

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4月23日現在

機関番号： 15501
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23701100
 研究課題名（和文） 乳癌患者自己抗体を用いた術後補助化学療法選択システムの開発
 研究課題名（英文） Study for post-operative adjuvant therapy choice by using autoantibodies in patients with breast cancer.
 研究代表者
 為佐 路子 (TAMESA MICHIKO)
 山口大学・医学部附属病院・医師
 研究者番号： 10570822

研究成果の概要（和文）：

乳癌の癌組織と非癌部組織を用いて二次元電気泳動を行い、乳癌患者血清あるいは非癌患者血清を反応させて10個の陽性スポットを比較した。癌患者血清において有意に発現が認められるスポットを質量分析で同定したところ、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Aなど3スポットの蛋白質は同定することができたが、他の7スポットの蛋白質同定はできなかった。今後はさらにこれらの同定できなかった蛋白スポットの同定を続けていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：

Protein samples from breast cancer tissues and paired non-cancerous tissues were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. After reaction with sera from patients with breast cancer or cancer-free patients, 10 spots which reacted to auto-antibodies from patients with breast cancer and not reacted to control sera were detected. Mass spectrometry analysis by LC-MS/MS identified three spots such as peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, but the other spots were not identified. Further studies for identifying the other spots are expectable.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：乳癌

科研費の分科・細目： 腫瘍学、臨床腫瘍学

キーワード：乳癌・自己抗体・プロテオミクス・二次元電気泳動

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、現在さまざまな診断法、治療法が確立されており、予後も一般に良好であるといわれているが、一度転移・再発してしまうと現行の薬物療法では治療が困難であり、治療の目的は延命と生活の質の改善である。よって乳癌の早期発見・早期治療が重要になってくる。わが国での女性乳癌の増加は粗率でも年齢調整率でも顕著に増加しており、リス

クを増大させる生活・環境因子の関与(初潮年齢の早期化、晩婚化と初産年齢の高齢化など)が明瞭といえる。そして乳癌罹患年齢は他癌より若く、社会的にも家庭的にも重要な役割を担う世代であることが多い。

これからの乳癌治療を考えるうえで、個々の患者に対して癌の性質や予後を把握し最適な医療を行ういわゆる「オーダーメイド医療」がより重要になってくると考えられる。

近年 intrinsic subtype による乳癌の分類が行われ、Luminal A 症例における術後補助化学療法追加の群の選択が臨床上問題となってくる。

乳癌の proteomics の報告には Hudelist らのものがあり、乳癌患者の血中自己抗体については、Desmetz, Lu, Hamrita らの報告があり、血清学的診断マーカーとしての可能性が示唆されているが、我々は血中抗体を単に診断マーカーとして利用するだけにとどまらず、発現する複数の抗体の組み合わせから、予後と比較検討し、術後補助化学療法必要群と不必要群の選択システムの確立を目的としている。

我々の教室ではC型肝炎 (HCV) 由来の肝細胞癌 (HCC) に対して以前本研究と同様の目的でタンパク質の網羅的解析を可能にした二次元電気泳動と質量分析法を用いて、HCC の発癌及び進行に関連する蛋白質を解析・同定し、新たな治療法、予後診断システムの確立を得るとともに、血清中の自己抗体を検討し新たな診断マーカーを見出した。また食道癌、膵臓癌についても同様の研究を行っている。

2. 研究の目的

前述の肝癌、食道癌の経験をもとに、罹患率の高い乳癌に焦点を当て術後補助化学療法必要群と不必要群の選別システムを目的として自己抗体の検討を行う。

具体的には、非担癌患者血清と比較して intrinsic subtype 別に乳癌患者血清中で増加している自己抗体によって認識されているタンパク質スポットを LC-MS/MS により同定する。そしてその蛋白質に対する自己抗体の特異性の確認を行い、乳癌組織および非癌組織における蛋白質の発現量を検討する。また同定された自己抗体およびそれに対する蛋白質と臨床病理学的特徴、予後についても検討し、術後補助化学療法必要群と不必要群に選別する。

3. 研究の方法

(概要) 乳癌患者癌部組織から蛋白質を抽出して、電気泳動で展開した後に PVDF 膜に転写し、乳癌患者血清あるいは非担癌患者血清と反応させ、その後 HRP 標識抗ヒト二次抗体を反応させて ECL 反応によって陽性スポットを検出し、乳癌患者血清中の自己抗体によって認識されている蛋白質スポットを LC-MS/MS により同定する。そしてその蛋白質に対する自己抗体の特異性の確認を行い、乳癌組織および非癌組織における蛋白質の発現量を検討する。また同定された自己抗体およびそれに対する蛋白質と臨床病理学的特

徴についても検討し、診断マーカー、予後診断、術後補助化学療法の選択への応用を検討する。

(1) 試料の収集および調製

山口大学医学部消化器・腫瘍外科にて手術を受けた乳癌患者のうち、本学の臨床研究審査委員会の承認を得て、十分な研究説明を行った後に同意の得られた患者から癌組織と非癌組織をペアで採取し、乳癌の癌組織と非癌部組織から抽出したタンパク質と、患者から採取した血清を使用時までディープフリーザー (-80°C) にて冷凍保存し、随時実験に使用した。

(2) 二次元電気泳動 (Two-dimensional gel electrophoresis: 2DE) による乳癌特異的スポットの検出

上記 (1) の試料を 8M 尿素、2%CHAPS、2.8mg/ml dithiothreitol (DTT) を含む 0.5%Immobiline polyacrylamide gel (IPG) 用緩衝液中で調製し、合計蛋白質量 200 μg を含む試料液 125 μl を IPG ストリップ (pH 3.0-10, 長さ 7cm, Amersham Bioscience) に添加して IPG を 4°C で 14 時間膨潤させ、膨潤した IPG ストリップを等電点電気泳動装置 (IPGPhor, Amersham Bioscience) にセットして、500 V で 1 時間、1,000 V で 1 時間、さらに 8000 V で 2 時間通電した。泳動終了後、IPG ストリップを 6M 尿素、30% グリセロール、2% SDS を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液中で 2 回それぞれ 10 分間平衡化し、15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用い、15 mA/gel の定常電流で通電した。ゲルは See Pico CBB Kit を用いて染色を行った。

(3) イムノブロットによる血清中自己抗体の検出

二次元電気泳動の後ゲル中に展開された蛋白質を PVDF 膜に転写し、1%スキムミルクを含む TBS で溶解した血清 (乳癌患者血清あるいは非担癌患者血清) を一次抗体として膜上の蛋白質と結合させ、洗浄後、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ヒト二次抗体を反応させて一次抗体に結合させた後に膜を洗浄し、ECL 反応によって検出された陽性スポットを乳癌患者と非担癌患者の血清で比較し、癌患者血清において有意に発現が認められる自己抗体を同定した。

(4) 自己抗体に対するタンパクの同定

ウェスタンブロットにより検出された乳癌血清中自己抗体に対する蛋白質を同定するため、二次元電気泳動を行い、See Pico CBB Kit を用いて染色した。そして血清と反応した自己抗体と比較し、対応する蛋白質スポットを同定した。

(5) 質量分析

現有設備の質量分析装置 LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies) を用いた peptide sequence tag (PST) 分析によって乳癌患者血清において発現が増強した自己抗体に対するタンパク質の同定を行った。

①ゲル内消化 (in-gel digestion)

切り出された蛋白質スポットゲルを 50 mM 重炭酸アンモニウムと 5 mM DTT を含む 60% メタノールで洗浄した後、CBB 色素を除いた。脱色されたゲルは脱水した後に 10 μg/ml の濃度にトリプシン (シーケンス用、Promega V5111) を加えた 50 mM 重炭酸アンモニウムと 5 mM DTT を含む 30% アセトニトリル中で 30°C のもと再膨潤しながら、ゲル内のタンパク質を消化した。

②peptide sequence tag (PST)

ゲル内消化した後に、現有設備の LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies) を用いて、PST 分析を行った。蛋白質の同定は、ProteinProspector web site (<http://prospector.ucsf.edu/>) の MS-Fit データベース検索によって行った。

4. 研究成果

(1) 乳癌組織からの抽出蛋白質の二次元電気泳動像をプロットした PVDF 膜に対して癌患者血清とコントロール血清を用いたウェスタンブロット像において有意に発現が認められる自己抗体反応スポットを検出した。

(2) 自己抗体が反応する蛋白質の同定のために二次元電気泳動を行い、See Pico CBB Kit を用いて染色し、血清と反応した自己抗体と比較して対応する蛋白スポットを 10 スポット選定しゲルから切り出した後に CBB 色素を脱色後、脱水した後にインゲル消化して質量分析で同定したところ、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A、triosephosphate isomerase、ubiquitin-conjugating enzyme E2N の 3 スポットの蛋白質を同定することができたが、これらは何れも過去においての同様の研究で同定された蛋白質であった。

(3) 他の 7 スポットの蛋白質同定はできなかった。この原因は、上記の同定された 3 スポットが何れも以前に同定できた蛋白質スポットと全く同一であったことから、我々が用いている LC-MS/MS での同定に低感度な蛋白質である可能性が考えられる。今後はさらにこれらの同定できなかった蛋白スポットの同定を続けていく必要がある。

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 1 件)

- ① Prospective ultrasonographic prediction of sentinel lymph node metastasis by real-time virtual sonography constructed with three-dimensional computed tomography-lymphography in breast cancer patients. Breast Cancer, 2012 Jan;19(1):77-82. Yamamoto S, Maeda N, Tamesa M, Nagashima Y, Yoshimura K, Oka M. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 前田 訓子、山本 滋、井上 由佳、松井 洋人、徳光 幸生、兼清 信介、爲佐 路子、吉村 清、岡 正朗
乳癌サブタイプ別にみた FEC followed by weekly paclitaxel による乳癌術前化学療法の検討
第 74 回日本臨床外科学会総会
2012 年 11 月 29 日～12 月 1 日
東京 (京王プラザホテル)
- ② 山本 滋、井上 由佳、兼清 信介、前田 訓子、爲佐 路子、吉村 清、岡 正朗
3D CT-LG と RVS システムを用いた乳癌センチネルリンパ節の術前情報
第 20 回日本乳癌学会学術総会
2012 年 6 月 28 日～30 日
熊本 (ホテル日航熊本)
- ③ 前田 訓子、井上 由佳、兼清 信介、爲佐 路子、吉村 清、山本 滋、岡 正朗
乳癌 3D CT-lymphography を用いたセンチネルリンパ節の体積変化率によるリンパ節転移予測
第 20 回日本乳癌学会学術総会
2012 年 6 月 28 日～30 日
熊本 (熊本市国際交流会館)
- ④ 前田 訓子、井上 由佳、兼清 信介、爲佐 路子、山本 滋、岡 正朗
乳癌 3D CT-lymphography を用いたセンチネルリンパ節の体積変化率によるリンパ節転移予測
第 112 回日本外科学会定期学術集会
2012 年 4 月 12 日～14 日
千葉 (幕張メッセ)
- ⑤ 山本 滋、井上 由佳、兼清 信介、前田 訓子、爲佐 路子、吉村 清、岡 正朗
RVS および 3D CT-LG によるセンチネルリ

シパ節陽性例における腋窩郭清省略の
可能性
第 112 回日本外科学会定期学術集会
2012 年 4 月 12 日～14 日
千葉（幕張メッセ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

爲佐 路子 (TAMESA MICHIKO)

山口大学・医学部附属病院・医師

研究者番号：10570822