

## 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 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700904

研究課題名（和文）

細胞培養上清のセクレトーム解析による膵癌の血中診断マーカー探索と診断法の確立

研究課題名（英文）

Development of a diagnostic marker and method for pancreatic cancer using secretome and proteome analysis.

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（和文）：安定同位体標識した膵癌感受性株、耐性株のホール細胞抽出物のタンパク質の比較を行った。2倍以上の増減を示す120タンパク質を同定することができた。これまでに、抗体を使いバリデーションを行っており、20タンパク質で再現性が取れている。また、膜タンパク質の比較解析においても2倍以上の増減を示す30タンパク質を同定することができた。ターゲットタンパク質の siRNA を用いた実験で抗癌剤への感受性の上昇がみられている。培養上清については、10%FBS 添加培地・無血清培地（各分泌刺激を含む）で膵癌株、耐性株を培養して上清を取得し、質量分析計での比較解析の結果、2倍以上の増減を示すタンパク質を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we employed a quantitative proteomics technique using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) followed by mass spectrometry to quantify changes in protein levels between gemcitabine resistant and sensitive pancreatic cancer cells. The 120 proteins were shown more than 2-fold change between the resistant and sensitive cell lines, of which twenty proteins were confirmed by WB. Moreover, 30 proteins were changed more than two times in the comparative analysis of membrane proteins. The siRNA-mediated inhibition of protein expression which was increased in resistant cells increased the cytotoxic effect of gemcitabine. We identified the candidate proteins of diagnosis marker in secretome analysis, the validation of candidate proteins in the serum is now underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：プロテオミクス解析

## 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。

血中の腫瘍マーカー候補ペプチドの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]。また、血清中の診断マーカー探索において一番問題となる 22 種類で総タンパク量の 99% を占めるメジャータンパク質 [Tirumalai RS., et al., Mol. Cell. Proteomics 2.10, 1096-1103, 2003] を除去し、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] も行われている。

以上のように血中で癌細胞から分泌・逸脱しているタンパク質・ペプチドの探索は盛んに行われているが、培養上清から探索し、患者血中で定量評価していく研究はあまり行われていない。

## 2. 研究の目的

現在多くの研究グループが早期診断を目指した血中の腫瘍マーカー候補ペプチドの探索を行っている。しかし、そのほとんどが血清・血漿からの直接探索したものである。本研究では最初に培養上清から癌細胞から分泌・逸脱する診断マーカー候補タンパク質・ペプチドの探索・同定を行う。その後、患者血清・血漿を用いて分泌タンパク質・ペプチドを定量評価していくことで、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

研究の全体像を図1に示した。

(1) SILAC法による細胞培養と培養上清採取  
安定同位体標識アミノ酸を添加した培地で野生株・耐性株の培養を行う。野生株・耐性株ともに、Light・Heavyでの標識を行う。これにより、実験の再現性をとることができる。極力細胞が壊れることでのタンパク質の流出を避けるために、無血清培地での培養は行わず、80%コンフルエントでの継代を行う。培養上清採取後の遠心も2段階で行う。ネガティブコントロールとして培養液を用いる。さらに、膵β細胞への刺激でよく用いられるグルコース・IBMXで細胞を刺激して培養上

清を採取する。これにより、刺激（濃度）依存的に分泌・逸脱しているタンパク質と細胞が死ぬことで流出したタンパク質を区別する。現在、別の癌細胞株で、刺激依存的に分泌されているタンパク質を検出しており、有効な方法だと考えている。野生株・耐性株中のタンパク質は細胞分画を行う。

