

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591776

研究課題名（和文） 腫瘍随伴性腎細胞癌のプロテオーム解析

研究課題名（英文） Proteomic analysis of cyst fluid associated with renal cell carcinoma

研究代表者

岩村 正嗣（IWAMURA MASATSUGU）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：20176564

研究成果の概要（和文）：

単純性腎嚢胞と嚢胞随伴性腎細胞癌に由来する嚢胞から採取した嚢胞液を逆相液体クロマトグラフィーにより精製した後に二次元電気泳動による蛋白分離を施行した。両方で発現量の異なる 274 個のスポットにつき質量解析による蛋白同定を行った結果、腎細胞癌に由来する嚢胞液中に特異的に発現する新規の蛋白質として 14-3-3 protein beta/alpha を同定した。同タンパク質は腎癌患者の尿中にも正常腎に比較して有意に高濃度に排泄されており、腎癌のバイオマーカーになり得るものと推察された。

研究成果の概要（英文）：

Proteins in the cyst fluid were separated by reverse-phase high-performance liquid chromatography and agarose two-dimensional gel electrophoresis and were identified by tandem mass spectrometry. Our search resulted in the identification and selection of 14-3-3 protein beta/alpha, which was overexpressed in cyst fluid from cyst-associated RCC but has not been previously associated with RCC. The expression levels of 14-3-3 protein beta/alpha were higher in urine samples from patients with RCC than in samples from healthy volunteers, suggesting that 14-3-3 Protein beta/alpha may be a diagnostically useful biomarker for early diagnosis of RCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌, 腫瘍マーカー, ペプチド解析, プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

当研究グループの取り組み研究申請者は現在北里大学病院泌尿器科に所属し、腎癌患者

の組織、血清、尿、腎嚢胞などの豊富な臨床検体を扱える立場にあり、臨床検体を体系的に収集し、プロテオミクス技術を用いて診断候補蛋白の解析が可能である。研究分担者(小寺)の研究室では2000年より独自のプロテオーム解析技術を基盤に北里大学医学部泌尿器科、千葉大学医学部大学院分子病態解析学講座と共同で大規模なプロテオーム解析を行ってきた(科研費特定領域研究「ゲノム医科学」計画研究班, 2000-2004)。現在, プロテオーム解析の主流はタンパク質を二次元電気泳動(2-DE)法でゲル上に展開し, 高感度質量分析計でタンパク質を同定する方法であり、広く普及している技術である。従来の2-DE法では分子量80kDaを超える高分子量タンパクや塩基性タンパクの解析が困難であった。共同研究を行った北里大学理学部生体分子動力講座では、これを改善したagarose 2-DE法を開発し、200~500kDaもの高分子量タンパク質と塩基性タンパク質の解析・同定に成功した。ヒト前立腺癌細胞株を用いてアンドロゲン耐性獲得メカニズムの検討を行ったところ、前立腺癌由来の蛋白質を226種類検出し、そのうち分子量80kDa以上の蛋白を85種類同定している。(特願2003-313565、Proteomics, 2005)このように本研究では、agarose 2-DE法を応用することで従来の2-DE法では解析しえなかった高分子蛋白領域を解析できるという大きな利点がある。

嚢胞随伴性腎細胞癌には既存の腎嚢胞の内壁を淡明細胞癌が被覆する嚢胞由来腎細胞癌と、腫瘍の大部分が多房性の嚢胞により形成される嚢胞性腎細胞癌があり、しばしば良性病変との鑑別が困難なことがある。嚢胞性腫瘍であるため針生検による組織採取は困難であり、また嚢胞液の吸引細胞診の感受性は低く偽陰性率が高いことが知られている。現在、これらの鑑別診断は超音波断層法やCT、MRIなどによる画像診断に依存しており、嚢胞性病変の形態や隆起性病変の有無、嚢胞壁および隔壁の血流分布などを経時的に観察して診断することが一般的である。したがって複雑性嚢胞の経過観察は長期に及ぶことが多く、有用な腫瘍マーカーの確立が切望されている。

嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液は直接癌組織に接しており、これまで腎癌患者血清から検出困難であった微量な蛋白質が多く含まれている可能性は高いと思われる。嚢胞液は比較的血清成分に近く、我々の血清蛋白同定技術が腎嚢胞にも応用できると考えられ、それにより嚢胞液内癌特異的ペプチドを高効率に検出できる可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は単純性腎嚢胞や多房性腎嚢胞、嚢胞随伴性腎細胞癌から採取した嚢胞液のプロテオーム解析を行い癌特有の蛋白質を同定することにより、より確実に迅速な鑑別診断法を確率することである。本研究の成果は嚢胞随伴性腎細胞癌の診断だけでなく、今まで血清成分では微量で発見されなかった腎癌に対する新規腫瘍マーカーや予後予見因子の発見も期待され、癌研究への根本的發展に寄与するものと考えられる。

3. 研究の方法

① 嚢胞液の処理法の確立 [岩村, 藤田, 笹本, 小寺]嚢胞液は個人差が大きく、前処理の方法も確立されていない。我々の施設では前処理の方法は確立しているが、今後血清の分画方法も組み合わせてゆき、詳細な腎嚢胞液の分析方法を確立してゆく。

② 嚢胞液の比較 [岩村, 松田, 笹本, 大草, 小寺]②-1嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液、正常嚢胞液をK法にてペプチド抽出後またはALB-IgG除去で主要蛋白質除去後にHPLCにて分画し、質量分(MALDI-TOF ms)によって比較し、マーカー候補蛋白

を探索する。②-2多数の嚢胞液をagarose 2-DE法で展開し、癌患者と正常患者の共通の蛋白成分の違いを比較し、蛋白同定を行ってゆく。

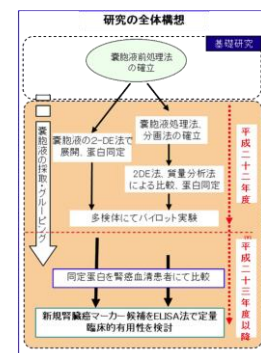
③②で同定した蛋白質を、他の嚢胞液(嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液 5例、正常腎嚢胞 5例)を使用し抗体を使い評価してゆく。

④ELISA法による定量 [岩村, 藤田, 松田, 笹本, 大草, 小寺]

検出した新規腫瘍マーカー候補蛋白をウェスタンブロッティングで嚢胞随伴性腎細胞癌の腎嚢胞液、正常嚢胞液、及び腎癌患者血清と比較し発

現量が増加しているかを確認する。発現を認めた蛋白質について、嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液、正常嚢胞液、腎癌患者血清、健常者血清での発現量をELISA法で定量し、臨床的有用性を検討する。腎癌患者血清については各病理学的ステージの患者血清で確認してゆく。

⑤ 嚢胞随伴性腎細胞癌のペプチド領域での新規マーカー候補蛋白質の同定、評価



[岩村, 小寺, 藤田, 松田]

嚢胞液中のペプチド成分を比較し、嚢胞随伴性腎細胞癌患者と健常者嚢胞液でMS ピークに違いの認められたものを探索する。こうして得たマーカー候補ペプチドをMALDI-TOF/TOF MS を使ったタンデムMS (MS/MS) 測定で同定する。その後、このペプチドの安定同位体標識ペプチドを合成し、内部標準として用いて定量解析を行う。これによってマーカーとしての可能性を多検体で評価する (この方法は既に確立済み)。

4. 研究成果

- ① 嚢胞液の処理法の確立：嚢胞液は個人差が大きく、前処理の方法も確立されていなかった。我々の施設で嚢胞液の成分を調査したところ血清の成分に非常に近いことから、前処理方は血清と同様にアルブミン・IgG 除去カラムを使用した方法を採用した。
- ② 嚢胞液の比較：嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液、正常嚢胞液を ALB-IgG 除去、主要蛋白質除去後に HPLC にて分画し、その後アガロース 2 次元電気泳動を使用しタンパク質を展開した。その後、癌患者と正常患者の共通の蛋白質成分の違いを比較し、蛋白質同定を行った。
- ③ 同定した蛋白質を、他の嚢胞液 (嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液 2 例、正常腎嚢胞 5 例) を使用し抗体を使い評価したところ、14-3-3 protein beta/alpha というタンパク質が嚢胞随伴性腎細胞癌の嚢胞液で過剰発現を認めた。
- ④ 腎癌患者の血清、尿検体でタンパク質量を調査したところ腎癌患者尿でも 14-3-3 protein の過剰発現を認めた。
- ⑤ 多検体比較試験は、嚢胞随伴性腎癌の嚢胞液の数が不十分であったため本年度は行わず、代わりに腎癌患者尿を使用して多検体比較試験を行ったところ有意に 14-3-3 protein の過剰発現を認めた。

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 10 件)

- ① Tadashi Matsuda, Elspeth M. McDougall, Yoshinari Ono, Ryohei Hattori, Shiro Baba, Masatsugu Iwamura, Toshiro Terachi, Seiji Naito, Ralph V. Clayman, Positive Correlation Between Motion Analysis Data on the LapMentor Virtual Reality Laparoscopic Surgical Simulator and the Results from Videotape Assessment of Real

Laparoscopic Surgeries. 査読有, JOURNAL OF ENDOUROLOGY, 26(11), 2012, 1506-1511, DOI:0892/7790

- ② Tetsuo Fujita, Masatsugu Iwamura, Daisuke Ishii, Kenichi Tabata, Kazumasa Matsumoto, Kazunari Yoshida, Shiro Baba, C-reactive protein as a prognostic marker for advanced renal cell carcinoma treated with sunitinib. 査読有, INTERNATIONAL JOURNAL OF UROLOGY, 19(10), 2012, 908-913, DOI:0919/8172
- ③ Hideo Saito, Tadashi Matsuda, Kazunari Tanabe, Akihiro Kawauchi, Toshiro Terachi, Ken Nakagawa, Masatsugu Iwamura, Masanobu Shigeta, Katsunori Tatsugami, Akihiro Ito, Jiro Machida, Mutsushi Kawakita, Hidefumi Kinoshita, Nobuo Shinohara, Naomasa Ioritani, Toshimori Seki, Yoichi Arai, Surgical and Oncological Outcomes of Laparoscopic Partial Nephrectomy: A Japanese Multi-Institutional Study of 1375 Patients. 査読有, JOURNAL OF ENDOUROLOGY, 26(6), 2012, 652-659 DOI: 0892-7790
- ④ 西 盛宏、岩村正嗣、藤田哲夫、笹本 治子、山田泰史、馬場志郎、小径腎腫瘍に対する腹腔鏡下腎部分切除術後腎機能に関する臨床的検討—無阻血・阻血手術の比較—, 査読有, Japanese Journal of Endourology and ESWL, 25(2), 2012, 299-304, DOI: 0914/9635
- ⑤ Satoru Minamida, Masatsugu Iwamura, Yoshio Kodera, Yusuke Kawashima, Kenichi Tabata, Kazumasa Matsumoto, Tetsuo Fujita, Takefumi Satoh, Tadakazu Maeda, Shiro Baba, 14-3-3 Protein beta/alpha as a urinary biomarker for renal cell carcinoma: proteomic analysis of cyst fluid. 査読有, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401(1), 2011, 245-252, DOI: 1618/2642
- ⑥ Satoru Minamida, Masatsugu Iwamura, Yoshio Kodera, Yusuke Kawashima, Masaomi Ikeda, Hiroshi Okusa, Tetsuo Fujita, Tadakazu Maeda, Shiro Baba, Profilin, 1 overexpression in renal cell carcinoma. 査読有, INTERNATIONAL JOURNAL OF UROLOGY, 18, 2011, 63-71 DOI: 0919-8172
- ⑦ 岩村正嗣、西 盛宏、池田勝臣、土田 繭美、笹本治子、南田 諭、別所英治、村本将俊、宋 成浩、馬場志郎、腹腔鏡下腎盂形成術：初期 50 尿管の長期成績, 査読

- 有, Japanese Journal of Endourology and
ESWL, 24, 2011, 282-298 DOI: 0914-9635
- ⑧Kazumasa Matsumoto, Masanori Noguchi,
Takefumi Satoh, Ken-Ichi Tabata, Tetsuo
Fujita, Masatsugu Iwamura, Akira Yamada,
Nobukazu Komatsu, Shiro Baba and Kyogo
Itoh, A phase I study of personalized
peptide vaccination for advanced
urothelial carcinoma patients who
failed treatment with methotrexate,
vinblastine, adriamycin and cisplatin.
査読有, BJU INTERNATIONAL, 108(6), 2011,
831-838 DOI:1464-4096
- ⑨Masaomi Ikeda, Kazumasa Matsumoto,
Ken-ichi Tabata, Satoru Minamida,
Tetsuo Fujita, Takefumi Satoh,
Masatsugu Iwamura, Shiro Baba,
Combination of Gemcitabine and
Paclitaxel is a Favorable Option for
Patients with Advanced or Metastatic
Urothelial Carcinoma Previously
Treated with Cisplatin-based
Chemotherapy, 査読有, JAPANESE JOURNAL
OF CLINICAL ONCOLOGY 41(10), 2011,
1214-1220 DOI: 0368/2811
- ⑩平山貴博、設楽敏也、藤田哲夫、久保 星
一、岩村正嗣、馬場志郎, Morcellation
における hand-piece 反転法の有用性の実
証, 査読有, Japanese Journal of
Endourology and ESWL, 23(1), 2010,
133-137 DOI: 0914/9635

[学会発表] (計6件)

- ① 岩村正嗣, 腹腔鏡下根治的左腎摘除術 (経
腹膜到達法), 第19回泌尿器腹腔鏡ビデ
オ講習会, 2012. 9. 22, 東京
- ② T. Piechaud, CC. Abbou, R. Van
Velthoven, S. Egawa, M. Iwamura,
SH. Lu, YC. Tsai, SM. Wang, Approach of
the lower urinary system, ADVANCED
COURSE IN LAPAROSCOPIC UROLOGICAL
SURGERY, 2012. 8. 31, 台湾
- ③ 岩村正嗣、藤田哲夫、南田 諭、馬場志
郎 腎細胞癌に対するリンパ節郭清の意
義: To do or not to do? 第100回日本泌
尿器科学会総会, 2012. 4. 24. 横浜
- ④ Masatsugu Iwamura, Partial nephrectomy,
ADVANCED COURSE IN LAPAROSCOPIC
UROLOGICAL SURGERY, 2011. 9. 3, 台湾
- ⑤ Masatsugu Iwamura, Cystotomy, ADVANCED
COURSE IN LAPAROSCOPIC UROLOGICAL
SURGERY, 2011. 9. 2, 台湾
- ⑥ 岩村正嗣、腹腔鏡下腎盂形成術: 経腹膜
的アプローチによる Anderson-Hynes 法
の手術手技, 第24回日本Endourology・ESWL
学会総会, 2010. 10. 22, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩村 正嗣 (IWAMURA MASATSUGU)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 20176564

(2) 研究分担者

藤田 哲夫 (FUJITA TETSUO)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 00306599

田畑 健一 (TABATA KENICHI)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 20327414

西 盛宏 (NISHI MORIHIRO)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 40383624

若田部 陽司 (WAKATABE YOJI)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 10525710

大草 洋 (OKUSA HIROSHI)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 70337963

笹本 治子 (SASAMOTO HARUKO)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 70439115

松田 大介 (MATSUDA DAISUKE)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 50348570

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)
北里大学・理学部・准教授
研究者番号: 60265733