

## 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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390114

研究課題名（和文） 多戦略的グライコプロテオミクスによる消化器癌のバイオマーカー開発と臨床応用

研究課題名（英文） Biomarker searches and clinical applications of gastrointestinal and hepatobiliary cancers by multidisciplinary approaches

研究代表者

野村 文夫（NOMURA FUMIO）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80164739

研究成果の概要（和文）：

血清の deep-proteome を探索し、新たな飲酒マーカー候補を同定した。発現プロテオーム解析に加えて、癌組織に高発現している蛋白質に対する血中自己抗体を検索した結果、血清 Ku86 抗体が早期の原発性肝細胞癌患者において従来の腫瘍マーカーよりも高い診断能を示すことを見出した。proximal fluids の一例として歯肉溝浸出液(GCF)を対象として歯周疾患患者のプロテオーム解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Novel biomarker for excessive drinking was determined by serum deep proteome analyses. In addition to expression proteomics, antibody against proteins overexpressed in cancer tissues were explored. Serum anti-Ku86 was found to be a potential early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Gingival crevicular fluid (GCF) was analyzed as a typical example of proximal fluids to search for biomarkers of periodontal diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：蛋白質・プロテオーム・癌・臨床・検査医学

### 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムシーケンス時代となり、ヒトの精密な生命活動や複雑な病態を理解するためのキーワードとしてエピゲノムとプロテオームが注目されている。発現しているすべての蛋白質を意味するプロテオームの解析技術は近年急速に進歩し、gel-based および gel-free の手法を駆使した解析が広く行われている。プロテオーム研究の成果はその

まま診断応用や治療標的の開発につながるため注目されてきた。しかし、蛋白質の発現量の解析だけでは不十分であり、糖鎖修飾を初めとする翻訳後修飾の検出など多角的なアプローチが重要であることが明らかになってきている。また、研究成果をいかに臨床検査に応用するかも課題である。消化器系悪性腫瘍の早期診断においては、各種画像診断、内視鏡診断を駆使した方法が主

体であり、血液・尿などの臨床検体を用いた従来の腫瘍マーカーによる早期診断には限界があるとされてきた。しかし、低侵襲性という点でバイオマーカーによる診断は魅力的であり、その可能性を追求するべきである。

近年のプロテオーム解析テクノロジーの進歩により、多くの新たな疾患マーカー候補が報告されている。申請者らは 2007 年～2009 年にわたる基盤研究 B「多戦略的プロテオーム・ペプチドーム解析による消化器癌の早期診断法の開発と実用化」に関する研究により、多重蛍光標識タンパク質発現ディフアレンス解析法 (2D-DIGE) を用いた原発性肝細胞がんの早期病理診断マーカーの開発 (Hepatology, 2008)、プロテインチップシステムを用いた膵臓がんの予後予測マーカー (Oncogene 2008) などの成果をあげてきた。

しかし、ゲノムに比べてはるかに情報量が多いプロテオームの解析においては、単なる発現量のみでの解析では不十分であり、糖鎖修飾をはじめとする翻訳後修飾を含めた多角的な解析も重要である。血清蛋白質の半数以上が何らかの糖鎖修飾をうけているとされる。したがって、近年の解析技術の進歩を活用し、グライコミクス、グライコプロテオミクスの手法を加えた多戦略的プロテオミクスが重要と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は最新のプロテオーム、グライコプロテオーム解析技術を取り入れ、血清試料だけでなく、病変部に近いいわゆる proximal fluids も対象として新たな疾患関連マーカーを探索することを第 1 の目的とする、一方、発現プロテオミクスによる腫瘍マーカー探索は特に早期がんの検出においては限界があると予想されるので、早期の癌化過程における蛋白質の発現の量的・質的变化を反映しうる血中自己抗体にも焦点をあてることとした。

## 3. 研究の方法

(1) Three-Step プロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証

アルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用いた。患者血清から Multi Affinity Removal Column (Agilent Technologies, CA, USA) を用い主要 6 タンパク質 (albumin, IgG, anti-trypsin, IgA, transferrin, haptoglobin) を除去した後、脱塩・濃縮後、HPLC により分画した 40 フラクシオンを SDS-PAGE を行い、銀染色した。タンパク質発現の違いを T 数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。

