

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513002

研究課題名(和文) 乳頭分泌液のグリコミクスによる早期乳癌糖タンパク質マーカーの探索と診断法の開発

研究課題名(英文) Exploratory research on early breast cancer glycoprotein markers in nipple discharge by glycomics and development of the diagnostic method

研究代表者

黒野 定 (Kurono, Sadamu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20271554

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)：大阪大学医学部附属病院、大阪府立成人病センター、大阪がん循環器病予防センター、古妻クリニック、及び市立貝塚病院の5施設から29検体の乳頭分泌液(ND)の提供を受けた。AALレクチンLCを使用し、ND検体から糖タンパク質を分取した後、二次元ナノLC-MS/MSを用いて乳癌患者により多く発現している糖タンパク質を解析し、ホルネリンというタンパク質を同定した。合成ペプチド2種を用いて免疫ウサギ抗体を作成し、ホルネリンに対する反応性を確認したところ、1種の抗体についてホルネリンとの反応性が好ましいことを確認した。今後、当該新規抗体を用いてホルネリンの簡易アッセイ系の確立を行いたい。

研究成果の概要(英文)：I received 29 nipple discharges (ND) from 5 facilities of Osaka University Hospital, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka Center for Cancer and Cardiovascular Diseases Prevention, Kotsuma Clinic, and Kaizuka City Hospital. After fractionating glycoprotein from ND specimen using AAL lectin LC, I analyzed glycoproteins which exist even more abundant in breast cancer patient specimens by two-dimensional nano-LC/MS/MS, and identified a candidate protein called hornerin. After making immune rabbit antibodies using two kinds of synthetic peptides, I confirmed that one kind of antibody was preferable for reactivity with hornerin. In future, the establishment of the simple assay system of hornerin in ND using the new antibody will be required.

研究分野：質量分析、生体分子解析学

キーワード：グリコミクス グライコプロテオミクス プロテオミクス 二次元LC/MS 絶対定量 選択反応モニタリング(SRM) 安定同位体ラベル

1. 研究開始当初の背景

現在我が国では年間約4万人もの女性が乳癌に罹患し、年間乳癌死亡者数は1万人を超えている。特に30歳から64歳の壮年・中年層では乳癌が女性がん死亡原因の第1位となっており、発症年齢は欧米と異なり40歳前後から急激に増加している。また乳癌は早期に発見し適切な処置を行えば完治するケースが多く、5年生存率も高いことが報告されている。従って、何よりも「早く・正確に」乳癌が初期の段階で発見・診断される事が重要であるが、現状のマンモグラフィによる診断では数mm以下の大きさの腫瘍は検出が難しく、乳腺密度が高い若年層の場合は更に読影が困難となっている。加えて、当該診断における乳房圧迫による身体的苦痛は自発的な乳癌検診を阻む要因ともなっているため、より非侵襲な乳癌診断法を開発することにより乳癌検診率を上げることも期待される。

従来多くのがんで糖タンパク質の糖鎖構造の変化が研究されてきたが、診断薬として実用化された例はAFP-L3やPIVKA-IIなどの肝細胞癌の腫瘍マーカーが挙げられるがまだまだ少数であり、早期がんの診断は困難である。乳癌ではCA15-3、BCA225、CA125、NCC-ST-439、CEA、ErbB2 (HER2)などいずれも糖タンパク質が腫瘍マーカーとして知られているがやはり早期病期における陽性率は低い。触知不能乳癌(T0乳癌)においては乳頭分泌液中のCEA検査が唯一実施されているが、癌以外の要因でも上昇するため早期癌の確度の高い診断には至っていない。

このような現状のもと、本研究は日本人に特徴的な閉経前若年層の早期乳癌診断法を「予防診断」という観点で捉え新しい診断方法論の確立を目指す。早期乳癌腫瘍マーカーによる診断が可能になれば早期乳癌が組織に浸潤する前に対処することが可能となり、近年増加が著しい若い世代での乳癌死亡率の低減に大きく貢献できるものと期待している。それには、まだまだ有用なマーカーが見出されていない早期乳癌の腫瘍マーカーの探索とその診断システムの確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

臨床検査や予防検診におけるがんの診断において様々な腫瘍マーカーが検査されているが、一般的に早期がんの発見には利用できない。その理由として、血液中に腫瘍マーカーが有意な値で検出された場合は既にがんが進行していることが挙げられる。そこで我々は乳癌に対しより早くより正確な早期診断法を確立するため、乳癌発症部位である乳管内の情報を直接得ることができる乳頭分泌液(ND)を検体とし、癌と密接な関係がある糖鎖のグライコミクスを臨床応用することによって、新規な早期乳癌糖タンパク質

腫瘍マーカーの探索と、それらの簡易診断法を開発する研究目的を設定した。

3. 研究の方法

[1] 検体の採取

既に検体採取機関より乳腺外来及び検診受診者を対象に90例(非乳癌者も含む)のNDが採取され必要な検体情報と共に登録されている。さらに検体採取数を増やしていく。

[2] 糖タンパク質の網羅的な発現差異解析、及び詳細な糖鎖解析による乳癌腫瘍マーカー候補糖タンパク質の選択

先ずは、肝癌の癌化に伴い亢進することが知られているM-グリコシド結合糖鎖還元末端グルコサミンへの α -1,6結合フコシル化の乳癌での挙動を探究するため、AAL (*Aleuria aurantia* Lectin)を用いたレクチンLCを使用し当該化糖タンパク質を分取した後、トリプシン消化を経てタンパク質同定数を飛躍的に高めることが可能な二次元ナノLC(RP-RP)-MS/MSを用いて測定し、乳癌患者及び非乳癌者検体間での糖タンパク質発現差異を解析する。さらに、同上のトリプシン消化物をナノLC(HILIC)-MSn及びCID/ETD法並びに糖鎖構造解析ソフトウェアを用いて糖鎖構造及び糖鎖結合位置解析を実施し、乳癌患者検体に特徴的な糖タンパク質発現や糖鎖構造の差異を有する腫瘍マーカー候補糖タンパク質及び糖鎖を選択する。

[3] 腫瘍マーカー候補糖タンパク質及び糖鎖の妥当性の検証及び新規腫瘍マーカーの確定

腫瘍マーカー候補の乳癌病理組織等での発現相関についてその妥当性を検討すると共に、独自に構築した安定同位体ラベル化試薬 $^{13}\text{C}_7$ -IAA (iodoacetanilide)を用いた新規な糖タンパク質絶対定量解析を実施し、その両法により新規腫瘍マーカーを確定する。

[4] 新規腫瘍マーカーに対するモノクローナル抗体の作製

抗原部位を想定後合成ペプチド抗原を作製し、これらに対するモノクローナル抗体を作製する。

[5] 簡易アッセイ系の確立

2種のモノクローナル抗体でのサンドイッチ或いはレクチン-抗体サンドイッチELISAを構築しEIA法による簡易アッセイ系を確立し、臨床検体での臨床評価を行い実用化への道をつける。

4. 研究成果

1. 検体採集の継続

大阪大学医学部附属病院、大阪府立成人病センター、大阪がん循環器病予防センター、古妻クリニック、及び市立貝塚病院の5施設で、乳頭分泌液(ND)の採取が実施され、2013-2015年度通して29検体を受領した。

2. (グライコ)プロテオミクスによる乳癌診断腫瘍マーカー(糖)タンパク質候補の同

定及び定量法の開発

N-グリコシド結合糖鎖還元末端グルコサミンへの α -1,6 結合フコシル化の乳癌での挙動を探究するため、AAL (*Aleuria aurantia* Lectin) を用いたレクチン LC を使用し ND 検体から糖タンパク質を分取した。その後トリプシン消化を経て、タンパク質同定数を飛躍的に高めることが可能な二次元ナノ LC(RP-RP)-MS/MS を用いて測定し、乳癌患者 ND により多く発現している糖タンパク質としてホルネリンというタンパク質を同定した。当該結果は特許 (W02014/132869) にて公開されている。ホルネリンは、全 2,850 アミノ酸からなる分子量約 282 kD の糖タンパク質である。糖鎖結合部位は POS137-139 及び POS218-220 の 2 箇所であることが知られているが、詳細解析に有効な抗体及び抗原精製法は確立されていない。そこで、合成ペプチド 2 種を用いて免疫ウサギ抗体を作成し、ウエスタンブロッティング法等でホルネリンに対する反応性を確認したところ、1 種の抗体についてホルネリンとの反応性が好ましいことを確認した。今後、当該新規抗体を用いてホルネリンの詳細解析を実施すると共に、ホルネリンの簡易アッセイ系の確立を行っていきたい。

また、浸潤性乳癌診断腫瘍マーカー候補タンパク質 4 種、非浸潤性乳癌診断腫瘍マーカー候補タンパク質 7 種を選定し、これらの結果を特許出願 (特願 2015-217201 号、特願 2015-217202 号) すると共に科学雑誌に論文掲載された (Kuroono, S. et al. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, in press)。

さらに、抗体を用いない乳癌診断腫瘍マーカータンパク質候補の絶対定量法として、ヨードアセトアニリド及びその ^{13}C 同位体置換物を用いた手法を開発し科学雑誌に論文掲載された (Kuroono, S. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, **25**, 1110-1116)。

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. Kuroono, S., Kaneko, Y., Niwayama, S. Quantitative protein analysis using $^{13}\text{C}_7$ -labeled iodoacetanilide and d5-labeled *N*-ethylmaleimide by nano liquid chromatography/nano electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, **23**, 3111-3118.
2. Kuroono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., Niwayama, S. Quantification of proteins using $^{13}\text{C}_7$ -labeled and unlabeled iodoacetanilide by nano liquid chromatography/nano electrospray ionization and by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Bioorg. Med.*

Chem. Lett. 2015, **25**, 1110-1116.

3. 大石晴樹、黒野 定、早期乳がん発見を目指す乳頭分泌液中分子マーカーの探索と診断法の開発. *生産と技術* 2016, **68**, 72-77.
4. Kuroono, S., Kaneko, Y., Matsuura, N., Oishi, H., Noguchi, S., Kim, S. J., Tamaki, Y., Aikawa, T., Kotsuma, Y., Inaji, H., Matsuura, S. Identification of potential breast cancer markers in nipple discharge by protein profile analysis using two-dimensional nano-liquid chromatography/nano electrospray ionization-mass spectrometry. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, in press.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 黒野 定、中嶋智之、小林則文、松浦脩治、松浦成昭、大石晴樹、二次元 Nano LC/nano-ESI-MS による乳頭分泌液中の乳癌マーカー探索研究、第 61 回質量分析総合討論会、つくば、2013. 9.
2. Kuroono, S., Nakajima, T., Kobayashi, N., Matsuura, S., Matsuura, N., Oishi, H. A Study of Protein and Glycoprotein Biomarker Discovery in Nipple Discharges from Breast Cancer by Nano-LC-ESI-Mass Spectrometry. HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013. 9.
3. 黒野 定、乳頭分泌液を用いた乳癌バイオマーカー探索における二次元 LC/MS の活用とその効果、第 238 回生存圏シンポジウム、宇治、2013. 11 (招待講演)
4. Kuroono, S., Kobayashi, N., Nakajima, T., Matsuura, S., Matsuura, N., Oishi, H. Proteome and Glycoproteome Analyses for Breast Cancer Biomarker Discovery with Nipple Discharge Using Two-Dimensional Nano LC/Nano-ESI-MS. The 62nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore, MD, 2014. 6.
5. Kuroono, S. Exploratory Research on Potential Tumor Markers that are Useful for Cancer Diagnosis, and Development of a Simplified Assay System. Environmental Organic Chemistry Class, 室蘭, 2014. 10 (招待講演)
6. Kuroono, S., Oishi, H., Niwayama, S. An Attempt to Quantitative Analysis of Clinical Proteome in Nipple Discharge by Nano LC-Nano-ESI-SRM-MS using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide. The 63rd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, St. Louis, MO, 2015. 5.
7. 黒野 定、小林則文、中嶋智之、松浦脩治、松浦成昭、大石晴樹、二次元 LC/MS/MS を用いた乳頭分泌液中の乳癌マーカー探索研究、第 42 回 BMS コンファレンス、岐阜、2015. 7.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：浸潤性乳癌の判定法
発明者：大石 晴樹、松浦 成昭、黒野 定、
小林 則文
権利者：和光純薬工業株式会社、大阪大学
種類：
番号：特願 2015-217201 号
出願年月日：平成 27 年 11 月 5 日
国内外の別：国内

名称：非浸潤性乳癌の判定法
発明者：大石 晴樹、松浦 成昭、黒野 定、
小林 則文
権利者：和光純薬工業株式会社、大阪大学
種類：
番号：特願 2015-217202 号
出願年月日：平成 27 年 11 月 5 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒野 定 (KURONO, Sadamu)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい准
教授
研究者番号：20271554

(2) 研究分担者

檜枝 美紀 (HIEDA, Miki)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00380254