

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19590365

研究課題名 (和文) 神経内分泌肺癌の網羅的プロテオーム解析

研究課題名 (英文) Exhaustive proteome analyses of pulmonary neuroendocrine carcinomas

研究代表者

佐藤 雄一 (SATO YUICHI)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30178793

研究成果の概要 (和文)：様々なプロテオミクス手法を駆使し、肺癌診断に有用なマーカータンパク質の獲得を目指した。**1. 抗体プロテオミクス**：腫瘍組織もしくは細胞を直接免疫する、所謂ランダム免疫法により、肺癌、膀胱癌細胞と反応する単クローン性抗体を合計 1,522 個作製した。この中で、肺腺癌 (AD) 細胞と特異的に反応する抗 RACK1 抗体を樹立し、その性状を報告した。この抗体により、PACK1 の発現は臨床病期、腫瘍径、リンパ節転移と逆相関しており、新たな肺癌のマーカーとして有用であることを報告した。**2. Secretome 解析**：大細胞性神経内分泌肺癌 (LCNEC) 由来細胞株 LCN1 の培養上清中の腫瘍由来ペプチドを、独自の培養上清の精製法を駆使して解析した。その結果、神経内分泌細胞由来の VGF nerve growth factor inducible (VGF) の N 末側の 40 と C 末側の 19 このアミノ酸からなるペプチドを見出した。このペプチドは、神経疾患のある患者の髄液中にも、同一のペプチドが見出されており、神経内分泌肺癌の新たな血清中のマーカーとなる可能性が示唆された。**3. 二次元電気泳動法による腫瘍抗原の解析**：神経内分泌癌である小細胞癌 (SCLC) と LCNEC 腫瘍由来の細胞株を用いて、二次元電気泳動法で発現に相違のあるタンパク質の解析を行った。その結果、cytokeratin (CK) 7, 8, 18, 19 を含む両方で発現量に相違のある 25 のタンパク質を同定した。さらに、CK 7, 8, 18, 19 に対する抗体を用いて、各種肺癌組織を免疫染色した。その結果、二次元電気泳動法の結果と同じく、4 つの CK とも SCLC に比して LCNEC で有意に発現が亢進していることが明らかとなった。**4. 肺癌患者血清中の自己抗体解析**：肺癌細胞を二次元展開し、肺癌患者血清を一次抗体として用いる方法で、腫瘍特異的自己抗体の解析を行った。その結果、SCLC と LCNEC を鑑別可能な villin-1 に対する自己抗体を見出した。

研究成果の概要 (英文)：I describe recent results of the search for pulmonary neuroendocrine carcinoma markers with diverse proteome techniques.**1. Exhaustive monoclonal antibodies production**: We generated monoclonal antibodies using cells derived from pulmonary carcinomas as an immunogen. From a group of obtained antibodies, present described antibody for the receptor of activated C kinase 1 (RACK1). The expression RACK1 was significantly high and frequent in adenocarcinomas but was barely detected in a few squamous cell carcinomas and large cell carcinomas. Moreover, RACK1 expression was also significantly associated with the pathological stage, tumor size and lymph node status of adenocarcinoma patients. These results suggest that RACK1 may be a novel differential diagnostic marker for pulmonary adenocarcinomas. **2. Detection of peptides in the conditioned medium from carcinoma cell lines**: Aiming to identify new markers of pulmonary neuroendocrine tumors, we analyzed comprehensively analyzed peptides which were secreted into the conditioned medium by LCN1, an LCNEC line. Two peptide fragments of 40 and 19 amino acid residues were identified by MALDI-TOF/TOF MS. These two fragments were demonstrated to be parts of VGF. RT-PCR analysis of lung cancer cell lines showed that *vgf* was expressed only in neuroendocrine carcinoma-derived cells. Our data suggest that VGF can be a novel sero-diagnostic marker of pulmonary neuroendocrine tumors. **3. Application of**

