

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07147

研究課題名(和文)新規卵巣癌診断マーカーTFPI2の基礎的性状解析

研究課題名(英文)Characterization of TFFI2, a novel diagnosis biomarker for ovarian cancer

研究代表者

荒川 憲昭(Arakawa, Noriaki)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官

研究者番号：60398394

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)：卵巣卵巣明細胞癌(OCCC)に特異的な血清バイオマーカーであるTFPI2は、妊婦胎盤においても増加する。本研究では、胎盤由来TFPI2とOCCC由来TFPI2の分子性状に違いがあるかどうかを明らかにするために、TFPI2の結合糖鎖を質量分析法により比較解析した。培養した胎盤絨毛栄養膜細胞とOCCC細胞株からTFPI2を精製し、結合糖鎖を解析した結果、胎盤型TFPI2はLacNAcを骨格に持つ糖鎖、OCCC由来TFPI2の糖鎖は、LacdiNAc構造を骨格に持つ糖鎖を有しており、胎盤型とOCCC型とでは異なる糖鎖を有することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の組織型の中でも、卵巣明細胞癌(OCCC)は、抗がん剤に対する抵抗性が高く予後が悪い。TFPI2はOCCCの血清診断に有用なバイオマーカーとして期待されているタンパク質であるが、妊婦の血清中でも増加するため、妊婦とOCCC患者を見分けることができない。本研究では、TFPI2に結合している糖鎖を解析し、妊婦胎盤で作られるTFPI2とOCCCが作るTFPI2の違いを明らかにした。本研究で得られた知見は、診断特異性の高い卵巣癌診断法の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) is a serum biomarker candidate for ovarian clear cell carcinoma (OCCC), a highly lethal histological subtype of ovarian cancer. TFPI2 is also known to be a placental specific Kunitz-type protease inhibitor that is exclusively expressed in the blood of pregnant women. In this study, to clarify the difference between TFPI2 produced from OCCC and placenta, the glycan structure of TFPI2 from cultured placental cells and OCCC cell lines were analyzed by mass spectrometry. The analysis revealed that OCCC-derived TFPI2 has bi-antennary complex type glycans with the LacdiNAc structure, unlike the placental cell-derived TFPI2 that preferentially attaches to bi-, or tri-antennary glycans with the LacNAc structure. Similar results were confirmed in the analysis of serum from pregnant women. This finding may allow the development of a new method for highly specific detection of OCCC.

研究分野：プロテオーム解析

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 バイオマーカー TFPI2 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌組織型の中でも、卵巣明細胞癌 (OCCC) は、欧米人と比べて日本人に多い。OCCC は抗がん剤に対する抵抗性が高く、他の組織型の卵巣癌よりも予後が悪い。そのため、OCCC を治療するには、早期発見することが重要とされている。卵巣癌の代表的な診断マーカー CA125 は、OCCC では低値を示すことが多く、また OCCC の発生母地である子宮内膜症でも高値になるため、OCCC を術前に検出、診断することは、他の組織型の卵巣癌よりも難しい。そのため、OCCC の診断法の改善が必要とされている。

本研究代表者らは卵巣癌細胞株の培養上清のプロテオーム解析により、OCCC 細胞が tissue factor pathway inhibitor (TFPI)2 を特徴的に分泌発現しており [Arakawa, N. *et al. J. Proteome Res.* 2013]、これが本疾患の血清診断マーカーとして有用性が高いことを明らかにした。TFPI2 は3つの Kunitz 型プロテアーゼインヒビタードメイン (Kunitz domain, KD) を有するセリンプロテアーゼインヒビターであり、元来、胎盤タンパク質 5 (placental protein 5) として呼ばれたこともあり、妊婦血中においても増加する [Miyagi, Y *et al. J. Biochem.* 116, 939-942 (1994)]。そのため、現在のところ、TFPI2 測定による OCCC の検査は、妊娠している女性には適応できないことが考えられる。

ヒト TFPI2 には KD2 (Asn116) と KD3 (Asn170) に N 型糖鎖結合配列 (NXS/T) が存在し、げっ歯類を除く哺乳類に共通して保存されている。しかしながら、TFPI2 の結合糖鎖の構造については解析例がなく、OCCC 由来の TFPI2 は当然のこと、胎盤由来の TFPI2 でさえも明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、質量分析装置を用いた糖ペプチド解析技術を用いて、OCCC と胎盤、二つの異なる組織から産生される TFPI2 の結合糖鎖の種類とその分布を調べ、両者に相違点があるのかどうか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. サンプル調製

卵巣明細胞癌細胞株 4 種 (OVISe, OVManA, OVASAYO, RMG-11) およびヒト胎盤絨毛栄養膜 (Human Villous Trophoblast, HVT) をそれぞれ推奨培地を用いて培養した。ヘパリン処理により得られた培養上清から、抗ヒト TFPI2 マウスモノクローナル抗体を用いて免疫沈降反応を行い、TFPI2 を精製した。TFPI2 は SDS-PAGE にて分離を行い、ゲル染色により検出されたバンドを、グアニジン塩酸を用いた方法により、還元、アルキル化、トリプシン消化を行った。

2. LC/MS/MS 測定

トリプシン消化ペプチドは、ナノ LC システムを連結した Q Exact ive 質量分析装置 (Thermo Scientific 社) にて分析した。得られた質量分析データを、Thermo Proteome Discoverer を使って、データベース (Uniprot) から予測される理論値と実測値を照合し、修飾部位を決定すると同時に、糖ペプチドおよび糖タンパク質の同定を行った。TFPI2 の KD2 (Asn116) と KD3 (Asn170) を含む N 型糖鎖結合ペプチド $^{113}\text{YFFNLSSMTCEK}^{124}$ (KD2-pep) および $^{163}\text{DEGLCSANVTR}^{173}$ (KD3-pep) について、これらのペプチドに GlcNAc が結合したイオンの m/z 値を用いて抽出したイオンクロマトグラムにより、糖ペプチドのプ

ロダクトイオンスペクトルを探索した。診断イオンの検出、主要フラグメントイオン同士の間隔を確認することにより、糖ペプチド由来のプロダクトイオンスペクトルであるかどうかを判断した。次に、糖ペプチドのプリカーサーイオンの質量から、ペプチド部分の質量を考慮することで、糖鎖単体の質量を算出し（脱糖鎖酵素の加水分解反応により遊離する糖鎖の質量）GlycoMod tool を用いて糖鎖組成を算出後、Consortium for Functional Glycomics(CFG) データベースを用いて構造推定を行った。推定した構造に基づいて、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルの帰属を行い、推定した構造とスペクトルパターンが一致するかを確認した。確認後、糖ペプチドのプリカーサーイオンの m/z 値 (Monoisotopic mass) で抽出イオンクロマトグラムを抽出した。その後、精密質量と質量間隔から糖ペプチドのプリカーサーイオンの価数と同じ価数のグリコフォームを探索した。

4 . 研究成果

4 - 1 . TFPI2 のトリプレットバンド、 α 、 β 、 γ の糖鎖修飾状態

図 1 は、HVT 細胞と 4 種類の OCCC 由来細胞株から得られた TFPI2 を IP-ウェスタンブロットにて比較解析した結果である。いずれの細胞においても、 α 、 β 、 γ のトリプレットバンドが検出された。各バンドのトリプシン消化物の質量分析装置による解析、および PNGase を用いた一連の分析により、 α バンドは KD3 および KD2 の両方の糖鎖修飾体、 β バンドには KD3 あるいは KD2 のいずれか一方の糖鎖修飾体が混在しており、 γ バンドは未糖鎖修飾体であることが分かった。

