

§2-2 質量分析システムを用いた前立腺がんの研究

京都大学大学院 医学研究科 泌尿器科学

前立腺がんは罹患率の高い悪性腫瘍の一つで、米国では2012年には約241,740名の新患者数(米国男性の悪性疾患のうち罹患率は第1位、悪性疾患の約29%)、約28,170名の死亡者数(それぞれ第2位、9%)が推定されている。我が国においても前立腺がんの罹患率は増加傾向にある。2006年の罹患数は年間約4万2千人で胃がん、大腸がん、肺がんに次いで第4位であった。2020年には男性において肺がん、結腸がんと共に最も頻度の高いがんになると推定され、2020年の前立腺がんによる死亡率は、2000年の前立腺がん死亡率の実測値に対して約2.8倍にもなると予測されている。近年、腫瘍マーカーであるPSA(前立腺特異抗原)の普及もあって、限局性前立腺がんの状態で見られる症例が増加している。

PSAは前立腺の腺管から分泌される前立腺特異的なタンパク質であるががん特異的ではなく、炎症や肥大症などの良性疾患でも血清中値の上昇を認める。従って、前立腺がん検出特異度は低い。とくにPSAスクリーニングの結果、前立腺生検を施行すべき対象であるPSA値が4~10 ng/mlのいわゆる“gray zone”での特異度は芳しくない。前立腺がんの確定診断には前立腺生検は現時点では必須であるが、その侵襲は決して低くない。PSA値がgray zoneでの前立腺がん罹患率は約20%であることを考えると、この範囲のPSA値を有する多くが侵襲の高い前立腺生検を過剰に受けることになる。

こうした過剰な検査を回避するためにも血清PSAを補完する新たな診断バイオマーカーの開発が急務である。血清PSAを補完する目的でPSA F/T ratio、proPSAなどのPSA関連マーカーやPCA3などのRNAマーカーの臨床応用に関する報告があるが、現時点では前立腺がんの診断において血清PSAを補完する十分なバイオマーカーは見つかっていない

また、前立腺がんには高分化型低悪性度のがんがある一方、低分化型高悪性度のがんも存在し、治療戦略を立てる上で前立腺がんの生物学的悪性度をきちんと把握することは重要である。しかしながら、現時点では血清PSAのみではその悪性度を見分けることができず、前立腺がん特有の組織分類であるGleason分類のみが唯一その悪性度を示す指標である。したがって、その生物学的悪性度を非侵襲的に知りうるバイオマーカーを見出すことも臨床的には強く望まれている。

前立腺がんはホルモン依存性がんであり、進行性前立腺がん(転移を有する)であっても従来のLHRH analogue および第一世代の抗アンドロゲン剤による初期治療によく反応するが、多くは2-3年以内いわゆる“去勢抵抗性がん”へと変異する。近年では、この難治性がんへの変異メカニズムは、様々な分子生物学的な手法を用いて少しずつ解明されてきている。その変異メカニズムをターゲットにした新規薬剤の臨床試験が進み、前立腺がんに対する薬物療法は急激に変化する一方、どの薬剤をどのような順番に使用するのがよくかまわなくエビデンスのない混沌とした状況になると思われる。したがって、治療反応性や薬剤抵抗性を見分けることのできるバイオマーカーも今後強く望まれると考えられる。

本研究では高感度質量分析装置や質量顕微鏡を用いて、臨床に直結するようなバイオマーカーの探索を試みることを目的とする。

§2-2-1 尿中ペプチドをマーカーとする前立腺がん(肥大)の病態診断

【研究目的】

血清中の前立腺特異抗原(Prostate-specific antigen: PSA)濃度は、前立腺がん(PCa)の診断マーカーとして広く検診等で利用されている[1-3]。現在では、予後予測や再発及び治療効果の判定にも広く用いられている。血清 PSA(sPSA)濃度は、PCa の検出感度としては良好であるが、前立腺特異抗原であり、PCa に特異的な抗原でないことから、前立腺肥大症(Benign prostatic hyperplasia: BPH)、前立腺炎などの良性疾患や直腸診、射精行為でも PSA が上昇することがあるため、PCa の検出特異性としては良好とは言いがたい。従って、PSA 値 4 ng/mL を精密検査実施の判定基準値としている現状では、偽陽性率が高い状況にある。その結果、身体的負担が大きい前立腺生検が過度に施行されていることが課題視されている。疫学的調査研究から sPSA 濃度が 4~10 ng/mL のいわゆるグレイゾーン(診断が難しい濃度範囲)においては PCa の陽性率は 25~30%であり、この範囲の値では約 70%で不要な生検が行われていることが報告されている[4]。このような現状から、非がん者の不必要な生検を回避し、sPSA 濃度に比べ PCa 患者をより効率よく検出するための、新たなバイオマーカーが切に望まれている。

患者から得る臨床試料の採取法にも改善が求められている。血液は一般的な臨床試料であるが、疾患の経時的なモニタリングの際には採血が頻回になると採血量の制限がかかることがある。より負担が少ない採取方法で臨床試料が確保出来れば、より好ましいとされている。毎日排泄される尿は非侵襲的に採取が可能であり、尿中マーカーは倫理的にも理想的な検査試料である。更には、前立腺の腺管は尿道に開口しているので、随時尿(通常の検査用の尿)と前立腺マッサージ後尿(前立腺マッサージ[直腸診]後に採取した尿)を比較することで前立腺から直に分泌されている様々な物質を検出することが可能である。実際、尿を検体とした診断方法として、(1)尿中 RNA、(2)尿中 DNA、(3)尿中タンパク質、(4)尿中代謝物などがある。このうち、Non-coding RNA である前立腺がん遺伝子 3(PCa3)は、PCa で発現が高く、正常の前立腺ではその発現が低いことが報告され[5]、この PCA3 を尿中で検出する PCa 診断法の報告が近年散見されるが[6]、臨床現場の検査法としては sPSA を補完するまでには至っておらず、またその他の尿中成分を用いた診断法も研究段階にある。従って、新たに疾患関連性のある尿中ペプチドやタンパク質断片による前立腺疾患検査法が確立されれば、その臨床的意義は高い。尿中には、分子量 10 kDa 以下のペプチドやタンパク質断片が多種存在し、その排泄量は健常人でも通常数十 mg/day に達する[7]。尿は、非侵襲的なサンプリングが可能であり、プロテアーゼの活性も低く、血液・腎臓・膀胱・卵巣・前立腺などに由来する物質を含んでいることから、分子量 10 kDa 以上のタンパク質を標的にした疾患関連マーカー探索に関するプロテオミクス研究が多面的に実施されている[8-11]。Okamoto らは、前立腺マッサージ後尿を検体として、 m/z 2,500~150,000 の質量範囲での SELDI-TOFMS 解析を行い、PCa と BPH との間に有意に異なる 72 種のピークを検出した[12]。しかし、質量分析装置の分解能が悪く MS/MS 解析が出来なかったことから、検出された多くのピークは同定すること出来ずに、臨床応用されるまでには至っていない。

そこで本研究では、本プロジェクトで開発された高感度・高分解能で MS^n が可能な MALDI-DIT-TOFMS(DIT-FP 機)を用いて、迅速なマススペクトル解析と、詳細な構造解析を同時に実施することにより、前立腺マッサージ後尿に分泌される微量なペプチドやタンパク質断片を捕捉して解析し、新しいバイオマーカー候補の探索を実施した。

【研究方法】

インフォームド・コンセントを取得した男性から前立腺マッサージ後尿を採取し、50 mL 遠心管に 100 μ m ナイロン製セルストレーナーを載せ、採尿した尿をセルストレーナーを通して回収した。回収した尿は、20°C で 10 分間、2,000 x g で遠心分離を行った(採尿から遠心分離までを 30 分以内に実施した)。遠心分離後

の上清を、1.5 mL のマイクロチューブに、それぞれ 1.0 mL ずつ分取して、解析用尿検体とし、分析まで-80°Cで保存した。

前立腺マッサージによる尿検体の採取法は以下の通りである。(1)直腸内に示指を挿入し、(2)前立腺の左右および中央を底部から尖部にかけておのおの3回マッサージした後、(3)尿を採取した。

解析に使用する尿検体は、20°C、1,000 x g で遠心しながら溶解させた。溶解した尿検体 1.0 mL に対して 400 μ L の変性用緩衝液(9 M 尿素、2% CHAPS、50 mM Tris、pH 9.0)を加え、良く攪拌した後、4°Cでロータリーミキサーを用いて 30 分間、ペプチド及びタンパク質を変性させた。1.4 mL の変性溶液に 3.6 mL の binding buffer(100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液、pH 4.0、0.05% Triton-X100)を加え、攪拌後、33%スラリーの活性化済弱陽イオン交換樹脂(Carboxy methyl [CM]-Sephacryl Fast Flow)を 60 μ L 添加した。この混合溶液を、ロータリーミキサーを用いて室温で 30 分間攪拌した。

5 mL の混合溶液は、20°Cで 10 分間、1,000 x g で遠心分離を行い、上清を廃棄した。CM-Sephacryl の沈査を 1.5 mL マイクロチューブに移し、washing buffer (binding buffer と同一)で 3 回、超純水で 3 回洗浄した。洗浄の際には、20°Cで 3 分間、3,000 x g で遠心分離を行い、樹脂を巻き上げないように上清のみをピペッターで廃棄した。最後に、トリフルオロ酢酸溶液(TFA)を用いて、ペプチド・タンパク質を溶出させた。溶出液は 20°Cで 5 分間、15,000 x g で遠心分離し、クリーンナップした上清を質量分析解析用試料とした。

MALDI-TOFMS 分析に際しては、本プロジェクト開発された Digital Ion Trap を搭載した DIT-FP 機(図 1)を用いてマスマスペクトル解析、更にはターゲットピークの MS/MS 解析に基づく構造解析を行った。

マトリックスとしては、本研究においては主に dihydroxybenzoic acid(DHB, 5 mg/tube)を用いて解析を実施した。DHB マトリックスは、50% acetonitrile in water / 0.1% TFA 溶液 500 μ L で溶解し、質量分析解析用試料と等量をプレミックスし、MALDI-TOFMS 用ステンレス製サンプルプレートに 0.5 μ L をアプライし、風乾後、再度 0.5 μ L をアプライするという操作を 3 回行い、分析用サンプルとした。また、 μ Focus MALDI プレート(Hudson Surface Technology, Inc.)を用いる場合は、1.5 μ L をアプライし、フォーカシングさせた後、分析用サンプルとした。

【結果と考察】

1. DIT-FP 機を用いた尿中ペプチド・タンパク質断片のマスマスペクトル

図 2 に、健常者、前立腺肥大症患者(BPH)および前立腺がん患者(PCa)の尿検体(前立腺マッサージ後尿)の質量分析結果の代表例を示す。横軸に質量(m/z)、縦軸にその質量で検出器に到達した分析物の量を反映するピークで示した。図 2 から明らかなように、PCa と BPH・健常者(Healthy)の尿検体を比較すると、PCa では m/z 23XX の強度が有意に増加していた。そこで、 m/z 23XX の PCa バイオマーカー候補の可能性に着目して下記の実験を実施した。



図1 島津製作所が開発した MALDI-DIT-TOFMS(DIT-FP機)

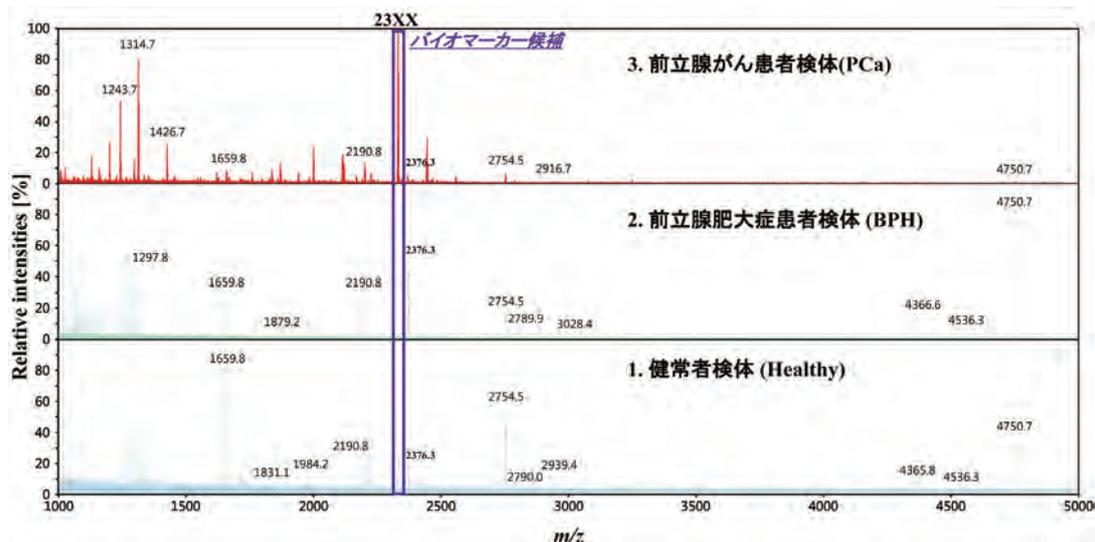


図2 DIT-FP機を用いたマススペクトル

2. DIT-FP 機を用いた m/z 23XX ピークの同定

DIT-FP 機を用いて尿中ペプチドの構造解析を行った。解析は、MS で precursor イオンを選択し、MS/MS 解析により得られた MS/MS マススペクトルデータを用いて Mascot MS/MS Ion Search (Matrix Science) 検索を実施した。

