

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590759

研究課題名(和文) 新たなスクリーニング法の開発を目指した胆嚢がん特異蛋白の検索

研究課題名(英文) SEARCHING OF SPECIFIC PROTEINS PRODUCED IN GALLBLADDER CANCER TISSUES FOR THE EARLY DETECTION OF THE CANCER

研究代表者

土屋 康雄 (TSUCHIYA, Yasuo)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：60334679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、胆嚢がん患者の癌組織中の蛋白質を網羅的に検索し、早期発見用の新規マーカーの開発を目指すことである。胆嚢がん患者のホルマリン固定パラフィン包埋切片から、コントロール群(群)3、異形成群(群)6、進行癌群(群)6の計15試料を作成した。LC/MS/MS法により各群の発現蛋白質を網羅的に検索した。

平均蛋白質数は、群993、群1,291、群1,109であり、306、1,148、930が群特異蛋白質であった。胆嚢がんマーカーとすべき候補蛋白質を絞り込み、免疫染色により胆嚢組織での発現を確認した。胆嚢がんマーカーの候補とした蛋白質を用いて、新たな患者での検証が必要である。

研究成果の概要(英文)： Our operating procedure to detect and identify the specific proteins as the biomarker for the early detection of gallbladder cancer was as follows: preparation of paraffin sections from formalin-fixed paraffin-embedded gallbladder cancer tissue blocks, deparaffinization, stain sections on a microscope by Periodic acid-Schiff stain, excision of tissue section by laser microdissection, on-site direct digestion, purification of the samples using the C18 Stage Tip, concentration measurement of the peptide solutions by micro bicinchoninic acid protein assay, LC/MS/MS analysis.

A total of 15 samples were collected: 3 from normal cell (group I), 6 from cancer cell (group II), and 6 from advanced cancer cell (group III). The average numbers of detected proteins from each group were 993, 1,291, and 1,109. In these proteins, the group specific proteins were 306, 1,148, and 930. The new bio markers for the early detection of gallbladder cancer may be found to examine these proteins closely.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：胆嚢がん スクリーニング 特異蛋白 質量分析

1. 研究開始当初の背景

胆嚢がんは南米、東ヨーロッパ、北インドなどで好発している。胆嚢がんは特徴的な自覚症状や初期症状がほとんど認められないことから早期に発見されることは少なく、その5年生存率は著しく低い。しかし、胆嚢がんは早期に発見されれば予後の良い疾患であることから、本症好発地域における死亡率低下のためにはスクリーニングによる早期発見、早期治療が求められる。しかし、現在までに胆嚢がんマーカーは報告されていない。胆嚢がんを早期発見、早期診断するためのマーカーの同定が急務である。

診断マーカーの同定には、胆嚢がん組織のみに特異的に発現する蛋白質、または、正常組織と比較して顕著な発現差のある蛋白質を検索、同定することが必要である。しかし、これまでに胆嚢がん患者の胆嚢組織中に特異的に存在する蛋白質を網羅的に検索した報告例は認められない。

2. 研究の目的

診断マーカーの同定には、胆嚢癌組織や正常組織中に発現する1,000種類を超える蛋白質を網羅的に解析、比較する必要がある。

これまででも、組織由来の蛋白質を二次元電気泳動で分離してインゲル消化し、得られたペプチド断片を質量分析にかけ、質量分析結果をデータベースと照合して、含まれる蛋白質を同定することは可能であった。しかし、この手法では、一度に解析できる蛋白質の数はせいぜい数10種類であった。

近年、組織・細胞や培養上清等から抽出した粗製蛋白質画分を液体クロマトグラフィ質量分析法(LC/MS/MS法)により網羅的に同定するショットガン分析が開発され、数100個~1,000個程度の蛋白質を一度に同定することが可能になった。

しかし、従来のショットガン分析には、有機溶媒や加温による蛋白変性がないとされる凍結標本が多く用いられてきた。これに対して、ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) 標本は最も普遍的な組織固定法であり、膨大な標本試料が臨床データとともに保存されているため、過去に遡っての解析が容易である。共同研究先の新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野では、FFPE 標本切片からペプチド混合物を調整する On-Site Directed Digestion (OSDD) 法を開発し、凍結標本切片と同等の蛋白質を同定することに成功している。

本研究では、胆嚢がん患者の病理 FFPE 切片から OSDD 法を用いてペプチド試料を作製し、ショットガン分析により正常組織と癌組織に発現する蛋白質を網羅的に解析した。

3. 研究の方法

蛋白質の解析は以下の手順で行った。

(1) FFPE 包埋ブロックからの切片作製

- (2) 脱パラフィン
- (3) PAS 染色
- (4) Laser microdissection (LMD)による組織切片の切り出し
- (5) OSDD 法による処理と切片の HE 染色
- (6) OSDD 後のペプチド溶液の精製 (C18 Stage Tip, Thermo Scientific 社)
- (7) Micro bicinchoninic acid (micro BCA) 法によるペプチド溶液の濃度測定
- (8) 試料の LC/MS/MS 解析
- (9) 蛋白質同定システム MASCOT Server Ver. 2.3.02 を用いた測定試料に含まれる蛋白質・ペプチドの同定
- (10) バイオインフォマティクス解析
- (11) Gene normalized spectral index (GeneSIN) を用いた同定蛋白質の評価
- (12) SIN System を用いた群間比較
- (13) 抗体リストの作成
- (14) 候補蛋白質の絞り込みと確認

4. 研究成果

(1) 病理切片の組織学的所見による分類

チリ胆嚢がん患者の各 FFPE ブロックから PAS 染色スライドをそれぞれ作製し、その組織学的形態から I 群; コントロール (一部炎症)、II 群; 異形成、III 群; 進行癌、の3群に分類した。I~III 群の特徴的な組織画像とその組織学的特徴、分類された Sample ID を図1に示す。

群	組織画像	組織学的特徴	Block ID
I 【正常】		胆嚢粘膜は温存されている （一部炎症を伴っている）	343327 343422
II 【異形成】		異形細胞が認められる 管腔形成が認められる	343962-5 343970 343936
III 【進行癌】		癌塊の分化度が低い 粘膜下層浸潤が認められる	343503 343327

図1 FFPE 切片の PAS 染色画像と特徴

(2) LMD による組織切片の選択的切り出し
選択した Sample ID の各 FFPE ブロックから、LMD 専用の mmi Membrane slides (Molecular Machines & Industries, MMI 社) 上に切片を作製し、脱パラフィン処理を行った。組織学的知見をもとに、LMD を用いて、組織切片から目的部位のみを切り出し、切り出したサンプルを専用の mmi Isolation Caps transparent 0.5 ml (MMI 社) に回収した。

(3) OSDD 法によるサンプルのペプチド化
回収した各サンプルをチューブごとにトリプシンで消化し、ペプチド化した。ペプチド化したサンプルは、それぞれ C18 Stage Tip を用いて精製と脱塩を行った後、別チューブに回収して乾燥させた。トリプシン処理後の

各チューブを HE 染色し、トリプシンによる消化具合を確認した (図 2)。

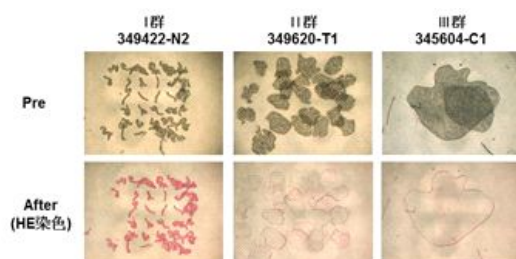


図 2 トリプシン処理前後の染色画像

(4) LC/MS/MS 解析とタンパク質の同定

調整したサンプルを再度 0.2% trifluoro acetic acid (TFA) 溶液に溶解し、低濃度サンプルを測定できるように改変した BCA 法を用いて、ペプチド濃度を測定した。この測定結果をもとに、各サンプルを 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整し、I 群 3 試料、II 群 6 試料、III 群 6 試料を用意した。それぞれ 2 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ ずつを送付して、LC/MS/MS 解析を行った。LC/MS/MS 解析で得られたペプチドの質量分析結果 (raw data) を MASCOT 解析にかけ、International Protein Index (IPI) human データベースと照合して、各サンプル中の蛋白質を同定した。

各サンプルについて、3 回ともに検出された蛋白質を 3 overlap、2 回検出された蛋白質を 2 overlap、1 回のみ検出された蛋白質を unique とした。

この結果、I 群からは平均 993 個、II 群からは平均 1,291 個、III 群からは平均 1,109 個の蛋白質が同定された。

(5) 同定タンパク質のブロック内比較

各ブロック内で同定された蛋白質の比較を行った。各試料 3 回の MS データを MASCOT 上でマージして蛋白質を同定し、各ブロックで同定された蛋白質を比較した。

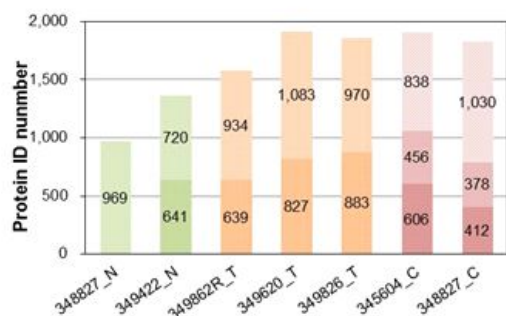


図 3 同定蛋白質のブロック内比較

I 群では、同定された蛋白質のうち、47% がサンプル間で一致した。II 群では、同定された蛋白質のうち、41%、43%、48% がサン

プル間でそれぞれ一致した。また、III 群では、同定された蛋白質のうち 32%、23% が 3 サンプル間でそれぞれ一致し、22%、21% が 2 サンプル間で一致した。

