

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701015

研究課題名(和文)抗体ファージライブラリを用いた胃癌特異的構造・翻訳後修飾をもつ新規癌抗原の探索

研究課題名(英文)Development of high-throughput screening system using autoantibody phage library for finding novel diagnostic biomarker of gastric cancer

研究代表者

村岡 賢(MURAOKA, SATOSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：50582681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：癌の早期発見、治療や病態のモニタリングの為に診断マーカーの開発を目的とする。以前に構築した胃癌患者リンパ球由来の抗体ファージライブラリの評価を行った。構築した抗体ファージを用いて、胃癌患者・健常者の血清サンプルにより、癌抗原に特異的に結合する抗体ファージの濃縮を行った。その結果、特異的に結合する抗体ファージの濃縮が認められたため、現在クローン化を行い癌抗原特異的抗体ファージの単離を行っている。

研究成果の概要(英文)：We report on high-throughput screening system using autoantibody phage library for finding novel diagnostic biomarker of gastric cancer. The antibody phage library was constructed from peripheral blood lymphocytes from gastric cancer patients using polymerase chain reaction. We panned the constructed library with scirrhous gastric cancer and disease-free control serum to make a sublibrary of antibodies that bind proteins differentially expressed, structurally changed, and post-translationally modified. To confirm this, we examined the binding ability of enriched antibody phage using ELISA. The results indicated that they were binding against gastric cancer serum. In the future, we will perform to isolate antibody phage clone specific to gastric cancer serum.

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：抗体ファージ

1. 研究開始当初の背景

多くの癌において早期診断、術後の予後予測が重要な問題となっている。早期発見、予後予測を行うことにより患者への治療、手術などでの負担が軽減される。そのことにより、血清・血漿を用いた早期診断の新たなバイオマーカーの発見が必要である。いくつかのタンパク質が血清・血漿のバイオマーカーとして報告されているが、臨床的有用性が認められたものはまだほとんどない。

2. 研究の目的

癌の早期発見、治療や病態のモニタリングのための診断バイオマーカーの開発、新規治療法及び個人に合わせた治療選択法のための抗体医薬・バイオマーカーの開発は急務である。本研究は、抗体ファージライブラリを用いて、胃癌の新規バイオマーカーの探索・癌抗原特異的抗体の単離を目的とする。多様性がある癌患者由来の抗体ファージライブラリを用いることで以前では困難であった構造変化、異常な翻訳後修飾をもつ癌抗原の探索が可能となる点、及び抗体アレイ技術を用いたスクリーニングにより、1度に多数の癌抗原、特異的抗体のペアを獲得できる点が特色で独創的である。本研究により、従来の方法では同定できない胃癌特異的抗原の発見が期待される。

3. 研究の方法

本研究では、胃癌患者の血液に存在する新規バイオマーカーの探索と特異的抗体を単離するために以下の方法で研究を進めた。

(1) 抗体ファージライブラリの評価

平成22～23年度の研究活動スタート支援の時に構築した抗体ファージライブラリの評価を行った。

シークエンス解析による評価

ランダムに選択した16クローンの抗体ファージを大腸菌に感染させ、プラスミドを精製後、特異的プライマーを用いてシークエンス解析を行った。

ファージ上への scFv(single chain Fv) の提示効率の評価

ELISA plate に anti-His 抗体を固定化、BSA でブロッキング後、調製したランダムに選択した44クローンの抗体ファージをそれぞれ反応させ、anti-M13 phage 抗体により検出を行った。

(2) 胃癌患者血清に存在する癌抗原に特異的に結合する抗体ファージの単離

胃癌患者、健常者の血清サンプルから high abundant protein の除去調製

Agilent Human 14 Multiple Affinity Removal System Columns により血清サンプル中から high abundant protein の除去を行った。

胃癌患者の血清の癌抗原に特異的に結

合する抗体ファージの濃縮

胃癌患者と健常者の high abundant protein を除去精製した血清サンプルをイムノチューブに固定化を行い、1で構築した抗体ファージライブラリを胃癌患者の血清サンプルと反応させて回収後、健常者の血清サンプルと反応させて反応しなかったものを回収する。この操作を3回繰り返した後、回収した抗体ファージを再度胃癌患者の血清サンプルと反応させて結合した抗体ファージの回収を行う。この操作を行うことにより癌抗原に特異的に結合する抗体ファージの濃縮がされる。(図1)

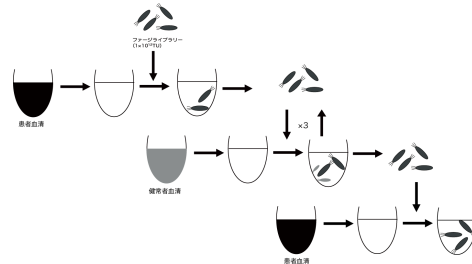


図1. 抗体ファージライブラリを用いた血中癌抗原特異的抗体の濃縮

(3) 濃縮した抗体ファージの特異性の確認

ELISA plate に pool したそれぞれの血清サンプルを固定化、ブロッキング後、濃縮した抗体ファージを反応させ結合特異性の確認を行った。

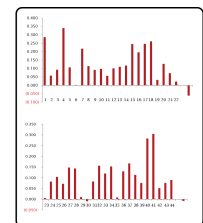
4. 研究成果

(1) 抗体ファージライブラリの評価

研究活動スタート支援の時に構築した胃癌患者リンパ球由来の抗体ファージライブラリ(多様性: 7.6×10^7)を、遺伝子レベルでシークエンス解析、ファージ上への scFv の提示効率を sandwich ELISA により評価を行った。図2で示したようにシークエンス解析の結果、構築した抗体ファージの約80%以上で正確な抗体の遺伝子配列をもっていることが分かった。次に sandwich ELISA により、scFv のファージ上への提示効率を解析した結果、約90%のファージに scFv が提示されていることが示された(図3)。

16 clones	Results of sequence analysis
13	normal
1	Deletion of Vh
1	Insertion (linker)
1	Insertion (Vk-CDR3)

13/16 clones = 81%



39/44 clones=89%

図2. シークエンス解析による抗体ファージの評価

図3. ファージ上への scFv の提示効率の確認

(2) 胃癌患者血清サンプルに存在する癌抗原に特異的に結合する抗体の単離

健常者・胃癌患者の血清サンプルより high abundant に存在するタンパク質の除去を Human 14 Multiple Affinity Removal system column により行い、タンパク質の定

量後、SDS-PAGE を行い、Sypro Ruby 染色により評価を行った。その結果、図4に示すように high abundant protein が除去されている事が確認された。



図4. Hu-14 column 後の sypro ruby の結果

胃癌患者の血清サンプルの癌抗原に特異的に結合する抗体ファージの濃縮

により high abundant protein を除去調製した血清サンプルを用いて、癌抗原に特異的に結合する抗体ファージの濃縮を、図1に示しているプロトコールに従って行った。その後、濃縮が効率よく行われているかの確認をELISAにより行った。結果として、図5に示しているように、健常者の血清サンプルと比較して胃癌患者の血清サンプルに結合する抗体ファージの濃縮が行われている事が確認された。今後は、濃縮された抗体ファージのクローン化を行い特異的に結合する抗体ファージの単離を行っていく。

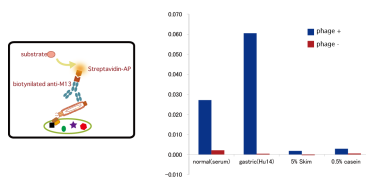


図5. ELISA による濃縮した抗体ファージの結合特異性の確認

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)

Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Shio Watanabe, Tatsuo Murakami, Takahisa Kuga, Satoshi Muraoka, and Takeshi Tomonaga: Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. Peer-Reviewed. J. Proteome Res. 2013 12 (6) 2414-21

Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Shio Watanabe, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, and Takeshi Tomonaga: In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. Peer-Reviewed. J. Proteome Res. 2013 12 (1) 208-13

Ryohei Narumi, Tatsuo Murakami, Takahisa Kuga, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Yoshio Kodera, Masaki Matsumoto, Keiichi Nakayama, Yasuhide Miyamoto, Makoto Ishitobi, Hideo Inaji, Kikuya Kato, and Takeshi Tomonaga: A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples. Peer-Reviewed. J. Proteome Res. 2012 11 (11) 5311-22

Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Shio Watanabe, Masayoshi Kuwano, Misako Sato, Naoko Kawasaki, Jun Adachi, Makoto Ishitobi, Hideo Inaji, Yoshio Kodera, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Takeshi Tomonaga: Strategy for SRM-based Verification of Biomarker Candidates Discovered by iTRAQ Method in Limited Breast Cancer Tissue Samples. Peer-Reviewed. J. Proteome Res. 2012 11 (8) 4201-10

〔学会発表〕(計 8 件)

国外

Muraoka S, Kume H, Saitoh H, Enomoto Y, Ito Y, Nishizuka S, Wakabayashi G, Hoshino I, Matsubara H, and Tomonaga T: Development of High-throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhus Gastric Cancer Biomarker. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress Yokohama Japan 14-18 September 2013

Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Shio Watanabe, Masayoshi Kuwano, Misako Sato, Naoko Kawasaki, Jun Adachi, Makoto Ishitobi, Hideo Inaji, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for SRM-based systematic validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in breast cancer tissue samples. HUPO 11th Annual World Congress September 9-13 2012

Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Shio Watanabe, Masayoshi Kuwano, Misako Sato, Naoko Kawasaki, Jun Adachi, Makoto Ishitobi, Hideo Inaji, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for SRM-based large-scale validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. Asia Oceania Human proteome organization 6th Congress Beijing China May 5-7 2012

国内

招聘セミナー

村岡賢：抗体ファージライブラリを用いた胃癌の診断バイオマーカーの探索と抗体医薬への応用：国立がんセンター、東京、2014年1月24日

村岡賢、久米秀明、西塚哲、若林剛、星野敢、松原久裕、朝長毅：自己抗体ファージライブラリを用いたスキルス胃癌の診断バイオマーカーの探索 第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月3～5日

村岡賢、久米秀明、渡邊史生、桑野晶喜、足立淳、佐藤三佐子、川崎直子、石濱泰、石飛真人、稲治英生、小寺義男、宮本泰豪、加藤菊也、朝長毅：乳がん膜タンパク質の大規模iTRAQ-ショットガン解析とSRM/MRM解析によるバイオマーカータンパク質の探索と検証 がん若手ワークショップ、長野、2013年9月4～7日

Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for validation of biomarker candidates combining iTRAQ and SRM/MRM assay in breast cancer tissue samples 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19-21日

村岡賢、久米秀明、渡邊史生、桑野晶喜、足立淳、佐藤三佐子、川崎直子、石濱泰、石飛真人、稲治英生、小寺義男、宮本泰豪、加藤菊也、朝長毅：乳癌膜タンパク質の大規模iTRAQ-shotgunとSRM解析によるバイオマーカータンパク質の検証 日本プロテオーム学会2012年大会、東京、2012年7月26-27日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：乳がん患者手術治療後の予後判定方法
発明者：朝長毅、村岡賢、村上達夫、加藤菊也、宮本泰豪
権利者：同上
種類：
番号：2012P6952
出願年月日：平成24年5月23日
国内外の別：国内

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

<http://www.nibio.go.jp/proteome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村岡賢 (MURAOKASATOSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロテオームリサーチプロジェクト・研究員

研究者番号：50582681

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：