

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790411  
 研究課題名（和文）多角的プロテオーム解析による予後不良消化器癌の早期診断法の開発  
 研究課題名（英文）Discovery of novel biomarkers for gastrointestinal cancers of poor prognosis using multiple proteomic strategy  
 研究代表者  
 梅村 啓史 (Umemura Hiroshi)  
 千葉大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：90456070

研究成果の概要（和文）：プロテオーム解析手法である、MALDI-TOF MS ペプチドプロファイリングシステムを用い、胃癌手術前後 81 例の血清、健常人コントロール 66 名の血清を網羅的に比較解析した。その結果、2 種類の高分子キニノーゲン断片ペプチドが同定され、胃癌手術前の検体において有意に高レベルにあった。これら 2 種類のペプチドは従来の CEA や CA19-9 といった腺癌マーカーよりも、特に早期癌の検出に有用であった。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円
2009 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円

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、癌、臨床検査、腫瘍マーカー、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学研究のめざましい発展により、ヒトの発癌メカニズムが次々と解明されてきた。得られた知見の一部は分子標的治療薬等の形ですでに臨床現場に還元され、治療成績の向上に結びつき始めている。このように基礎医学研究の成果を実際の臨床に応用する、トランスレーショナル・リサーチをさらに発展させることで、今後飛躍的に癌の治療

成績が向上する可能性が見込まれる。この数年 DNA や RNA に焦点を当てたゲノム・トランスクリプトーム解析研究が癌を対象として盛んに行われてきた。例えば cDNA マイクロアレイ技術を用いた体系的遺伝子発現解析や、SNPs などの遺伝子多型解析である。これらは癌の悪性度診断や薬物・放射線治療に対する感受性判定、副作用の予測など、来たるべきオーダーメイド医療へ多大な貢献をす

るものと期待される。一方で、生体内での種々の癌化プロセスは一部の例外を除いてほとんどがタンパク質によって制御されている。発癌のメカニズムの解明、さらには癌化の根本的要因である因子にターゲットを絞った分子標的治療薬の開発、あるいは癌の早期診断に有用な腫瘍マーカーの発見には、直接タンパク質/ペプチドに焦点を当てた疾患プロテオーム/ペプチドーム解析もまた非常に効率的な戦略である。しかし、疾患プロテオーム解析におけるいくつかの問題点も明らかとなってきた。それは(1)情報量の問題、(2)解析の再現性の問題、(3)候補タンパク質/ペプチドの病態への関与の証明である。それらを解決するには(1)複数の解析機器・タンパク質分画方法を用いた解析、(2)大規模研究へと展開可能なマスマスプロトメトリ解析法の確立、(3)タンパク質/ペプチド機能解析研究の同時進行が重要である。

## 2. 研究の目的

本邦の 2003 年の統計によれば、癌全体に対する食道癌や胃癌などの消化管悪性腫瘍の死亡率の割合は、男性で 33.3%、女性で 30.2%を占めている。中でも食道癌やスキルス型胃癌は増殖や転移浸潤のスピードが速く、また早期診断に結びつくような症状に乏しいため、診断時には多くがすでに進行期であり治癒可能な切除に至らないことがほとんどである(5年生存率:食道癌=約45%、進行期胃癌=約10%)。これらの腫瘍マーカーとして SCC や CEA などが存在するものの、進行癌やサイズの大きな癌で初めて陽性となることが多く、早期診断に有用なものは皆無である。本研究では、胃癌などの消化管悪性腫瘍(早期例を含む)の癌組織抽出タンパク質や患者血液、ならびに癌細胞株抽出タンパク質/培養上清を対象として、複数の解析

機器・タンパク質分画方法を用いたプロテオーム解析、タンパク質機能解析を行う。これにより研究期間内に、胃癌(特に予後不良の低分化/スキルス胃癌)等における新規疾患マーカー候補を発見・同定し、実際に ELISA 法や安定同位体標識を用いた質量分析計による定量手法を開発することで、実用化のためのプロトタイプ診断法を構築する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

