

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19791127
 研究課題名 (和文) 前立腺癌の広範囲プロテオミクス解析による新規血清マーカーの探索
 研究課題名 (英文) Search for the novel serum markers for prostate cancer diagnosis
 研究代表者
 鎌田 裕子 (KAMATA YUKO)
 東京慈恵会医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60433984

研究成果の概要：現在、前立腺癌で汎用されている血清マーカーである前立腺特異抗原は臓器特異性は高いが癌特異性が低く、新たな血清バイオマーカーが求められている。そこで、血清中のタンパク質を網羅的に解析し、前立腺癌の新規バイオマーカーの探索を行った。この結果、前立腺癌の新たなマーカー候補タンパク質として、Fibrinopeptide A と Complement C3f (C3f) を発見した。さらに、C3f の ELISA 法による測定系を構築し、より簡便な多検体測定を可能とした。本方法で C3f を測定したところ、癌患者群で有意に高発現しており、臨床的に有用なマーカーとなる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌、マーカー、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は、欧米では罹患率、致死率とも非常に高い悪性腫瘍であり、本邦においても高齢化や生活様式、食生活の欧米化に伴い急速に増加している。前立腺癌は、理学所見に乏しく画像診断も困難なため、血清中の前立腺特異抗原 Prostate specific antigen (PSA) によるスクリーニングに頼らざるを得ないのが現状である。しかし、PSA は前立腺癌の

みならず正常前立腺上皮細胞も産生しているため、前立腺炎や前立腺肥大症などの良性前立腺疾患においても PSA 値が異常値を示すことがあり、その癌特異性は低い。そのため、前立腺癌に特異的な新たな血清バイオマーカーの探索は急務である。現在、国内外で主に遺伝子学的手法による新規バイオマーカーの探索が盛んに行われているが、未だ PSA を凌駕するものは見つかっていない。

プロテオミクスはポストゲノム時代の基盤となる新しい分野であり、試料中のタンパク質の種類や状態を直接解析することができる。そのため、血清などの体液からタンパク質である新規バイオマーカーを探索するのに非常に有利であると考えられている。近年のプロテオミクスの発展に伴い、前立腺癌の新たなバイオマーカーをタンパク質レベルで探索しようという試みが始まっている。

SELDI TOF-MS (ProteinChip® array)は、様々な官能基で修飾された ProteinChip®上にタンパク質を結合させ、結合したタンパク質を質量分析計によって解析するシステムである。非常にハイスループットで解析できるため、マーカー探索や臨床応用が期待されている新しいプロテオーム解析技術である。

2. 研究の目的

本研究では、SELDI TOF-MSを用いて、特に PSA<10.0ng/ml の前立腺癌患者を対象に、SELDI-TOF MSを用いて特に低分子量タンパク質（ペプチドを含む）に注目した新規血清前立腺癌マーカーを探索することを第1の目的とした。

さらに、ここで発見された新規マーカー候補タンパク質を、より簡便に多検体で測定可能とするために、ELISA法による測定法を構築する。これは、本研究により臨床的に有用なマーカー候補タンパク質が発見された場合、その臨床応用を速やかに進めるためにも重要である。この構築された測定系にて、マーカー候補タンパク質が臨床的に有用であるかどうかを評価することを第2の目的とした。

これらを通して、最終的に臨床的応用可能な新規前立腺癌血清マーカーを探索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

対象は PSA<10.0ng/ml の未治療前立腺癌患者 40 人で、対象群として PSA<10.0ng/ml かつ PSAV≤0.0ng/ml/yr で、前立腺生検で癌が否定された患者 40 人を選択した。

この 80 例に対して、SELDI-TOF MS 解析を行った。ProteinChip は、官能基によって異なるタンパク質を検出するために Q10（陰イオン交換）、CM10（陽イオン交換）の 2 種類を用いた。また、低分子量タンパク質およびペプチドを解析するため、EAM には CHCA を用いた。得られたピークの統計学的解析は、Biomarker Wizard™を用い、t-test にて行った。低分子量タンパク質をターゲットとするため、1500<M/Z<5000 のうち、t-test での $p<0.05$ で、Intensity>5 以上のピークをマーカー候補タンパク質とした。

得られたマーカー候補タンパク質は、HPLCにて精製後 autoflex II (Bruker)にて同定した。

同定したマーカー候補タンパク質に対して、ウサギポリクローナル抗体を作製し、ELISA 法による血清中でのマーカー候補タンパク質の測定系を構築した。これを用いて、前立腺癌患者群 36 例、コントロール群 29 例の血清中でのマーカー候補タンパク質濃度を測定した。

