

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09177

研究課題名(和文) がん特異的プロテアーゼによる尿中シェディング産物を応用した肺腺癌早期診断法の確立

研究課題名(英文) Diagnosis methods of lung adenocarcinoma using analysis of urinary protein fragments

研究代表者

松元 信弘 (MATSUMOTO, NOBUHIRO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70418838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌特異的プロテアーゼ活性により生成されたと考えられる尿中蛋白断片解析の結果を検討して、がん治療の臨床において有用と考えられるマーカーを探索した。進行肺腺癌患者と健常者尿との比較から、脳転移を予測する尿中がんマーカー候補蛋白断片と骨転移を予測する尿中がんマーカー候補蛋白断片を探索した。
これらのマーカー候補蛋白断片の断片化前の元蛋白の一部は、アルファ-1-マイクログロブリン/ビクニン前駆体であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we found several urinary protein fragments, which are early diagnosis markers for brain metastasis and bone metastasis of lung adenocarcinoma. These protein fragments are thought to be produced by cancer specific proteinase activity. Some of these protein fragments are from alpha-1-microglobulin/bikunin precursor.

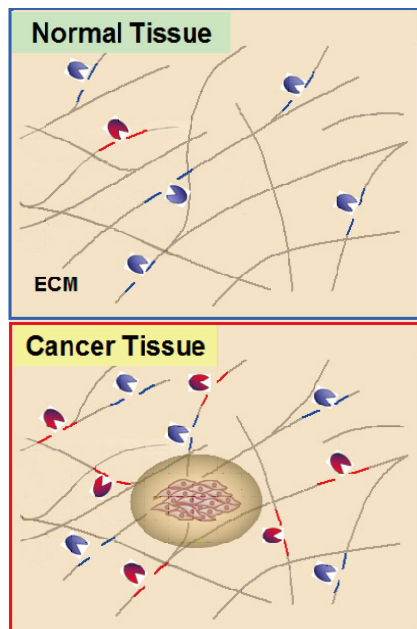
研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺癌 早期診断 尿 蛋白断片

1. 研究開始当初の背景

肺癌はわが国で男女合わせて年間約7万人が死亡しており、あらゆる癌腫の中で最も多い。さらに男性は年間約7,4000人、女性は年間約3,4000人が新たに発症しており、近年は腺癌の増加傾向に特徴がある。従来腫瘍マーカー陽性率は肺腺癌では約60%とされており、進行期ほど陽性率は高い。肺癌ではstage I、IIの陽性率が約30%前後であるのに対し、stage IIIでは50~80%であり、現在の腫瘍マーカーは早期発見のスクリーニングには適切ではない。本研究では“癌細胞における様々なプロテアーゼ活性の異常”という点に着目し、その反応産物である蛋白質断片を解析して早期診断、予後判定、治療反応性の予測に有用な新規のバイオマーカーを確立する。

癌の浸潤、転移、増殖には多くのプロテアーゼが重要な役割を担っている。癌細胞は特異的に発現する種々のプロテアーゼにより周囲の組織を破壊し、増大する。また、癌細胞由来プロテアーゼは、膜蛋白質である受容体や増殖因子を限定分解し、可溶性の細胞外ドメインを生成する。この“シェディング”



● Protease expressed in normal cell
● Protease expressed in cancer cell
● Cancer cell

と呼ばれる翻訳後修飾機構は、癌の浸潤や免疫回避など、最も精力的に研究が行われている分野の一つである。このようなプロセッシングを担うプロテアーゼとして、癌細胞との関連が注目されるマトリックスメタロプロテアーゼやカスパーゼなどが知られている。しかしながら、このようなプロテアーゼの多くは、基質となる蛋白質のNまたはC末端側領域を一部切断するにすぎず、通常のプロテオミクス技術による切断部位の特定は極めて困難である。癌細胞特異的に亢進するプロテアーゼの作用により生成してくる、例えば、癌細胞周辺の微小環境に存在する様々な蛋白質の断片は、癌の進展や進行度等

を的確に診断する上で有効なバイオマーカーとなり得る。しかし、一般に行われている癌組織や血液を用いた蛋白質解析では、単離直後から蛋白質が切断を受け非常に不安定であることや、癌の進展とは関連しない多くのプロテアーゼのために、早期診断、予後予測や治療効果判定に有用なバイオマーカーを同定することは困難である。

シェディング産物である蛋白質断片は尿中に排泄され、極めて安定で容易には分解されない。尿は検体採取の簡敏さと量において、早期診断スクリーニングの試料として非常に優れている。尿検体中のこれら蛋白質断片を網羅的な末端解析という新たな着眼点から探索し、未知の癌特異的マーカーを確立したい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来検診による早期発見が困難な肺腺癌を対象に、蛋白質の網羅的な末端構造解析によって同定された、癌細胞が生成する尿中シェディング産物を用いて、早期診断に有用なバイオマーカーを確立し、その病態を解析することである。

癌細胞は特異的なプロテアーゼを産生し、浸潤や免疫回避などにシェディング機構を利用していることはよく知られているが、プロテアーゼの種類や基質蛋白質は、未だ不明な点が多い。特異的なシェディング産物の解析から、逆にこれらの点を明らかにするヒントが得られ、癌生物学の発展にも貢献したい。

尿由来のバイオマーカーによる検診は安全性と簡敏さから、受診率の大幅な向上が期待でき、検診にも広く受け入れられるため、医療の地域格差を是正するうえでも重要である。本研究は酵素によるさまざまな生体内反応を尿から解析するもので、非常に独創的で新規性の高い研究テーマである。

3. 研究の方法

本研究では、申請者らが先行研究にて実施してきた、癌特異的なプロテアーゼ活性により生成された尿中シェディング産物探索の成果をもとに、患者臨床情報を再検討してがん治療の臨床に有用なマーカーを探索する。

具体的には、蛋白質断片発現強度が、癌患者/健常者比で1.5以上、統計学的に(Wilcoxon検定)有意に肺腺癌患者において発現強度が強い蛋白C末端断片を抽出する。これらマーカー候補蛋白質の肺腺癌に対する感度と特異度から Receiver Operating Characteristics (ROC) 曲線を作成し、Area Under Curve (AUC) の高い順にソートを行う。さらに、AUCを0.7以上でスクリーニングすることで癌特異的に増加している蛋白質断片を抽出することができる。

本研究では脳転移を有する症例や骨転移を有する症例など、がん治療の臨床的に重要な状況を検出する蛋白質断片を探索する。

4. 研究成果

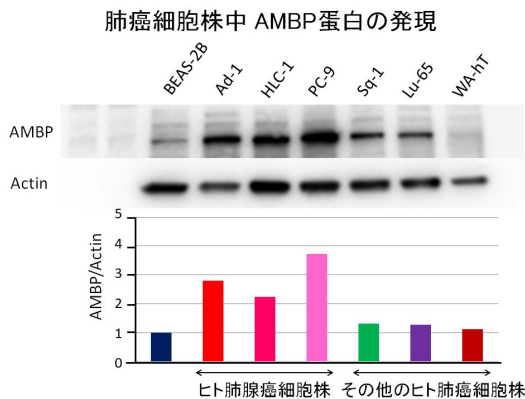
遠隔臓器への転移を有する進行肺腺癌症例を抽出してデータを再解析し、脳転移を予測する7種のマーカー候補蛋白断片を抽出した。それぞれの感度(%)は45, 45, 45, 63, 55, 45, 45であり、特異度(%)は91, 88, 88, 83, 85, 91, 88であった。また、受信者動作特性曲線における曲線下面積(ROC-AUC)はそれぞれ、0.66, 0.65, 0.65, 0.72, 0.70, 0.68, 0.68であった。

タンパク断片番号	非脳転移群との相対比	感度(%)	特異度(%)	ROC-AUC	p value
p277	12.9	45	91	0.66	0.03
p387	4.01	45	88	0.65	0.06
p1134	4.88	45	88	0.65	0.056
p1849	5.21	63	83	0.72	0.017
p2749	7.02	55	85	0.7	0.016
p3975	4.78	45	91	0.68	0.0056
p4498	1.48	45	88	0.68	0.068

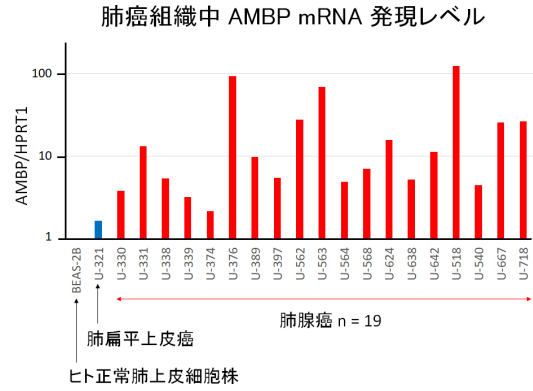
同様に骨転移を予測するマーカー候補蛋白断片を3種抽出した。それぞれの感度(%)は54, 69, 63であり、特異度(%)は90, 71, 79、ROC-AUCは、0.71, 0.70, 0.68であった。これらのマーカー候補蛋白断片を複数組み合わせることによって、より精度の高いマーカーとして機能する可能性も示唆された。

タンパク断片番号	非骨転移群との相対比	感度(%)	特異度(%)	ROC-AUC	p value
p1581	2.59	54	90	0.71	0.0013
p2421	2.04	69	71	0.7	0.0078
p10357	2.22	63	79	0.68	0.0072

これらのマーカー候補蛋白断片のシェディング前の元蛋白についても肺腺癌患者で検討したところ、血清中でも非肺癌対象者に比較して高値であるものも含まれていた。これらのマーカー候補断片蛋白断片の元蛋白の一部はアルファ-1-マイクログロブリン/ビクニン前駆体(AMBP)であった。



これらのアルファ-1-マイクログロブリン/ビクニン前駆体(AMBP)は肺癌細胞株での遺伝子発現が確認された(上図)。さらに、肺癌患者の癌組織中でも mRNA 発現が上昇していることが確認された。(下図)



アルファ-1-マイクログロブリン/ビクニン前駆体そのものは癌患者血清で上昇していることが報告されている。今後は早期肺腺癌や肺扁平上皮癌、小細胞癌についても検討を加えていく。

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)

本研究の成果の一部は今後特許申請を念頭にしているため、現時点では学会発表、論文発表は行っていません。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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〕
特になし。

6. 研究組織 (1)研究代表者

松元信弘 (NOBUHIRO MATSUMOTO)
宮崎大学 医学部 助教
研究者番号：70418838

(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
()