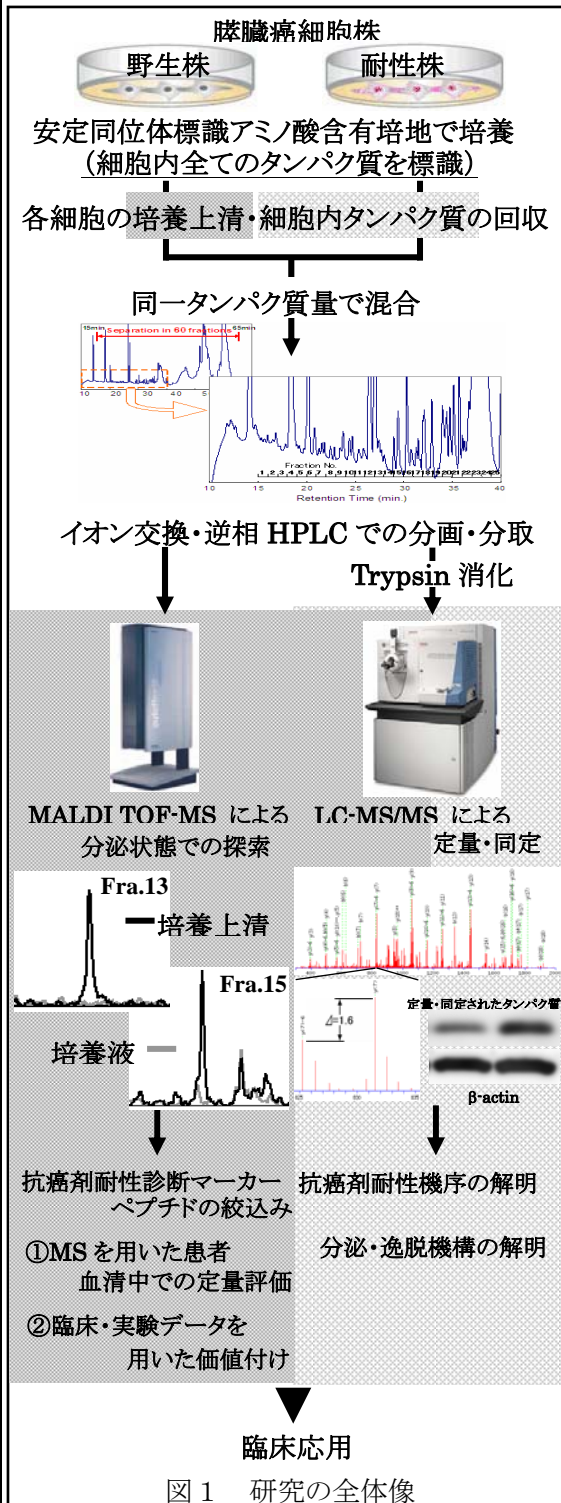


図1 研究の全体像

(2) 細胞分泌・逸脱タンパク質・ペプチドの探索と培養細胞中のタンパク質解析  
分画したペプチドを MALDI TOF-MS で測

定し、野生株と抗癌剤耐性株ならび段階的な分泌刺激で発現量の変化の見られるペプチドを探索する。測定は自動測定で行う。また、細胞分泌・逸脱タンパク質・ペプチドは各画分ごとにトリプシン消化を行い、LC-MS で測定し、定量・同定していく。

細胞中のタンパク質は細胞分画後、直接または等電点・イオン交換カラムで分離して SDS-PAGE を行う。電気泳動後ゲル内消化を行って LC-MS 測定し、定量・同定する。定量結果から発現量に差の認められたタンパク質については Western Blotting を行い確認して機能解析につなげる。

(3) 臨床応用可能な診断マーカー候補としての絞込み (価値付け)

①臨床データ：臨床・病理・検査データから、早期診断・予後予測・抗癌剤効果予測に優れているものを絞り込む。この部分は医師の意見が非常に重要であるので、積極的に共同研究を行う。

②実験データ：申請者が行う膵癌以外にもセンターでは肝癌・胃癌・大腸癌等の癌患者血清だけでなく、疾患コントロールとなる良性疾患の血清・健康診断時採取の健康人血清とインフォームドコンセントの得られた血清を保有しているので、さまざまな疾患で比較し、特異度を調べる。また、各癌の MS 測定データと検査データを用いて多変量解析を行い、診断に使える腫瘍マーカー候補ペプチドのセットを探していく。これにより個別には有意差が低くとも診断に使えるペプチドを拾い上げていく。

#### 4. 研究成果

安定同位体標識した膵癌感受性株、耐性株のホール細胞抽出物のタンパク質の比較を行った。2 倍以上の増減を示す 120 タンパク質を同定することができた。(図 2)

これまでに、抗体を使いバリデーションを行っており、20 タンパク質で再現性が取れている。さらに、変動のあったタンパク質の相互作用情報を基にしたパスウェイ解析において 2 つの経路に分類されることが示唆された。また、膜タンパク質の比較解析においても 2 倍以上の増減を示す 30 タンパク質を同定することができた。

マーカー候補タンパク質の病理組織標本を使ったバリデーションも行った結果、2 タンパク質が癌部で高発現していることがわかった。現在、多検体でのバリデーションと臨床情報を組み合わせた解析を行っている。

ターゲットタンパク質の siRNA を用いた実験で抗癌剤に対する感受性の向上がみられている。

培養上清については、10%FBS 添加培地・無血清培地 (各分泌刺激を含む) で膵癌株、耐性株を培養して上清を取得し、質量分析計での比較解析の結果、2 倍以上の増減を示す