two-dimensional gel electrophoresis: We studied the proteomic approach using cell lysate from two cell lines (N231 derived from small cell lung carcinoma (SCLC) and LCN1 derived from pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC)) with two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and MULDI-TOF/TOF MS. Within the 25 identified proteins, cytokeratins (CK) 7, 8, 18 and 19 were up-regulated in LCN1 cells compared with N231 cells. Their expressions were studied immunohistochemically with 81 pulmonary carcinomas. The mean immunostaining scores of CK7, 8, 18, and 19 were significantly higher in LCNEC cases than in SCLC. These data suggest that the biological characteristics of LCNEC and SCLC may be different and the expressions of CKs may serve as differential diagnostic markers. **4. Detection of autoantibodies in sera of patients with lung cancer:** To detect autoantibodies (AAs), sera from SCLC patient was screened by immunoblotting using cell lysate of four cell lines. To identify the antigens recognized by AAs, two-dimensional gel electrophoresis was immunoblotted and target spots were cut out from the membrane and gel. By this method, villin1 was identified with AA in sera from patients with SCLC. Villin1 may be useful markers to distinguish LCNEC/AD from SCLC/SCC, and the present method might be useful to identify specific tumor-associated molecules in sera from pulmonary carcinoma patients with different histologic types.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腫瘍のプロテオミクス解析

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺癌、腺癌、小細胞癌、大細胞性神経内分泌癌、二次元電気泳動、自己抗体、単クローン性抗体、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

肺癌は肺癌とともに難治性癌の代表であり、本邦では男性癌死の第1位、女性でも2位を占めている。この肺癌では、初診時すでにstage III以上の進行癌であることが多いこと、化学療法としてはプラチナ製剤を基本とした多剤併用療法が用いられているが、その効果は依然として不十分であることなどが、予後不良な原因と考えられている。現在、悪性腫瘍の早期診断には放射線被爆を伴う画像診断や侵襲性のある内視鏡検査が主として行われている。侵襲を伴わない検査として血清腫瘍マーカーも用いられているが、癌の早期診断に有用なマーカーは数少ない。また、抗癌剤感受性に関与する分子として幾つかの報告はあるが、特定の抗癌剤に対する個々の患者の感受性を予測する分子の解析は遅れており、感受性の有無にかかわらず共通のプロトコールで治療されているのが現状である。

2. 研究の目的

この研究では、肺癌患者の予後の大幅な改善を目指し、北里大学で独自に開発もしくは発展させた二次元電気泳動法、ペプチド精製・探索法、ランダム免疫法を用いた腫瘍特異的タンパク質に対する単クローン性抗体作製法、患者血清中の自己抗体解析法など、最新のプロテオーム解析法を多角的に駆使して、患者血清中の新規の早期診断マーカー、肺癌組織亜型や臨床病期に関連したマーカー、抗がん剤感受性予測マーカーを網羅的に獲得することを、第一の目的とする。候補マーカーは、さらにバイオインフォマティクスの手法を用いて、有用分子を絞り込むことを第二の目的とする。将来的には抗体チップ、プロテインアレイの作製、ELISA系の構築へと進め、診断、抗がん剤感受性の予測など実際の診療に役立てたい。

3. 研究の方法

(1)腫瘍特異的単クローン性抗体の作製には精製抗原は免疫源とせず、腫瘍細胞や組織を直接免疫源に用いる、所謂ランダム免疫法 (Hirohashi et al. *Gann* 75: 485, 1984) を用いて行い、同じ細胞を免疫染色するスクリーニング方法で抗体を選別している。肺腺がん由来細胞株 A549 を直接免疫源に用い、スクリーニングにも AMeX 固定やホルマリン固定しパラフィン包埋した A549 細胞を免疫染色することにより、腫瘍細胞と反応する単クローン性抗体を作製し、樹立した抗体の肺腺がん (AD) との反応性を免疫組織化学的に検討した。

(2)神経内分泌肺がんの新たな早期診断マーカーの獲得と同時に大細胞性神経内分泌がん (LCNEC) と小細胞がん (SCLC) を鑑別出来るマーカーの獲得を目指して、無血清培地で維持している LCNEC 由来細胞株 LCN1 細胞から分泌されるペプチドを網羅的に独自の方法で精製し解析した。まず、培養上清は脱塩と濃縮を行い、RP-HPLC 装置を用いて分画した。それぞれの分画で培養上清にのみに見られるペプチドのピークは MALDI-TOF MS と MALDI-TOF/TOF MS で解析した。見出した VGF 分子が LCNEC 細胞だけに存在するの否か確認するために 11 種類の肺癌細胞株を用いて、VGF mRNA の発現を RT-PCR 法で確認した。

(3)SCLC と LCNEC のタンパク質発現を比較する目的で、SCLC 由来細胞株 N231 と LCNEC 由来細胞株 LCN1 は二次元電気泳動法 (2-DE) 法で比較した。さらに、同定された CK7, 8, 18, 19 に対する抗体を用いて肺がん組織を免疫染色した。

(4)肺癌患者血清中の腫瘍関連自己抗体の有無をそれぞれ 1 例の AD 患者、SCLC 患者血清を一次抗体として、各種肺癌細胞株を対象に免疫ブロット法で検出した。明らかなバンドが認められた血清と細胞株のペアを使用し、再度細胞株を agarose 2-DE で展開し PVDF 膜に転写後、患者血清を一次抗体として二次元免疫ブロット法で反応するスポットを PVDF 膜と対応するゲルから切り出し、トリプシン消化後 LCMS/MS で抗体が認識するタンパク質名を同定した。

4. 研究成果

(1)A549 の細胞質と強く反応する抗体を樹立し、この抗体が認識する抗原タンパク質は receptor of activated C kinase (RACK1) であることを確認した。さらに、この抗体の肺癌組織における有用性を免疫組織化学的に検討した。その結果、RACK1 の発現は腫瘍細胞と気管支上皮細胞の細胞質に認められた。RACK1 の発現は 123 例中 77 例 (62.6%) の AD、44 例中 3 例 (6.8%) の扁平上皮癌 (SCC)、4 例中 1 例 (25.0%) の大細胞がん (LCC)、7 例全例陰性 (0%) の SCLC、6 例中 3 例 (50.0%)

の LCNEC に認められた。また、それぞれの平均染色スコアは 2.9、0.1、0.8、0、1.9 であった。AD の陽性率と平均染色スコアは SCC に比して、統計的有意差を持って高い傾向を示した ($p < 0.0001$)。さらに、RACK1 の染色性は臨床病期 ($p = 0.0042$)、腫瘍径 ($p = 0.0074$)、リンパ節転移 ($p = 0.0009$) と統計学的有意差を持って、逆相関していた。RACK1 は肺腺癌の予後因子と相関した新たな腫瘍マーカーである可能性がある。

(2)MALDI-TOF MS、MALDI-TOF/TOF MS で解析した結果、2つの神経細胞や内分泌細胞に認められる VGF 由来のペプチド断片を見出した。ISH 法の結果、VGF の発現は 8 例中 7 例の LCNEC、SCLC 等の神経内分泌肺がん細胞株で認められた。しかし、AD や SCC 由来細胞株では発現が認められなかった。この分子は、新たな神経内分泌肺がんのマーカーになる可能性がある。

(3)SCLC と LCNEC 由来細胞株の 2-DE ではそれぞれ 2,000 以上のタンパク質スポットに展開された。両細胞株で発現量に 2 倍以上の相違の認められるスポットは 25 個認められた。その中で、cytokeratin (CK) 7, 8, 18, 19 の発現は SCLC 由来 N231 細胞に比して LCNEC 由来 LCN1 細胞では、それぞれ 4.6 倍、27 倍、17 倍、3.3 倍亢進していた。さらに、この CKs に対する抗体を用いて 81 例の各種肺癌組織における CKs の発現も検討した。その結果、LCNEC におけるそれぞれの CK の陽性率、染色スコアは AD のそれらと類似していた。また、4つの CK のうち 2つもしくは 3つ以上でそれぞれの染色スコアが 8 以上の症例は LCNEC でそれぞれ 28 例中 18 例 (64.3%) と 14 例 (50.0%) であり、SCLC では 28 例中それぞれ 1 例 (4.2%) と 0 例 (0%) であり LCNEC と SCLC の間には統計学的有意差が認められた (それぞれ $p = 0.0000072$, $p = 0.000052$)。以上の結果より、SCLC と LCNEC は生物学的特徴が異なっており、CK7, 8, 18, 19 は SCLC と LCNEC の鑑別に有用なマーカーである可能性が示唆された。

