

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10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：22790521

研究課題名(和文) 血清糖タンパク質・ペプチド解析による原発性肝細胞癌のマーカー探索・同定・臨床応用

研究課題名(英文) The serum glycoprotein/peptide analysis for discovery of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma.

研究代表者

曾川 一幸 (SOGAWA KAZUYUKI)

千葉大学・医学部附属病院・寄附研究部門教員

研究者番号：50436440

研究成果の概要(和文)：

原発性肝細胞癌診断に用いる腫瘍マーカーは画像診断に及ばなく、新たなマーカーの探索が急務である。探索では原発性肝細胞癌患者術前後血清 20 組(計 40 検体)を使用し、血清中のメジャータンパク質 12 種類を除去し、MB-LAC ConA, MB-LAC LCA を使用し、N 型糖タンパク質を抽出後、逆相 HPLC で分画した各フラクションを二次元電気泳動で解析した。手術前後血清 10 組以上で、Desmoplakin, Elongation factor 2, Heat shock protein HSP 90-beta, Lamin-A/C, Involucrin, Serpin B3, Serpin B4, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Protein S100-A9 は手術前で発現量が高く、特に Growth/differentiation factor 5 の発現量の増加がみられた。検証では健常者血清、慢性肝炎患者血清、肝硬変患者血清及び原発性肝細胞癌患者血清各 50 検体を使用し、Growth/differentiation factor 5 の ELISA kit を用いて解析した。肝硬変患者血清と原発性肝細胞癌患者血清との間で統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

研究成果の概要(英文)：

Changes in glycosylation, most notably fucosylation, have been associated with the development of hepatocellular carcinoma (HCC). In this report, the levels of growth/differentiation factor 5 (GDF5) was analyzed individually with currently used marker, AFP and PIVKA-II, for the ability to distinguish between a diagnosis of cirrhosis and HCC. This analysis was done on serum from 50 patients with cirrhosis and 50 serum samples from patients with cirrhosis plus HCC. The levels of GDF5 was significantly higher in patients with HCC compared with those with cirrhosis ($P < 0.01$).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：プロテオミクス, 糖タンパク質, 糖ペプチド

1. 研究開始当初の背景

わが国の年間の原発性肝細胞癌による死亡者数は3万人を超えている(Marugame T. *Jpn J Clin Oncol*, 37, 884-891, 2007)。また、わが国では約200万人のC型肝炎ウイルスキャリアが存在すると推定されており、原発性肝細胞癌による死亡者の約8割がC型肝炎ウイルス感染に由来していると考えられ、原発性肝細胞癌対策を考える際にはC型肝炎ウイルス感染との関係が重要となる。またわが国に限らず欧米諸国においてもB型肝炎ウイルス感染ではなくC型肝炎ウイルス感染とそれ由来の原発性肝細胞癌が問題になっている(Niederau C. et al., *Hepatplogy*, 1998)。

原発性肝細胞癌の早期診断体系において、現在利用されている腫瘍マーカー(AFP, AFP-L3, PIVKA-II)はその診断効率において超音波検査などの画像診断に及ばないのが現状であり、新たなマーカーの探索が急務である。

2. 研究の目的

本研究は2つの方法をもとに、疾病特異的に発現量の変動を受ける血清中のN型糖タンパク質・ペプチドを探索し、同定する。既存のマーカー(AFP, AFP-L3, PIVKA-II)との比較を行う。原発性肝細胞癌の早期発見、再発予測を行うための既存腫瘍マーカーより感度・特異度のよいアッセイ系の構築し、臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 血清の糖ペプチド解析

ペプチド抽出において大きな問題点は、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。様々な条件検討の結果、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を用いる(*J. Electrophoresis*, 2005)。

血清から抽出したペプチドはMB-LAC ConA, MB-LAC LCA (Bruker Daltonics社)を使用し、N型糖ペプチドを抽出し、逆相HPLCにより溶媒流速200 μ l/minで1min毎に30フラクション分画する。そして各フラクションをMALDI-TOF MSで測定し、発現解析を行い、マーカー候補糖ペプチドを探索する。

マーカー候補糖ペプチドの同定は、分子量が3,000Da以下のペプチドでヒトタンパク質データベース上にあるペプチドに関しては、MALDI-TOF MSのタンデムMS(MS/MS)測定で同定することが可能である。データベース上にないペプチドまたは分子量が3,000Da以上のペプチドについては単離して、N末端アミノ酸配列解析を行う。1種類のペプチドの単離は一般的には非常に困難である。しかし、2種類の溶媒を使ったtwo-step逆相HPLCの技術を確立している。ペプチドの全アミノ酸配列の決定、または、翻訳後修飾を受けたペプチドの同定にはアミノ酸配列解析だけでは不完全な場合がある。この場合は超高分解能質量分析計(QhFT MS)で解析を行う。

(2) 血清中のN型糖タンパク質解析

血清中にはAlbuminやIgGなど22種類のタンパク質が全体の99%の存在量を占めてい

るため、わずか1%に含まれているタンパク質を検出するのは困難である。従って、あらかじめメジャータンパク質を除く必要がある。Proteome Lab Ig-Y column (Beckman Coulter社) を用い、メジャータンパク質12種類 (Albumin, IgG, Transferrin, Fibrinogen, IgA, α 2-Macroglobulin, IgM, α 1-Antitrypsin, α 1-acid Glycoprotein, Apolipoprotein A-1, Apolipoprotein A-2) を除去し、MB-LAC ConA, MB-LAC LCA (Bruker Daltonics社) を使用し、N型糖タンパク質を抽出し、逆相HPLCにより溶媒流速400 μ l/min で1min毎に30フラクション分画する。そして各フラクションを二次元電気泳動により解析する (Shock, 2009)。

一次元目のゲルは、従来からよく用いられている固定化pH勾配ゲルに比べて多量のタンパク質が添加でき、さらに固定化pH勾配ゲルでは分離出来ない高分子量タンパク質の検出に適しているアガロールゲルを用い、泳動ゲルは7.5-15%勾配SDS-PAGEを用いて行う。

Progenesis (nonlinear 社) 解析ソフトウェアを用いて発現解析を行う。手術前後で有意に発現量の異なるスポットを切り出し、トリプシンによる in gel 消化後、LT-Q (Thermo Fisher Scientific 社) によりMS/MS 測定する。測定データは Mascot sarch (Matrix Science 社) を用いN型糖タンパク質を同定する。

(3) 新規腫瘍マーカー候補N型糖タンパク質・ペプチドのバリディーション

原発性肝細胞癌の新規腫瘍マーカーN型糖タンパク質・ペプチド候補の妥当性を検討するため、健常者・慢性肝炎患者・肝硬変患者・原発性肝細胞癌患者各50症例を対象に行う。新規腫瘍マーカー候補N型糖タンパク質に関

しては、糖鎖及びタンパク質に特異的な抗体を購入もしくは作成し、Western blotting・ELISA によりバリディーションする。新規腫瘍マーカー候補N型糖ペプチドに関しては、糖鎖及びペプチドに特異的な抗体を購入もしくは作成し、免疫沈降を行い、MALDI-TOF MS で測定し検証する。ELISA を構築してバリディーションする。抗体の購入・作成が困難な場合は、三連四重極型質量分析計を用いたSRM (Selected Reaction Monitoring) 法を利用する。ペプチドをダイレクトに測定可能であり、分子選択性が高く、高感度 (ng/ml 以下の検出感度) ・同時多項目定量分析が可能である。

(4) 新規腫瘍マーカー候補タンパク・ペプチドと既存マーカーとの比較

原発性肝細胞癌の早期診断血清検査において、現在利用されている腫瘍マーカーはAFP, AFP-L3, PIVKA-II であるが、感度・特異度ともに満足いくものではない。内科・外科と連携することにより、疾患プロテオーム解析で問題となる試料の採取条件、保存条件の揃っている臨床データのある健常者・慢性肝炎患者・肝硬変患者・原発性肝細胞癌患者各50症例を対象にして、新規腫瘍マーカーと既存腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3, PIVKA-II) とを比較検討する。

4. 研究成果

(1) 血清中の糖ペプチド解析

原発性肝細胞癌患者術前後血清20組 (計40検体) を使用し、MB-LAC ConA, MB-LAC LCA (Bruker Daltonics社) を使用し、N型糖ペプチドを抽出後、逆相HPLCにより30フラクション分画した。各フラクションをMALDI-TOF MS で測定し、発現解析を行った。術前後に12ピーク統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた

。各マーカー候補糖ペプチドの同定を進めている。

(2) 血清中の糖タンパク質解析

原発性肝細胞癌患者術前後血清 20 組 (計 40 検体) を使用し、血清中のメジャータンパク質 12 種類を除去し、MB-LAC ConA, MB-LAC LCA (Bruker Daltonics 社) を使用し、N 型糖タンパク質を抽出後、逆相 HPLC で分画した各フラクションを二次元電気泳動で解析した。術前後に 42 スポット統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。各マーカー候補糖タンパクの同定を進めている。

