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

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 一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的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

ス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安分画後、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特異の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

性腺癌細胞株と粘液性腺癌細胞株の培養上清から同定されたタンパク質リストと比較した。図2に各細胞株由来のタンパク質リストの比較結果をベン図で示した。本解析により、148種のタンパク質がCCA群にのみ検出されることがわかった。また、本解析において代表的卵巣癌マーカーも同定されており、CA125やCYFRA21-1は、3種の細胞株群から検出された。したがって、上記148種には、既存のマーカーに取って代わる新しいCCA診断マーカー候補タンパク質が含まれている可能性が示唆された。

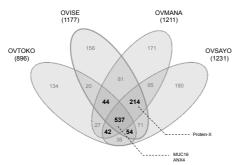


図 1. 各CCA由来細胞株から同定されたタンパク質の比較

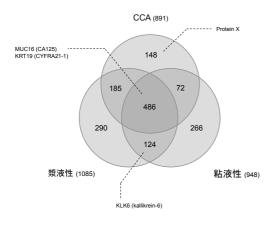


図2. CCA細胞株群に共通して同定されたタンパク質891 と他の卵巣癌細胞株から同定されたタンパク質の比較

③ 148種のタンパク質の中から、血中での検出が期待される"細胞外分泌タンパク質"、あるいは"膜タンパク質"として分類されるものをデータベース情報に基づいて抽出した。RCAI RefDICデータベース (http://refdic.rcai.riken.jp/)を用いて、Gene Ontology分類における"extra cellular"や"cellular membrane"のtermの注釈が付くタンパク質を51種類抽出した。

④ 様々な組織で広範囲に発現していない (組織特異性の高い) タンパク質は、 健常者の血中には微量にしか存在しないことが予測される。これは早期診断マーカーの有用性を考える上で重要な情報であると思われる。そこで、上記の51種のタンパク質の発現プロファイルをRCAI RefDICデータベース中のmRNA 発 現 情 報 、 お よ び Human Protein Atlas(http://www.

proteinatlas.org/)中の免疫組織学解析の情報を用いて、組織特異性の高いタンパク質を探索した。既存マーカーMUC16(CA125)は、これらのデータベースにおいては、ほとんどの正常組織や細胞で発現が認めらないことから、解の傾向を持つタンパク質がないか探索した。その結果、51種の候補タンパク質の中で、Protein-X(特許の関連からタンパク質正式名を伏せる)が極めて高い組織特異性を示すことがわかり、本タンパク質をCCAマーカー候補タンパク質とした。

(4) 臨床的有用性の評価

2種の抗 Protein-X 抗体を用いて、サンドイッチアッセイ法に基づく Protein-X 測定系を構築し、患者血清中における Protein-X 濃度を測定した。健常群(n=79)および子宮内膜症群 (n=30) と比べて CCA 群 (n=50) では有意に高い値を示した(図 3、左)。さらに、CA125 陰性の CCA 検体 13 例中 11 例にて陽性であった(図 3、右)。したがって、当該マーカー候補タンパク質を用いれば、CA125 では判別が難しい明細胞腺癌患者を高確率で陽性判別することが可能になると期待される。

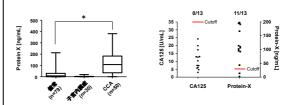


図3. ヒト血清中のProtein-X濃度の測定結果

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4件)

1. <u>荒川憲昭</u>、増石有佑、平野 久、卵巣明 細胞腺がん関連タンパク質の発現調節 (2011)生物物理化学、5 5 号:1、5-8、 杳読有

- 2. Masuishi, Y., <u>Arakawa, N.</u>, 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. 查読有
- 3. 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. 查読有
- 4. Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., <u>Arakawa, N.</u>, Kimura, Y. and <u>Hirano, H</u>. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. Proteomics, 10, 2769-2779, 2010. 查

〔学会発表〕(計5件)

- 1. <u>荒川憲昭</u>, 卵巣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
- 2. 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&エクシビジョンセンター,シドニー, 2010年9月
- 3. <u>荒川憲昭</u>、森田絵理奈、宮城悦子、平原史樹、平野久. 卵巣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
- 4. <u>荒川憲昭</u>, 森田絵理奈, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久. 卵巣明細胞腺癌細胞株のセクレトーム解析による新規卵巣癌マーカーの探索. BMB2010, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2010.12
- 5. <u>荒川憲昭</u>, 田矢史織, 川崎博史, 宮城 悦子, 平原史樹, 平野久. 卵巣明細胞 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)

1. 名称:組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測

定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および検査薬

発明者:<u>荒川憲昭</u>,平野久,宮城悦子, 大竹官久

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

2. 名称: NDRG 1 タンパク質を標的とした卵 巣明細胞腺癌の治療

発明者:<u>荒川憲昭</u>, 增石有佑, 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

3. 名称:卵巣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:<u>荒川憲昭</u>,增石有佑,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

4. 名称:卵巣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: <u>荒川憲昭</u>, 增石有佑, 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: