

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19591741

研究課題名（和文） ヒト骨転移特異的タンパク質の逆翻訳によるゲノム解析

研究課題名（英文） Genome Analysis through Reverse Translation of Human Bone Metastasis-Specific Protein

研究代表者

津留 美智代 (TSURU MICHIO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90368887

研究成果の概要（和文）：がん患者の血清から骨に特異的に転移する時に発現するタンパク質を発見した。このタンパク質は不安定な状態にあり、健常人の血液中には発現しないために、アミノ酸解析後、ヒト健常人のデータバンクからは合致するゲノムは見つけることができなかった。miRNA 発現パターンと癌の間には、顕著な相関関係があること、骨転移で発現する特定 miRNA を明らかにし、癌増殖や癌遺伝子への miRNA の影響を解析する。

研究成果の概要（英文）：Primary cancer control has become almost feasible, and controlling the spread of metastases to remote organs is the main focus of future cancer treatment. Even if a patient receives the best primary cancer treatment, metastasis of cancer occurs mostly five or ten years after the treatment when the cancer is considered to be completely cured. For the clinical test, a time-series follow-up study was conducted on blood samples obtained from each patient after the primary cancer was completely cured. Clinically, the target protein is present in the blood before the spread of definitive bone metastases (screening for bone metastases can be achieved by bone scintigraphy) and shows a decreasing trend after the initiation of chemotherapy and radiotherapy. A time-series follow-up was conducted on an individual basis. Regarding the purification method, the target peak was detected for the unattached fraction and the elution fraction (pH 7.0) was obtained after fractionating 200 μ L of the blood serum in an anion exchange column. Using this fraction as a partial purification fraction, the unattached and elution fractions (pH 7.0) were added to the cation exchange column and eluted by increasing the level of NaCl concentration. Consequently, the target peak was confirmed for 0.2 M and 0.3 M NaCl fractions. These fractions were then applied onto reverse-phase HPLC (2 mm) and eluted by the concentration gradient of acetonitrile. However, because the peak immediately adjacent to the target peak could not be separated and there was a possibility that high molecular protein, which could not be confirmed by SELDI may have existed, the fraction was applied onto the normal-phase HPLC system, where the target peak was successfully obtained. A tertiary structure analysis was performed on the amino acid sequence of the target protein using a super computer. First, an identified amino acid was synthesised. An antibody was generated by immunizing a rabbit with this amino acid, and the antibody was then purified. Furthermore, the result of tertiary structural analysis of this target protein has suggested that its synthesis for antibody pharmaceuticals can be expected. The target antigenic peptide and cancer cells were transplanted into the artery of a nude mouse, and systemic metastasis was confirmed by CT scan ten days after transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000

2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

我が国では、がん死亡総数が約 30 万人、続発性悪性骨腫瘍（骨転移）罹患者数は 15 万～25 万人と推定され、がんの転移において、骨はその標的としてのリスクが高い臓器で、画像読影時、及び、解剖学的所見から、約 15～25 万人の患者様に骨転移が発症していると考えられる。中でも乳がん、前立腺がん、肺がん、腎がん、甲状腺がんなどは高い頻度で骨転移を発症し、胃がん、肺がん原発巣の骨転移は予後不良で、胃がん骨転移の生存期間の中央値は約 2 ヶ月、肺がん骨転移の平均生存期間は 10.2 ヶ月であり、2 年生存率は 17.4%であった（図 1）。

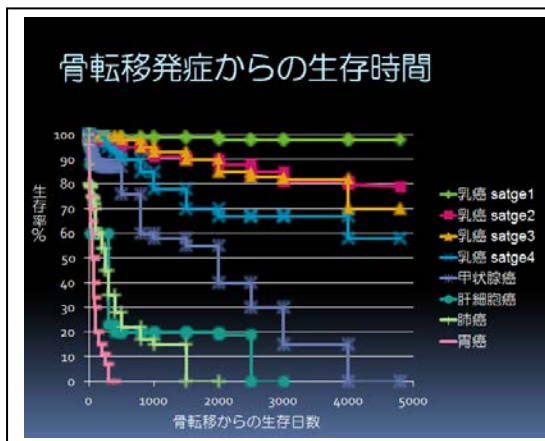


図 1. 原発巣別骨転移後の生存曲線（久留米大学解析結果）

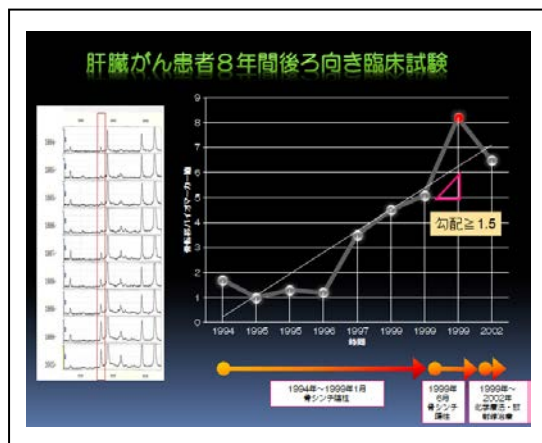


図 2. 骨転移バイオマーカー追跡試験（久留米大学）

現在、国内・国外、骨転移を早期発見する方法や根治可能な治療方法もない。骨転移の確定診断は、骨シンチグラフィ^{99mTc-MDP} (370MBq～740MBq/1回)であるが、既に進行期、末期に進行しており、それまでの原発がんの根治を目的とした積極的な化学療法・放射線療法からがん性疼痛や体力保持を目的とした緩和ケアの比重が高くなり、麻痺、下肢・骨盤の骨折、切迫骨折に対する対症療法を行っているのが現状である。骨転移をいち早く見つける目的で、定期的に骨シンチグラフィを撮るとなると医療被曝の線量制限の問題等から、核医学検査の回数は制限される。我々の骨転移超早期発見と早期治療への研究は、経済産業政策ツール「がんの予防、診断、治療」の早期発見と質的診断を実現に資する研究開発であると考え、国民へ健康で生き生きとした生活を提供するという政策目標を推進でき、我々の疾患特異的な真のアミノ酸構造解析方法からの化合物合成は、世界中でも独自の方法であり、副作用を回避した、より良い医薬品の開発・提供を目指す目的として、新たな分子薬学産業技術研究への人材養成を図り、健康産業の創造（骨転移早期発見から早期治療、予防）を柱となる産業技術の革新となる。本課題に取り組むべき必要性・緊急性：骨転移には、現在、早期発見のための腫瘍マーカーは存在せず、早期発見しても治療方法もない。原発がんの積極的な治療に比べ、年々骨転移の人口は増加傾向を示し、若年層の早期死亡が多く見られている。我々の病理解剖学的所見の結果、骨転移所見なしのがん患者 250 例の脊椎病理学解剖の結果、骨梁間型骨転移 34%、造骨型骨転移 25%、溶骨型骨転移 17%、小転移巣 11%、混合型 9%、圧迫骨折 4%であった。この骨梁間型骨転移は、骨シンチグラフィ、MRI、CT という画像診断には写らないということが解った。このことは、現在の医療では骨転移を確定する方法が無く、骨転移罹患者数はもっと多いことが考えられた。

我々の骨転移バイオマーカーによる早期診断と早期治療の融合が実現されれば、国民の意識改革となり、がん＝死という漠然とした恐怖心を無くすことができ、患者主体の積極的な治療が可能となる。

現在、炭素イオン線治療は、保険適応外治療で高額医療（315万円/1回）であるが、骨転移バイオマーカーを臨床エンドポイントとするサロゲートマーカーとして、骨転移の早期発見と炭素イオン線治療による早期治療が融合すれば、炭素イオン線療法のヒューマン・エビデンスを生物統計学的に有用性評価が明確となり、近い将来、保険承認審査が加速化され、手術ではなく、がんのみをピンポイントで破壊する低侵襲性治療を誰でもが低コストで受けることができ、克つ国内均てん化の整備となることが期待される。