胃癌患者 81 名の手術施行前後の血清、健康人 66 名のコントロール血清を用いて、ClinProt™System による網羅的発現解析を行う。ClinProt™System は、様々な化学的性質を表面に持たせたビーズ(カラムクロマトグラフィーと同様の性質をビーズ上に持たせたもので、陽イオン親和性、陰イオン親和性、金属親和性などいくつかの種類がある)によりサンプル中のタンパク質/ペプチドを捕捉し、MALDI-TOF/TOF-MS を用いて解析を行えるものである。さらに 3000Da 以下のペプチドについては、タンデム MS 解析によりアミノ酸配列の同定が可能である。サンプルのビーズ処理からタンパク質/ペプチド溶液の抽出、レーザーエネルギー吸収分子の混合および MALDI プレート上での結晶化まで、先述した独自のロボットシステムを使用し、再現性よくハイスループットな解析を行える。上述の市販のビーズによる方法以外にも、脂質二重膜にカルシウム濃度依存性に結合するタンパク質や、レクチンやヘパリンなどに特異的に結合するタンパク質/ペプチドを抽出し解析にかける。以上の解析で得られた候補に対してポリクローナルおよびモノクローナル抗体を入手あるいは業者に受託し作成する。これらを用いて質量分析計で得られた解析結果の確認を行う。また、安定同位体標識ベ

プチドと質量分析計を用いた定量的臨床検査システムを確立する。この定量法は以下の通りである。

(1) 疾患マーカーとして見つかったペプチドのアミノ酸配列を元に、生体由来ペプチドより数十 Da 分子量の大きい安定同位体標識ペプチドを作製し、これを臨床検体に一定量加える。

(2) 安定同位体標識されたペプチドはその物理化学的性質が生体由来のものと同様であるため、たとえ複雑な前処理を経たとしても、常に生体由来ペプチドと同じ動態をとる。

(3) 質量分析計で生体由来ペプチドと安定同位体標識ペプチドのピーク強度を測定する。安定同位体標識ペプチドを臨床検体に加えた量が事前に分かっているため、両ペプチドのピーク強度の比から、生体由来ペプチドの量を求めることができる。

#### 4. 研究成果

平成 20 年度は共同研究機関である君津中央病院にて、胃癌約 120 症例（うち早期胃癌約 50 例、進行胃癌約 70 例）の手術実施前後の血清を収集した。一方、正常人コントロール検体を柏戸クリニックの人間ドックより収集し、約 400 例の血清を収集した。ClinProt™ System を安定稼働させながらこれらの血清（胃癌手術前後 81 例、正常コントロール 66 例の計 228 検体）を WCX、IMAC-Cu、C8 の三種類の磁性ビーズで解析した。その結果、複数のピークが手術前後の比較および胃癌症例と健常人の比較において統計学的に有意差をもって変化することを見出した。このうち 3000Da より低分子量のペプチドについては、MALDI-TOF MS のリフレクターモードを使用した MS/MS 分析によって 1945Da と 2210Da の高分子キニノーゲンの断片ペプチドと同定された(図 1)。

