

# 腫瘍マーカーの探索と腎がん診断に向けた評価解析

東京理科大学大学院 理工学研究科 応用生物科学専攻

博士課程 6411702 金子 直樹

指導教員 薬学博士 池北 雅彦

## 目次

要旨 .....	4
略語表 .....	8
第1章 序論 .....	10
第2章 腎がん組織を用いた NBS プロテオーム解析 .....	17
第1節 NBS プロテオーム解析によるマーカー候補タンパク質のスクリーニング .....	17
諸論 .....	17
実験材料・方法 .....	21
結果 .....	24
2-1-1 MS ディフアレンシャル解析 .....	24
2-1-2 MS/MS 解析による腎がん関連タンパク質の同定 .....	25
考察 .....	36
第2節 プロテオーム解析結果のバリデーション .....	39
諸論 .....	39
実験材料・方法 .....	41
結果 .....	44
2-2-1 ウェスタンブロット .....	44
2-2-2 定量的リアルタイム RT-PCR .....	44
考察 .....	48
第3章 候補タンパク質の血中診断マーカー応用へ向けた検証 .....	50
第1節 マーカー候補タンパク質の血中濃度解析による評価 .....	50
諸論 .....	50
実験材料・方法 .....	52
結果 .....	55
3-1-1 サンドイッチ ELISA の構築 .....	55
3-1-2 腎がん患者と健常者の各タンパク質の血中濃度の比較 .....	56
3-1-3 腎がん患者と健常者の各タンパク質の受信者動作特性 .....	56
3-1-4 galectin-1 と galectin-3 の診断能力 .....	57
3-1-5 外科的摘出前後における腎がん患者の血漿タンパク質の変化 .....	58
考察 .....	69
第2節 マーカー候補タンパク質の細胞外移行の確認 .....	74
諸論 .....	74
実験材料・方法 .....	76

結果.....	79
3-2-1 培養細胞における各タンパク質の発現量比較.....	79
3-2-2 Galectin-1 の細胞外分泌量比較.....	79
考察.....	83
第4章 総合討論.....	85
謝辞.....	91
参考文献.....	92

## 要旨

本論文において、第1章で序論を記述した。日本では社会や生活習慣の変化とともに欧米諸国で多いがんが増えている。腎臓に発生するがんも例外ではなく増加の一途をたどっており、2008年では推定18000人以上の患者が発症している。腎がんは小さいうちはあまり症状が現れないため、大きくなってから血尿、お腹の痛みや腫瘍といった症状がでるまで発見できなかった。これらの症状が見られる場合は比較的大きながんで、すでに転移を伴っているなど進行がんである確率が高い。早期がんの予後は良好で手術後の5年生存率は90%前後であるが、転移がみられる進行がんは早期がんに比べて予後は非常に悪くなり20%程度に低下する。しかし、最近では人間ドックでの超音波検査の普及や、他の病気でCTがとられる機会が増え、以前よりは小さい段階で見つかるようになってきた。しかしながら、人間ドックやCTは高い医療費、検診時間の長さ、被ばく等の理由により頻繁に受診できる方法ではない。早期発見を目指すには簡易的で非侵襲的な診断方法、すなわち血液検査における腫瘍マーカーが必要となってくる。しかし、腎がんに関しては現在有効な血中腫瘍マーカーは存在しない。腎がんに対して最も効果的な治療方法は摘出手術である。一方、腎細胞がんは化学療法や放射線療法に耐性が強いいため、転移のある腎がんに対しては免疫療法が標準的な治療方法となっている。最も一般的に行われている免疫療法はインターフェロン- $\alpha$ とインターロイキン-2によるサイトカイン療法である。さらに近年では分子標的薬による治療が開発されてきており、日本ではチロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブとスニチニブ、mTOR阻害薬であるテムシロリムスとエベロリムスが認可されている。これら薬物療法による患者の経過観察にも腫瘍マーカーは必要とされており、投薬中のがんの縮小、もしくは拡大などを血中マーカーでモニタリングすることで薬効評価を行うことができる。さらに、再発を早期に発見するためにも重要となってくる。本研究では、これまで存在していなかった腎がん血中腫瘍マーカーを探索することとした。血液マーカーを探索するためには、がん形成を誘導するシグナル伝達に関与するタンパク質のみならず、がん化の結果として発現変化するタンパク質も候補となる。つまり、がん細胞に特異的に高発現しているタンパク質であれば血液腫瘍マーカーとなりうる。ただし、血液を対象として検査するため、それらが細胞外へ放出されて抹消血まで到達し、血流に乗ることが必要条件となる。本

研究では、腎がん組織で高発現しているタンパク質をプロテオーム解析でスクリーニングしてきて、それら腎がん高発現タンパク質をターゲットに、腎がん患者と健常者から採血された血漿中の濃度を測定することによって腎がん診断マーカーを探索することにした。

