

## 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 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790530

研究課題名（和文） プロテオミクスによる卵巣明細胞腺癌の分泌タンパク質の解析および診断、治療への応用

研究課題名（英文） Proteomic analysis of secreted protein of ovarian clear cell adenocarcinoma for therapeutic and diagnostic applications.

研究代表者 荒川 憲昭 (ARAKAWA NORIAKI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教

研究者番号：60398394

## 研究成果の概要（和文）：

上皮性卵巣癌の中でも、卵巣明細胞腺癌は化学療法に対する抵抗性が高く予後不良例が多い。また、明細胞腺癌では代表的腫瘍マーカーCA125が低値な症例も多く、本疾患を高い精度で検出できる血清診断マーカーの開発が必要である。本研究では、明細胞腺癌由来細胞株が産生する細胞外分泌タンパク質をプロテオミクス手法を用いて解析し、臨床的に有用なマーカー候補タンパク質を見いだした。本タンパク質はCA125陰性の明細胞腺癌患者血清でも高い確立で陽性を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

Of all of the epithelial ovarian cancers, clear cell adenocarcinoma (CCA) has the worst prognosis. In addition, level of CA125, a conventional marker for ovarian cancer, is relatively low and frequently negative in patients with CCA. Therefore, development of new biomarker is needed to improve diagnosis of CCA. In this study, we analyzed secreted proteins in conditioned media from CCA-derived cell lines by a proteomic approach, and identified a potential biomarker candidate with clinical utilities. Serum level of the identified protein was significantly elevated in CCA patients.

## 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・卵巣癌・明細胞腺癌・腫瘍マーカー・分泌タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌は、主に漿液性、粘液性、類内膜および明細胞の4種類の組織型に分類される。中でも明細胞腺癌(CCA)は化学療法に対する抵抗性と転移浸潤能が高く、早期に発見されても多数の予後不良例が存在する悪性度の高い組織型である。さらにCCAでは、現在卵巣腫瘍マーカーとして広く認知されているCA125が低値の症例が多く、特異的な腫瘍マーカーは今のところ開発されていない。また卵巣癌組織型の中でCCAの占める割合は、欧米諸国では5~6%であるのに対し、日本では20%を越えていることから、我が国におけるCCAの発生頻度が非常に高いことが伺える。したがって本邦では、CCAを他の卵巣癌組織型とは一線を画する疾患としてとらえており、CCAに対する新規抗悪性腫瘍薬の開発ならびにCCAの診断マーカーの確立が喫緊の課題となっている。

## 2. 研究の目的

- (1) CCAの分泌タンパク質を網羅的に検出し、その中からCCAに特徴的な分泌タンパク質を探索する。
- (2) 患者組織中の遺伝子発現量などを考慮して、研究対象とするタンパク質を絞り込む。
- (3) 当該タンパク質の患者血中濃度を測定し、CCAの診断マーカーとしての臨床の有用性を検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 分泌タンパク質のプロテオーム解析  
CCA細胞株4種(OVTOKO、OVISE、OVMANA、OVSAYO)、粘液性腺癌細胞株2種(MCAS、RMUG-S)、漿液性腺癌細胞株2種(OVSAHO、OVKATE)をそれぞれ上皮増殖因子を含む無血清培地にて2日間培養し、各々の培地上清をフィルター濾過後、脱塩濃縮することにて得られるタンパク質を解析試料とした。得られたタンパク質をトリプシン消化後、C18逆相カラムナノLCシステムを連結したLTQオービトラップ質量分析装置(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いて解析した。得られたデータはProtein Discovererソフトウェア(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を用いて解析し、Swiss-Protデータベース上のアミノ酸配列に対して検索をかけることで、タンパク質を同定した。
- (2) バイオマーカー検出系の構築  
抗Protein-Xモノクローナル抗体を得るために、GPIアンカー型Protein-Xの発現プラ

ズミドを免疫したマウスから抗血清を採取し、Protein-Xに対する抗体を産生可能なハイブリドーマを樹立した。ハイブリドーマ培養上清を硫酸分画後、HiTrap Protein GHP(GEヘルスケア社製)を用いて、認識部位の異なる2種のモノクローナル抗体を精製した。一方の抗体は固定化担体に吸着させ、もう一方の抗体はアルカリフォスファターゼで標識し、両者を磁性透過性容器(1.2 mL)に入れたProtein-X測定試薬を作製した。本試薬を用いて、東ソー株式会社の全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA-1800により、検体中のProtein-X濃度を測定した。