(4)AD 患者血清と反応した分子量が 45 kD 付近で等電点が 5.6-5.8 のタンパク質は cytokeratin 18 (CK18) であり、SCLC 患者血清と反応した分子量 90 kD 付近で、等電点が 6.2-6.4 のタンパク質は villin1 であることが確認された。さらに、CK18 と villin1 に対する抗体を購入し、肺癌細胞株との免疫ブロット法を行った結果、患者血清で認められたバンドと同じ位置にバンドが認められ、同定したタンパク質が正しいことを再確認した。さらに、124 例の肺癌組織を用いて、CK18 と villin1 の発現を免疫染色法で検討した。その結果、CK18 は 42 例全例 (100%) の AD、23 例中 17 例 (73.9%) の SCC、29 例中 28 例 (96.6%) の SCLC、30 例中 29 例の LCNEC、2 例全例 (100%) の大細胞癌 (LCC) に陽性を示し、平均染色

スコアはそれぞれ 10.9, 2.6, 6.1, 8.2 であり、AD で最も高く SCC で最も低い傾向を示した。AD における平均染色スコアは統計学的有意差を持って SCC や SCLC より高い傾向を示した (どちらも $p < 0.001$)。同様に、LCNEC における平均染色スコアは統計学的有意差を持って SCC や SCLC より高いことも明らかとなった (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.01$)。一方、villin1 の発現は 44 例中 17 例 (38.6%) の AD、34 例中 21 例 (61.8%) の LCNEC、28 例中 1 例 (3.6%) の SCLC に認められた。SCC では全例陰性であった。Villin1 の細胞膜上での発現は AD や SCLC では認められなかったが、61.9% の LCNEC では明瞭な細胞膜上での染色像が認められた。Villin1 と CK18 は LCNEC と AD から SCLC と SCC を鑑別するために有用なマーカーとなることが明らかとなった。今回示した方法は、肺癌患者血清中から腫瘍特異的マーカーを見出すのに油様な方法であろう。

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. Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Goshima N, Jiang SX, Okayasu I. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* (in press, online published) (査読あり)
2. Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang SX, Okayasu I. Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. *Pathol Int* 60: 71-77, 2010 (査読あり)
3. Matsumoto T, Kawashima Y, Nagashio R, Kageyama T, Kodera Y, Jiang SX, Okayasu I, Kameya T, Sato Y. A new possible lung cancer marker: VGF detection from the conditioned medium of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma-derived cells using secretome analysis. *Int J Biol Markers* 24: 282-285, 2009 (査読あり)
4. Nagashio R, Sato Y, Jiang SX, Ryuge S, Kodera Y, Maeda T, Nakajima T. Detection of tumor-specific autoantibodies in sera of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 62: 364-373, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 27 件)

1. 佐藤雄一、五島直樹 ランダム免疫法を用いた腫瘍特異的単クローン性抗体の作製

と血清、尿中の腫瘍特異的自己抗体の網羅的解析 創薬イノベーションフォーラム 2009 2009.12.15 東京

2. 佐藤雄一 成果発表 4 「自己抗体を活用した効率的な特定のがんの総合診断システムの開発の概要」 木原記念横濱生命科学振興財団 研究開発事業成果報告会 2009 2009.11.26 横浜

3. Sato Y, et al. The exhaustive search for tumor markers with various proteome techniques. 7th Kitasato Symposium for Disease Proteomics. 2009. 7.26 Sagami-hara

4. 影山泰平、佐藤雄一他 肺組織における IMMT の有用性 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2009.9.27 大津

5. 松本俊英、佐藤雄一他 肺神経内分泌癌における Hu antigen C の発現 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2009.9.27 大津

