

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：34401  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K07928  
研究課題名（和文）膵臓癌特異ネオ抗原の同定と対応自己抗体スクリーニングの検査診断学的有用性の検証

研究課題名（英文）Identifications of pancreatic cancer specific neo-antigens with the autoantibodiomics and verifications of diagnostic utilities of its autoantibody screening to neo-antigens

研究代表者  
中西 豊文（NAKANISHI, TOYOFUMI）  
大阪医科薬科大学・研究支援センター・准教授

研究者番号：10247843  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト膵臓癌培養細胞可溶画分を膵臓癌特異抗原とし、膵疾患患者血清を一次抗体とし、電気泳動/ウエスタンブロット/ECL検出にて特異的バンドを見出し、更に構造解析にて34番目のValがIleに変異したTPIと同定した。この変異はメラノーマ特異ネオ抗原の近傍に位置し、新たな膵臓癌特異抗原の可能性を示唆した。次にELISA法を確立しスクリーニングを実施、健常者血清では検出感度以下で、膵臓癌ではPanIN分類に一致した定量値であり、膵疾患の鑑別検査に応用可能と思われた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌は、悪性新生物による死亡数の第4位を占め、発券時には既に浸潤・転移を伴う進行癌で極めて予後不良である。其処で、感度・特異度の高い分子マーカーを見出せば、早期診断・根治療法の道が開ける。今回のTPIネオ抗原によるELISA法によるスクリーニングは鑑別診断への応用可能な検査技術の確立への大きな第一歩となるであろう。

研究成果の概要（英文）：A human pancreatic cancer cultured cell soluble fraction was used as a pancreatic cancer-specific antigen, a pancreatic disease patient serum was used as a primary antibody, a specific band was found by electrophoresis / western blot / ECL detection, and the 34th Val was further structurally analyzed. Was identified as a TPI mutated to Ile. This mutation is located in the vicinity of the melanoma-specific neoantigen, suggesting the possibility of a new pancreatic cancer-specific antigen. Next, the ELISA method was established and screening was carried out. The sera of healthy subjects had a detection sensitivity or less, and the quantitative values of pancreatic cancer were consistent with the PanIN classification, and it was considered that they could be applied to the differential test for pancreatic diseases.

研究分野：検査診断学

キーワード：膵臓癌診断マーカー 特異抗原 自己抗体 自己抗体スクリーニング 検査診断技術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は日本人の悪性新生物による死亡原因の第4位を占め、毎年3万人もの生命が犯されている。膵臓癌は、発見時には殆ど浸潤・転移を伴う進行癌として診断され、しかもその予後は極めて不良な悪性新生物である。これまで、外科的切除・化学療法・放射線療法・免疫療法・温熱療法などを組み合わせた集学的治療が実施されて来たが、未だ根治療法は確立されるに至っていないのが現状である。近年、膵管上皮に存在する増殖性病変が膵臓癌の前駆病変であることが明らかになって来た。ジョンホプキンス大学 Hruban 教授らは、何等かの遺伝子異常を伴った不可逆的な膵管上皮病変を膵臓癌前駆病変と定義し、その重症度に合わせて Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) 分類の正当性を確かめる為に、遺伝子解析・免疫組織学的手法による発現タンパク質解析・細胞学的所見と重症度との関連性に関する研究をスタートさせた。この PanIN 分類による膵臓癌早期発見・治療スタートを目指し、膵臓癌へ移行する分子機構の解明や診断精度の高いバイオマーカーを見出すことが出来れば、膵臓癌の早期発見・根治療法への道が開けてくる可能性が示唆された。自己抗体を標的にしプロテオーム手法の癌診断への応用は、2001年 Hanash 教授等のグループのメラノーマに対するバイオマーカー発見が最初の報告例で、その後も数々の成果が発表されており、本法による癌関連自己抗体の検出とその対応抗原は新しい癌診断マーカーとなり得る可能性を有すると同時に、新たな癌研究への扉が開かれた。今回、ヒト膵臓癌細胞株の発現する可溶性タンパク質分子を、特異抗原とし膵臓癌患者血清中に存在する自己抗体を標的にした高選択性・特異的プロテオーム解析は、新しい膵臓癌診断マーカー候補を見出せる可能性があると思われる。

### 2. 研究の目的

PanIN 病変から膵臓癌へ移行する分子機構解明の為に高精度なバイオマーカーを見出し同定することが出来れば、膵臓癌の早期診断・根治療法への道が開けてくる。同時に、高精度スクリーニング法の確立は検査診断学的にも非常に有用であることから、PanIN 分類にて選別された膵臓癌前駆病変～膵臓癌の各グループの解析結果を集計し統計処理することで、より正確な膵臓癌診断あるいは予知マーカー候補を検出・同定すること。培養ヒト膵臓癌細胞の各抽出画分(細胞質成分/細胞膜成分/核成分など)に存在する可溶性～難溶性タンパク質分子と特異結合する患者血清中の自己抗体を標的にした膵臓癌診断マーカーを検索するため、選択的・特異的癌プロテオーム解析法を採択した。

### 3. 研究の方法

ヒト膵臓癌培養細胞 (Capan-II など) 可溶画分を膵臓癌特異抗原とし、文部科学省ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針および本学研究倫理委員会規程に則り採取した膵臓癌、慢性・急性膵炎患者血清並びに健常者血清を一次抗体とし、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (DTT 存在下) / ウエスタンブロット / ECL 検出法を用い、プロテオーム解析にて患者血清 (一次抗体) と特異的に結合する陽性バンドを見出し、更に得られた陽性バンドに対する対応抗原分

子をソフトイオン化質量分析手法にて構造解析し、膵臓癌特異抗原の構造情報を得る。その抗原分子を用いて、サンドイッチ ELISA 法を確立する。今回は、前解析にて得られた詳細構造情報を再確認し、正体高分子構造解析支援システム (Molecular Operating Environment: MOE) にてその抗原性の有無を PC 上で検証する。定量サンドイッチ ELISA 法を確立し、第一次スクリーニングを実施する。

#### 4. 研究成果

ヒト膵臓癌培養細胞可溶画分を膵臓癌特異抗原とし、膵臓癌並びに慢性/急性膵炎患者血清を一次抗体とし、電気泳動/ウエスタンブロット/ECL 検出にて約 26kDa 付近に陽性バンドを見出し、更に構造解析にて 34 番目の Val が Ile に変異した TPI と同定した。この変異はメラノーマ特異ネオ抗原として報告された近傍に位置し、新たな膵臓癌特異抗原の可能性があった。其処で定量サンドイッチ ELISA 法を確立し、第一次スクリーニングを実施した。健常者血清を対象にした基準値は、感度以下ほぼゼロに近い数字であり、膵臓疾患を対象にした解析結果は、PanIN 分類に一致した定量値であった。今回の TPI スクリーニングは、膵疾患の鑑別検査に応用可能と思われた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asano S, Masutani R, Ueda K, Igarashi K, Nirasawa T, Kubota M, Tabushi-Matsumura Y, Osaka N, Nakanishi T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Application of MALDI-TOF MS analysis for rapid discrimination of free immunoglobulin light chains, kappa and lambda isotypes in patients with monoclonal immunoglobulin gammopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 47-54
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishida T, Kotani T, Tabushi-Matsumura Y, Nakanishi T, Takeuchi T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Identification of nine proteins in whole lung extract derived from bleomycin-induced interstitial pneumonia model mouse by two-dimensional electrophoresis/in-gel digestion/ MALDI-TOF MSMS analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 1-9
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Minami K, Masutani R, Suzuki Y, Kubota M, Osaka N, Nakanishi T, Nakano T, Ukimura A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluation of SARS-CoV-2 RNA quantification by RT-LAMP compared to RT-qPCR.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Infect. Chemother.	6. 最初と最後の頁 1068-1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2021.05.004.	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 Nomura F, Nakanishi T, Igarashi K, Yamaguchi S, Setou M, Niwa M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Medical mass spectrometrist (MMS) training and certification: A key step to expanding routine clinical mass spectrometry usage in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin. Mass Spectrom.	6. 最初と最後の頁 13-15
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 Okuda Y, Fukumoto M, Horie T, Oku H, Takai S, Nakanishi T, Matsuzaki K, Tsujimoto H, Ikeda T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Periocular injection of candesartan-PLGA microparticles inhibits laser-induced experimental choroidal neovascularization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin.Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 87-93
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 -

〔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 麻野秀一、中西豊文、五十嵐一雄
2. 発表標題 MALDI-TOFMS法による尿中単クローン性免疫グロブリン / 鎖の迅速検出法の確立
3. 学会等名 第45回日本医用マスペクトル学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 麻野秀一、中西豊文
2. 発表標題 MALDI-TOFMS法による尿中単クローン性免疫グロブリン軽鎖のスクリーニング法の確立
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 丹羽利充、中西豊文編集主幹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 119
3. 書名 医療系学生のための「医療質量分析学テキスト」	

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	高折 恭一  (Tanaori Kyouichi)  (10329485)	京都大学・医学研究科・准教授    (14301)	
研究分担者	増井 俊彦  (Masui Toshihiko)  (20452352)	京都大学・医学研究科・准教授    (14301)	
研究分担者	五十嵐 一雄  (Igarashi Kazuo)  (80098467)	近畿大学・医学部・非常勤講師    (34419)	
研究分担者	松村 洋子(田伏洋子)  (Matsumura Yoko)  (80388256)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関