

令和元年6月18日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08753

研究課題名(和文) 検出・同定した胆嚢がん特異蛋白の検証とマススクリーニング検査に関する国際共同研究

研究課題名(英文) Verification of identified gallbladder cancer-specific proteins and mass screening : an international joint research

研究代表者

遠藤 和男 (Endoh, Kazuo)

新潟医療福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：60176790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先の研究で検出・同定された蛋白質が胆嚢がん早期発見のためのバイオマーカーとして使用可能かどうか検証するため、胆嚢がん患者血清からELISA法による検出系の確立を試みた。抗体価の検討ではTUBAL3、SFN、STMN1の3種類の蛋白質が有効であることが判明した。しかしながらELISA法では、何れも50～300 ng/ml濃度の蛋白質は検出できたが、検出限界は50 ng/ml程度であり、当初目的としたpg/mlオーダーでの蛋白質検出には至らなかった。今後はより高精度な定量を行うことができるSRM法による検出系の確立が求められる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、胆嚢がん早期発見に使用できるバイオマーカーとして、TUBAL3、SFN、STMN1の3種類の蛋白質がより有力な候補として示された。ただし、これらの蛋白質が血清中に存在するとしても極めて微量であるため、実用的な検出のためにはpg/mlオーダーでの蛋白質検出が求められる。そのためにはより高精度な定量を行うことができるSRM法による検出系の確立が新たな課題として浮かび上がった。

研究成果の概要(英文)：In order to verify whether the protein identified in the previous study could be used as a biomarker for early detection of gallbladder cancer, we attempted to establish a detection system using ELISA method from the serum of patients with gallbladder cancer. In the examination of the antibody titer, it was proven that three kinds of proteins of TUBAL3, SFN and STMN1 were effective. However, although 50～300 ng/ml of protein could be detected by the ELISA method, the detection limit was about 50 ng/ml, which did not lead to the detection of protein on the order of pg/ml as originally intended. In the future, the establishment of the detection system by the SRM method which can determine the high-precise quantity is required.

研究分野：疫学

キーワード：胆嚢がん 特異蛋白 質量分析 インド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内における胆嚢がんの発生要因の検討は、1980年代に新潟県において本症が多発したこともあり申請者らのグループが精力的に取り組んできた。申請者らは、複合要因説(胆嚢がんは胆石の存在のもと何らかの環境要因が作用して発生する)を作業仮説として設定し検証した結果、環境要因として農薬が本症の発生要因として高い統計的相関関係を持つことを導き出した(Yamamoto et al. *Acta Med Biol.* 1993)。さらに、遺伝要因の検討で、環境中に排泄された汚染化学物質の代謝に関連する CYP1A1 遺伝子変異が本症発生と関連していることを明らかにした(Tsuchiya et al. *J Exp Clin Cancer Res.* 2002, Tsuchiya et al. *Clin Biochem.* 2007)。新潟県における胆嚢がん発生率は環境要因とした農薬の使用自粛以降低下傾向が続いており、その発生率は現在全国平均に回帰しつつある(新潟県保健福祉部. 平成24年度福祉保健年報. 2013)ことから、応募者らがたてた作業仮説は矛盾していないと考えている。

(2) 一方、胆嚢がんは特定のアメリカ先住民の集団においてよく見られ、発生率における顕著な地理的・民族的集積性を示すことが特徴である(Wistuba et al. *Nat Rev Cancer*, 2004)。南米アンデス山脈西側のチリ、ボリビア、ペルーなどが胆嚢がんの好発地域であり、患者のほとんどは診断時に進行している例が多く、早期治癒見、早期治療が必要であるが、胆嚢がんバイオマーカーは明らかにされていない。特に、欧米先進国では胆嚢がんの症例が少ないために研究者の関心も薄く、本症に関する研究報告は極めて少ない。また、胆嚢がんは、他の消化器系がんに比べて症例や研究報告が少ないことから、外科的切除以外の有効な治療方法が確立されていない。さらに、胆嚢がんは初期症状がほとんどなく早期診断が難しいため、患者の5年生存率が低く予後が悪い。そのため、胆嚢がんの早期発見につながる有効な腫瘍マーカーの同定が望まれている。

2. 研究の目的

先の研究で、胆嚢がん患者のパラフィンブロック包埋標本から検出、同定した8種類の蛋白質が早期発見のためのバイオマーカーとして使用可能かどうかを、チリ胆嚢がん患者の血清を用いて検証する。チリ胆嚢がん患者の癌組織中には同定した蛋白質が存在することは既に免疫染色で確認済みである。検出・同定した8種類の蛋白質を単独、もしくは複数の組み合わせでがん患者を検出できることが実証された場合は、非がん患者でかつ胆嚢がんのリスク要因を有する人(胆嚢炎、胆石保有者、肥満など)を対象にスクリーニング検査を行い、がん患者を検出できるかどうかの検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象者および試料: チリ・サンティアゴの Dr. Sótero del Río 病院、ボリビア・ラパスのボリビア・日本消化器センター、およびインド・ラクナウの Sanjay Gandhi Post-Graduate Institute of Medical Sciences 大学病院にて、胆嚢がんを診断され、胆嚢摘出術を受けた患者を対象とした。対象者には術前に本研究の目的、方法、予想される結果等を説明し、書面によるインフォームドコンセントを得た。試料については、チリ、ボリビア、インド患者からの試料採取を各々の国の研究者に依頼した。ボリビア患者の試料については、平成29年2月にボリビア・日本消化器センターを訪問し、研究協力者の Dr. Loza、Dr. Villa-Gomez らと面会し、胆嚢がん患者の血清試料16例、胆石症患者の試料3例を受け取り、日本に搬入した。インド患者の試料については、平成29年9月にサンジャイ・カンジー医科学大学院(Sanjay Gandhi Post-Graduate Institute of Medical Sciences)を訪問して消化器外科教授の Dr. Kapoor らと面会し、免疫染色用として胆嚢がん患者の組織試料50例、健常者の組織試料10例、早期がん組織試料5例、進行がん組織試料5例を受け取った。また、あわせて質量分析用の試料として胆嚢がん患者の血清試料100例、胆石症患者の血清試料100例、健常者血清10例を受け取り、日本に搬入した。

(2) ELISA(直接法): 96 well plate (SUMILON)の各ウェルに50 mM 炭酸 buffer (pH 9.4)で0.2 µg/ml に調整したリコンビナントタンパク質を50 µl ずつ加え、4°C で一晩インキュベートして抗原をプレートに固相化した。各ウェルを phosphate buffer saline (PBS) 200 µl で3回ずつ洗浄後、ブロッキング buffer (1% BSA/PBS)を200 µl ずつ加え、37°C で一時間インキュベートしてブロッキングを行った。各ウェルを PBS 200 µl で3回ずつ洗浄後、各濃度に調製した二次抗体を100 µl ずつ加え、37°C で1時間反応させた。blank には0.1% BSA/PBS を用いた。各ウェルを T-TBS (Tris Buffer Saline (0.05% Tween/10 mM Tris-HCl buffer, 0.15M NaCl, pH7.4))で4回ずつ洗浄後、酵素標識二次抗体溶液を100 µl 加え、37°C で1時間置いて反応させた。各ウェルを200 µl の T-TBS で3回、TBS で1回ずつ洗浄後、DEA Buffer (1M diethanolamine buffer, pH 9.7, with 0.5 mM MgCl₂, 0.02% NaN₃)で1 mg/ml に調整した p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP) (nacalai) 溶液を100 µl ずつ加え、37°C で1時間反応後、プレートリーダー(Thermo Scientific, MULTISCAN FC)を用いて、405 nm の吸光度を測定した。