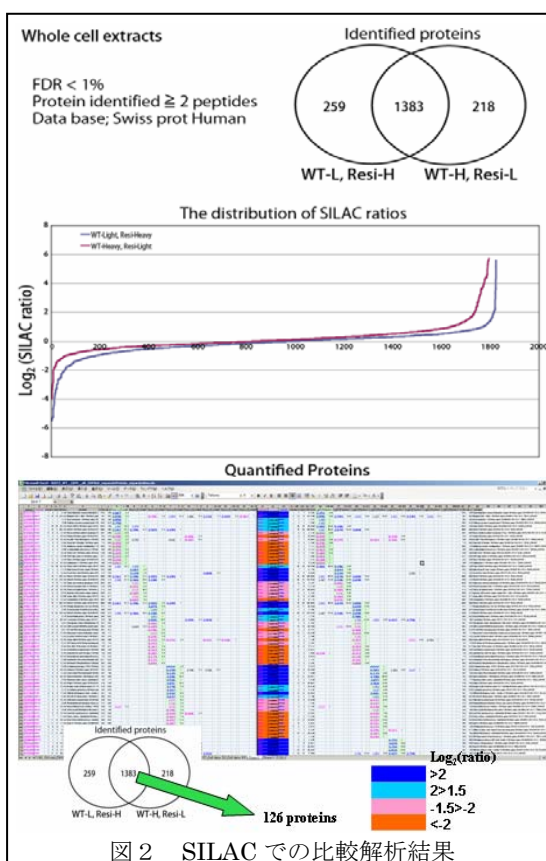


図 2 SILAC での比較解析結果

タンパク質を同定することができた。これらの中で細胞中での発現量と一致しているタンパク質もあり、WB でも確認することができた。

#### 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 7 件)

- ① Guo F, Hiroshima K, Wu D, Satoh M, Abulazi M, Yoshino I, Tomonaga T, Nomura E, Nakatani Y. Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: its expression and possible clinical significance. *Human pathology*. 査読有、2012 Feb 2. in press.
- ② Katada K, Tomonaga T, Satoh M, Matsushita K, Tonoike Y, Kodera Y, Hanazawa T, Nomura E, Okamoto Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of proteomics*. 査読有、2012 16; 75(6): 1803-1815.
- ③ Abulazi M, Tomonaga T, Satoh M, Sogawa K, Matsushita K, Kodera Y, Obul J, Takano S, Yoshitomi H, Miyazaki M, Nomura F. The application of a three-step proteome analysis for identification of new biomarkers of pancreatic cancer. *International journal of proteomics*. 査読有、2011; 2011:628787.



- ④ Kiyokawa I, Sogawa K, Ise K, Iida F, Satoh M, Miura T, Kojima R, Katayama K, Nomura F. Adsorption of urinary proteins on the conventionally used urine collection tubes: possible effects on urinary proteome analysis and prevention of the adsorption by polymer coating. *International journal of proteomics*. 査読有、2011;2011:502845.
- ⑤ Umemura H, Togawa A, Sogawa K, Satoh M, Mogushi K, Nishimura M, Matsushita K, Tanaka H, Takizawa H, Kodera Y, Nomura F. Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis. *J Gastroenterol*. 査読有、2011; 46(5):577-85.
- ⑥ Yahiro K, Satoh M, Morinaga N, Tsutsuki H, Ogura K, Nagasawa S, Nomura F, Moss J, Noda M. Identification of subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun*. 査読有、2011 ;79(2):617-27.
- ⑦ Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-step serum proteome analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 査読有、2011 Feb;35(2):211-7.

[学会発表] (計6件)

- ① 佐藤守, 高野重紹, 石橋真澄, 吉富秀幸, 西村基, 曾川一幸, 松下一之, 賀川真吾, 荷堂清香, 宮崎勝, 野村文夫 ジェムシタピン耐性ヒト膵癌細胞株のプロテオーム解析、JHUPPO 第9回大会、2011年7月28日 新潟市朱鷺メッセ
- ② 土田祥央, 佐藤守, 曾川一幸, 川島祐介, 荷堂清香, 澤井撰, 西村基, 松下一之, 小寺義男, 野村文夫 定量的ショットガンプロテオミクスによる歯周疾患マーカーの探索、JHUPPO 第9回大会、2011年7月28日 新潟市朱鷺メッセ
- ③ 佐藤守 質量分析計を用いた生体資料の定量測定、第8回千葉大学分析センターセミナー (NMR・MS定量分析基礎講座)、2011年9月6日、千葉大学けやき会館3階レセプションホール
- ④ 海老瀬広規、村上聡史、佐藤守、荷堂清香、安藤昭一、齋藤明広 放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) における MsiK-ABC 輸送系複合体の探索、第8回21世紀大腸菌研究会、2011年5月18日、南木曾 ホテル木曾路
- ⑤ 佐藤守, 高野重紹, 石橋真澄, 吉富秀幸,

賀川真吾, 宮崎勝, 曾川一幸, 野村文夫 膵臓癌組織のプロテオーム解析、JHUPPO 第8回大会、2010年7月27日、東京ベイホテル東急

- ⑥ 佐藤守 プロテオーム解析をもっと身近に、資生堂ユーザーズセミナー (リアル LCcafe)、2010年11月26日、東京コンファレンスセンター品川

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 免疫測定方法、それに用いるキットおよびそれを用いた癌判定方法

発明者: 小島良、野田健太、宮崎勝、吉富秀幸、高野重紹、野村文夫、佐藤守、曾川一幸

権利者: 千葉大、日東紡績

種類: 特許

番号: 特願 2010-122204

出願年月日: 2010年5月28日

国内外の別: 国内

名称: データ収集方法、キット及び腫瘍マーカー

発明者: 小島良、野田健太、宮崎勝、吉富秀幸、高野重紹、野村文夫、佐藤守、曾川一幸

権利者: 千葉大、日東紡績

種類: 特許

番号: 特願 2010-129157

出願年月日: 2010年5月28日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

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) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 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  
宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：70166156  
吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：60375631  
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

(4) 研究協力者

川島 祐介 (KAWASHIMA YUSUKE)  
北里大学・理学部・日本学術振興会特別研究員