6. 松本俊英、佐藤雄一他 神経内分泌肺癌患者血清中の早期診断可能な自己抗体の検出 日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回大会 2009.7.28 東京

7. 影山泰平、古内美穂、松本和将、佐藤雄一、岡安 勲 ランダム免疫法によるモノクローナル抗体の作製と腫瘍におけるその有用性 日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回大会 (東京) 2009.7.27

8. 石田誠司、佐藤雄一他 神経内分泌肺癌組織における KU-L-10 抗体の有用性について 第 98 回日本病理学会総会 2009.5.2 京都

9. 松本俊英、佐藤雄一他 肺神経内分泌癌における VGF の発現について 第 98 回日本病理学会総会 2009.5.2 京都

10. 長塩 亮、佐藤雄一他 肺癌組織における Calnexin の有用性について 第 98 回日本病理学会総会 2009.5.2 京都

11. 小林 信、佐藤雄一他 肺癌患者血清中の腫瘍特異的自己抗体としての抗 AMF 抗体の有用性 第 98 回日本病理学会総会 2009.5.2 京都

12. 影山泰平、佐藤雄一他 肺癌における抗癌剤感受性予知マーカーとしての IMMT の有用性 第 98 回日本病理学会総会 2009.5.2 京都

13. 大西美帆子、佐藤雄一他 肺癌静脈血を用いた腫瘍マーカーの獲得 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2008.10.5 長崎

14. 石田誠司、佐藤雄一他 肺大細胞性神経内分泌癌と強い反応を示す KU-L-10 抗体の有用性について 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2008.10.5 長崎

15. 松本俊英、佐藤雄一他 肺神経内分泌細

胞株を用いた培養上清の解析とその応用
第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会
2008.10.5 長崎

16. 大西美帆子、佐藤雄一他 肺癌静脈血を用いた腫瘍マーカーの獲得 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 15 金沢

17. 影山泰平、佐藤雄一他 大細胞性神経内分泌癌におけるシスプラチン感受性予知マーカーの網羅的探索 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 15 金沢

18. 松本俊英、佐藤雄一他 神経内分泌肺癌細胞株の培養上清を用いた secretome 解析 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 17 金沢

19. 長塩 亮、佐藤雄一他 腫瘍マーカーとしての肺癌患者血清中の腫瘍特異的自己抗体 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 17 金沢

20. 佐藤雄一他 AMeX 固定・細胞標本を用いた単クローン性抗体作製の有用性について 第 97 回日本病理学会総会 2008. 5. 15 金沢

21. 松本俊英、佐藤雄一他 神経内分泌肺癌細胞株を用いた無血清培養上清のプロテオーム解析 - 新規血清診断マーカー獲得へのアプローチ 第 58 回日本電気泳動学会総会 2007.11.9 宇部

22. 影山泰平、佐藤雄一他 肺大細胞性神経内分泌癌細胞株 LCN1 におけるシスプラチン感受性に関与する分子のプロテオーム解析 第 58 回日本電気泳動学会総会 2007.11.9 宇部

23. 長塩亮、佐藤雄一他 肺癌組織における RACK-1 の発現とその有用性について 第 58 回日本電気泳動学会総会 2007.11.9 宇部

24. 松本俊英、佐藤雄一他 大細胞性神経内分泌肺癌の早期診断に有用な低分子量タンパク質の探索 第 96 回日本病理学会総会 2007.3.14 大阪

25. 影山泰平、佐藤雄一他 シスプラチン耐性とした肺大細胞性神経内分泌癌細胞におけるタンパク質の変化 第 96 回日本病理学会総会 2007.3.14 大阪

26. 佐藤雄一他 肺癌組織と末梢肺組織で反応性が異なる単クローン性抗体の有用性について 第 96 回日本病理学会総会 2007.3.15 大阪

27. 長塩亮、佐藤雄一他 肺腺癌の診断に有用な抗体の網羅的作製 第 96 回日本病理学会総会 2007.3.15 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 雄一 (SATO YUICHI)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30178793