

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592411
研究課題名(和文) プロテオミクス解析およびパスウェイ解析による新規前立腺癌バイオマーカーの検討

研究課題名(英文) Exploration of novel biomarkers for prostate cancer by proteomic and pathway analysis

研究代表者
木村 高弘 (Kimura, Takahiro)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00307430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではこれまでのプロテオミクス解析で得たタンパク質発現データをもとに、パスウェイ解析を行い、癌の悪性度、進行度と関連の強いシグナル経路を検討した。さらにその結果をもとに、重要なシグナル経路の中から新規バイオマーカー候補を検討し、多症例による検証を行い、前立腺癌の新しい予後予測マーカーを探索した。前立腺癌においてホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いたプロテオミクス解析法の有用性が示された。パスウェイ解析法はハイスループットな解析結果より効率よく新規バイオマーカー候補蛋白の選別に有用であった。MCCC2は前立腺癌新規バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, shotgun nano LC-MS/MS proteomics using laser-microdissection (LMD) of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues was conducted to identify grade- and stage-related biomarkers of prostate cancer (PCa). Nano LC-MS/MS proteomics was conducted using FFPE tissue of PCa. The tissue samples included specimens with low Gleason score (GS), specimens with high GS, and biopsy specimens from metastatic PCa. Targeted cells were microdissected for proteomic analysis. Candidate proteins were selected by pathway analysis and evaluated by immunohistochemistry. Immunohistochemical evaluation was attempted to validate candidate markers. The expression of MCCC2 was significantly higher in cancerous tissue than in benign prostatic tissue. Nano LC-MS/MS proteomics using LMD of FFPE specimens was useful for exploring biomarkers in solid tumors, including PCa. We found potential biomarker candidates with expression profiles related to grade and stage of PCa.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の治療法の選択には D'Amico のリスク分類などが用いられている。このリスク分類を決定する因子である PSA、生検グリソンスコア (GS)、臨床病期は有用な臨床情報として広く用いられている一方で、それらの不確定性も指摘されている。これらの因子を用いたリスク分類をもとに局所治療法が選択されるが、治療後再発を来す症例が存在する。しかし、このような症例を現行の予後関連因子を用いて正確に予測することは困難であり、新しいバイオマーカーの探索が求められている。新規バイオマーカーの探索研究におけるプロテオミクス解析の有用性は多くの癌で示されてきた。しかし、微少な腫瘍が前立腺内に多発する前立腺癌は、手術検体から肉眼的に純度の高い新鮮な癌組織を分離することが困難である。また、前立腺癌の分子生物学的性格を保持したままの初代培養系の樹立も困難であるため、プロテオミクス解析には不向きとされてきた。これまでに近年確立したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織のレーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いたプロテオミクス解析法を行い、371 種類の前立腺癌で高発現しているタンパク質を同定した。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでのプロテオミクス解析で得たタンパク質発現データをもとに、各タンパク質の変化をシグナル経路単位の動きとしてとらえるパスウェイ解析を行い、癌の悪性度、進行度と関連の強いシグナル経路を検討する。さらにその結果をもとに、重要なシグナル経路の中から新規バイオマーカー候補を検討し、多症例による臨床、病理学的パラメーターとの比較を行うことで、前立腺癌の新しい予後予測マーカーを発見することを目的とする。

3. 研究の方法

プロテオミクス解析で同定した 371 種類のタンパク質のパスウェイ解析

これまでの研究で正常、低 GS、高 GS、転移前立腺癌 FFPE 組織を対象としたプロテオミクス解析により計 371 種類のタンパク質を同定している。各群におけるタンパク質発現データをパスウェイ解析ソフトウェア、インジェヌイティ パスウェイ アナリシス (IPA: インジェヌイティ社) を用いて、パスウェイ解析を行った。IPA は同定された各タンパク質の発現量とアノテーションデータを関連づけ、タンパク質をシグナルパスウェイ毎にグループ分けし、パスウェイ単位での活性化の程度を解析するシステムである。この方法により、発癌に伴い活性化 (または不活化) するパスウェイ (正常に対し低 GS、高 GS および転移群で増減)、低分化癌 (高 GS) で活性化 (または不活化) するもの (高 GS および

転移群で増減)、転移性癌で活性化 (または不活化) するもの (転移群でのみ増減) など、特に前立腺癌の発癌、進展に重要な役割を果たすパスウェイが同定可能である。

パスウェイ解析の結果から新規前立腺癌バイオマーカー候補の選別と免疫組織染色による検証

i) 新規前立腺癌バイオマーカー候補の選別

パスウェイ解析で得られた、前立腺癌の発癌、進展に関与すると考えられるシグナルパスウェイ内のタンパク質を検討し、新規前立腺癌バイオマーカー候補を選択した。選別方法としては、実験で前立腺癌の発癌、進展に関与すると考えられたシグナルパスウェイ内で同定されたタンパク質の中で、特に発現量が高いタンパク質を選択した。この方法により、同一パスウェイ上にあるタンパク質を重複して検討する事を避ける事が出来るため、従来の方法に比べ効率の高い選別が可能である。タンパク質発現量の比較には、プロテオミクス解析で得られたデータ (NSAF および RSC 値) を参考にした。

ii) 免疫組織染色による検討

実験 i) で選択された新規バイオマーカー候補タンパク質の発現を、プロテオミクス解析に用いた前立腺癌検体の免疫組織染色によって検証した。対象症例はプロテオミクス解析で対象とした、低 GS 症例 5 例、高 GS 症例 5 例 (いずれも前立腺全摘検体)、初診時より転移を認め無治療で前立腺針生検を受けた症例 5 例 (生検検体) および低 GS 症例の正常組織とした。

新規前立腺癌バイオマーカー候補の臨床検体による検討

実験 ii) にて前立腺癌組織でのタンパク質発現の変化が確認された methylcrotonoyl-CoA carboxylase b (MCCC2) および fatty acid synthase (FASN) について、臨床検体での検討を行った。慈恵医大病院泌尿器科で 2004 年~2006 年に前立腺癌に対し前立腺全摘術を行った 76 症例を対象とした。前立腺全摘標本における各タンパク質の発現を免疫組織染色にて評価を行い、臨床病理学的パラメーター (年齢、body mass index、PSA、GS、病理ステージ、手術断端陽性、予後) との比較を行った。検体の免疫組織染色の評価は、一人の泌尿器病理医が行った。スコア 1 は細胞質の弱陽性、スコア 2 は細胞質強陽性、スコア 0 は陰性とし、数値化して評価した。

4. 研究成果

パスウェイ解析

これまでにプロテオミクス解析で同定し

た 371 種類のタンパク質のパスウェイ解析を行った。結果、発癌に伴い活性化するパスウェイを 10 経路、低分化癌で活性化するもの 23 経路、転移性癌で活性化するもの 9 経路、さらに低 GS 癌で活性化し、高 GS および転移癌で非活性化するもの 16 経路を同定した。これらの経路は特に前立腺癌の発癌、進展に重要な役割を果たすパスウェイと考えられた。

新規前立腺癌バイオマーカー候補の選別

実験の結果より得られた各パスウェイの中から特に変化の大きかった蛋白を新規前立腺癌バイオマーカー候補として選別した(表 1)

表 1 新規前立腺癌バイオマーカー候補

	Up-regulated	Down-regulated
Control	PRDX6, ANXA1, ANXA5, AL9A1	THIL, MMSA, MCCC2
Low GS	DOP2, GDIB, GNMT, AMPN(CD13), GABT, NEP(CD10), FAS	LMNA, TRFL, ANXA2, HNRPU
High GS	AIFM1, AGR2, GLU2B, DEF1, NDKA(nm23), TRFE, BASP1, GRP75, MDHM, PHB2, MYH9, MYL6, TPM3, RS3, PLEC1, SFPQ, QCR1, ALDOA, PDIA4, ATPG, TAGL2	EZRI
M1	CH60, FLNA, CO4A, TAGL, CO6A3, MYH11, NPM, DESM, CO6A2	(none)

これらの蛋白の発現を、プロテオミクス解析に用いた前立腺検体を対象に免疫組織染色によって検証した。免疫組織染色には主に市販抗体を用いた。結果、methylcrotonoyl-CoA carboxylase b (MCCC2) が癌組織で発現が亢進し、fatty acid synthase (FAS) は特に低 GS 癌で発現が亢進していることが確認された。

新規前立腺癌バイオマーカー候補の臨床検体による検討

実験にて前立腺癌組織でのタンパク発現の変化が確認された MCCC2 および FAS について、当院にて局所前立腺癌の診断で手術が施行された前立腺摘出検体 76 例を対象に、免疫組織染色にて検証を行った。対象となった 76 例の患者背景を表 2 に示す。

表 2 患者背景

No. of patients	76
Mean age (years, range)	62.6 (47-74)
Mean BMI (range)	23.7 (18.4-29.3)
Mean PSA (ng/mL, range)	9.7 (3.4-27.5)
Gleason score (%)	
4-6	16 (21.1)
7	46 (60.5)
8-10	14 (18.4)
Pathological stage (%)	
pT2a	6 (7.9)
pT2b	51 (67.1)
pT3a	14 (18.4)
pT3b	5 (6.6)
No. pos. EPE (%)	19 (25.0)
No. pos. surgical margins (%)	34 (44.7)
Mean prostate volume (cm ³ , range)	48.5 (20-122)
Mean MTD (mm, range)	21.5 (3-55)

図 1 および 2 に MCCC2 および FAS の典型的な染色例を示す。

図 1 MCCC2 免疫組織染色

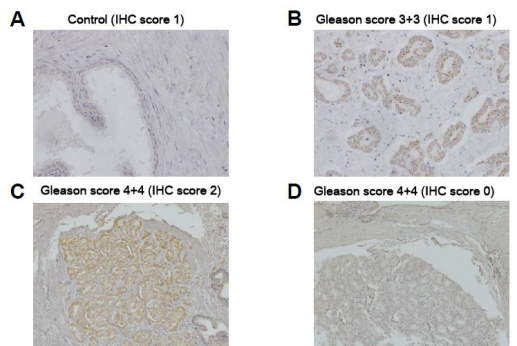
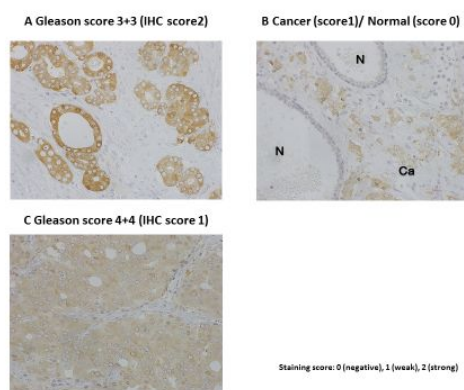


図 2 FAS 免疫染色



MCCC2 および FAS の発現と臨床病理学的パラメーター(年齢, body mass index, PSA, GS, 病理ステージ, 手術断端陽性, 予後)との比較を行った。FAS に関しては、臨床検体においては癌部および非癌部で有意な発現の差を認めなかった。MCCC2 の結果を表 3 に示す。

表 3 MCCC2 免疫染色結果

IHC score	1 or 2	0	P
No. of patients	62	14	
Mean age (years, range)	62.3 (47-74)	64.4 (58-72)	0.230
Mean PSA (ng/mL, range)	9.3 (3.4-27.5)	11.6 (5.5-21.8)	0.125
Gleason score (%)			0.275
5-6	15 (24.2)	1 (7.1)	
7	37 (59.7)	9 (64.3)	
8-10	10 (16.1)	4 (28.6)	
Pathological stage (%)			0.035
2	50 (80.6)	7 (50.0)	
3	12 (19.4)	7 (50.0)	
No. pos. surgical margins (%)			0.231
0	36 (58.1)	5 (35.7)	
1	26 (41.9)	8 (57.1)	
X	0 (0.0)	1 (7.1)	
Biochemical failure (%)			1.000
No	39 (62.9)	9 (64.3)	
Yes	23 (37.1)	5 (35.7)	
Mean MTD (mm, range)	20.9 (3-60)	24.0 (6-35)	0.285

PSA: prostate-specific antigen; pos: positive; MTD, maximum tumor diameter

前立腺癌 76 例中、MCCC2 は 62 例 (81.6%) で発現が確認された。14 症例では正常前立腺組織では MCCC2 の軽度発現が確認されたにもかかわらず、癌組織では全く発現を認めな

った。MCCC2を発現していた62例においては、その発現は有意に癌組織で亢進していた($P < 0.0001$)。一方で、MCCC2を発現していない14症例はMCCC2を発現している症例に対し有意に臨床病期が高かった($P = 0.035$)。MCCC2の発現は他の臨床病理学的パラメーターと有意な差を認めなかった。

これらの結果より、前立腺癌においてFFPE組織のLMDを用いたプロテオミクス解析法の有用性が示された。パスウェイ解析法はハイスループットな解析結果より効率よく新規バイオマーカー候補蛋白の選別に有用であった。MMMC2は前立腺癌新規バイオマーカーとしての有用性が示唆された。また、その発癌および癌進展に関する役割は、複雑であり、今後のさらなる研究が求められる。

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3件)

“Exploration of stage and grade-related biomarkers of prostate cancer by novel proteomic approach using laser-microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded tissues”, Takahiro Kimura, Toshihiro Yamamoto, Makoto Kihara, Yuko Kamata, Naoki Tanaka, Makiko Otsuji, Yasuhiko Bando, Bungo Furusato, Toshihide Nishimura, Shin Egawa. 32nd Congress of the Société Internationale d'Urologie. 2012年9月30日~10月4日, 福岡

“Proteomic analysis of laser-microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded tissues of low and high Gleason score and metastatic prostate cancer”, Takahiro Kimura, Toshihiro Yamamoto, Makoto Kihara, Yuko Kamata, Naoki Tanaka, Makiko Otsuji, Yasuhiko Bando, Sayaka Mikami, Bungo Furusato, Hiroyuki Takahashi, Toshihide Nishimura, Shin Egawa, AUA Annual Meeting. 19-23 May 2012. Atlanta.

“ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた前立腺癌組織学的悪性度および病期関連腫瘍マーカーの探索” 木村高弘, 山本順啓, 木原 誠, 鎌田裕子, 田中直樹, 尾辻真紀子, 板東泰彦, 三上紗弥香, 川上裕貴, 古里文吾, 鷹橋浩幸, 西村俊秀, 穎川 晋。第8回日本臨床プロテオーム研究会。2012年5月12日, 東京

〔図書〕(計1件)

木村高弘 他、金原出版、臨床プロテオミクス バイオマーカー探索から個別化医療へ 第9章 研究例 4 前立腺癌、2012、335

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 高弘 (Kimura Takahiro)

東京慈恵会医科大学・泌尿器科・講師

研究者番号：00307430