第2章第1節では、腎がん組織を用いてプロテオーム解析を行った。2DE や SELDI-TOF MS と比べて、特定のアミノ酸を安定同位体標識することにより質量分析装置で相対定量する方法は網羅性と同定精度の両方において高い解析能力があることが知られている。そこで、我々は、安定同位体標識試薬である 2-nitrobenzenefulfonyl (NBS) 試薬を用いたプロテオーム解析方法を用いて、腎がん患者から摘出された腎がん組織とそれに隣接する正常組織のディファレンシャル解析を行った。その結果、腎がん組織と正常組織で有意に発現差のあったタンパク質が 92 種類（増加タンパク質 34 種類、減少タンパク質 58 種類）同定された。それらの中には、既報告の腎がん関連タンパク質も含まれていた。腎がんで発現上昇していたタンパク質の中には、細胞質に局在する代謝系のタンパク質、つまり解糖系に関わる酵素が多く見つかり、腎がんで発現低下していたタンパク質の中では、ミトコンドリアに局在するタンパク質、つまり TCA 回路に関わる酵素が多かった。このことから、解糖系酵素の発現上昇と TCA 回路に関わる酵素の不活性化に関与する HIF が過剰に蓄積されていることが考えられた。プロテオーム解析はタンパク質の変動を網羅的に分析するための有力な手段であるが、得られたタンパク質変動の結果が真に正しいかどうかは他の手法を用いて検証しなければならない。

第2章第2節では、プロテオーム解析で見つかった発現上昇タンパク質のバリデーションを行った。腎がん組織と正常組織から抽出された可溶性画分中の galectin-1 および CNDP2 を、ウェスタンブロット法を用いてタンパク質レベルでの発現比較を行った。その結果、いずれの症例においても腎がん組織の方で galectin-1 と CNDP2 が高いことが確認された。さらに、galectin-1 における mRNA レベルでの発現をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。その結果、galectin-1 mRNA 量は正常組織よりも腎がん組織で有意に増加しており、pT1 と pT3 のステージ別における大きな違いは無かった。ここまでは、ヒトの組織における正常と腎がんとタンパク質発現の違いを解析してきた。しかし、血中腫瘍マーカーとして利用するためには、これらが血液中へ移行されること、そして腎がん組織でのタンパク質発現量を反映して血液中での濃度も変化すること、この2

つを検証する必要がある。

第3章第1節では、腎がん患者と健常者から採血した血漿中の腎がんマーカー候補タンパク質濃度を定量比較解析した。第2章で同定された腎がん高発現タンパク質のうち、8種類のタンパク質( $\alpha$ -enolase, calnexin, CNDP dipeptidase 2, galectin-1, galectin-3, lectin mannose-binding 2, MHC class I antigen A and triosephosphate isomerase)に対するサンドイッチ ELISA を構築した。これらの ELISA を用いて腎がん患者 15 症例と健常者 51 症例の血漿中濃度を測定した結果、 $\alpha$ -enolase と calnexin、galectin-1、galectin-3、lectin mannose-binding 2 の血漿中濃度が健常者よりも腎がん患者の方で統計的に有意に高かった。これら5つのタンパク質の ROC 曲線を描いたところ、ROC 曲線以下の面積 (AUC) は calnexin と galectin-1、galectin-3、lectin mannose-binding 2 で 0.7 以上と高かった。しかしながら、calnexin と lectin mannose-binding 2 は健常者の中でも高い濃度を示した症例もあり、診断マーカーとしては擬陽性が多いと言える。一方、galectin-1 と galectin-3 は 80-100%の特異度の範囲において calnexin と lectin mannose-binding 2 よりも高い感度を示したことから、galectin-1 と galectin-3 は腎がん患者と健常者を区別するための診断マーカーとしてより好適であることがわかった。galectin-1 と galectin-3 のカットオフ値 (galectin-1 : 48.4 ng/mL、galectin-3 : 18.4 ng/mL) を定めたところ、galectin-1 と galectin-3 の特異度はそれぞれ 82%(42/51) と 92%(47/51)で、感度は 53%(8/15)と 60%(9/15)だった。さらに、galectin-1 と galectin-3 を組み合わせると、特異度は 98%(50/51)で感度は 47%(7/15)であり非常に高い特異度を示した。したがって、galectin-1 と galectin-3 はその両方を用いることで高い特異性で腎がんを診断できる初期診断マーカーとして利用できる可能性を示した。外科的摘出手術前後の腎がん患者における血漿タンパク質濃度の変化を調べると、 $\alpha$ -enolase 濃度のみが術後 4 週間後で統計的に有意に減少しており、その低濃度状態が 12 週目も続いていた。このことから、術後患者の再発の発見や、薬の治療効果評価の目的で患者のがんの状態をモニタリングするための経過観察用マーカーとして利用できる可能性がある。

第3章第2節では、培養細胞株を用いて、マーカー候補タンパク質が腎がん細胞から細胞外へ分泌されることを検証した。ヒト肺由来正常 2 倍体線維芽細胞 WI-38、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 293 と 4 クロンのヒト腎臓がん由来細胞株 (VMRC-RCW、OS-RC-2、TUHR4TKB、RCC10RGB) の細胞溶解液からウェスタンブロットで 6 種類のタンパク質発現を調べた。腎臓の非がん細胞である 293

細胞と 4 種類の腎がん細胞株を比較すると、4 種類の腎がん細胞株全てにおいて galectin-1 は高発現しており、galectin-3 では 3 種類の腎がん細胞株で発現が高かった。腎がん細胞株で高発現していた galectin-1 が細胞外へ分泌されて、培養上清に高濃度で存在しているかどうかを調べるために、サンドイッチ ELISA で各細胞株の培養上清の galectin-1 濃度を解析した。293 細胞よりも 4 種類の腎がん細胞の全てにおいて galectin-1 分泌量が増加していることが示された。しかしながら、galectin-3 に関しては、今回解析した全ての細胞株において ELISA 測定限界以下であり検証できなかった。

第 4 章では本研究の総合討論を行った。本研究により、腎がん組織で高発現しているタンパク質を 34 種類同定した。これらのうち 5 種類のタンパク質は、健常者よりも腎がん患者の血漿中で高濃度に存在していることを示した。特に、galectin-1 と galectin-3 の組み合わせによる診断方法は腎がんを含めた広域ながんの初期診断に適しており、 $\alpha$ -enolase は摘出手術後の経過観察に有用な血中マーカーとなりうる可能性を示した。これらのタンパク質が腎がん患者の血中で高濃度となる機序の一端として、培養細胞株を用いて galectin-1 が細胞外へ分泌されることも証明した。腎がんの早期発見や薬効モニタリングのための血中腫瘍マーカー開発へ向けて、有用なマーカー候補を絞り込めたことを示した。

略語表

2-DE	two-dimensional gel electrophoresis
ACT	antichymotrypsin
AMG	macroglobulin
AP	alkaline phosphatase
AUC	area under the curve
CDR	complementary determining region
CEA	carcinoembryonic antigen
CRD	carbohydrate recognition domain
CT	computed tomography
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
FDA	food and drug administration
HAMA	human anti mouse antibody
HIF	hypoxia inducible factor
HNBA	hydroxynitrobenzoic acid
HRP	horseradish peroxidase
ICAT	isotope-coded affinity tag
IQR	interquartile range
IgG	immunoglobulin G
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
MEK	MAP kinase kinase
MRI	magnetic resonance imaging
MS/MS	tandem mass spectrometry
NBS	2-nitrobenzenesulfenyl
NHS	N-hydroxysuccinimide
PDGF	platelet-derived growth factor



PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PSA	prostate-specific antigen
PVDF	polyvinylidene difluoride
RCC	renal cell carcinoma
RNA	ribonucleic acid
ROC	receiver operatorating characteristic curve
RP-LC	reversed phase liquid chromatography
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS	sodium dodecyl sulfate
SELDI-TOF MS	surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
TBST	tris-buffered saline Tween-20
TCA	tricarboxylic acid
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride
TFA	trifluoroacetic acid
TGF- $\alpha$	transforming growth factor alpha
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantitation
mAb	monoclonal antibody
mTOR	mammalian target of rapamycin
pAb	polyclonal antibody

## 第1章 序論

腎臓に発生するがん(腎臓がん)は、尿細管の上皮細胞から発生する腎がん(腎細胞がん)や尿路の上皮細胞から発生する尿路上皮癌(腎盂癌)、他にも腎芽腫や平滑筋肉腫などがある。腎がんと腎細胞がんは同意語であるため、本論文で用いる名称は腎がんに統一する。腎がんは、がん細胞の形やその集まり方によって様々な病理組織型分類に分けられ、それぞれの組織型は治療と予後に影響を与える。腎がんの中で最も多い組織型は淡明細胞がん(clear cell carcinoma)で、約70%を占める。顕微鏡で見ると明るい腫瘍細胞が索状に並んでいることから名づけられた。腎がんの10~15%を占めている類型が乳頭状腎がん、がん細胞が乳頭状の構造をとって並んでおり一般に淡明細胞がんよりも予後は良好である。その他、嫌色素細胞がんや紡錘細胞がんなどあるが、紡錘細胞がんは腎がんの中で最も予後の悪い組織型である。

腎がんは尿細管細胞から発生するがんである。小さいうちはあまり症状がでないため、以前は早期発見が難しく、大きくなってから血尿や腹痛、お腹の腫瘍といった症状が現れるまで発見できなかった。しかし、最近では人間ドックでの超音波検査の普及や、他の病気でCTスキャンがとられる機会が増え、以前よりは小さい段階で見つかるようになってきた。しかしながら、人間ドックやCTを受ける機会は頻繁にあるものではない。簡易的で非侵襲的な診断方法の方が受診間隔が短いため早期発見に結びつく。早期がんの予後は良好で手術後の5年生存率は90%前後であるが、転移がみられる進行がんは早期がん比べて明らかに予後は悪くなり20%程度に低下する(Frank et al., 2005)。したがって、腎がんを早期に発見することができれば、腎がん患者の生存率に大きく貢献できる。早期の腎がん患者は症状がほとんど現れない。症状が現れていない人に対して、腎がんを発見するためには、広く国民が受診できるような簡易的で安価な検査が必要であり、その一つが血液検査である。現在、血液検査に使用される腫瘍マーカーは大腸癌や胃がん、肺がんなど多くの組織のがんに対して利用されている。しかし、腎がんに対する有効な腫瘍マーカーは、これまでに一つも存在していない。このことから、症状の無い多くの人を対象にして腎がんを発見できる、1次スクリーニングとして利用できる初期診断用マーカーが求められている。

腎がんの特徴の一つが多発性である。ある腎臓に1個の腎がんが見つかった時

に、その他の一見正常そうに見える部分にも、画像検査では見つからない小さながんが隠れていることがある。これを衛星病変と呼ぶ。直径 4cm 以上の大きながんでは約 10-20%に衛星病変がみられるとされているが、小さな腎がんでも皆無ではない。しかし現在では小さい腎がんでも 5mm あれば十分に画像診断で見つかるため、一部の小さい腎がんに対してはがん組織とその周辺の正常組織だけを取り除く腎部分切除術が行われ、腎臓をまるまる一つ取り除く根治的腎摘除術と同等の治療成績をあげている。そのことから、早期の小さい腎がんの時に発見することが、正常な腎臓の温存のためにも有効である。

わが日本においては現在、社会や生活習慣の変化により、腎がん、前立腺がん、肺がん、大腸がんなど、欧米諸国で多いがんが増える傾向にある。国立がん研究センターの統計データをもとにした年齢別の腎がん罹患数によると腎臓に発生するがんは増加の一途をたどり、2008 年には推定 18000 人以上の患者が発症していると発表されている。腎がんが増加した原因には、人工の高齢化、診断技術の進歩によって発見されるがんの増加、生活習慣と環境の変化が考えられる。腎がんにかかったヒトのなかで、男性は女性に比べて約 2-3 倍の頻度で腎がんにかかりやすいことがわかっている。

前述したように、近年、人間ドックなどの検診、あるいは他疾患の検査時に偶然発見される、無症状の腎がん（偶発腎がん）が増加している。偶発腎がんの割合は腎がん全体のおよそ 7 割で、何らかの症状を示すことによって発見される腎がん（症候腎がん）より多くなっている。腎がんには特異的な血液検査マーカーがないため、早期に腎がんを発見するためには、検診や人間ドックで積極的に腹部の超音波検査や CT などの断層画像検査を受診しなければならない。一方、腎がんでは古典的な 3 主徴とされる、血尿、腰背部痛、腹部腫瘤触知などの症状を伴うことがあるが、これらの症状が見られる場合は比較的大きながんで、すでに転移を伴っているなど進行した腎がんが多くなっている。

偶発腎がんの多くは早期がんであるため、腎機能の温存という観点から出来るだけ正常の腎を残すように、周囲の正常組織を含めたがん部位のみを切除する腎部分切除術を考慮する。しかし、がんが発生した場所や大きさによっては、がんを含めて腎臓全部を摘出する腎摘除術を選択する。治療法の基準としては腫瘍径が 4cm 以下の小さいがん症例は腎部分切除術または腎摘除術、腫瘍径が 4cm 以上の大きながんは腎摘除術となる。近年、径 4cm 以下の小さな腎がんに対する腎部分切除術と腎摘除術では、がんの治療成績に差がないことが分かり、

腎機能を残すという観点からも、可能な場合は腎部分切除術が積極的に選択されている。しかし、腎部分切除術も腎摘除術も、手術後に再発する場合がある。腎部分切除術の時に温存しておいた腎臓部分や、腎摘除術で残しておいたもう一つの腎臓に再発する。再発する時期は患者によって異なる。現在、手術後の経過観察にはレントゲンや超音波、CTなどで検査されている。腎がんが再発する場合にも早期に発見することが患者の生存にとって大切であるため、検査間隔を短く実施できる方法が好ましいため、簡易的な血液検査は適した方法だと言える。したがって、手術後の再発を発見することができる経過観察用マーカーも必要とされている。

腎がんに対して最も効果的な治療方法は摘出手術であり、腎がん原発巣に対する標準治療法となっている。(Amato, 2005)。一方、腎細胞がんは化学療法や放射線療法に耐性が強いいため、転移のある腎がんに対しては免疫療法が標準的な治療法となっている。最も一般的に行われている免疫療法はインターフェロンとインターロイキン-2によるサイトカイン療法である。当初、このサイトカイン療法は大きな期待をもって始められたが、腫瘍が50%以下に縮小する効果は、概ね10-20%の症例に限られることが明らかになり、その反省から、サイトカイン療法が生存期間の延長に寄与するか否かについては疑問視する向きもあった。しかし、前向き無作為化試験で生存期間の延長効果があることが明らかにされ、日本においては転移がんに対する標準的な治療法として用いられている。さらに近年、転移を有する腎がん症例に対して、分子標的薬による治療が行われてきている。日本では、チロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブとスニチニブ、mTOR阻害薬であるテムシロリムスとエベロリムスが厚生労働省に認可されている。サイトカイン療法や分子標的薬は、患者によって効果の有無がある。また、処方され始めた当初は薬効があっても、がん細胞が次第に耐性を獲得していく場合もある。薬効の有無や耐性の獲得は、がん組織の増大や縮小をモニタリングしながら評価される。腎がんの場合、超音波検査やCT検査などの画像によって評価される。サイトカイン療法や分子標的薬の場合は副作用もあるため、薬効が無い時には患者の負担を軽減させるために、投薬をすぐに中止しなければならない。しかし、画像診断の場合は診断間隔が比較的に長いため、より短い間隔で検査可能な血液診断の方が迅速にモニタリングできる。したがって、投薬中の腎がん患者のがん組織のモニタリングのための経過観察用マーカーも必要とされている。

