

定量プロテオミクスを用いた 悪性脳腫瘍および膵がん診断マーカーの同定と検証

創薬・生命薬科学専攻 HIGO 専門コース 微生物薬学分野 高畑 智宏

がんに対する治療方法や診断技術の進歩により、がん全体の 5 年生存率は 66.4%まで向上した。一方、神経膠芽腫(GBM)と膵がんの 5 年生存率は 8.5%以下と未だに低いままである。GBM と膵がんの 5 年生存率低値を招いている 1 つの要因はがん検出診断の難しさであり、優れたがんマーカーによる診断の開発により予後改善への貢献が期待できる。そこで、本研究では定量プロテオミクスを活用し GBM と膵がんを検出する診断マーカーを同定し有効性を検証することを目的とした。

1. セクレトーム解析による GBM 診断マーカーの同定と検証

GBM は主に MRI など画像検査によって診断されるが、より簡便に高頻度で診断が可能なマーカーが望まれている。GBM 診断マーカー探索は主に血液や脳脊髄液(CSF)を用いて行われる。しかし、高い診断精度を有するマーカーは未だ同定されていない。その原因は、血液や CSF 中に高濃度に存在するアルブミンなどの影響で腫瘍細胞から放出される微量タンパク質の同定が困難なためである。そこで本研究は、細胞の培養上清(CM)中に分泌されたタンパク質を定量プロテオミクスにより解析するセクレトーム解析を用いて GBM 細胞選択的に分泌されたタンパク質を GBM 診断マーカーとして同定し、患者由来の CSF を用いてマーカー有効性を検証することを目的とした。GBM 細胞(U87, U251, T98G)、乳がん細胞(MDA-MB-231, MCF-7)、結腸がん細胞(Caco-2)を無血清培地で培養後、回収した CM に対し網羅的定量プロテオーム解析を行った。その結果、2,371 分子を同定し、19 分子を GBM 細胞株選択的分泌タンパク質の候補分子として同定した。次に、GBM 細胞株選択的分泌した 19 分子を、定量精度と感度の高い内部標準ペプチドを用いた標的プロテオミクスにより検討した。その結果、15 分子の CM 中濃度が他がん種細胞株と比較し GBM 細胞株で有意に高かった。

GBM 細胞株選択的分泌タンパク質として同定した 15 分子について GBM 患者と非脳腫瘍患者から採取した CSF を用いて診断マーカーとしての有効性を検証した。内部標準を用いた標的プロテオミクスによる定量的結果、laminin subunit alpha-4 (LAMA4)と osteopontin (OPN)の発現量が非脳腫瘍患者と比較して GBM 患者の CSF で有意に 1.85 倍以上増加した。非脳腫瘍患者と GBM 患者を区別する ROC 曲線の AUC は、LAMA4 で 0.946、OPN で 0.913 であった。GBM 腫瘍体積と発現量の相関をピアソン相関により解析した結果、LAMA4 と OPN の発現

量は腫瘍体積に対して有意な相関が検出された。以上から、LAMA4 と OPN は GBM 診断マーカーとして有効であることが示唆された。

2. 標的プロテオミクスによる切除可能膵がんを検出する診断マーカーの検証

既存のマーカーである CA19-9 は、切除可能な段階の膵がん検出率は低く、診断されたときには既に進行や転移していることが多い。したがって、切除可能な膵がんを検出できるバイオマーカーの同定が望まれている。当研究室では、inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (ITIH3)、apolipoprotein A-I (APOA1)、apolipoprotein A-IV (APOA4)を切除可能膵がん診断マーカー候補分子として同定した。そこで本研究では、内部標準ペプチドを用いた標的プロテオミクスによるマーカー分子の絶対定量系を構築し、複数の施設で採取された検体を用いてマーカー候補分子の診断能を検証することを目的とした。マーカー候補分子特異的ペプチド (ITIH3: DYIFGNYIER , APOA1: THLAPYSDELRL , APOA4: LLPHANEVSQK)に対し、Q-tag 法により濃度を測定した合成安定同位体標識ペプチドを内部標準として用い、標的プロテオミクスによる絶対定量系を構築した。国立がん研究センターの血清検体 (計 150 検体)を定量した結果、健常者と膵がん患者を区別する ROC 曲線の AUC は、3 ペプチドで 0.782~0.841 であった。さらに、3 ペプチドの定量値を用いロジスティック回帰分析により診断式を構築した。診断式から算出される膵がんスコアによる健常者と切除可能膵がん患者を区別する ROC 曲線の AUC は 0.908 となり、CA19-9 (AUC = 0.862)より高値を示した。次に、神戸大学医学部で採取された血漿検体 (計 134 検体)で絶対定量を行い、診断式から膵がんスコアを算出した。その結果、健常者と切除可能膵がん患者を区別する ROC 曲線の AUC は 0.732 であった。また、National Cancer Institute の Early Detection Research Network から提供を受けた血清検体 (計 83 検体)でブラインド検証を行った。その結果、健常者と切除可能膵がん患者の ROC 曲線は AUC = 0.820 であり、CA19-9 (AUC = 0.751)より高値を示した。以上から、3 ペプチドから構成される診断式は CA19-9 と比較して高い診断能を有し、切除可能膵がん診断の有効性が示唆された。

GBM は再発しやすい疾患であり、偽再発によって治療方針の決定を困難にしている。本研究で同定した LAMA4 と OPN は、GBM 患者の再発診断に用い適切な治療方針のサポートへの利用が期待される。また、本研究で検証した膵がん複合マーカーは、膵がんが疑われる患者のスクリーニングに利用し、陽性者に更なる精密検査を行うことで切除可能な段階で膵がんを発見および治療の促進が期待される。本研究は最新プロテオミクスを利用し難治がんの予後改善に貢献できる新規診断マーカーを同定し検証した重要な知見である。