

機関番号：11301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19689028

研究課題名（和文） 癌細胞膜フォーカストプロテオミクスでの薬物輸送体群発現同時絶対定量と抗癌剤感受性

研究課題名（英文） Verification of diagnostic biomarker candidates for biliary and pancreatic carcinoma by SRM MS-based Multiple Assay

研究代表者

小野川 徹 (ONOGAWA TOHRU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50431557

研究成果の概要（和文）：ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片からレーザーマイクロディセクション（LMD）により、特異的部位を回収してショットガンプロテオーム解析、スペクトラルカウント統計解析によって変動の見られるタンパク質候補のスクリーニング、Triple-Q 型質量分析計による定量プロテオーム解析による検証を行った。同定された全 1993 種類のタンパク質から 160 種類のタンパク質をスクリーニングした。その中から 11 種類の分泌タンパク質を含む 77 種を選択し、Scheduled-SRM による定量アッセイを実施、Stage-I、Stage-IV の癌部特異的な 16 種、Stage-I に特異的な 6 種、Stage-IV においては 10 種のタンパク質が見出された。現在、免疫組織染色による検証を実施中であり、いくつかのタンパク質については SRM のデータとの相関性が確認されている。Scheduled-SRM により多成分一斉分析（マルチプル・アッセイ）の効率が飛躍的な向上が確認できた。

研究成果の概要（英文）：Cholangiocarcinoma (CC) is usually diagnosed in advanced stage and associated with a dismal prognosis. A proteomic analysis may help identify novel biomarkers for the early detection, prevention and treatment of CC. The purpose of this study was to identify proteins differentially overexpressed in CC and to validate these proteins as potential biomarkers. We conducted a retrospective global proteomic study of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues by shotgun LC-MS/MS. We identified about 2000 proteins, and statistical comparison showed that 160 proteins were overexpressed in CC compared to noncancerous bile duct. We applied a targeted proteomics approach based on selected reaction monitoring (SRM) to quantify a subset of these proteins. SRM analysis suggested that some proteins would be useful as potential biomarkers. Expression of these proteins was confirmed by immunohistochemistry. Further validation using a large-scale sample set of FFPE tissues is now under way.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：薬物輸送体・抗癌剤感受性・プロテオミクス・バイオマーカー・質量分析

1. 研究開始当初の背景

胆道癌・膵臓癌は、特異的臨床症状に乏しく、特異的腫瘍マーカーもないために進行癌症例が多く、死亡罹患比が高い癌腫である。ゴールドスタンダードである外科的切除の治療成績向上にも、多くの課題が残されているが、症例数の少なさや術式の多様性から、プロスペクティブな集積や大規模解析が困難で、高いエビデンスレベルのデータは殆どない。その一方、患者層別化や新規薬剤導入を加速できるバイオマーカー研究の競争激化の中、罹患数での社会的ニーズや創薬研究の生産性からの対象疾患に対する投資がされているのが現状であり、胆道癌のバイオマーカー研究は、他の癌種に比べて大幅に遅れている。

最も一般的な組織保存法として病院に多数保管されているホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin Embedded; FFPE) 組織は、予後などの臨床情報が付加した状態でアーカイブされており、レトロスペクティブな解析が容易な点で稀少疾患では特に優位性が高い解析対象となる。近年 FFPE 組織からのタンパク質抽出が実現し、断片化され脆弱と考えられてきた抽出タンパク質も、ノーベル賞受賞となった生体高分子のイオン化法の開発を契機に目覚ましい発展を遂げた質量分析 (Mass Spectrometry; MS) を基盤とするプロテオーム解析に供することが可能になった。その中でバイオマーカー研究の力点も、網羅的に探索する段階 (グローバル解析) から候補タンパク質群を選択的に検定・定量解析する段階 (ターゲット解析) に大きくシフトしており、抗体フリーの選択的定量法である三連四重極型 MS での SRM 定量法 (Selected Reaction Monitoring MS-based assay) は、低濃度下高感度検出・多数のターゲットの同時定量解析が可能で、極めてスループットの高い新規検証手法として注目されている。

我々は、東北大学病院の診療科として「肝胆膵外科」を標榜し、肝胆膵外科ハイボリュームセンターとして機能し、東北地方はもとより全国から数多くの患者が集まっており、手術数及び手術成績は全国でも有数である。よってこれから作製する標本ではなく、過去の膨大な当科手術症例を対象として、その臨床情報データとタンパク質の発現データをレトロスペクティブに比較・解析することで、胆道癌診療に貢献しうるバイオマーカーを探索したいと考え、本研究計画を想起するに至った。

2. 研究の目的

臨床情報がアーカイブされた胆道癌 FFPE 組織から質量分析を基盤としたプロテオーム解析を行い、胆道癌外科診療に貢献しうる新規バイオマーカータンパク質を同定する。

3. 研究の方法

Discovery Stage

1. Sample Preparation

- ① **Sectioning:** FFPE組織を専用スライドグラス (DIRECTOR™ Laser Microdissection slides) に 10 μm で薄切・伸展させ、脱パラフィン後、ヘマトキシリン染色を行い抽出用プレパラートとして作製する。
- ② **Microdissection:** NIMS ナノテクノロジー融合センター NIIMS-Leica バイオイメージングラボ内の Leica LMD 6000 レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて病理医とのディスカッションの上、目的とする細胞特異的なダイセクションを行う。
- ③ **Peptide Extraction:** プロテオーム解析前処理キットとして Liquid Tissue™ MS Protein Prep Kit を用いてサンプルを可溶化後、トリプシンペプチド化する。

2. Global proteomics

- ① **LC-MS/MS Analysis:** 高感度にタンパク質発現を行うためにカスタマイズされた nanoflow LC-イオントラップ型 MS/MS (ZAPLOUS System™) を用いて同一サンプルを3回測定し、網羅的に解析する。
- ② **Bioinformatic Analysis:** タンパク質同定プロセスを自動化するためのクライアントソフトウェアである MASCOT™ を用いて、MS/MS スペクトラルデータをタンパク質データベース SwissProt に照合し、各サンプルのタンパク質を同定リストアップする。同定されたタンパク質に帰属するペプチド数、検出された総ペプチド数、タンパク質のアミノ酸数などの数値化されたデータより、統計解析 (*G* 検定²⁾)、スペクトラルカウント法³⁾⁻⁶⁾による半定量比較を行い、癌部で有意に高発現するタンパク質を選定する。

Validation Stage

3. Targeted Proteomics

- ① **SRM MS-based Assay:** Discovery stage で選定された癌部で有意に高発現するタンパク質のうち、GeneOntology 解析や文献検索により新規バイオマーカーとして期待されるタンパク質を抽出し、nanoflow LC-三連四重極型 MS/MS を用いた SRM アクセシによる定量解析を行う。得られた

データは解析ソフトMulti Quantにより各SRM transitionのretention time一致でのpeak pickingを行い、peak areaを測定値とした。Actin-βをinternal standardとして各測定値をnormalizeし、相対定量比較を行う。

4. Immunohistochemistry

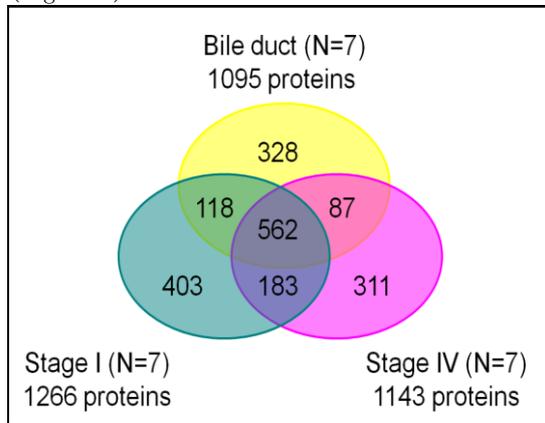
- ① Analysis of Discovery Set: Discovery stageで用いたサンプル(Discovery Set)を対象に、候補タンパク質の癌細胞での特異的発現、MS解析結果の組織学的妥当性を検証するため、免疫組織化学を行う。MS解析結果と免疫組織化学の相関性についても検証する。
- ② Analysis of Validation Set: Discovery Setを除く解析対象全例(Validation Set)を用いて免疫組織化学を行い、癌特異的な発現や進行度による変動など、バイオマーカーとしての有用性を検証する。

4. 研究成果

胆道癌

1998年～2008年の期間に当科で手術を施行し術前化学療法・放射線療法施行例と在院死亡例を除き、臨床情報が統一フォーマットでアーカイブされた肝外胆管癌症例163例(胆道癌取扱い規約/stage I: II: III: IV = 8: 38: 53: 66)を対象とした。コントロール(非癌部)には、膵頭部癌に対して膵頭十二指腸切除術を施行した症例の胆管22例を用いた。

