

平成 22 年 5 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790410
 研究課題名（和文） 独自ペプチド解析技術による消化器癌の血中新規腫瘍マーカー探索と実用的診断法の確立

研究課題名（英文） A searching of novel biomarker in digestive organ cancer serum and the establishment of a practical diagnostic method using unique high-yield peptide-extraction method.

研究代表者

佐藤 守 (SATO MAMORU)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20401002

研究成果の概要：健常人 15 例、食道癌術前患者 13 例、術後患者 11 例の血清の解析を行った結果、食道癌患者血清で増加しているピークを 20 ピーク検出できた。これらのピーク強度に差の認められたペプチドの同定を行った。しかしながら、同定できたピークは 1 ピークとなっている。この原因としては、さまざまな翻訳後修飾（細胞内で起こるもの以外を含む）が起きていると考えられる。同定できたマーカー候補ペプチドについては、安定同位体標識ペプチドを作成し、定量を行う。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：臨床検査医学・プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、国内外で質量分析計を用いた癌の診断法に関する報告が数多くみられるようになったが、そのきっかけとなったのは、米国癌研究所の Liotta L らによる論文[Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet, 359: 572-577, 2002.]である。この論文ではプロテインチップシステムを用いて卵巣癌の患者血清を解析した結果、ほぼ 100% の感度特異度で卵巣癌の診断ができるという画期的なものであった。その後種々の癌に関する同様な研究が

他施設から相次いで報告されたが、再現性に問題があることからその有用性については疑問が残る。しかし、この報告によってプロテオーム解析による血中疾患マーカーの探索が脚光を浴びたのは確かである。

多くの研究グループが血中の腫瘍マーカー候補ペプチドの探索を行うことで、探索のための手法開発も盛んに行われている[Gong Y., et al., J Proteome Res. 6:1379-87, 2006]。最近では検出できたペプチドの同定まで行っている論文も増え始めている。しかし多くの場合、探索・検出に留まっているか、より

微量な成分を検出するための複雑な手法の開発 [Tang HY., et al., *Proteomics* 5:3329-3342, 2005]に留まっている。これらの研究が連携して行われたい結果、診断薬・診断方法の開発に向けた臨床基礎研究にまで至らないのが現状である。

2. 研究の目的

現在用いられている血清腫瘍マーカーはいずれも進行癌では陽性率が高いものの、早期癌の検出率は非常に低い。したがって、血中に存在する新しい腫瘍マーカーとなりうるペプチドを見つけることが、癌の早期診断には欠かせない。本研究は独自のペプチド抽出法を用いて、血清・血漿中の新規腫瘍マーカー候補ペプチドを探索し、臨床基礎研究（診断マーカー候補ペプチドの多施設臨床試験、簡単なアッセイ系の構築、既存のマーカーとの比較）をとおして癌の早期診断、治療方針の検討、再発予測を行うための診断薬、診断法を開発することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

血清・血漿のプロテオーム解析は臨床的に非常に大きな利点があるにもかかわらず、組織を対象としたプロテオーム解析に比べて遅れている。この理由は22種類のメジャータンパク質の存在量が血中の全タンパク質の約99%を越えているからである [Tirumalai RS., et al., *Mol. Cell. Proteomics* 2.10, 1096-1103, 2003]。現在、血中のメジャータンパク質を除去するための有効な前処理技術が盛んに開発されている。しかし、多くは抗体を使って数種類のメジャータンパク質を除去する方法に止まっている。抗体を使う限り生理条件下で処理を行うため、メジャータンパク質の除去と共にこれらのメジャータンパク質と相互作用している多くのマイナータンパク質も除去されてしまう。低分子量タンパク質・ペプチドを対象とした研究のほぼ全ての研究は、ペプチドの濃縮のために従来の有機溶媒沈殿法 [Chertov O., et al., *Proteomics* 4, 1195-203, 2004] または、フィルターを使用している [Harper RG., et al., *Electrophoresis* 25, 1299-1306, 2004]

(図1参照)。これらの研究に共通の問題点は方法の評価に質量分析計を使用している点である。質量分析計の感度は非常に高い、これに加えて、スペクトル強度は個々のペプチドのイオン化効率に大きく依存し、個々のMSスペクトルがペプチド相互の存在量を正確に反映するものではない。特に複雑なペプチド混合物を対象とした場合、たとえ同じ試料を分析しても再現性よく同じMSスペクトルを得ることは非常に困難である（このことは質量分析の専門家の間では当然のこととして認識されている）。したがってMSスペクトルを評価法としてその上流の前処理方法

を議論している論文の多くは、その前処理法のペプチド抽出の効率、再現性、網羅性を正當に評価できていない。

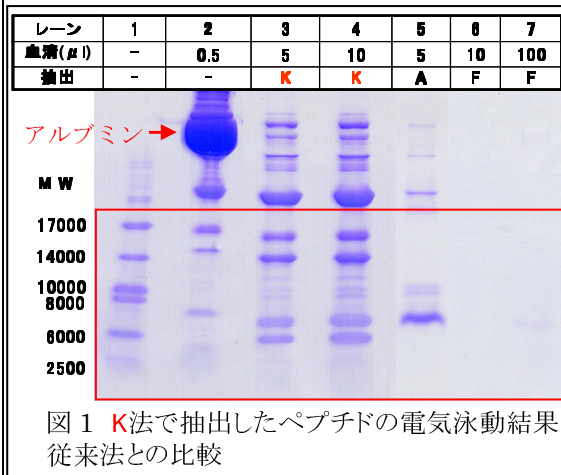


図1 K法で抽出したペプチドの電気泳動結果従来法との比較

ペプチド成分の抽出において最も大きな問題点は、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。これを克服すべく申請者出身研究室で開発された方法が、血清を対象としたペプチド抽出法(K法)である。本法は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である。図1にこの方法を使って血清から抽出したペプチド成分を低分子用電気泳動法で分離し、クーマシー染色した結果を示す。レーン3, 4はそれぞれ血清5μl, 10μlからK法で抽出した結果、レーン5が従来使用されているアセトン沈殿法(A法, 70%アセトン使用)で血清5μlから抽出した物、レーン6, 7はそれぞれ血清10μl, 100μlから分画分子量30,000のフィルター(F法)を使って高分子量タンパク質を除去した結果である。また、レーン2は血清0.5μlをそのまま電気泳動した結果である。A法、F法ではアルブミンを初めとした高分子量タンパク質の除去にともない、ペプチド成分の大部分が除去されていることがわかる。これに対してK法では、高分子量タンパク質は若干残っているが分子量約20,000以下(赤四角)のペプチド成分が他に比べて明らかに効率よく抽出されていることがわかる。

(1) 血清・血漿中のペプチド成分の抽出とHPLCでの分画:各群10人の計30の血清・血漿からK法によるペプチド抽出を行った。立ち上げの際に日差再現性が取れていることは確認しているが、実際の検体処理においても同時にpool血清・血漿を処理しtricine-PAGEで再現性を確認した。抽出物は凍結乾燥後、HPLCによる分画・分取を行った。溶媒流速は200μl/min

で 0.5min 毎に分画した。HPLC での分離では溶出時間に数秒～十数秒のズレが生じることがある。これは、サンプル測定によるカラムの状態変化や溶媒交換が主な原因である。これに対して、十分なカラム洗浄を行うこと・標準物質での溶出時間の確認を行うことで対処した。スルーポイントは 1 日に 3 サンプルと違いが 30 サンプルであれば溶媒交換を行わずに再現性のとれた分画ができていた。

- (2) MALDI TOF-MS によるマーカー候補ペプチドの探索：分画したペプチドを MALDI TOF-MS で測定し、健常群と術前患者群ならび術前と術後患者群で発現量の変化の見られるペプチドを探索した。測定は自動測定で行った。MALDI TOF-MS 測定ではサンプルとマトリックスの結晶化の安定性が問題となるが、今回すでにマトリックスが添付されているプレートを用いることで再現性の良いスペクトルが得られるようになった。
- (3) 腫瘍マーカー候補ペプチドの同定：上記の解析で発現量に変化のあるペプチドは新しい腫瘍マーカーになる可能性が高いので同定を行う。分子量 3,000 以下のペプチドについては MALDI TOF/TOF MS を用いて MS/MS 測定を行い、データベース検索で同定した。分子量 3,000 以上のペプチドに関しては、2 次元 HPLC を用いて単離後、アミノ酸配列解析にて部分アミノ酸配列を決定する。さらに、分子量 8,000 以上の成分はゲル中での分離が可能となるので、in-gel 消化を行い LC-MS で同定した。

