

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2009～2010
課題番号：	21790545
研究課題名(和文)	プロテオミクスを用いた大腸癌特異抗原結合自己抗体同定による新規診断マーカーの開発
研究課題名(英文)	Identification of β -tubulin as a common immunogen in gastrointestinal malignancy by mass spectrometry of colorectal cancer proteome: implications for early disease detection
研究代表者	
藤田 能久	(Fujita Yoshihisa)
大阪医科大学・医学部・助教	
研究者番号：	70465607

研究成果の概要(和文)：大腸癌由来細胞株(DLD-1)より抽出した蛋白および大腸癌患者血清を用いて2D-PAGE-WB-MALDI-TOF-MS/MSにて新規癌診断マーカー候補の検討を行ったところ、抗 β -tubulin自己抗体を同定した。本研究で採用する実験法は非常に簡便であり、これまであまり注目されていなかった自己抗体に着目して研究を行うことが特徴である。本結果により患者血清中に存在する抗 β -tubulin自己抗体が初めて同定され、患者血清中に優位であったことより大腸癌診断マーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify tumor-specific antigens in patients with colorectal cancer by mass spectrometry of cancer cell line proteins. To determine the number of patients with various types of gastrointestinal malignancy demonstrating anti-tumor antibodies. Proteins from the colorectal cancer cell line DLD-1 were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotted onto P polyvinylidene fluoride membranes for immune reaction with sera from colorectal cancer patients. Immunoreactive spots were mapped and excised from Coomassie brilliant blue stained gels. In-gel trypsin digestion, peptide extraction and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry was performed to identify immunogenic proteins. Sera from patients with gastrointestinal malignancies, other colorectal conditions and healthy subjects were tested for reactivity against identified proteins. One of the immunogenic proteins was identified as β -tubulin. Antibodies in patients were detected in 16/54 (30%) colorectal, 6/16 (38%) gastric, 2/10 (20%) esophageal and 4/10 (40%) pancreatic cancer, while in 2/3 (67%) colorectal adenoma, 0/2 colonic Crohn's and 0/1 carcinoid of the appendix. Only one healthy subject had antibodies making the specificity 96%. For those with colorectal cancer, the presence of anti- β -tubulin antibodies was associated with well differentiated lesions ($p < 0.05$) while there were no correlations with disease stage or the presence of vascular and lymphatic invasion. Through a proteomics-based approach, we have successfully identified β -tubulin as a tumor-specific antigen in colorectal cancer and other gastrointestinal malignancies. Anti- β -tubulin antibodies may be a sensitive and measurable marker for early malignant disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：プロテオミクス、癌診断マーカー、自己抗体

1. 研究開始当初の背景

癌抗原および癌特異抗原に対する自己抗体の存在は古くから知られ、これらを同定することは癌診断マーカーの同定および抗体療法の確立に有用である。2001年、SM. Hanash (ミシガン大)らのグループは癌細胞中に存在する全蛋白を抗原対象として患者血性中より新規自己抗体を同定し、解析する新たなプロテオミクス手法 (serological proteome analysis: SERPA) を確立、肺癌患者血清中の抗 Annexin I & II 自己抗体を同定し、新規自己抗体の癌診断マーカーとしての有用性を報告した (Proc Natl Acad Sci USA 2001)。従来のプロテオミクス手法における high-throughput な網羅的発現蛋白質解析は再現性、スペクトル解析アルゴリズムおよび臨床応用などにおいて問題点が多かったが (Diamandis EP. Cancer Res 2006)、これに変わる新たなプロテオミクス手法として注目されている (Hanash SM, et al. J Clin Oncology 2008)。

国内においては、未だ従来のプロテオミクス手法が主流ではあるが、研究代表者および研究協力者 (大阪医科大学 臨床検査医学 中西豊文) らのグループはいち早く SERPA 法

に注目し本手法を用いて肺癌患者血清中に抗 α -enolase 抗体 (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006) や、食道癌患者血清中に新規抗 peroxiredoxinVI抗体、抗 mortalin/HSP709B 抗体などを同定している (Clin Cancer Res. 2006) (Cancer Letters. 2008) (特許申請 特願 2007-118582)。

2. 研究の目的

これまでの研究成果をベースとして、大腸癌細胞株 (DLD-1、HT-29、SW480等) を用いた癌特異抗原および新規自己抗体の同定を行い、ELISA法を構築、多検体による validation studyを行い、新規癌診断マーカーの開発を目標に検討を行っていく予定である。

3. 研究の方法

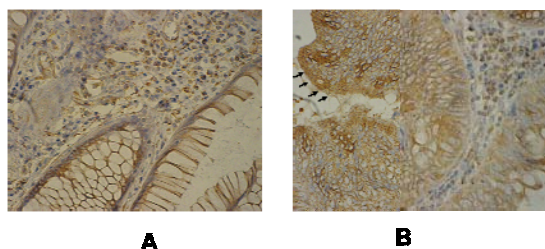
2003年1月から2005年8月までに大阪医科大学附属病院 一般・消化器外科に入院した大腸癌患者血清 30例、対照群として他癌患者血清 30例 (胃癌患者血清 15例、大腸癌患者血清 15例)、正常人血清 30例を用いた。抗原提示には大腸癌由来細胞株 (DLD-1) を用い、蛋白質解析は飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS/MS, ブルカーダ

Table 1

Patients (<i>n</i>)	Antibodies against β -tubulin (%)
Colorectal adenocarcinoma (54)	16 (30%)
Gastric adenocarcinoma (16)	6 (38%)
Esophageal squamous cell carcinoma (10)	2 (20%)
Pancreatic adenocarcinoma (10)	4 (40%)
Colonic adenoma (3)	2 (67%)
Carcinoid of the appendix (1)	0 (0%)
Colonic Crohn's disease (2)	0 (0%)
Healthy subjects (28)	1 (4%)

(3) 免疫染色での β -tubulin 発現は、進行癌では細胞表面に強発現を認める (Figure 5B, arrow)。一方、正常大腸粘膜では細胞質に局在的に低発現が散見される (Figure 5A)。

Figure 5



プロテオミクスを用いた手法により抗 β -tubulin 自己抗体を同定した。

自己抗体産生のメカニズムについては過剰発現、癌細胞特異的な翻訳後修飾や遺伝子変異による立体構造変化などにより新たに抗原提示されると報告されている。本研究においても免疫染色にて癌細胞特異的な強発現を認めたことなどが、自己抗体産生に寄与した

のではないかと推察した。2D-PAGE-WB-MALDI-TOF MS/MS 法によるプロテオミクス手法により大腸癌患者血清中に高頻度に存在する新規抗 β -tubulin 自己抗体を同定し、癌診断マーカーとしての有用性が示唆された。

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 Soichiro Tsunemi, Toyofumi Nakanishi, Yoshihisa Fujita, George Bouras, Yoshiharu Miyamoto, Akiko Miyamoto, Eiji Nomura, Takayuki Takubo, Nobuhiko Tanigawa, Proteomics-based identification of a tumor-associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer., *Oncology Reports*, 査読有, Vol 10, No. 4, 2010, p949-956
- ② Akihito Ogata, Akira Wada, Masami Ueta, Hideo Fushitani, Satoru Tanaka, Kosei Kimura, Akiko Sakai, Hideji Yoshida, Akiko Miyamoto, Yoshihisa Fujita and Nobuhiko Tanigawa, Proteomic analysis regarding resistance to anticancer drugs using a 5-fluorouracil-resistant human gastric cancer cell line and the radical-free and highly reducing method of two-dimensional electrophoresis., *Bulletin of the Osaka medical college*, 査読有, Vol 57, No. 1, 2011, p31-38

〔学会発表〕（計1件）

- ① 藤田 能久、Proteomics-based Identifying Autoantibody as a Novel Serum Marker in Esophageal Squamous Cell Carcinoma 、BIT Life Sciences` 3rd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2010) 、March 23,2010 、Beijing, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 能久 (Fujita Yoshihisa)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：70465607