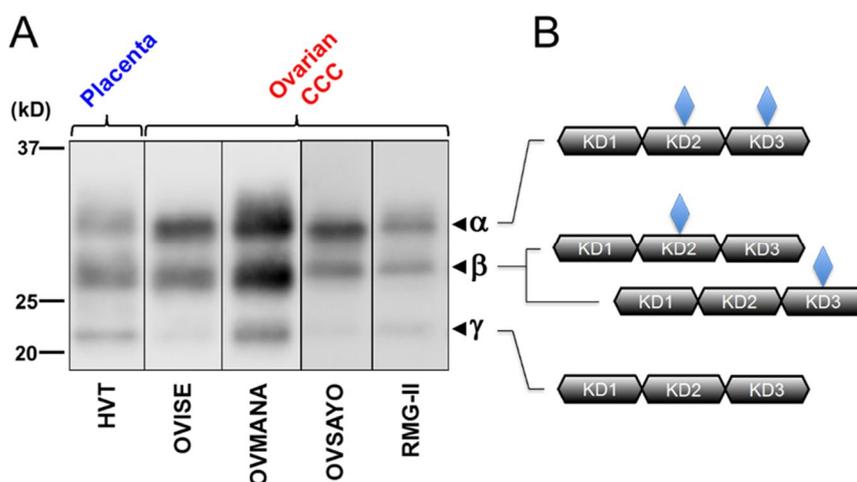


図 1 . 各細胞から検出される TFPI2 糖鎖修飾体

4 - 2 . TFPI2 の糖鎖構造解析

HVT 細胞および OCCC 由来細胞株に発現する TFPI2 の糖鎖の構造を明らかにするために、 α と β のバンドについて、質量分析データの詳細な解析を行った。図 2 に、HVT、OVISe および OVMA から検出された KD3-pep の代表的な糖鎖修飾体の概要を示す。検出された糖ペプチドの質量に基づいて、まず GlycoMod tool と CPG データベースを用いて糖鎖の組成計算および構造予測を行った。HVT から代表的に検出された糖ペプチド (計算質量 : 3572.35 Da) の結合糖鎖の質量は 2350.82 Da と算出され、これは Hex5 HexNAc4 dHex1 NeuAc2 (理論値 : 2350.83 Da) の質量に一致した。この組成を CPG データベースに照合した結果、その構造は LacNAc (LN) と呼ばれる Gal-GlcNAc 構造を有した典型的なバイアン

テナ型の複合型糖鎖であると予想された。これに対して、OVISE (計算質量: 3654.43 Da) および OVMANA (計算質量: 3364.33 Da) の代表的糖ペプチドの結合糖鎖は、2432.90 Da および 2142.80 Da と算出され、両方とも LacdiNAc (LDN) と呼ばれる GaINac-GlcNAc 配列をアンテナに有する構造が推測された。この推測された構造を支持するかたちで、図 2 のプロダクトイオンスペクトルには、LDN 基 (GaINac-GlcNAc + H⁺) の質量に一致する *m/z* 407.17 のシグナルが OVISE と OVMANA に共通して見られ、また他の OCCC 由来細胞株でも見られたことに対し、HVT 細胞では見られなかった。したがって、*m/z* 407.17 のシグナルは、N 型糖鎖に共通するキトビオスコア (GlcNAc-GlcNAc) に由来するシグナルではなく、LDN 基に由来するシグナルに帰属できると考えた。さらに、LDN の異型であるシアリル化体やフコシル化体である sialy-LDN 基 (LDNS 基、NeuNAc-Gal-GlcNAc) や、fucosyl-LDN 基 (LDFN 基、GaINac-(Fuc-)GlcNAc) に相当するシグナルとして、*m/z* 値 657.23 や *m/z* 値 553.22 のシグナルが、それぞれ対応する糖ペプチドに特徴的に検出されており (図 2) 推定された構造がプロダクトイオンスペクトルから正しく帰属できることを確認した。

すべての細胞の TFPI2 の バンドおよび バンドについても、一連の解析を行い、OCCC 由来細胞株の TFPI2 の および バンドから優先的に検出される KD3-pep および KD2-pep の結合糖鎖は、アンテナに LDN 配列を有するバイアンテナ型糖鎖が帰属され、OCCC 由来 TFPI2 は LDN 構造を高い割合で有していることが明らかになった。

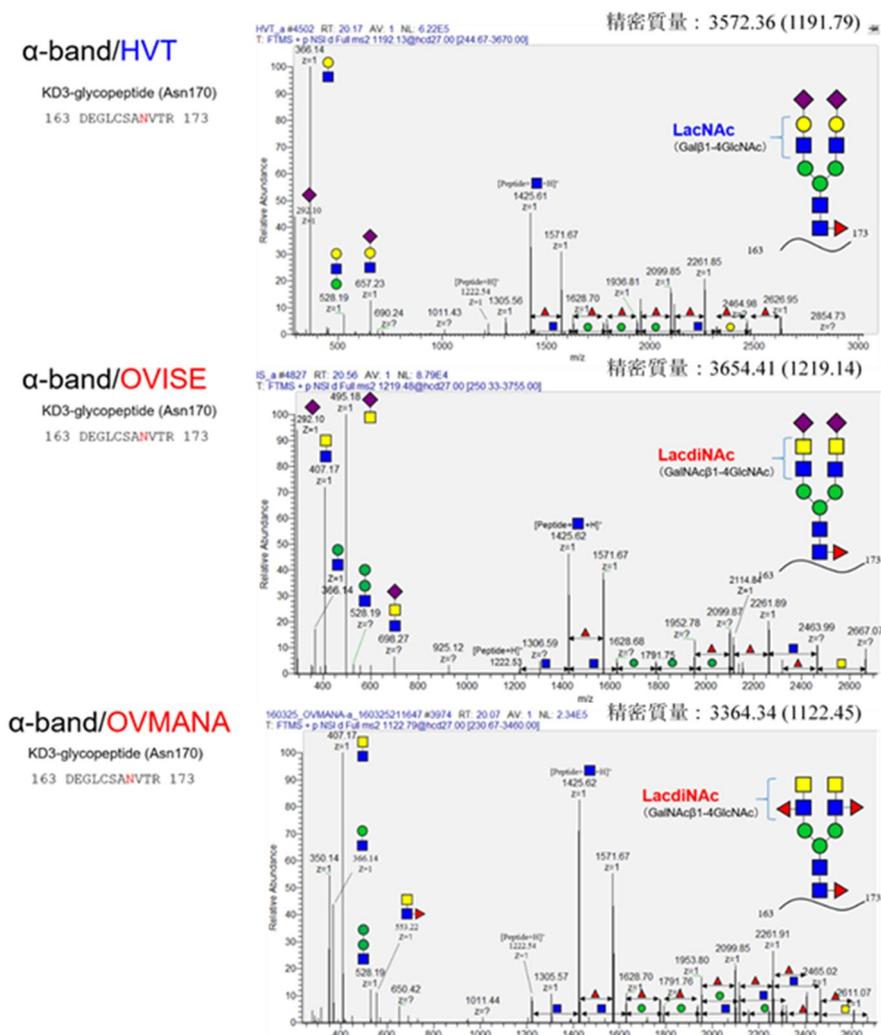


図 1: TFPI2 糖ペプチドの代表的なプロダクトイオンスペクトル

4 - 3 . TFPI2 の糖鎖構造多様性の比較

各細胞から検出される TFPI2 の結合糖鎖の構造多様性と発現パターンを明らかにするため、構造決定した糖ペプチドの類縁である糖鎖修飾体を探索した。図 3 は、各細胞から構造決定された KD3-pep の糖鎖修飾体の m/z 値 1040 - 1240 の範囲でマスクロマトグラムを抽出し、分類されるグリコフォームと検出されるシグナル強度に基づいて作成した、TFPI2 の KD3 の結合糖鎖プロファイルである。同一の細胞であれば、バンドとバンドでは差異はほとんど認められず、きわめてよく似たパターンを示した。HVT 細胞からは、様々な糖鎖が検出されるものの、構造を分類すると、すべてのアンテナが LN 構造を有するバイアンテナ型 (Bi-LN) もしくはトリアンテナ型糖鎖 (Tri-LN) が、強いシグナルで検出されることが特徴的であった。一方で、OCCC 細胞株からは、LDN を有するバイアンテナ型糖鎖 (Bi-LDN) が、4 種の OCCC 細胞に共通して検出されることが特徴的であった。同様に、KD2 においても OCCC では LDN 糖鎖が優先的に検出された。

