

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650617

研究課題名（和文） HSP72 結合解析による多発性骨髄腫腫瘍マーカーの開発

研究課題名（英文） The search for diagnostic biomarkers of multiple myeloma by the identification of Hsp72-binding proteins

研究代表者

岩尾 洋（IWAO HIROSHI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00137192

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫の腫瘍マーカーを探索するために、血液中の熱ショックタンパク質（Hsp72）複合体の単離・同定システムを開発した。本法は、血清の前処理を必要とせず、短時間に血中微量タンパク質の単離を可能にした。患者血清を用いて微量タンパク質の単離・同定を行った結果、44種類のタンパク質を同定した。さらに株化細胞を用いた確認実験により、4つの腫瘍マーカー候補を選抜した。

研究成果の概要（英文）：Multiple myeloma (MM) is a malignant disorder of the hematopoietic organ and it is difficult to determine stage. Therefore, the novel diagnostic markers with high sensitivity to staging are desired. Heat shock protein 72 (Hsp72) was reported to be secreted from tumor cells and elevated in the sera of MM patients. It is also known that secreted Hsp72 were bound with other proteins and peptides. To explore an efficient biomarker we attempted to isolate and identify Hsp72-complexes from the serum of the MM patient. Nine clones of anti-Hsp72 monoclonal antibodies were conjugated with NHS-activated sepharose beads, and which were named as NHq. Hsp72 complexes in the sera were isolated by using the batch method with NHq, followed by identification of LC/MS/MS analysis.

The NHq methods identified 86 proteins in which 44 unique proteins detected in patients except in healthy subjects. Furthermore, a comparative analysis of Hsp72-complexes, which were isolated from both the conditional medium and the cell lysate of MM cells, was performed. Of 44 proteins detected in patients, 4 proteins were verified within vitro profiling. These results suggest that the NHq method can be applied to discover the candidates of biomarkers for MM.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

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

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は予後不良の造血器悪性疾患で治癒を期待できる治療法がなく、治療の目標は患者の生活の質（QOL）を維持した長期生存となる。よって腫瘍の悪性度や進行度

を正確に反映し、治療介入時期を決定する上でも的確なバイオマーカーが必要とされている。

近年、シャペロン分子として機能するHsp72が細胞外へ分泌されることが報告さ

れた。この分泌型 Hsp72 は腫瘍特異抗原に結合したまま血中に放出され、抗原提示細胞を介して免疫系を惹起することも明らかにされている。つまり、悪性腫瘍患者血清中の分泌型 Hsp72 と結合するタンパク質の中には腫瘍由来の抗原分子が含まれている可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

多発性骨髄腫患者血清中の分泌型 Hsp72 に注目し、Hsp72 と結合する分子を同定し、骨髄腫の特性を強く反映した腫瘍マーカーを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 多発性骨髄腫腫瘍マーカーの探索

#### ① Hsp72 アフィニティービーズを用いた血清の精製

血清中に含まれる Hsp72 複合体を精製するために申請者がこれまでに作製した抗 Hsp72 モノクローナル抗体を共有結合させた NHS-activated Sepharose (NHq と命名) を作製した。多発性骨髄腫患者および健康人血清は NHq を用いたバッチ法にてアフィニティー精製した。まず、使用ビーズの量、血清量をはじめ反応系の至適化し、精製サンプルを SDS-PAGE で展開し銀染色を行うことで実験系の評価を行った。健康人血清、患者血清で差異が認められるか評価した。

#### ② 腫瘍マーカー候補タンパク質の同定

①で精製したサンプルに含まれる全タンパク質を Q-TOF 型質量分析計にてショットガン分析法を用いて同定した。得られた結果の解析は ProteinPilot にて NCBI 提供のヒトデータベースと照合し、Hsp72 結合タンパク質を同定した。

#### ③ 同定タンパク質の確認

血液中で同定したタンパク質が多発性骨髄腫細胞由来であるかを検証するために多発性骨髄腫の株化細胞 (RPMI8226, KMS-12-PE) を用いて NHq による精製を行い、同様にプロテオーム解析した。血清中に見出された Hsp72 結合分子と比較することで、腫瘍マーカー候補分子を選抜した。

#### (2) 多発性骨髄腫腫瘍マーカーの候補分子の検証

健康人および多発性骨髄腫患者血清を NHq にて精製し、同定した腫瘍マーカー候補タンパク質の発現をウェスタンブロット法にて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 多発性骨髄腫腫瘍マーカーの探索

#### ①血清からの Hsp72 結合タンパク質の精製

血清中の Hsp72 複合体をアフィニティー精製するために、HSP72 モノクローナル抗体作製し、9 種類をスクリーニングにて選抜した。これらを NHS-activated Sepharose に結合させ、NHq と命名した。血清の精製を行う

ための NHq アフィニティー精製の至適条件の検討を行い、血清からの微量タンパク質抽出精製法を確立した。本システムは血清の前処理を必要とせず、1 時間で血清より微量タンパク質を単離できる画期的な方法であり、特許申請した (特願 2011-169552 号、図 1)。

健康人、患者で血中 HSP72 量に大きな変化は認めなかった。一方で、結合分子を SDS-PAGE にて展開し、銀染色した結果、30 kD

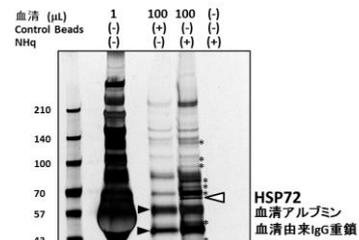
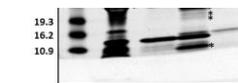


図 1 NHq による血中微量タンパク質の単離



以下の低分子量領域のパターンが患者群で大きく変化していることがわかった (図 2)。同定分子をショットガン法にてプロテオーム解析し、同定分子を GO term の cell component に基づいて分類したところ、45% が細胞内タンパク質であった。

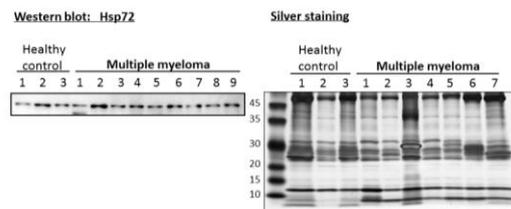


図 2 血中 Hsp72 結合分子の健康人、患者間比較

#### ② 腫瘍マーカー候補タンパク質の同定

本系を用いて健康人 2 名、患者 4 名の血清を用いてマーカー候補タンパク質の探索を試みた。86 の同定タンパク質を Gene Ontology を用いて生物学的プロセスに基づいて分類した結果、患者血清中には健康人には見られないタンパク質分解系分子、アポトーシス関連分子、リン酸化酵素、翻訳関連分子というカテゴリーに分類される分子がみられた。さらに細胞周期、シグナル伝達関連分子に分類される分子群が患者血清中で増加していることがわかった。同定分子の大半はこれまでに血液中での存在が報告されていないものであり、本法の有効性を示している。さらに健康人にはなく、患者特異的に同定される分子を 44 種類見出した。

#### ③ 同定タンパク質の確認

これらのタンパク質が多発性骨髄腫由来であることを確かめるために、多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226, KMS-12-PE) の細胞溶解液及び培養上清を用いて同様に NHq によるアフィニティー精製を行い、Hsp72 結合分子を質量分析により同定した。その結果、4つの分子が培養液中、血液中に共通して見出された。これらのタンパク質は multifunction, development, organization, cell cycle といった GO term の分子であった (表 1)。いずれも細胞外での機能や、分泌が知られていない分子であった。本成果は腫瘍マーカー候補分子として特許申請した (特願 2013-45581 号)。

表 1 4つの腫瘍マーカー候補分子

## (2) 多発性骨髄腫腫瘍マーカーの候補分子の検証

| No. | Biological process | MW (kD) | Multiple myeloma cell |           |
|-----|--------------------|---------|-----------------------|-----------|
|     |                    |         | RPMI8226              | KMS-12-PE |
| 1   | multi function     | 3200    | ○                     | -         |
| 2   | development        | 62.9    | -                     | ○         |
| 3   | organization       | 11.4    | ○                     | ○         |
| 4   | cell cycle         | 110     | -                     | ○         |

これらのうちの cell cycle 関連分子に着目して更なる検証をすすめた。KMS-12-PE 株を用いて細胞内、細胞外での本分子の発現解析を行った結果、本分子は細胞内でフラグメント化されていること、そのフラグメントが培養上清中で HSP72 と結合していることが明らかとなった。全長のサイズの分子は培養上清中には存在しなかった。そこで、患者血清を NHq 精製し、本抗体にてウエスタンブロットしたところ、患者血清 9 例中 3 例で本分子を認め (図 3)。健康者血清中には本分子は見いだせなかった。したがって、本分子は多発性骨髄腫の有力な腫瘍マーカーとなりうることが示唆された。

以上より、従来の血清プロテオミクスの最大の懸案事項であった血中微量タンパク質

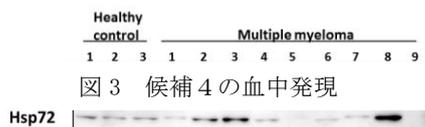


図 3 候補 4 の血中発現

単離に成功し、多発性骨髄腫腫瘍マーカー候補の選抜に成功した。本課題によって得られた結果は単に一疾患の腫瘍マーカーの同定に留まらず、血清プロテオミクスのブレークスルーになりうる点で意義深い。今後、他の癌種を含めて、他の疾患への適用を検討して

いきたい。

## 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 2 件)

- ① Shiota M, Hikita Y, Kawamoto Y, Kusakabe H, Tanaka M, Izumi Y, Nakao T, Miura K, Funae Y, Iwao H. Pravastatin-induced proangiogenic effects depend upon extracellular FGF-2, *J Cell Mol Med*. 査読有, 16, 2012, 2001-2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01494.x.
- ② Tanaka M, Shiota M, Okada S, Harada A, Odawara J, Mun S, Iwao H, Ohkawa Y. Generation of a rat monoclonal antibody specific for hsp72. *Hybridoma (Larchmt)*. 査読有, 30, 2011, 397-400, doi: 10.1089/hyb.2011.0015.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 西智史、田中昌子、植村遼、中尾隆文、大川恭行、鰐淵英機、泉康雄、三浦克之、塩田正之、岩尾洋 血中 Hsp72 結合分子を同定し、多発性骨髄腫に対する新規診断マーカーを探索する、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡国際会議場
- ② 植村遼、田中昌子、西智史、川口真紗子、大川恭行、鰐淵英機、泉康雄、三浦克之、塩田正之、岩尾洋 疾患プロテオミクスのための血中 HSP72 結合分子の単離、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡国際会議場
- ③ 田中昌子、塩田正之、高橋克之、山形雅代、雪村時人、鰐淵英機、岡真優子、泉康雄、三浦克之、岩尾洋 HSC70-targeted proteomics revealed the association of RAB1A with stress response in cancer cells. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日、福岡国際会議場
- ④ 岩尾洋 アンジオテンシン II によるエキソソームへの影響、第 42 回日本心臓血管作動物質学会、2013 年 2 月 8 日、奈良県立新公会堂
- ⑤ 泉康雄、中村泰浩、山崎貴紀、高橋延吉、岡真優子、塩田正之、三浦克之、岩尾洋 ラット心筋梗塞急性期に対するバソプレシン V2 受容体拮抗薬の効果、第 22 回日本循環薬理学会、2012 年 11 月 30 日、富山国際会議場
- ⑥ 岡真優子、西山方規、泉康雄、塩田正之、三嶋梨花、三浦克之、岩尾洋 心血管障害におけるエキソソームの役割、第 122 回日本薬理学会近畿部会、2012 年 11 月 16 日、千里ライフサイエンスホール
- ⑦ 田中昌子、塩田正之、三嶋梨花、下條真未、

岡田麻代実、高橋克之、山形雅代、岡真優子、泉康雄、雪村時人、三浦克之、岩尾洋 分子シャペロン Hsc70 を標的とした癌のストレス応答分子同定法の確立、第 121 回日本薬理学会近畿部会、2012 年 06 月 29 日、あわぎんホール

⑧塩田正之、田中昌子、岩尾洋 HSP70s 結合分子を標的とした抗がん剤創薬戦略、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、京都国際会議場

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：形質細胞性腫瘍を検出するための方法、キット及びマーカー

発明者：塩田正之、岩尾洋、田中昌子、植村遼、西智史

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：特願 2013-45581 号

出願年月日：2013 年 3 月 7 日

国内外の別：国内

名称：分子シャペロン結合分子を標的とした血中タンパク質の高効率同定システム

発明者：塩田正之、岩尾洋

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：特願 2011-169552 号

出願年月日：2011 年 8 月 2 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩尾 洋 (IWAO HIROSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00137192

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

塩田 正之 (SHIOTA MASAYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30381990