

血漿タンパク・自己抗体の網羅的解析による 新規大腸癌早期診断法の開発

愛知県がんセンター 分子診断TR分野
分野長 田口 歩

(共同研究者)

愛知県がんセンター 分子診断TR分野 主任研究員 阿部 雄一

はじめに

我が国において、大腸癌の罹患者数は増加傾向で、約15万人と全がんの中で最多であり、また死亡者数も5万人超と肺癌について2番目に多い。大腸癌の5年相対生存率は、局所限局症例では95%以上と非常に良い一方で、局所限局症例の占める割合は全体の約40%に過ぎず、その診断の遅れが大きな問題となっている。さらに、高齢化社会の到来とともに、手術を要する高齢進行大腸癌患者も増加している。高齢者は多くの併存疾患を有することが多く、手術に伴うリスクは非常に高い。また、進行大腸癌においては、手術療法に引き続き化学療法がしばしば行われるが、患者の経済的・身体的負担は、高齢者において非常に大きい。したがって、低侵襲な内視鏡的治療で根治できる早期の段階で大腸癌を診断することが可能になれば、患者の経済的・身体的負担の低下と早期の社会復帰が期待できることから、大腸癌の早期診断は、特に高齢者において、極めて大きなメリットがある。

現在、大腸癌を早期診断するためのスクリーニングとして、免疫法便潜血検査が行われている。便潜血検査は、受診者の負担が低く、また大腸癌による死亡率を減少させることが証明されているが、疑陽性率が高く、その陽性的中率はわずか5%前後であること、また早期大腸癌に対する感度も約50%と低いことから、より精度が高い早期診断法の開発が急務である。

ほとんどの大腸癌は、10～30年という長い経過の中で腺腫から癌へと進展していくことが知られているが、特に1cm以上の大きさを持つ大腸腺腫は、その15%が10年以内に癌になると推定される、リスクが非常に高い前癌病変である。1cm以上の高リスク大腸腺腫と粘膜内にとどまる早期の大腸癌は、より侵襲の少ない内視鏡的切除のよい適応となっていることから、高リスク大腸腺腫を含む大腸癌の早期診断は、大腸癌の克服を目指すための有力なアプローチであると考えられる。

申請者らは、新規血中タンパクバイオマーカーであるMAPRE1と、大腸癌の腫瘍マーカーとして臨床で用いられているCEAの組み合わせが、早期大腸癌と高リスク大腸腺腫の診断において、FDAに承認された便中DNA検査キット(Cologuard)と同等で、免疫法便潜血検査をはるかに上回る診断精度を持つことを示してきた⁽¹⁾。本研究では、臨床上さらに有

用な診断精度を持つ、高リスク大腸腺腫・早期大腸癌の血液診断バイオマーカーの探索を目指して、高リスク大腸腺腫・早期大腸癌患者から採取された血漿検体を用いて、血中タンパクと自己抗体の網羅的かつ高深度なプロファイリングを行う。

結 果

愛知県がんセンター病院内視鏡部で内視鏡検査を行った大腸腺腫・大腸癌症例から、内視鏡検査前に採取された血漿を用いて、各症例を等量混ぜたプール血漿とした（ACCセット：表1）。各プール血漿検体について、安定同位体を用いて標識し定量的プロテオーム解析を行った。

表1 ACCセット症例

グループ	症例	症例数	性別(男性/女性)	平均年齢(範囲)
1	コントロール	11	6/5	72 (64-82)
2	低リスク大腸腺腫	12	6/6	68 (61-76)
3	大腸腺腫	10	5/5	70 (63-79)
4	上皮内癌	7	5/2	72 (49-80)
5	LST(腺腫)	8	6/2	72 (61-83)
6	LST(上皮内癌)	9	5/4	72 (54-89)
7	ステージI 大腸癌	10	6/4	69 (57-78)

また、内視鏡的に治療された大腸腺腫・早期大腸癌症例から、切除前と切除後6ヶ月で採血されたペアの血漿検体についても、同様にプール血漿を作成し（Pre-postセット：表2）、安定同位体を用いて標識したのち定量的プロテオーム解析を行った。

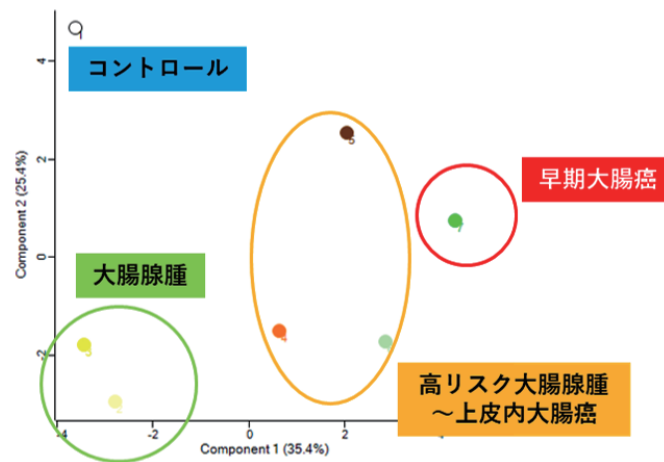
表2 Pre-postセット症例

グループ	症例	症例数	性別(男性/女性)	平均年齢(範囲)	発生部位	KRAS 変異
1	大腸腺腫	5	1/4	76 (73-78)	右側	有
2	大腸腺腫	4	3/1	68 (62-75)	左側	有
3	大腸腺腫	6	5/1	72 (62-82)	右側	無
4	大腸腺腫	3	1/2	54 (45-68)	左側	無
5	ステージI 大腸癌	4	3/1	76 (65-84)	右側	有
6	ステージI 大腸癌	4	2/2	67 (53-73)	左側	有
7	ステージI 大腸癌	3	2/1	72 (66-75)	右側	無
8	ステージI 大腸癌	3	3/0	78 (73-81)	左側	無
9	正常コントロール	6	2/4	51 (45-60)	-	-

解析に先立って、既報⁽²⁾の血漿タンパク解析プロトコルの最適化を行った。改良したプロトコルに基づく解析では、全体として1,600を超えるタンパクが同定定量でき、極めて高感度な血漿タンパクの定量が可能となった。

興味深いことに、ACCセットにおいて、定量された血漿タンパクプロファイルの主成分分析を行ったところ、コントロール、腺腫、早期大腸癌という病態に関連したクラスター形成がみられ（図1）、血漿タンパクプロファイルが、大腸腺腫から早期大腸癌における分子

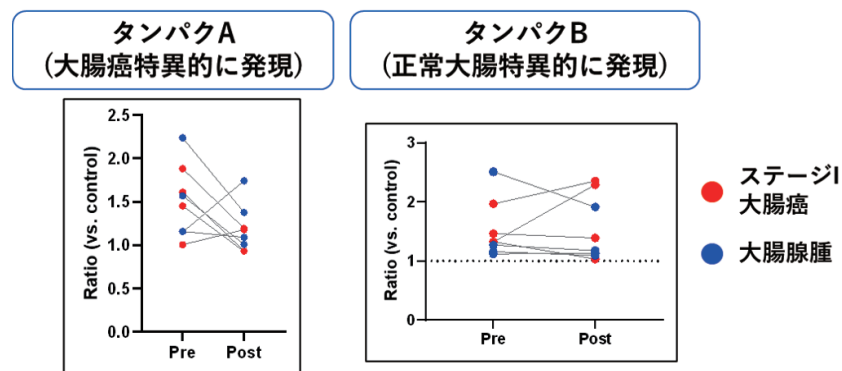
図1 血漿タンパクプロファイルの主成分分析 (ACCセット)



病態の違いを反映していることが示唆された。ACCセットで定量されたタンパクについては、コントロールとの比、正常組織・大腸癌組織における遺伝子発現から、有望と考えられるバイオマーカー候補を絞り込み、Pre-postセットにおける血漿中濃度を検討した。以下2つのバイオマーカー候補を紹介する。

大腸癌特異的に発現するタンパクAは、Pre-postセットにおいて、切除前は正常に比べて上昇しており、切除後に低下することから、腫瘍組織から分泌されていると考えられた(図2左)。これに対して、正常大腸粘膜特異的に発現するタンパクBは、Pre-postセットにおいて、切除前は正常に比べて上昇しているものの、切除後にも有意な低下は見られなかった。このことはタンパクBの血漿レベルは、背景正常大腸粘膜における大腸癌のリスクを反映していると考えられた(図2右)。

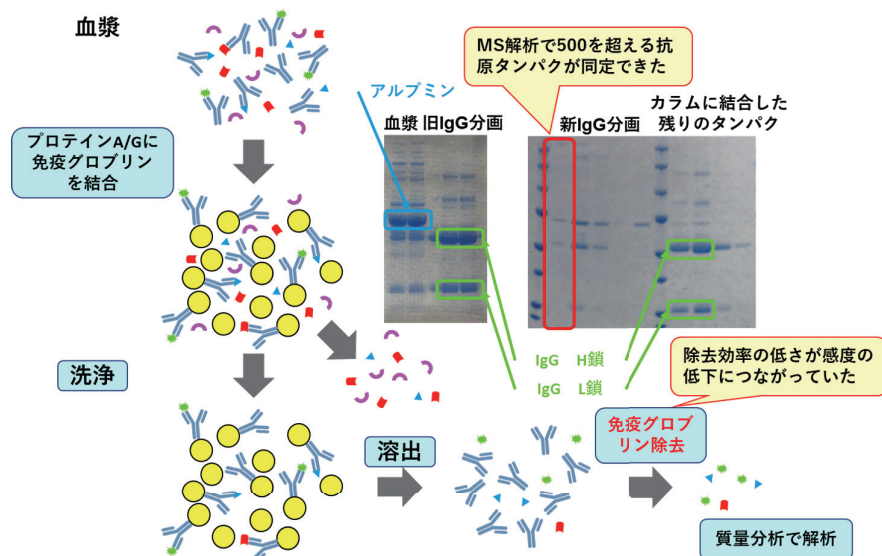
図2 大腸癌バイオマーカー候補例



自己抗体の解析については、従来我々が用いてきた免疫グロブリン複合体の解析プロトコル⁽³⁾において、免疫グロブリン複合体画分中に濃縮された免疫グロブリン量が著しく多いために、微量な免疫グロブリン結合タンパクの同定感度が落ちてしまう点が問題であった。そこで、免疫グロブリン抗体固相カラムの溶出pH条件の最適化とSDS-PAGEによる免疫グロブリン除去により、従来法に比べて約3倍となる、500個を超える免疫グロブリン結合タ

ンパクが同定可能な高感度測定系を構築した（図3）。現在、各プール血漿検体からProtein A/Gを用いて免疫グロブリンを回収し、自己抗体のプロファイリングを行っている。

図3 血中免疫グロブリン複合体の網羅的プロファイリング



考 察

真に有用な血液バイオマーカーは、単に統計学的に有意であるだけではなく、疾患の病態に関連していなければならない。この点において、本研究で同定した高リスク大腸腺腫から早期大腸癌に関連する血漿タンパクシグネチャは、極めて有望な大腸癌早期診断血液バイオマーカー候補を内包していると考えている。本研究で同定された、いくつかのバイオマーカー候補については、愛知県がんセンター病院内視鏡部で集積された血漿検体セット（143例；正常9例、低リスク大腸腺腫48例、高リスク大腸腺腫20例、早期大腸癌20例、進行大腸癌46例）を用いて、初期検証を現在行っている。

血液バイオマーカーは、簡便かつ低侵襲、低コストで高スループットな診断法であり、癌の早期診断やスクリーニングにおいて有望である。その一方、臨床応用にまでいたったタンパクバイオマーカーは、いまだに非常に少ない。その理由としては、①血中タンパク濃度は 10^{12} 程度と極めて幅広い範囲に及んでおり、低含量の有望な癌関連タンパクバイオマーカーを同定するためには、より網羅的かつ高深度なプロファイリングを行う必要があること、②自己抗体との結合による見かけ上の濃度の低下など、癌関連タンパクの血中動態の包括的な理解はいまだにほとんどなされていないこと、③癌は個々の症例において臨床的、分子生物学的に多様であり、1つの血液バイオマーカーが臨床上有用な診断精度を持つ可能性は低く、バイオマーカーを組み合わせたパネルを確立する必要があることなどがあげられる。

本研究は、これら従来のバイオマーカー研究の短所や限界を克服し、さらに臨床上有用な診断精度を持つ血液タンパクバイオマーカーの探索同定を目指して、血中タンパクと自己抗

体の網羅的かつ高深度なプロファイリングを高リスク大腸腺腫・早期大腸癌患者から採取された血漿検体で行い、さらに同一患者の切除前後で比較することで、大腸発癌過程における癌関連タンパクの血中動態を解明するという、極めて独創性の高い研究である。本研究によって、癌関連タンパクの血中動態の包括的な理解が深まり、血液バイオマーカー研究の新たな道を拓くと同時に、革新的な大腸癌の早期診断法の開発につながることを期待できる。

要 約

大腸癌の早期診断に有用な血液バイオマーカーの探索を目指して、大腸腺腫・早期大腸癌患者から採取した血漿を用いて高感度プロテオーム解析を行い、有望なバイオマーカー候補の一群を同定した。また、網羅的自己抗体解析プロトコルの最適化を行い、現在解析を進めている。今後はバイオマーカー候補の初期検証とバイオマーカーパネルの確立、さらに独立したサンプルセットでの検証を進めていく。

本研究に対する貴財団の多大なるご支援に深謝申し上げます。

文 献

1. Taguchi A, Rho JH, Yan Q, Zhang Y, Zhao Y, Xu H, Tripathi SC, Wang H, Brenner DE, Kucherlapati M, Kucherlapati R, Boutin AT, Wang YA, DePinho RA, Feng Z, Lampe PD, Hanash SM. MAPRE1 as a plasma biomarker for early-stage colorectal cancer and adenomas. *Cancer Prev Res.* 8:1112-9. 2015.
2. Taguchi A, Politi K, Pitteri SJ, Lockwood WW, Faça VM, Kelly-Spratt K, Wong CH, Zhang Q, Chin A, Park KS, Goodman G, Gazdar AF, Sage J, Dinulescu DM, Kucherlapati R, Depinho RA, Kemp CJ, Varmus HE, Hanash SM. Lung cancer signatures in plasma based on proteome profiling of mouse tumor models. *Cancer Cell.* 20:289-99. 2011.
3. Capello M, Vykoukal JV, Katayama H, Bantis LE, Wang H, Kundnani DL, Aguilar-Bonavides C, Aguilar M, Tripathi SC, Dhillon DS, Momin AA, Peters H, Katz MH, Alvarez H, Bernard V, Ferri-Borgogno S, Brand R, Adler DG, Firpo MA, Mulvihill SJ, Molldrem JJ, Feng Z, Taguchi A, Maitra A, Hanash SM. Exosomes harbor B cell targets in pancreatic adenocarcinoma and exert decoy function against complement-mediated cytotoxicity. *Nat Commun.* 10 (1) :254. 2019.