(3) 新規腫瘍マーカー候補糖タンパク・ペプチドのバリディーション

原発性肝細胞癌患者術前後血清 20 組 (計 40 検体) を使用し解析を行った結果、手術前後血清 10 組以上で、Desmoplakin、Elongation factor 2、Heat shock protein HSP 90-beta、Lamin-A/C、Involucrin、Serpin B3、Serpin B4、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、Protein S100-A9 は手術前で発現量が高く、特に Growth/differentiation factor 5 の発現量の増加がみられた。検証を行うため、健常者血清、慢性肝炎患者血清、肝硬変患者血清及び原発性肝細胞癌患者血清各 50 検体を使用し、Growth/differentiation factor 5 の ELISA kit を用いて解析した。肝硬変患者血清と原発性肝細胞癌患者血清との間で統計学的有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

(4) 新規腫瘍マーカー候補タンパクと既存マーカーとの比較

新規腫瘍マーカー候補である Growth/differentiation factor 5 と既存腫瘍マーカー (AFP, AFP-L3, PIVKA-II) とを比較検討するため、健常者血清、慢性肝炎患者

血清、肝硬変患者血清及び原発性肝細胞癌患者血清各 50 検体を使用し行っている。

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 7 件)

- ① 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 –、査読有、Vol.35、No.2、2011、pp.211-217
- ② Sogawa K, Kodera Y, Noda K, Ishizuka Y, Yamada M, Umemura H, Maruyama K, Tomonaga T, Yokosuka O, Nomura F, The measurement of a fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution、Clinica Chimica Acta、査読有、Vol.412、No.11-12、2011、pp.1094-1099
- ③ 曾川一幸, 野田健太, 梅村啓史, 清宮正徳, 金井文彦, 今関文夫, 瀧澤弘隆, 横須賀収, 野村文夫、Fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa フラグメント (F I C 5.9) の線維化マーカーとしての評価、医学と薬学、査読有、66 巻、2011、329-337

[学会発表] (計 5 件)

- ① 曾川一幸, 飯田史枝, 佐藤 守, 川島祐介, 山田真子, 角谷真知子, 丸山勝也, 和田芳直, 野村文夫、HPLC と MALDI-TOF MS による血清糖鎖欠損トランスフェリンの評価、第 31 回アルコール医学生物学研究会学術集会、2012 年 1 月 28 日、ホテル日航金沢
- ② 曾川一幸, 飯田史枝, 佐藤 守, 川島祐介, 山田真子, 角谷真知子, 丸山勝也, 和田芳直, 野村文夫、血清糖鎖欠損トランスフェリンの高感度測定を目指して、第 30 回アルコール医学生物学研究会学術集会、2010 年 11 月 26 日、久留米翠香園ホテル
- ③ Sogawa K, Kodera Y, Noda K, Umemura H, Matsushita K, Kojima R, Katayama K, Nomura F, Measurement

of 5.9 kDa fragment of fibrinogen alpha-C chain (FIC 5.9) by MALDI-TOF MS with stable-isotope labeled standard in patients with liver diseases、HUPO 9th Annual World Congress、2010年9月20日、Sydney, Australia

- ④ 曾川一幸、高野重紹、清宮正徳、佐藤守、小寺義男、野村文夫、消化器領域における多戦略的疾患プロテオミクス、第57回日本臨床検査医学会学術集会、2010年8月29日、京王プラザホテル
- ⑤ 曾川一幸、野田健太、小島良、野村文夫、質量分析装置を用いた問題飲酒者診断法確立への基礎的検討、第59回日本医学検査学会、2010年5月23日、神戸国際会議場

〔図書〕(計3件)

- ① 曾川一幸、他、東洋書店、アルコールと医学生物学、2010、82-88

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

名称：コフィリンとその自己抗体との複合体の免疫測定方法、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：曾川一幸、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
権利者：同上

種類：特許

番号：2010-122204

出願年月日：22年5月28日

国内外の別：国内

名称：Novel Biomarkers of Biliary Tract Cancer

発明者：曾川一幸、吉川真太郎、横須賀收、野村文夫

権利者：同上

種類：特許

番号：2010-248021

出願年月日：22年11月5日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moldiag/clinical_proteomics_index.html

(1)研究代表者

曾川一幸(SOGAWA KAZUYUKI)

千葉大学・医学部附属病院・寄附研究部門
教員

研究者番号：50436440