(3) ELISA(サンドイッチ法): 96 well plate (SUMILON)の各ウェルに2 µg/ml の固相抗原を50 µl ずつ加え、4°C で一晩インキュベートして抗原をプレートに固相化した。各ウェルを PBS 200 µl で3回ずつ洗浄後、ブロッキング buffer (1% BSA/PBS)を200 µl ずつ加え、4°C または室温で2時間または一晩インキュベートしてブロッキングを行った。各ウェルを PBS 200 µl で

3回ずつ洗浄後、各濃度に調製したリコンビナントタンパク質またはサンプルを 100 μ l ずつ加え、4 $^{\circ}$ C または 37 $^{\circ}$ C で1時間または一晩反応させた。blankにはPBSを用いた。各ウェルを200 μ lのT-TBSで5回ずつ洗浄後、各ウェルに各濃度に調製した検出抗体を100 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。blankには0.1% BSA/TBSを用いた。各ウェルをT-TBSで5回ずつ洗浄後、アルカリフォスファターゼ (AP) またはホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体溶液またはアビジン - HRP 溶液を100 μ l 加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間置いて検出抗体と反応させた。各ウェルを200 μ lのT-TBSで3回、TBSで1回ずつ洗浄後、基質を100 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、プレートリーダー (Thermo Scientific, MULTISCAN FC) を用いて、反応溶液の吸光度を測定した。STMN1については、市販されている Human STMN1 (Stathmin1) ELISA Kit (MyBio Source, Cat. MBS765617) を用いて、測定を行った。測定条件はKitのプロトコールにしたがった。

(4) SRM法：市販の High-Select Top14 Abundant Protein Depletion Mini spin Columns を用いて、血清中の高濃度タンパクを除去し、得られた溶液を凍結乾燥した。サンプル中のシステイン残基の還元アルキル化を行った後、サンプル中の総タンパク質量に対して 25:1 の比率 (w/w) になるように、トリプシンを加えて、一晩、トリプシン消化を行った。トリプシン反応溶液からのペプチドの精製は、MonoSpinTM C18 column を用いて行った。各ステップの収率と再現性は、microBCA アッセイと SDS-PAGE で確認した。精製後の消化物を TripleTOF5600 で解析を行い、得られた質量データをもとにタンパク質同定システム Mascot Daemon を用いてサンプル中に含まれるタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) ELISA

まず初めに、市販の抗体を用いて候補タンパク質の検出を行うため、抗体価を検討した結果から、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の抗体価が確認できた TUBAL3、SFN、STMN1 について、サンドイッチ ELISA を行うこととした。

まず TUBAL3 のサンドイッチ ELISA の確立を試みた。抗 TUBAL3 モノクローナル抗体の固相濃度を検討するために、炭酸バッファーで 2, 5, 10 μ g/ml 希釈した抗 TUBAL3 モノクローナル抗体をプレートに 50 μ l ずつ分注して、4 $^{\circ}$ C で一晩、静置した。37 $^{\circ}$ C で1時間も試したが、この条件ではうまく固相されなかった。ブロッキングは1% BSAで行った。ポジティブコントロールの rhTUBAL は 0~300 ng/ml の濃度で用いた。その後、一次抗体として 1/500 希釈した抗 TUBAL3 ポリクローナル抗体を2時間、二次抗体として 1/5,000 希釈した AP 標識抗ラビット IgG 抗体を1時間、それぞれ 37 $^{\circ}$ C で反応させた。APの基質として PNPP を加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応後に吸光度を測定した。この結果、固相濃度を上げるに従って、測定値のバックが上昇した。特に、10 μ g/ml のモノクローナル抗体を使用した場合には、rhTUBAL3 を加えていない well でも吸光度が 1 を超えた (図 1 a)。一次抗体の濃度を 1/20,000 に下げてもバックは下がらなかった。二次抗体と固相抗体が交差している可能性が示唆されたので、二次抗体を pre-absorbed (血清吸着済) HRP 標識ラビット IgG 抗体に変えて、基質に TMB を用いて同様の実験を行ったが、結果は変わらなかった。一方で、いずれの固相濃度でも、100 ng/ml 以下の濃度では検出不可能だった (図 1 a)。次に、固相抗体を最もバックが低い 2 μ g/ml で固相して、ブロッキング後、一次抗体を 1/500 希釈、二次抗体の濃度を 1/5,000 または 1/20,000 希釈、基質を PNPP より感度の高い Blue Phos に変えて、同様条件で実験を行った。rhTUBAL の濃度を変えながら、細かく条件を変えて何度か実験を行い、再現性と検出範囲を精査した。最も良好だった結果を図 1 b に示す。いずれの条件でも二次抗体を 1/5,000 で希釈した場合の方がバックは低く、100~300 ng/ml の濃度で、直線的な検量線が得られ、50 ng/ml が検出限界だった。一方で、再現性が認められない場合もあった。以上の結果から、サンドイッチ ELISA の反応条件を精査することで 100 ng/ml の rhTUBAL を検出することができた。しかしながら、この系では一次抗体が二次抗体のどちらかが固相抗体と非特異的に反応しており、再現性も低かったため、サンプルの測定までは行えなかった。

