

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007 ～ 2008
課題番号：	19590574
研究課題名(和文)	自己抗体結合性非ホジキンリンパ腫特異抗原の同定と診断マーカーの検索
研究課題名(英文)	Identifications of non-Hodgkin's lymphoma (NHL)-specific antigens bounded with autoantibodies in plasma derived from patients with NHL by an autoantibodiomics
研究代表者	
	中西 豊文 (Nakanishi Toyofumi)
	大阪医科大学・医学部・准教授
	研究者番号： 10247843

## 研究成果の概要：

造血器腫瘍（非ホジキンリンパ腫：NHL 25 例、ホジキンリンパ腫：HL 4 例、白血病：10 例など）及び非腫瘍性造血器疾患（骨髄異型性症候群など）、計 101 例並びに対照疾患（自己免疫疾患 13 例など）、健常者 8 例を用いて造血器腫瘍特異自己抗体及びその対応抗原を検索した結果、NHL 患者血清中に Raji 細胞（B リンパ球系腫瘍細胞）発現タンパク質と特異結合する数本の陽性バンドを高頻度に見出した。

その一つ 70 kDa 付近（=L-Plastin）のバンドについては、NHL では 21/25 例、一方 HL では全く検出（0/4 例）されず、白血病では 2/10 例、自己免疫疾患では 5/13 例、健常者では 1/8 例検出されたのみであった。一方、50kDa（= $\alpha$ -Enolase）のバンドについては、HL では 2/4 例が陽性であった。この 2 つの NHL 特異抗原を用いた一次スクリーニング法（ELISA 法）を確立した。引き続き、不特定症例について定量し、その統計学的検討を現在継続中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 病態検査学

キーワード：Autoantibodiomics、非ホジキンリンパ腫、L-plastin、癌特異マーカー、癌患者自己抗体

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の悪性リンパ腫（発症数 1 万人/年）の大半は非ホジキンリンパ腫であり、発症数は年々増加している。ホジキンリンパ腫

が 20～30 歳代に多いのに対し、非ホジキンリンパ腫の発生のピークは 50～60 歳代で、非ホジキンリンパ腫は比較的高齢者に多い。非ホジキンリンパ腫の発症原因としてはヒト T 細

胞白血病 I 型ウイルス (T 細胞白血病リンパ腫)、EB ウイルス (B リンパ腫やバーキットリンパ腫の一部) などのウイルス感染説があるが、感染した人すべてが悪性リンパ腫を発症するわけではない。一方、シェーグレン症候群に見られる唾液腺の B リンパ腫、慢性甲状腺炎 (橋本病) に合併する B リンパ腫のように、自己免疫疾患に B リンパ腫が合併しやすいことが報告されている。また一部のリンパ腫では、特定の染色体異常 (ヒト染色体 6q15-23 領域の欠失など) や遺伝子異常 (ALK 遺伝子のリン酸化など) が同定されているが、未だにその発症原因・機序の全容は明らかにされていない。現在、非ホジキンリンパ腫をはじめリンパ球系悪性腫瘍の診断・分類には主として病理組織学的検査、免疫学的手法 (腫瘍細胞表面マーカーの検索)、遺伝子解析 (免疫グロブリンあるいは T 細胞抗原受容体遺伝子再構成)、血液検査 (LDH 上昇、可溶性インターロイキン 2 受容体上昇、ヒト T 細胞白血病 I 型ウイルスに対する抗体有無など) 等によりなされているが、確定診断・早期診断が困難な症例が数多く存在する。

プロテオーム手法の癌診断への応用は、SM. Hanash 教授らのグループが、2001 年に初めて 2 次元電気泳動/WB/MALDI-TOFMS 法を用い、肺癌患者血清中に抗アネキシン I&II 抗体 (ProNAS. 2001) や PGP9.5 抗原 (Cancer Res. 2001) を、乳癌患者血清中からは RS/DJ-1 抗原 (Clin. cancer Res. 2001) を見出し、それら自己抗体・癌抗原が新しい癌診断指標となり得る可能性を示すと同時に、新たな癌研究への扉を開いた (Cancer Proteomics)。従来のプロテオーム手法を用いた癌診断法は、癌/非癌組織切片中の発現タンパク質の質的・量的変動を多数症例について検討し、同定した数百・数千あるタンパク質の中から癌マーカー候補を見出す方法が主流であった (Differential Display 法)。

我々の方法は B リンパ球系腫瘍細胞 (Raji 細胞) 発現タンパク質を腫瘍抗原とし、非ホジキンリンパ腫患者血清中に存在する自己抗体を標的にし、非ホジキンリンパ腫診断マ-

ーカー候補を検索する方法 (一種の Focused Proteomics) であり、今後新しい非ホジキンリンパ腫をはじめとした造血器腫瘍の診断マーカー検索法の一つとして位置付けられる可能性がある。また、悪性リンパ腫の治療法として既に実用化されているモノクローナル抗体療法に有用な知見を与えることが出来る。更に個々の患者様に対するオーダーメイド療法への新たな道が開けられる可能性を有している。

国内では、我々グループがいち早くその有用性に注目し、患者様の血清中に存在する自己抗体を標的にした癌プロテオミクスを立ち上げ、ミシガン大グループの追試を行い、抗  $\alpha$  エノラーゼ抗体をはじめとして 8 種類の肺癌特異抗原に対する自己抗体の存在を明らかにした (J. Chromatogr B 2006)。また、最近では食道癌の診断マーカー候補としてペルオキシレドキシシン 6 を同定した (ClinCancerRes. 印刷中)。最近、疾病診断や病態解明などを目的としたプロテオーム解析センターが東京医大に設置されたのを始め、各地の大学・研究所・企業内にプロテオミクスファクトリーが開設されて来ているが、解析方法は従来の Differential Display 法が主流である。

## 2. 研究の目的

今回、我々は独自の検索手法に準じ、リンパ球系腫瘍細胞株から得られた可溶性タンパク質を腫瘍抗原とし、確定診断された造血器腫瘍患者血清中に存在する自己抗体を標的に新規診断マーカー候補を検索する。見出した診断マーカー候補の ELISA 法を確立させ、多数症例を用いて腫瘍抗原を定量し、得られた結果を統計処理し診断マーカーとしての有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

Raji 細胞 (B リンパ球系腫瘍細胞) 発現タンパク質を腫瘍抗原とし、種々の造血器腫瘍患者を対象にして患者血清中に存在する自己抗体を標的に、非ホジキンリンパ腫診断マ-

カーを検索する。検索法は、これまでの肺アデノカルチノーマ、食道癌の診断マーカー検索に準じ、電気泳動／ウェスタンブロット

(WB)・化学発光検出 (ECL) /質量分析法にて実施する(下図参照)。対象検体は、文部科学省ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針及び学内倫理委員会規定に則って採取した造血器腫瘍患者血清を用いる。

- 1) Raji 細胞発現タンパク質を電気泳動し、泳動後分離した発現タンパク質を PVDF 膜に転写し、造血器腫瘍患者様から採取した血清を 1 次抗体とし WB/ECL 検出法にて血清中に存在する自己抗体と特異結合する陽性スポットの有無を多数症例について検索する。
- 2) 同時に泳動したゲルを銀染色し、WB/ECL 検出での陽性バンドに対応するバンド(染色ゲル上)を切り出し、還元アルキル化(DTT/モノヨードアセトアミド)後、ゲル内トリプシン消化し、トリプシン断片化ペプチド混合物を TFA・アセトニトリル系溶媒で抽出・濃縮後、質量分析(UltraFlex, LCQ-DECA, TSQ7000) /データベース検索し、非ホジキンリンパ腫特異抗原を同定する。
- 3) 同定した特異抗原を親和性カラムあるいは遺伝子導入した大腸菌を用いて大量に合成する。既知のタンパク質であれば、まず市販の特異抗体を用いて親和性カラムを作成し、Raji 細胞発現タンパク質を分離・精製する。分離精製した抗原を用いて ELISA 法を確立する。
- 4) 大量精製抗原が必要な場合は、Tag(グルタチオン S-転移酵素: GST) 付加ベクターに全長遺伝子を挿入後、大腸菌内に誘導・発現させ大量培養する(一部企業に委託の可能性あり)。

- 5) 培養した大腸菌をクローニング後、破碎し、Tag 付加タンパク質を抽出し、更に GST 親和性カラムにて目的腫瘍抗原を精製する(一部企業に委託の可能性あり)。

#### 4. 研究成果

造血器腫瘍(非ホジキンリンパ腫: NHL 25 例、ホジキンリンパ腫: HL 4 例、白血病: 10 例など)及び造血器疾患(骨髄異型性症候群など)101 例並びにその対照疾患(自己免疫疾患 13 例など)及び健常者 8 例を用いて造血器腫瘍特異自己抗体及びその対応抗原検索では、NHL 患者血清中に Raji 細胞発現タンパク質と特異結合する数本の陽性バンドが高頻度に見出された。

その一つ 70 kDa=L-Plastin のバンドについては、NHL では 21/25 例、一方 HL では全く検出(0/4 例)されず、白血病では 2/10 例、自己免疫疾患では 5/13 例、健常者では 1/8 例検出されたのみであった。

一方、50kDa= $\alpha$ -Enolase のバンドについては、HL では 2/4 例が陽性であった。

プロテオーム解析にて同定した 2 つの NHL 特異抗原(L-plastin/ $\alpha$ Enolase)のうち、先ず前者に関して、大量に精製抗原を購入し、常法に準じて 96 穴プレートに固相化し、検出系としては Peroxidase 標識抗ヒト IgG 抗体にてサンドイッチ ELISA 法を確立し、その発色系には、4-アミノアンチピリン系色素/ $H_2O_2$ 系を用い、抗 L-plastin 抗体の定量的 1 次スクリーニングを実施した。継続してその統計学的検討を加える。

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) Ueda K, Nakanishi T, Shimizu A, Takubo T, Matsuura N. Identification of L-plastin autoantibody in plasma of patients with non-Hodgkin's lymphoma using a proteomics-based analysis. *Ann Clin Biochem*. 45(1):65-69, 2008. (査読有り)

2) N. Mukai, T. Nakanishi, A. Shimizu, T. Takubo, T. Ikeda. Identification of phosphotyrosyl proteins in vitreous humors of patients with vitreoretinal diseases by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/western blotting/matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*. 45(3):307-312, 2008. (査読有り)

3) Y. Tabushi, T. Nakanishi, T. Takeuchi, M. Nakajima, K. Ueda, T. Kotani, S. Makino, A. Shimizu, T. Hanafusa, T. Takubo. Detection of citrullinated proteins in synovial fluids derived from patients with rheumatoid arthritis by proteomics-based analysis. *Ann Clin Biochem*. 45(4):413-417, 2008. (査読有り)

4) Y. Fujita, T. Nakanishi, Y. Miyamoto, M. Hiramatsu, H. Mabuchi, A. Miyamoto, A. Shimizu, N. Tanigawa. Proteomics-based identification of autoantibody against heat shock protein 70 as a diagnostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 263(2):280-90, 2008. (査読有り)

5) 中西豊文、清水章、田伏洋子、田窪孝行 自己抗体を標的とした癌マーカー検索 (Autoantibodimics) *生物物理化学* 52:35-38, 2008 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

1) 中西豊文 自己抗体を標的とした癌マーカー候補の検索 第 58 回日本電気泳動学会総

会 (宇部市) Nov8-9, 2007

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1) 「扁平上皮癌の診断用キット及び判定方法」(特願 2007-118582) 国内  
発明者: 藤田 能久、中西 豊文、馬淵 秀明、清水 章  
権利者: 財団法人大阪産業振興機構  
出願年月日: 平成 19 年 4 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 豊文 (Nakanishi Toyofumi)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10247843

(2) 研究分担者

田窪 孝行 (Takubo Takayuki)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60163359

田伏 洋子 (Tabushi Yoko)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80388256

(3) 連携研究者

武内 徹 (Takeuchi Toru)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 10330078