4. 研究成果

SELDI TOF-MS による低分子量タンパク質の前立腺癌マーカー探索では、Q10 チップによる解析から 2 個、CM10 チップの解析から 12 個のマーカー候補を発見した。これら 14 個のうち、Fibrinopeptide A (FBA)、Complement C3f (C3f) の 2 つの同定に成功した。

FBA は Q10 チップの解析により発見された。その同定された配列は、ADS*GEGDFLAEGGVGR であった (S*はリン酸化)。ピーク intensity は癌患者群で 10.3 ± 7.1 、コントロール群で 19.2 ± 13.1 で癌患者群で有意に低値であった ($p=0.002680173$)。また、ROC 曲線により、ピーク intensity 10.9 以下を癌としたところ、感度 70%、特異度 65%で前立腺癌を検出できた (ROC integral:0.695, 0.576-0.814)。また、PSA や Gleason Score 等他の臨床病理学的因子との相関は認めなかった。

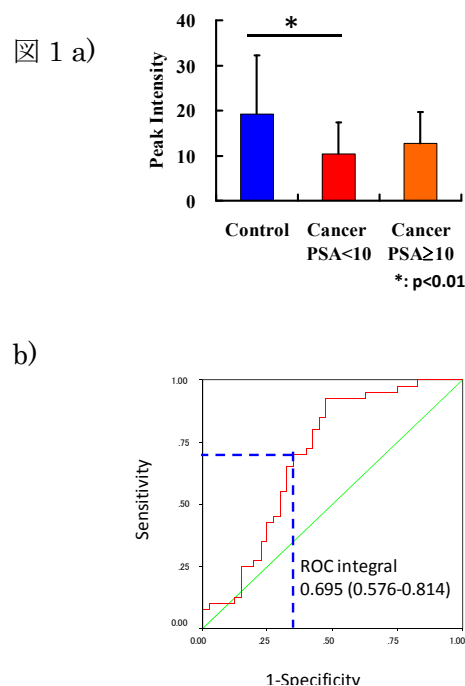


図 1 SELDI TOF-MS による FBA の発現
(a)、FBA 発現の ROC 曲線(b)

C3fはCM10チップの解析により発見された。その同定された配列は、SSKITHRIHWESASLLであった。ピーク intensityは癌患者群で 13.4 ± 16.2 、コントロール群で 20.0 ± 17.7 で癌患者群で有意に高値であった ($p=0.007259956$)。また、PSA ≥ 10 の癌患者群でもコントロール群と比べ、有意に高発現していた (図2)。また、ROC曲線により、ピーク intensity 6.8以上を癌としたところ、感度 80%、特異度 60%で前立腺癌を検出できた (ROC integral: 0.674, 0.553-0.796)。また、PSAやGleason Score等他の臨床病理学的因子との相関は認めなかった。

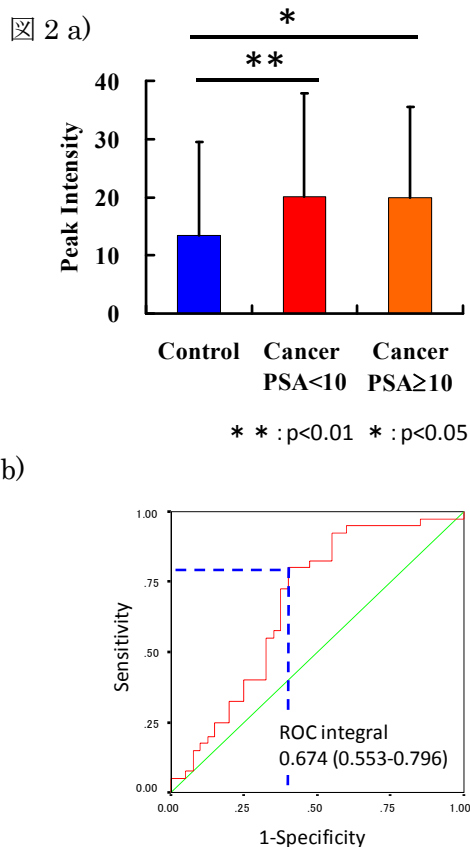


図2 SELDI TOF-MSによるC3fの発現(a)、C3f発現のROC曲線(b)

これらの結果から、前立腺癌患者血清で発現の増加していたC3fに着目し、さらに解析を進めることとした。同定されたC3fの配列の合成ペプチドをウサギに免疫し、anti-C3f rabbit polyclonal antibodyを作製した。この抗体を用いて、ELISA法によりC3fの血清中での濃度を測定した。C3fは、低分子量タンパク質であるため、血清は、限外分子量3000の限外濾過膜で前処理を行い測定した。