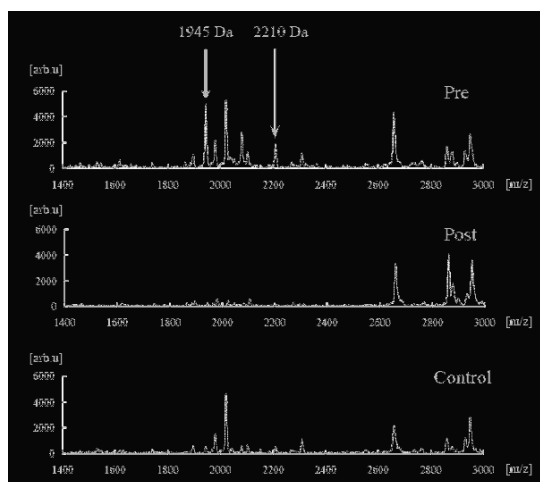


図 1

胃癌症例の血清を ClinProt™ System で解析した報告としては Ebert et al. のもの (J Proteome Res. 2006;5:2152-8) があるが、今回同定に成功したペプチドはこの論文で報告されている Fibrinopeptide A とは異なるものであった。従って、新規のペプチドを胃癌マーカー候補として見出したことになる。平成 21 年度は、前年度に WCX ビーズを用いた検討で高分子キニノーゲンの断片と同定した 2 種類のペプチド(1945Da と 2210Da) について、胃癌腫瘍マーカーとしての診断効率を検討した。既存の CEA と CA19-9 と比較したところ、2210Da は CEA および CA19-9 を、1945Da は CA19-9 を上回る AUC を示した。これを早期癌(粘膜下層までの癌)に限定して検討したところ、両ペプチドともに CEA と CA19-9 を圧倒する AUC を示し、特に早期癌の検出に有用なマーカー候補であることが確認された(図 2)。一方、血清の Western blot を行ったところ、高分子キニノーゲンのバンドが術後検体や正常コントロール検体でより強い発現を示した。血清中のペプチドのレベルと高分子キニノーゲンのレベルの相関を検討したところ、両者は有意に逆相関していた。したがって、胃癌患者の血清中では高分子キニノーゲンが分解され、断片化したペプチドが MALDI で観測されたものと推測された。

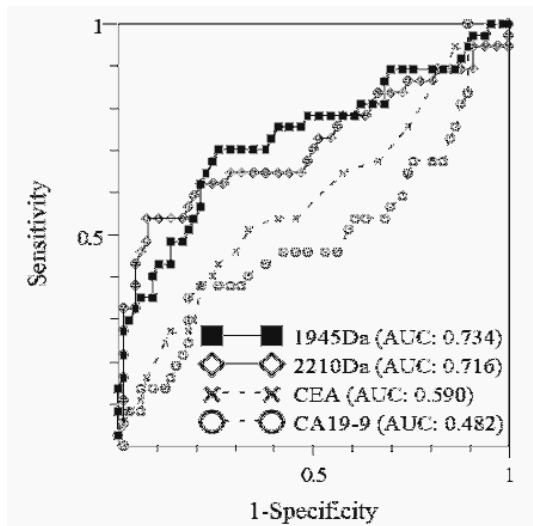


図 2

近年、高分子キナーゼの HKa と D5 ドメインについて新しい機能が明らかになってきた。HKa と D5 ドメインは血管新生抑制作用を持つされ、今回同定したペプチドのアミノ酸配列は D5 ドメイン内に存在していた。本研究により、局所の癌やその周辺環境が高分子キナーゼや D5 ドメインを分解し、血管新生を亢進させているメカニズムの存在が示唆された。今回同定したペプチドおよび高分子キナーゼの分解機構は胃癌の新しい血清バイオマーカーとなるものと考えられる。

#### 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. “Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: proteomic analysis.”  
Sawai S, Umemura H②, 他 7 名 Journal of Neuroimmunology, 218(1-2): 112-115, 2010 査読有
2. “Effects of the time intervals between

venipuncture and serum preparation for Serum Proteome Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”

Umemura H①, 他 6 名 Clinica Chimica Acta, 406(1-2): 179-180, 2009 査読有

3. “Aberrant promoter hypermethylation in serum DNA from patients with silicosis” Umemura S, Umemura H⑧, 他 12 名 Carcinogenesis, 29(9): 1845-1849, 2008 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. 梅村啓史 「MALDI-TOF MS peptide profiling による血清胃癌マーカーの探索」2009年7月27日 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会 北里大学薬学部
2. 梅村啓史 「ホモ遺伝子異常と診断された脊髄小脳変性症 SCA6 の症例」2008年8月2日 第15回日本遺伝子診療学会大会 仙台市戦災復興記念館
3. 梅村啓史 「遺伝子検査部門からみた脊髄小脳変性症に関する遺伝カウンセリングの有用性」2008年5月23日 第32回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 仙台国際センター
4. 梅村啓史 “Evaluation of preanalytical factors for automated serum peptidome analysis by MALDI-TOF MS” 2008年4月19日 The 6th Cherry Blossom Symposium, 神戸商工会議所

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 多発性硬化症または NMO の検査マーカーの測定方法

発明者: 澤井撰、梅村啓史、森雅裕、桑原聡、

野村文夫、清川巖、三浦俊英、小島良、片山  
勝博

権利者：同上

種類：応用特許

番号：2008-239303

出願年月日：2008年9月18日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅村 啓史 (Umemura Hiroshi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90456070

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：