2. 研究の目的

がん骨転移特異的タンパク質のアミノ酸構造からゲノム配列を特定し、がん転移の発現メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究の前実証研究であった、「ヒト骨転移バイオマーカーの臨床試験」は、2006年1月、久留米大学倫理委員会の承認を得た。久留米大学倫理委員会は、厚生労働省、臨床研究に関する倫理指針、文部科学省、厚生労働省、経済産業省、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、文部科学省、生命倫理・安全に対する取り組みのなかの「医学研究等における個人情報取り扱いの在り方等について」の基本原則に則った、久留米大学医の倫理に関する規程施行細則、久留米大学生命に関する倫理委員会内規、久留米大学医療に関する倫理委員会内規に基づき、生命に関する倫理委員会の承認を得た。患者情報の匿名化に関しては、FDAバリデーション、連邦規則第21条第11章の基準に準じたフリーザーワークスソフトウェアを導入し、患者個人情報、患者試料はバーコード化され、保存されている。本研究に参加を希望されるがん患者様には、担当医師、トランスレーショナルリサーチャーがインフォームドコンセントを遂行しており、試料の採血は、他の患者様と同じく、臨床検査部にて採血をいただいている。また、国内国外の多施設臨床試験参加機関も同様に遂行している。

4. 研究成果

がん骨転移特異的タンパク質のアミノ酸構造解析、ゲノム解析を完了した。立体構造解析、質量分析の結果、分子量、エネルギーレベルでの一致を確認した。

新たに合成したペプチドから抗体を作製し、ヒトがん骨転移を有する細胞にて発現を確認した。

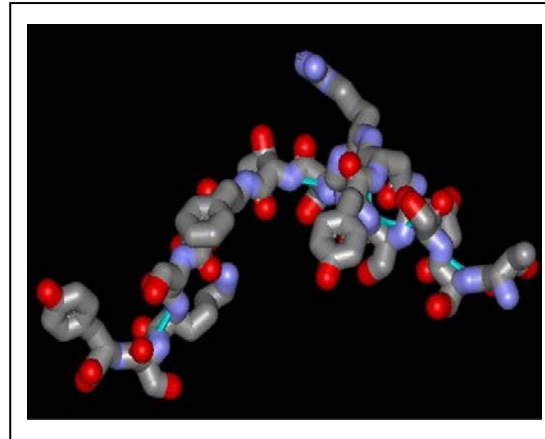


図3. アミノ酸構造解析結果ペプチドを合成し、抗体を作製した。

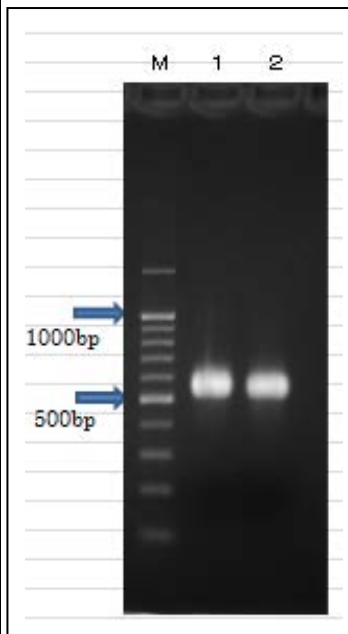


図4. 骨転移逆翻訳ゲノムプローブ合成のアガロース電気泳動像を示す。これにより、in situ hybridizationを行い、逆翻訳した骨転移特異的タンパク質のmRNAの骨転移組織発現を確認することができた。

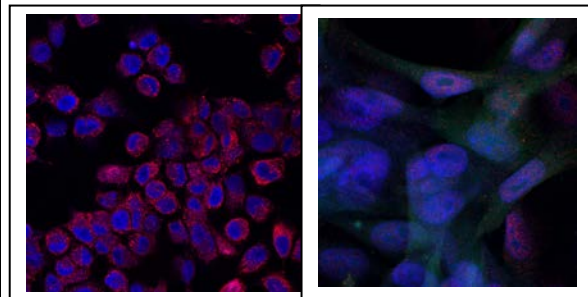


図5. 共焦点レーザー顕微鏡写真像
左：ヒト肺がん細胞（骨転移あり）
赤；Alexa Fluor 図1抗体、青；DAPI核
右：ヒト骨肉腫細胞
赤；Alexa Fluor 図1抗体、青；DAPI核