ELISA法による測定でも、SELDI TOF-MSでの結果と同様に、C3fは癌患者群血清で高発

現していた (図3)。ROC曲線により、ピーク intensity 6.8以上を癌としたところ、感度 80%、特異度 60%で前立腺癌を検出できた (ROC integral: 0.674, 0.553-0.796)。また、PSAやGleason Score等他の臨床病理学的因子との相関は認めなかった。

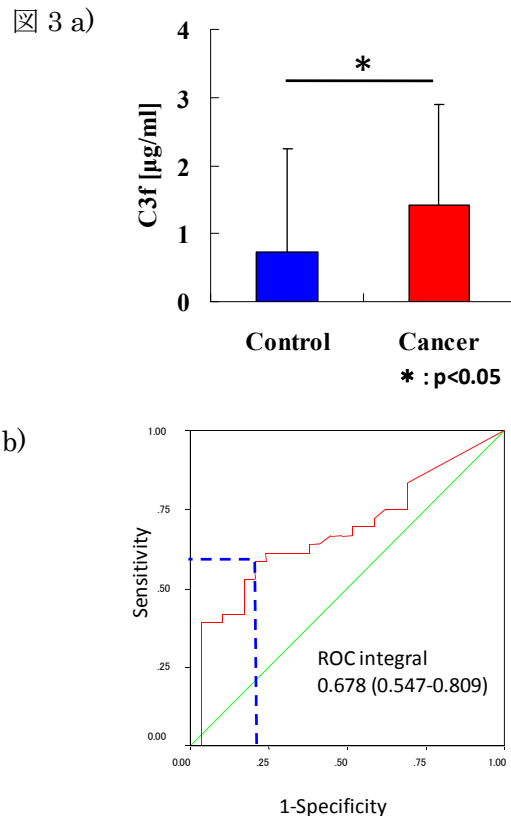


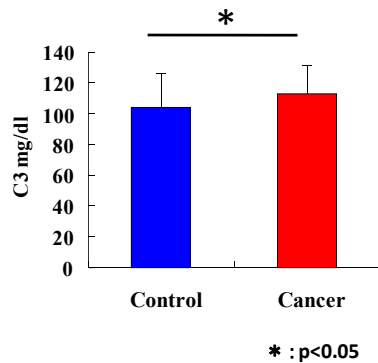
図3 ELISA法によるC3fの発現(a)、C3f発現のROC曲線(b)

このC3fはELISA法による測定でも、癌患者群で高発現を示したことから、前立腺癌の新規血清マーカーとして有望であると考えられる。今後、多検体を用いたより詳細な臨床的有用性の検討が必要であるが、本研究で、ELISA法による簡便な血清中のC3fの測定系が構築されたことは、これを進める上で極めて意義深い。

C3fは癌患者血清で高発現していたが、これが前立腺癌組織で産生されているかどうかは不明であった。C3fはComplement C3 precursorという前駆体の形で生成され、Factor Iなど分子によって切断されることにより生じることが知られている。そこで、このComplement C3 precursorのmRNAが前立腺癌組織で発現しているかどうかを*in situ* Hybridization法にて検討したところ、前立腺癌組織内で発現が認められた。このことから、前立腺癌では、C3も血清中での新たなマ

一カーとなる可能性が考えられた。そこで、血清中での C3 発現を測定し、マーカー候補となりうるかどうかを検討した。血清中の C3 の平均は前立腺癌患者群で 112.7mg/dL、コントロール群で 103.8mg/dL で癌患者群で有意に高かった (図 4、 $p<0.05$)。前立腺癌では C3f だけでなく、C3 も新たな血清マーカーとなる可能性があると考えられた。

図 4



以上から、前立腺癌では、Complement C3 precursor の mRNA が発現し、タンパク質が生成され、血清中でも高発現していると考えられ、C3 および C3f は新規前立腺癌血清マーカーとなる可能性が示された。今後、より多検体での測定を行い、そのマーカーとしての有用性や、臨床病理学的因子との関係について検討する予定である。

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 5 件)

- ① 鎌田 裕子、Search for the novel serum markers for prostate cancer diagnosis、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋
- ② 鎌田 裕子、SELDI-TOF MSによる前立腺癌マーカーの探索、第4回日本臨床プロテオーム研究会、2008年5月10日、大阪
- ③ 鎌田 裕子、SELDI-TOF MSを用いた新規前立腺癌血清マーカーの探索、第96回日本泌尿器科学会総会、2008年4月25日、横浜
- ④ 鎌田 裕子、SELDI-TOF MSによる新規前立腺癌血清マーカーの探索、第17回泌尿器科分子・細胞研究会、2008年2月16日、東京
- ⑤ 鎌田 裕子、Search for the novel serum

markers of peptides or low molecular proteins for prostate cancer、HUP0 6th Annual World Congress、2007年10月10日、ソウル、韓国

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 裕子 (KAMATA YUKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60433984

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし