

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830097

研究課題名(和文) 乳腺疾患における癌関連蛋白の発現とその臨床的意義

研究課題名(英文) Clinical significance of cancer-related protein expression

研究代表者

河手 敬彦 (Kawate, Takahiko)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：30532303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の初稿では、癌関連タンパク質であるDJ-1が術前化学療法の治療効果予測因子となることを報告し、実臨床への応用を視野に、効果予測因子となり得るかを網羅的に解析した。我々の報告では、DJ-1の発現とトリプルネガティブ乳癌の術前化学療法の治療効果に関して有意な差を認めたことを臨床応用したいと考え、血清でのDJ-1蛋白の測定を行い、癌特異的なisoformを検出した。

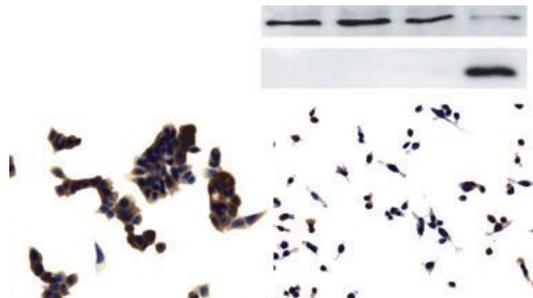
研究成果の概要(英文)：This study reported that DJ-1, a cancer-related protein, is a predictive factor for preoperative chemotherapy treatment effectiveness, and comprehensively analyzed whether it could be a predictive factor of effectiveness, with a view to practical clinical application. In our report, we focused on the expression of DJ-1 protein and the therapeutic effect of preoperative chemotherapy of triple-negative breast cancer, and we wanted clinical application, and we measured DJ-1 protein in serum, And detected cancer-specific isoform.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 DJ-1 術前化学療法 病理学的完全奏効 癌関連タンパク ELISA法 血清

1. 研究開始当初の背景

乳癌細胞株(MDA-MB-231、MCF-7、BT474、AU565)を良好に発育させ、1つは細胞破碎液から蛋白を抽出し、一方で無血清培地に変更し、Western Blot 法により培養液中に分泌される蛋白質の検出を試みた。良好な発育が確認できた4種の乳癌細胞株を用いた結果、細胞破碎液から抽出された蛋白では、すべての乳癌細胞株でDJ-1蛋白質を検出した。一方で、MDA-MB-231を培養した培養液中にも、DJ-1が検出された。免疫細胞染色を行ったところ、MCF-7細胞株では高発現であ



ったのに対し、MDA-MB-231細胞株では他の細胞株に比べて発現の減弱を認めた。以上の結果から申請者はDJ-1蛋白質が乳癌細胞から分泌されることを証明した。(Histopathology 2012, 61, 69-77)さらには、ヒト乳汁分泌液中のDJ-1蛋白質濃度を測定したところ、癌が存在する症例で濃度が有意に高いことを見出し、実際のヒト乳癌もDJ-1を分泌していることが強く示唆された。高濃度のDJ-1はductal carcinoma in situ (DCIS)の症例でも検出されることから、DJ-1は早期の癌から分泌されることが予測された。

DJ-1遺伝子は、rasと協調して細胞の癌化を促進する新規の癌遺伝子として報告された。その後、DJ-1タンパク質はapoptosisの促進PTENのnegative regulator、あるいはp53のtranscriptionを制御するなどの、多機能タンパク質であると報告されている。実際に、免疫染色とin situ hybridizationを乳癌組織に対して行った申請者らの検討では、乳癌の大部分の症例でmRNAレベルでDJ-1の発現が亢進していた。これに対して、蛋白質レベルでは、約半数の症例で乳癌におけるDJ-1の発現低下が認められた。発現低下を示す症例は予後不良で、分泌に関与している可能性が示唆された。このような発現パターンはDCISにも認められ、特にhigh nuclear grade DCISの症例では高頻度に認められ、逆にlow nuclear grade DCISでは、ほとんど認められなかった。

乳癌の粗死亡率は肺癌や胃癌に続き5番目と高頻度であり、人口比死亡率は世界と比較しても増加傾向にある。しかしながら英米では乳癌発生率は漸増しながらも死亡率は減少傾向に転じている。死亡率の低下の要因については検討がなされているが、検診の普及による早期乳癌の増加と集学的治療の進歩の果たす役割が大きいとされる。また早期発見

により局所療法のみで治療できる可能性が高い非浸潤性乳管癌(DCIS)の発見頻度が増加傾向にある。

近年、日本における乳癌検診はマンモグラフィや超音波検査の幅広い普及により、非浸潤性乳管癌(DCIS)の段階で発見できる割合が増加している。DCISは、核の形態学的悪性度からlow nuclear grade ~ high nuclear gradeに分類される。良性の増殖病変及び一部のlow grade DCISとhigh grade DCIS及び浸潤癌の多くは、発生のかなり早い段階で異なる発生機序を辿ると考え、分子生物学的にもこれを示唆する(#1)。このことから、今後は発症機序を踏まえた上で、手術や薬物療法などの必要選択性が検討されるようになると考えられる。しかしながら、DCISの段階から検出可能な乳癌の腫瘍マーカーは存在せず、全世界の女性からその発見が待ち望まれている。

2. 研究の目的

乳癌患者から採取した乳汁分泌液や血清を材料にプロテオーム解析して、早期乳癌を診断するための腫瘍マーカーや予後因子を同定する。また早期乳癌のみならず全ての乳癌(進行乳癌)に対する術前化学療法の感受性の評価など、テーラーメード医療に寄与する情報を患者に提供することを目標とする。網羅性を最大限に検索するために腫瘍組織におけるHiCEPを実施し、mRNAレベルより予後因子の同定、また術前化学療法の感受性の評価を合わせて行う。

無治療状態の乳癌患者血清と健常者コントロールの血清を用い以下の3点を中心として研究を進めていく。

・早期乳癌の腫瘍マーカーの可能性を踏まえて、乳腺腫瘍の良悪性の診断ツールとしての有用性を検討する。具体的には病理組織診断と血清DJ-1濃度の関連を比較検討する。

・の結果で良悪性の判定に有用であるという結果が得られた段階で、術前化学療法の治療効果予測因子としての重要性を検討する。術前化学療法後の血清DJ-1濃度と無治療状態の血清DJ-1濃度を比較し、術後病理組織学的治療効果判定との関連を調べる。

・回収した血清あるいは乳汁分泌液中の新規蛋白質を検索するために2次元電気泳動を行って展開した蛋白質のスポットを質量分析器にかけてアミノ酸配列を決定し、これらの物質を臨床病理学的に解析する。また、組織材料を用いてHiCEP法を実施し、網羅的発現解析をmRNAレベルで検討する。

今回の研究期間では、DJ-1を対象の中心におき、およびの確認を行う。そして、乳癌細胞株、乳癌患者血清、および乳癌組織標本を解析してapoptosisを引き起こす作用機序を検討することにより、DJ-1が乳癌術前化学療法の治療効果予測因子としてどのように寄与するかを明確にする。

3. 研究の方法

(1) 各施設の乳腺外来にて何らかの異常所

見(良悪性を問わず、精査の結果明らかな異常を認めなかった場合も含む)を疑われた患者に対して通常採血と同様の採血管に9ccの全血を採取する。採血に際しては受信時外来担当医よりインフォームドコンセントを行い同意がえられた患者に限り、採血行為は各施設採血技師に一任する。9ccの全血は各施設検査室にて速やかに血清を分離し、1.5mlのeppen dorf tubeに300 $\mu$ lずつ分注し速やかに-80で凍結したのち、防衛医科大学校当講座まで搬送される。

(2)同時に外来受診時に外来担当医の判断にて確定診断目的に針生検を行った症例に関しては、各施設の病理診断部と連携を図り、1検体につき10枚の未染標本の作製を依頼し、当講座に送ってもらう。

(3)必要な患者情報に関しては代表者本人が必要に応じて情報の収集に努める。

(4)適当数の血清検体が届き次第、まず初めに血清中のDJ-1蛋白濃度を測定する。使用するELISA kitはCircuLex<sup>TM</sup> Human DJ-1/PARK7 ELISA Kitであり、必要に応じ暫時購入予定である。血清の凍結解凍は1度限りと設定しているため、残った血清は後述する二次元電気泳動の際に利用できるように、GE Healthcare 2-D Quant Kitを用いて蛋白の抽出を行っておく。