まず、胆道癌特異的な発現タンパク質を網羅的に探索する目的で、解析対象のうちStage I・Stage IV・非癌部を各7例ずつ抽出し、Discovery Setとした。網羅的プロテオーム解析にてStage I: 1266種、Stage IV: 1143種、非癌部: 1095種、計1992種の発現タンパク質を同定した(Figure 1)。(Figure 1)

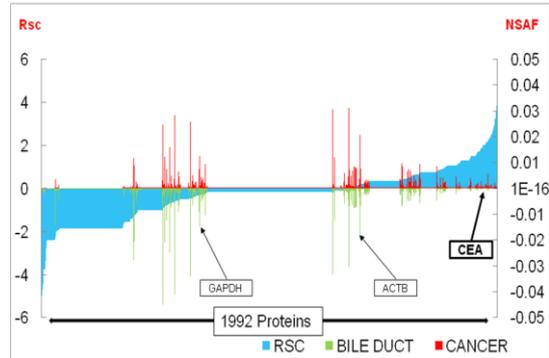


スペクトラルカウント法による半定量比較解析およびG検定の結果、そのうち160種のタンパク

質が癌部で有意に高発現していた(Figure 2)。

GeneOntology解析や文献検索から95種のタンパク質を抽出し、SRMデザイン候補タンパク質とした。SRMテスト測定の結果にて、actin-βを含む69種のタンパク質が有効に検出可能であり、これらのタンパク質に対してSRM本測定を行った。Actin-βの測定値によりnormalizeして相対定量比較を行った結果、12種のタンパク質が癌部で有意に高発現していることが明らかになった。

(Figure 2)



Discovery Setを対象に25種の特異的抗体による免疫組織化学を行い、11種のタンパク質がStage I、Stage IV(もしくは両群)で特異的に高発現を示した。特に、SRMアッセイにて有意に高発現をしていたタンパク質は免疫組織化学においても高い相関性を持って高発現していた。

膵臓癌

1998年～2007年に当科で膵切除が行われ、浸潤性膵管癌と診断された156例のうち、術前化学療法を行わずに根治切除できた予後が明らかな96例を選択し、対象症例とした。さらにその96例から既知の予後因子(Stage、分化度、術後腫瘍マーカー値、補助化学療法)が同一であるにも関わらず、予後に差のある2群(予後不良群4例、予後良好群4例)を抽出し(Figure 3)、タンパク質の発現を比較することで、新規の予後予測因子を探索した。コントロールとして、膵癌以外の5症例から採取された正常膵管上皮を用いた。

(Figure 3)

	予後不良群	予後良好群	p-value
術後生存期間	21.0±4.8ヶ月	58.1±13.0ヶ月	p=0.0017
年齢	66.75±10.66	63.25±12.95	p=0.6909
性別			
男性	3(75)	3(75)	p=1.0
女性	1(25)	1(25)	
部位	膵頭部	4(100)	
術式			
PD	3(75)	3(75)	p=0.3679
PPPD	0(0)	1(25)	
PPTP	1(25)	0(0)	
T	T3	4(100)	p=1.0
N	N1	4(100)	p=1.0
M	M0	4(100)	p=1.0
Stage(UICC)	IIB	4(100)	p=1.0
分化度	中分化型	4(100)	p=1.0
組織学的根治度	R0	4(100)	p=1.0
術後腫瘍マーカー	正常	4(100)	p=1.0
補助化学療法	GEM	4(100)	p=1.0

予後不良群4例、予後良好群4例、正常膵管5例の分析により、それぞれ924種、845種、730

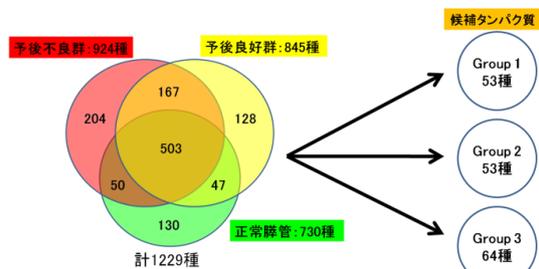
種、合計 1229 種のタンパク質が同定され、スペクトラルカウント法による半定量比較解析および G 検定の結果、170 種を SRM デザイン候補タンパク質とした。(Figure 4)

(Figure 4)

Group1: 予後不良群で高発現するタンパク質

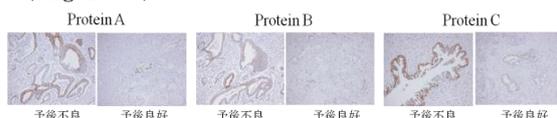
Group2: 予後良好群で高発現するタンパク質

Group3: 膵癌で高発現するタンパク質



Group 1 及び 2 の 106 種の候補タンパク質の中から、比較定量により 2 群間の発現量の差が大きいと算出されたタンパク質 27 種を選定し、免疫組織化学による発現の特異性と細胞内局在を検討したところ、3 種のタンパク質が、比較定量結果と同様に予後不良群で高発現していた。(Figure 5)