以上の結果から、同一ブロックからサンプルを調整した場合でも、採取部分が異なれば、同定される蛋白質は約半数が異なることが明らかとなった。

(6) 同定蛋白質の群内比較

I ~ III 群それぞれのブロックから同定された全蛋白質の群内 (ブロック間) 比較を行った。各ブロックの同定蛋白質の半数以上は、群内で共通であった。一方で、それ以外の同定蛋白質は各ブロックに特異的であった。

(7) 同定蛋白質の群間比較

I 群、II 群、III 群それぞれに 306 個、1,148 個、930 個の特異的な蛋白質が認められた。この内、I 群と II 群間で共通な蛋白質が 266 個、II 群と III 群間で共通な蛋白質が 696 個認められた。一方で I 群と III 群間では 91 個のみが共通の蛋白質として認められた (図 4)。

正常細胞が I 群から II 群を経て III 群へと癌化していくと考えると、I 群と II 群、II 群と III 群間に共通する蛋白質数に対して、I 群と III 群で共通する蛋白質数が少ないことは妥当な結果と考えられた。

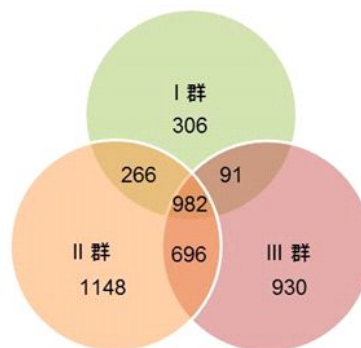


図 4 同定蛋白質の群間比較

(8) 遺伝子シンボルの群間比較

MASCOT 解析結果をそれぞれ GeneSIN にかけて、同定されたタンパク質 ID を遺伝子シンボルに変換し、ペプチドスコアをもとに SIN 値を算出した。さらに、この結果を Group 1 (I 群)、Group 2 (II 群)、Group 3 (III 群) に分けて SIN System で解析し、各群に含まれていた遺伝子シンボルとその SIN 値の平均値および SD 値を全遺伝子シンボルリストに対応させた。

これらの結果をもとに、各群で同定された遺伝子シンボルを群間で比較した。この結果を図 5 に示す。

すべての Group に共通な遺伝子シンボルは 731 個であった。このうち、Group 1 と Group 2 に共通な遺伝子シンボルが 137 個、Group 2 と Group 3 に共通な遺伝子シンボルが 391 個、

Group 1 と Group 3 に共通な遺伝子シンボルが 27 個認められた。さらに、Group 1、Group 2、Group 3 に特異的な遺伝子シンボルはそれぞれ 130 個、506 個、435 個であった。

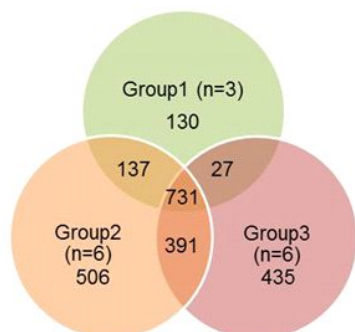


図 5 同定遺伝子シンボルの群間比較

GeneSIN で与えられた SIN 値に基づいて、Group 1 ~ 3 で共通している遺伝子 733 個のうち、コントロール群である Group 1 に対して、癌群である Group 2 および Group 3 で高値を示す遺伝子を選出した。選出条件は、コントロール群に対して癌群で 5 倍 または 10 倍の SIN 値を示したものの、またはコントロール群に対して癌群である Group 2 で 5 倍かつ Group 3 で 10 倍または 15 倍の SIN 値を示したものとした。これらの選出条件を条件 1 とし、選出された遺伝子数を表 1 に示す。

表 1 コントロール群に対して高値を示した癌群の遺伝子数

Condition	Example
Group2/Group1 \geq 5 & Group3/Group2 \geq 3 (Group3/Group1 \geq 15)	3
Group2/Group1 \geq 5 & Group3/Group2 \geq 2 (Group3/Group1 \geq 10)	7
Group2/Group1 \geq 10 & Group3/Group1 \geq 10	10
Group2/Group1 \geq 5 & Group3/Group1 \geq 5	40

