

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 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790522

研究課題名（和文） 網羅的自己抗体検出系による血清胃癌マーカーの開発と臨床応用

研究課題名（英文） The development and clinical application of the novel autoantibody for gastric cancer using proteomic analysis

研究代表者

梅村 啓史（UMEMURA HIROSHI）

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90456070

研究成果の概要（和文）：癌の細胞株を抗原とし、血清を網羅的にウェスタンブロットすることによって血中の自己抗体をスクリーニングするプロテオーム解析の系を確立した。次に低分化胃癌の細胞株から抽出したタンパク質を電気泳動し、胃癌患者血清と健常人血清を一次抗体とした網羅的ウェスタンブロッティングを行った。その結果、複数のバンドが検出され、質量分析計によってタンパク質を同定したところ、30種類のタンパク質が同定された。合成タンパク質を用いた検証実験において、2種類のタンパク質の検証に成功した。これらは新規の低分化胃癌マーカーと考えられる。

研究成果の概要（英文）

We constructed a novel proteomic analysis system for the detecting of autoantibodies from sera. This system is composed of first screening procedure of comparative western blotting and subsequent mass analysis. At first, we extracted proteins from four poorly-differentiated gastric cancer cell lines. Using comprehensive western blotting in which protein extracts were used as antigen, we analysed sera from gastric cancer patients and healthy controls. In this analysis, we detected several bands, and identified thirty proteins from these bands with mass spectrometry. Among them, two proteins were successfully validated. These proteins were considered to be novel biomarkers for poorly-differentiated gastric cancer

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：プロテオーム、癌、臨床検査、自己抗体、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

平成 19 年 11 月に抗 p53 抗体が食道癌・大腸癌・乳癌に対する血清腫瘍マーカーとし

て保険適応を受けた。それまでに保険適応となっている他の腫瘍マーカーが全て癌細胞から分泌されるタンパク質であったのに対

し、この抗 p53 抗体は腫瘍が直接分泌する物質を測定するのではなく、抗体を測定する腫瘍マーカーとして初めて保険適応が認められたという点が画期的である。従来の癌細胞が分泌するタンパク質を探索するという戦略以外に、生体が癌を認識して産生する、自己抗体をターゲットとする手法もまた有効と考えられる。

胃癌は現在、日本人の癌死因の第 2 位を占めている。現在胃癌を診断するのに最も優れた手法は胃内視鏡であるが、大規模スクリーニングには適さない、特に予後の悪い印環細胞癌、低分化胃癌に対する診断効率が低い、侵襲性がある、といった欠点がある。既存の腫瘍マーカーは感度・特異度ともに不十分で有る。従って、胃癌を効率的に低侵襲で診断でき、特に予後不良な組織型を検出できる腫瘍マーカーが求められている。

2. 研究の目的

今回、血清から自己抗体を網羅的にスクリーニングする実験系を新規に確立した。本研究では、この新規の実験系を用いて胃癌患者および健康コントロールの血清を用いて、プロテオーム解析を行う。血中有用な血中腫瘍マーカーが存在せず、かつ罹患者の多い胃癌をターゲットとしてこの新規探索技術を応用し、胃癌患者血清中に存在する自己抗体を検出することを目的とする。網羅的な解析の一方でタンパク質の機能解析も行い、胃癌との関連を正確に立証することで、臨床検査としての意義を確立するのみならず、発癌や癌の進行に関するメカニズムの解明にも貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

胃癌培養細胞株からタンパク質を 4 画分に分けて抽出し、アガロース二次元電気泳動に

よって分離、患者血清を一次抗体としたウェスタンブロッティングによって抗原を検出する。膜タンパク質等の難溶性タンパク質に関しては SDS-PAGE によって対応する。これらの工夫によって、他の二次元電気泳動法をベースとした従来のプロテオーム解析技術では不可能な、高分子タンパク質や難溶性タンパク質の検出が可能となった。抗原タンパク質の同定においては、二種類の質量分析計によって速やかな同定を行った。そして同定されたタンパク質のリコンビナントの純品を入手し、これを抗原としたウェスタンブロッティングによって検証実験を行った。