(2) 歯肉溝滲出液のプロテオーム解析による歯周疾患マーカーの探索

健常人 5 名、軽度～中等度歯周疾患 6 名、重度歯周疾患 5 名を GCF の採取対象とした。

臨床データを基にして GCF の採取部位を選択した。また質量分析精度向上のため唾液混入の可能性の少ない部位を優先した。GCF の採取にはペーパーポイントを用いた採取法を試みた。簡易防湿後、ペーパーポイントを歯肉縁下に 30 秒挿入した。挿入の深さは約 2mm 程度とした。その後ペーパーポイントを除去後、30 秒後に再び同一部位にペーパーポイントを 30 秒挿入。この操作を 10 回繰り返して 10 本採取した。得られたサンプルは直ちに  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保管した。

GCF のプロテオーム解析はアガロース二次元電気泳動法を用いたゲルベースの方法及びショットガン法によった。

(3) プロテオーム解析により見出された原発性肝細胞癌組織高発現蛋白質に対する血中自己抗体の診断的意義

対象は 2008 年 1 月から 2010 年 12 月の間に千葉大学医学部附属病院消化器内科を受診した計 113 名の C 型肝炎ウイルスに起因する HCC (Stage I, N=28 および Stage II, N=30 を含む)、143 名の C 型肝炎ウイルス関連肝硬変患者、50 名の慢性肝炎患者である。プロテオーム解析により肝癌組織において高発現している蛋白質に対する血中自己抗体の検出の有無を予備検討として行った結果より、血中 Ku86 抗体に焦点をあて、各種慢性肝疾患における同自己抗体の検出率を検討した。

## 4. 研究成果

(1) Three-Step プロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証

アルコール性肝硬変患者 8 名 (入院時・入院後 8 週間・計 16 サンプル) から Multi Affinity Removal Column を用い主要 6 タンパク質を除去した後、HPLC により分画した 40 フラクシオンを SDS-PAGE を行い、銀染色した。タンパク質発現の違いは Total Lab TL120 software で数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。その結果、 $p < 0.05$  と有意な違いを 27 バンドでみられた。24 バンドが入院時検体において入院 8 週間後検体に比して増加していたのに対し、3 バンドでは入院時に比し、入院 8 週間後に増加した。Mann-Whitney test により  $p < 0.01$  と有意に発現量の違いが見られた 6 バンドを同定した結果、入院時に増加していたバンドは、Alpha2-HS glycoprotein

(M.W. 35641, pI 5.20, Mascot Score 112, Sequence coverage 8%)、Apolipoprotein A-I (M.W. 28061, pI 5.27, Mascot Score 1049, Sequence coverage 70%)、Glutathione peroxidase 3 (M.W. 25489, pI 8.20, Mascot Score 82, Sequence coverage 6%)、Heparin cofactor II (M.W. 57034, pI 6.41, Mascot Score 161, Sequence coverage 5%)、Pigment epithelial-derived factor (M.W. 46300, pI

5.84, Mascot Score 491, Sequence coverage 22%) であり、入院後 8 週間に増加したバンドは、Apolipoprotein C-III (M.W. 8759, pI 4.72, Mascot Score 118, Sequence coverage 24%) であった (表 1)。これらのうち Pigment epithelial-derived factor (PEDF) のタンパク質発現量変化とアルコール性肝障害との関連性は報告されていないので、PEDF に関してさらに検討した。飲酒マーカー探索に用いたアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用い、PEDF の蛋白発現量変化をウエスタンブロット法で検証した。入院時と断酒 8 週間後では、 $7.68 \pm 0.15$  vs  $6.08 \pm 0.16$  ( $p < 0.05$ ) と有意な違いが認められた (図 1)。入院時の  $\gamma$ -GTP は 2 症例で正常域にとどまり、

Spot No.	ID	M.W.	pI	Score	sequence Coverage
1	Alpha2-HS glycoprotein	35641	5.20	112	8%
2	Apolipoprotein A I	28061	5.27	1409	70%
3	Apolipoprotein C III	8759	4.72	118	24%
4	Glutathione peroxidase 3	25489	8.20	82	6%
5	Heparin cofactor II	57034	6.41	161	5%
6	Pigment epithelial-differentiating factor	46300	5.84	491	22%

表 1

いわゆる non-responder と考えられたが、これら 2 症例においても変化が認められた。

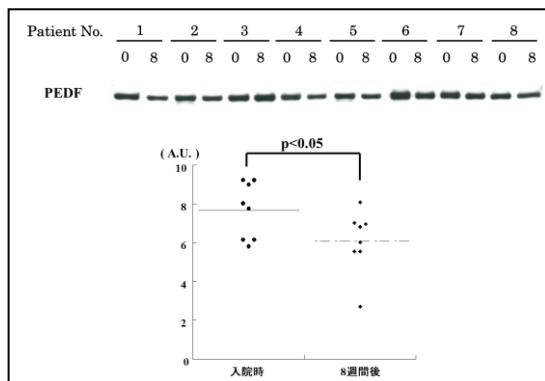


図 1

(2) 歯肉溝滲出液のプロテオーム解析による歯周疾患マーカーの探索

健康人 5 名より得られた GCF と歯肉辺縁唾液をアガロース 二次元電気泳法で比較した。GCF に高発現している 8 つのスポットを検出した (図 2)。続いてこのスポットのタンパク

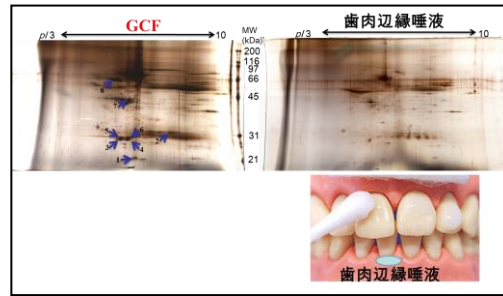


図 2

Spot number <sup>a)</sup>	Protein name	MW <sup>b)</sup>	pI <sup>c)</sup>	Score <sup>d)</sup>	Sequence coverage <sup>e)</sup>	MS/MS <sup>f)</sup> (Unique)	Fold increase <sup>e)</sup>
1	HP Haptoglobin precursor	46693	6.28	118	7%	4	1.58
2	SOD1 Superoxide dismutase	15926	5.7	61	9%	1	1.51
		45130	5.77	75	3%	1	
3	IGL@ IGL@ protein	24777	5.93	52	8%	1	1.77
		APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	557	50%	
4	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	713	41%	11	1.77
		IGK@ IGK@ protein	25757	5.94	204	28%	
5	DCD Dermcidin precursor	11277	6.08	74	10%	1	1.73
		APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	571	41%	
6	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	392	43%	11	1.75
		IGKV1-5 IGKV1-5 protein	26218	6.3	136	15%	
7	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin precursor	46707	5.37	241	18%	7	1.62
		IGHV3OR16-13	53054	6.46	136	8%	
8	ALB Uncharacterized protein ALB	71658	6.33	151	9%	6	1.61

表 2

質同定をおこなった。これらのスポットからは ApoA-I, 酸化ストレスに関与するタンパク質 SOD1 および抗菌ペプチド DCD が同定された (表 2)。健常人 GCF のショットガン法による網羅的解析を行ったところ、327 のタンパク質が同定された。また、同定された GCF 中のタンパク質の機能を Gene Ontology により解析した。GCF 中には歯肉線維芽細胞と比較すると刺激応答の機能を司るタンパク質や免疫応答に関与するタンパク質が歯肉線維芽細胞より多数含まれていることが明らかになった (図 3)。このことから GCF には歯周疾患に関与するタンパク質が数多く存在する事が示唆された。同定された 327 のタンパク質には歯周組織破壊に関与していると思われるタンパク質、細胞骨格系タンパク質、免疫系に関与するタンパク質等が含まれていた。

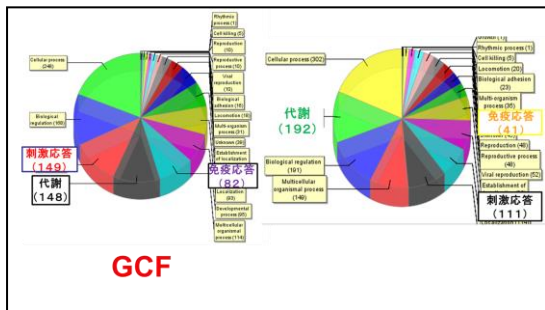


図 3

(3) プロテオーム解析により見出された原発性肝細胞癌組織高発現蛋白質に対する血中自己抗体の診断的意義

図 4 に健常人、肝硬変 (LC)、HCC、慢性肝炎 (CH) 血中 Ku86 抗体レベルを示した。

健常人、慢性肝炎、肝硬変に比し HCC において Ku86 抗体は明らかに高値を示した。また、従来から HCC の腫瘍マーカーとして測定されている AFP、PIVKA-II と Ku86 抗体の陽性率を比較すると Stage I、Stage II いずれにおいても Ku86 抗体の陽性率が最も高かった (図 5A)。ROC 曲線においても Ku86 抗体の優位性を確認することができた (図 5B)。

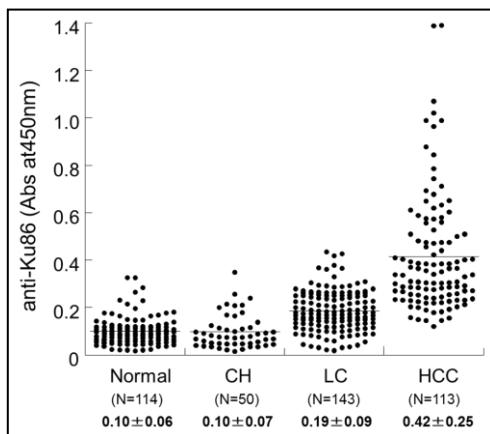


図 4

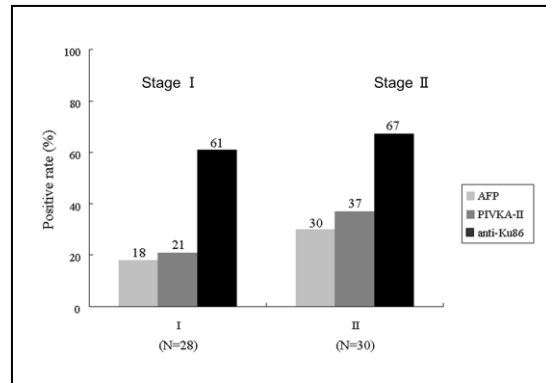


図 5A

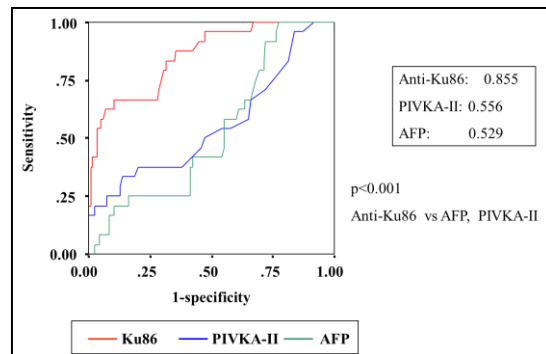


図 5B

## 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 18 件) すべて査読あり

1. Yamada M, Satoh M, Seimiya M, Sogawa K, Itoga S, Tomonnaga T, Nomura F. Combined Proteomic Analysis of Liver Tissue and Serum in Chronically Alcohol-Fed Rats. Alcohol Clin Exp Res. 37 Suppl 1:E79-87. (2013)
2. Katada K, Tomonnaga T, Satoh M, Matsushita K, Tonoike Y, Kodera Y, Hanazawa T, Nomura F, Okamoto Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. J Proteomics. 75(6):1803-15. (2012).
3. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Kodera Y, Matsushita K, Nomura F. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. Proteomics. 12(13):2190-202. (2012)
4. Kikkawa S, Sogawa K, Satoh M,

- Umemura H, Kodera Y, Matsushita K, Tomonnaga T, Miyazaki, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a Novel Biomarker for Biliary Tract Cancer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int J Proteomics*. 108609. (2012)
5. Guo F, Hiroshima K, Wu D, Satoh M, Abulazi M, Yoshino I, Tomonnaga T, Nomura F, Nakatani Y. Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: its expression and possible clinical significance. *Hum Pathol*. 43(8):1282-8. (2012)
  6. Kimura A, Sogawa K, Satoh M, Kodera Y, Yokosuka O, Tomonnaga T, Nomura F. The application of a three-step serum proteome analysis for the discovery and identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Int J Proteomics*. 623190. (2012)
  7. Abulaizi M, Tomonnaga T, Satoh M, Sogawa K, Matsushita K, Kodera Y, Obul J, Takano S, Yoshitomi H, Miyazaki M, Nomura F. The application of a three-step proteome analysis for identification of new biomarkers of pancreatic cancer. *Int J Proteomics*. 2011;2011:628787.
  8. Yano T, Sogawa K, Umemura H, Sakao S, Kasahara Y, Tanabe N, Kodera Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Nomura F. Serum Level of Fibrinogen A $\alpha$  Chain Fragment Increases in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ J*. 2011 Oct 25;75(11):2675-82.
  9. Kadowaki M, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Yoshitomi H, Takano S, Sogawa K, Umemura H, Fushimi K, Nakatani Y, Nomura F, Miyazaki M. Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Jul;137(7):1105-15
  10. Sogawa K, Kodera Y, Noda K, Ishizuka Y, Yamada M, Umemura H, Maruyama K, Tomonnaga T, Yokosuka O, Nomura F. The measurement of a fibrinogen  $\alpha$  C-chain 5.9kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12;412(11-12):1094-9.
  11. Umemura H, Togawa A, Sogawa K, Satoh M, Mogushi K, Nishimura M, Matsushita K, Tanaka H, Takizawa H, Kodera Y, Nomura F. Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis. *J Gastroenterol*. 2011 May;46(5):577-85.
  12. Noda K, Sogawa K, Kikuchi W, Kiyokawa I, Miura T, Kojima R, Katayama K, Kodera Y, Nomura F. Development of a sandwich ELISA for the 5.9-kDa fibrinogen alpha C chain fragment detected by serum proteome analysis. *Proteomics Clin Appl*. 2011 Apr;5(3-4):141-6.
  13. Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. Increased Serum Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor by Excessive Alcohol Consumption-Detection and Identification by a Three-Step Serum Proteome Analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Feb ; 35(2):211-7.
  14. Yahiro K, Satoh M, Morinaga N, Tsutsuki H, Ogura K, Nagasawa S, Nomura F, Moss J, Noda M. Identification of Subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun*. 2011 Feb ; 79(2):617-27.
  15. Umemura H, Kodera Y, Nomura F. Effects of humidity on the dried-droplet sample preparation for MALDI-TOF MS peptide profiling. *Clin Chim Acta*. 2010 Dec 14;411(23-24):2109-11.
  16. Ritchie SA, Heath D, Yamazaki Y, Grimmalt B, Kavianpour A, Krenitsky K, Elshoni H, Takemasa I, Miyake M, Sekimoto M, Monden M, Tomonnaga T, Matsubara H, Sogawa K, Matsushita K, Nomura F, Goodenowe DB. Reduction of novel circulating long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age. *BMC Gastroenterol*. 2010 Nov 29;10:140.
  17. Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M.

Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. Br J Cancer. 2010 Jul 13;103(2):223-31.

18. Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonnaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T, Koderu Y. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. J Proteome Res. 2010 Apr 5;9(4):1694-705.

[学会発表] (計 8 件)

1. 土田 祥央、佐藤 守、曾川 一幸、川島 祐介、荷堂 清香、澤井 撰、西村 基、小寺 義男、松下一之、野村 文夫. 歯肉溝滲出液のプロテオーム解析による歯周疾患マーカーの探索. 第 19 回日本遺伝子診療学会大会、2012 年 7 月 28 日、三井ガーデンホテル千葉.
2. Nomura F, Sogawa K, Noda K, Seimiya M, Matsushita K, Tomonnaga T, Yokosuka O. DIAGNOSTIC VALUE OF SERUM ANTI-KU86 LEVELS IN THE EARLY DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS-RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2011. 5,Nov,2011. San Francisco, USA
3. 三橋暁、パストゥラル エロディ、山崎泰代、リッティアー ショーン、曾川一幸、生水真紀夫、野村文夫、グッデナウ ダイアン. 卵巣癌に特異的な代謝プロファイルの同定. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011 年 10 月 4 日. 名古屋国際会議場
4. Noda K, Kikuti W, Kiyokawa I, Miura T, Kojima R, Katayama K, Sogawa K, Nomura F. SERUM FIC5.9 LEVELS AS A PROMISING BIOMARKER FOR DETECTING LIVER PATHOLOGIES. HUPO 10<sup>th</sup> Annual World Congress. 5 Sep 2011. Geneva, Swiss
5. 佐藤守、高野重紹、石橋真澄、吉富秀幸、西村基、曾川一幸、松下一之、賀川真吾、荷堂清香、宮崎勝、野村文夫. ジェムシタピン耐性ヒト膵癌細胞株のプロテオーム解析. 第 9 回日本人プロテオーム機構大会. 2011 年 7 月 28 日. 朱鷺メッセ (新潟)
6. 野村文夫. プロテオーム解析による肝疾患の新たなバイオマーカーの探索と臨床応用. BMB2010. 2010 年 12 月 7 日. 神戸
7. 野村文夫. Comprehensive proteome

analysis in search for biomarkers of hepatocellular carcinoma and its high-risk group. 第 69 回日本癌学会. 2010 年 9 月 24 日. 大阪

8. 野村文夫. プロテオーム解析により見出された肝疾患の新しいバイオマーカー. 第 10 回日本蛋白質科学会. 2010 年 6 月 8 日. 札幌

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

野村 文夫 (NOMURA FUMIO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 80164739

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)  
独立行政法人医薬基盤研究所・基盤的研究部  
プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー  
研究者番号: 80227644  
小寺 義男 (KODERA YOSHIO)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号: 60265733  
松下一之 (MATSUSHITA KAZUYUKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 90344994  
曾川 一幸 (SOGAWA KAZUYUKI)  
麻布大学・生命・環境科学部・講師  
研究者番号: 50436440