(5)臨床病理検体は適当検体数が集まり次第、間接抗体法による免疫組織化学染色を行う。プロトコールはこれまでに我々が施行してきたものを利用する。1次抗体には、Anti-DJ-1 human monoclonal antibody (3E8, Medical & Biological Laboratories, Nagoya, JAPAN)を、2次抗体にはHRP labeled polymer anti-mouse IgG antibody at an antibody (Dako Envision + system, Dako, Glostrup, Denmark)を用い、an enzyme-labeled antibody system employing 3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride as the chromogen (DAB tris tablet, MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan)で発色しタンパクの発現を顕微鏡下で確認する。そして今回我々は、タンパクの発現状況を均一に評価できるようにするために、イメージアナライザー(Win-ROOF<sup>®</sup>; Mitani Corporation, Tokyo, Japan)を用い、3人の医師による検鏡評価と並行させる形で、発現状況を評価した。また同時にmRNAレベルでの発現状況を評価するために、同検体でIn situ hybridization法を行った。

(6)発現タンパクのプロテオーム解析は、蛍光標識二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法(2D-DIGE)を用いる。上記にて残血清から蛋白抽出を行ったものをあらかじめ-80で凍結保存していたものを利用する。回収された血清のうち、ELISA法にて高濃度のDJ-1タンパクを認めた症例と、検出されない程度に濃度が低い症例各2症例ずつのタンパクを等量ずつ混ぜたものをコントロールのプロテインライゼートとして使用し、一

つの症例から抽出した蛋白とのタンパク発現の差を比較するために、それぞれを異なる蛍光色素でラベリングする。これらをpH4-7のドライストリップゲルにローディングし、一次元目の等電点電気泳動を行い、さらにSDS-PAGEゲルを用いて二次元目の電気泳動を行う。その画像をスキャナーで取り込み、ソフトウェアDeCyder 2Dを用いて、乳癌症例と乳癌以外の乳腺腫瘍または乳腺に明らかな異常所見を認めない症例とで有意にタンパク発現差のあるスポットを検出する。その結果得られたスポットについて、蛍光色素を用いない二次元電気泳動を行ったゲルをクマシー染色を行った時に得られるスポットと重ねあわせ、クマシー染色したゲルからスポットをピックアップする。

(7)このスポット内のタンパクについて、In gel digestion法にてトリプシン消化を行い、ペプチド断片を生成する。これをMALDI-TOF-MSを用いて解析し、得られたピークをペプチドマスフィンガープリンティング法によるMascot解析にて解析し、タンパクを同定する。プロテオーム解析にて乳癌と診断された症例と乳癌以外の症例とで発現の差を認めるタンパクとして同定されたものについて、免疫組織化学染色を用いてタンパク発現を確認し、形態学的なタンパクの局在も確認する。

#### 4. 研究成果

今回の研究では、血清を用いDJ-1タンパクの同定を試みた。前述のように2D-DIGEを用いた実験系の確立を試み、目的とするタンパクの定量化が可能であった。

さらに実臨床に応用できる工夫として、血清中からDJ-1タンパクを計測する計画を並行して行ってきた。ELISA法では数百の血清検体を計測し、2D-DIGEの結果と網羅的に解析を行い、タンパクをisoformで解析することでがん患者特異的なDJ-1タンパクのisoformを同定するに至った。

今後もこの研究を派生させ臨床応用できるように努める。

#### 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. Cancer Sci. 2015 Jul;106(7):938-43. doi: 10.1111/cas.12673. Epub 2015 May 6. High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients.

Kawate T, Iwaya K, Koshikawa K, Moriya T, Yamasaki T, Hasegawa S, Kaise H, Fujita T, Matsuo H, Nakamura T, Ishikawa T, Hiroi S, Iguchi-Aruga SM, Aruga H, Murota K, Fujimori M, Yamamoto J, Matsubara O, Kohno N. (査読有)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河手 敬彦 (Kawate, Takahiko)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30532303

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )