

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



医療と技術

大石 晴樹*, 黒野 定**

Discovery and validation of early stage breast cancer biomarkers in ND and NAF

Key Words : breast cancer, biomarker, proteome, mass spectrometry, mass-screening

はじめに

我が国において乳がんは年々増加の傾向にある。欧米と異なる日本の特徴は、乳がん発症年齢分布において40歳代にひとつのピークがあることがあげられ、これら若年層での乳がん早期診断が強く望まれている。現状ではマンモグラフィーによる診断が実施されているが、数mm以下の腫瘍は検出が困難で乳腺密度が高い若年層では更に困難となっている。超音波エコーを用いた方法も提唱されているが、まだ標準化されたものではない。乳がんの多くは乳管内上皮から発生するので、超早期の前がん段階から乳管内の細胞分泌液を使用して診断ができれば理想的である。我々は、乳管内から得た分泌液をサンプルとし、臨床プロテオミクス技術を用いて新しい分子マーカー（タンパク質、糖タンパク質）を発見

することで、従来より早期の段階で乳がんを発見できる診断法の開発を目指している。また、乳がんの浸潤転移の有無は治療方針や患者の予後を大きく左右するため、悪性度を判断するマーカーの探索も研究課題としている。ここでは臨床プロテオミクス技術を用いた網羅的解析による早期乳がん診断マーカーの探索について簡単に紹介する。

研究の背景

日本の人口動態統計による1975年～2014年の乳がん死亡者数の推移データを図1に示す[1]。2010年の罹患数は推定で、76,041人、2014年の死亡者数は13,317人であり、乳がんは女性がかかりやすいがんの第一位となっている。一方、日本の乳がん検診の受診率は、20%台であり、受診率で60%から80%の欧米と比べると、我が国は乳がん検診の後進国といえる。乳がんは、患者数は多いものの早期に発見すればほぼ治るがんであるにもかかわらず、乳がんの早期発見は実現されていない。その理由としては、検診受診率が低いこと、マンモグラフィー検査では早期発見は難しいこと、現状の血液検査で



* Haruki OISHI

1953年12月生
大阪大学工学研究科応用物理学専攻
(1978年)
現在、大阪大学医学系研究科保健学専攻
疾患分子情報解析学(和光純薬工業)共
同研究講座 特任教授 工学博士 乳が
んマーカー、エンドトキシン、分光計測
TEL: 06-6878-8161
FAX: 06-6878-8162
E-mail: oishihrk@sahs.med.osaka-u.ac.jp



** Sadamu KURONO

1965年10月生
電気通信大学大学院電気通信学研究科電
子物性工学専攻博士後期課程修了
(1994年)
現在、大阪大学医学系研究科保健学専攻
疾患分子情報解析学(和光純薬工業)共
同研究講座 招聘准教授 博士(理学)
質量分析、生体分子解析学
TEL: 06-6878-8161
FAX: 06-6878-8162
E-mail: skurono@sahs.med.osaka-u.ac.jp



図1 乳がん死亡者数データ (1975年～2014年)
人口動態統計及び国立がんセンターがん対策情報
センター統計出典

は乳がん特異的な早期診断マーカーはないことなどがあげられる。現在の乳がん検診で一般的になっているマンモグラフィー検査に対するイメージを図2の新聞記事に示す [2]。検査にあたって肉体的、精神的に苦痛を感じるという感想が一般的であり、検診率の向上にはまだまだ工夫の余地がある。我々は、集団検診においてマンモグラフィーで発見されるよりも早期の段階で乳がんを発見することを目指して、乳管分泌液中のがんマーカーの探索を続けている。研究の最終的な出口は、図3に示すように、自宅で検診被検者である女性が自分で乳管内体液をサンプリングし、得られた検体を検査センターで分析するという集団検診システムである。このようなシステムは、大腸がん検診や子宮頸がん検診などで確立されているが、乳がんにおいても新たな検診システム

として提案することにより受診率の向上、乳がんの早期発見につなげることを目標にしている。

研究の手法

マーカー探索の具体的な手法は、同意を得た検診受診者及び乳がん患者より提供された、NAF (Nipple Aspirate Fluid：乳頭吸引液) と PND (Pathological Nipple Discharge：乳頭分泌液) 中のタンパク質、ペプチドの発現解析を行ない、有効な診断マーカーを探索するというものである。発現解析には多次元 HPLC を用いた分離後、質量分析装置 (MS) でタンパク質、ペプチドの同定、定量を行なうプロテオミクス技術を使用する。図4にマーカー探索と評価の手順、図5に実際のシステムのスキームを示す。最終的には、これらのプロテオーム発現情報と患者の臨床病理学的診断結果の相関を解析し、マーカー候補を見出す。これらの候補タンパク質について MS による定量測定で有用性を評価すると同時に、実用化に向けた診断法として酵素免疫法 (ELISA) による定量法の開発を進めている。また、免疫染色、RNA、マイクロ RNA や DNA メチル化の定量など細胞生物学的手法で重要タンパク質、遺伝子の発現や変化を検出してがん転移メカニズムの解明を進め、がんの悪性度判断の指標となるマーカー候補を探索している。

乳がん検診のイメージ (2014年10月16日朝日新聞記事)



図2 マンモグラフィー乳がん検診の一般的イメージ

研究の出口イメージ: 健康診断、集団検診の場合の検診の流れ



図3 集団検診を目指す研究の出口イメージ

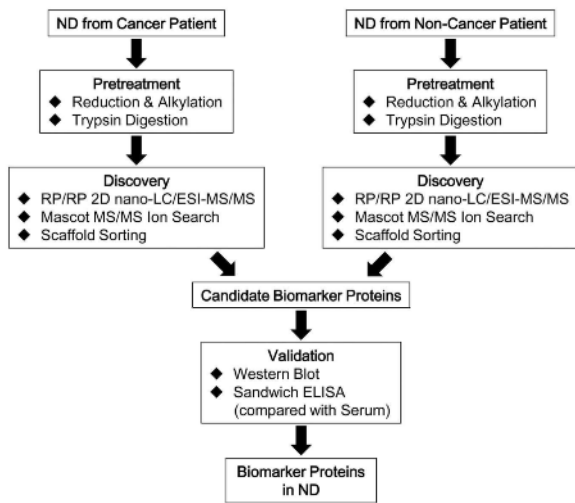


図4 乳がんマーカータンパク質の探索と評価の手順

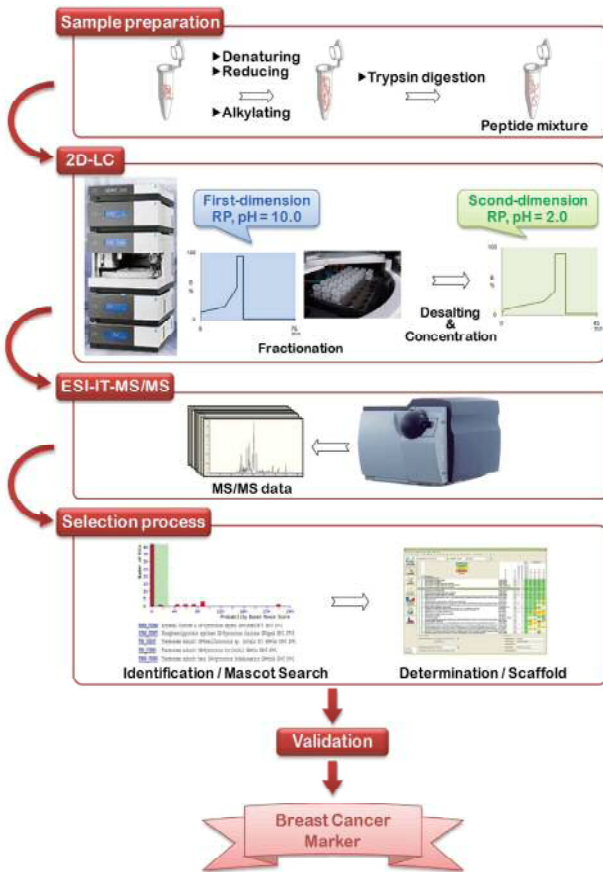


図5 網羅解析によるマーカー探索システムのスキーム

早期診断マーカー候補の発見と評価

共同研究者である大阪大学医学部松浦成昭特任教授の指導の下、大阪大学医学部附属病院、大阪府立成人病センター、市立貝塚病院、大阪がん循環器病予防センター及び古妻クリニックと連携し、PND、

NAF 様臨床サンプルの採取を継続している。2015年3月時点で、ND78検体、NAF 様37検体、計115検体を蓄積した。これら検体を使用し、二次元ナノLC-MS/MSを活用してマーカー候補タンパク質の網羅的な同定及び発現量の相対定量解析を行った。図6にがん患者群、非がん患者群から得られたタンパク質リストの比較データを示す。がん患者群に比較的特異的に現れているタンパク質についてソートしたA群、がん患者群と非がん患者群双方に現れるタンパク質についてソートしたB群、非がん患者群に特異的に表れるタンパク質についてソートしたC群に分けて結果を示している。がん患者群に比較的特異的に現れているタンパク質について統計的手法で解析し絞り込むことで乳がんマーカータンパク質候補15種を発見した[3]。また、同様の手法で絞り込んだフコシル化糖タンパク質の乳がんマーカー候補4種を発見した[4]。

図7に例として、有望なマーカー候補タンパク質である Catalase、Carbonic anhydrase 2、Peroxiredoxin-2 について、がん患者、非がん患者検体での出現の有意差をマンホイットニー検定した結果を示す。いずれのタンパク質も、がん患者と非がん患者の間で出現に有意差が認められ、有望なマーカー候補として更なる評価を進めているところである。図8にこれら3種のタンパク質について、ウェスタンブロット (WB) 法で発現測定した結果を併せて示す。いずれのタンパク質もがん患者に多く発現し、非がん患者では発現が弱いことが確認された。

我々は、MSを用いた絶対定量法の開発も並行して進めている。新規マーカー候補タンパク質の体液中での発現を質量分析法でより早く定量測定できる方法として、iodoacetanilide (IAA) 及びその¹³C同位体置換 IAA をタンパク質と反応させ、2群間における同種タンパク質を絶対定量する手法を開発した[5]。その手順は図9に示すように、試料に既知濃度の¹³C置換ペプチドを添加した後MSで測定し、質量の違いで7ダルトン (2価の場合は3.5ダルトン) シフトして現れるMSピークを使って試料中の目的ペプチドを定量するというものである (SRM法、selected reaction monitoring)。ND中の ovalbumin (OVA) をこの手法で定量した結果、理論値と実測値の間には良好な相関が得られた (図10)。候補タンパクの一つである Catalase についても、ND中

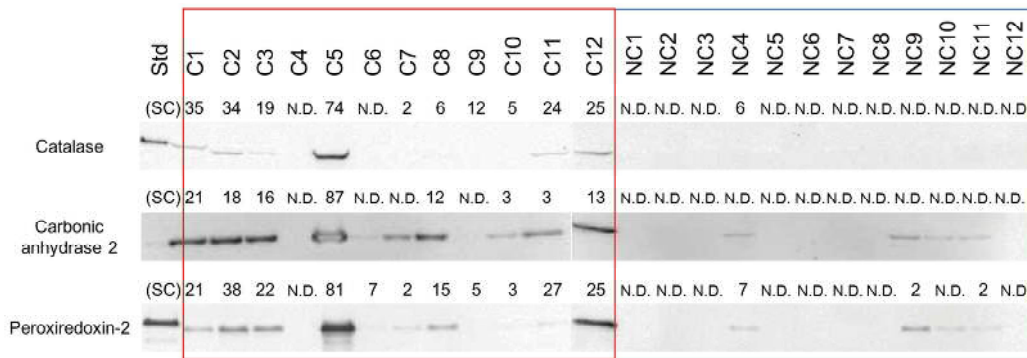


図8 Catalase、Carbonic anhydrase 2、Peroxiredoxin-2のWBによる発現確認結果
赤枠内はがん患者検体、青枠内は非がん患者検体を示す。

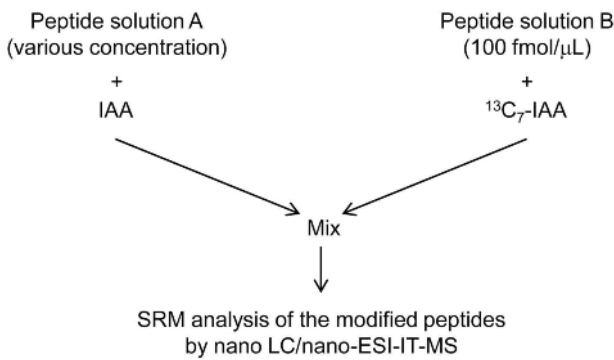


図9 MSによるタンパク質絶対定量の手順

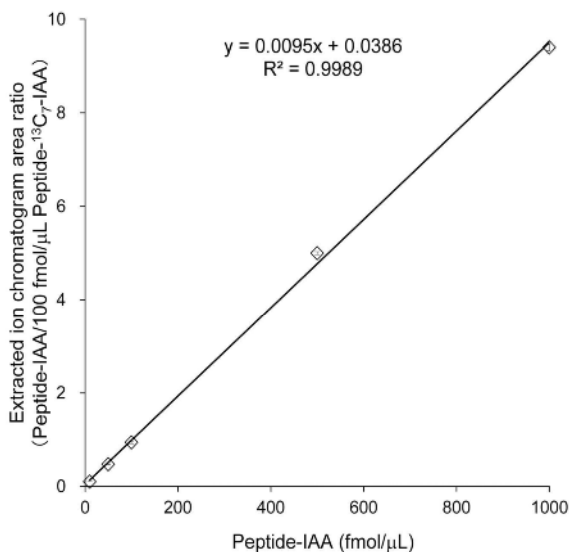


図10 ND中の合成ペプチド(OVA)の定量測定結果
横軸は理論値、縦軸は実測値を示す。

でIAA/¹³C₇IAAを用いたSRM法により絶対定量測定が可能であることを確認している[6]。SRM法では、複数のマーカータンパク質を抗体を使用せずに同時に定量できるメリットがあり、この手法の有効性を引き続き評価しているところである。

おわりに

乳管内は乾燥しているのではなく体液で湿潤している。我々はこの乳管内体液を侵襲性の低いサンプリング方法で試料として採取し早期の乳がん診断に結びつけることを目指している。がんマーカーが検出された場合には、マーカーは乳管由来であること(従って乳がんの疑いがあること)、左右どちらの乳房に異常があるかなど、がんの発生場所についても当初から自明の情報として得られるため、従来の血液中のマーカー検査に比べて優位性がある。最近の解析では、乳がんの中でも近年増加している非浸潤性乳がん(DCIS, ductal carcinoma in situ)に特異的なマーカー、或いは浸潤転移など悪性化が進んだ浸潤性乳がんの特異的なマーカーの存在も示唆されており、我々の研究成果が検診による乳がんの早期発見、悪性度の判定につながっていくことを期待している。

本講座は和光純薬工業株式会社との共同研究講座であり、産学連携の特徴を活かして、発見した乳がんマーカー候補を診断法として実用化する研究を同社と進めている。共同研究では主に、発見したマーカータンパク質候補の特異抗体を作成し(同社のDNA免疫法による抗体作成は極めて有用であった)、これを用いて免疫学的測定法による診断キットを開

発することを目指している。大阪大学医学部の医療・検査技術と大阪大学医学部関連の診療ネットワークを結びつけ医療現場のニーズに基づいて得られた研究成果から、和光純薬工業の臨床診断分野での分析技術と事業経験を活かして、世の中の役に立つ技術を創出することが本講座の目標である。

参考資料

- [1] 人口動態統計及び国立がんセンターがん対策情報センター統計が出典、
<http://www.mmjp.or.jp/kawakami-clinic/data/koseiidx.htm>.
- [2] 朝日新聞記事、オナナの保健室、2014年10月16日.
- [3] 松浦 脩治、松浦 成昭、黒野 定、金子 有香、
“乳癌の判定方法”、PCT/JP2013/073594、
2013年.
- [4] 松浦 脩治、松浦 成昭、黒野 定、中嶋 智之、
“乳癌の判定法”、PCT/JP2014/053991、2014年.
- [5] Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., Niwayama, S., “Quantification of proteins using $^{13}\text{C}_7$ -labeled and unlabeled iodoacetanilide by nano liquid chromatography/nanoelectrospray ionization and by selected reaction monitoring mass spectrometry”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, 25, 1110-1116.
- [6] Kurono, 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", 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 2015, St. Louis, MO, USA.

