

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21590642
研究課題名（和文）	膵臓癌細胞由来膜／核内タンパク質—自己抗体結合体を標的にした膵臓癌特異抗原の検索
研究課題名（英文）	Identifications of tentative pancreatic cancer-related antigens of expressed proteins derived from membrane and nuclei components of 4 pancreatic cancer cell lines by autoantibodiomics
研究代表者	
	宮本 好晴 (Miyamoto Yoshiharu)
	大阪医科大学・医学部・助教
	研究者番号： 20368096

研究成果の概要（和文）：

膵臓癌患者血清を用いた予備実験（膵臓癌 20 例、家族性膵臓癌 3 例、健常者 10 例）では、数個の細胞膜や核内由来タンパク質に対して特異的に結合する 6 本の陽性バンドを見出し、そのバンド中から 6 種のタンパク質を同定した。1 本を除いてこれら陽性バンドは、健常者血清では検出されず、膵臓癌に特異的なバンドの可能性が高く、今後症例数を増やしその陽性率を統計学的処理し、有用性を明らかにする必要がある。

研究成果の概要（英文）：

Pancreatic cancer has one of the poor prognoses of all neoplasm, with a 5-year survival rate of below 10%, accounting fifth largest number of cancer deaths. In pancreatic cancer, autoimmunity has been also identified against several proteins but it is not clear why only patients infiltrated with a particular tumor type develop a humoral response to cancer-associated antigens. At this time, we applied the autoantibodiomics to identify pancreatic cancer-related antigens and antibodies, and examined 33 sera samples of patients with pancreatic cancer to identify the autoantibodies against expressed cytosolic, nuclear and membrane proteins derived from four typical human pancreatic cancer cell lines. We identified 6 candidate biomarkers, such as MAP7 domain containing 2, carbonic anhydrase 1, ubiquilin-like protein, pyruvate kinase M1/M2, FAST kinase domain containing protein 2 and pericentriolar material 1 to detect the pancreatic cancer. The antibodies against to these 6 proteins were highly detected in plasma of the cancer patients. We should develop the ELISA system to detect these 6 candidate biomarkers for the screening of the pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：膵臓癌、自己抗体、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は日本人の悪性新生物による死亡の第5位を占め、毎年約2万もの人々が命を落としている。膵臓癌の殆どは、発見時には既に浸潤・転移を伴う進行癌として診断される。しかも、罹患者数と死亡者数がほぼ一致する程、その予後は極めて不良な癌である。これまで外科的切除・化学療法・放射線療法・免疫療法・温熱療法などを組み合わせた集学的治療が実施されているのにもかかわらず、根治性の高い治療法はいまだ確立されるには至っていない。最近の研究により、膵管上皮に存在する増殖性病変が膵臓癌の前駆病変であることが明らかになって来た。1999年、HrubanらはPanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasia) 分類を提唱し、何らかの遺伝子異常を伴った不可逆的な膵管上皮病変を膵臓癌前駆病変と定義し、遺伝子解析、免疫組織学的手法による発現タンパク質解析、細胞学的所見と重症度との関連性に関する調査・研究を開始した。これらの膵管上皮病変は、組織学的異型度を基準に3段階 (PanIN - 1~3) に分類され、最も異型度の高いPanIN - 3は従来の上皮内癌に相当し、グレードが高くなる程、膵臓癌で認められる*K-ras*, *p16*, *p53*, *DPC4*など様々な遺伝子変異や発現異常の頻度が高くなることが知られている。分担者 (高折) はHruban教授と共にPanIN分類による膵臓癌早期発見・診断を目指し、これまでに数々の臨床経験や学術的研究を重ねて来ている。また同様に、多くの研究者らが膵液・血液・糞便中の膵臓癌関連遺伝子・タンパク質の解析を継続しており、PanIN病変から膵臓癌へ移行する分子機構の解明と精度の高い分子マーカを見出すことが出来れば、膵臓癌の早期診断・根治療法の確立への道が開けてくる。

自己抗体を標的にしたプロテオーム手法の癌診断への応用は、2001年Hanash教授らのグループより初めて報告され、その後も数々の成果が発表されて来ており、本法による癌関連自己抗体の検出とその対応抗原は新しい癌診断指標となり得る可能性を示すと同時に、新たな癌研究への扉を開いた (癌プロテオミクス)。我々の方法は、ヒト膵臓癌細胞発現タンパク質 (従来の可溶性画分ではなく細胞膜/核内成分を用いるは我々が最初) を癌抗原とし、膵臓癌前駆病変

(PanIN) 患者・膵臓癌患者血清中に存在する自己抗体を標的にした高選択性・特異的プロテオミクスであり、新しい早期膵臓癌診断マーカーが見出せる可能性が高い。

国内では、我々グループがいち早く本法の有用性に注目し、癌プロテオミクスを学内研究グループと共に立ち上げ、肺癌・食道癌 (Peroxioredoxin-VI、HSP70isoform)・非ホジキンリンパ腫 (L-plastin) の診断指標となり得るバイオマーカーを同定し、専門誌に投稿すると共に特許申請した。

2. 研究の目的

使用抗原を従来の可溶性タンパク質に変えて、細胞膜/核内成分タンパク質を癌抗原とし、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法—ウエスタンブロット/化学発光検出法—ナノスプレーイオン化/マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法—データベース検索法を用いて、患者自己抗体と特異結合する膵臓癌特異抗原の検索を実施する。

同定した抗原タンパク質を精製/購入し、精製抗原を用いたELISA法による自己抗体の定量測定と測定結果の統計学的評価し、その有用性を感度・特異度及び既存の膵臓癌マーカーと比較評価する

3. 研究の方法

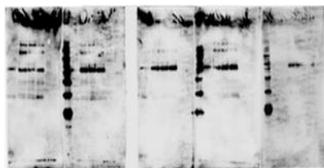
ヒト膵臓癌細胞株 (MIAPaca-II、Panc-I、AsPC-I、Capan-II) 発現する細胞膜/核内タンパク質を癌抗原とし、膵臓癌前駆病変 (PanIN) 患者、膵臓癌患者血清中に存在する自己抗体を標的に自己抗体—膵臓癌抗原結合体中の膵臓癌診断マーカーを検索する。検索法は、これまでの手順に若干の改良

(ReplicaBlotting法を採用)を加え実施する。対象試料は文部科学省ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針及び学内倫理委員会規定に則り採取した膵臓癌・癌前駆病変患者血清を用いる。本法にて同定した膵臓癌特異抗原を精製し、プレートに固相化したELISA法を用いて自己抗体値を定量し、得られた定量値とPanIN分類、膵臓癌重症度など病理組織学的分類、臨床経過などと比較し、統計学的検討を加え、その有用性を明らかにする。

4. 研究成果

膵臓癌患者血清を用いた実験で、膵臓癌 20 例、家族性膵臓癌 3 例、健常者 10 例では、数個の細胞膜や核内由来タンパク質に対して特異的に結合する複数本の陽性バンドを見出し、そのバンド中から 6 種のタンパク質 (MAP7 系蛋白、炭酸脱水素酵素 I、ユビキチン様蛋白、ピルビン酸キナーゼ、FAST キナーゼ系蛋白など) を同定した。1 本を除いてこれら陽性バンドは、健常者血清では検出されなかった。今回見出したタンパク質は、前回の研究で用いた膵臓癌細胞 (AsPC-1、Capan-2、Miapak-II、Panc-I) 由来可溶性タンパク質を腫瘍抗原としなかった結果、より膵臓癌に特異的なタンパク質である可能性が高く、今後 ELISA 等その陽性率を統計学的検索し、その早期診断マーカーとしての有用性を明らかにする必要がある。

また、同時に可溶性膵臓癌特異抗原として見出したトリオースリン酸イソメラーゼの変異体(TIM)の変異部位(³⁴Val→Leu)は、MHC-クラス I の認識抗原ペプチド内に存在しており文献検索の結果、その近傍の変異(²⁸Thr→Ile)は、メラノーマ特異抗原ペプチドであることが既に報告(*J.Mol.Biol.*, 319 :449-61, 2002)されており、今回の結果は非常に興味深い。



1: 正常膵臓可溶性タンパク質、2: 膵臓癌腫タンパク質、3: 膵臓癌腫タンパク質、4: 膵臓癌可溶性タンパク質、5: AsPC-1可溶性タンパク質、6: Capan-2可溶性タンパク質

- 1) MAP7 domain containing 2
- 2) Carbonic anhydrase 1
- 3) Ubiquitin-like protein
- 4) Pyruvate kinase M1/M2
- 5) FAST kinase domain containing protein 2
- 6) Pericentriolar material 1

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 4 件)

- 1) Miki A, Katagi M, Shima N, Kamata T, Tatsuno M, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Takubo T, Suzuki K. Imaging of methamphetamine incorporated into hair using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight

imaging mass spectrometry. *Forensic Tox.* 29:111-6, 2011.

- 2) Miki A, Katagi M, Kamata T, Zaitso K, Tatsuno M, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Takubo T, Suzuki K. MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair. *J.Mass Spectrom.*, 46(4):411-6, 2011.
- 3) Nakanishi T, Yoshioka M, Moriuchi K, Yamamoto D, Tsuji M, Takubo T. S-sulfonation of transthyretin is an important trigger step in the formation of transthyretin-related amyloid fibril. *Biochim.Biophys Acta.* 1804(4):1449-56,2010
- 4) Tunemi S, Nakanishi T, Fujita Y, Bouras G, Miyamoto Y, Miyamoto A, Sakai A, Noumra E, Takubo T, Tanigawa N. Proteomics-based identification of a tumor associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. *Oncology Reports.* 23,949-56,2010.

[学会発表] (計 2 件)

- 1) Nakanishi T. The detection of disease-specific proteins in clinical samples by the soft-ionization mass spectrometry. IUPAC international Congress on Analytical Sciences 2011. (May22-26,2011, Kyoto)
- 2) Nakanishi T, Takaori K, C. Iacobuzio-Donahue A, Yachida S, Hruban RH, Miyamoto Y, Tanigawa N, Tabushi Y, Takubo T. Detetction of alpha-enolase and triosephosphate isomerase in sera from patients with pancreatic cancer by autoantibodiomics analysis. 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry. (Jun.25-29, 2010. Salt Lake, CO, USA)

〔図書〕(計1件)

1) 『『臨床プロテオーム』個別化医療を目指す臨床バイオマーカー探索』(日本臨床プロテオーム研究会編 加藤治文、中村和行、西尾和人、西村俊秀編)金原出版 分担:臨床材料を用いたMALDI-イメージング解析(第8章:分子イメージングと医療)p294-298, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 好晴 (Miyamoto Yoshiharu)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20368096

(2) 研究分担者

中西 豊文 (Nakanishi Toyofumi)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10247843

松村 洋子 (Matsumura Yoko)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80388256

武内 徹 (Takeuchi Touru)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10330078

田窪 孝行 (Takubo Takayuki)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60163359

高折 恭一 (Takaori Kyoichi)
京都大学・医学部・講師
研究者番号: 10329485