

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591628

研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いた膵癌の発癌関連蛋白質の検討と早期診断マーカーの検出

研究課題名(英文) Screening for carcinogenesis-related proteins and diagnostic markers of pancreatic cancer by proteomic analysis

研究代表者

吉野 茂文 (YOSHINO SHIGEFUMI)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60294633

研究成果の概要(和文)：膵癌は極めて予後不良な疾患である。本研究の目的は二次元電気泳動を用いて、膵癌の発癌に関連するタンパク質を同定することで新たな早期診断マーカーを見出すことである。膵癌患者40例および健常人20例の血清を用いて二次元電気泳動を行った。膵癌患者と健常人で発現に差があるタンパクスポットが2種類同定され、このタンパクはともに α -1-antitrypsinであった。以上の研究成果より血清中の α -1-antitrypsinは、膵癌の診断およびモニタリングの良いバイオマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer (PC) is one of the most lethal malignant tumors because of late diagnosis and the lack of response to various therapies. To identify potential biomarkers in cancerous serum from early stage PC patients, we carried out two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) to compare the serum proteomic profiles from 45 patients with PC and 20 healthy volunteers. Two spots showed differential expression on 2-DE gels and these up-regulated protein spots were identified as α -1-antitrypsin (AAT). These protein spots were also confirmed by Western blotting. The serum isoforms of AAT might be clinically useful for PC diagnosis and monitoring.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器・腫瘍外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌、プロテオーム解析、発癌関連蛋白質、早期診断マーカー、血清マーカー、 α -1-antitrypsin

1. 研究開始当初の背景

(1) 2003年4月にヒトゲノム解析が完了し、post-genome sequenceとして、ゲノム構成遺伝子の全ての翻訳産物であるタンパク質群(proteome)の網羅的解析「proteomics(プロテオミクス=プロテオーム解析)」が世界的に活発に行われている。proteomicsとは、網羅的にタンパク質を分離・同定し、それら

の機能を明らかにすることによって生命システムを解明しようとするものである。医学の分野では、疾患の発症や治療によって特異的に変動するタンパク質群を同定し、疾患の発症機序の解明や予後の判定、さらには薬剤感受性の違いを明らかにする試みが行われている。

(2) 当研究グループではこれまでに消化器

悪性腫瘍を中心にプロテオーム解析に取り組んでおり、特に肝細胞癌に関しては発癌関連蛋白の同定や早期診断マーカーとして臨床応用が期待できる血中自己抗体の存在について報告してきた。そこでこれまで確立してきた手法を応用して、新たに膵癌のプロテオーム解析を行うという着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 膵癌は、わが国の年間死亡者数約 20,000 人で、癌の死因としては第 5 位で年々増加傾向にある。唯一の根治治療は外科的切除であるが、進行が早く発見時に根治手術可能な症例は全体の 3 割弱である。治癒切除が行われたとしても約 9 割が再発を来しその 5 年生存率は 13% で、非切除例にいたっては 5 年生存率 0% と極めて予後不良な疾患である。現在の医療技術では、この疾患の治療成績を上げる方法は早期発見早期治療のみであり、一般検診レベルでも施行できるような非侵襲的かつ簡易的な診断システムの開発が急務である。

(2) 本研究の目的は、蛋白質の網羅的解析を可能にした二次元電気泳動と質量分析法によるプロテオーム解析を用いて、膵癌の発癌及び進行に関連するタンパク質を解析・同定することで新たな早期診断マーカーを見出そうとするものである。

3. 研究の方法

(1) 膵癌患者 40 例の血清および健常人 20 例の血清を用いた。

(2) 血清から 1 サンプルあたり蛋白量 100 μ g を採取して IPG ストリップ (Amersham Bioscience) に添加し、等電点電気泳動装置 (IPGPhor, Amersham Bioscience) と 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた水平式 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置 (Multiphor II, Amersham Bioscience) による二次元電気泳動で蛋白質を分離展開した。

(3) ゲル上のタンパク質を Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad) により可視化し、ProXpress 2D Proteomic Imaging System で画像としてコンピューターに取り込んだ。

(4) ゲル中のタンパク質スポットは二次元画像解析ソフト (Progenesis SameSpots software) で解析して膵癌患者、健常人の血清において異なる染色強度を示すタンパク質スポットをピックアップし、該当するスポットをゲルから切り出し質量分析に供した。

(5) 切り出されたタンパク質スポットゲルを 50 mM 重炭酸アンモニウムと 5 mM DTT を含む 60% メタノールで洗浄した後、染色液を脱色。脱色されたゲルは脱水した後に 10 μ g/ml の濃度にトリプシン (シーケンス用、Promega V5111) を加えた 50 mM 重炭酸アン

モニウムと 5 mM DTT を含む 30% アセトニトリル中で 30°C のもと再膨潤しながら、ゲル内のタンパク質を消化した。

ゲル内消化した後に、LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies) を用いて、PMF 分析を行った。タンパク質の同定は、Protein Prospector web site の MS-Fit データベース検索によって行った。

(6) さらに同定したタンパク質の膵癌患者と健常人における発現量の差を Western blot により確認した。

4. 研究成果

(1) 二次元電気泳動

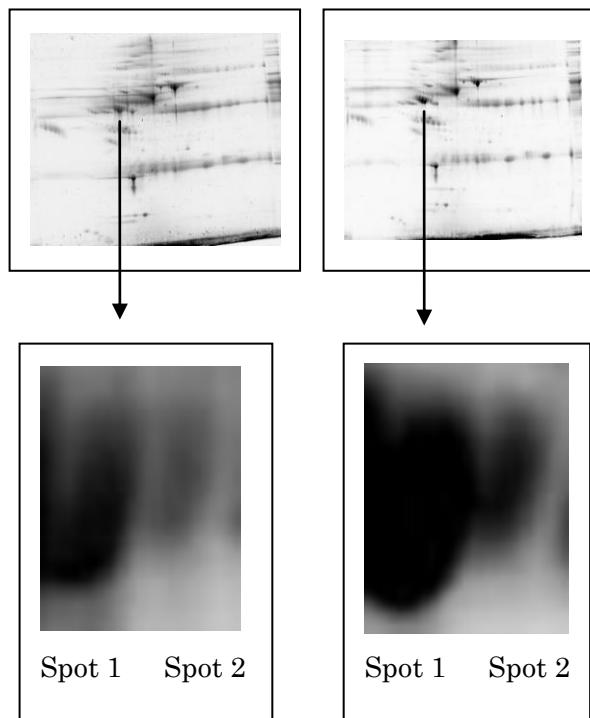
健常人血清と膵癌患者血清において二次元電気泳動により展開されたタンパク質スポットを画像解析ソフトにより解析した結果、少なくとも 230 のタンパク質が一致していることが確認された。

その中で 7 つのスポットにおいて健常人血清と膵癌患者血清で有意差を持って発現強度に差が認められた。このうち発現強度が 1.5 倍以上のスポットを 2 種類同定した。この 2 つのタンパク質スポットは、共に膵癌患者血清において発現が増強していた。

下に同定された 2 種類のタンパク質スポットの健常人血清と膵癌患者血清の代表例を示す。(上が二次元電気泳動ゲルの全体像、下が膵癌患者血清において発現強度が増強していた 2 つのスポットの拡大像)

健常人の血清

膵癌患者の血清



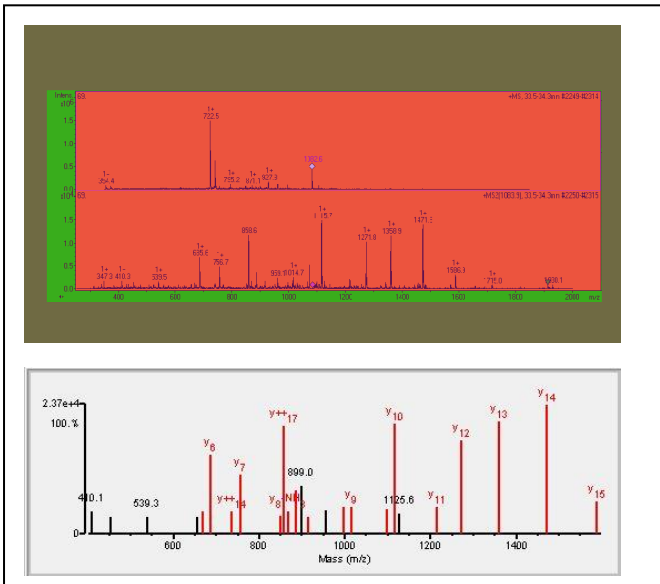
(2) これらのタンパク質スポットを liquid (LCLC-MS/MS)により解析した結果、それぞれ α -1-antitrypsin の isoform 1 および isoform 2 であった。すなわち 2 つのスポットは共に α -1-antitrypsin であり、同一のタンパク質であった。

下に LC-MS/MS spectra の分析結果を示す。

上段：タンパク質スポットをトリプシン消化した後の LC-MS spectra
赤いひし形が α -1-antitrypsin (precursor ion m/z 1082.6)

中段および下段：precursor ion m/z 1082.6 の LC-MS/MS spectrum

MS/MS spectrum によりペプチドの一部が VFSNGADLSGVTEEEAPLKLSK と同定された。



isoform 1, 2 の MS/MS データ

isoform 1

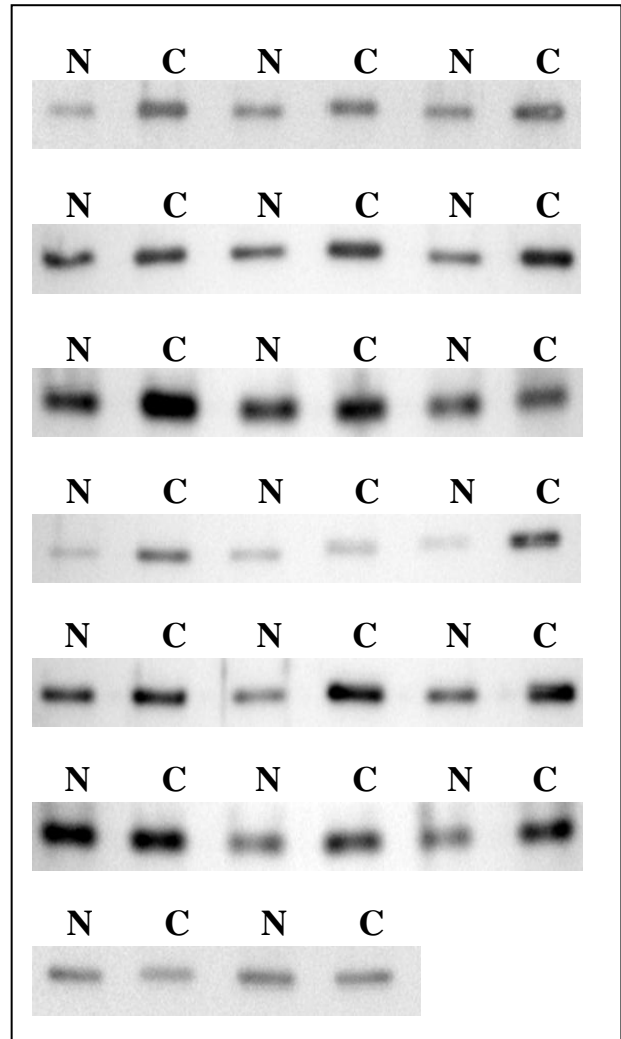
Protein name	α -1-antitrypsin
Accession no.	P01009
pI	5.37
Molecular mass	46736.8Da
Distinct peptides	14
MS/MS search score	190.84
Sequence coverage	32%

isoform 2

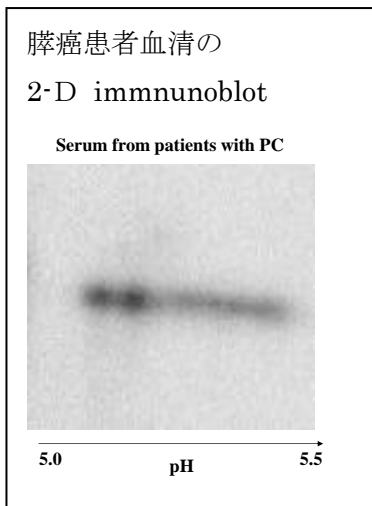
Protein name	α -1-antitrypsin
Accession no.	P01009
pI	5.37
Molecular mass	46736.8Da
Distinct peptides	5
MS/MS search score	56.20
Sequence coverage	10%

(3) Western blot で α -1-antitrypsin の発現を確認した結果、膀胱癌患者 (20 例) では健康者 (20 例) に比べて有意に発現が増強していた。

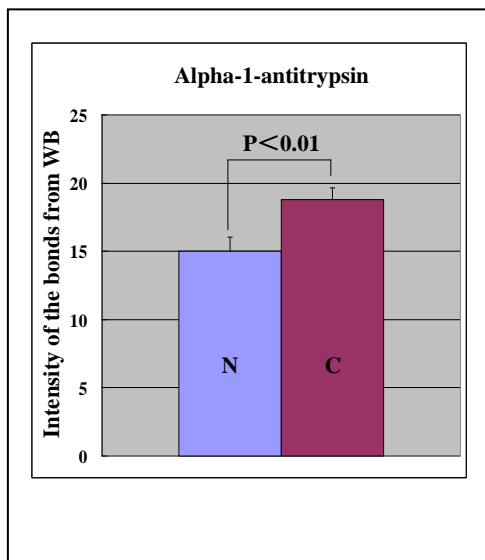
下に健康者 (N) と膀胱癌患者 (C) それぞれ 20 例の Western blot の結果を示す。ランダムにペアにしてあるが、それぞれのペアのうち 70% の症例で健康者に比べて膀胱癌患者での α -1-antitrypsin の発現が増強していた。



また、次ページに膀胱癌患者血清から得られた α -1-antitrypsin の 2-D immunoblot の結果を示すが、2 つのスポットとも pH 5.0-5.5、45-50 kDa の間に確認された。



下に前ページの健常者 (N) と膵癌患者 (C) 各々20例の Western blot band の発現強度のグラフを示す。健常者に比べて膵癌患者での α -1-antitrypsin の発現が有意に増強していた。



(4) 本研究において、われわれは膵癌患者の血清中に2つのタンパク質スポットが増強していることを確認した。2つのタンパク質スポット共に α -1-antitrypsin であった。 α -1-antitrypsin は膵癌細胞から放出されている可能性がある。

以上より、血清中の α -1-antitrypsin は膵癌の早期診断およびモニタリングの良いバイオマーカーになる可能性が示唆された。

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1件)

① Screening for serological biomarkers of pancreatic cancer by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Wang Y, Kuramitsu Y, Yoshino S, Takashima M, Zhang X, Ueno T, Suzuki N, Oka M, Nakamura K, Oncol Rep. 2011, 26: 287-292, doi: 10.3892/or.2011.1278 査読有

[学会発表] (計0件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 茂文 (YOSHINO SHIGEFUMI)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 60294633

(2) 研究分担者

爲佐 卓夫 (TAMESA AKUO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30359905

坂本 和彦 (SAKAMOTO KAZUHIKO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50420526

(3) 連携研究者

なし