

令和元年6月11日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05289

研究課題名（和文）高速高精度な選択反応モニタリング定量的質量分析法による大腸癌先制医療の確立

研究課題名（英文）Precision Medicine for Colon Cancer by High-throughput Analysis by Quantitative Mass Spectrometry

研究代表者

内藤 裕二（Naito, Yuji）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：00305575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は独自の血液前処理法、血清ペプチドーム解析法による探索的研究により、大腸癌患者血中で変動するペプチドを同定、5種のペプチドによるマルチマーカー解析により感度83%、特異度92%で大腸癌を検出することに成功した。本研究ではそのシーズをさらに発展させ、大腸癌のステージ毎のこのペプチドマーカーによる診断能は、それぞれステージ 感度64.3%、特異度93.3%、ステージ 感度92.9%、特異度93.3%、ステージ 感度78.6%、特異度90.0%、ステージ 感度100%、特異度95.0%と極めて高感度、高特異度であることが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的にみてもわが国の大腸癌死亡率は極めて高く、大腸癌対策は緊喫の臨床的課題であり、大腸癌の早期診断・治療・予防に向けた取り組みは極めて重要な国家戦略となりつつある。侵襲度の高い生体検査なしに血液で大腸癌を診断するリキッドバイオプシーの開発がニーズも高く重要な研究である。本研究の結果、大腸癌のステージ毎のペプチドマーカーによる診断能は、感度、特異度とも極めて高感度、高特異度であり、大腸がん検診における新たな検診の方向性を見いだす社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer (CRC) is one of the most predominant types of cancer, and it is the fourth most common cause of cancer-related death and it is important to diagnose CRC in early stage to decrease the mortality by CRC. A total of 56 patients with CRC (n = 14 each of stages I-IV), 60 healthy controls, and 60 patients with colonic adenoma were included in this study. The five peptides were extracted and analyzed by selected reaction monitoring using ProtoKey, Colorectal Cancer Risk Test Kit (Protosera, Inc., Amagasaki, Japan). The results clearly showed that the four CRC groups, stages I-IV, could be sufficiently discriminated from the control group and colonic polyp group. This five-peptide set could identify CRC at each stage compared to the control population in this validation cohort, including those with early-stage disease. The AUC values for each stage of CRC compared to the control population were 0.779, 0.946, 0.852, and 0.973 for stages I, II, III, and IV, respectively.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 バイオマーカー 早期発見 ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 早期大腸癌に対する内視鏡診断、治療は近年著しい進歩を見せ、画像強調内視鏡による診断、内視鏡的粘膜切除術（EMR）や内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）による治療が積極的に臨床応用され、当施設でも有用な結果を得ていた。しかし、わが国の大腸癌罹患率、死亡率は急増しており、国立がん研究センターによる予測では、2015年の大腸癌罹患数は135,800人（全がん中1位）、死亡数50,600人（全がん中2位）と算出され、世界的にみてもわが国の大腸癌死亡率は極めて高く（*Gastroenterology* 138:2177, 2010）、大腸癌対策は緊喫の臨床的課題であった。大腸癌の早期診断・治療・予防に向けた取り組みは極めて重要な国家戦略となりつつあった。

(2) 大腸がんの診断においては侵襲度の高い生体検査なしに血液で大腸癌を診断するリキッドバイオプシーの開発が進み、循環腫瘍細胞の検出、細胞外小胞、マイクロRNA、メチル化DNA、プロテオーム、メタボローム解析によるバイオマーカー候補も報告されているが、臨床的には確立されたものはない状況であった。生体に存在するタンパク質が癌組織特異的に分解されて産生するタンパク質断片（ペプチド）のバイオマーカーとしての意義が以前より注目されていた。申請者は、独自に開発した前処理法、高速ペプチド定量法（BLOTCHIP®-MS）さらには安定同位体標識内部標準を使用した高速高精度な選択反応モニタリング質量分析法（stable isotope dilution-selected reaction monitoring mass spectrometry：SID-SRM-MS/MS）を大腸癌バイオマーカー研究に応用してきた。特に、大腸内視鏡検査受診者を対象に、独自の前処置法による血清ペプチド定量法（BLOTCHIP®-MS）を実施し、内視鏡所見正常の健常者に比較して大腸癌で変化するペプチドを探索し、14種のペプチド断片を同定し、5種類のマルチペプチドマーカー解析により大腸癌を感度83%、特異度92%、AUC 0.924で検出できることを見だし、知財化していた。

2. 研究の目的

本研究では、SID-SRM-MS/MSによる血清ペプチド定量法を用いて、3年間の研究期間で以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) SID-SRM-MS/MS法により定量したペプチドバイオマーカーが大腸癌先制医療に利用できること
- (2) 5種のペプチドマーカーを精密微量測定可能なSID-SRM-MS/MS法が大腸腺腫、早期癌の診断、スクリーニングに有用であること
- (3) SID-SRM-MS/MS法によるHsp27、SPARC、TRRタンパク質とその修飾体の同時一括測定
- (4) 分子イメージングやペプチドワクチンに応用可能な大腸癌特異的新規ペプチドの同定

3. 研究の方法

本研究は3つの研究計画、研究計画1：大腸癌早期診断のためのマルチペプチドマーカー解析と臨床評価、研究計画2：分子イメージング法、ペプチドワクチンに応用可能な大腸癌組織特異的ペプチドの同定、研究計画3：大腸癌リスク診断のためのSPARC、TTR、Hsp27に対するSID-SRM-MS/MS解析に集約した。

(1) 研究計画1：大腸癌早期診断のためのマルチペプチドマーカー解析と臨床評価

大腸内視鏡検査受診者に対して文書による同意の後、1000例以上の臨床情報の確定した血清を用いて、ペプチド解析のための独自の血液前処置法を開発し、高速ペプチド定量法

（BLOTCHIP®-MS/MS）により、大腸内視鏡検査受診者の健常人と臨床病期Ⅱ～Ⅳ期の大腸癌ペプチドマーカー比較において、5種のペプチドによるマルチマーカー解析を実施し、高感度、高特異度で大腸癌の検出能を評価する。これら5種のペプチドマーカーのSID-SRM-MS/MSのための安定同位体標識ペプチド合成（外注予定）、ペプチド切断点のデザイン、酵素消化反応条件、高速液クロ導入条件の検討を行い5種のペプチドを高収率に再現性よく回収可能な血清前処理法を検討する。確立した5種のペプチドマーカーのSID-SRM-MS/MS法により、年齢・性をマッチングした健常人、大腸腺腫症例、早期大腸癌症例、進行大腸癌症例（各群50例を予定）に対して、ペプチド定量法を行い、後ろ向き臨床研究を実施する。さらに、すでに進行大腸癌で同定している14種の血清ペプチドについても準備を進め、大腸腺腫、早期癌の検出に有用なマルチマーカーによるSID-SRM-MS/MS法を完成させ、大腸癌先制医療への有用性を評価する。最終的には、大腸癌スクリーニング内視鏡検査受診者を対象にした前向き臨床評価、大腸腺腫、早期癌の検出に対する完成したペプチドバイオマーカーの有用性を確認するために、大腸内視鏡スクリーニング実施施設の関連施設と共同で前向き臨床試験を実施する

(2) 研究計画2：分子イメージング法、ペプチドワクチンに応用可能な大腸癌組織特異的ペプチドの同定

血清ペプチドに加えてがん組織でのペプチド解析についても研究を進める。これまでに7例の進行大腸癌患者から得た癌組織と周辺正常組織についてBLOTCHIP®-MS/MS解析によるペプチド解析を終了し、各ペプチドピークの比較解析を行い、2群間に有意差のあるペプチドピーク199個を選出している。さらにAUC値が0.8以上の27個の大腸癌特異的ペプチド候補を得ている。得られている大腸癌特異的ペプチド候補についても分子構造解析、機能解析を慎重に進め

ていく。ペプチドの中から、精密質量を確定でき、逆相クロマトグラフィーによる分画画分のMS/MS（タンデム質量分析計）分析で同定可能と考えられるm/z（質量電荷比）値が3500以下のペプチドの分子配列を同定する。症例を追加しながら最終的に2-3個の大腸癌特異的ペプチドに絞り込む。

(3) 研究計画3：大腸癌リスク診断のためのSPARC、TTR、Hsp27に対するSID-MRM-MS/MS解析
運動による大腸癌予防効果をもつ筋肉由来マイオカイン SPARCは運動によりヒト血中に増加し、予防医学領域のバイオマーカーとして期待されるが、SPARCの大腸局所での発現低下が大腸癌予後予測因子として報告された。SPARC、TTR、Hsp27タンパク質はそのものの血中濃度だけでなく、各種修飾体の存在が以前から知られており、大腸癌バイオマーカーとして確立するためにはタンパク質未修飾体ならびにその修飾体の精密な定量的測定法が必要であった。TTR、Hsp27についてはすでにその修飾体を同定しているため、安定同位体標識ペプチド合成、ペプチド切断点のデザイン、酵素消化反応条件、高速液クロ導入条件の検討を行い、計画1と同様にSID-SRM-MS/MS解析に向けた諸条件の検討を進める。これらのペプチドマーカーは大腸癌の予防戦略上のマーカーとなる可能性もあるために、動物モデル、ヒトモデルでの評価を進める。

4. 研究成果

(1) 大腸癌早期発見のためのペプチドマーカーの評価

健常人60名、大腸腺腫60名、大腸癌56名（ステージI 14名、II 14名、III 14名、IV 14名）を年齢と性をマッチングさせ、既に同定していた5種のペプチドによるマルチマーカー解析を実施した（Table 1）。5種のペプチドマーカーから大腸癌リスクインデックス（CRC risk index）を以下の式で決定し、

$$\text{Probability} = 1 / \{1 + \exp[(0.000702452 \times [\text{PDA018}] - 0.005752447 \times [\text{PDA052}] - 0.002831309 \times [\text{PDA066}] - 0.008127156 \times [\text{PDB001}] + 0.413701477 \times [\text{PDB007}] + 1.977597688)]\}$$

Fig.1で示すような、大腸癌で増加するペプチドマーカーを同定した。大腸癌のステージ毎のこのペプチドマーカーによる診断能は、それぞれステージI 感度64.3%、特異度93.3%、ステージII 感度92.9%、特異度93.3%、ステージIII 感度78.6%、特異度90.0%、ステージIV 感度100%、特異度95.0%と極めて高感度、高特異度であることが明らかとなった。

(2) 大腸癌免疫学的便潜血反応による検診との比較試験

大腸がん検診ガイドラインでは死亡率減少効果を示す十分な証拠のある検診法として免疫学的便潜血反応が推奨され、いくつかの検診機関において利用されている。そこで、大腸癌ペプチドマーカー（プロトキ®）を用いた大腸がんリスク検査の検証と題した前向きヒト臨床研究計画を本学の倫理委員会に提出した。現在、審議中であるが、すでに関連の施設3施設での同意が得られ、2019年度に本臨床研究が開始されることになった。臨床研究法などの施行もあり、本臨床計画は研究機関内に実施できなかったが、2019年度中には終了予定である。

(3) 新たな大腸癌バイオマーカーの同定

ペプチドマーカー研究を推進する中で新たな大腸癌バイオマーカー候補も同定してきた。特に、腸内細菌叢との関連において興味深いマーカーを発見した。腸内細菌叢の代謝物である短鎖脂肪酸の一つである酪酸による腸管上皮の分化増殖因子として同定したWnt-5aが、新たに大腸癌増殖抑制作用を示すことを見だし、その詳細を検討中である。さらに、腸内細菌のなかでも大腸菌に由来するコリバクチンタンパク質が新たな便中早期発見マーカーである可能性について、ヒト臨床試験計画を本学の倫理委員会に提出した。さらに、大腸癌と腸内細菌叢との関連についての解析を進めており、内視鏡鉗子により得た微量検体を用いた腸内細菌叢のメタゲノム解析法を確立し、大腸癌、大腸腺腫に存在する腸内細菌叢解析も展開している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計7件）

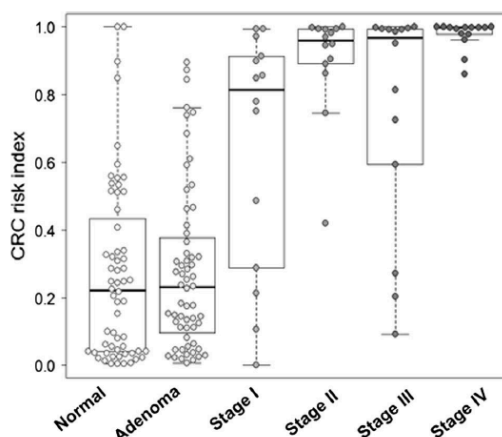


Fig. 1 Scatter plot and box plot of the probability of CRC at different stages according to the combination of five peptides obtained with the logistic model

- ① Uchiyama K, Yagi N, Mizushima K, Hirai Y, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y, Naito Y. Serum metabolomics analysis for early detection of colorectal cancer. J Gastroenterol 2017, 52: 677-694. 査読有. DOI: 10.1007/s00535-016-1261-6
- ② Uchiyama K, Naito Y, Yagi N, Mizushima K, Higashimura Y, Hirai Y, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Katada K, Kamada K, Handa O, Ishikawa T, Takagi T, Konishi H, Nonaka D, Asada K, Lee LJ, Tanaka K, Kuriu Y, Nakanishi M, Otsuji E, Itoh Y. Selected reaction monitoring for colorectal cancer diagnosis using a set of five serum peptides identified by BLOTCHIP((R))-MS analysis. J Gastroenterol 2018, 53: 1179-1185. 査読有. DOI: 10.1007/s00535-018-1448-0
- ③ Tanaka M, Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Hotta Y, Toyokawa Y, Ushiroda C, Hirai Y, Aoi W, Higashimura Y, Mizushima K, Okayama T, Katada K, Kamada K, Ishikawa T, Handa O, Itoh Y. Secreted protein acidic and rich in cysteine functions in colitis via IL17A regulation in mucosal CD4+ T cells. J Gastroenterol Hepatol 2018, 33: 671-680. 査読有. DOI: 10.1111/jgh.13842
- ④ Ueda T, Takagi T, Katada K, Iida T, Mizushima K, Dohi O, Okayama T, Yoshida N, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Ishikawa T, Konishi H, Naito Y, Nagasaki Y, Itoh Y. The protective effect of orally administered redox nanoparticle on intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. Biochem Biophys Res Commun 2017, 495: 2044-2049. 査読有. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.204
- ⑤ Kashiwagi S, Naito Y, Inoue R, Takagi T, Nakano T, Inada Y, Fukui A, Katada K, Mizushima K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Ishikawa T, Itoh Y. Mucosa-associated microbiota in the gastrointestinal tract of healthy Japanese subjects. Digestion 2019, in press. 査読有. DOI: 10.1159/000496102
- ⑥ 内藤裕二. 大腸癌と腸内フローラ. 特集 腸内フローラ研究の最前線. The GI Front 2017, 13: 18-24. 査読無.
- ⑦ 内藤裕二. 大腸癌と腸内細菌叢. 特集「腸内細菌が関与する諸疾患—腸内細菌が全身を制御する—」 Current Therapy 2019, 37: 367-373. 査読無.

〔学会発表〕 (計5件)

- ① 内藤裕二. 招待講演：大腸癌を撲滅するために内視鏡医に必要なこと～大腸癌を診る，治す，防ぐ～. 第60回日本消化器内視鏡学会東海支部例会. 2017年11月18日；岐阜.
- ② 内藤裕二. 特別講演「腸内フローラを標的とした大腸癌先制医療」. 第73回福岡ブロック大腸精検懇話会. 2017年1月14日；福岡.
- ③ 内藤裕二. シンポジウム「代謝異常と腸内細菌」 大腸癌と腸内フローラ；1次・2次予防にむけて. 第51回糖尿病の進歩. 2017年2月18日；京都.
- ④ 内藤裕二. シンポジウム「胆汁酸代謝と腸内細菌」胆汁酸・腸内細菌叢を標的とした大腸癌予防. 第39回胆汁酸研究会. 2017年11月11日；つくば.
- ⑤ 内山和彦, 八木信明, 内藤裕二. 大腸癌診断における血清ペプチドマーカーの有用性に関する検討. ワークショップ「消化器疾患のバイオマーカー研究」第105回日本消化器病学会総会. 2019年5月10日；金沢.

〔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：
 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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/reseaches/shokakan.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高木 智久
ローマ字氏名：TAKAGI, tomohisa
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：大学院医学（系）研究科（研究院）
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70405257

研究分担者氏名：半田 修
ローマ字氏名：HANDA, osamu
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：大学院医学（系）研究科（研究院）
職名：講師（特任）
研究者番号（8桁）：90381970

研究分担者氏名：内山 和彦
ローマ字氏名：UCHIYAMA, kazuhiko
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：大学院医学（系）研究科（研究院）
職名：助教
研究者番号（8桁）：50298428

研究分担者氏名：東村 泰希
ローマ字氏名：HIGASHIMURA, yasuki
所属研究機関名：石川県立大学
部局名：生物資源環境学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70628924

研究分担者氏名：吉田 直久
ローマ字氏名：YOSHIDA, naohisa
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：大学院医学（系）研究科（研究院）
職名：講師
研究者番号（8桁）：50340089

(2) 研究協力者

なし