### (3) 臨床検体

使用した検体は、健常人検体(甲状腺刺激ホルモン低値検体)79例、(内訳:SLR社購入検体30例、Trina社購入検体49例)、卵巣子宮内膜症検体30例(PROMEDDX社購入検体)および卵巣明細胞腺癌検体50例(内訳:SLR社購入検体30例、NOVA社購入検体20例)であり、いずれの検体もインフォームドコンセント承諾済と記載された欧米人血清検体である。

## 4. 研究成果

- (1) 分泌タンパク質のプロテオーム解析  
4種類のCCA由来細胞株を無血清培地にて2日間培養し、培養上清に含まれるタンパク質を脱塩濃縮後、LC-MS/MSにより解析した。それぞれのCCA細胞株群から1000前後のタンパク質を同定した(図1)。
- (2) マーカー候補タンパク質の選別  
同定されたタンパク質の中から、以下の基準により、CCAマーカー候補タンパク質を選別した。
  - ① プロテオーム解析により同定されたタンパク質のリストに基づいて、各細胞群で検出されるタンパク質の比較解析を行った(図1)。4種類のCCA細胞株のうち少なくとも3種類に共通して同定されるタンパク質は891種存在した。この中には、我々が以前より注目していたCCA特異的発現タンパク質アネキシンIVも含まれていたことから(文献1, 2)、これら891種の中にCCAを特徴づけるタンパク質群が含まれていることが示唆された。そこで、この891種を出発材料として、CCAマーカー候補タンパク質の絞り込みを行った。
  - ② 891種のタンパク質のリストの中で、他の卵巣癌細胞株の培養上清からは検出されないタンパク質を抽出するために、漿液



査読有

- Masuishi, Y., Arakawa, N., Kawasaki, H., Miyagi, E., Hirahara, F., Hirano, H. Wild-type p53 enhances Annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. (2011) FEBS Journal, 278, 1470-1483. 査読有
- Kato, Y., Kawasaki, H., Arakawa, N. and Hirano, H. Subcellular localization of the interaction of bipolar landmarks Bud8p and Bud9p with Rax2p in *Saccharomyces cerevisiae* diploid cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 399, 525-530, 2010. 査読有
- Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., Arakawa, N., Kimura, Y. and Hirano, H. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. Proteomics, 10, 2769-2779, 2010. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- 荒川憲昭, 卵巢明細胞腺がん創薬標的分子・診断マーカーの探索、日本電気泳動学会、横浜市開港記念会館、横浜、2011. 11 月
- Arakawa, N., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F., Hirano, H. Secretome analysis of cell lines derived from ovarian clear cell adenocarcinoma, a highly malignant type of ovarian cancer. Human Proteome Organization 10th Annual World Congress, シドニーコンベンション&エキシビジョンセンター, シドニー, 2010 年 9 月
- 荒川憲昭、森田絵理奈、宮城悦子、平原史樹、平野久. 卵巢明細胞腺癌のセクレトーム解析. 日本プロテオーム機構、東京ベイホテル東急、浦安、2010. 7
- 荒川憲昭, 森田絵理奈, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久. 卵巢明細胞腺癌細胞株のセクレトーム解析による新規卵巢癌マーカーの探索. BMB2010, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2010.12
- 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久. 卵巢明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の構成因子の同定日本生化学会大会. 神戸ポートアイランド, 神戸, 2009.10

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- 名称: 組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測

定による卵巢明細胞腺癌の検査方法および検査薬

発明者: 荒川憲昭, 平野久, 宮城悦子, 大竹宣久

権利者: 公立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2011-179450

出願年月日: 2011 年 8 月 19 日

国内外の別: 国内

- 名称: NDRG 1 タンパク質を標的とした卵巢明細胞腺癌の治療

発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 平野久

権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-178684

出願年月日: 2011 年 8 月 18 日

国内外の別: 国内

- 名称: 卵巢明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用

発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 山中結子, 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/53497

出願年月日: 2011 年 2 月 11 日

国内外の別: 国外

- 名称: 卵巢明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用

発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 山中結子, 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-35737

出願年月日: 2010 年 2 月 22 日

国内外の別: 国外

○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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 憲昭 (ARAKAWA NORIAKI)

横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学

研究科・助教

研究者番号: 60398394

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：