

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591772  
 研究課題名（和文） プロテオミクスの手法を用いた腎細胞癌新規腫瘍マーカー蛋白の探索  
 研究課題名（英文） Searching for new biomarkers of Renal cell carcinoma based on proteomic approach.  
 研究代表者 岩村 正嗣（IWAMURA MASATSUGU）  
 北里大学・医学部・講師  
 研究者番号：20176564

研究成果の概要:プロテオミクスの手法を用いて腎癌に特異的な腫瘍マーカー候補蛋白質を探索した。腎癌組織を用いた研究と腎癌細胞株の培養上清を用いた研究を施行し、最終的に 2 種類の腎癌に関連した報告例のないタンパク質を確認することが出来た。今後、この 2 種類のタンパク質については、腫瘍マーカーとしての有用性の検討や機能解析、そして既知の癌関連因子との相関も含め検証していく。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌、プロテオミクス、腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌においては、根治可能な早期での診断、手術が予後を改善するうえで最重要となる。早期の、根治可能な腎細胞癌に特徴的な症状はなく、早期診断、治療効果判定に有効な特異的な腫瘍マーカーもない。現在までいくつもの予後予見因子、腫瘍マーカーが報告されてはきたが、それらの多くは進行癌の関連因子であり、腎細胞癌の早期診断、治療効果判定や術後再発のマーカーとして有用なものは皆無である。また、腎細胞癌では術後 10 年以上の長期を経た再発・転移も稀ではないことから、有用な予後予見因子を確立することは、重点的に観察を要する患者を選択し不必要な検査を減らすことで医療費の削減に寄与するものと期待される

## 2. 研究の目的

プロテオミクス解析技術を用いて腎細胞癌の新規腫瘍マーカー候補蛋白を探索することを目的とする。プロテオーム解析は、ポストゲノム時代の基盤となる新しい分野であり、病態により異常な挙動を示す多数のタンパク質を網羅的に検出し、その病態の直接的な原因となるタンパク質を同定し、その機能を解明する新たな解析方法である。この方法により、従来の遺伝子学的手法だけでは不可能であったタンパク質の翻訳後修飾を確認することも可能で、遺伝子レベルでは変化を認めない病態の解明に有効であるとされている。今回の研究では腎癌組織と正常組織からタンパク質

を抽出し、アガロース二次元電気泳動法で展開、挙動異常のあるタンパク質を解析することを目的とし遂行した。また同時に腎癌患者尿と非腎癌患者尿（健常者尿）においても同様な検討を行う予定であったが、尿は定量比較することが困難であるため、まず腎癌培養細胞における培養上清中のタンパク質を SDS-PAGE 法で展開し、体液中に放出される可能性のあるタンパク質を解析し、腎癌に特異的なタンパク質を同定することを目的とし遂行した。ここにその結果を報告し、諸賢の御意見と御批判を仰ぎたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腎癌組織におけるプロテオーム解析

##### ① アガロース二次元電気泳動法

同一の腎臓から採取した腎細胞癌組織 (Clear cell type) と正常腎組織をタンパク抽出液とともにホモジナイズし、タンパク質を抽出した。抽出液をアガロース二次元電気泳動法により展開し、癌組織と正常組織のそれぞれから得られたゲルのパターンを比較し、個々のタンパク質の発現量の違いを比較検討した。ゲル上で発現量に差が認められたタンパク質については、酵素的ゲル内消化を施行後、質量分析計によりタンパク質を同定した。

②新規マーカー候補タンパク質における検証  
腎癌で発現が増加したタンパク質については、抗体を購入しウエスタンブロッティング法により多検体での検証を施行した。

##### (2) 細胞上清におけるプロテオーム解析

①当初、癌患者の術前と術後の尿、そして正常尿（患者と同年代の健常者より採取したもの）で発現プロテオームの変化を解析する予定であったが、タンパク量の差が大きく解析が困難であった。このため腎癌培養株の培養上清における検討をまず施行した。腎癌細胞株 769-P を継代し、コンフルエントになった時点で無血清培地に変え、48 時間後にその培養上清を回収した。回収した培養上清を脱塩・濃縮し SDS-PAGE にてゲル上に展開した。電気泳動によって得られたバンドを 2mm 間隔で切り出し、タンパク質を同定した。同定されたタンパク質のうち、腎癌との関連性がすでに報告されているものを除外し、新規マーカー候補タンパク質を選定した。

②ウエスタンブロッティング法による検証  
新規腫瘍マーカー候補タンパク質については、抗体を購入しさらに 6 症例の癌組織と正常組織についてウエスタンブロッティング法により検証した。

### ③免疫組織化学染色法による検証

ウエスタンブロッティング法により癌と正常組織間で発現に差が確認されたタンパク質については病理学的に腎細胞癌 (clear cell type) と確認された 10 症例で免疫組織化学染色法による検証を施行した。

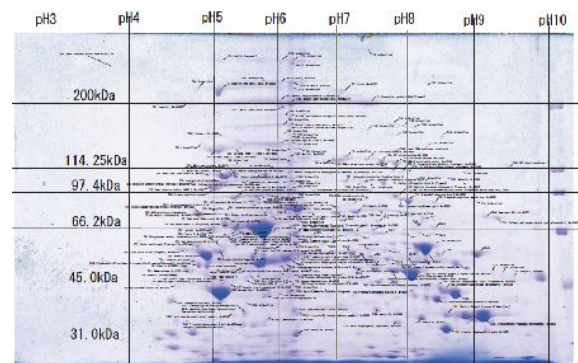
### 4. 研究成果

#### (1) 腎癌組織におけるプロテオーム解析

##### ①アガロース二次元電気泳動法によるディフュージョンディスプレイ

図 1 のようにアガロース 2 次元電気泳動法で腎癌組織、腎正常組織のマッピングを作成し、比較検討を施行した。腎細胞癌組織、正常腎細胞組織のそれぞれの組織で 300 個以上のスポットをゲル上で検出することができ、66 kDa 以上の高分子量タンパク質領域では 34 個の相違が見られた。これらのスポットについて酵素的ゲル内消化 Enzymatic in-gel digestion を行い、LC-MS/MS でタンパク質を同定した。本検討においては(1)解糖系と TCA サイクルに関わる複数の酵素に増減、(2)細胞接着に関わるアクチン結合タンパク質に増減、(3)ビタミン作用のある葉酸の合成に関する酵素が減少、(4)糖新生に関わる酵素が欠失が確認された。これより腎細胞癌では、エネルギー代謝が変化するとともに、細胞骨格と細胞接着に変化が生じていることが確認された。そのなかで腎細胞癌組織で増加した 5 種類のタンパク質、すなわち ATP-citrate synthase、6-phosphofructokinase type C、Annexin A6、Lamin-B1、Plastin-L を新規腫瘍マーカー候補とした。

図 1 Proteomic map of renal cell carcinoma by Agarose 2-DE



②新規マーカー候補タンパク質における検証  
 上記 5 種類の新規腫瘍マーカー候補タンパク質についてウェスタンブロッティング法により検証した。組織での検討では、plastin-Lのみ癌組織で発現が上昇しているのが確認された。他の 4 種類においては有意差は得られなかった。Plastin-Lについては、血清、尿においてそれぞれ検証したが癌患者と健常者において有意な差は認められなかった。

(2) 細胞上清におけるプロテオーム解析

①同定されたタンパク質については以下に示すとおりである。

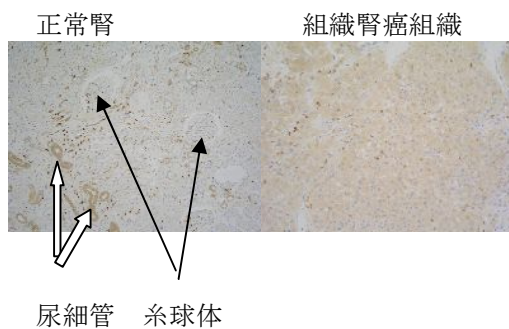
この同定されたタンパク質のうち、Amyloid beta A4 protein、ProSAAS、Cadherin-2、Profilin-1

についてウェスタンブロッティング法にて組織による発現を比較検討した。その結果、Profilin-1 においてのみ有意に癌で発現が上昇した。

②免疫組織化学染色

Profilin-1 で腎癌組織、正常組織を免疫組織化学染色した結果、癌部で有意に Profilin-1 の発現が上昇していることが確認された。正常腎組織においても腎糸球体は染色されないが、尿細管は染色された。腎癌組織においては細胞膜から細胞質にかけて染色され、正常組織と腎癌組織の染色性に大きな違いがあることが確認された。10 症例において検討を行ったが、Profilin-1 の染色性については再現性が得られた。今後、更に多検体において検証を行っていくのと同時に、clear cell type 以外の腎癌組織における発現についても検証していく予定である。

図 2 免疫組織化学染色 (Profilin-1)



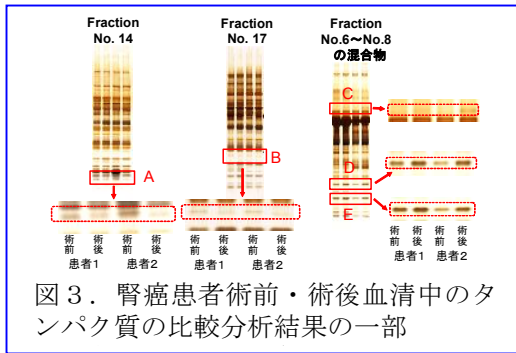
腎正常組織においては、主に尿細管が染色されるが、癌組織では癌細胞の細胞質を中心に

染色されているのが確認された。

(3)血清中の診断マーカータンパク質の探索

血清は多くの生物学的情報を含んでいる。従って、血清中のタンパク質を調べることにより、病気の早期発見につながる情報を得ることができる。しかし、血清中に存在する 22 種類の高存在量タンパク質が総タンパク量の 99% を占めており、残り 1% 中に数 1,000 種類のタンパク質が存在する。さらに、これらのタンパク質の濃度分布は mg/mL から pg/mL と非常に広く、その中における組織由来のタンパク質の濃度は数 μg/mL 以下といわれている。そのため、癌のマーカー候補となる腫瘍由来のタンパク質を検出するためには、多くの高濃度タンパク質に隠れた微量タンパク質を詳細に比較分析する必要がある。我々は分担研究者の小寺を中心に血清中の診断マーカータンパク質ならびにペプチドを探索するための方法の開発を行っている。前者に関してはまず血清アルブミン・免疫グロブリンを除去カラムで除去後、残りの数 1,000 種類のタンパク質を逆相 HPLC で分画し、その各分画物を電気泳動法 (SDS-PAGE または二次元電気泳動法) で比較分析する (本報告書に記載の主要な発表論文 4)。後者に関しては、独自の高効率な抽出法で抽出したペプチド混合物を逆相 HPLC で細かく分画し、それぞれを質量分析する (PCT/JP2008/002168 (特願 2007-206602)、日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会シンポジウム発表)。いずれも分画の再現性を高めることに成功し、詳細な診断マーカー候補の探索が可能となっている。

本研究では前者のタンパク質分析法を腎癌患者の手術前後の血清の比較分析に応用した (図 3 に結果の一部を示す)。その結果、術後に減少するタンパク質 3 種類、増加するタンパク質 4 種類の探索に成功した。減少するタンパク質の 1 つは既に腎癌患者血清中で報告されているタンパク質であったが、残りの 2 つは腎癌患者血清中での報告例はない。その中の 1 つは卵巣明細胞腺癌の腫瘍で過剰発現することが確認されており、今回探索に用いた血清が腎癌の中で最も多い淡明細胞癌の患者血清であったことから考えると、淡明細胞癌特異的なマーカーとなり得る可能性があることがわかった。



#### (4) 今後の展望

我々は(1)腎癌組織、(2)腎癌培養細胞、(3)腎癌患者血清を対象にプロテオーム解析による診断マーカーの探索を行った。現時点においては(1)、(2)より2種類のタンパク質(Plastin-L、Profilin)を新規腫瘍マーカー候補とした。また、(3)については、腎癌手術に伴って減少する2つの興味深いマーカー候補を探索することに成功した。

Plastin-Lは、白血病における報告はあるが固形癌での報告はない。Profilinは膵臓癌の培養上清中で減少するとの報告があるが腎癌との関連については報告例はない。今回の検討においては両タンパクとも血清、尿とともに腎癌と非腎癌患者において十分に検出されず、有意差は得られなかった。抗体の感度等の問題も考えられ、今後ELISA法での検証も含め多検体で検証を行う予定である。また機能解析や遺伝子レベルでの発現も検討し、腎癌との関連性をさらに検討し発展させていく予定である。

血清の分析で検出した2種類のマーカー候補タンパク質については、現在、抗体を入手してウェスタンブロッティングによる診断応用可能性の評価を開始している。今後、様々なステージの約100例の癌患者血清ならびに健常者血清に対して小規模な評価を行い、診断マーカーとしての有用性がある程度確認できた段階でELISA系を構築し、詳細な評価を行う予定である。

#### 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4件)

- (1) Kawashima, Y., Fukuno T., Satoh M., Takahashi H., Matsui T., Maeda T. and Kodera Y., A simple and highly reproducible method for discovering

potential disease markers in low abundance serum proteins *J. Electrophoresis*, in press. (査読あり)

- (2) Oh-Ishi M., Kodera Y., Furudate S., Maeda T. Disease proteomics of endocrine disorders revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl* **2**: 327-337, 2008.(査読あり)

- (3) Okusa H., Kodera Y., Oh-ishi M., Minamida M., Tsuchida M., Kavoussi N., Matsumoto K., Sato T., Iwamura M., Maeda T. and Baba S. (2008) Searching for new biomarkers of bladder cancer based on proteomic analysis. *J. Electrophoresis*, **52**, 19-24, 2008(査読あり)

- (4) Sawada A., Ueno T., Kawashima Y., Haruta-Satoh E., Oh-Ishi M., Kodera Y. and Maeda T. (2008) Protein Carbonyl Detection by Two-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis, *J. Electrophoresis*, **52**, 1-17, 2008(査読あり)

[学会発表] (計12件)

- (1) 大石正道, 二井祥仁, 小寺義男, 前田忠計, 大草洋, 松本和将, 藤田哲夫, 岩村正嗣, 馬場志郎 一次元目にアガロースゲルを用いた二次元電気泳動(アガロース2-DE)法とLC-MS/MSを組み合わせた腎細胞癌の高分子量プロテオーム解析 第58回日本電気泳動学会総会 2007.11.9(山口)
- (2) Oh-Ishi M., Nii Y, Kodera Y., Okusa H., Fujita T., Iwamura M., Baba S, Maeda T. High molecular mass proteomics of human renal cell carcinoma by 2-DE using agarose gels for IEF (Agarose 2-DE) and HPLC/MS/MS HUPO 6<sup>th</sup> Annual World Congress 第6回国際ヒトプロテオーム機構年会 2007.10.9(Seoul, Korea : 韓国, ソウル)
- (3) Okusa H., Kodera Y., Kondo R, Matsumoto K, Iwamura M., Oh-Ishi M., Baba S, Maeda T. Urinary proteomics of high-molecular-mass

- proteins by 2-DE with agarose gels in the first dimension (Agarose 2-DE) and LC-MS/MS Human Kidney & Urine Proteome Project HUPO 6<sup>th</sup> Annual World Congress 第6回国際ヒトプロテオーム機構年会 2007.10.6 (Seoul, Korea : 韓国, ソウル)
- (4) 大石正道, 二井祥仁, 小寺義男, 大草洋, 藤田哲夫, 岩村正嗣, 馬場志郎, 前田忠計 アガロース 2-DE と LC-MS/MS によるヒト腎細胞癌の疾患プロテオミクス 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会 2007.7.31 (東京)
- (5) 大石正道, 二井祥仁, 大草洋, 藤田哲夫, 岩村正嗣, 馬場志郎, 小寺義男, 前田忠計 アガロース 2-DE を用いたヒト腎細胞癌プロテオミクスにおけるサンプル調製法改良の重要性 第3回日本臨床プロテオーム研究会 2007.4.28(東京)
- (6) Oh-Ishi M, Okusa H, Nii Y, Matsumoto K, Iwamura M, Kuruma H, Kodera Y, Maeda T, Baba S: Disease proteomics of high-molecular-mass proteins by two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension (Agarose 2-DE). Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan 第5回東アジア生物物理学シンポジウムおよび第44回日本生物物理学会年会 2006.11.15. (沖縄県宜野湾市)
- (7) Nii Y, Oh-Ishi M, Okusa H, Matsumoto K, Iwamura M, Kuruma H, Kodera Y, Maeda T, Baba S: Renal cell carcinoma proteomics by agarose two-dimensional gel electrophoresis and LC-MS/MS. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan 第5回東アジア生物物理学シンポジウムおよび第44回日本生物物理学会年会 2006.11.15. (沖縄県宜野湾市)
- (8) 二井祥仁, 大草洋, 松本和将, 岩村正嗣, 馬場志郎, 大石正道, 小寺義男, 前田忠計 アガロース二次元電気泳動による腎細胞癌の疾患プロテオーム解析 第4回北里疾患プロテオーム研究会 2006.8.4. (相模原)
- (9) 近藤涼二郎, 大草洋, 小寺義男, 大石正道, 松本和将, 馬場志郎, 前田忠計: 尿のプロテオーム解析法の開発 第4回北里疾患プロテオーム研究会 2006.8.4. [相模原]
- (10) 仁井祥仁, 大草洋, 岩村正嗣, 馬場志郎, 小寺義男, 大石正道, 前田忠計: アガロース二次元電気泳動法による腎細胞癌の疾患プロテオーム解析. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会・第2回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 2006.7.19 (東京)
- (11) 近藤涼二郎, 大草洋, 小寺義男, 大石正道, 松本和将, 馬場志郎, 前田忠計: 尿のプロテオーム解析法の開発 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会・第2回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 2006.7.19. (東京)
- (12) 大石正道, 前田忠計: より多くの高分子タンパク質解析をめざしたアガロース 2-DE 用試料調製法の改良 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会・第2回日本臨床プロテオーム研究会連合大会 2006.7.18. (東京) 相模原

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩村 正嗣 (IWAMURA MASATSUGU)

北里大学医学部・講師

研究者番号: 20176564

### (2) 研究分担者

藤田 哲夫 (FUJITA TETSUO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 00306599

大草 洋 (OKUSA HIROSHI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 70337963

前田 忠計 (MAEDA TADAKAZU)

北里大学・理学部・教授

研究者番号: 90265728

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号: 60265733

大石 正道 (OISHI MASAMICHI)

北里大学・理学部・講師

研究者番号: 40233027