(Figure 5)



今後症例を集積し、候補の中で「血液や胆汁に現れる可能性がある」漏洩・分泌タンパク質などに絞り込み、術前に採取できる血液や胆汁を用いて選択的に検出・定量して候補マーカーを検証する新規研究戦略や、従来の形態学を超えた分子病理学的診断への応用、候補マーカーをターゲットした分子標的治療や分子イメージング技術開発等、産業や臨床医学上のイノベーションや肝胆膵診療のブレイクスルーにつながるような成果を生み出したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- 1) Sakata N, Egawa S, Rikiyama T, Yoshimatsu G, Masuda K, Ohtsuka H, Ottomo S, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Onogawa T, Yamamoto K, Yoshida H, Akada M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Unno M. Computed tomography reflected endocrine function of the pancreas. *J Gastrointest Surg.* 2011 Mar;15(3):525-32. 査読有
- 2) Maeda S, Motoi F, Onogawa T, Morikawa T, Shigeru O, Sakata N, Takadate T, Naitoh T, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Paclitaxel as second-line chemotherapy in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer: a retrospective study. *Int J Clin Oncol.* 2011 Apr 1. 査読有
- 3) Abe M, Toyohara T, Ishii A, Suzuki T, Noguchi N, Akiyama Y, Shiwaku HO, Nakagomi-Hagihara R, Zheng G, Shibata E, Souma T, Shindo T, Shima H, Takeuchi Y, Mishima E, Tanemoto M, Terasaki T, Onogawa T, Unno M, Ito S, Takasawa S, Abe T. The HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin stimulates insulin secretion through organic anion transporter polypeptides. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(3):274-82. 査読有
- 4) Egawa S, Motoi F, Sakata N, Kitamura Y, Nakagawa K, Ohtsuka H, Hayashi H, Morikawa T, Omura N, Ottomo S, Yoshida H, Onogawa T, Yamamoto K, Akada M, Rikiyama T, Katayose Y, Matsuno S, Unno M. Assessment of Frey procedures: Japanese experience. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010 Nov;17(6):745-51. 査読有
- 5) Shiraso S, Katayose Y, Yamamoto K, Mizuma M, Yabuuchi S, Oda A, Rikiyama T, Onogawa T, Yoshida H, Hayashi H, Ohtsuka H, Motoi F, Egawa S, Kato J, Unno M. Overexpression of adenovirus-mediated p27kip1 lacking the Jab1-binding region enhances cytotoxicity and inhibits xenografted human cholangiocarcinoma growth. *Anticancer Res.* 2009 Jun;29(6):2015-24. 査読有
- 6) Oda A, Katayose Y, Yabuuchi S, Yamamoto K, Mizuma M, Shirasou S, Onogawa T, Ohtsuka H, Yoshida H, Hayashi H, Rikiyama T, Kim H, Choe Y, Kim K, Son H, Motoi F, Egawa S, Unno M. Clock gene mouse period2 overexpression inhibits growth of human pancreatic cancer cells and has synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res.* 2009 Apr;29(4):1201-9. 査読有
- 7) Yabuuchi S, Katayose Y, Oda A, Mizuma M, Shirasou S, Sasaki T, Yamamoto K, Oikawa M, Rikiyama T, Onogawa T, Yoshida H, Ohtsuka H, Motoi F, Egawa S, Unno M. ZD1839 (IRESSA) stabilizes p27^{Kip1} and enhances radiosensitivity in cholangiocarcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 2009 Apr;29(4):1169-80. 査読有
- 8) Mizuma M, Katayose Y, Yamamoto K, Shiraso S, Sasaki T, Yabuuchi S, Oda A, Masuda K, Rikiyama T, Onogawa T, Ohtsuka H, Motoi F, Egawa S, Unno M. Up-regulated p27Kip1 reduces matrix metalloproteinase-9 and inhibits invasion of human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2008 Sep-Oct;28(5A):2669-77. 査読有
- 9) Nakamura H, Katayose Y, Rikiyama T, Onogawa T, Yamamoto K, Yoshida H, Hayashi H, Ohtsuka H, Hayashi Y, Egawa S,

