

令和 6 年 7 月 1 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07408

研究課題名（和文）大腸発癌過程における血中タンパク動態の解明と革新的大腸癌早期診断法の開発

研究課題名（英文）In depth proteomics-based dynamic profiling of blood proteins for colorectal cancer early detection

研究代表者

山田 啓策（Yamada, Keisaku）

愛知県がんセンター（研究所）・分子診断TR分野・研究員

研究者番号：10894793

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：早期大腸癌の予後は良好で、また高リスク大腸腺腫と粘膜内癌は、内視鏡的切除のよい適応となっている。したがって、血液バイオマーカーを用いた高リスク大腸腺腫を含む大腸癌の早期診断は、より低侵襲、低コストで大腸癌の克服を目指すための有力なアプローチである。本研究では、臨床上有用な診断精度を持つ血液バイオマーカーパネルの構築を目指して、正常対照者と、異なる大腸発癌過程にある症例（低リスク大腸腺腫、高リスク大腸腺腫、早期大腸癌、進行大腸癌）由来の血漿検体を用いて、血中タンパク質と自己抗体の網羅的な高感度プロテオーム解析を行い、大腸癌早期診断に有用な血液バイオマーカーの探索同定とその検証を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で初期検証を行ったバイオマーカーは、さらに臨床応用を目指して、便潜血陽性者における偽陽性率の低減と、大腸癌の臨床診断前における血液診断をゴールとして、それぞれに最適化したバイオマーカーパネルを開発する。これによって、高リスク大腸腺腫を含む大腸癌の早期診断血液テストが開発されれば、内視鏡的治療などより侵襲の少ない治療が可能になる症例が増え、患者の負担低下、医療コストの低下と早期の社会復帰による社会全体の生産性向上と社会コストの引き下げなど、メリットは非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：The prognosis for early-stage colorectal cancer is favorable, and high-risk colorectal adenomas and intramucosal carcinoma are good indications for endoscopic resection. Therefore, early diagnosis of colorectal cancer, including high-risk colorectal adenoma, by blood-based biomarkers is a promising approach to reduce mortality of colorectal cancer in a non-invasive and cost-effective fashion. In this study, we will perform in-depth proteome analysis for both free plasma proteins and autoantibody-bound proteins in the plasma samples collected from normal controls and cases in different colorectal carcinogenesis that include adenomas to advanced colorectal cancer. The biomarker candidates will be validated in an independent plasma sample set to develop a biomarker panel with clinically useful diagnostic accuracy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 大腸腺腫 早期診断 プロテオミクス 血液バイオマーカー 自己抗体 便潜血陽性

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において、大腸癌の罹患者数は増加傾向で、約16万人と全がんの中で最多であり、また死亡者数も5万人超と肺癌について2番目に多い(国立がん研究センターがん対策情報センター)。大腸癌の5年相対生存率は、Stage Ⅰでは95%以上と非常に良いものの、Stage Ⅳでは約70%、遠隔転移を有するStage Ⅳでは約15%である。多くの大腸癌は、10-30年という長い経過の中で腺腫から癌へと進展していく。その中で、1cm以上の大きさを持つ大腸腺腫は、その15%が10年以内に癌になる、非常にリスクが高い前癌病変である。その一方で、高リスク大腸腺腫と粘膜内にとどまる早期の大腸癌は、内視鏡的切除のよい適応となっている。したがって、高リスク大腸腺腫を含む大腸癌の早期診断は、より低侵襲、低コストに大腸癌の克服を目指すための有力なアプローチである。

大腸癌を早期発見するためのスクリーニングとして免疫法便潜血検査が行われ、その陽性者に対して大腸内視鏡による精密検査が行われている。便潜血検査は、受診者の負担が低く、また大腸癌による死亡率を減少させることが証明されているが、疑陽性率が高く、その陽性的中率はわずか5%前後である。また早期大腸癌や高リスク大腸腺腫に対する感度もそれぞれ約50%、約20%と低いことから、より精度が高い診断法の開発が望まれている。

血液中のタンパク質や自己抗体は、血中循環腫瘍DNA(ctDNA)やエクソームと異なり、検出に大量の血液を必要としないこと、簡便かつ低侵襲、低コストで高スループットな診断法となりえることから、癌の早期診断やスクリーニングの有望なバイオマーカープラットフォームである。にもかかわらず、今までに癌の早期診断バイオマーカーとして報告されてきた、数多くの血中癌関連タンパク質や自己抗体のほとんどは、臨床応用に至っていない。その理由としては、血中タンパク質濃度は $10^{12}$ 程度と極めて幅広い範囲に及んでおり、低含量の真に有望な癌関連タンパク質バイオマーカーを同定するためには、より網羅的かつ高深度なプロテオーム解析を行う必要があること、癌関連タンパク質を抗原とする自己抗体との結合による見かけ上の濃度低下についての理解がなされていないこと、癌は臨床的、分子生物学的に多様であり、1つの血液バイオマーカーが十分な診断精度を持つ可能性は低く、バイオマーカーを組み合わせたパネルを確立する必要があることなどがあげられる。

### 2. 研究の目的

愛知県がんセンター分子診断TR分野では、大腸癌を含む様々な癌腫において、早期診断や治療個別化に有用な血液バイオマーカーの探索同定を行っており、最近極めて高感度な血漿タンパク質解析法と、抗原-自己抗体複合体解析法を開発した。そこで、本研究では、従来のタンパク質バイオマーカー研究の短所や限界を克服し、臨床上有用な診断精度を持つ血液バイオマーカーパネルの構築を目指して、正常対照者と、異なる大腸発癌過程にある症例(低リスク大腸腺腫、高リスク大腸腺腫、早期大腸癌、進行大腸癌)由来の血漿検体を用いて、血中タンパク質と自己抗体の網羅的な高感度プロテオーム解析を行い、大腸癌早期診断に有用な血液バイオマーカーを探索同定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) バイオマーカー探索に用いる臨床検体と研究のストラテジー

大腸癌はその発生部位によって、臨床像、また分子生物学的にも違いがあることが知られている。すなわち、左側に発生した大腸癌は予後が良く、p53突然変異が多く見られるのに対し、右側に発生した大腸癌は予後が悪く、マイクロサテライト不安定性(MSI-H)と関連している。そこで、発生部位(左側と右側)と進行度(正常、低リスク大腸腺腫、高リスク大腸腺腫、早期大腸癌、進行大腸癌)を考慮して、血中タンパク質と自己抗体のプロファイルを比較する。

#### (2) 高深度血漿タンパク質解析

上記のように発生部位と進行度別に、性・年齢をマッチさせて各群5例程度ずつ選び、等量の血漿を混合する。各血漿からProtein A/G Beadsを用いて免疫グロブリン複合体を回収し、さらにアルブミンなどの高含量タンパク質を取り除く。トリプシン消化後、定量ラベル試薬を反応させる。血漿タンパク質解析においては、バイオマーカー候補となりうる低濃度血中タンパク質の濃度は高含量タンパクの $1/10^7 \sim 1/10^8$ と極めて低い。本研究ではこの問題点を克服するため、分子診断TR分野で開発したペプチド分画システムによる大規模分画を行い、超高感度な定量的質量分析を実現する。

#### (3) 抗原-自己抗体複合体解析

血漿から回収された免疫グロブリンはすなわち抗原-自己抗体複合体である。これをトリプシン消化し、サンプル毎に質量分析を行い、免疫グロブリンに結合した抗原タンパク質を同定し、自己抗体プロファイルを得る。既存のアミノ酸シーケンスデータベースに基づくタンパク同定に加えて、データベース非依存性のde novoアミノ酸シーケンス解析を行い、遺伝子突然変異に由来するネオアンチゲンや、Long non-coding RNAにコードされるような、未知の免疫原性を有するペプチドの同定も試みる。これらのプロテオームデータと、The Cancer Genome Atlas (TCGA)などの公開されている大腸癌の遺伝子発現データを統合して解析し、大腸発癌のメカニズムに

関連したバイオマーカー候補の同定を行う。

#### (4) アッセイの確立と初期検証研究

バイオマーカー候補のタンパク質、自己抗体については、ELISA を用いた検出アッセイを確立し、初期検証を行う。バイオマーカーの初期検証研究として、血漿検体 150 例(正常対照、低リスク大腸腺腫、高リスク大腸腺腫、早期大腸癌、進行大腸癌各 30 例)を用いて、CEA など既存の大腸癌血液診断バイオマーカーとともにアッセイを行う。

#### 4. 研究成果

分子診断 TR 分野で開発されたペプチド分画システムによる大規模サンプル分画を応用した超高感度前処理プロトコルを用いた血漿低含量タンパク質画分の解析では、一つの解析当たり 800 個を超える低含量タンパク質が定量可能となった。高リスク大腸腺腫を含む大腸癌早期診断タンパク質バイオマーカーを同定するために、以下の血漿検体について、定量的プロテオーム解析を行った。

(1) コントロール、大腸腺腫 (10 mm 未満; 左側)、大腸腺腫 (10 mm 未満; 右側)、高リスク大腸腺腫、大腸側方発育型腫瘍(腺腫)、上皮内大腸癌、早期大腸癌(Stage I; 手術施行例)の 7 グループ。

(2) コントロールと、内視鏡切除を受けた高リスク大腸腺腫と Stage I 大腸癌をそれぞれ KRAS 変異の有無、発生部位(左側、右側)で分けた 9 グループ。

(1)、(2)の各グループは性・年齢をマッチさせた 10 例前後の症例から得られた血漿を等量混合したプール血漿である。興味深いことに、(1)の解析で得られた血漿低含量タンパク質プロファイルの主成分分析を行ったところ、病態に関連したクラスタリングがみられ、血漿低含量タンパク質プロファイルが、大腸腺腫から早期大腸癌における分子病態の違いを反映しており、有望なバイオマーカーとなりうることを示唆された(図 1A)。(2)の解析では、大腸癌で高発現している一群のタンパク質が切除後に正常と同レベルまで低下しており、高リスク大腸腺腫・Stage I 大腸癌由来のタンパク質で存在診断に有用なバイオマーカーと考えられた。一方、大腸特異的に発現し、腫瘍の内視鏡切除後も正常より高いレベルを維持する一群のタンパク質については、大腸癌のリスクの高い背景大腸粘膜由来のタンパク質で、高リスク者の絞り込みに有用なバイオマーカーとなりうると思われた(図 1B)。

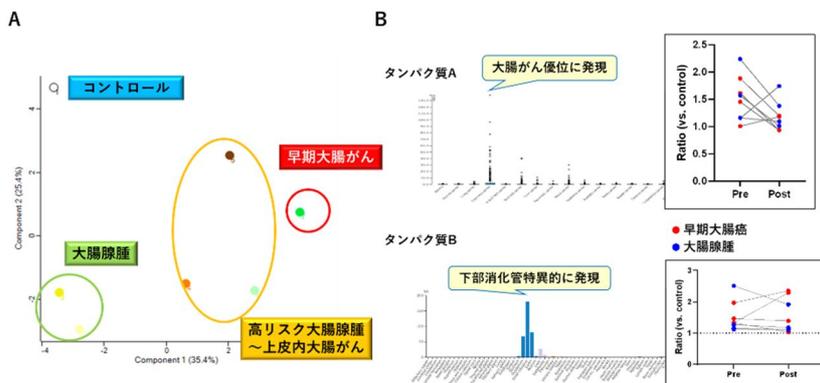


図 1 大腸癌血漿プロテオーム解析

これらのデータから、一群のタンパク質バイオマーカー候補を選択し、独立した血漿サンプル 150 例(正常対照、低リスク大腸腺腫、高リスク大腸腺腫、早期大腸癌、進行大腸癌各 30 例)を用いて、アッセイの初期検証を行った。AUC が 0.6 を上回ったバイオマーカーで予備的にバイオマーカーパネルの構築を行ったところ、正常 vs. 大腸腺腫 + 大腸癌では AUC 0.847 で、正常 vs. 大腸腺腫では AUC 0.918 と、いずれも CEA 単独の AUC (0.584、0.530) より有意に高く、大腸腺腫を含めた大腸がんの早期診断に有用であると考えられた。

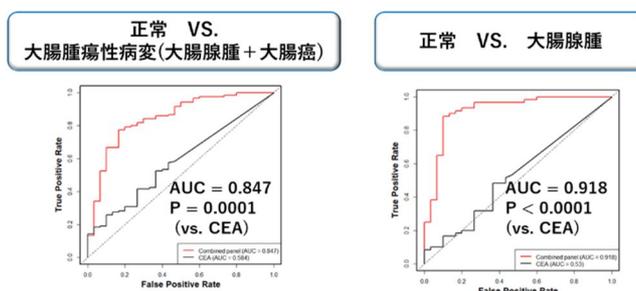


図 2 大腸癌早期診断バイオマーカーの初期検証

自己抗体結合抗原の解析については、当初のプロトコルでは、抗原 自己抗体複合体分画に含

まれる微量な抗原と多量に存在する免疫グロブリンを精度よく分離することができず、同定される抗原数は1検体当たり150個程度と十分な感度とは言えなかった。しかし、pH勾配液体クロマトグラフィーを応用して抗原を溶出することで、従来の7倍超の高感度化を達成して1,000個超の抗原同定が可能なハイスループット自己抗体結合抗原解析法を開発した(特願 2022-152089)(図3)。

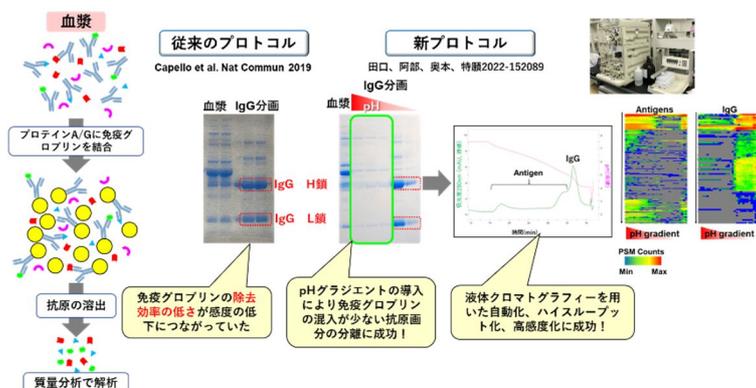


図3 血中抗原 自己抗体複合体の網羅的プロファイリング

現在、微量ながん抗原の血中動態を捉えるために、上記血漿プロテオーム解析に用いた同一の検体について解析を進めている。予備的な解析では、一群の大腸特異的なタンパク質が大腸癌由来血漿で正常対照由来血漿と比較して上昇しており、先行して自己抗体 ELISA アッセイの開発と初期検証を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuichi Abe, Hisanori Isomura, Zhou Shuang, Taisuke Kajino, Rui Yamaguchi, Waki Hosoda, Kazuo Hara, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 A proteogenomic approach for identification of novel IgG-bound antigens in pancreatic cancer
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth proteomics to decipher the complexity of the blood cancer proteome
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth Plasma Proteomics for Cancer Biomarker Discovery
3. 学会等名 HUP0 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口 歩、飯田琢也
2. 発表標題 がん早期診断に「光」を！
3. 学会等名 第10回光科学異分野横断萌芽研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部雄一, 磯村久徳, 田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合抗原の高深度プロテオーム解析による新規がんバイオマーカー探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯村 久徳、阿部雄一、山田啓策、大西祥代、田中努、山村健史、中村正直、島田昌明、田近正洋、藤城光弘、川嶋啓揮、田口 歩
2. 発表標題 血漿タンパク質と自己抗体の定量的プロファイリングによる大腸がん早期診断バイオマーカーの探索同定
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 血液バイオマーカーが拓く大腸がん検診の近未来
3. 学会等名 JDDW 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichi Abe, Hisanori Isomura, Koji Komori, Mitsuhiro Fujishiro, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Quantitative profiling of circulating proteins and autoantibodies for early detection of colorectal cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 雄一、磯村 久徳、田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合タンパク質の高深度プロテオーム解析と、新規がんバイオマーカー探索研究への応用
3. 学会等名 第42回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部雄一、磯村久徳、田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合タンパク質の高深度プロテオーム解析と、新規がんバイオマーカー探索研究への応用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 治樹、磯村 久徳、阿部雄一、山田啓策、田近正洋、田口 歩
2. 発表標題 高深度プロテオーム解析による大腸癌早期診断血液バイオマーカーの同定
3. 学会等名 コホート・生体試料支援プラットフォーム (CoBiA) 若手支援研究成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 光濃縮による血中がんバイオマーカーの超高感度測定法の開発および新規バイオマーカー探索
3. 学会等名 第48回光科学異分野横断セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 血液は何を語るのか：光濃縮によるがん早期診断への挑戦
3. 学会等名 LAC-SYS 研究所第3回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 クリニカルプロテオミクスが拓くがん研究の近未来
3. 学会等名 第53回藤田医科大学医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 血液バイオマーカーを用いた大腸がんの早期診断
3. 学会等名 第63回日本消化器がん検診学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗原分子の単離方法	発明者 田口 歩、阿部雄一、奥本泰秀	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-152089	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田口 歩  (Taguchi Ayumu)  (50817567)	愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR分野・分野長    (83901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関