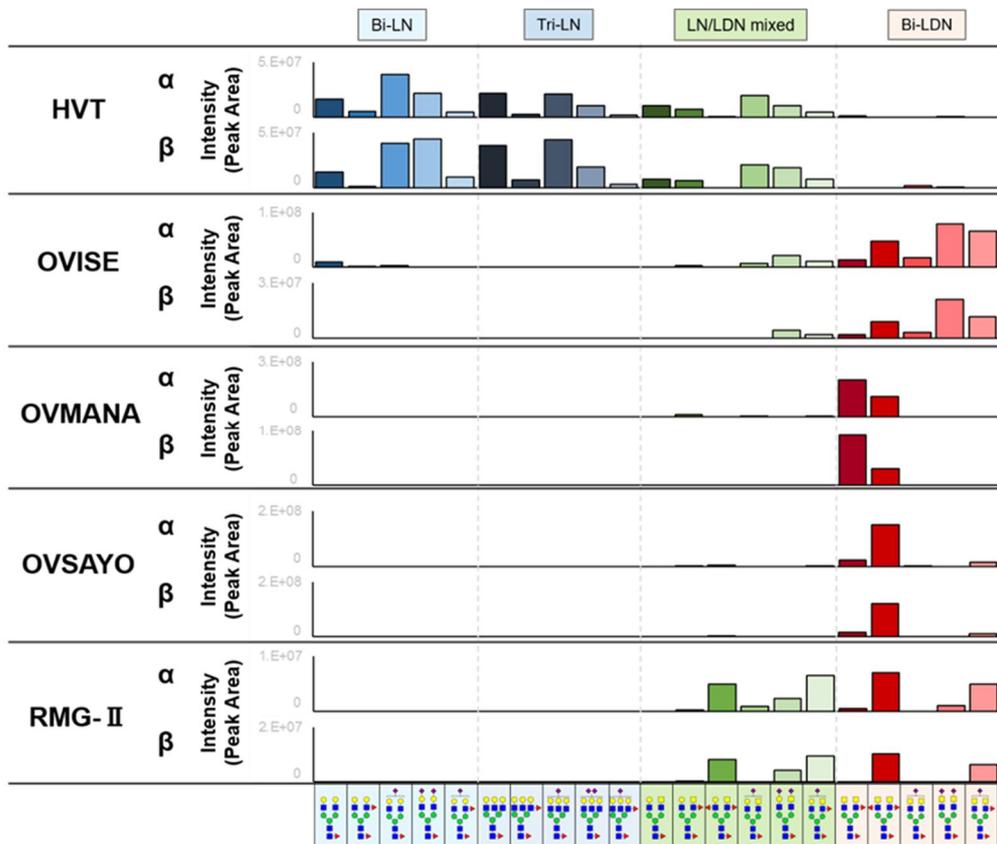


図 3 : TFPI2 の KD3 の結合糖鎖プロファイル

4 - 5 . まとめ

ヒト胎盤細胞が産生する TFPI2 からは、LacNAc (LN) 構造が優先的に検出されるのに対し、OCCC 由来細胞株の TFPI2 では、LacdiNAc (LDN) を有する糖鎖が特徴的に結合しており、胎盤とがん細胞で TFPI2 の結合糖鎖に違いがあることが明らかとなった。今後、OCCC 患者血清を用いた検証が必要であると思われるが、TFPI2 の糖鎖構造を明らかにした例は今のところ他になく、本研究が初めての例である。本研究で得られた知見は、診断特異性の高い卵巣癌診断法の開発に役立つと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宮城 悦子・荒川 憲昭・ルイズ 横田 奈朋・最上 多恵	4. 巻 通巻17号 6(4)
2. 論文標題 卵巣明細胞癌の血液凝固異常・抗癌剤耐性に着目したトランスレーショナルリサーチ	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 別冊BIO Clinica 6/4 産婦人科領域と炎症	6. 最初と最後の頁 xx
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama U, Arakawa N, Ishiwata R, Yasuda S, Minami T, Goda M, Uchida K, Suzuki S, Matsumoto M, Koizumi N, Taguri M, Hirano H, Yoshimura K, Ogino H, Masuda M, Ishikawa Y.	4. 巻 315(4)
2. 論文標題 Proteomic Analysis of Aortic Smooth Muscle Cell Secretions Reveals an Association of Myosin Heavy Chain 11 With Abdominal Aortic Aneurysm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol.	6. 最初と最後の頁 H1012-H1018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00329.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arakawa N, Kobayashi H, Yonemoto N, Masuishi Y, Ino Y, Shigetomi H, Furukawa N, Ohtake N, Miyagi Y, Hirahara F, Hirano H, Miyagi E.	4. 巻 11(10)
2. 論文標題 Clinical Significance of Tissue Factor Pathway Inhibitor 2, a Serum Biomarker Candidate for Ovarian Clear Cell Carcinoma	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0165609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0165609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ino Y, Arakawa N, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, Hirano H, Toda T.	4. 巻 16(7)
2. 論文標題 Phosphoproteome Analysis Demonstrates the Potential Role of THRAP3 Phosphorylation in Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 1069-1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.201500365	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒川憲昭、岡部美妃、高倉大輔、平野久、川崎ナナ
2. 発表標題 卵巣明細胞癌と妊婦胎盤が賛成するTFPI2の糖鎖構造比較解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 荒川憲昭、上村博司、伊藤悠亮、井野洋子、明庭昇平、大竹則久、矢野正祐、平野久
2. 発表標題 セクリトーム解析による去勢抵抗性前立腺癌のバイオマーカーの開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 疾患特異的な組織因子経路インヒビター2の糖鎖構造の利用	発明者 荒川憲昭、高倉大輔、川崎ナナ、大竹則久	権利者 横浜市立大学・東ソー
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-22398	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川崎 ナナ (Kawasaki Nana)	横浜市立大学大学院生命医科学研究科	
研究協力者	高倉 大輔 (Takakura Daisuke)	横浜市立大学大学院生命医科学研究科	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	宮城 悦子 (Miyagi Etsuko)	横浜市立大学医学部産婦人科	