BALB/c-nu ノードマウスの静脈より、合成ペプチド、腫瘍細胞を移植し、時系的に転移

を観察した結果、コントロール群に比較し、明らかな低い生存時間を示し、多臓器にわたる転移を誘発した。

また、この新たなペプチドのタンパク相互作用を解析した結果、関連したタンパク質が確認された。

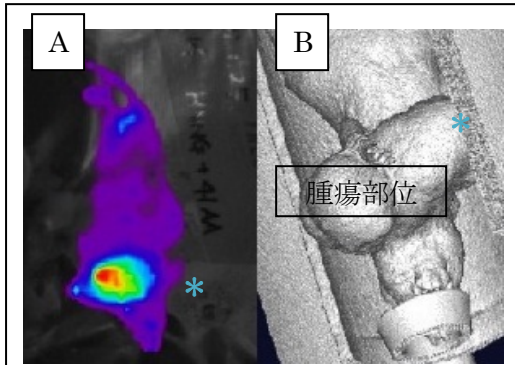


図 6. In vivo 腫瘍形成像
 マウス静脈より、図 3 ペプチドと肺癌細胞を移植
 A;蛍光スキャナ Optix 撮影像
 *マウス頭部腫瘍形成
 B;3D-CT 画像像

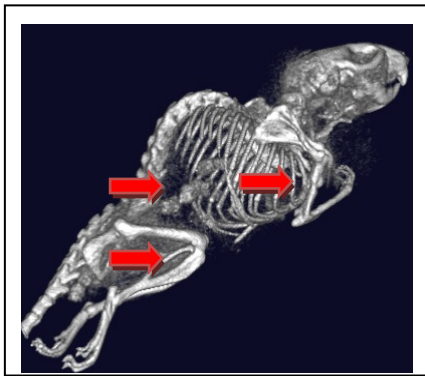


図 7. In vivo 3D-CT 骨解析画像像
 図中矢印部位にマウス骨転移が確認できた。

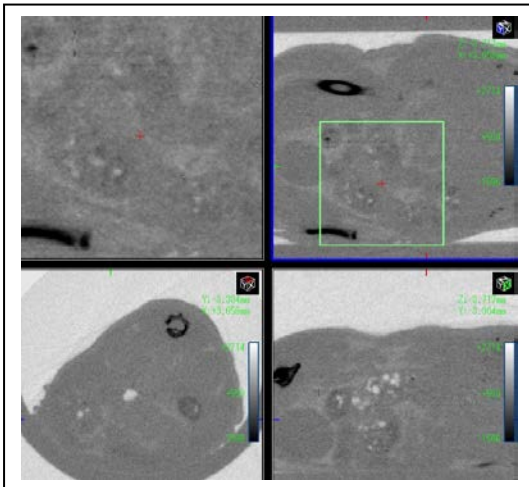


図 8. CT 断面画像

マウス尾静脈、頸静脈から肺癌細胞、骨転移抗原ペプチドを投与すると 10 日目には、全身に転移を呈した。しかし、マウス尾静脈から肺癌細胞を移植後、反対側の尾静脈からペプチド抗原をウサギに投与し作製した抗体を投与した結果、マウス全身部位からがん組織は検出されず、健常マウスと同じ生存時間を示した。



図 9. 関節リウマチ患者血液の質量分析結果

骨破壊、骨炎症疾患として、関節リウマチの患者血液を調べた結果、骨転移バイオマーカーは検出されなかった。

これらの結果から、我々が発見した骨転移特異的タンパク質は、原発腫瘍を根治後、骨転移を早期に診断予測が可能なマーカーであることが判明し、且つ、この抗体医薬は、がん骨転移を予防することが期待できることが分かった。

製薬企業への臨床研究へ移行し、がん骨転移の不安を回避したいと考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

がん転移ペプチド (2011 年申請中)

○取得状況 (計◇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.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津留 美智代 (TSURU MICHIO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90368887

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：