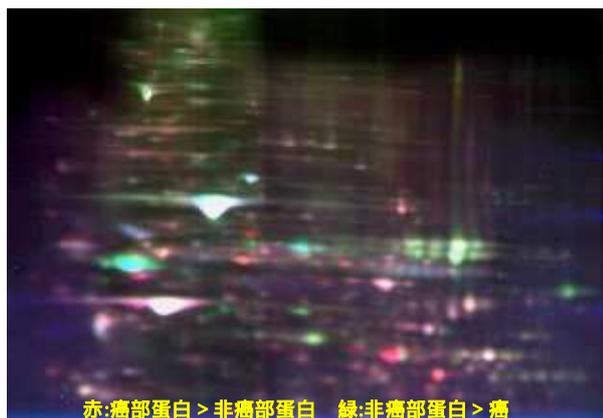


図5 2D-DIGEを用いたプロテオーム解析

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9件:すべて査読有)

1. Guo WZ, Sugaya S, Satoh M, Tomonaga T, Nomura F, Hiwasa T *et al* (2009). Nm23-H1 is responsible for SUMO-2-involved DNA synthesis induction after X-ray irradiation in human cells. *Arch Biochem Biophys*. in press.
2. Yamamoto-Ishikawa K, Suzuki H, Nezu M, Tomonaga T, Nomura F, *et al*. (2009) The isolation and identification of apolipoprotein C-I in hormone-refractory prostate cancer using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Asian J Androl* in press.
3. Hattori N, Oda S, Sadahiro T, Tomonaga T, Nomura F, *et al*. (2009) YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock* in press.
4. Tong XB, Kita K, Karata K, Zhu CL, Sugaya S, Ichimura Y, Tomonaga T, Nomura F, *et al* (2008). Annexin II, a novel HSP27-interacted protein, is involved in resistance to UVC-induced cell death in human APr-1 cells. *Photochem Photobiol* **84**: 1455-61.
5. Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, Sogawa K, Shida T, Kimura F, Tomonaga T, Nomura F, *et al* (2008). Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **27**: 2810-22.
6. Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Tomonaga T, Nomura F, *et al* (2008). Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine-adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol* **15**: 3157-68.
7. Shirai Y, Sogawa K, Yamaguchi T, Sudo K, Nakagawa A, Sakai Y, Tomonaga T, Nomura F, *et al* (2008). Protein profiling in pancreatic juice for detection of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *HepatoGastroenterology* **55**: 1824-9.
8. Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, Sunaga M, Oh-Ishi M, Koderia Y, Nomura F, *et al* (2008). Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology* **48**: 519-30.
9. Lu J, Suzuki T, Satoh M, Chen S, Tomonaga T, Nomura F, *et al* (2008). Involvement of aldolase A in X-ray resistance of human HeLa and UV(r)-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 948-52.

[学会発表](計5件)

1. 朝長 毅、風見隆浩、呉 迪、久家貴寿、轟 華、佐藤 守、松下一之、野村文夫 プロテオーム解析による染色体不安定性の分子機構の検討 第31回日本分子生物学会 2008 12 11 神戸
2. 朝長 毅、小寺義男、曾川一幸、佐藤守、前田忠計、野村文夫 Discovery of low abundant proteins and peptides for diagnosis of gastrointestinal cancer and their clinical use 第67回日本癌学会 2008 10 29 名古屋
3. 朝長 毅、清宮正徳、松下一之、高野重紹、吉富秀幸、山本雅一、中野雅行、宮崎勝、野村文夫 プロテオーム解析を用いた原発性肝細胞癌の病理診断マーカーの開発 第13回日本外科病理学会 2008 9 26 東京
4. 朝長 毅 疾患プロテオミクスの新展開 第8回蛋白質科学会 2008. 6. 11 東京
5. Takeshi Tomonaga and Fumio Nomura Proteome analysis of human solid cancers using various proteomic

approaches and its application for
diagnosis and treatment of cancer.
BIT s 1st Annual Protein and Peptide
Conference.2008 4.22 Shenzhen 市

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：癌が疑われる患者または患者由来の組織の癌部と非癌部との判別方法およびそれに用いる判別試薬

発明者：清宮正徳、朝長 毅、宮崎勝、野村 文夫

権利者：国立大学法人 千葉大学、日東紡績株式会社

産業財産権の種類、番号：特願 2008-264794

出願年月日：平成 20 年 10 月 14 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80227644

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

島田 英昭 (SHIMADA HIDEAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：20292691

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：60265733