腎がんの発生に関する分子機構のこれまでの知見について説明する。最近の遺伝子研究の進歩により、ヒトの腎がんは、がん化の過程で染色体 3 番の短腕の末端にある 1 つの遺伝子の機能がなくなることが明らかになり、それが腎がん発症の主要な原因の 1 つであると考えられている。その遺伝子は VHL 病がん抑制遺伝子で、VHL 遺伝子の作るタンパク質はヒトの腎臓の細胞ががんになることを抑えているため、がん抑制遺伝子と名付けられている(D. J. George & Kaelin, 2003)。一般に、がん細胞が発生する過程では、正常細胞の遺伝子を構成する DNA に化学物質や放射線などが作用して傷をつけ、その傷が 6-7 個蓄積して、がん細胞が誕生すると考えられており、VHL 遺伝子はその際に最初に標的となる遺伝子の一つである。腎がんの約半数で、VHL 遺伝子に傷がつくか、または欠損して機能が無くなっている(Kaelin, 2009)。したがって、腎がんを発症させる危険因子は、この遺伝子を含む遺伝子に傷をつける可能性が高いと考えられている。

この VHL 遺伝子が産生する VHL タンパク質 (pVHL) は低酸素誘発因子アルファ (HIF) を制御する機能を持つ。正常な酸素濃度の細胞では、pVHL が HIF と直接結合し、この転写因子の作用を安定化させる。さらに、pVHL は HIF をユビキチン化し、プロテアゾームの経路での分解を促進する。一方、低酸素状態の細胞では pVHL の産生が低下し、HIF の活性が増強される。その結果、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、あるいは細胞増殖に参与するトランスフォーミング成長因子 (TGF- $\alpha$ ) が産生され、細胞および毛細血管の成長が促進されることにより、低酸素状態の細胞が細胞死を免れることになる。腎がんでは、VHL 遺伝子の異常のため pVHL が HIF を分解できなくなり、いわば恒常的に低酸素状態が継続している状態になる。その結果 HIF が過剰に蓄積することになり、細胞増殖、血管形成に参与する成長因子も過剰に産生されることになる(Kaelin, 2009)。過剰発現した VEGF、PDGF、あるいは TGF- $\alpha$  は、受容体チロシンキナーゼと結合し、がん細胞あるいは血管内皮細胞のシグナル伝達系を活性化する。このうち、増殖や生存のシグナル伝達に参与する RAF/MEK/ERK 経路および PI3K 経路が重要であるとされている。

ソラフェニブは VEGF 受容体、PDGF 受容体、RAF キナーゼの作用を阻害することで細胞増殖を抑制する(Wilhelm et al., 2004)。スニチニブも受容体チロシンキナーゼである VEGF、PDGF の作用を抑制し、腫瘍血管における血管新生を阻害する(Rini & Small, 2005)。ソラフェニブ、スニチニブ共にサイトカイン抵抗性の転移性腎がんにも明らかな臨床効果を示すことが報告されている(Motzer et al.,

2007)。一方、エベロリムスやテムシロリムスは mTOR を阻害する分子標的薬である。mTOR は PI3K/AKT 経路の下流に存在しているセリン・スレオニンキナーゼであり (Brugarolas, Vazquez, Reddy, Sellers, & Kaelin, 2003; Majumder et al., 2004)、VEGF による血管内皮細胞の増殖作用にはこの PI3K/AKT 経路の活性化が必要とされている。また、HIF の上流に存在する活性化因子としても作用し、HIF 活性増強に関与している。この mTOR を阻害すると、細胞の増殖や血管新生を抑制できることが研究で明らかになった。VHL 遺伝子などの腎がんの発生機序に関する基礎的研究の努力が、ようやく治療薬の開発に結実したといえる。

しかしながら、治療標的薬の作用阻害標的分子と血液診断マーカーを開発するための研究方針は分けて考えていかなければならない。前者の治療薬標的マーカーはがん形成に関わるシグナル伝達に関わるキナーゼタンパク質や、細胞膜に存在する受容体タンパク質が、がん細胞の増殖を抑制するうえで好ましいターゲットである。一方、血液マーカーに対しては、それらががん形成を誘導するシグナル伝達に関与するタンパク質のみならず、がん化に伴い変化するタンパク質が候補となる。つまり、がん細胞に特異的に高発現しているタンパク質であれば血液腫瘍マーカーとなりうる。ただし、血液を対象として検査するため、それらが細胞外へ放出され血液まで移行することが必要条件となる。前述した VEGF 受容体、PDGF 受容体、RAF キナーゼや mTOR、HIF は分子標的薬のターゲットとして非常にふさわしいタンパク質であるが、これらシグナル伝達に関わるタンパク質は主に細胞膜や細胞内で機能するため、細胞外に分泌されることはない。そのため血液診断マーカーとしては不適である。したがって、治療標的分子の探索研究とは異なる、血液マーカーとして開発する観点で新たに研究を組み立てなければならない。

医療現場における血中腫瘍マーカーの用途は主に次の二つにまとめることができる。一つは、早期診断用マーカーで、既往歴がなく全くの症状が表れていない人が健康診断などで実施され、マーカーの基準値を超えた場合に、より正確な精密検査を実施するといった、一次スクリーニングとして用いられる。もう一つは、経過観察用マーカーである。手術前に濃度が高かったマーカー値が術後に下がった場合に、その患者においてがんの指標として有効であると判断し、その後の再発のモニタリング、薬効評価の判断に用いられる。現在、厚生労働省に認可されている腫瘍マーカーの一例を紹介する。CEA は主に消化器系の臓器の腫瘍マーカーとして使用される。しかし、乳がんや膀胱がんでも増加

することがある(Perkins, Slater, Sanders, & Prichard, 2003)。また、がん以外にも喫煙や消化管潰瘍などでも増加する。CA19-9 も膵がん、胆道がん、大腸がん、食道がんなど、主に消化器系のがんで増加するが、膵炎、肝硬変でも増加することが知られている。AFP は主に肝臓がんなど、CA-125 は主に卵巣がんなどで増加する。これらのマーカーは、経過観察用のマーカーとして有効に利用されている。また、一つの臓器のがんにのみ特異的に増加する経過観察用マーカーは、ほとんどない。一方、早期診断用マーカーとして十分な効果を発揮するマーカーは PSA のみであり、PSA は前立腺がんの診断に適用される特異性の高いマーカーである。このように多くのがんに対して腫瘍マーカーが使用されているが、現時点で腎がんに対する腫瘍マーカーは一つも存在していない。したがって、腎がん以外の悪性腫瘍で増加するか否かに関わらず、まずは腎がんでは血中濃度が増加するマーカーを探索することが重要である。そこで本研究では、腎がんに対する血中診断マーカーを探索することを目的として研究を始めた。

本研究では、腎がん組織で高発現しているタンパク質をプロテオーム解析でスクリーニングしてきて、それら腎がん高発現タンパク質を対象として、腎がん患者と健常者から採血された血漿中の濃度を測定することによって腎がん診断マーカーを見つけることを目的とした。第 2 章で、腎がん患者から摘出手術によって取り出された腎がん組織とそれに隣接している正常組織を可溶化したサンプルに対して安定同位体標識された NBS 試薬をトリプトファン残基へ結合させることによりラベリングを行い、質量分析装置でディファレンシャル解析を行った。その結果、腎がん組織で高発現しているタンパク質を 36 種類同定することができた。第 3 章では腎がん組織で高発現していたタンパク質が血液診断マーカーとして利用できるかどうかを検討した。血漿中の腎がんマーカー候補タンパク質の濃度を測定するためにサンドイッチ ELISA の構築を試みて、8 種類のタンパク質に対する ELISA 測定系の構築に成功した。これらの ELISA を使用して腎がん患者と健常者から得られた血漿を測定したところ、 $\alpha$ -enolase と calnexin、galectin-1、galectin-3、lectin mannose-binding 2 の濃度が健常者よりも腎がん患者の方で高かった。特に、galectin-1 と galectin-3 が腎がん診断に対する Sensitivity と Specificity が高く、さらに galectin-1 と galectin-3 を組み合わせると腎がん診断の精度、特に Specificity の点で改善された。galectin-1 と galectin-3 は健常者と腎がん患者を区別する特性が高いことから、腎がんの初期診断マーカーとしての利用可能性を示した。さらに、患者の腎がん摘出手術前と手術後

で 8 種類のタンパク質濃度を調べたところ、 $\alpha$ -enolase 濃度が術後 4 週目と 12 週目で大きく減少していた。このことから、 $\alpha$ -enolase は腎がん患者の術後経過観察用のマーカーとして応用できる可能性を見出すことができた。galectin-1 が腎がん細胞から高濃度で分泌されていることを検証するために、in vitro の系において腎臓由来の非がん細胞株とがん細胞株を比較した。その結果、galectin-1 は腎がん細胞株の方で有意に高濃度で分泌されていることが証明された。最後に、第 4 章で本研究の総合討論を行った。



## 第2章 腎がん組織を用いた NBS プロテオーム解析

### 第1節 NBS プロテオーム解析によるマーカー候補タンパク質のスクリーニング

#### 諸論

血液検査の腫瘍マーカーとして利用できるタンパク質の条件として、がん組織で高発現しているタンパク質であることが必要となってくる。そして、がん組織高発現タンパク質が細胞外に出て、末梢血へ移行することにより血液中のマーカー濃度が上昇する。その濃度増加を利用した診断が血中腫瘍マーカーである。したがって、我々はまず腎がん組織で高発現しているタンパク質を探索することから研究を始めることにした。タンパク質の発現を網羅的に比較解析するためには、プロテオーム解析技術が必要となってくる。

近年のプロテオーム解析技術の発展により、新たな診断マーカーや予測マーカーが同定されてきている(Roessler et al., 2006; Sarkissian et al., 2008)。加えて、プロテオーム解析は新規標的分子を発見することに対しても強力なツールとなりうる。これまでに、大きく分けて二つのプロテオーム技術、すなわち 2 次元電気泳動(2-DE)と SELDI-TOF MS が臨床的な研究に用いられてきた。2-DE とはタンパク質をゲル内で等電点と分子量の違いで分離する方法である。タンパク質の網羅的な定量解析は、タンパク質の分離処理において高い分解能を有する 2-DE と MS などの解析法を組み合わせで行われる。SELDI-TOF MS はバイオマーカーを見つけるために開発された新しい解析法で、様々な化学修飾を施したチップ上に試料を接触させることでチップ表面に親和性の高いタンパク質を結合させて質量分析を行う方法であり、ハイスループット性を持っている。しかし、これらのプロテオミクス解析方法にはいくつかの点で技術的な限界がある。2-DE では 10 kDa 以下、150 Da 以上のタンパク質や強塩基性もしくは強酸性タンパク質、そして疎水性の強いタンパク質に対しては検出が難しい(Gygi, Corthals, Zhang, Rochon, & Aebersold, 2000; Kyte & Doolittle, 1982; Rabilloud, 2002)。SELDI-TOF MS においては、質量の大きいタンパク質の検出や検出ピークの同定が困難である。したがって、プロテオームの網羅性を改善させるためには別の解析手法が必要であることは明白である。

近年では、上記の SELDI-TOF MS の欠点を解消する方法として、特定のアミノ

酸を安定同位体標識することによって質量差を生じさせ、質量分析装置でタンパク質量の網羅的な相対定量を可能とする方法（定量プロテオミクス）が開発された。ワシントン大学の Aebersold 博士らによって開発された ICAT 法は、高い正確性でタンパク質のプロファイリングを可能としている(Gygi et al., 1999; Han, Eng, Zhou, & Aebersold, 2001)。ICAT 試薬の構造は、3つの重要な部分から構成されている。アミノ酸のシステイン側鎖と結合する反応基、重い水素の同位体(d8)か軽い水素の同位体(d0)のいずれかでラベルされたリンカー部位、ICAT 試薬でラベルされたペプチドを単離・検出するためのビオチンアフィニティータグである。軽い ICAT 試薬と重い ICAT 試薬で、異なる試料中に含まれるシステイン残基を含むタンパク質をラベルし、それらを混合することで、両方の試料中に含まれていたタンパク質を同定すると同時に相対定量も行う。一般的な分析方法としてはまず、比較したい 2 つの試料中のタンパク質を抽出する。両方の試料のタンパク質を、重い ICAT 試薬か軽い ICAT 試薬で標識する。そして、ICAT で標識されたタンパク質試料を混合する。トリプシンにより両方の試料中のタンパク質を消化し、ペプチド断片にする。続いて、アビジンによるアフィニティー精製を行う。これによって、ICAT 試薬でラベルされたペプチドを、ラベルされていないペプチドから分離できる。システイン残基のみを含むペプチドを解析することで、解析が単純化される。しかしながら、アビジン-ビオチン結合は非常に強いため、この工程においてアビジンカラムからの回収率が低いことが問題として挙げられている。アフィニティー精製で回収されたペプチド断片は質量分析装置で検出する。質量スペクトルには 2 つのペアピークが現れるが、その質量差が試薬の同位体の違いによるものであり、このピークが 2 つの試料に含まれていた同一のペプチドを表す。ペアとなるピーク強度の比を計算することで、各試料中のペプチド断片の相対的な存在量を決定する。この値は、ペプチドの親となるタンパク質の存在量を表す。ペプチド断片から親タンパク質を同定するためには、MS/MS データから得られるペプチド配列情報を使ってデータベースの検索を行う。

米国のアプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems Incorporation、ABI)が開発した iTRAQ の技術は、4 種類の試料の絶対定量と相対定量を同時に行うことのできる方法である。N 末端アミノ基およびリジン側鎖と結合することのできる iTRAQ 試薬は、異なる同位体標識のレポーターグループとバランスグループから構成される。異なる同位体標識のレポーターグループに対して、iTRAQ

試薬全体として同じ質量となるようにバランスグループを構成する。このことにより、異なる同位体標識の iTRAQ 試薬が結合したペプチドは全て同じ質量を持つため、シグナル強度を高くすることができる。そして、異なる iTRAQ 試薬はタンデム質量分析の中で、レポーターグループのイオンシグナルを異なる質量電荷比 (114~117) のピークとして表示することができる。そこでピークの高さおよび面積に基づき、異なる試料由来のタンパク質の定量情報を得ることができる。

近年、 $^{12}\text{C}_6$  (light) or  $^{13}\text{C}_6$  (heavy) で標識された NBS 試薬を用いて定量的なプロテオーム解析技術が開発された(Kuyama et al., 2003; E.-I. Matsuo, Toda, Watanabe, Iida, et al., 2006; E.-I. Matsuo, Toda, Watanabe, Ojima, et al., 2006)。NBS 試薬はトリプトファン残基へ選択的に導入されて、その結果 6 Da の質量差が生まれる (Figure 1)。この方法は、多種類のタンパク質をまとめて酵素消化することによって生じる膨大な数のペプチドの中からフェニルカラムによって NBS 標識ペプチドを分離する事ができる。ICAT 法は ICAT 試薬に結合されているビオチンアフィニティータグをアビジンカラムで結合させることにより標識ペプチドを精製するが、アビジン-ビオチン結合は非常に強いためアビジンカラムからの回収率が低いことが問題として挙げられていたが、NBS 法ではフェニルカラムの疎水性相互作用により NBS 試薬と結合させるため NBS 標識ペプチドを回収率良く精製する事ができる。しかしながら、NBS 標識ペプチドのフェニルカラムへの結合特異性は高くないため、フェニルカラムだけでは NBS で標識されていないペプチド全てを除去しきれない。そこで、NBS で標識されていないペプチドよりも NBS 標識ペプチドを効果的にイオン化させるマトリックス HNBA を用いることにより、選択的に NBS 標識ペプチドを測定することを可能とした。マトリックスによって選択的に標識ペプチドをイオン化する方法は MALDI 特有の利点であり、このことにより MS で検出される不要なペプチドピーク数を減少させることができる。ランダムなタンパク質の集まりを消化するとき、各タンパク質が 30 から 40 のペプチドに分解すると見積もると、1000 種類のタンパク質の混合物から、3 万から 4 万のペプチドが得られる。この数は膨大であり、このペプチド混合物から標識されたペプチドを分離し、標識ペプチドのみを選択的にイオン化することによって、混合物の複雑さを減らすことができる。それゆえ、測定のダイナミックレンジが広がり、これによりタンパク質発現の違いを高感度に検出することができると期待される。さらに、NBS 法を含めた、安定

