

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10587

研究課題名(和文) 高感度質量分析法を用いた尿ペプチドミクスによる前立腺癌の新規標的分子の探索

研究課題名(英文) The exploration of new molecular markers in urine derived from prostate cancer patients by peptidomics

研究代表者

井上 貴博 (INOUE, Takahiro)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80511881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：MALDI-TOF/MSを用いた直腸診後尿のペプチド解析では前立腺癌患者尿中に有意なピークを複数認め、その一つとして新規PSA C末断片(アミノ酸配列：YTKVVHYRKWIKDTIVANP)(以降 2331Daペプチド)を同定した。本研究ではMALDI-TOF/MSによる2331Daペプチドの定量分析系の再構築を行った。さらに2331Daペプチドの癌組織および細胞内発現をドットプロット法にて確認した。また尿中去勢低抵抗性癌のマーカー探索の基盤としてアンドロゲン依存性前立腺癌細胞株と非依存性亜株を用いた解析では、神経突起の発生や酸化還元反応に関するタンパク質の発現変化を認めた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that a C-terminal PSA fragment composed of 19 amino acid residues (YTKVVHYRKWIKDTIVANP) with 2331 Da was statistically more abundant in post-digital examination urine of prostate cancer patients compared with in that of benign prostate hypertrophy patients by using MALDI-DIT-TOF/MS. In this study we have constructed quantitative analytical methods of the peptide using commercially available MALDI TOF/MS equipment. We have also evaluated expression of the peptide in prostate cancer cell lines and prostate cancer human tissues and finally detected in prostate cancer tissues but not in prostate cancer cell lines. In order to evaluate molecular markers for castration-resistant prostate cancer, we used iTRAQ method for comprehensive analysis of proteins expressed in LNCaP and AILNCaP cells. Up-regulated proteins in AILNCaP cells belongs to neuronal projection development and oxidation-reduction process by analysis of STRING database.

研究分野：前立腺癌

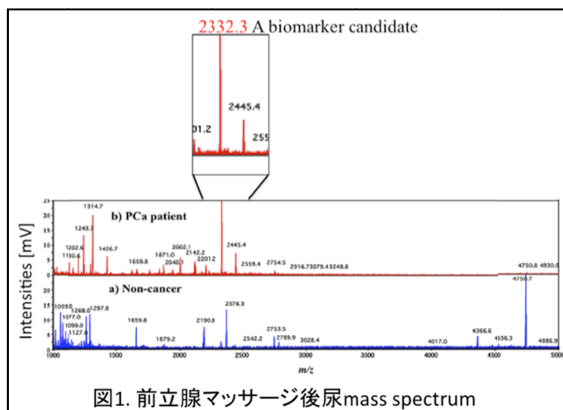
キーワード：前立腺癌 診断 質量分析

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の診断には血清 PSA (前立腺特異抗原) を測定するのが一般的であるが、PSA 値は前立腺肥大症などの良性疾患でも上昇することがある。PSA 4.0ng/mL をカットオフ値とした場合、偽陽性率が高く、不要な前立腺生検が行われていることが臨床的に問題であると考えられる。PSA が 4~10 ng/mL のグレーゾーンに該当する約 7 割の患者で、不要な前立腺生検が行われているとの報告もある。血清 PSA 検査よりも癌患者を特異的に検出できる新たなバイオマーカーが切望されている。

前立腺マッサージ後尿には前立腺を直接圧迫することで排出される前立腺特異的なたんぱく質断片やペプチド類が含まれており、その尿を解析することで前立腺がん特異的なバイオマーカーを見出すことができると考えられる。実際、前立腺がん特異的 RNA “PCA3” の前立腺マッサージ後尿中の定量解析は、米国において初回前立腺生検陰性症例の再生検の可否を決めるひとつの臨床情報として FDA に認可されている。

我々は前立腺がん患者および前立腺がんに罹患していない非がん被験者の前立腺マッサージ後尿を検体として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF/MS)を用いて網羅的ペプチド解析を実施した。その結果、**前立腺がんにおいて有意にシグナル強度を認める新規のピーク(m/z 2332)を検出した(図 1)。**



さらに m/z 2332 ピークの MS/MS 解析を実施したところ、これまで報告のない PSA の C 末端部の断片ペプチドであることが同定された。

2331Da ペプチド(m/z 2332)のアミノ酸配列: YTKVVHYRKWKDTIVANP (P243-261)
 次いで、非がん症例 19 例と前立腺がん患者 50 例について、尿中の本ペプチド(m/z 2332)量を MALDI-TOF/MS で定量する方法を見出し、比較検討した。その結果、前立腺がん群と非前立腺がん患者において、本ペプチドの存在量に有意な差があることがわかった(図 2)。(Nakayama, Inoue et al. *PLOS One*, 2014)

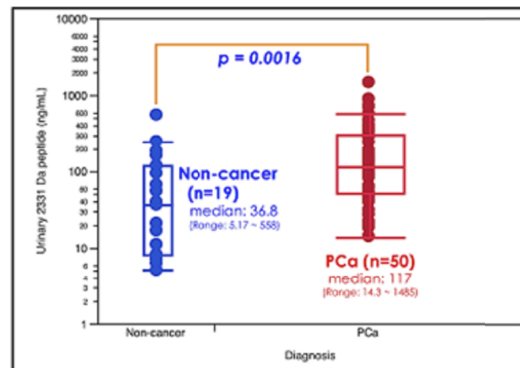


図2 前立腺がん患者では尿中 m/z 2332 が有意に増加

2. 研究の目的

- 1) 2331Da ペプチドの汎用性 MALDI-MS を用いた定量測定系の構築
- 2) 2331Da ペプチドの前立腺癌細胞・組織内発現解析
- 3) 2331Da ペプチドの N 末および C 末特異的抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法を応用した測定法の確立
- 4) 2331Da ペプチド以外の前立腺がん特異的なペプチドを検出し、同定すること

3. 研究の方法

- 1) 2331Da ペプチドの汎用性 MALDI-MS を用いた定量測定系の構築

前立腺がん(PCa)手術のために京都大学医学部附属病院に入院している術前の患者に対して、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院「医の倫理委員会」の指針に従って、インフォームドコンセント(IC)の取得を行った。IC の得られた患者について前立腺マッサージを実施し、およそ 50mL の初尿を採尿容器に採取した。尿検体の前処理、抽出法、更には、MALDI-TOF/MS を用いた定量解析法については、Nakayama et al.¹の方法に従った。定量解析に用いる安定同位体標識内部標準ペプチド(iSTD)は、MALDI-DIT-TOF/MS から AXIMA Performance (MALDI-TOF/MS) への変更に伴い、分解能がおよそ 1 桁低下したことから、+17Da 差から+23Da 差(2354Da)への+6 Da の変更を行い、ターゲットペプチドとの分離を試みた。デザインしたペプチドは、Sigma-Aldrich で AQUA peptide として合成された。アミノ酸配列は、YTKVVHY-Arg(-13C6, -15N4)-K-Trp (-13C11, -15N2)-IKDTIVANP とし、これを iSTD として定量解析を実施した。iSTD の添加量は尿検体 1000 μ L 当たり 10 μ L (100pmol) とした。

また、定量解析に伴うデータ処理では、Max Planck 研究所、Tübingen 大学、Berlin 自由大学、スイス連邦工科大学チューリッヒ校(ETH Zürich)の著名なバイオインフォマティク・グループが運営する MS データ

解析オープンソース OpenMS²⁻⁵ を活用した (図3, 参照 URL: <https://www.openms.de>)

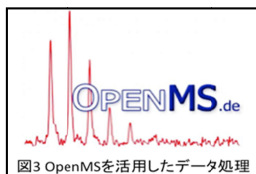


図3 OpenMSを活用したデータ処理

データ解析の流れについて図4に示した。図4のStep4で peak picking されたターゲット (m/z 2332) と iSTD (m/z 2355)の強度値を, data2d file format で export し, その比率からターゲット濃度の算出を行った。

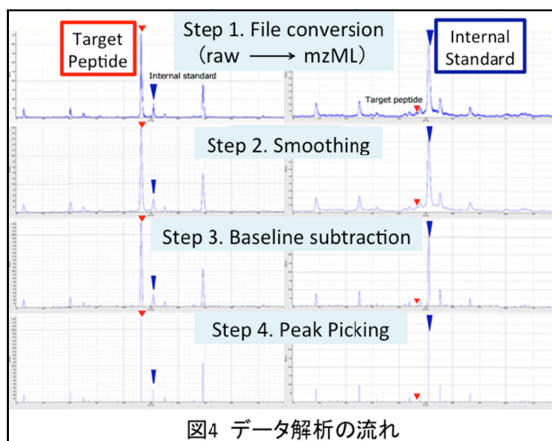


図4 データ解析の流れ

汎用機器 AXIMA Performance (MALDI-TOF/MS)による上記定量測定法を用いて、前立腺癌および BPH 患者の尿中 2331Da ペプチドの定量解析を追加して行った。

2) 2331Da ペプチドの前立腺癌細胞・組織内発現解析

前立腺マッサージ後尿中に MALDI-TOF/MS 法で PSA C 末断片 2331Da ペプチドを検出し得た症例の前立腺全摘組織から PSA C 末断片 2331Da ペプチド特異的抗体を用いた Dot blot 法で PSA C 末断片 2331Da ペプチドの検出を試みた。また MALDI-DIT-TOF/MS 法にて前立腺癌組織内での 2331Da ペプチドの検出を試みた。

また PSA を産生するヒト前立腺癌細胞株 LNCaP, VCaP, LAPC4 の細胞溶解液や当科で樹立した Patient-derived xenograft model(KUCaP-2/KUCaP-3(Terada, Inoue et al. CancerRes 2010, Yoshikawa, Inoue et al. Prostate 2016)の細胞溶解液から 2331Da ペプチドの検出を Dot blot 法および MALDI-DIT-TOF/MS 法にて検出を試みた。

3) 2331Da ペプチドの N 末および C 末特異的抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法を応用した測定法の確立

合成 2331Da ペプチドを PBS 中に様々な濃度でスパイクして検量線が書けるかどうかを検討した。また 1) 汎用機器 AXIMA Performance (MALDI-TOF/MS)による定量測定法で解析した同一の前立腺がんおよび BPH 症例の尿を用いて測定を試み、MS との

相関関係を検討した。

4) 2331Da ペプチド以外の前立腺がん特異的なペプチドを検出し、同定すること

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 (LNCaP)とそのアンドロゲン非依存性の亜株 (AILNCaP: Inoue et al. Mol Endocrinol, 2006)の培養上清液中のタンパク質を iTRAQ 試薬を用いてラベリングを行い、Nano-HPLC capillary column (Nikkyo Technos,Co.cLtd.)を用い、Easy-nLC 1000-Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) で分析を行った。得られたデータは Proteome Discoverer (Thermo Fischer Scientific)を用いて解析を行い、あらたな去勢抵抗性癌(CRPC)のターゲット分子の網羅的検索を行った。

4. 研究成果

1) 2331Da ペプチドの汎用性 MALDI-MS を用いた定量測定系の構築

定量性の確認試験を図5に示す。ボランティアの尿検体を小分けし、-80 で保存して実験に供した。室温で解凍した尿に、0pmol (0 ng/mL), 12.5pmol (29.1 ng/mL), 25pmol (58.3ng/mL), 50pmol (117 ng/mL), 100pmol (233 ng/mL), 200pmol (466 ng/mL) の合成 2331Da ペプチドを添加した6本について、全ての検体に対して一定量[10pmol/μL X 10μL]の iSTD を添加し、強度比を測定した。日間変動の有無も確認しながら二日間に亘る in triplicate の検量線の作成を行った。

この定量系にて前立腺癌 12 例、BPH15 例の 2332Da ペプチドの測定をしたところ有意差は認めなかった。

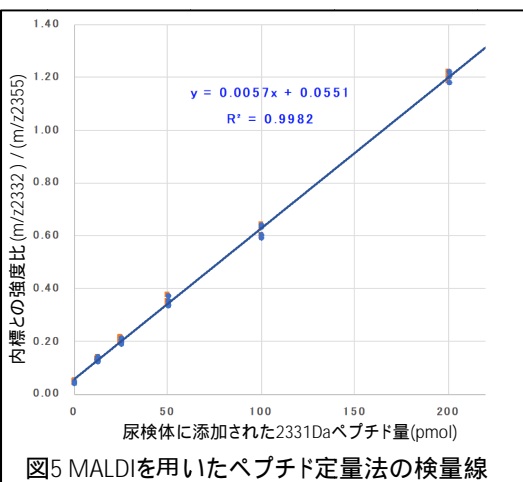


図5 MALDIを用いたペプチド定量法の検量線

2) 2331Da ペプチドの前立腺癌細胞・組織内発現解析

図6のように組織内での 2331Da の発現は Dot blot 法にて検出可能であった。したがって前立腺癌組織内で 2331Da ペプチドが発現していることは間違いないと考えられる。しかしながら尿中で検出し得た MALDI-TOM/MS では検出できなかった。

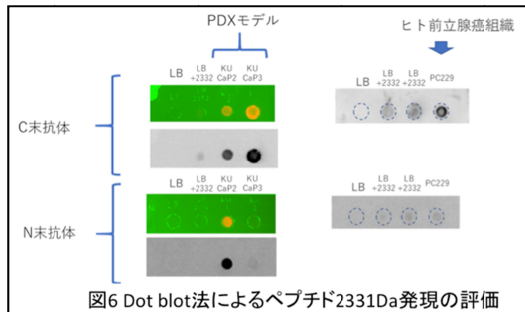


図6 Dot blot法によるペプチド2331Da発現の評価

PSA を産生するヒト前立腺癌細胞株 LNCaP、VCaP、LAPC4 では確認できなかった。KUCaP-2/KUCaP-3 の細胞溶解液においては Dot Blot 法でその発現が認められたが、MALDI-TOF/MS 法では発現が確認できなかった。

3) 2331Da ペプチドの N 末および C 末特異的抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法を応用した測定法の確立

合成 2331Da ペプチドを PBS 中に様々な濃度でスパイクして検量線を書くことはできた。しかしながら 2331Da の非常に凝集しやすい性質のために ng/ml レベルまで十分希釈して測定しないと溶解液に含まれる界面活性剤の影響で検量線は直線にならなかった。一方、実際の尿中の 2331Da ペプチドの測定は MS と関連しなかった。これは尿中での 2331Da ペプチドの多量体形成に伴う現象によるものと考えている。今後は様々な界面活性剤を用いた測定法の確立を目指す予定である。

4) 2331Da ペプチド以外の前立腺がん特異的なペプチドを検出し、同定すること

LNCaP と AILNcCaP とともに検出されたタンパク種は 1265 種であった。そのうち AILNcCaP で 1.5 倍以上の発現量増加を、0.67 倍以下の発現量減少を示したタンパク質はそれぞれ 130 種類、11 種類であった。これらの発現を

Protein analysis through evolution relationships (PANTHER) classification system、STRING database、Database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID) bioinformatics resources の 3 つのデータベースを用いて解析した。

PANTHER 解析では PCa の CRPC 変異伴う癌の進展等に関わるターゲットとの関連性を示す報告と矛盾しない結果であった(図 7)。

STRING 解析では CRPC 変異に伴い神経突起の発生や酸化還元反応を中心とする 2 つのネットワークが AILNcCaP に存在していることが明らかになった。

DAVID 解析では CRPC 変異に関わる代謝ネットワークは見いだせなかった。

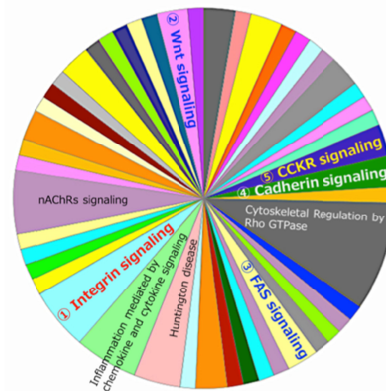


図7 PANTHER解析

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 10 件)

Kobayashi T, Kanao K, Araki M, Terada N, Kobayashi Y, Sawada A, Inoue T, Ebara S, Watanabe T, Kamba T, Sumitomo M, Nasu Y, Ogawa O. Int J Clin Oncol. 査読有, 2017 Nov 11. doi: 10.1007/s10147-017-1203-1.

Inoue T, Mizowaki T, Kabata D, Shintani A, Terada N, Yamasaki T, Negoro H, Kobayashi T, Nakamura K, Inokuchi H, Ogawa O. Recovery of Serum Testosterone Levels and Sexual Function in Patients Treated With Short-term Luteinizing Hormone-releasing Hormone Antagonist as a Neoadjuvant Therapy Before External Radiotherapy for Intermediate-risk Prostate Cancer: Preliminary Prospective Study. Clin Genitourin Cancer. 査読有, 2017 Sep 23. pii: S1558-7673(17)30284-7. doi: 10.1016/j.clgc.2017.09.009.

Terada N, Akamatsu S, Kobayashi T, Inoue T, Ogawa O, Antonarakis ES. Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. Ther Adv Med Oncol. 査読有, 2017 Aug;9(8):565-573. doi: 10.1177/1758834017719215. Epub 2017 Jul 5. Review.

Terada N, Maughan BL, Akamatsu S, Kobayashi T, Yamasaki T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O, Antonarakis ES. Exploring the optimal sequence of abiraterone and enzalutamide in patients with chemotherapy-naïve castration-resistant

prostate cancer: The Kyoto-Baltimore collaboration. *_Int J Urol*. 査読有, 2017 Apr 28. doi: 10.1111/iju.13346.

Inoue T, Terada N, Kobayashi T, Ogawa O. Patient-derived xenografts as in vivo models for research in urological malignancies. *_Nat Rev Urol*. 査読有, 2017 May;14(5):267-283

Mizuno K, **Inoue T**, Kinoshita H, Yano T, Kawanishi H, Kanda H, Terada N, Kobayashi T, Kamba T, Mikami Y, Shiraishi T, Uemura Y, Imai Y, Honjo G, Shirase T, Okumura K, Kawakita M, Ogura K, Sugimura Y, Matsuda T, Ogawa O. Evaluation of predictors of unfavorable pathological features in men eligible for active surveillance using radical prostatectomy specimens: a multi-institutional study. *_Jpn J Clin Oncol*. 査読有, 2016 Dec;46(12):1156-1161.

Terada N, Akamatsu S, Okada Y, Negoro H, Kobayashi T, Yamasaki T, Matsui Y, **Inoue T**, Kamba T, Ogawa O. Factors predicting efficacy and adverse effects of enzalutamide in Japanese patients with castration-resistant prostate cancer: results of retrospective multi-institutional study. *_Int J Clin Oncol*. 査読有, 2016 Dec;21(6):1155-1161.

Kobayashi T, Kimura T, Lee C, **Inoue T**, Terada N, Kono Y, Kamba T, Kim CS, Egawa S, Ogawa O. Subclassification of high-risk clinically organ-confined prostate cancer for early cancer-specific mortality after radical prostatectomy. *_Jpn J Clin Oncol*. 査読有, 2016 Aug;46(8):762-7. doi: 10.1093/jjco/hyw061.

Yoshikawa T, Kobori G, Goto T, Akamatsu S, Terada N, Kobayashi T, Tanaka Y, Jung G, Kamba T, Ogawa O, **Inoue T**. An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation. *_Prostate*. 査読有, 2016 Aug;76(11):994-1003. doi: 10.1002/pros.23188. Epub 2016 Apr 21.

Takahiro Inoue, Keiji Ogura, Mutushi Kawakita, Hiromasa Tsukino, Shusuke Akamatsu, Toshinari Yamasaki, Yoshiyuki Matsui, Takehiko Segawa, Yoshio Sugino, Toshiyuki Kamoto, Tomomi Kamba, Shiro Tanaka, Osamu Ogawa Effective and safe administration of low-dose estramustine phosphate for castration-resistant prostate cancer. *_Clin Genitourinary Cancer* 査読有, 2015Feb;14(1):e9-e17. doi: 10.1016/j.clgc.2015.08.008. Epub 2015 Sep 2.

〔学会発表〕(計 6 件)

宮崎有、中山憲司、井上貴博、牧野雄樹、植垣正幸、後藤崇之、岡田能幸、小林恭、寺田直樹、山崎俊成、松井喜之、神波大己、小川修「前立腺マッサージ後の尿中 PSA 濃度の検討」第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、名古屋

宮崎有、井上貴博、牧野雄樹、植垣正幸、後藤崇之、吉川武志、岡田能幸、小林恭、寺田直樹、山崎俊成、松井喜之、神波大己、小川修「前立腺マッサージ後の尿中 PSA 濃度の検討」第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015 年 04 月 18 日~2015 年 04 月 21 日、金沢

Yu Miyazaki, Kenji Nakayama, Sadanori Sekiya, Takahiro Inoue, Takayuki Goto, Naoki Terada, Yuki Makino, Masayuki Uegaki, Yoshiyuki Okada, Takashi Kobayashi, Shigeki Kajihara, Shin-ichiro Kawabata, Shinichi Iwamoto, Tomomi Kamba, Koichi Tanaka and Osamu Ogawa 「Discovery of Urinary Biomarker Candidates for Prostate Cancer Based On Proteomic analyses」, 13th Urological Association of Asia Congress 2015、2015 年 09 月 03 日~2015 年 09 月 06 日

中山憲司、甲斐力、井上貴博、宮崎有、岡所広祐、小川修「前立腺癌細胞株モデルを用いた去勢抵抗性癌への変異に関わるタンパク質の網羅的解析」第一回京都生体質量分析研究会シンポジウム、2017 年 02 月 07 日、京都

神吉智子、栗原孝成、梅本周朗、藤本大介、水本輝彦、早田学、中山 憲司、宮崎有、井上貴博、高谷宗男、小川修、向山政志「慢性腎臓尿中マーカーの開発を目指した疾患特異的な病的分子の探索ならびに化学修飾の検討」第一回京都生体質量分析研究会シンポジウム、2017 年 02 月 07 日、京都

Xin Li, Kenji Nakayama, Takahiro Inoue, Takayuki Goto, Shusuke Akamatsu, Osamu Ogawa 「Identification and Characterization of Antioxidant Additives Dissolved from Polypropylene Plastic Tubes by MALDI-TOF/MS.」第 2 回京都生体質量分析研究会シンポジウム 2018 年 2 月 3 日、京都

〔図書〕(計 3 件)

後藤崇之、井上貴博、小川 修、科学評論社、腎臓内科・泌尿器科 高解像度マ

スペクトロメトリーによる前立腺がん
脂質バイオマーカーの探索、2016、
594-598

井上貴博、小川 修、日本臨床社、前立
腺癌の基礎研究の現況、74(1)、 2016、
7-12

井上貴博、日本臨床社、新前立腺癌学 最
新の基礎研究と診断・治療 前立腺癌の
治療 放射線療法 外照射療法 再発後
の治療戦略、2016、 525-529

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

井上 貴博 (INOUE, Takahiro)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80511881

(2)研究分担者

小川 修 (OGAWA, Osamu)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90260611

(3)連携研究者

(4)研究協力者

中山 憲司 (NAKAYAMA, Kenji)
京都大学・医学研究科・研究員
研究者番号：30442494