(1) m/z 23XX の構造解析

m/z 23XX を precursor イオンとした時の MS/MS 構造解析の結果を図 3 に示す。Mascot MS/MS Ion Search の結果、 m/z 23XX はこれまで報告のない PSA の C 端部断片であると推定された。

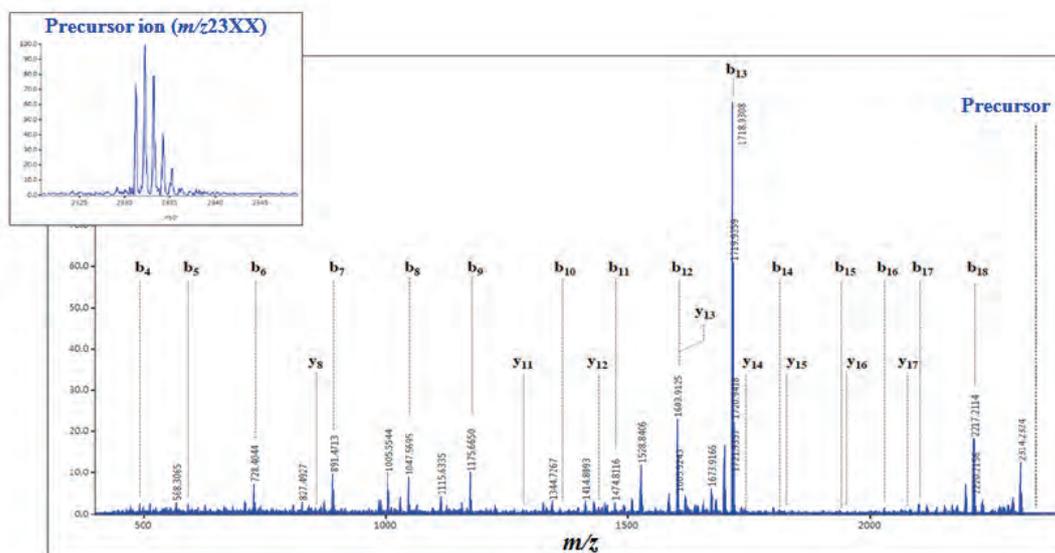


図3 DIT-FP機を用いたMS/MSマススペクトル

更に、Mascot MS/MS Ion Search で推定された PSA の C 端部のアミノ酸配列を有するペプチドを合成して、MS/MS マススペクトルからの validation 試験を行った。

合成ペプチドの MS/MS マススペクトルは、PCa 患者尿で検出された m/z 23XX の MS/MS マススペクトルと完全に一致した(データ省略)。本解析の結果、PCa 患者尿中の m/z 23XX は PSA の C 端部のアミノ酸構造と同一であることが明らかとなった。

(2) m/z 23XX の由来について

PCa 患者の前立腺マッサージ後尿と随時尿の比較を行った。その結果、PCa 患者の随時尿中では顕著な m/z 23XX ピークは検出されなかった(データ省略)。

以上の知見から、 m/z 23XX ピークは、PCa 患者に対する前立腺マッサージによって前立腺より分泌された PSA の C 末端部断片であることが明らかとなった。

3. DIT-FP 機を用いたマスペクトルから算出された相対強度解析

表1 臨床検体について

対象者グループ (n: 検体数)	年齢 (歳)
健常者群 (Healthy; n = 17)	70.0 ± 10.4
前立腺肥大症群 (BPH; n = 8)	65.0 ± 4.3
前立腺がん群 (PCa; n = 14)	68.0 ± 6.8

(median ± SD)

表 1 に示した通り、健常者(Healthy)症例 9 例、BPH 患者(BPH)症例 8 例、PCa 患者症例 14 例について、DIT-FP 機を用いて m/z 23XX の相対強度の比較を行った。群間の比較には、統計ソフト JMP10.0.2 (SAS Institute Japan Inc.)を用いて、マンホイットニー-U 検定を用いて実施した。

sPSA 値は年齢により、差異が認められることが知られている。表 1 に示した通り、以下の解析に用いた検体間には、統計的に有意な年齢差は認められない Age-matching した検体を用いた。

(1) 解析に用いた検体の sPSA 濃度の比較

図 4 に 3 群 31 検体の sPSA 濃度を示した。

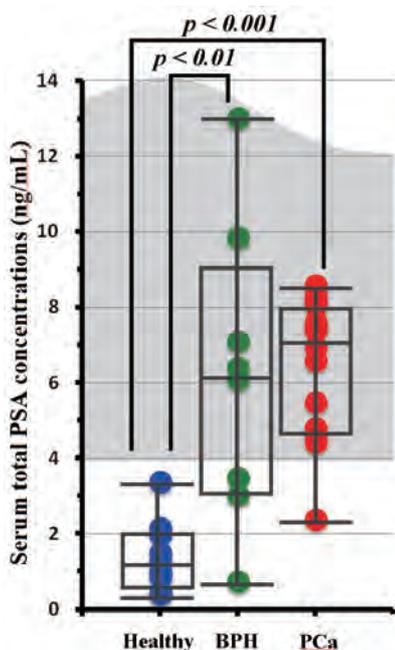


図4 血清PSA濃度の比較
(健常者群・BPH群・PCa群)

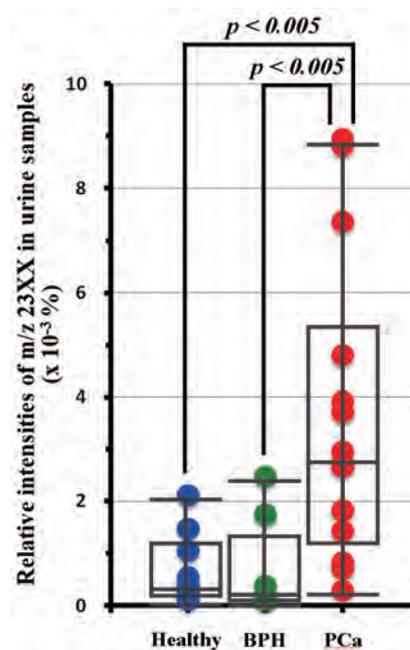


図5 m/z 23XXの相対強度の比較
(健常者群・BPH群・PCa群)

従来の臨床検査(電気化学発光免疫測定)法で分析された sPSA 濃度について、Healthy 群、BPH 群、そして PCa 群の 3 群に分けて解析を行った。Healthy 群と BPH 群及び PCa 群の間には統計的な有意差が認められたが、BPH 群と PCa 群の間には有意差が認められなかった。これらの結果から、sPSA 濃度だけでは、BPH 群と PCa 群を明瞭に判別することが出来ないことが確認された。現在の PCa 判定の sPSA 濃度の基準値は 4 ng/mL 以上に設定されているが、図 4 から分かる様に、BPH でも基準値を超える検体が多く認められ、また、PCa でも基準値を下回る症例の存在が確認された。以上のことから PSA 濃度による PCa 診断を補完する新たなバイオマーカーの必要性が再確認された。

(2) m/z 23XX 相対強度を用いた比較

DIT-FP 機を用いた尿中ペプチド・タンパク質断片のマススペクトルから各ピークの相対強度を算出した。すなわち、 m/z 1,200~5,000 の範囲の全てのピーク強度の総和に対する m/z 23XX のピーク強度の割合を%で表示した(図 5)。

m/z 23XX の相対強度は、Healthy 群と比較し有意に高値を示した。また、sPSA 濃度では判別が不可能であった BPH 群と PCa 群の間に統計的な有意差が確認された。

以上の知見から、前立腺マッサージ後尿中の PSA の C 末端部の存在量を測定することにより、BPH 群と PCa 群との判別の可能性が示唆された。

また、従来の臨床検査法で分析された sPSA 濃度を横軸に、 m/z 23XX の相対強度を縦軸にして、臨床検体の値をプロットした相関図を図 6 に示した。

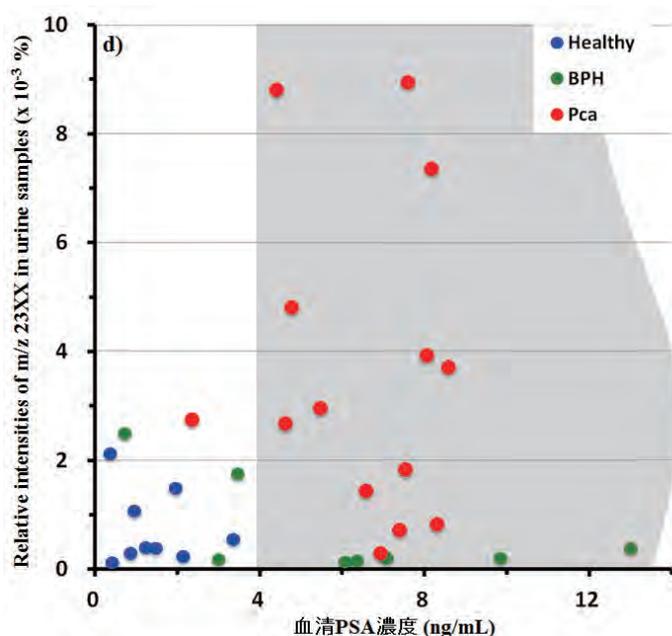


図6 血清PSA濃度と m/z 23XX の相対強度の分布図

図 6 から、sPSA 濃度と PSA の C 末端断片ペプチドである尿中 m/z 23XX ピークの相対強度の値には有意な相関関係がないことが明らかとなった。従来の PSA 検査ではグレイゾーンとなっている sPSA 濃度 4~10 ng/mL の範囲に、半数以上の BPH 症例がプロットされた。これに対し、 m/z 23XX の相対強度を指標とする検査法では、PCa の検出感度が優れており、とりわけ sPSA 値のグレイゾーンにおいて高い検出感度が確認された。

以上の知見から、sPSA 濃度と独立して変動する尿中 m/z 23XX の相対強度(PSA の C 末端断片ペプチド量)は、sPSA 濃度による PCa 診断を補完する新しいバイオマーカー候補である可能性が示唆された。

【まとめ】

以上の結果より、本研究で明らかとなった前立腺マッサージ後尿中に含まれる PSA の C 末端断片である m/z 23XX ペプチドが、sPSA 濃度を補完する新しい PCa のバイオマーカー候補となることが強く示された。今後、解析症例数を増やししながら、更なる検討を実施し、臨床応用を目指す必要がある。

m/z 23XX ペプチドの発見には、島津製作所田中最先端研究所 で開発された高感度・高分解能で MSⁿ が可能な DIT-FP 機を使用した。迅速なマススペクトル解析と構造解析が同時に実施出来たことが、大きな研究の駆動力となった。

【成果一覧】

学会発表

- (1) K. Nakayama, T. Inoue, S. Sekiya, Y. Miyazaki, N. Terada, S. Kajihara, S. Iwamoto, S. Kawabata, K. Shimizu, K. Tanaka, O. Ogawa. Fragmented peptides of prostate-specific antigen (PSA) as novel urinary biomarker candidates for diagnosis of prostate cancer, European Cancer Congress 2013.
- (2) K. Nakayama, T. Inoue, S. Sekiya, N. Terada, M. Suzuki, H. Tsumoto, S. Kawabata, S. Iwamoto, K. Shimizu, O. Ogawa, K. Tanaka. Discovery of novel urinary biomarker candidates for diagnosis of prostate cancer, 19th International Mass Spectrometry Conference 2012.

特許出願

- (1) Kenji Nakayama, Kazuharu Shimizu, Jun Utsumi, Takahiro Inoue, Osamu Ogawa. Urinary biomarkers for prostate cancer test, PCT/JP2013/059208.
- (2) 中山憲司, 清水一治, 内海潤, 井上貴博, 小川修. 前立腺がん検査用尿中バイオマーカー, 特願 2012-78963:WO2013146997.

参考文献

- [1] American Cancer Society. (2010) Cancer facts and Figures 2010, Atlanta: American Cancer Society.
- [2] がん情報サービス, 国立がん研究センターがん対策情報センター
URL: <http://ganjoho.jp/professional/index.html>
- [3] Wang MC, et al. (1979) Purification of a human prostate specific antigen. Invest Urol. 17:159-63.
- [4] Chou R, et al. (2011) Prostate cancer screening--the evidence, the recommendations, and the clinical implications. JAMA. 306:2721-2722.
- [5] De Kok JB, et al. (2002) DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res. 62:2695-2698.
- [6] Lee GL, et al. (2011) Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test. Nat Rev Urol. 8:123-124.
- [7] Norden AG, et al. (2004) Quantitative amino acid and proteomic analysis: very low excretion of polypeptides >750 Da in normal urine. Kidney Int. 66:1994-2003.

- [8] Adachi J, et al. (2006) The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* 7:R80.
- [9] Afkarian M, et al. (2010) Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics.* 9:2195-2204.
- [10] De Bock M, et al. (2010) Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOFMS. *J Biomed Biotechnol*, 2010:906082.
- [11] Theodorescu D, et al. (2008) Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2:556-570.
- [12] Okamoto A, et al. (2009) Protein profiling of post-prostatic massage urine specimens by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to discriminate between prostate cancer and benign lesions. *Oncol Rep.* 21:73-79.

§2-2-2 質量顕微鏡を用いた前立腺がんバイオマーカーの探索

【研究目的】

前立腺がんの診断および予後予測において PSA や Gleason score を補完する新規バイオマーカーが求められている。近年、がんの増殖や進展、分化と脂質代謝の変化の関連性が指摘されている[1-3]。特に、前立腺がん和脂質の関連は多く指摘されており、血清中の様々な脂肪酸値と前立腺がんのリスクが関連するという報告や[4,5]、ある種の極性脂質やコレステロールが前立腺がんの進展に関わるという報告がある[6-11]。

一方で、質量顕微鏡は組織の脂質分布を、位置情報を持ったまま網羅的に解析することが可能である[12]。しかし、早期の前立腺がんではがん部は間質に囲まれ、正常腺管と混在して存在するため、従来型のMSイメージングの解像度ではがん部と正常腺管、間質の正確な区別は困難であった。

そこで今回の我々は、高解像度質量顕微鏡を用いて前立腺がん組織の *in situ* 脂質分布を解析し、バイオマーカーとしての可能性を探索することを目的とした。

【研究方法】

京都大学附属病院にて2005年から2008年の間に、前立腺がんに対して前立腺全摘術を施行した症例のうち38例を対象とした。凍結保存された前立腺組織をクライオスタット(Leica)を用いて10 μm厚に薄切しindium-tin oxide-coated (ITO)ガラスに乗せサンプルを作成した。マトリックスは真空蒸着装置(サンヨー電子)を用いて9-aminoacridine hemihydrates (9-AA)を220°Cで8分間蒸着させた。

高解像度質量顕微鏡(島津製作所:図1)を用いて、負イオンモードで m/z 500-1,000 の範囲で質量分析を行った(分解能:10 μm)。同機種を用いてMS/MS分析も行った。

測定データはSIMtools software (in-house software;島津製作所)を用いて信号処理され、Biomap software (Novartis)を用いて画像化された。

前立腺組織で一般的に発現している分子の同定に際しては、SIMtools software を用いてピーク検出を行い、各症例で強度順に上位100ピークを選び、30/38例以上で上位100ピークに選ばれたピークを候補とし、マトリックスや同位体由来のピークを除外した。

統計学的に正常腺管部とがん部の信号強度を比較する際には、Mann-Whitney (M-W) U test を用い、 $p < 0.05$ で有意とした。



図1 高解像度質量顕微鏡

【結果と考察】

結果

高解像度質量顕微鏡を用いることで、前立腺がん部と正常腺管部の詳細な脂質分布の比較が可能となった(図2)。

今回我々は、38例に高解像度質量顕微鏡を用いた観測を行い、まずがん部および正常腺管を含む前立腺組織で一般的に発現している26分子を選んだ。次に、26分子のうちがん部で発現が有意に高い15分子および有意に低い1分子が同定された($p < 0.05$)。さらに、MS/MS解析により、それらの多くはホスファチジルイノシトール(PI)やホスファチジン酸(PA)と同定された。

考察

従来型の解像度の質量顕微鏡を用いて、前立腺がんのバイオマーカー候補を同定した報告はあるが[13-19]、低解像度のため前立腺がん部と正常腺管、間質の正確な区別は出来ておらず、高解像度質量顕微鏡を用いることで全く新しいバイオマーカー候補が同定できる可能性が示唆された。

本研究により前立腺がん部においては正常腺管部と比べて PI や PA の分布が異なると推測された。前立腺がん部において、リン脂質のうちホスファチジルコリン(PC)の分布ががん部と正常腺管部で異なるという報告はあるが[20]、PI や PA の分布が異なるという報告はまだない。PI は PI3K 経路の

基質となり[3,21]、PA は mTOR を直接活性化させることから[22]、PI や PA の分布の変化が細胞の成長や増殖のシグナルに影響を与え得ると言われている。今後、症例数を増やして検討する必要があるが、PI や PA の分布の変化は、前立腺がんの新規バイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

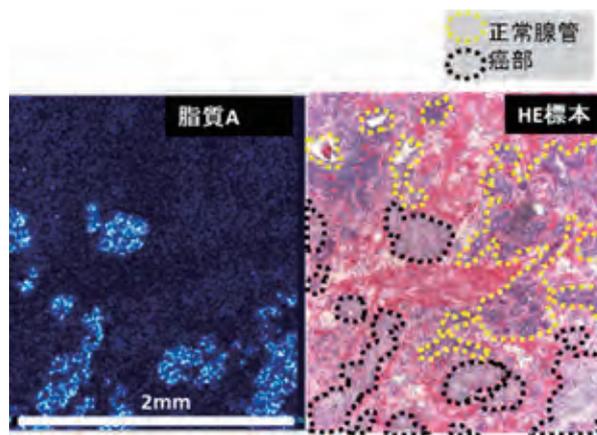


図 2 詳細な脂質分布

【まとめ】

高解像度質量顕微鏡を用いることで、前立腺がん部と正常腺管部の詳細な脂質分布の比較が可能となった。高解像度質量顕微鏡は前立腺がんの新規バイオマーカー探索に有用である可能性が示唆された。

【成果一覧】

論文発表

(1) The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer.

Takayuki Goto, Naoki Terada, Takahiro Inoue, Kenji Nakayama, Yoshiyuki Okada, Takeshi Yoshikawa, Yu Miyazaki, Masayuki Uegaki, Shinji Sumiyoshi, Takashi Kobayashi, Tomomi Kamba, Koji Yoshimura, Osamu Ogawa. Plos ONE (in press).

学会発表

(1) 後藤崇之、寺田直樹、井上貴博、中山憲司、宮崎 有、植垣正幸、吉川武志、小林恭、清水洋祐、神波大己、吉村耕治、小川修、「In situ lipid profiling of prostate cancer tissues using high resolution imaging mass spectrometry」、第 72 回日本癌学会学術総会(2013).

【参考文献】

- [1] Santos CR, Schulze A (2012) Lipid metabolism in cancer. FEBS J 279: 2610-2623.
- [2] Menendez JA, Lupu R (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer 7: 763-777.
- [3] Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296: 1655-1657.

- [4] Crowe FL, Allen NE, Appleby PN, Overvad K, Aardestrup IV, et al. (2008) Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 88: 1353-1363.
- [5] Freeman VL, Flanigan RC, Meydani M (2007) Prostatic fatty acids and cancer recurrence after radical prostatectomy for early-stage prostate cancer. *Cancer Causes Control* 18: 211-218.
- [6] Zeng Y, Kakehi Y, Nouh MA, Tsunemori H, Sugimoto M, et al. (2009) Gene expression profiles of lysophosphatidic acid-related molecules in the prostate: relevance to prostate cancer and benign hyperplasia. *Prostate* 69: 283-292.
- [7] Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- [8] Zhou X, Mao J, Ai J, Deng Y, Roth MR, et al. (2012) Identification of plasma lipid biomarkers for prostate cancer by lipidomics and bioinformatics. *PLoS One* 7: e48889.
- [9] Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR (2005) Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115: 959-968.
- [10] Xie Y, Gibbs TC, Mukhin YV, Meier KE (2002) Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277: 32516-32526.
- [11] Pchejetski D, Golzio M, Bonhoure E, Calvet C, Doumerc N, et al. (2005) Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res* 65: 11667-11675.
- [12] Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 69: 4751-4760.
- [13] Bonnel D, Longuespee R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, et al. (2011) Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal Bioanal Chem* 401: 149-165.
- [14] Cazares LH, Troyer D, Mendrinis S, Lance RA, Nyalwidhe JO, et al. (2009) Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue. *Clin Cancer Res* 15: 5541-5551.
- [15] Eberlin LS, Dill AL, Costa AB, Ifa DR, Cheng L, et al. (2010) Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 82: 3430-3434.
- [16] Pallua JD, Schaefer G, Seifarth C, Becker M, Meding S, et al. (2013) MALDI-MS tissue imaging identification of biliverdin reductase B overexpression in prostate cancer. *J Proteomics* 91C: 500-514.
- [17] Pirro V, Eberlin LS, Oliveri P, Cooks RG (2012) Interactive hyperspectral approach for exploring and interpreting DESI-MS images of cancerous and normal tissue sections. *Analyst* 137:

2374-2380.

- [18] Schwamborn K, Krieg RC, Reska M, Jakse G, Knuechel R, et al. (2007) Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. *Int J Mol Med* 20: 155-159.
- [19] Steurer S, Borkowski C, Odinga S, Buchholz M, Koop C, et al. (2013) MALDI mass spectrometric imaging based identification of clinically relevant signals in prostate cancer using large-scale tissue microarrays. *Int J Cancer* 133: 920-928.
- [20] Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, et al. (2010) De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* 70: 8117-8126.
- [21] van Meer G, de Kroon AI (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci* 124: 5-8.
- [22] Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294: 1942-1945.

§2-3 質量分析システムを用いた乳がんの研究

京都大学大学院 医学研究科 乳腺外科学

わが国で乳がんと診断される女性は、現在 1 年間に 5~6 万人と推定されており。生涯に乳がんを患う日本人女性はおよそ 15 人に 1 人で女性の部位別がん罹患率のトップとなっている。欧米諸国と比べると、わが国においては乳がんの罹患率・死亡率とも低い水準で推移しているが、いずれも年々増加傾向であり将来的に欧米諸国に迫ると予想されている。また、我が国では乳がんは 40 代から 60 代の現役世代の女性に多く発症する特徴があり、乳がんの予防、早期発見ならびに治療法の開発は社会的に無視できない重要な課題となっている。

乳がんは遺伝子の発現のパターンによって intrinsic subtype と呼ばれるいくつかのグループに分類されることが知られるようになり、近年では腫瘍の性質に応じた治療の個別化、最適化が行われるようになった。乳がんの生物学的特性に対する理解が進んだことで、早期に発見し適切な治療を受けることができれば完全に治癒できるケースが増えてきている。

HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) タンパク質を高発現する HER2 タイプの乳がんは、最も予後不良な一群として知られていたが、HER2 タンパク質およびそのシグナル伝達経路を標的とした標的治療薬が相次いで開発されたことで、その予後が大きく改善された。しかしながら、抗 HER2 療法に対して治療抵抗性を示すケースは少なからず存在し、治療抵抗性を示した場合の予後は著しく不良である。このため、治療抵抗性を予測し適切な薬剤の選択を可能にし、また、治療抵抗性を克服する新規治療法開発の糸口となる新たな指標の開発が望まれている。

また、intrinsic subtype とは別に、細胞のがん化やがんの増殖進展に関わる代謝経路に注目した診断法や治療法の開発が、新たな研究分野として注目を集めている。乳汁産生能を有する乳腺を発生母地とする乳がんは特に脂質代謝との関連が深く、乳がん組織で脂質合成酵素の発現亢進が生じていることが知られている。しかしながら、脂質など代謝産物はタンパク質などの酵素と異なり、組織中での分布を正確に分析できる技術が確立されていなかった。乳がん組織内で生じている脂質代謝の改変の結果として脂質が組織中のどのような分布を示すかを解析できれば、脂質を指標として乳がんの性質を推定し、乳がんの発生進展にとって真に重要な代謝過程を同定できる可能性がある。

以上を踏まえて、本研究では2つの研究を行った。1つ目は HER2 タンパク質に着目したもので、本プロジェクトで開発された高感度質量分析技術を用いることにより臨床検体由来の血中 HER2 の糖鎖構造の解析が可能であるか、また、高感度質量分析が臨床応用として有効であるかの検証を目的とした。2つ目は、近年開発された高解像度質量顕微鏡を用いて、乳がん組織中での脂質分布傾向を調べ、そのマーカーとしての意義を臨床病理学的所見との相関から検証することで新規のバイオマーカー候補の探索を目指した。

§2-3-1 HER2 糖鎖構造をマーカーとする病態診断

【研究目的】

乳がんは遺伝子の発現のパターンによって intrinsic subtype と呼ばれるいくつかのグループに分類され、近年では乳がんの生物学的特性に応じた治療の個別化、最適化が試みられるようになってきている。中でも全乳がん患者の約1~2割を占め、これまで最も予後不良であるとされていたHER2タンパク質を高発現する患者群の治療成績は、HER2タンパク質を特異的なターゲットとする抗体医薬品 trastuzumab (商品名ハーセプチン)の登場により大きく改善した。ハーセプチンの登場後も、HER2とそのシグナル経路を標的とした治療薬は次々と開発される一方で、これらの抗HER2療法に対し治療抵抗性を示すケースは依然と少なからず存在し、抗HER2療法のさらなる最適化、個別化を可能にする指標の開発が強く望まれている。

タンパク質への糖鎖修飾はタンパク質が生体内で機能するために重要な働きをしていることが知られており、糖鎖構造ががんなどの疾患のマーカーとなっている例も多数報告されている。HER2タンパク質の糖鎖修飾は上述のハーセプチン等の抗体依存性細胞障害活性などに影響を与えることで治療抵抗性に関与することが予想され、事実、本プロジェクトの初期の研究成果として、2種の異なるHER2陽性乳がん細胞株から精製したHER2タンパク質に糖鎖構造の違いが観察されたことなどから、HER2タンパク質の糖鎖修飾構造の違いが、抗HER2療法に対する耐性や予後を予測するための有用な指標となる可能性があると考えられた。HER2タンパク質は組織中に存在する他、血中にHER2細胞外領域(以下HER2-ECD)として存在することが知られているが、これまでにこれら患者検体由来のHER2糖鎖修飾構造に着目した臨床研究は報告されていなかった。

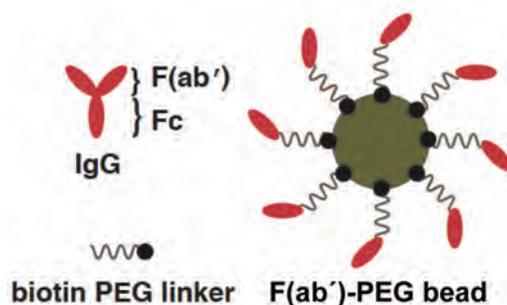
一方、従来の質量分析技術では血中に存在するHER2-ECDの量などの制約のため、糖鎖構造を解析する上で十分な感度が得られなかった。本プロジェクトで開発された高感度質量分析技術を用いることにより、臨床検体由来のHER2-ECDの糖鎖構造の解析が可能であるか、また、高感度質量分析が臨床応用として有効であるかを検証するため本研究を計画した。