また、Group 2 と Group 3 のみで共通な遺伝子シンボル 391 個 (条件 2) と、Group 2 または Group 3 のみに特異的な遺伝子シンボル 506 個と 435 個 (条件 3、条件 4) についても、抗体リストの作成を行った。

(9) 抗体リストの作成

各条件を満たす遺伝子シンボルについて、各サンプルでの出現回数と SIN 値の平均値、蛋白質名、抗体名、胆嚢での発現割合、正常/癌組織での発現等についてリスト化した。

条件 1 (図 5) で絞り込んだ遺伝子シンボルの多くは、コントロール群での出現回数は 1/3 と低かったが、癌群では半数以上で出現し、また SIN 値も高かった。一方で、条件 1 で絞り込んだ Group 1 の SIN 値と The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) での抗体 (一部 mRNA) を用いた正常な胆嚢組織での発現割合を比較すると、結果は必ずしも一致しなかった (例; CTNNB1 は、出現回数

1/3、SIN 値 0.020、SIN 値の平均値 0.007 であるが、The Human Protein Atlas での胆嚢組織での発現割合は 75% であった。) これは、LC/MS/MS での解析結果と抗体の染色結果が必ずしも一致しないことを示しており、解析方法に対する感度の差が原因と考えられる。しかしながら、いくつかの遺伝子シンボルは、LC/MS/MS での解析結果と抗体での染色結果がほぼ一致していた。また、条件 1 で選抜した遺伝子シンボルの半数以上は、The Human Protein Atlas において癌細胞を 80%以上の効率で染色することが示された。そこで今回は、これらの結果をもとに、各サンプルでの出現回数と SIN 値が高く、胆嚢での発現割合や癌細胞での発現が低いものを候補として絞り込んだ。

次に、上記と同様に、コントロール群の Group 1 には出現せず、癌群の Group 2 と Group 3 のみに出現した条件 2 の遺伝子シンボル 391 個について、抗体リストを作成した。この際、Group 2 と Group 3 での出現回数の合計が 8 回以上かつ各 Group での出現回数がそれぞれ 3 回以上のも 47 個を選抜した。条件 2 においても、コントロール群で検出されなかったにも関わらず、The Human Protein Atlas でのデータベースでは発現が確認されているものが多数あり、LC/MA/MS での解析結果と抗体の染色結果は必ずしも一致しなかった。そこで、条件 1 と同様、各サンプルでの出現回数と SIN 値が高く、胆嚢での発現割合や癌細胞での発現が低いものを候補として絞り込んだ。

さらに、Group 2 のみに出現した条件 3 の遺伝子シンボル 506 個、Group 3 のみに出現した条件 4 の遺伝子シンボル 435 個について、それぞれ抗体リストを作成した。いずれも出現回数が 4 回以上かつ SIN 値が 0.01 以上のものを選抜し、条件 3 については 30 個、条件 4 については 14 個の遺伝子シンボルをリスト化した。条件 3 については、コントロール群で検出されなかったにも関わらず、The Human Protein Atlas でのデータベースでは発現が確認されているものが多数あり、LC/MS/MS での解析結果と抗体の染色結果は必ずしも一致しなかった。特にこの条件では、The Human Protein Atlas のデータベースにおいて発現割合が高いものが多数あった。一方で、条件 4 については、The Human Protein Atlas のデータベースにおいて発現割合が 75%以上のもの 2 つのみであった。条件 3 および条件 4 についても、それぞれ比較的初期の癌および進行癌で特異的なマーカーとなる可能性があるため、各サンプルでの出現回数と SIN 値が高く、胆嚢での発現割合や癌細胞での発現が低いものを候補として 8 種類の蛋白質を絞り込んだ。

(10) 免疫染色による確認

選定した 8 種類の蛋白質に対する抗体を用いて、胆嚢組織中の各蛋白質の発現状況を調

べた。このうちの2種類はこれまで胆嚢での発現が認められておらず、かつ、がんの進行とともに発現が強くなった。

これらは胆嚢がんのスクリーニングマーカーとして使用できる可能性があり、新たな胆嚢がん患者で確認する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Asai T, Tsuchiya Y, et al. Proteomic Analysis of Paraffin-Embedded Gallbladder Cancer Tissues, XL Chilean Congress on Gastroenterology, 2013 年 11 月 27 - 29 日, Pucon, Chile.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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

土屋 康雄 (TSUCHIYA, Yasuo)

新潟医療福祉大学・臨床技術学科・教授

研究者番号: 60334679

(2)研究分担者

山本 正治 (YAMAMOTO, Masaharu)

新潟医療福祉大学・健康栄養学科・教授

研究者番号: 40018693

山本 格 (YAMAMOTO, Tadashi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 30092737

若井 俊文 (WAKAI, Toshihumi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 50372470

(3)連携研究者 ()

研究者番号: