

機関番号：83802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701014

研究課題名(和文)腫瘍マーカーCEAにおける臓器特異性の検証

研究課題名(英文)Tissue specificity of Carcinoembryonic antigen

研究代表者

中尾 香菜子(Nakao, Kanako)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：30583059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な腫瘍マーカーの1つ、癌胎児性抗原CEAに着目し、その臓器特異性の検証を行った。数種類の臓器由来の培養癌細胞を用いて、CEAの発現様式、糖鎖修飾部位について検証した。その結果、CEAは由来臓器や細胞株ごとに異なった糖鎖修飾を有することが示唆された。さらに、LC-MS/MS解析により、CEAのN結合型糖鎖修飾予測部位のうち、新たに7箇所の同定に成功した。また、消化器癌由来細胞株において新規のCEAスプライスバリエーションおよびバリエーション由来CEAアイソフォームたんぱく質が存在すること、そしてCEA関連分子の1つCEACAM4が甲状腺髄様がん由来細胞株特異的に発現することを発見した。

研究成果の概要(英文)：Carcinoembryonic antigen (CEA) is an oncofetal cell surface glycoprotein. Because of its high expression in tumors and secretion to serum, CEA has been widely used as a serum tumor marker. To investigate the tissue specificity of CEA, we examined the expression patterns of CEACAM family members and the N-glycosylation patterns on CEA molecules derived from several cancer cell lines using a proteomic strategy. We identified novel N-glycosylation sites on CEA and further precise investigation revealed that the N-glycosylation patterns were varying among various cancer cell lines. Furthermore, two novel CEA splice variants were identified in gastrointestinal cancer cell lines. Those transcripts were not expressed in normal tissues. CEA protein isoforms derived from the novel splice variants were also expressed in cancer cell lines, and those protein isoforms were secreted to culture medium. We also found that CEACAM4 expression was unique to a medullary thyroid carcinoma cell line.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：CEA 糖鎖修飾 腫瘍マーカー プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

医薬・薬学分野においてバイオマーカーの開発が急務となっている。癌などの病態を検出するマーカーや薬剤の薬効性をモニターするマーカーなど、求められているマーカーは多岐にわたる。特に我が国における死亡要因の第一位(3人に1人)にあげられるのが癌であり、その早期発見や治療の一助となっているのが腫瘍マーカーである。体液、特に血中の腫瘍マーカーを測定することで癌の診断を行っているが、その感度や特異性の問題から、腫瘍マーカーの値のみを癌の決定的な指標とするには早計である。前立腺癌のマーカーであるPSAや肝癌のマーカーであるAFP、PIVKA などのように、腫瘍マーカーの一部には臓器特異性の高いものも存在する。それらは癌の早期診断に有用であると考えられる。しかしながら腫瘍マーカーの大部分が、進行癌でないと高値を示さない、複数の癌の可能性を示すなどの問題点を抱えており、他の検査項目と組み合わせて診断を行うなど患者への負担を大きくする要因をはらんでいる。むしろ腫瘍マーカーは、治療中の経過観察や再発チェックの面で有用であるというのが現状である。また未だマーカーの発見されていない腫瘍もあるため、より感度や特異性の高い腫瘍マーカーの開発が切望されている。

代表的な腫瘍マーカーの1つとして、癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA) がある。1965年CEAがP.Goldらによって同定されて、約50年。当初、大腸癌特異的に発現するたんぱく質として同定されたCEAだったが、その後胃がん、膵臓がんなどの消化器系の癌全般や肺がん、乳がんなど広範囲な癌患者でその血中濃度の上昇が報告されている。様々な癌で検出されるため、臓器特異性が低く、また早期癌での検出が難しいため、CEAは、癌のスクリーニングや術後の経過観察、再発予防の指標として用いられているというのが現状である。臨床の現場で多用に用いられているCEAであるが、一方で、多数の糖を有する膜たんぱく質としての分子型や局在、機能といったその分子生物学的側面からの研究は、腫瘍マーカーとしての歴史の割に乏しいというのが現状である。

## 2. 研究の目的

CEAは広範囲の癌で産生、血中に分泌されているが、腫瘍マーカーとしての既存の検出方法では、その臓器特異性までは検出することができない。しかしながら、様々な種類の臓器・細胞から産生されているCEAがすべて同じ分子型をとっているとは考えにくい。CEAが多数の糖鎖を有すること(分子量の50-60%を糖が占める)、CEA属するCEA関連分子群(CEACAMファミリー)の因子はいずれも癌との関連性が高く、また配列・構造上の同性的の高さからその交差反応性が重要視

されていること、以上に着目し、細胞株あるいは由来臓器ごとでCEAの分子型に多様性がみられるかどうか検証を行い、CEAの臓器特異性を見出すことを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養癌細胞株の選択

CEAを産生すると言われている癌(消化器系がん、肺がん、乳癌、甲状腺髄様がん)由来細胞株をそれぞれ複数ずつ選択し、CEAとCEA関連分子群の遺伝子レベルでの発現解析を行った。発現解析は、それぞれの分子に特異的なプライマーを設計し、RT-PCR法により定性的に検証した。CEA関連分子群の発現を細胞株ごと、臓器ごとで比較を行うとともに、CEAを発現する細胞株を選択し、たんぱく質レベルでの発現と培養上清中への分泌も同時に検証を行った。たんぱく質レベルでの発現検証は、CEA特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法および質量分析器を用いた方法により行った。

### (2) LC-MS/MS解析によるペプチド配列および糖鎖修飾部位の同定

糖鎖修飾部位を含むペプチド断片は、糖鎖修飾の分ピークがシフトするため、MS/MS解析の結果をそのままデータベース検索にかけてもペプチド配列が同定されない。CEAは多数の糖鎖修飾を受けているため、トリプシンなどを用いてペプチド断片へと消化を行っても、その大部分が糖鎖を含むペプチド断片のため、そのままでは多くのペプチド配列を同定することが難しい。そこで、PNGase Fと呼ばれるNグリコシダーゼを用いて、N結合型糖鎖修飾の切断を行った後、トリプシン消化などのMS/MS解析サンプル調製を行う。N型糖鎖修飾を受けているアスパラギン(N)残基は、酵素処理で加水分解により糖鎖が解離すると、アスパラギン酸(D)残基に置換される。データベース上でMS/MS解析の結果を基にペプチド配列の検索をする際、アスパラギン残基がアスパラギン酸残基へと置換されている可能性があるというパラメータを設定することで、置換が起きている配列情報も解析することができる。さらには、アスパラギン酸残基に置換されて同定=N結合型糖鎖修飾を受けていた部位であるため、同時に糖鎖修飾部位の同定が可能となる。

## 4. 研究成果

### (1) CEAにおけるN結合型糖鎖修飾

CEAは、多数のN結合型糖鎖修飾を受けており、分子量の50-60%を糖がしめることが知られている。複数の細胞株を用いて、CEAの発現をウェスタンブロットで確認したところ、アミノ酸配列から予測される分子量よりもかなり高分子量側にシフトした位置

(180-200 kDa)にバンドが検出された。また検出される位置は、細胞株ごとで異なっていた。しかしながら N 結合型糖鎖修飾切断処理後のサンプルでウェスタンブロットを行ったところ、CEA は全ての細胞株でほぼ同じ位置(アミノ酸数から計算される理論分子量の位置)に検出された。以上のことから、CEA は由来臓器や細胞株ごとに異なった糖鎖修飾を有することが示唆された。さらに、LC-MS/MS 解析により、CEA における N 結合型糖鎖修飾予測部位 28 箇所のうち、これまで実験的に証明されていた 3 箇所に加え、新たに 7 箇所の同定に成功した。新たに同定された 7 箇所のうちの何カ所かにおいて、ある種の細胞株では糖鎖修飾が起こっていないことも同定された。

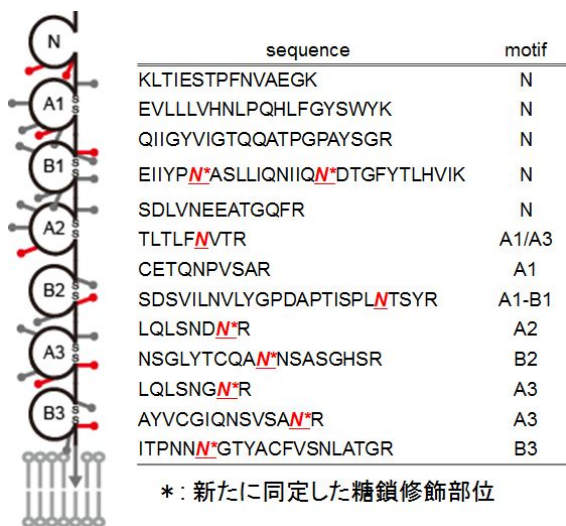


図 1: CEA の N 結合型糖鎖修飾部位の同定

(2) CEA の新規スプライスバリエント、バリエント由来アイソフォームたんぱく質の同定

消化器癌由来細胞株において 2 種類の新規 CEA スプライスバリエントおよびバリエント由来 CEA アイソフォームたんぱく質が存在することを発見した。2 種類の新規スプライスバリエントは、大腸がん、胃がん、膵臓がん由来細胞株で発現が認められた一方で、正常組織由来の RNA 中には発現がほとんど認められなかったことから、癌特異的なバリエントであることがわかった。

また、CEA の新規スプライスバリエントは、たんぱく質レベルでもその存在がみとめられ(CEA アイソフォームたんぱく質)、野生型と同様に細胞に発現するだけでなく、培養上清中へと分泌されていることが明らかとなった。

しかしながら、CEA アイソフォームはいずれの癌細胞株でも野生型 CEA と共発現・共分泌しており、アイソフォームの発現の有無に特異性は認められなかった。一方で、ある種の臓器癌では、CEA 野生型に対するアイソフ

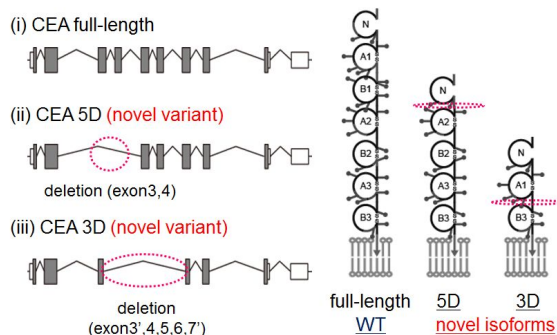


図 2: 新規 CEA スプライスバリエントおよび CEA アイソフォームたんぱく質

フォームの発現・分泌量が多いことが確認されており、CEA アイソフォームの発現・分泌量のバランスが癌種ごとに異なる可能性が考えられる。

2 種類の CEA アイソフォームは、細胞接着や他分子との相互作用に重要なドメインの一部が欠損しているため、癌細胞における機能が、野生型と異なることが示唆された。CEA を発現する多くの細胞株では、野生型とアイソフォームを共発現・共分泌しているものがほとんどであるため、今後は、それぞれを単独に発現する安定発現株を構築し、機能への影響を検証していく予定である。

(3) 甲状腺髄様がん由来細胞株における CEACAM4 の特異的な発現

CEA を産生する主要な癌(大腸がん、胃がん、膵臓がん、肺がん、乳がん、甲状腺がん)由来の培養細胞株における CEACAM ファミリー分子の遺伝子レベルでの発現のスクリーニングを行った。臓器ごとに様々な発現パターンをとったが、中でも、CEACAM4 が、甲状腺髄様がん由来細胞株 TT でのみ発現していることを見出した。この CEACAM4 は、血球由来成分から同定された CEA 関連分子の 1 つであるが、髄様がん以外の甲状腺がんやその他癌由来細胞株、正常組織由来の RNA では発現が認められなかった。さらに TT 細胞では、CEACAM4 の新規スプライスバリエント 2 種類も発現することが確認された。

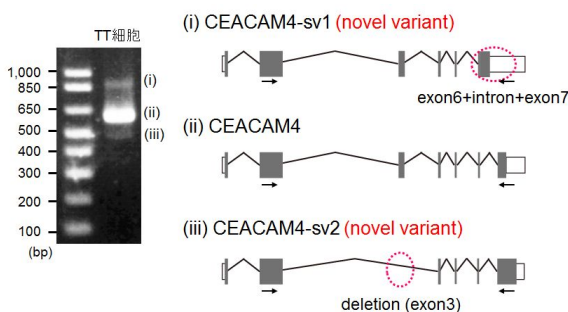


図 3: 甲状腺髄様がん由来細胞株における CEACAM4 の発現と新規スプライスバリエント

CEACAM4 は、生体内での発現や機能、また癌との関連性についてほとんど知られていない。甲状腺髄様がんは、甲状腺がんの中でも稀少がんであるが、唯一 CEA を分泌することが知られているがんであり、CEACAM4 の特異的発現が明らかとなれば、多数ある CEA 産生がんの中での区別化に有効であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sakura N., Ide T., Wakabayashi-Nakao K., Ohshima K., Hatakeyama K., Ogura S., Mochizuki T., editors. Synthesis of Proneurotensin/neuromedin N (proNT/NMN) N-Terminal-Related Peptides to Develop a ProNT/NMN-Specific ELISA System. *Peptide Science 2013*; 査読有, 2014; Osaka, Japan.

Ishikawa T., Wakabayashi-Nakao K., Nakagawa H. Methods to examine the impact of nonsynonymous SNPs on protein degradation and function of human ABC transporter. *Methods Mol Biol.* 査読有, 2013; 1015:225-50.

DOI: 10.1007/978-1-62703-435-7\_15.

Hatakeyama K., Wakabayashi-Nakao K., Ohshima K., Sakura N., Yamaguchi K., Mochizuki T. Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. *BMC Res Notes.* 査読有, 2013; 6(1):381.

DOI: 10.1186/1756-0500-6-381.

Wakabayashi-Nakao K., Maruyama K., Ishii H., Muramatsu K., Hatakeyama K., Ohshima K., Ogura S., Nakajima T., Yamaguchi K., Mochizuki T. Investigation of proNT/NMN secretion from small cell lung carcinoma cells using a mouse xenograft model. *Oncol Rep.* 査読有, 2012; 28(4):1181-6.

DOI: 10.3892/or.2012.1926.

Hatakeyama K., Wakabayashi-Nakao K., Aoki Y., Ogura S., Yamaguchi K., Nakajima T., Sato T. A., Mochizuki T., Hayashi I. Novel protein extraction approach using micro-sized chamber for evaluation of proteins eluted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Proteome Sci.* 査読有, 2012; 10:19.

DOI: 10.1186/1477-5956-10-19.

〔学会発表〕(計 3 件)

中尾香菜子、畠山慶一、大島啓一、山口建、望月徹。消化器癌由来細胞株における新規 CEACAM5 アイソフォームタンパク質の同定  
第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 05 日、パシフィコ横浜(神奈川)

Sakura N., Ide T., Wakabayashi-Nakao K., Hatakeyama K., Ohshima K., Ogura S., Mochizuki T. Synthesis of Proneurotensin/neuromedin N (proNT/NMN) N-Terminal-Related Peptides to Develop a ProNT/NMN-Specific ELISA System  
4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/50th Japanese Peptide Symposium, 2013 年 10 月 6-8 日、Hotel Hankyu Expo Park (Osaka)

中尾香菜子、畠山慶一、大島啓一、山口建、望月徹。CEACAM4 の甲状腺髄様癌における特異的発現

第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、ロイトン札幌(北海道)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 甲状腺髄様がん判定方法

発明者: 中尾香菜子、望月徹、畠山慶一、山口建

権利者: 静岡県

種類: 特許

番号: 特願 2012-113732

出願年月日: 平成 24 年 5 月 17 日

国内外の別: 国内

名称: CEACAM5 遺伝子のスプライシングバリエーション

発明者: 中尾香菜子、望月徹、畠山慶一

権利者: 静岡県

種類: 特許

番号: 特願 2013-35758

出願年月日: 平成 25 年 2 月 26 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 香菜子 (NAKAO, Kanako)

静岡県立静岡がんセンター研究所・遺伝子診療研究部・研究員

研究者番号: 30583059