4. 研究成果

健常人 15 例、食道癌術前患者 13 例、術後患者 11 例の血清の解析を行った。その結果、健常人と比較して食道癌患者血清で増加しているピークを 20 ピーク、減少しているピークを 13 ピーク検出することができた。中でも、特に 2 群間で有意差のあったピークを図 2 に示した。しかしながら、差異の認められたピークで、術後患者血清での値が健常人血清レベルに戻るようなピークは検出することはできなかった。

有意差が認められた各ピークについて同定を行った。同定できたピークは 1 ピークだけであった。この原因としては、ピーク強度が低いこと、候補ピークが単離できていないこと、なんらかの修飾がされており、データベースサーチで同定することができないことが考えられる。これについては今後の課題であり、使用する血清量を増やすこと、FT-MS のようにより分解能の高い質量分析計での同定を考えている。現在、条件検討を行っている。

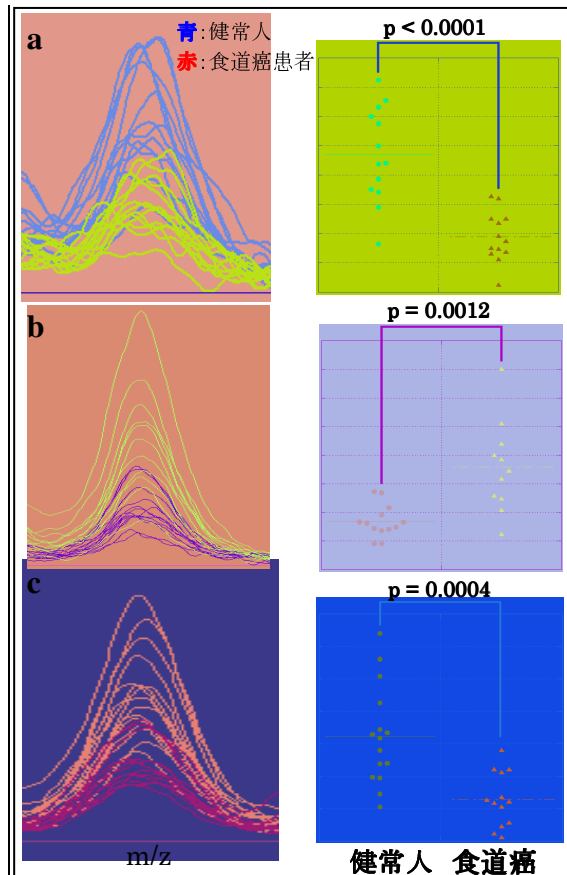


図 2 健常人と食道癌患者血清の比較
左: MS ピーク(raw data) 右: 面積値でのプロット

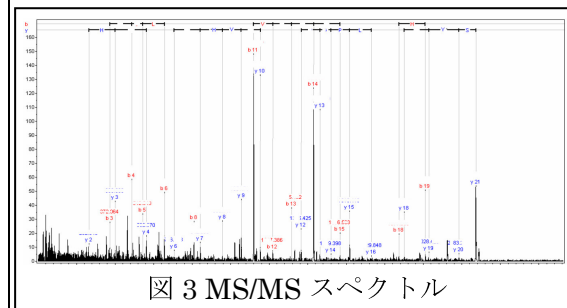


図 3 MS/MS スペクトル

同定できたマーカー候補ペプチドについては、安定同位体標識ペプチドを合成し、マーカー候補ペプチドの定量を行う予定であったが、合成に時間がかかってしまい、現在スパイク量の検討も行っている最中である。今後は前処理の最適化を行い、三連四重極型質量分析による SRM 測定 (定量) につなげていきたいと考えている。

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 11 件)

- ① Mamoru Satoh, Eri Haruta-Satoh, Mako Yamada, Fumio Nomura. Proteome analysis of

- the rat pancreas by the chronic alcohol dosage. Alcohol And Biomedical Research. 査読無、28, 2009, 16-20
- ② Mako Yamada, Mamoru Satoh, Kazuyuki Sogawa, Fumio Nomura. Proteome analysis of a rat model of alcoholic liver injury. Alcohol And Biomedical Research. 査読無、28, 2009, 21-25
- ③ Matsushita K, Kajiwara T, Itoga S, Satoh M, Sogawa K, Umemura H, Sawai S, Nishimura M, Tamura M, Tanaka N, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F. Clinical application of alternative splicing form of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor for cancer detection and treatment. 臨床病理、査読無、57 (12), 2009, 1151-1158
- ④ Yusuke K, Tomoyuki F, Mamoru S, Hiroki T, Takashi M, Tadakazu M and Yoshio K. A simple and highly reproducible method for discovering potential disease markers in low abundance serum proteins. Journal of Electrophoresis. 査読有、53, 2009, 13-18
- ④ Hattori N, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Shinozaki K, Nomura F, Tomonaga T, Matsushita K, Kodera Y, Sogawa K, Satoh M, Hirasawa H. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. Shock. 査読有、32 (4), 2009, 393-400
- ⑤ Guo WZ, Sugaya S, Satoh M, Tomonaga T, Nomura F, Hiwasa T, Takiguchi M, Kita K, Suzuki N. Nm23-H1 is responsible for SUMO-2-involved DNA synthesis induction after X-ray irradiation in human cells. Archives of biochemistry and biophysics. 査読有、486 (1), 2009, 81-87
- ⑥ Sogawa K, Satoh M, Kodera Y, Tomonaga T, Iyo M, Nomura F. A search for novel markers of alcohol abuse using magnetic beads and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Proteomics - Clinical Applications. 査読有、3 (7), 2009, 821-828
- ⑦ Sawai S, Umemura H, Mori M, Satoh M, Hayakawa S, Kodera Y, Tomonaga T, Kuwabara S, Nomura F. Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: proteomic analysis. Journal of neuroimmunology. 査読有、218, 2009, 112-115
- ⑧ Umemura H, Nezu M, Kodera Y, Satoh M, Kimura A, Tomonaga T, Nomura F. Effects of the time intervals between venipuncture and serum preparation for serum peptidome analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinica chimica acta. 査読有、406, 2009, 179-180
- ⑨ Lu J, Suzuki T, Satoh M, Chen S, Tomonaga T, Nomura F, Suzuki N. Involvement of aldolase A in X-ray resistance of human HeLa and UV(r)-1 cells. Biochemical and biophysical research communications. 査読有、369, 2008, 948-952
- ⑩ Tong XB, Kita K, Karata K, Zhu CL, Sugaya S, Ichimura Y, Satoh M, Tomonaga T, Nomura F, Jin YH, Suzuki N. Annexin II, a novel HSP27-interacted protein, is involved in resistance to UVC-induced cell death in human APr-1 cells. Photochemistry and Photobiology. 査読有、84 (6), 2008, 1455-1461
- ⑪ Umemura S, Fujimoto N, Hiraki A, Gemba K, Takigawa N, Fujiwara K, Fujii M, Umemura H, Satoh M, Tabata M, Ueoka H, Kiura K, Kishimoto T, Tanimoto M. Aberrant promoter hypermethylation in serum DNA from patients with silicosis. Carcinogenesis. 査読有、16, 2008, 1845-1849
- [学会発表] (計5件)
- ① 佐藤 守、慢性的アルコール投与ラット膵臓のプロテオーム解析、アルコール医学生物学研究会、2009年11月13日、三井ガーデンホテル千葉
- ② 佐藤 守、プロテオーム解析をもっと身近に、日本生化学会(シンポジウム)、2009年10月24日、神戸国際会議場
- ③ Katada K, Tomonaga T, Matsushita K, Satoh M, Hanazawa T, Kodera Y, Okamoto Y, Nomura F. Plectin-1 promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker of head and neck cancer. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2009年10月3日、パシフィコ横浜
- ④ Abulaizi M, Tomonaga T, Sogawa K, Satoh M, Wubuli J, Matsushita K, Kodera Y, Nomura F. Identification of new biomarker for early pancreatic cancer by three step serum proteome analysis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2009年10月3日、パシフィコ横浜
- ⑤ 佐藤 守、慢性的アルコール摂取におけるラット膵臓のプロテオーム解析、アルコール医学生物学研究会、2008年9月15日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 守 (SATO MAMORU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20401002

(2) 連携研究者

野村 文夫 (NOMURA FUMIO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：80164739

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)
独立行政法人医薬基盤研究所・研究員
研究者番号：80227644
小寺 義男 (KODERA YOSHIO)
北里大学・理学部・准教授
研究者番号：60265733
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
川島 祐介 (KAWASHIMA YUSUKE)
北里大学・理学部・ポストドク