

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790658

研究課題名（和文）血中膵癌由来ペプチドの網羅的解析による新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文） Peptidomics analysis of serum in patients with pancreatic cancer

研究代表者

山本 憲彦（ Yamamoto Norihiko ）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60501963

研究成果の概要（和文）：

今回、我々は、新たに開発したペプチド解析プラットフォームを用いて、早期発見が困難とされる膵癌患者の血清中に特異的にみられるペプチドを網羅的に解析した。その結果、膵癌患者に特異的に増加したり、減少したりするペプチドを多数同定した。同定されたペプチドは、病態疾患ペプチドームを形成していると考えられる。今後、プロテオミクス解析を用いて、さらなる診断マーカーの開発や病態解明が発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have found many fragments of peptides that determine the development of pancreatic cancer. Among them, we identified and focused on increase or decrease of the special fragments. These findings are very useful for the diagnosis of pancreatic cancers. These molecules would be the promising molecular target of diagnosis and therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：消化器内科学、膵臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード膵癌、バイオマーカー、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、病態プロテオミクスにおける血中ペプチドの重要性が指摘されている。早期発見が困難とされている膵癌に関しては、臨床的に有用なバイオマーカーが発見されていない。そこで、多くの研究者が、プロテオミクス解析法を用いることにより、血清を中心としたバイオマーカーを探索している。

一方、病態時における細胞においては、疾患関連タンパクの分泌、プロテアーゼによる

分解が行われており、いわゆるペプチドームの産生源となっていると考えられている。細胞由来のペプチドは、末梢血中に移行し、多くはアルブミンなどの高分子蛋白と結合し、腎臓などで排泄されると考えられている。この流血中のペプチドは、疾患とその病態に密接に関連していることが推察され、さらに病態や予後などの有用なバイオマーカーに成り得ると思われる。特に疾患特性のプロテアーゼの影響を受けると考えられる。しかしなが

ら、このような低分子量のペプチドを網羅的、包括的に解析することはこれまで技術的にも難しいとされてきた。そこで、我々は、患者血中の低分子ペプチドを、包括的にハイスループットで解析するシステムを構築した。

一方、固形癌のなかで膵癌は早期発見が困難で、かつ予後が不良である。そこで、膵癌を早期に発見できるマーカーの開発が非常に重要である。現在までに、膵癌の腫瘍マーカーまたは腫瘍マーカー候補とされ発表されているものを表1にまとめた。この中で実用化されているものは、I型糖鎖関連のものだけである。プロテオミクス解析によっても多数の分子が同定されているが、実用化されていない。

2. 研究の目的

我々は、最新のプロテオミクス解析を用いたディファレンシャルプロテオーム解析システムを構築し、時間軸にける肝疾患における「疾患パスウェイ」を解析してきた。具体的には、2次元電気泳動 (NEpHGE と EttanDIGE)、プロテインチップを用いた SELDI or SELDI-TOF MS、また 2次元 HPLC と Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) を組み合わせた 2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS 法の 3 種類の方法を開発応用している。これらの方法では低分子量から高分子量までのペプチド・タンパクを包括的かつ網羅的に解析できる。(Fuke H, Yamamoto N, et al. *BBRC*. 363, 738-44, 2007)。
そこで本研究ではこの血液中ペプチドミクス解析により新たな膵癌発症の病態を解析し病態責任分子を明らかにし、最終的に**膵癌診断、発症予測や予後推定のバイオマーカーを探索して臨床応用することを目的**とする。

3. 研究の方法

A, 対象は膵癌患者 26 例とコントロールとして健常者 11 例および脂肪性肝疾患肝症例 18 例である。

B, 血清中ペプチド成分の網羅的比較解析方法の確立 (図 2)

ヒト血清中には多くの種類のタンパク質・ペプチドが存在し、その存在比率は不均一である。血清は約 100 mg/ml のタンパク質濃度であるが、そのうちの約半分以上がアルブミン (50×10^9 pg/mL) であり、もっとも少ないとされるインターロイキン 6 (5 pg/mL) とを比較すると、ダイナミックレンジは 10^{10} 以上となる。このような血清中のタンパク質やペプチド成分のプロファイルを探索するために、われわれは血清中のタンパク質やペプチドを、電気泳動や HPLC を用いて可能な限り分画し、それぞれの画分を質量分析することで多量に含まれるタンパク質成分の影響を除き、微量のペプチドを検出可能にするも

のである。具体的な方法を以下に記載する。

① 清サンプルの前処理

血清は一回の分析につき、25 μ L を用いた。その後、より確実にペプチド成分を回収するために、MAX μ Elution Plate および WCX μ Elution Plate を用い血清処理を行った。限外ろ過膜を用いて分子量 10,000 以下のものだけを回収した。

② 次元 HPLC による分画と質量分析

1 次元目には SCX カラム、2 次元目には逆相カラムを用いて分画を行った。1 次元目には SCX カラム、2 次元目は逆相カラムを用いて分画を行った。最終的に 384 の分画を得た。

1 枚のサンプルプレート上の 380 サンプルを質量分析計にて自動分析した。また内部標準として Bradykinin fragment 1-7 と ACTH fragment 18-39 を用いた。

③ ディファレンシャル・ディスプレイ・ビューワーによる解析

Differential Display Viewer は、MALDI-TOF/MS から出力される質量分析結果を、ゲルビューワーのようにヒートマップで表示して可視化するソフトウェアであり、縦軸に液体クロマトグラフィーで分画されたフラクション番号を、横軸に質量数 (m/z) をとり、ピーク強度 (intensity) を表示する。更に、本ソフトウェアは、健常人と患者とで発現量の差異の大きいペプチドを大きいものから順にリスト表示することができる。また、患者由来のタンパク質と正常人タンパク質とを画面上で色の異なる (赤と緑など) 疑似カラーで着色して重ね合わせることで発現量の異なるタンパク質を識別するといった機能も備わっている。また、それぞれのペプチドの疾患に対する感度、特異度を計算し、有用なバイオマーカー候補を特定できる。それぞれの分子について AUC 値を計算し値の高く判別の可能性が高いものからリストアップした。このシステムに同定できるペプチドは、少なくとも 500 個以上が含まれると推定される。それぞれのクラスターについては、自動で選択し、ペプチドの m/z の範囲は 0.3kDa、保持時間は 72s とした。

④ タンパク・ペプチドの構造決定

その後に再調整することなく MSⁿ 測定により、タンパク・ペプチドの構造決定をした。具体的には MS/MS 結果を自動で Mascot 検索を行った。これらの一連の過程を自動化した 2D- μ HPLC-MALDI-TOF-MS 法によって行った。本法によって、包括的かつ網羅的なプロテオーム解析がはじめて可能になった。

4. 研究成果

A, 肝疾患患者血清ペプチドの疾患プロテオミクス

上記方法を用い、膵癌における新規バイオマーカーの同定を試みた。一例を示すと、図に

示すように健常者ではほとんど発現がみられないが、ほとんどの膵癌患者で上昇しているペプチドまた、その逆に膵癌で発現が低下しているペプチドを多数みとめた。

(1) 膵癌患者と健常者との比較。AUC 値のカットオフを 0.8 以上と設定すると以下に示すペプチドがクラスターとして認められた。

膵癌で増加したペプチド 25 ペプチド

膵癌で減少したペプチド 93 ペプチド

(2) 膵癌患者と脂肪性肝疾患患者との比較。AUC 値のカットオフを 0.75 以上と設定すると以下に示すペプチドがクラスターとして認められた。

膵癌で増加したペプチド 88 ペプチド

膵癌で減少したペプチド 243 ペプチド

また両解析に共通するペプチドも多数、同定できている。また AUC 値しており、現在さらなる解析風である。個々のクラスターの具体的な解析例を図に示す。これらの分子においては、膵癌患者において健常人、脂肪肝患者と比較して優位に増加または減少している。

B, ペプチドの同定

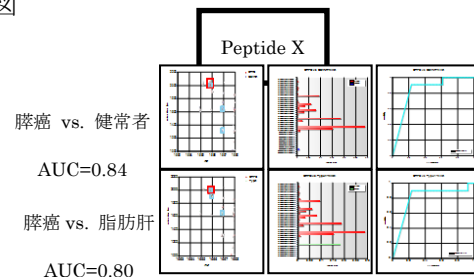
上記において、検出された疾患特異的ペプチドについて、飛行時間型と四重極型イオントラップ型のハイブリッド質量分析計 AXIMA QIT を用いて、そのペプチドシーケンスを決定した。その結果、膵癌マーカーとして、新規のものが多数含まれていた。また、膵癌細胞由来と考えられるペプチドを多数同定できた。現在まで同定できたペプチドが含まれる分子のカテゴリー別一覧を示す (表)。癌遺伝子から細胞内シグナル関連、血管新生関連、代謝また免疫関連の分子など非常に多岐に渡っていることが判明した。

我々は、血清からペプチドームの包括的かつ網羅的解析可能なプラットフォームを構築した。この方法により、血清中の低分子ペプチドレベルまでのタンパク質の包括的および網羅的解析が可能であった。この系を用い膵癌患者の血清を用い膵癌特異的ペプチドの同定を試みた。AUC 値のカットオフを 0.75 と高く設定しても、血中における多数のペプチドの変化が認められた。今回われわれは、癌に対する生体反応など、非特異的に変化しているペプチドを判別するため、脂肪性肝疾患患者の血清もコントロールとして検討した。その中で膵癌患者で増加しているペプチドを多数認めた。現在、その詳細な意義および機能について解析中であるが、同定されたペプチドは癌遺伝子、細胞内シグナル関連、血管新生関連や代謝関連あんど非常に多岐に渡っていた。すでに膵癌関連分子と報告されているものもあり、本方法による解析の妥当性が示唆され、疾患関連バイオマーカーの探索に有用であることが示唆された。

実際の解析では、おどろいた事に膵癌にお

いて増加するペプチドのみならず減少するペプチドも多数認められた。これは、膵癌に特異的なプロテアーゼやペプチダーゼなどにより、ペプチドの切断が特異的に変化していることを示していると考ええる。血清においてこのようなタンパク・ペプチドのダイナミックな変化が確認されたことは、膵癌の病態解明を研究するうえで極めて重要な知見と考える。実際、今回同定された膵癌関連ペプチドはその AUC 値の高さから既存のマーカーである CA19-9 と比較しても感度、特異度とも遜色なく、これらのマーカーを組み合わせると診断率が向上する可能性が示唆される。しかし、新規バイオマーカーとしての地位の確立には、さらに新規多数例での有用性の検討が必要であると考ええる。また、そのペプチドの変化の機序についてのさらなる研究が必要である。実用化にはまだ時間がかかるが、ペプチドームを基盤とした新しい医療が展開されることが期待される。

図



表

膵癌患者で増加しているもの
Complement-related
Inflammatory reaction
Electron transport chain
ECM-related
Cholesterol Metabolism-related
Neurotransmitter
Tyrosine-protein kinase
Angiogenesis-related
Serine protease family
など
膵癌患者で減少しているもの
Finrinogen-related
Cytoskelton-related
Heme-related
Ferritin-related
Energy -enzyme
Phosphoryrate-enzyme
Neuron-relatede
Metabolism-related
Immunoglobulin-related
Thyroid hormone-related

Tumor-suppressor protein
transporterPhosphoryrate-enzyme

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 6 件)

- ① Sugimoto K, Ito T, Yamamoto N, Shiraki K. Seven cases of autoimmune hepatitis that developed after drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2011 in press 査読有
- ② Suzuki M, Sugimoto K, Tanaka J, Tameda M, Inagaki Y, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Ito M, Yoneda M, Uchida K, Takase K, Shiraki K. Up-regulation of Glypican-3 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 30, 5055-61, 2010. 査読有
- ③ Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, Beppu T, Yoneda K, Yamamoto N, Uchida K, Kojima T, Takei Y. Functional cell surface expression of Toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*. 37, 805-14, 2010. 査読有
- ④ Beppu T, Sugimoto K, Shiraki K, Tameda M, Kusagawa S, Nojiri K, Tanaka J, Yamamoto N, Takei Y, Takaki H, Uraki J, Nakatsuka A, Yamakado K, Takeda K. Clinical significance of tumor markers in detection of recurrent hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Int J Mol Med*. 26, 425-33, 2010. 査読有
- ⑤ Ooi K, Sugimoto K, Shiraki K, Yamamoto N, Tameda M, Beppu T, Tanaka J, Nojiri K, Kusagawa S, Takei Y, Masuda C, Nobori T. Classification of hypocholesterolemia lipid patterns using Chol/Trig Combination System. *Int J Mol Med*. 25, 601-6, 2010. 査読有
- ⑥ Yamakado K, Nakatsuka A, Takaki H, Sakurai H, Isaji S, Yamamoto N, Shiraki K, Takeda K. Subphrenic versus nonsubphrenic hepatocellular carcinoma: combined therapy with chemoembolization and radiofrequency ablation. *AJR Am J Roentgenol*. 194, 530-5, 2010 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 憲彦 (YAMAMOTO NORIHIKO)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60501963