【研究方法】

本研究のプロトコールは、京都大学医学部附属病院の医の倫理委員会にて研究内容の承認を受けた。糖鎖解析の測定に用いた血液は書面にて研究同意を得た患者より採取され、30分以内に遠心分離により血漿分画を分離した後、サンプル調製までは-80℃にて凍結保管された。

1. F(ab')ビーズの作製

HER2タンパク質の細胞外領域に対する抗HER2 IgG抗体の抗原-抗体結合に必要なF(ab')領域だけを酵素処理とカラム精製により回収した。精製したF(ab')は、マレイミド基を持つビオチン化PEGリンカーを介してストレプトアビジン磁性ビーズにクロスリンクにより固定化し、PEGリンカーを介したF(ab')磁性ビーズ(以下、F(ab')-PEGビーズと呼ぶ)を作製した。



2. 臨床サンプルからの HER2 タンパク質の回収及び HER2 糖鎖の解析

臨床血液検体からの効率的な HER2-ECD の回収の為に、市販のリコンビナント HER2-ECD (以下、rHER2-ECD) と血清及び血漿を用い予備的な検討を行った。rHER2-ECD を血清ならびに血漿に既知量スパイクしたサンプルから F(ab')-PEG ビーズによる免疫沈降 (以下、IP) を行った。IP 産物は電気泳動に供し、ゲルの染色や WB 法により回収効率やバックグラウンドの程度を評価した。IP 法は、フィルターによる夾雑物の除去、サンプルの希釈倍率や希釈溶液の検討、使用するビーズ量、ビーズの洗浄条件等を検討し最適化を行った。確立した IP 手法を用いて臨床サンプルより HER2-ECD を精製し、IP 産物は SDS-PAGE に供し、Sypro Ruby 染色を行った。HER2-ECD のバンドをゲルから切出し、ゲルを洗浄して還元アルキル化を行った。PNGaseF 処理によりゲル中の HER2 タンパク質から糖鎖を切り出して抽出し精製を行った。精製した糖鎖は 3-AQ ラベル化法に基づいて MS 測定用のサンプル調製を行った。なお、一般に糖鎖に結合しているシアル酸は、MS 測定の際に容易に部分的な脱離が生じ易くマススペクトルが複雑化してしまうことから、精製の前に脱シアル酸処理を行った。測定には本プロジェクトで開発された次世代質量分析装置 DIT-FP 機を使用した。

【結果と考察】

1. F(ab')-PEG ビーズの作製

血液などの臨床サンプル内では、アルブミン、グロブリンなどが 1 mL 辺り数十 mg もの単位で存在しているのに対して、HER2 細胞外領域が切り出された HER2-ECD タンパク質の量はその百万分の一程度 (数十 ng 程度) であることから HER2-ECD タンパク質の回収をより効率的に行う必要がある。そこで、臨床サンプルからの HER2 の精製には特異性の高い抗原-抗体反応を用いた IP 法を用いた。一般的な IP 法では Fc 領域に対する親和性を利用して抗体を protein A や protein G セファロース等のビーズに固相化したものを用いるが、血液サンプルで protein A/G ビーズを使用してしまうと内在性のイムノグロブリンもビーズ

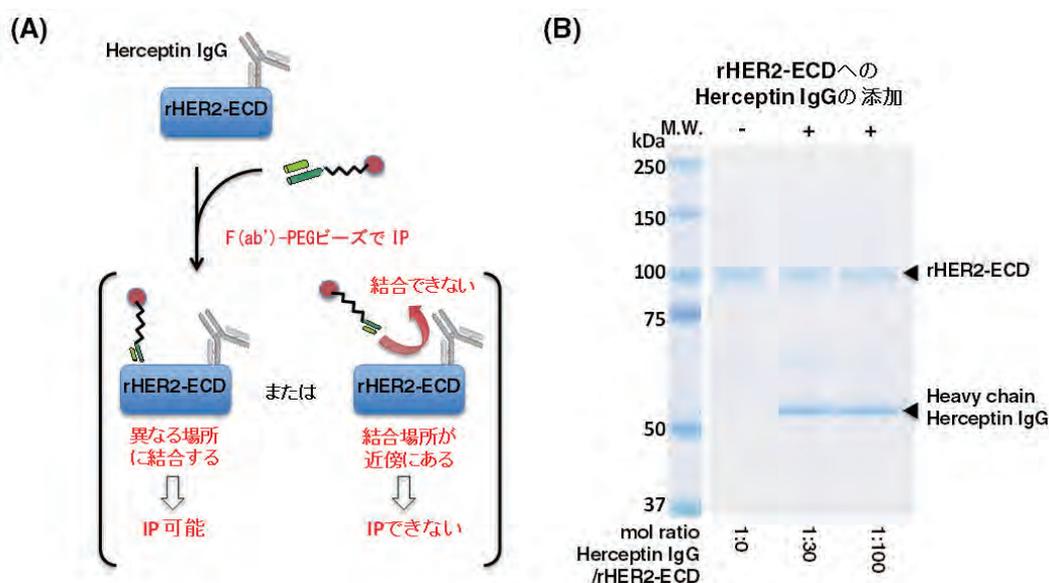


図2 F(ab')-PEGビーズを用いたrHER2-ECDのIP実験

rHER2-ECDとハーセプチンを結合させて、N24抗体F(ab')ビーズでIPを行なった。

(A)実験の模式図、(B) IP産物のゲル電気泳動の結果から、ハーセプチンが結合している場合でも、rHER2-ECD単独の場合と同様にIPが可能であることが分かった。

に結合してしまい、精製サンプルに混入することが考えられる。また、抗体は Fc 領域に糖鎖構造を持ち、内在性のイムグロブリンのみならず精製に利用した抗体由来の糖鎖も混入する可能性も考えられる。そこで、抗原認識部位である F(ab')領域だけを酵素的に切出し精製したものをリンカーを介して磁性ビーズに固定した F(ab')-PEG ビーズを作製することで、これらの問題を回避した。使用する抗体は、市販の HER2-ECD に対する抗体を数種検討し、IP の効率と入手性からマウスモノクローナル IgG 抗体(以下、N24 抗体)を選別した。また、HER2 陽性乳がん患者ではハーセプチンが処方されることもあり、投与したハーセプチンが血液中の HER2-ECD タンパク質へ結合し立体障害等により F(ab')-PEG ビーズの結合を阻害する可能性が考えられる(図 2A)。そこで、作製した F(ab')-PEG ビーズによる HER2-ECD の回収がハーセプチンの投与により阻害を受けないことも確認した(図 2B)。

2. 臨床サンプルからの HER2 タンパク質の回収及び HER2 糖鎖の解析

市販血清・血漿を用いた予備検討で、精製後のゲル電気泳動像を比較したところ血漿サンプルの方が夾雑タンパク質の量が少なく、より純度よく HER2-ECD タンパク質を回収できることが分かり、解析には基本的に血漿サンプルを用いることにした。IP 法を最適化することで血漿中の HER2-ECD のおよそ 6~8割を回収する手法を確立した。スパイクサンプルを用いて糖鎖解析を実施したところ、1ml 辺り 10~20 ng 程度といった非常に微量な HER2-ECD 量であっても糖鎖の検出が可能であった。図 3 に臨床サンプルからの回収例を示す。

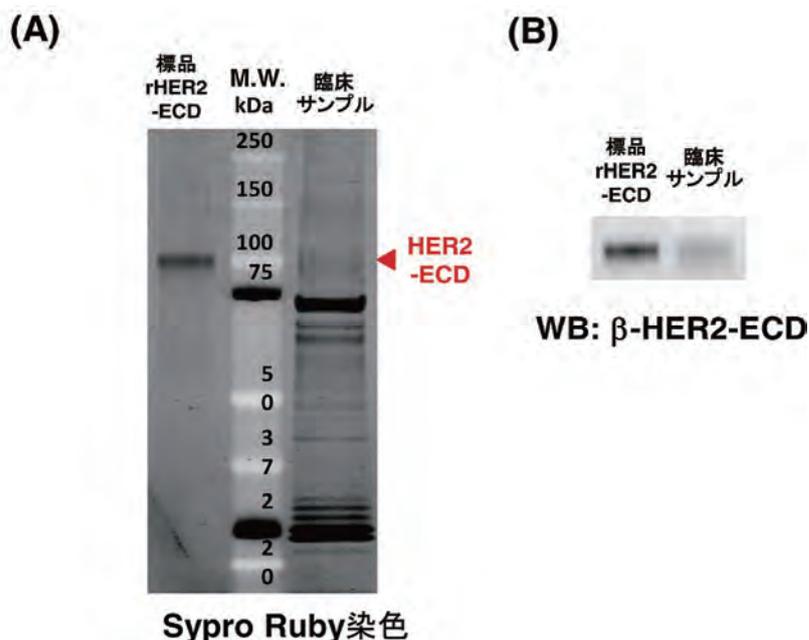
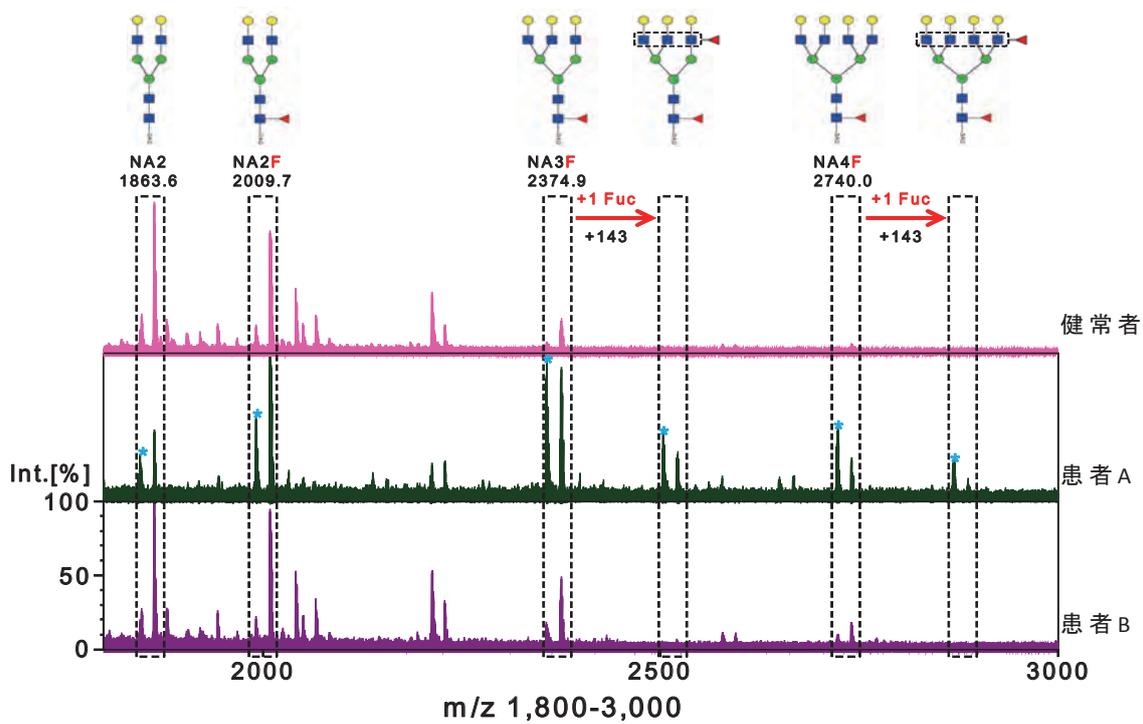


図3. F(ab')-PEGビーズによる臨床サンプルからのHER2-ECDの回収

血中のHER2-ECD値が高い検体のIP後の電気泳動の結果を示す。ゲルはSyproRubyで染色し、Typhoon 9410 イメージスキャナで検出した。(B) IP産物の一部でWBを行いHER2-ECDの確認も行った。

臨床サンプル由来の HER2 の糖鎖解析を、非担がん患者由来の血漿 5 検体と臨床検査にて HER2-ECD が検出された HER2 陽性乳がん患者由来の血漿 2 検体を用いて実施した。図 4 に、非担がん患者 1 名と HER2 陽性乳がん患者 2 名の DIT-FP 機を用いたイオントラップモード(負イオン)で測定したマススペクトルを示す。

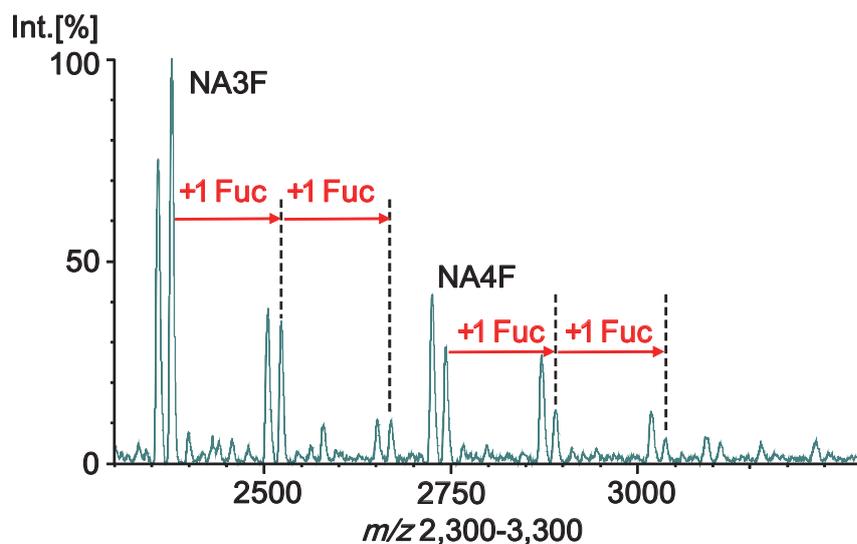


I-TOF モード (負イオン)

図4 臨床サンプル由来HER2-ECDの3AQラベル化糖鎖測定

糖鎖の m/z による推定構造を併記する。糖鎖の根元にフコースを持つコアフコース構造の糖鎖が主に検出された。患者AのNA2F、NA3FならびにNA4FはMS/MS解析によりコアフコース構造を持つ糖鎖であることを確認している。なお*は水が脱離したピークになる。

健康者と比較して、がん患者では高分岐構造を持った糖鎖(3分岐以上)の割合が増加している傾向がみられた。また、患者Aではコアフコース構造を持つ糖鎖にさらにフコースが付加した高フコースの糖鎖の割合が顕著に亢進していることが分かった(図5)。



P-LTOF モード (負イオン)

図5 高フコース構造の検出

実際に臨床検体での HER2-ECD 糖鎖の解析が可能であることが確認できたことから、検体数を増やし測定を行った。患者 A を加えた HER2 陽性乳がん患者 5 例のスペクトルを図 6 に例示する。

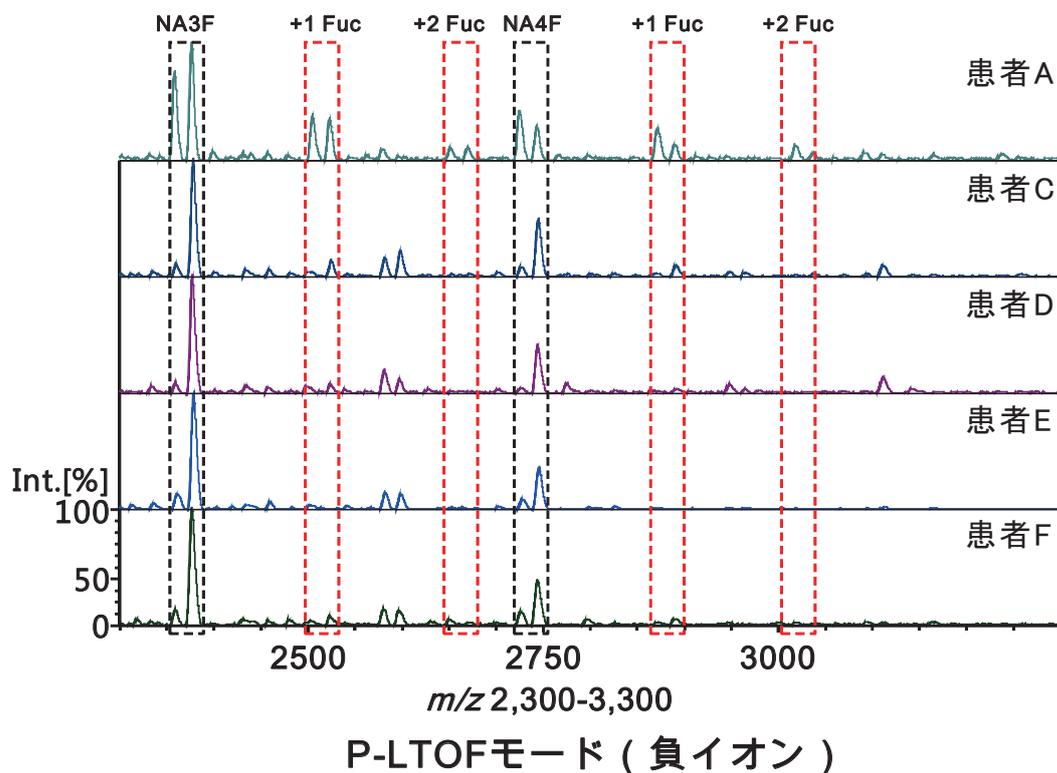


図6 臨床サンプル由来HER2-ECDの糖鎖マススペクトル

追加で測定した乳がん患者検体(患者 C~F)においては、高フコース構造をもつ糖鎖に相当する m/z を顕著に持つものは見られなかった。がんにおいてフコース転移酵素の発現が亢進することが知られており、膵臓がんでは血中の α フェトプロテインのフコース化を指標とするバイオマーカーが利用されている。高フコースが見られた患者 A は他検体と異なり抗 HER2 療法に抵抗性を示す進行再発症例であった。このような背景の患者において特徴的な糖鎖パターンが検出されたことは初期の予想と相違ない結果であると考えられた。

【まとめ】

効率的な IP 法の実施のために F(ab')-PEG ビーズを作製し、血漿 1.5 mL から微量 (15 ng/mL 程度) 濃度の HER2-ECD の精製法を確立し、3-AQ ラベル化法を用い MALDI 質量分析装置による HER2 糖鎖解析に成功した。我々の知る限り臨床検体より HER2-ECD の糖鎖を測定した例は世界で初めてであり、本プロジェクトで開発された高感度質量分析技術の有用性を示すものと考えられる。今回は、HER2-ECD の糖鎖測定を第一の目的としたため症例数の関係もあり、予後や薬剤感受性との関連を調べるまでには至らなかった。また、検体の入手性や今後の適応範囲の拡大の容易性から血液検体での解析を行ったが、腫瘍組織由来の HER2 タンパク質の解析を行い、血液検体と合わせた解析も重要であると考えている。今後、検体数を増やし、予後や薬剤感受性との関連を調べ臨床マーカー候補の同定を目指す。

【成果一覧】

論文発表

(1) Rapid Quantitative Profiling of N-Glycan by the Glycan-Labeling Method Using

3-Aminoquinoline/ α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid, *Analytical Chemistry*, 2012, Vol. 84 No.14, pp7146-7151

Kaoru Kaneshiro, Makoto Watanabe, Kazuya Terasawa, Niromasa Uchimura, Yuko Fukuyama, Shinichi Iwamoto, Taka-Aki Sato, Kazuharu Shimizu, Gozoh Tsujimoto, Koichi Tanaka

(2) Improvement of mass spectrometry analysis of glycoproteins by MALDI-MS using

3-aminoquinoline/ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, Vol. 405 No. 12, pp4289-4293

Makoto Watanabe, Kazuya Terasawa, Kaoru Kaneshiro, Hiromasa Uchimura, Rie Yamamoto, Yuko Fukuyama, Kazuharu Shimizu, Taka-Aki Sato, Koichi Tanaka,

学会発表

(1) 寺澤和哉、内村浩正、金城薫、渡辺真、福山裕子、清水一治、辻本豪三、佐藤孝明、田中耕一、MALDI 質量分析を用いた HER2 における N 型糖鎖付加割合の推定、第 59 回質量分析総合討論会 (2011).

(2) 寺澤和哉、内村浩正、金城薫、渡辺真、福山裕子、清水一治、辻本豪三、佐藤孝明、田中耕一、MALDI 質量分析を用いた HER2 における N 型糖鎖付加割合の推定、第 34 回日本分子生物学会 (2011).

§2-3-2 質量顕微鏡を用いた乳がんバイオマーカーの探索

【研究目的】

乳がんの罹患率は、本邦において増加の一途をたどっている[1]。乳がんの発症には、遺伝的な要因に加えてライフスタイル(食事や運動、肥満など)といった環境要因が発症に寄与していることが、疫学的事実として知られている[2]。多くの乳がん組織では、脂質代謝関連酵素の発現変動や脂質の組成変化が観察され、また、そのいくつかは乳がんの組織学的悪性度や患者予後と相関することから、乳がんにおける脂質代謝は新たな乳がんの研究領域として近年注目を集めている[3,4]。しかしながら、脂質分子のヒト乳がん組織内での挙動や分布、また、数ある脂質分子の中でどの分子が乳がんの発生進展にとって重要であるかは、脂質が持つ多様性や測定手法の限界からこれまで不明であった。哺乳動物の細胞を構成する主要なリン脂質の一つに Phosphatidylinositol(以下;PI と記載)がある。PI の多くは細胞膜中に存在し膜構造の維持に関わるだけでなく、様々な細胞内伝達経路の活性化に関わっている。乳がん組織においては、PI の組織中での存在量の増加と、PI のイノシール基のリン酸化に始まる PI3-Kinase 経路の活性化がしばしば観察され、同経路は新たな乳がんの治療標的として臨床応用されつつある[4-6]。しかし、PI も他の多くのリン脂質と同様、乳がん組織内でどのように分布し、乳がんの臨床像とどのような相関を示すかは不明である。このような背景から、我々は高解像度質量顕微鏡を用いて PI の乳がん組織内での分布傾向を明らかにし、そのマーカーとしての意義を臨床病理学的所見との相関から検証することを目的として本研究を計画した。

【研究方法】

本研究のプロトコールは、京都大学医学部附属病院の医の倫理委員会にて研究内容の承認を受けた。質量顕微鏡の測定に用いた検体は書面にて研究同意を得た患者より採取され、測定解析までは -80°C にて凍結保管された。また組織染色などの用途には、ホルマリン固定パラフィン包埋標本が別に作成・保管された。

1. ヒト乳がん組織における高解像度質量顕微鏡を用いた PI 測定系の確立

質量顕微鏡(島津製作所)による PI の測定にあたって下記の点をそれぞれ検討し、最適な測定系の確立を行った。マトリックスの蒸着には真空蒸着装置(サンヨー電子)を用いた。

- ・ 最適なサンプル前処置法の検討
- ・ 測定の実験条件(測定間隔)の確認
- ・ 標的 PI の分子同定

2. ヒト乳がん組織における PI の分布パターンと病理組織像との相関解析

1.で確立された測定系を用いて非担がん症例を1例含む全10症例、計13病変(浸潤がん;9病変、非浸潤がん;1病変、過形成性病変;1病変、正常乳管;2病変)での PI の分布傾向を質量顕微鏡にて測定、解析した。また、その分布傾向と HE 染色や免疫染色等により得られる病理組織像との相関を検討した。

3. ヒト乳がん組織における PI の分布パターンと患者背景との相関解析

2.にて明らかになった PI の分布傾向の特徴と患者背景(年齢、病期、閉経状態など)との相関を検証した。

【結果】

1. 測定系の確立と組織中の PI の分子同定

乳がん組織中の PI の検出には、マトリックスに 9-aminoacridine を用いた真空蒸着法が最適であることを確認した。同一の乳がん組織検体を用いて連続切片を作成。切片毎に前処置を行い、組織学的に相同とみなされる領域をそれぞれの切片で測定。検出されるピークの相対強度の再現性が良好であることを確認した(図1)。さらに、脂肪酸組成が異なる 10 種類の PI を MALDI MS/MS 分析により同定し、目的とする PI が同方法にて効果的に検出可能なことを確認した。

2. a) 乳がん組織内での PI の分布傾向の把握

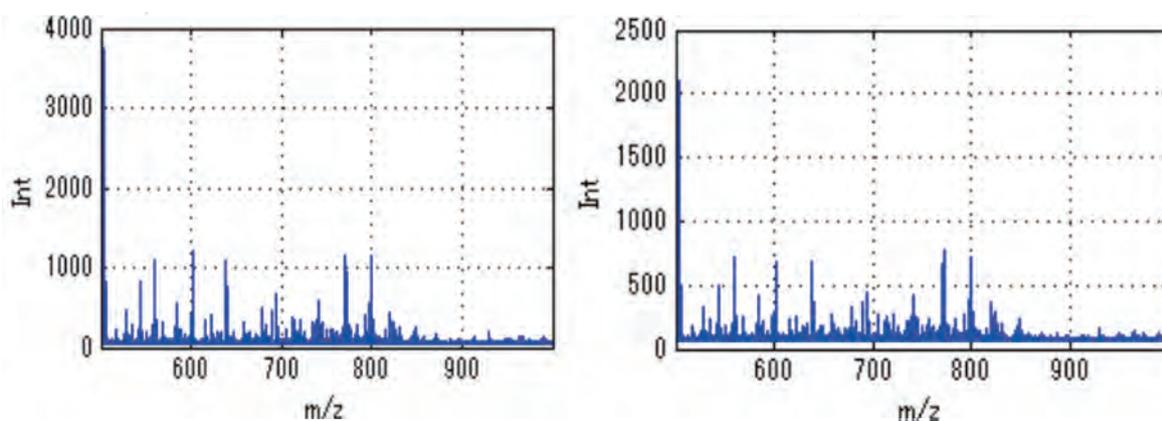


図1 乳がんの連続切片を用いたスペクトルの測定間誤差の確認

連続切片上の同一部位を測定し、良好なスペクトルの再現性を示した。

病理組織像との対比により、検出された 10 種類の PI の中でがん細胞領域においては、がん細胞以外の領域で高い割合を示す PI(18:0/20:4)の割合が有意に減少し、他の分子種、主に PI(18:0/18:1)と PI(18:0/20:3)の割合が増加していることが確認された(図 2)。症例間で同分子の空間分布のパターンを比較検討したところ、同二分子はがん細胞に特異的な局在を示し、乳がん症例はこれら二分子の存在比によって二群に分類されることがわかった(図 3a)。すなわち、がん細胞領域で PI(18:0/18:1)が優位に存在する群(G1)と PI(18:0/20:3)が優位に存在する群(G2)の二群に分類された(図 3a)。一方、がん細胞以外の領域で PI 組成の大部分を占める PI(18:0/20:4)は、G1 群では間質領域に顕著な局在を示し、G2 群ではがん細胞と間質に広く分布しがん細胞特異的な局在を示さないことがわかった(図 3b)。

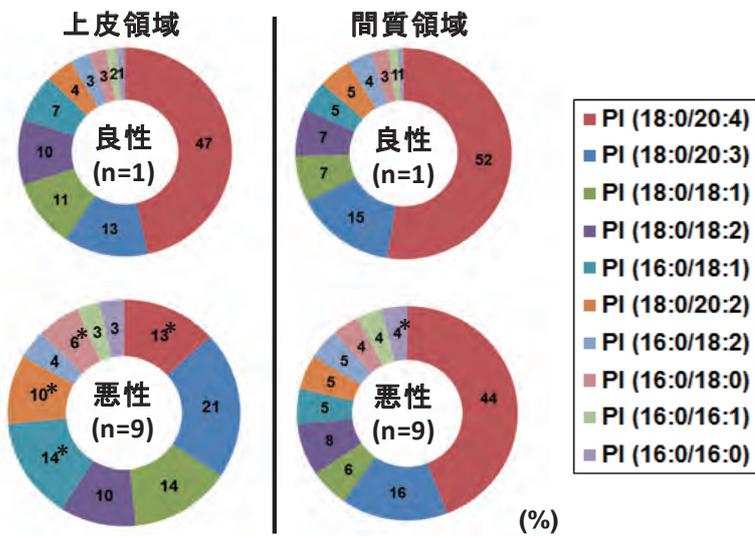


図2 各領域のPIの構成比を表す円グラフ

がん細胞の領域（左下）ではPI(18:0/20:4)の組成比が有意に減少し、その他のPIの比率が増加している。がん組織においてもがん細胞を含まない間質領域では変化はみられない。（*良性病変に対する有意な変化を示す；p<0.05）

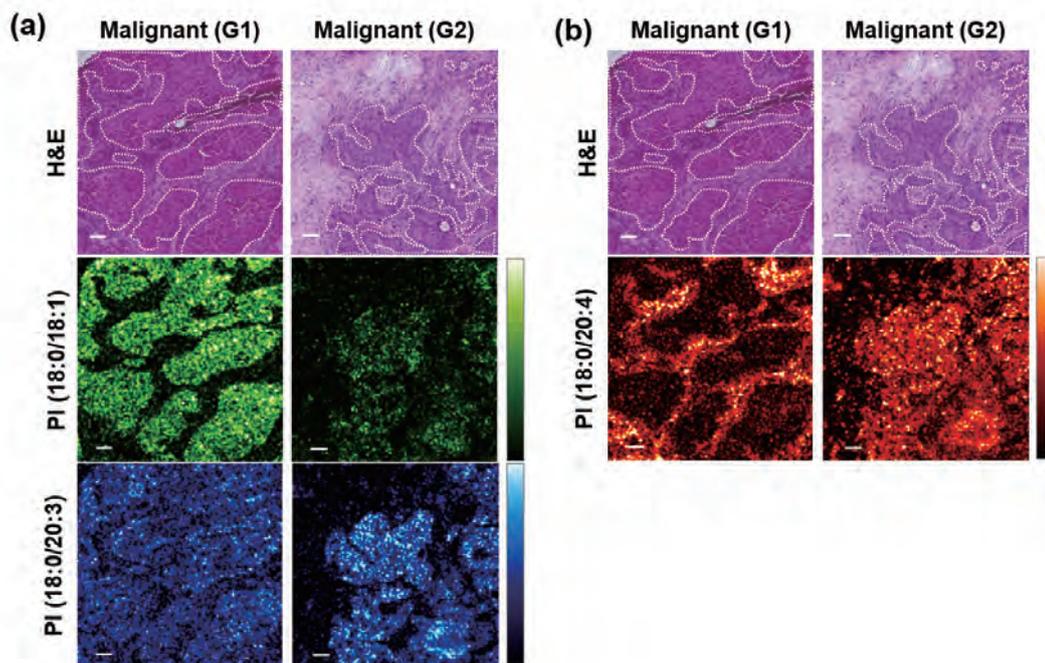


図3 PIの分布パターンの症例間比較

- (a) G1群ではPI(18:0/18:1)が、G2群ではPI(18:0/20:3)ががん細胞特異的な局在を示す。
 (b) PI(18:0/20:4)はがん細胞特異的な局在を示さず、G1群ではむしろ間質に強い局在を示した。
 （図中の点線ががん細胞集塊と間質の境界）

b) 質量顕微鏡によるがん細胞塊中のPIの分布特性の解析

顕微 imaging によりがん細胞集塊中でのPI(18:0/18:1)とPI(18:0/20:3)の分布傾向を観察したところ、これら2分子はお互いに相補的な空間分布を示し、かつ、PI(18:0/20:3)はPI(18:0/18:1)に対してより間質に

近い領域に集積する傾向が認められた(図4)。

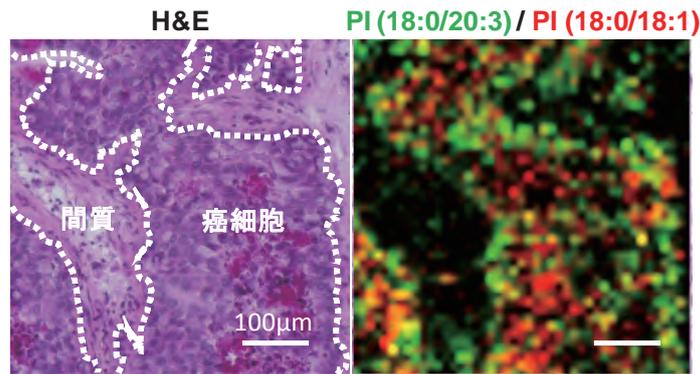


図4 がん細胞が間質と接する領域にPI(18:0/20:3)のシグナル(緑)が偏在することを示す図

PI(18:0/18:1)のシグナル(赤)と重なり合わず、これらが空間的に相補的な分布を示していることもわかる。図中の点線ががん細胞と間質の境界。

また、同一切片上に存在する正常乳管、過形成、非浸潤がん、浸潤がんの領域それぞれにおいて、PI(18:0/18:1)とPI(18:0/20:3)の信号強度を測定領域に存在する細胞数で補正した形で算出。それらとがんの発育進展状態との相関を検討したところ、非浸潤がんと浸潤がんの間でPI(18:0/20:3)の有意かつ顕著な上昇を認めた(図5)。

これらの所見からがん細胞の間質方向への浸潤とPI(18:0/20:3)の増加との関連が推察された。

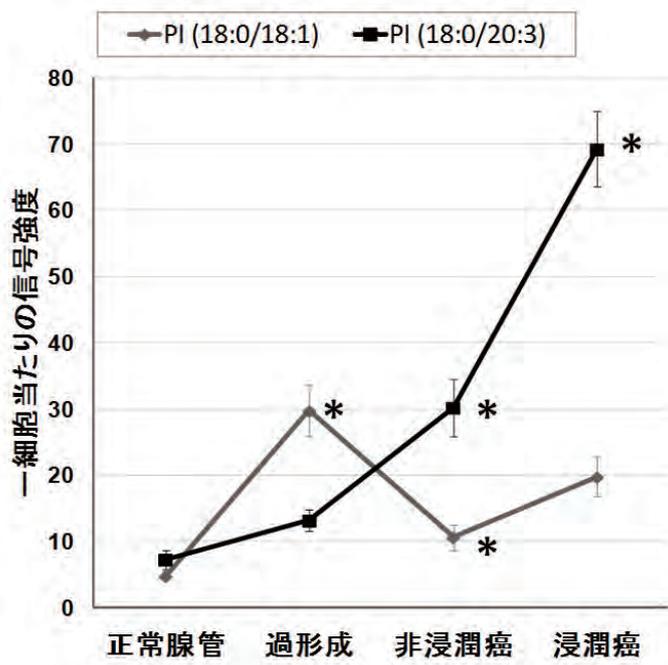


図5 同一切片上の進行段階に異なる領域でのPIのシグナル強度の変化

非浸潤がんと浸潤がんの間でPI(18:0/20:3)の信号強度の有意かつ顕著な上昇がみられる。

(*前段階に対する有意な変化を示す; p<0.05)

3. PI の比率とリンパ節転移との相関

2. で同定された、がん細胞領域における PI(18:0/18:1)と PI(18:0/20:3)の比率で定義される G1 群および G2 群と、患者背景(年齢、病期、組織学的悪性度など)との相関を検討した。結果、PI(18:0/20:3)の割合が高い G2 群において、高い比率(4 症例中 3 例)でリンパ節転移を認めた(図 6)。本検討では症例数の少なさから有意差を得るには至らなかったが($p = 0.07$)、その後の追加解析の結果で有意差をもった相関を確認している(データ省略)。2. での観察結果とあわせてがん細胞における PI(18:0/20:3)比の増加はがんの浸潤/転移と関連する可能性があることが示唆された。

【まとめと考察】

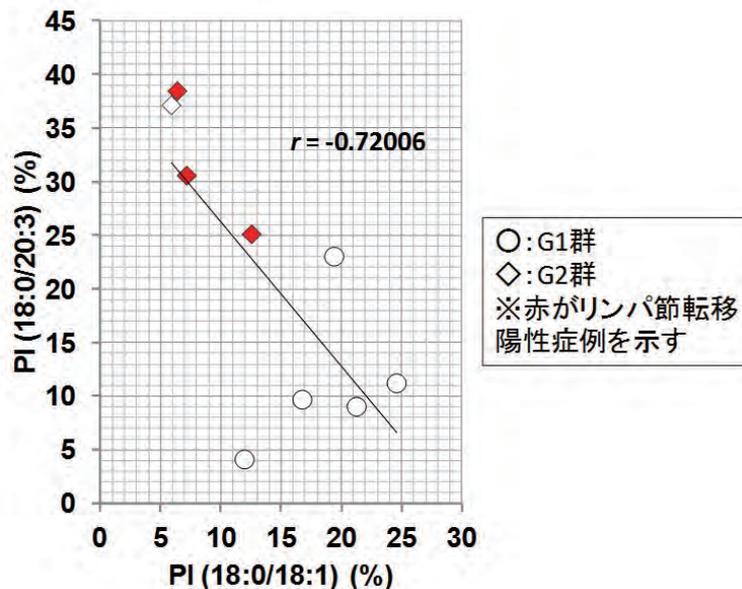


図6 各症例のがん細胞集塊におけるPI(18:0/20:3)およびPI(18:0/18:1)の比率

PI(18:0/20:3)優位であるG2群において、リンパ節転移を高率に認めた。

本研究では、乳がん細胞中では正常の組織や周囲間質と比し、PI の脂肪酸組成が変動していることが初めて明らかになった。さらに、乳がん細胞中の PI(18:0/18:1)に対する PI(18:0/20:3)の比率の増加が浸潤やリンパ節転移といった現象と相関を示す可能性を初めて指摘した。PI(18:0/18:1)が優位のがん細胞領域では PI(18:0/20:4)信号が著しく減少しているのに対し、PI(18:0/20:3)が優位のがん細胞領域では PI(18:0/20:4)の信号の減弱は見られない。これは、PI(18:0/20:3)が優位のがん細胞領域において多価不飽和脂肪酸を持つ PI が増加していることを意味する。脂肪酸組成中の不飽和度の増加は、詳細な機序は未だ不明であるが、細胞膜の流動性を増加させ、また、下流の PI3-Kinase 経路の活性に影響を与えることが知られている[7,8]。これらの観点から考察し、我々は今回同定された乳がん細胞特異的な PI の組成変化が、がんの転移や浸潤状態を予測するマーカーとして、または、PI3-Kinase 経路を標的にした治療の効果予測のマーカーといった分野で発展、応用される可能性が期待できると考えている。また、結果中には示していないが、我々は免疫組織学的検討により、PI の脂肪酸組成の変化に関わると考えられる脂質代謝関連酵素の発現分布とPIの組織内分布に一部相関が認められることを確認している(図7)。しかしながら、これら脂質関連酵素の発現のみに注目した解析では患者背景や病理学的な因子との有意な相関は確認できなかった(データ省略)。これは、脂質代謝が複数の酵素により制御される多段階的な反応であり、かつ、細胞外からの脂質の取り込みといった外的要因の影響を受けうる複雑な系であるため、がん細胞における代謝状態や表現型をより正確に把握するには、代謝産物である脂質そのものを観察することが有用

であることを示唆する重要な所見であると考えている。

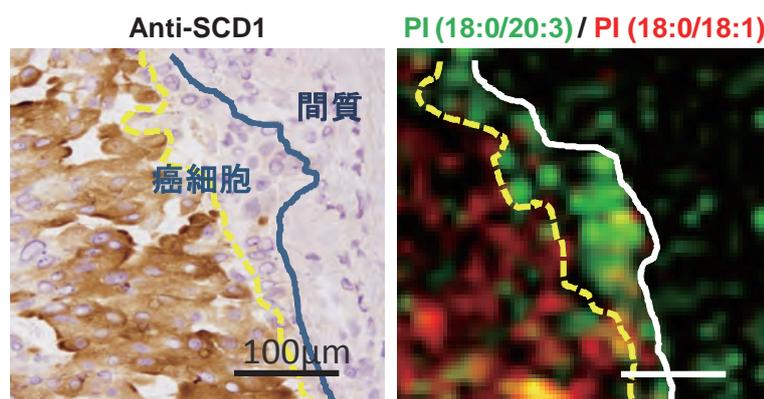


図7 脂質合成酵素の1つSCD1の局在とPI(18:0/18:1)の局在の一致

実験（左図では青、右図では白）ががん細胞集塊と間質の境界。この例では、同じがん細胞中であっても、PI(18:0/20:3)が局在する部位にはSCD1の発現は認められないことがわかる。

本成果を得るにあたっては、高い空間解像度を保った分析を可能にする適切な前処置法の確立、従来困難と考えられていた高解像度質量顕微鏡における分子同定を可能にするイオン化法の確立、さらに、取得される大規模なデータを処理する解析法の確立といった技術的な貢献が果たした役割が大きかったと考えられる。

本研究は少数例での検討であったが、今後はさらに例数を増やして検討し、得られた知見の有用性を確認し発展させる必要があると考えている。また、今回マーカー候補として同定された PI をより侵襲性が低く汎用性の高い手段で同定できる技術を並行して開発することも重要で考えている。

【成果一覧】

論文発表

(1) High-resolution imaging mass spectrometry reveals detailed spatial distribution of phosphatidylinositols in human breast cancer.

Kawashima M, Iwamoto N, Kawaguchi-Sakita N, Sugimoto M, Ueno T, Mikami Y, Terasawa K, Sato TA, Tanaka K, Shimizu K and Toi M. *Cancer Sci.* 2013; 104(10):1372-9.

学会発表

(1) 顕微質量分析による乳癌組織に存在する脂質分子のイメージング解析

川島雅央、川口展子、上野貴之、深尾典子、佐藤孝明、田中耕一、寺澤和哉、辻本豪三、清水一治、戸井雅和、第16回日本がん分子標的治療学会学術集会(2012).

(2) Molecular detection of breast cancer-related phosphatidylinositol by high-resolution imaging mass spectrometry

Kawashima M, Fukao N, Suzuki M, Sato TA, Tanaka K, Kawaguchi-Sakita N, Sugimoto M, Ueno T, Terasawa K, Tsujimoto G, Shimizu K and Toi M. 19th International mass spectrometry

conference(2012).

- (3) High resolution imaging mass spectrometry reveals the breast cancer cell-related profiles of phosphatidylinositol unsaturation

Kawashima M, Iwamoto N, Kawaguchi-Sakita N, Sugimoto M, Ueno T, Terasawa K, Sato TA, Tanaka K, Shimizu K, Toi M. American Association of Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013.

報道発表等

- (1) 2013年8月21日 京都大学 報道発表

乳がん組織中のがん細胞を脂質の違いで見分けることに成功 –次世代質量分析の乳がん研究への応用に期待–

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130821_1.htm

朝日新聞(8月22日 30面)、京都新聞(8月22日 24面)、産経新聞(8月22日 26面)、日刊工業新聞(8月22日 22面)および日本経済新聞(8月22日 34面)に掲載。

参考文献

- [1] 国立がんセンターがん対策情報センター

<http://ganjoho.jp/professional/statistics/index.html>

- [2] 科学的根拠に基づく 乳癌診療ガイドライン 2013年版. 金原出版.

- [3] Schulze A, Harris AL. Nature. 2012; 491(7424): 364-73.

- [4] Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, et al. Cancer Res. 2011; 71(9):3236-45.

- [5] Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. J Clin Oncol. 2011; 29(33):4452-61.

- [6] The Cancer Genome Atlas Network. Nature. 2012; 490(7418):61-70.

- [7] Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, et al. Biophys J. 2000; 79(1):328-39.

- [8] Lee HC, Kubo T, Kono N, et al. Genes Cells. 2012; 17(9):748-57.

§2-4 質量分析システムを用いたアルツハイマー病の研究

国立長寿医療研究センター

アルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)は、我が国では患者数が200万人を超え、高齢者人口の増加に伴い、今後さらにその数は増加すると推測され、医学・医療の枠を超えた大きな社会経済的・心理的負担となっている。アルツハイマー病発症の物質的基盤はアミロイドというタンパク質の異常な重合体であり、最近の研究によれば、その蓄積は臨床症状の出現よりも10年ないしは20年先行しているといわれている(図1)。

この疾病の病状を診るため、現在はいくつかの診断法が試みられている。一例としてPET-CTがあるが、それに必要な画像化試薬(プローブ)の費用だけでも1検診に10万円以上が必要となっている。また、確立した診断法と考えられている脊髄液中アミロイドベータ量測定は、エキスパートによる脊髄液採取に頼らなければならない。広く中高年の国民を対象に、認知症発症前にアミロイドの脳内蓄積を採血等によるより低侵襲・簡便な方法で正確に検出し、予防的介入を実施する先制医療の確立は喫緊の国家的課題である。

本研究では、以下の2つの目標を掲げた。1つ目は、アルツハイマー病先制医療への貢献をめざし、試料採取が安全かつ簡便な血液を対象に、アミロイドの脳内蓄積を捕捉しうる画期的なバイオマーカーを開発することである。

2つ目は、ADの神経細胞死に直結するとされるタウ凝集体を標的にした薬剤の開発が進められているなかで、脳内のタウ蛋白凝集体の診断及びその凝集抑制剤の創生に有用なタウ凝集体分子イメージング用PETプローブ開発の基礎となる独自の高速スクリーニング装置を開発することである。

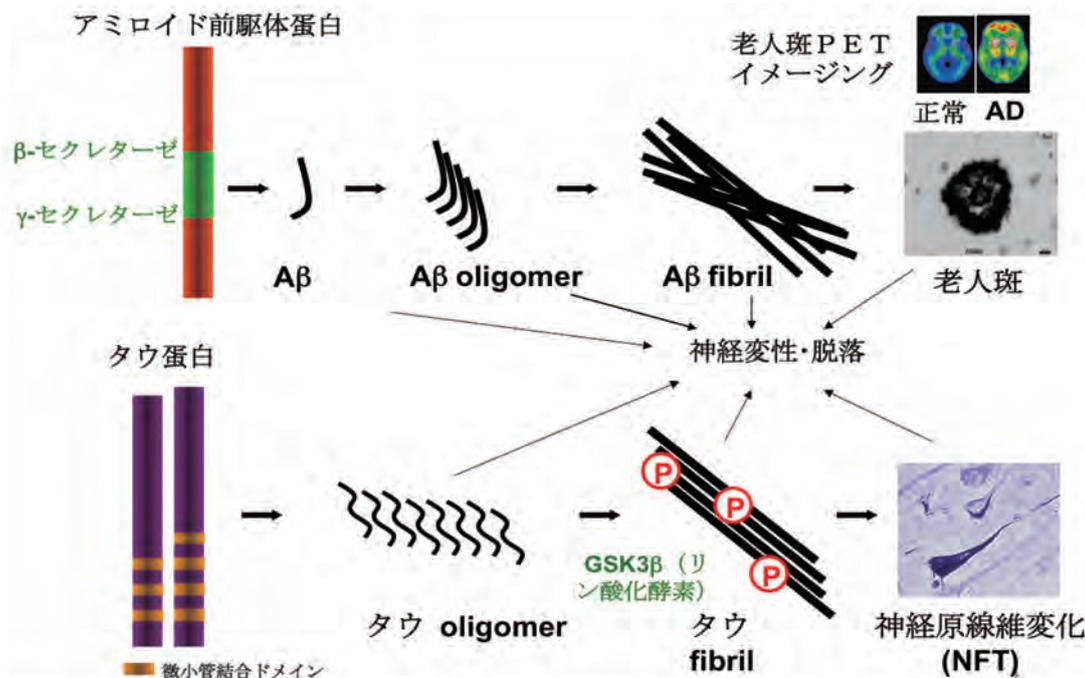


図1 アルツハイマー病における老人斑とタウ凝集体蓄積

§2-4-1 血漿中アルツハイマー病バイオマーカーの探索

【研究目的】

アミロイドベータ(A β)はアミロイド前駆体タンパク質(APP)から切り出されたものであるが、切り出され方の違う、いくつかの異形(A β バリエーション)の存在が知られている(図2)。これらの中にはアルツハイマー病の早期診断につながるバイオマーカーが含まれている可能性があり、血液(血漿)中から検出できれば簡便な検査法となり得る。ただし、これまでの方法では数種しか検出されておらず、かつ、アルツハイマー病との相関が確認できていない。それら以外のA β バリエーションは血中濃度が低いため確認できていないと考えられた。

島津製作所・田中最先端研究所で開発されたHetero F(ab')-PEG ビーズ法は、高感度化に有効であることが既に確認されており、これを用いて市販血漿を対象にA β バリエーションの探索を試みた(図3)。

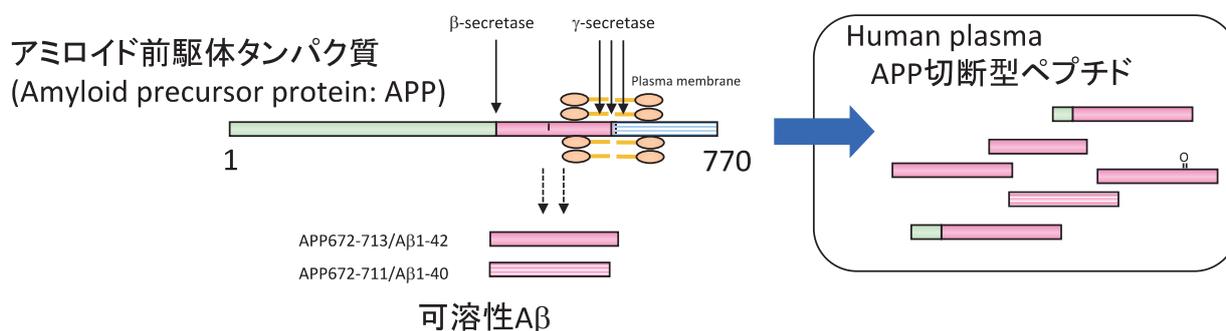


図2 アミロイドベータ(A β)の生成機構

A β はアミロイド前駆体タンパク質(APP)が β -セクレターゼなどの酵素によって切断されて生成する。この時に γ -セクレターゼの切断部位が複数あることから、種々のペプチドが生成し、可溶性のものは血中に移行する。また、一旦生成したA β は他の酵素によって更に切断されて様々なAPP切断型ペプチドとなる。

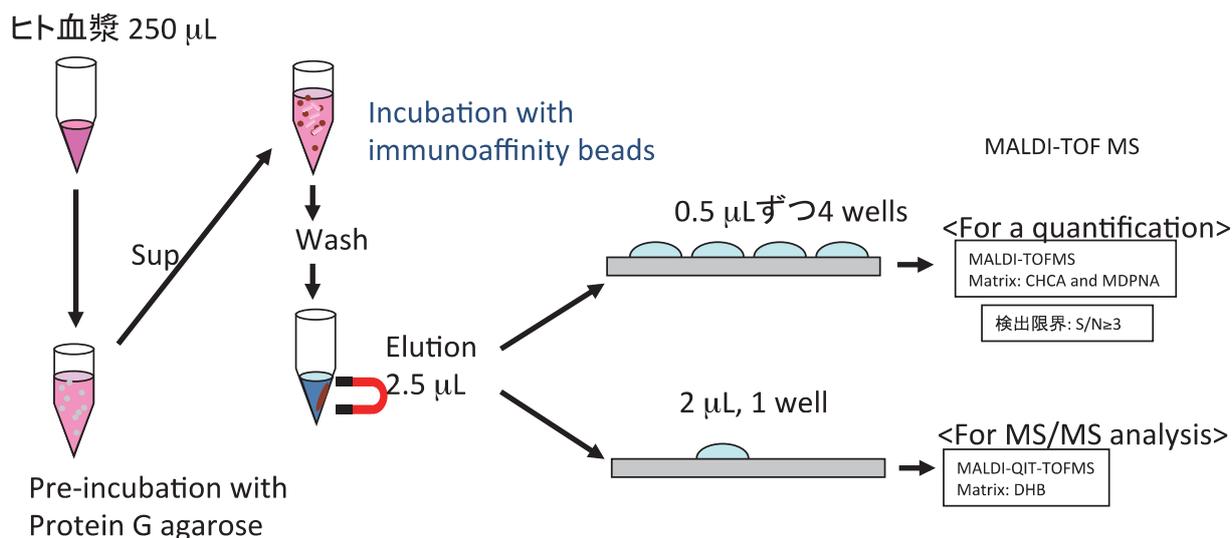


図3 血漿試料からのA β フィッシング方法

ヒト血漿250 μ LをプロテインGアガロースとインキュベーションしてIgMを除去し、A β の抗体である4G8及び6E10のF(ab)から構成されたHetero F(ab')-PEGビーズで免疫沈降した。抗体に結合したA β を2.5 μ Lに溶出し、定量解析のためには0.5 μ Lずつ4滴下し、MS/MS解析のためには2 μ Lを滴下した。

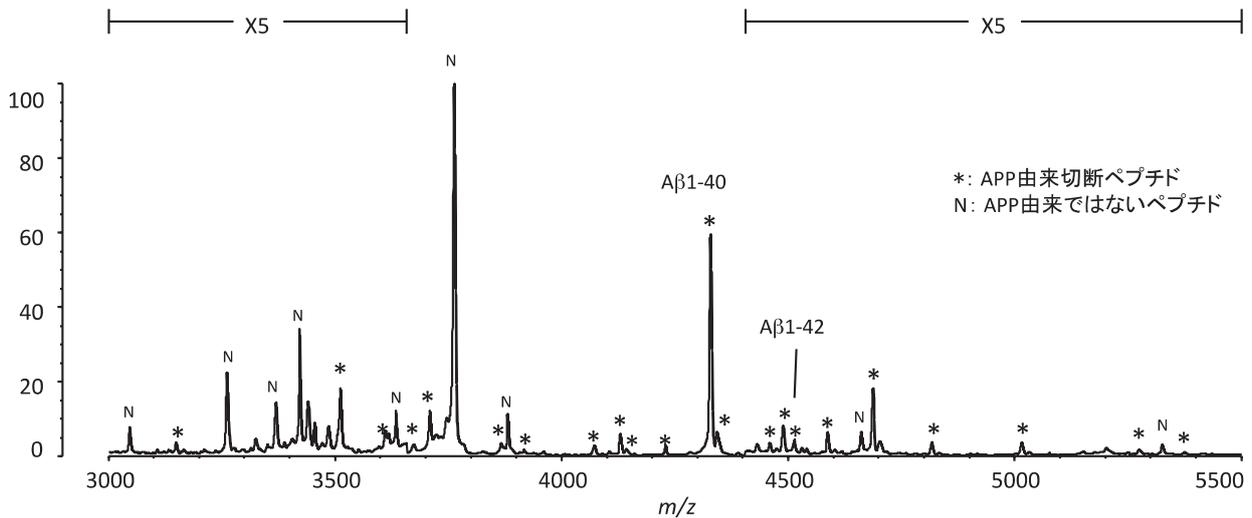


図4 血漿内アミロイド関連ペプチドのマスペクトル

4G8及び6E10のF(ab')を用いたHetero F(ab')-PEGビーズで市販血漿からアミロイド関連ペプチドをフィッシングした。得られた試料はMALDI-TOFMS(正イオンリニアモード)で測定した。Aβに由来するピークは表1の質量数と照合した。

【研究成果】

市販の健常者血漿から 22 種のアミロイド関連ペプチドを検出することができた(図 4、表1)。そのうちの Aβ1-40 と Aβ1-42 以外は血漿中での存在が初めて明らかになったものである。また 8 種のペプチドは Aβ よりも N 末端側に長いアミノ酸配列を有しており、脳髄液を含めて生体内で初めて発見されたものである。

これらの新たに発見された血漿内アミロイド関連ペプチドのアルツハイマー病血液バイオマーカーとしての可能性について、現在、国立長寿医療研究センターと島津製作所・田中最先端研究所が共同して検討を進めている。

表1 血漿内アミロイド関連ペプチドの検出

Aβ-related peptides	Sequence TEEISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA 663	Theoretical average mass	Measured average mass in linear TOF	Theoretical monoisotopic mass	Measured monoisotopic mass in QIT reflectron TOF	Observed fragmentation at C-terminal side of Asp or Glu in MS/MS spectrum	Mascot score
APP682-711(Aβ11-40)	EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	3152.7	3153.5	3150.68	3150.89	b ₁₂ , b ₁₃ , y ₁₇ , y ₁₈	5
APP677-709(Aβ6-38)	HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	3514.0	3513.5	3511.74	3511.92	b ₁₇ , b ₁₈ , y ₁₅ , y ₃₁	27
APP677-710(Aβ6-39)	HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV	3613.1	3613.1	3610.81	3610.93	b ₁₇ , b ₁₈ , y ₁₆	22
APP672-704(Aβ1-33)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIG	3675.0	3677.0	3672.78	3672.85	b ₂₂ , b ₂₃ , y ₂₂ , y ₂₆	5
APP677-711(Aβ6-40)	HDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	3712.2	3711.8	3709.88	3709.99	b ₁₇ , b ₁₈ , y ₁₆ , y ₁₈ , y ₃₃	33
APP676-711(Aβ5-40)	RHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	3868.4	3868.1	3865.98	3866.06	b ₁₉ , y ₁₆ , y ₃₃	11
APP672-706(Aβ1-35)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM	3919.4	3918.1	3916.91	3916.95	b ₂₂ , b ₂₃ , y ₁₂ , y ₂₈	6
APP672-708(Aβ1-37)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMV	4075.6	4074.8	4073.00	4072.93	b ₂₂ , b ₂₃ , y ₁₄ , y ₃₀ , y ₃₆	14
APP672-709(Aβ1-38)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	4132.6	4132.4	4130.02	4129.89	b ₁₂ , b ₂₂ , b ₂₃ , y ₃₁ , y ₃₅ , y ₃₇	22
APP674-711(Aβ3-40)	EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4144.7	4144.7	4142.09	4142.08	b ₉ , b ₂₆ , b ₂₁ , y ₁₅ , y ₃₃	9
APP672-710(Aβ1-39)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4231.8	4231.7	4229.09	4229.20	b ₁₁ , b ₂₂ , y ₃₂	13
APP672-711(Aβ1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4330.9	4330.6	4328.16	4328.11	b ₁₁ , b ₂₂ , b ₂₃ , y ₁₇ , y ₂₉ , y ₃₃ , y ₃₇ , y ₃₉	90
OxAPP672-711(Ox Aβ1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4346.9	4346.6	4344.16	4343.99	b ₁₁ , b ₂₂ , b ₂₃ , y ₃₃ , y ₃₉	14
APP671-711	MDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4462.1	4462.0	4459.20	4459.40	b ₂₃ , b ₂₄ , y ₁₇ , y ₂₉ , y ₃₃ , y ₃₉	8
APP669-709	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	4491.1	4491.6	4488.22	4488.15	b ₁₀ , b ₁₄ , b ₂₆ , y ₃₅	15
APP672-713(Aβ1-42)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	4515.1	4514.8	4512.28	4512.35	b ₁₁ , b ₂₂ , b ₂₃ , y ₃₅	17
APP669-710	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV	4590.3	4590.2	4587.29	4587.06	b ₉ , b ₁₃ , b ₂₃ , y ₃₁ , y ₃₉	11
APP669-711	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4689.4	4689.0	4686.36	4686.19	b ₁₀ , b ₁₄ , b ₂₃ , b ₂₆ , y ₃₃ , y ₃₇	17
APP666-709	ISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	4820.5	4818.2	4817.38	4817.27	b ₁₃ , y ₃₁ , y ₃₇	N/A
APP666-711	ISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	5018.7	5018.7	5015.52	5015.28	b ₁₃ , b ₂₆ , y ₃₉	17
APP664-711	EETISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	5277.0	5276.9	5273.60	N/D	N/A	N/A
APP663-711	TEETISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	5378.1	5378.7	5374.65	N/D	N/A	N/A

図4のマスペクトルから得られた質量数をペプチドのアミノ酸配列から計算される理論値と対比し、一致することを確認した。更に、それぞれのピークをプリカーサーイオンとするMS/MS解析とイオンサーチを行い、同定が有意であることを確かめた。

【結論】

血漿値によって脳内のアミロイド蓄積の如何を予測するタンパク質ないしはペプチドが発見されれば、世界に先駆けた成果であり、アルツハイマー病先制医療の確立に大きく貢献するものと期待される。本研究で新たに発見した血漿内アミロイド関連ペプチドはその期待に応えられる可能性がある。

【成果一覧】

論文発表

- (1) Identification and quantification of truncated amyloid precursor protein variants in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (in press)

【参考文献】

- [1] Villemagne VL et al., Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Annals of Neurology* 69: 181-19, 2011
- [2] Bateman RJ et al., Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 367: 795-804, 2012

で作製した。小切片の96ウェルマイクロプレートへの出し入れには繰返し精度の高い6軸ロボットアームを使用する。③分子イメージング法による化合物結合評価ユニットは、AD脳組織小切片上のタウ凝集体に特異的に結合する化合物を選択する装置である。本ユニットは、分子イメージングの解像度は劣るが高速処理可能なMALDI-QIT-TOFMS(島津製作所)と高精度な分子イメージングが可能な質量顕微鏡(iMScope、島津製作所)を使用する。MALDI-QIT-TOFMSを用いたMSイメージングは化合物の1次スクリーニングに使用し、iMScopeは1次スクリーニングでヒットした化合物の検証(2次スクリーニング)に使用する[1]。iMScopeは国立がん研究センターに導入された装置を共同研究として使用する予定である。1次スクリーニングにおいて多様な化合物を効率的にイオン化する方法として、通常のCHCAのような低分子マトリックスはそれ自体のイオンが化合物由来イオンの検出の妨げとなることから、そのような妨害イオンが発生しないnano-PALDI法を使用する[2]。この方法を使用することにより化学的多様性のある化合物ライブラリーを約70%の高効率でイオン化に成功した。現在、数万の化合物について1次スクリーニングを急いでいる。

【考察】

ADでタウ凝集体(NFT)は神経細胞死に直結する病態とされながら、臨床応用可能なタウ凝集体PETプローブは開発されていない。最近、放射線医学研究所の樋口らはタウ凝集体PETプローブ(PBB3)を開発しAD患者への応用を試みている[3]。PBB3はタウ凝集体の β シート構造を認識する化合物であるが、 β シート構造は多くの蛋白凝集体に共通な化学的性質を有することからPBB3にタウ凝集体に対し高い特異性を求めることには無理がある。実際、PBB3はA β 凝集体である老人斑に対し有意な結合能を示し、加えてAD脳の老人斑蓄積量はタウ凝集体蓄積量に比較し多いため正確なタウ凝集体イメージングは原理的に難しい。PBB3は従来のスクリーニング法の技術的制約から比較的少数の蛍光性化合物ライブラリーのスクリーニングから得られたものである。一方、我々が今回開発した新規スクリーニング装置は、より化学的多様性に富む大規模な化合物ライブラリーのスクリーニングを可能とし、タウ凝集体により特異的なPETプローブの開発に威力を発揮する。結果として、認知症に関連する医療費や介護負担の大幅な削減をもたらし、国民のQOLの向上に貢献することが期待される。加えて、本スクリーニング装置は α シヌクレイン、ポリグルタミン、TDP-43など他の神経変性疾患で見られる蛋白凝集体(図1)のPETプローブ開発にも使用可能であり、さらに微小がんの特異的に発現する蛋白を認識するイメージングPETプローブの開発にも展開できる極めて汎用性の高い装置である。このように本研究は我が国製薬企業の創薬基盤技術の開発研究としても大いに期待される。

【参考文献】

- [1] Shimma S et al., Alternative two-step matrix application method for imaging mass spectrometry to avoid tissue shrinkage and improve ionization efficiency. *J. Mass Spectrom.* 48:1285–1290, 2013
- [2] Taira S et al., Nanotrap and mass analysis of aromatic molecules by phenyl group-modified nanoparticle. *Anal. Chem.* 83:1370-1374, 2011
- [3] Maruyama M et al., Imaging of tau pathology mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 79:1094-1108, 2013

§2-5 質量分析システムを用いた早期診断システムの構築

京都大学大学院 医学研究科附属ゲノム医学センター

【研究目的】

日本では、新たにがんと診断される患者が年間50万人であり、疾患治療という観点のみならず医療費圧迫による経済的な側面からも予防や治療に対する積極的な対応が必要であり、そのための施策の一つとしてがんの早期発見に繋がるバイオマーカーの探索が期待されている。一般的にがんを早期に見つけることができれば、その後の治療方法や予後についても種々の有効な対策が可能となる。しかし、これまでに報告された健常者と患者の比較から得られたバイオマーカーの多くは、ある程度症状が進行した段階で初めてがんの発見に繋がるものもあり、定期的な検診を行っていたとしても必ずしも早期の発見に至らない場合があり、がんの初期段階を反映する早期バイオマーカーの探索が期待されている。そのためには、これまでに行われてきた健常者と患者の比較を、がん罹患する前からその後の状況までを過去、現在、未来に渡って長期的かつ大規模に調査するコホート研究へと展開し評価検証することが有効であると考えられる。我々は2005年より滋賀県長浜市と提携し、一万人の市民を対象とした「ながはま0次コホート事業（通称ながはまコホート）」を実施しており、参加者全員の生活習慣・環境情報、臨床情報、ゲノム・オミックス情報を採取・標準化したゲノム疫学研究の情報基盤となるデータベースを構築・公開するプロジェクトを進行中である。そこで、本研究課題内で行われている、乳がん、泌尿器関連のがん患者検体を用いた解析から得られたバイオマーカー候補を、ながはまコホートで収集した検体へと適用し、長期的な変化を評価することにより早期バイオマーカーとしての有用性の評価に役立てたいと考えている。マーカー候補の検証の前段階として、本グループでは臨床検体の測定方法を標準化すること、また測定データを含め患者背景など大量の臨床情報を包括的に管理する体制が評価解析に必要不可欠であることから、オミックス解析に有用な臨床データベースの構築を目的とした。

【研究実施状況】

バイオマーカー探索では、候補となったバイオマーカーを地域ベースのコホートで得られる検体で測定し、その有用性を検証するためにプロトコルの標準化を目指した。各検体は最適化された前処理方法により処理し、質量分析装置を用いて高感度に分析される(詳細は各項を参照)。それぞれの検体からは複数回測定データを採取し、最低限のデータ処理で可能な限り生データに近い状態でデータベース上に格納することとした。MALDIによる測定においてしばしば見られる異常値が再現性に影響する場合には、同一サンプルの複数回の測定データから外れ値を統計的に算出し除外することで再現性を担保することとした。

バイオマーカー探索と多検体による検証には、患者の詳細臨床情報とオミックス情報を統合するデータベースの構築が不可欠であるため、泌尿器科学・乳腺外科グループから臨床情報項目を取得し、疾患別データベースを構築した。さらに、データベースに実データ一部を格納して動作試験を実施し、バイオマーカー候補が同定された場合迅速に臨床情報を用いた関連解析が実施できるような情報基盤を構築した。

【まとめ】

臨床検体に対して測定から解析に至までのフローを確立しプロトコルの標準化を試みた。コホートを利用したバイオマーカー候補の超早期診断における有用性の前向きな検証には標準化したプロ

トコルによる迅速な検体処理と系統的なデータ取得保存が必須であり、本プロトコルをさらに洗練することで多検体による検証に十分に対応できると考える。

構築データベースは、患者データ蓄積のみならず新バイオマーカー有用性検証後の健常者集団での有効性確認にも汎用性を持って利用できるため、今後の本プロジェクトの水平(大規模コホートへの)展開において極めて利用価値が高いと考えている。