

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6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501030

研究課題名（和文） 早期乳癌の診断に有用な新規腫瘍マーカーの探索研究及び簡易アッセイ系の開発

研究課題名（英文） Exploratory research on new tumor markers that are useful for a diagnosis of the early breast cancer and development of a simplified assay system

研究代表者

黒野 定（KURONO SADAMU）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：20271554

研究成果の概要（和文）：採取した乳頭分泌液（ND）及び乳頭吸引液様（NAF 様）検体中のタンパク質を二次元ナノ LC-MS/MS を用いて測定し、マーカー候補タンパク質の網羅的な同定及び発現量の相対定量解析を行い、得られた結果を種々の統計的手法によって解析し、マーカー候補として15種のタンパク質を絞り込んだ。更に、病理組織での発現及び ELISA 法についても検討を行い新腫瘍マーカー候補を確定した。

研究成果の概要（英文）：We measured proteome in nipple discharge (ND) and nipple aspirate fluid like (NAF-L), which were collected from breast cancer and non-cancer patients, using two dimensional nano-LC-nanoelectrospray mass spectrometry (ESI-MS), and then 15 kinds of proteins were found as breast cancer candidate markers by various kinds of statistical technique. Furthermore, we have examined the expression of such protein candidate markers using histological stain and ELISA methods for validating as new breast cancer markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：腫瘍マーカー、プロテオミクス、乳癌、乳頭分泌液

1. 研究開始当初の背景

我が国の乳癌死亡者数は年々増加の一途を辿っており、ここ50年間で約7倍も増加

し、2008年には約1万1千人が死亡している。現在では年間約4万人もの女性が乳癌に罹患していると推定され、発症年齢は欧米と

異なり40歳前後から急激に増加している。特に30歳から64歳の壮年・中年層では乳癌が女性がん死亡原因の第1位となっており、乳癌罹患率でも40歳から64歳では1位、25歳から39歳では2位である。乳癌は他のがんと比べ腫瘍の成長する速度が遅いため、早期に発見し適切な処置を行えば完治するケースが多く、5年生存率も高いことが報告されている。また、乳癌腫瘍の大きさが小さいうちに手術を行えば、最近では乳房温存手術も大変進歩しており、昔のように乳房を取り去るケースは減ってきている。何よりも「早く・正確に」乳癌が初期の段階で発見・診断される事が大変重要と考えられる。

このように、より早くより正確な早期乳癌診断法を確立することは国家の急務であるが、現状のマンモグラフィーによる診断では数mm以下の大きさの腫瘍は検出が困難であり、乳腺密度が高い若年層の場合は更に困難となっている。

2. 研究の目的

上記現状のもと、本研究は日本人（アジア人）に特徴的な閉経前若年層の早期乳癌診断法を、腫瘍発症（発見）以後の予後診断としてではなく、「予防診断」という観点から方法論の確立を目指す。それには、まだまだ有用なマーカーが見出されていない早期乳癌の腫瘍マーカーの探索とその診断システムの確立が強く望まれている。早期乳癌腫瘍マーカーによる診断が可能になれば早期乳癌が組織に浸潤する前に対処することが可能となり、近年増加の著しい若い世代での乳癌死亡率の低減に大きく貢献できるものと期待している。

そこで我々は、乳癌発症部位である乳管内の情報を直接得ることができる乳頭吸引液様（NAF様）及び乳頭分泌液（ND）を検体とし、最新の液体クロマトグラム/質量分

析システムによるプロテオミクスを臨床応用することによって、新規な早期乳癌腫瘍マーカータンパク質の探索と、それらの簡易アッセイ系を開発することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検体の採取及びタンパク質の網羅的な同定解析

①乳腺検診及び乳癌治療者を対象に研究協力者（検体採取実施4医療機関）側によって匿名化された後に必要な検体情報と共に研究代表者側に手渡される。

②マーカー探索は近年タンパク質の同定数を飛躍的に高めることが報告されている二次元（逆相(ODS)塩基性/逆相(ODS)酸性）ナノLC-MS/MS手法を使用し、検出されたタンパク質のデータ集積を行うと共にタンパク質同定解析を実施する。

(2) 早期乳癌腫瘍マーカー候補タンパク質の選択及び妥当性の検証

①上記(1)により同定されたタンパク質の中から、早期乳癌に特徴的な発現差異を有するタンパク質を選択する。選択方法としては、検体間、主に、乳癌患者と非乳癌者（乳癌未確定者）間でタンパク質発現を比較した際に、発現強度比が有意な差で現れたタンパク質を選択する。

②選択されたタンパク質を種々の統計的手法によって解析し第一次マーカー候補として絞り込み、さらに、病理組織との相関についても検討し新腫瘍マーカーを確定する。

(3) 簡易アッセイ系の構築

確定した新腫瘍マーカータンパク質について2種のモノクローナル抗体でのサンドイッチ系を見出し、EIA法を確立する。

4. 研究成果

採集した計100検体の内26検体（非乳癌者検体14及び乳癌患者検体12）からタ

ンパク質を抽出し、二次元ナノ LC-ESI(electrospray ionization)-MS/MS 手法を用いてタンパク質発現差異の比較検討を行った。その結果、乳癌患者検体からより多く検出されたタンパク質 15 種を第一次マーカー候補として同定した。実用化をにらんで、平成 24 年 9 月 5 日に特許出願を行った(出願番号:特願2012-194804号、発明の名称:乳癌の判定方法)。これらのタンパク質は ND や NAF 様中に含まれていることから、これらのタンパク質のいくつかをターゲットとする乳癌診断マーカーキットを構築することにより、より非侵襲な乳癌診断の道を切り開くことが可能となり、乳癌診断受診率の向上、延いては、乳癌死亡率の低下に大いに貢献できるもとを考えている。

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 5 件)

① Kurono, S., Kaneko, Y., and Niwayama, S. 2013. Quantitative protein analysis using ¹³C₇-labeled iodoacetanilide and d₅-labeled N-ethylmaleimide by nano liquid chromatography/nanoelectrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有、**23**: 3111-3118.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.02.112

② Nishibu, T., Hayashida, Y., Tani, S., Kurono, S., Kojima-Kita, K., Ukekawa, R., Kurokawa, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Inoue, K., and Honda, S. 2012. Identification of MIWI-associated Poly(A) RNAs by immunoprecipitation with an anti-MIWI monoclonal antibody. *Biosci. Trends* 査読有、**6**: 248-261.

DOI: 10.5582/bst.2012.v6.5.248

③ Miki, T., Kamikawa, Y., Kurono, S., Kaneko, Y., Katahira, J., and Yoneda, Y. 2011. Cell type-dependent gene regulation by Stauf2 in conjunction with Upf1. *BMC Mol. Biol.* 査読有、**12**: 48.

DOI: 10.1186/1471-2199-12-48

④ Yamazaki, A., Tatsumi, M., Bondarenko, V. A., Kurono, S., Komori, N., Matsumoto, H., Matsuura, I., Hayashi, F., Yamazaki, R. K., and Usukura, J. 2010. Mechanism for the regulation of mammalian cGMP phosphodiesterase6. 2: Isolation and characterization of the transducin-activated form. *Mol. Cell. Biochem.* 査読有、**339**: 235-251.

DOI: 10.1007/s11010-010-0404-y

⑤ Yamazaki, A., Bondarenko, V. A., Matsuura, I., Tatsumi, M., Kurono, S., Komori, N., Matsumoto, H., Hayashi, F., Yamazaki, R. K., and Usukura, J. 2010. Mechanism for the regulation of mammalian cGMP phosphodiesterase6. 1: Identification of its inhibitory subunit complexes and their roles. *Mol. Cell. Biochem.* 査読有、**339**: 215-233.

DOI: 10.1007/s11010-010-0387-8

[学会発表] (計 10 件)

① Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., and Niwayama, S. "An Attempt to Quantitative Analysis for Clinical Proteomics by Nano LC-nano-ESI-SRM-MS Using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide as well as N-Ethylmaleimide." *19th International Mass Spectrometry Conference*, Kyoto, Japan, 2012. 9. 20.

② Kaneko, Y., Kurono, S., Matsuura, S., and Matsuura, N. “Protein Profile Analysis for Potential Breast Cancer Markers in Nipple Discharge by Nano-LC-ESI-Mass Spectrometry.” *HUPO 11th Annual World Congress*, Boston, MA, USA, 2012. 9. 10.

③ 黒野 定, 金子有香, 松浦脩治, “腫瘍(診断) マーカー探索における二次元 LC/MS の活用とその効果,”第5回日本質量分析学会北海道談話会・講演会, 札幌, 2012. 7. 12 (招待講演).

④ 黒野 定, “腫瘍(診断) マーカー探索における二次元 LC/MS の活用とその効果,”第1回教育研究推進セミナー講演会, 旭川, 2012. 7. 11 (招待講演).

⑤ Kaneko, Y., Kurono, S., and Matsuura, S. “Proteomic Analysis of Potential Breast Cancer Markers in Nipple Discharge by Two-dimensional Nano-LC-ESI-Mass Spectrometry.” *The 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, Vancouver, Canada, 2012. 5. 22.

⑥ Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., and Niwayama, S. “Quantitative Analysis for Clinical Proteomics by nano LC-nano-ESI-SRM-MS Using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide.” *The 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, Vancouver, Canada, 2012. 5. 22.

⑦ 黒野 定, 金子有香, 松浦脩治, “ナノ LC-ESI-IT-MS による臨床検体を用いたプロテオーム解析から見えてくること,”第36回日本医用マススペクトル学会年会, 吹田, 2011. 9. 16 (招待講演) (要旨集 : p. 39).

⑧ 黒野 定, “臨床検体を用いたプロテオーム解析によるバイオマーカー探索の試み—方法論を中心として—,”2011年 第2回 TMS 研究会講演会, 横浜, 2011. 9. 3 (招待講演) (要旨集 : p. 17-26).

⑨ Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., and Niwayama, S. “Identification and Quantitative Analysis for Clinical Proteomics by LC-ESI/MS Using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide.” *The 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, Denver, CO, USA, 2011. 6. 7.

⑩ Kurono, S., Kaneko, Y., and Niwayama, S. “An Attempt to Quantitative Analysis for Clinical Proteomics by Liquid Chromatography/ESI-Ion Trap MS Using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide.” *The 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, Salt Lake City, UT, USA, 2010. 5. 25.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称 : 乳癌の判定法
発明者 : 松浦脩治、松浦成昭、黒野 定、中嶋智之
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : 特願 2013-035521 号
出願年月日 : 平成 25 年 2 月 26 日
国内外の別 : 国内

②名称 : 乳癌の判定方法
発明者 : 松浦脩治、松浦成昭、黒野 定、金子有香
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : 特願 2012-194804 号
出願年月日 : 平成 24 年 9 月 5 日
国内外の別 : 国内

6. 研究組織
(1) 研究代表者

黒野 定 (KURONO SADAMU)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准
教授
研究者番号：20271554

(2) 研究分担者

檜枝 美紀 (HIEDA MIKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号：00380254

(3) 連携研究者

松浦 脩治 (MATSUURA SHUJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号：90142322