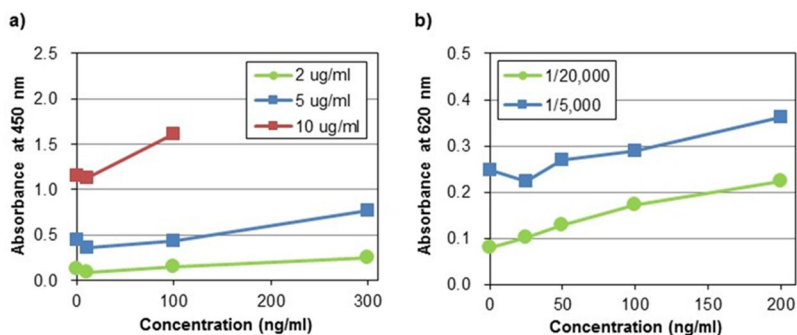


図 1 TUBAL3 に対するサンドイッチ ELISA

次に、SFN のサンドイッチ ELISA の確立を試みた。モノクローナル抗 SFN1 抗体を 2 µg/ml で固相後、ブロッキングを行った。ポジティブコントロールの rhSFN は 0 ~ 300 ng/ml の濃度で用い、37°C で一晩反応させた。その後、一次抗体として 1/500 希釈した抗 SFN ポリクローナル抗体を 2 時間、二次抗体として 1/5,000 希釈した AP 標識抗ラビット IgG 抗体を 1 時間、それぞれ 37°C で反応させた AP の基質として Blue Phos を加え、37°C で 1 時間反応後に吸光度を測定した。この結果、0 ~ 300 ng/ml の濃度で、再現性良く直線的な検量線が得られた。検出限界は、50 ng/ml だった (図 2 a)。固相濃度については、5 µg/ml でも検討を行ったが、バックがやや上がっただけで、検量線の傾きや検出限界に変化はなかった。また、一次抗体の濃度を 1/100 にあげても、大きく変化はなかった。さらに、AP の基質として PNPP も試したが、Blue Phos の方が良好な結果を示した。以上の結果を踏まえて、サンプルの測定を行った。サンプルは 1/25、1/50、1/100 希釈で用い、37°C で一晩反応させた。今回用いたサンプルは、いずれも検出限界以下だったが、濃度依存的に吸光度が上昇した。特に、No. 8、No.10、No.5 は測定値が高かった (図 2 b)。