4. 研究成果

(1) 低分化胃癌細胞株 4 種類からタンパク質を抽出し、これらに対して 16 症例ずつの胃癌血清をアプライし、自己抗体スクリーニングのウェスタンブロッティングを行った。反応するバンドを切り出してタンパク質を質量分析計で同定した。

(2) 質量分析計を用いて同定に成功したタンパク質は約 30 種類あり、これらに対する自己抗体が新規の低分化胃癌マーカー候補として考えられた。これらのうち①転写因子、細胞骨格系タンパク質、シグナル伝達系タンパク質等、発癌や癌の浸潤・転移に関係していると推定されるタンパク質であること、②複数の低分化胃癌細胞株にまたがって同定されているタンパク質であること、③低分化胃癌でも 3 種類の組織型のうち 2 種類以上の患者で反応しているタンパク質であること、④リコンビナントの合成タンパク質がコマーシャルに得られるタンパク質であること、を優先条件として絞込みを行った。絞込みの作業によって 8 種類のタンパク質を選んだ。

(3) 選んだ 8 種類のタンパク質を電気泳動し、最初のスクリーニングに用いた胃癌 16 症例の血清と反応させ、バリデーションを行った。

その結果、8種類のうち3種類のタンパク質でバリデーションに成功した。

(4)バリデーションに成功した3種類のタンパク質を抗原としたウェスタンブロットティングを再度行った。この際に用いた患者血清は最初のスクリーニングに用いた血清とは別セットの32例、および性別・年齢をマッチさせた健常コントロール32例であった。その結果、3種類のタンパク質のうち2種類に対する自己抗体が新規の低分化胃癌マーカー候補として確認されるに至った。

(5)これら64人分の血清で感度・特異度のROC分析を行ったところ、既存の腺癌マーカーである、CEAとCA19-9を上回るAUC(area under curve)が得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

(1) "Serum level of fibrinogen A α chain fragment increases in chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Yano T, Sogawa K, Umemura H, Sakao S, Kasahara Y, Tanabe N, Kodera Y, Takiguchi Y, Tatsumi K, Nomura F. *Circ J*. 2011;75(11):2675-82.

(2) "Identification of vitronectin as a novel serum marker for early breast cancer detection using a new proteomic approach." Kadowaki M, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Yoshitomi H, Takano S, Sogawa K, Umemura H, Fushimi K, Nakatani Y, Nomura F, Miyazaki M. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Jul;137(7):1105-15. Epub 2011 Jan 21.

(3) "The measurement of a fibrinogen α C-chain 5.9 kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution."

Sogawa K, Kodera Y, Noda K, Ishizuka Y, Yamada M, Umemura H, Maruyama K, Tomonaga T, Yokosuka O, Nomura F. *Clin Chim Acta*. 2011 May 12;412(11-12):1094-9.

(4) "Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis."

Umemura H, Togawa A, Sogawa K, Satoh M, Mogushi K, Nishimura M, Matsushita K, Tanaka H, Takizawa H, Kodera Y, Nomura F. *J Gastroenterol*. 2011 May;46(5):577-85.

(5) "Decreases in the serum VLDL-TG/non-VLDL-TG ratio from early stages of chronic hepatitis C: alterations in TG-rich lipoprotein levels." Nishimura M, Yamamoto H, Yoshida T, Seimiya M, Sawabe Y, Matsushita K, Umemura H, Sogawa K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. *PLoS One*. 2011 Feb 25;6(2):e17309.

(6) "Increased serum levels of pigment epithelium-derived factor by excessive alcohol consumption-detection and identification by a three-step serum proteome analysis." Sogawa K, Kodera Y, Satoh M, Kawashima Y, Umemura H, Maruyama K, Takizawa H, Yokosuka O, Nomura F. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011

Feb;35(2):211-7.

(7) "Effects of humidity on the dried-droplet sample preparation for MALDI-TOF MS peptide profiling."

Umemura H, Kodera Y, Nomura F.

Clin Chim Acta. 2010 Dec 14;411(23-24):2109-11.

(8) "Reducing the incidence of pseudohyperkalemia by avoiding making a fist during phlebotomy: a quality improvement report."

Seimiya M, Yoshida T, Sawabe Y, Sogawa K,

Umemura H, Matsushita K, Nomura F.

Am J Kidney Dis. 2010 Oct;56(4):686-92.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 啓史 (UMEMURA HIROSHI)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90456070

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者