

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790393

研究課題名（和文） 包括的プロテオーム解析による原発性肝細胞癌の診断

研究課題名（英文） The serum proteome analysis for discovery of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma.

研究代表者

氏 名（ローマ字）：曾川 一幸 (SOGAWA KAZUYUKI)

所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50436440

研究成果の概要：

原発性肝細胞癌診断に用いる腫瘍マーカーは画像診断に及ばなく、新たなマーカーの探索が急務である。ペプチド解析では、原発性肝細胞癌患者術前後血清 8 組（計 16 検体）を使用し、ClinProt™ system で解析を行った。Pre-platelet basic protein の分解産物は術前で著しく発現増大した。タンパク質解析では、同血清を使用し、血清中のメジャータンパク質 12 種類を除去し、逆相 HPLC で分画した後、各フラクションを二次元電気泳動で解析した。apolipoprotein J は術前で著しく発現増大した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

わが国の年間の原発性肝細胞癌による死亡者数は3万人を超えている。また、わが国では約200万人のC型肝炎ウイルスキャリアが存在すると推定されており、原発性肝細胞癌による死亡者の約8割がC型肝炎ウイルス感染に由来していると考えられ、わが国で原発性肝細胞癌対策を考える際にはC型肝炎ウイルス感染との関係が重要となる。またわが国に限らず欧米諸国においてもB型肝炎ウイルス感染ではなくC型肝炎ウイルス感染とそれ由来の原発性肝細胞癌が問題になっている[Niederau C., et al., *Hepatplogy* 28, 1687-1695, 2003]。

原発性肝細胞癌の早期診断体系において、現在利用されている腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3, PIVKA-II) はその診断効率において超音波検査などの画像診断に及ばないのが現状であり、新たなマーカーの探索が急務である。

2. 研究の目的

研究代表者は新たな観点から新規腫瘍マーカーを探索するための方法の開発を行った。血清中のメジャータンパク質12種類 (Albumin, IgG, Transferrin, Fibrinogen, IgA, α 2-Macroglobulin, IgM, 1-Antitrypsin, α 1-acid Glycoprotein, Apolipoprotein A-1, Apolipoprotein A-2) を高効率で再現性良く除去し、マイナータンパク質を抽出する方法。もう1つは血清中の低分子タンパク質・ペプチドをアルブミンなどのキャリアタンパク質の影響を受けず、迅速 (数10血清の同時進行可能、待ち時間を合わせて約4時間) に高効率で再現性よく抽出する方法である [Fukutomi T., et al., *J. Electrophoresis*

49, 15-21, 2005]。

本研究はこの2つの方法をもとに、疾病特異的に発現量の変動を受ける血清中のタンパク質・ペプチドを探索し、腫瘍マーカー候補タンパク質・ペプチドの同定、既存のマーカーとの比較を行う。原発性肝細胞癌の早期発見、再発予測を行うための既存腫瘍マーカーより感度・特異度のよいアッセイ系の構築を最終的な目的としている。

3. 研究の方法

(1) 血清中のペプチド解析

ペプチド抽出において大きな問題点は、高分子量タンパク質の除去に伴いペプチド成分も大きく損失する点である。これはペプチドがアルブミン、グロブリンなどのキャリアプロテインと結合しているためと考えられる。様々な条件検討の結果、キャリアプロテインの影響を受けずに高効率で再現性良く、血清中のペプチドを抽出する方法を用いる。

血清から抽出したペプチドは逆相HPLCにより溶媒流速200 μ l/minで0.5min毎に60フラクション分画する。そして各フラクション1 μ lをMALDI-TOF MSで測定し、発現解析を行いマーカー候補ペプチドを探索する。

マーカー候補ペプチドの同定は、分子量が3,000以下のペプチドでヒトタンパク質データベース上にあるペプチドに関しては、例えタンパク質の断片であっても使用しているMALDI-TOF MSのタンデムMS (MS/MS) 測定で同定することが可能である。

(2) 血清中のタンパク質解析

血清中にはAlbuminやIgGなど22種類のタンパク質が全体の99%の存在量を占めているため、わずか1%に含まれているタンパク質を検出するのは困難である。従って、あら

はじめメジャータンパク質を除く必要がある。Proteome Lab Ig-Y column (Beckman Coulter社) を用い、メジャータンパク質12種類を高効率で再現性良く除去する方法で、マイナータンパク質を抽出する。

血清中から抽出したマイナータンパク質は、2D-DIGE法を行い、Shimadzu 2D Evolution 解析ソフトウェアを用いて発現解析を行う。手術前後で有意に発現量の異なるスポットを切り出し、トリプシンによる in gel 消化後、イオントラップ型 LC-MS/MS 装置 (ThermoQuest 社 LCQ-Deca) にて部分アミノ酸配列を解析後、SEQUEST Program を用いてタンパク質を同定する。

(3)新規腫瘍マーカー候補タンパク・ペプチドのバリディーション

原発性肝細胞癌の新規腫瘍マーカータンパク質・ペプチド候補の妥当性を検討するため、原発性肝細胞癌患者手術前後血清20組を用いて行う。新規腫瘍マーカー候補タンパク質に関しては、抗体を購入もしくは作成し、Western blottingにより確認する。新規腫瘍マーカー候補ペプチドに関しては、抗体を購入もしくは作成し、免疫沈降を行い、MALDI-TOF MSで測定し確認する。

(4)新規腫瘍マーカー候補タンパク・ペプチドと既存マーカーとの比較

原発性肝細胞癌の早期診断血清検査において、現在利用されている腫瘍マーカーはAFP, AFP-L3, PIVKA-IIであるが、感度・特異度ともに満足いくものではない。内科・外科と連携することにより、疾患プロテオーム解析で問題となる試料の採取条件、保存条件の揃っている臨床データのある健常人血清、原発性肝細胞癌患者血清各 50 例を対象にして、新規腫瘍マーカーと既存腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3, PIVKA-II) とを比較検討する。

4. 研究成果

(1) 血清中のペプチド解析

原発性肝細胞癌患者術前後血清 8 組 (計 16 検体) を使用し、磁性ビーズと MALDI-TOF/TOF 質量分析計を組み合わせた ClinProt™ system (独国 Bruker Daltonics 社) で解析を行った。術前後に 48 ピーク統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。術前で著しく増加していた 8568Da ペプチドは同定の結果、pre-platelet basic protein の分解産物だった。他のタンパク質同定も進めている。

(2) 血清中のタンパク質解析

原発性肝細胞癌患者術前後血清 8 組 (計 16 検体) を使用し、血清中のメジャータンパク質 12 種類を除去し、逆相 HPLC で分画した後、各フラクションを二次元電気泳動で解析した。術前後に 83 スポット統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。術前で著しく増加していたタンパク質は同定の結果、apolipoprotein J だった。他のタンパク質同定も進めている。

(3) 新規腫瘍マーカー候補タンパク・ペプチドのバリディーション

①ペプチド解析によって、原発性肝細胞癌患者術前後血清 8 組 (計 16 検体) を使用し解析を行った結果、術前で Apolipoprotein AI, Apolipoprotein AII で発現量が高く、特に Pre-platelet basic protein の分解産物 (8568Da ペプチド) の発現が著しく増加がみられた。8568Da ペプチドの検証を行うため、健常人血清、肝硬変患者血清及び原発性肝細胞癌患者血清各 40 検体を使用した。測定は探索同様、磁性ビーズと MALDI-TOF/TOF 質量分析計を組み合わせた ClinProt™ system (独国 Bruker Daltonics 社) で行った。肝硬変患者血清と原発性肝細胞癌患者血清との間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

②原発性肝細胞癌患者術前後血清 8 組 (計 16

検体) を使用し解析を行った結果、Gelsolin, Retinol binding protein, kininogen I で発現量が高く、特に Apolipoprotein J の発現増加がみられた。検証を行うため、健常者血清、肝硬変患者血清及び原発性肝細胞癌患者血清各 40 検体を使用し、albumin・IgG を除去後、ウエスタンブロット法を行い、各バンドを Total Lab TL120 software により発現量を解析した。Apolipoprotein J において、肝硬変患者血清と原発性肝細胞癌患者血清との間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

(4) 新規腫瘍マーカー候補タンパク・ペプチドと既存マーカーとの比較

新規腫瘍マーカー (8568Da ペプチド、Apolipoprotein J) と既存腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3, PIVKA-II) とを比較検討するため、健常者血清及び原発性肝細胞癌患者血清各 40 検体を使用し行っている。

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 8 件)

① Kazuyuki Sogawa, Mamoru Satoh, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga, Masaomi Iyo, Fumio Nomura. A Search for Novel Markers of Alcohol Abuse Using Magnetic beads and MALDI-TOF /TOF Mass Spectrometry. Proteomics-Clinical applications. In press. 2009. 査読有り

② Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K, Wu D, Ohashi T. Application of proteomic technologies to discover and identify biomarkers for excessive alcohol consumption. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 855. 35-41.

2007. 査読有り

③ Sogawa K, Itoga S, Tomonaga T, Nomura F. Diagnostic values of surface-enhanced laser desorption/ionization technology for screening of habitual drinkers. Alcohol Clin Exp Res. 31. S22-26. 2007. 査読有り

[学会発表] (計 12 件)

① Kazuyuki Sogawa, Mamoru Sato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga, Fumio Nomura. Search for Novel Markers of Alcohol Abuse Using three-step proteome analyses. PepTalk 2009. 2009 年 1 月 16 日. San Diego, USA.

② 木村明佐子, 曾川一幸, 佐藤守, 小寺義男, 朝長毅, 横須賀收, 野村文夫. 原発性肝細胞癌の新たなマーカー探索への three-step 血清プロテオーム解析の応用. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007 年 10 月 4 日. パシフィコ横浜.

③ 劉洋, 須永雅彦, 曾川一幸, 佐藤守, 西村基, 根津雅彦, 小寺義男, 朝長毅, 野村文夫. New Strategies for Target, Marker, and Drug Identification Discover a new biomarker for early detection of hepatocellular carcinoma using MALDI-TOF MS and ClinProTools. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007 年 10 月 3 日. パシフィコ横浜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moldia/g/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾川 一幸 (SOGAWA KAZUYUKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50436440