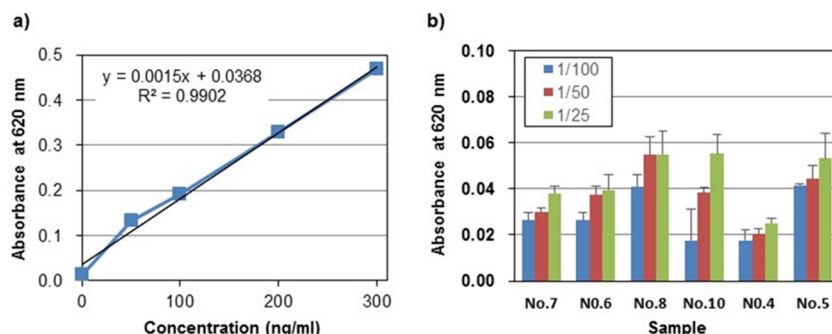


図 2 SFN に対するサンドイッチ ELISA

SFN については、サンドイッチ ELISA Kit を用いて、サンプル測定も行った。しかしながら、今回用いたキットはバックが高く、サンプルの濃度測定ができなかった。

次に、STMN1 のサンドイッチ ELISA の確立を試みた。モノクローナル抗 STMN1 抗体を 2 µg/ml で固相後、ブロッキングを行った。ポジティブコントロールの rhSFN1 は 0 ~ 200 ng/ml の濃度で用い、37°C で一晩反応させた。その後、一次抗体として 1/500 希釈した抗 STMN1 ポリクローナル抗体を 2 時間、二次抗体として 1/5,000 希釈した HRP 標識抗ラビット IgG 抗体を 1 時間、それぞれ 37°C で反応させた HRP の基質として TMB を加え、37°C で 1 時間反応後に吸光度を測定した。この結果、0 ~ 200 ng/ml の濃度で、再現性良く直線的な検量線が得られた (図 3 a)。検出限界は、25 ng/ml だった。固相濃度については、5 µg/ml でも検討を行ったが、検量線の傾きや検出限界に大きな変化はなかった。二次抗体に AP 標識抗ラビット IgG 抗体、基質に Blue Phos を用いても、同等の結果だった。以上の結果を踏まえて、サンプルの測定を行った。サンプルは 1/25、1/50、1/100 希釈で用い、37°C で一晩反応させた。今回用いたサンプルは、いずれも検出限界以下だったが、濃度依存的に吸光度が上昇した。特に、No.5 は測定値が高かった (図 3 b)。

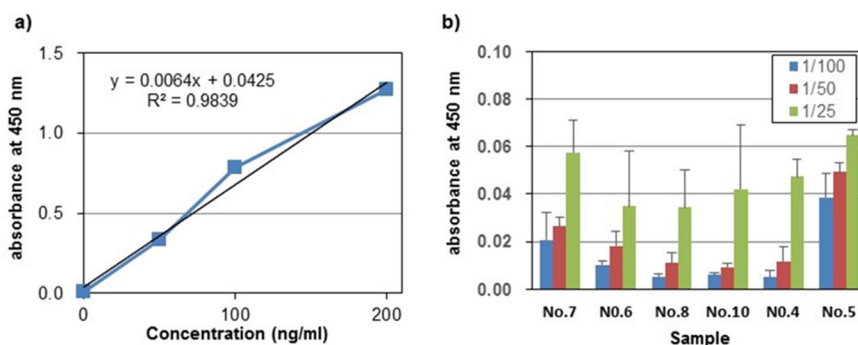


図 3 STMN1 に対するサンドイッチ ELISA

ここまで、胆嚢がん患者の血清からの候補タンパク質の検出を目的として、TUBAL3、SFN、STMN1 に対するサンドイッチ ELISA が確立を試みた。いずれも、50 ~ 300 ng/ml の目的タンパク質を検出でき、検出限界は 50 ng/ml 程度で、目標とする pg/ml オーダーの測定には至らなかった。また、いずれの系においてもサンプル中の目的タンパク質はうまく検出できなかった。やはり、ALP×PNPP または BluePhos や HRP-TMB の検出限界は ng/ml オーダーであり、pg/ml オーダーの測定には、Biotin-Abidin の系を用いる必要があると考えられた。