- Unno M. Advanced bile duct carcinoma in a 15-year-old patient with pancreaticobiliary maljunction and congenital biliary cystic disease. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008;15(5):554-9. 査読有
- 10) Fukase K, Ohtsuka H, Onogawa T, Oshio H, Ii T, Mutoh M, Katayose Y, Rikiyama T, Oikawa M, Motoi F, Egawa S, Abe T, Unno M. Bile acids repress E-cadherin through the induction of Snail and increase cancer invasiveness in human hepatobiliary carcinoma. *Cancer Sci.* 2008 Sep;99(9):1785-92. 査読有
- 11) Oshio H, Abe T, Onogawa T, Ohtsuka H, Sato T, Ii T, Fukase K, Muto M, Katayose Y, Oikawa M, Rikiyama T, Egawa S, Unno M. Peroxisome proliferator α -activated receptor α activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines. *J Gastroenterol.* 2008;43(7):538-49. 査読有
- 12) Sasaki T, Katayose Y, Yamamoto K, Mizuma M, Shiraso S, Yabuuchi S, Oda A, Rikiyama T, Oikawa M, Onogawa T, Suzuki M, Lee CT, Unno M. Adenovirus expressing mutant p27kip1 enhanced apoptosis and inhibited the growth of xenografted human breast cancer. *Surg Today.* 2007;37(12):1073-82. 査読有
- 13) Onogawa T, Muto M, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, Ohuchi N, Sasano H, Abe T, Unno M. Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1570-6. 査読有
- 14) Ota K, Ito K, Akahira J, Sato N, Onogawa T, Moriya T, Unno M, Abe T, Niikura H, Takano T, Yaegashi N. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: a possible role of the adriamycin importer. *Int J Gynecol Pathol.* 2007 Jul;26(3):334-40. 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
- 1) 小野川徹ら (15 名中 1 番目), ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片の臨床プロテオーム解析における基礎パラメータの検討, 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 2010 年 7 月 26 日, 浦安
- 2) 前田晋平, 小野川徹ら, 胆道癌 FFPE 組織を用いた網羅的プロテオーム解析による新規バイオマーカーの探索と検証, 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 2010 年 7 月 26 日, 浦安
- 3) 高館達之, 小野川徹ら, FFPE を用いた網羅的プロテオーム解析による膵癌新規予後予

- 測マーカーの探索, 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 2010 年 7 月 26 日, 浦安
- 4) 小野川徹ら (21 名中 1 番目), 病院保管のホルマリン固定組織からプロテオーム解析はどこまでできるか?, 第 22 回日本肝胆膵外科学会総会, 2010 年 6 月 28 日, 仙台
- 5) 小野川徹ら (21 名中 1 番目), 胆道癌ホルマリン固定パラフィン包埋切片からのディスカバリープロテオミクス, 日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会, 2009 年 7 月 27 日, 東京
- 6) Takadate T, Onogawa T, et al. Discovery of Prognostic Factor using Proteomic Analysis with Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues of Pancreatic Cancer, the Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010 年 7 月 11 日, Fukuoka
- 7) 小野川徹ら (21 名中 1 番目), 胆道癌ホルマリン固定パラフィン包埋組織からのディスカバリープロテオミクス, 第 5 回日本臨床プロテオーム研究会, 2009 年 5 月 9 日, 東京
- 8) 小野川徹ら (8 名中 1 番目), 新規乳癌独立予後規定因子 LST-2/SLC01B3 の癌細胞特異的発現とその腫瘍生物学的意義, 第 3 回トランスポーター研究会年会, 2008 年 6 月 7 日, 京都
- 9) 小野川徹ら (18 名中 1 番目), 検体微量ペプチド試料からの薬物輸送体及び代謝酵素蛋白群の網羅的同時絶対定量解析と抗癌剤感受性予測, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008 年 5 月 15 日, 長崎

[図書] (計 1 件)

- 1) Diseases of the Pancreas -Current Surgical Therapy-(共著書) (Beger HG, Matsuno S, Cameron JL Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, Onogawa T, Rikiyama T, Unno M, Matsuno S. : 895-904 Section 10 : Congenital Anomalies of the Pancreas, Chapter 82 : Biliopancreatic Maljunction: Classification, Diagnosis, and Treatment

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称:胆道がん診断用新規バイオマーカー群
 発明者:小野川徹、海野倫明、前田晋平
 権利者:国立大学法人 東北大学
 種類:特許願
 番号:特願 2011-107624
 出願年月日:平成 23 年 5 月 12 日
 国内外の別:国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野川徹 (ONOGAWA TOHRU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50431557