(2) ELISA (Biotin-Abidin 系)

胆嚢がん患者の血清中から目的のタンパク質を検出するためには、pg/ml オーダーの検出感度

が必要となるため、リコンビナントタンパク質をポジティブコントロールとして、検出限界と検出範囲を精査した。

以前の結果をもとに、STMN1 のサンドイッチ ELISA の確立を試みた。モノクローナル抗 STMN1 抗体を 2~10 µg/ml で固相後、ブロッキングを行った。ポジティブコントロールの rhSFN1 は 0~100 ng/ml の濃度で用い、37°C で一晩反応させた。その後、一次抗体として 1/500 または 1/100 希釈したビオチン標識抗 STMN1 ポリクローナル抗体を 2 時間、二次抗体として 1/15,000 希釈したアビジン標識 HRP を 1 時間、それぞれ 37°C で反応させた。HRP の基質として TMB を加え、37°C で 1 時間反応後に吸光度を測定した。この結果、0~100 ng/ml の濃度で直線的な検量線が得られた (図 4)。固相濃度を 5, 10 µg/ml にあげて、同様の条件で検討を行ったが、検量線の傾きや検出限界が低下した。以前に用いた一次抗体×ビオチン標識二次抗体×アビジン標識 HRP の系と比較すると、測定値が全体的に上昇し、より低濃度で直線的な検量線が引けたが、pg/ml オーダーの検量線は引けなかった。この原因としては、用いた抗体の抗体価が低かったことが考えられるが、現時点で市販のビオチン標識抗体が他にほぼないことから、市販の Kit を用いることにした。

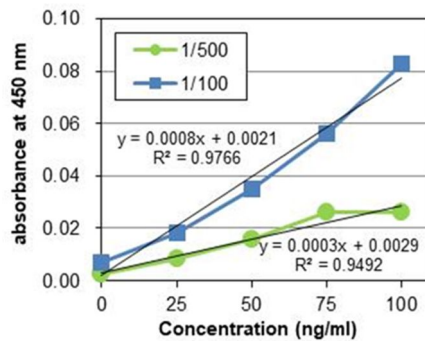


図 4 STMN1 に対するサンドイッチ ELISA

(3) ELISA (Kit)

次に、市販されている Kit を用いてサンドイッチ ELISA を行った。付属のプロトコールに従って、プレートに 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ng/ml のリコンビナントタンパク質を加えて、37°C で 90 分反応させた。サンプルとなる血清は、付属のバッファーで 1/25 または 1/5 希釈して加え、同様に反応させた。その後、検出用のビオチン標識抗体を加えて、90°C で 1 時間、さらにアビジン標識 HRP を加えて 37°C で 30 分反応させた。HRP の基質として TMB 溶液を加えて、37°C で 20 分反応後、Stop 溶液を加えて 450 nm の吸光度を測定した。

この結果、Kit のプロトコールと同様の曲線が引けた。今回は測定するサンプルが低濃度なので、サンプルの測定値が入る範囲で検量線を引いた (図 5 a) さらに、この検量線をもとに、各サンプルの濃度を定量した結果を図 5 b に示す。1/25 希釈したサンプルでは、3~8 ng/ml の濃度で目的サンプルが検出された。一方、1/5 希釈したサンプルでは、2~6 ng/ml の濃度で目的タンパク質が検出された。いずれのサンプルも希釈倍率 1/25 と 1/5 で約 1.5~2 倍濃度が違った。またサンプル No.6 のみ、測定値が高かったが、このサンプルは溶血していたため、その影響によるものと考えられる。

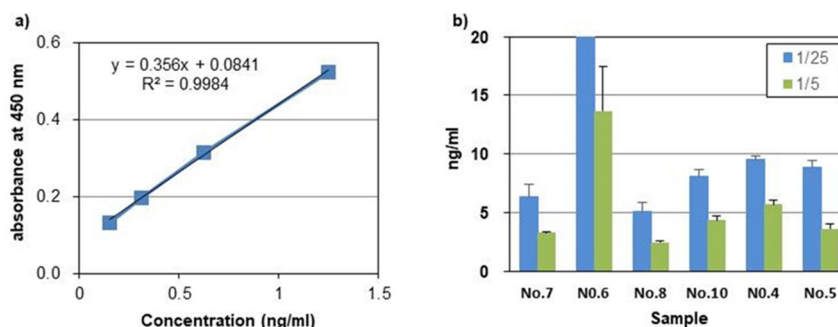


図 5 STMN1 に対する Kit を用いたサンドイッチ ELISA

胆嚢がん患者の血清からの候補タンパク質の検出を目的として、STMN1 に対するサンドイッチ ELISA が確立を試みた。今回は、Biotin-Abidin の系を用いて pg/ml オーダーの STMN1 の検出系の確立を目指したが、前回同様、0~100 ng/ml の検出範囲にとどまった。一方、市販の Kit を用いることで ng/ml オーダーの目的タンパク質の検出に成功した。

(4) SRM 法

血清中の特異蛋白の検出について、ELISA 法では有効な検出系を確立することができなかったため、より高精度な定量を行うことができる LC-MS/MS(質量分析装置)を用いた SRM(selected

reaction monitoring) 法による解析を行うこととした。まず、SRM 条件検討のため、候補タンパク質の一つである STMN1 のポジティブコントロール(rhGST-STMN1, MybioSource, MBS203211) についてトリプシン消化を行い、LC-MS/MS に供するサンプルの調整を行った。

日本人健常者の血清濃度は、67.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で一般的な血清のタンパク濃度であったのに対して、インド人の血清濃度は、健常者で 46.8 \pm 3.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、胆嚢がん患者で 42.1 \pm 10.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となり、健常者、胆嚢がん患者ともに血清中のタンパク質濃度が著しく低かった。また、カラムによる血清タンパク除去率は、日本人健常者で 86.6%、インド人と健常者で 88.0 \pm 1.8%、胆嚢がん患者で 81.7% \pm 2.3% となり、健常者と比較して胆嚢がん患者の血清ではタンパク除去率が優位に低かった。各ステップでのサンプル間の収率は、ばらつきも低く、再現性も高かった。各サンプルを LC/MS/MS で解析した結果、健常者のサンプルからはそれぞれ数 100 個のタンパク質を同定することができた。一方で、胆嚢がん患者の血清は、LC/MS/MS に供した際に、カラムにサンプルが詰まり、解析ができなかった。カラムが詰まった原因としては、サンプル中の脂溶性画分がカラム中で不溶性物質として析出したことが考えられる。

インド人の血清については、血清中のタンパク質濃度が低いことから、タンパクそのものが分解されている、もしくはその精製方法に問題があることが示唆された。また、胆嚢がん患者の血清については、血清除去カラムでの除去率が低いことから、血清中のタンパクに異常がある可能性があり、さらに健常者と比較して脂溶性ペプチドを多く含むことが示唆された。

今回、用いた精製方法は非常に簡便で再現性がある一方、血清中の微量タンパク質を精製するには至らなかった。さらに微量なタンパク質を抽出・精製するためには、標的タンパク質を絞って、抗体を用いた免疫沈降のステップを加えることが有効であると考えられる。また、胆嚢がん患者の血清が健常者と比較して、高脂血症化している可能性があるため、アセトン沈殿等の資質除去のステップを検討する必要性が示唆された。今後は、カラム精製で得られたサンプルを用いて、標的タンパク質を絞って WB を行い、抽出・精製方法をさらに最適化することが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：土屋 康雄

ローマ字氏名：TSUCHIYA, Yasuo

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：60334679

研究分担者氏名：浅井 孝夫

ローマ字氏名：ASAI, Takao

所属研究機関名：新潟医療福祉大学

部局名：医療技術学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：60612736

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。