同位体標識を用いた質量分析法によるプロテオーム解析はタンパク質をトリプシンで消化した後のペプチド断片を MS で比較しているため、**degradation** しているタンパク質でも測定できるという利点もある。また、トリプトファン残基は一タンパク質当りに含まれる残基数が最も少ないアミノ酸であり、かつ、それにも関わらずヒトゲノムにコードされている全タンパク質の 92%で、少なくとも一つはトリプトファンを含有しているため、網羅性も確保することができる (Cagney, Amiri, Premawaradena, Lindo, & Emili, 2003)。NBS 法の良い再現性や信頼性はすでに実証されている (Iida et al., 2006; Kuyama et al., 2003; E.-I. Matsuo, Toda, Watanabe, Iida, et al., 2006; Watanabe et al., 2008)。したがって、この方法は非ゲルタイプの定量的プロファイリングに有効である。さらにこの NBS 法は、ICAT 法におけるシステイン残基や iTRAQ 法におけるリジン残基あるいは N 末端アミノ基をターゲットとした標識法ではなく、トリプトファンを標識ターゲットにしている。システイン残基やリジン残基は翻訳後修飾されることがあるため、標識がブロックされることがある。一方、トリプトファンは翻訳後修飾されることはないため、確実に標識することができることも NBS 法の利点として挙げられる。また、iTRAQ 法はリジン残基を翻訳後修飾するため、各試料からタンパク質を抽出した後それぞれ還元・アルキル化してトリプシンで消化した後に iTRAQ で標識し、各試料を混合させる。したがって、各試料を混合させる前のトリプシン消化やその前処理のばらつきが各試料間の結果のばらつきに反映されてしまう。そのため、再現性が乏しくことが問題であった。一方、NBS 法では各試料からタンパク質を抽出した後すぐに NBS 標識し、各試料を混合する。その後、還元・アルキル化してトリプシンで消化するため、再現性を保つことができる。本研究ではこの NBS 法を用いたプロテオーム解析を腎がんサンプルへ適用し、バイオマーカー候補や治療標的分子を探索することにした。

## 実験材料・方法

### 臨床サンプル

腎がん組織とそれに隣接する正常組織のサンプルは神戸大学医学部附属病院で手術が行われた患者 29 症例から得られた。インフォームドコンセントは全ての患者から得られた。患者は 29-81 歳 (平均 $\pm$ SD = 60 $\pm$ 12)、男性 18 名、女性 11 名。全てのサンプルが mRNA 発現解析に用いられた。29 症例のうち 14 患者 (男性 7 名、女性 7 名) がプロテオーム解析に使用された (Table 1)。腎摘出後、腎がん組織と正常組織に分けられ、すぐに凍結させて -80°C で保存した。すべての腎がんサンプルは clear cell タイプであった。各症例の臨床情報は Table 1 にリスト化した。プロトコールは神戸大学医学部附属病院の倫理委員会で承認を受けた。

### MALDI-TOF MS のためのサンプル前処理

約 20 mg の腎がん組織、または正常組織に buffer A (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 100 mM PMSF, and 1% protease inhibitor cocktail, adjusted to pH 8.8) を加えて、ミキサーミル (MM300, Retch, Haan, Germany) でホモジナイズした。それを 20,000  $\times$  g で 15 分間遠心した後の上清を可溶性画分とした。ペレットは buffer A で 2 回洗浄した後、buffer B (6 M urea, 2 M thiourea, 3% CHAPS, 1% Triton X-100, and 1% protease inhibitor cocktail) で可溶化させ、これを難溶性画分とした。可溶性画分と難溶性画分を 2-D Cleanup Kit (BioRad, Hercules, CA) を使ってタンパク質以外の不純物を取り除き、洗浄後のペレットは 5 mM EDTA を含む 6 M guanidine hydrochloride で可溶化した。タンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Pierce, Lockford, IL) を用いて定量し、25  $\mu$ L 中に 100  $\mu$ g のタンパク質を含むようにすべてのサンプルを揃えた。

NBS 試薬の標識は  $^{13}\text{C}$ NBS<sup>®</sup> Stable Isotope Labeling Kit-N (Shimadzu, Kyoto) を用いて行った。0.17 mg の ( $^{13}\text{C}$ )NBS もしくは ( $^{12}\text{C}$ )NBS を 25  $\mu$ L の酢酸に溶解した。14 症例の患者において、腎がん組織と正常組織のタンパク質抽出液 25  $\mu$ L にそれぞれ 25  $\mu$ L の ( $^{13}\text{C}$ )NBS と ( $^{12}\text{C}$ )NBS を加えて暗所で室温、1 時間インキュベーションすることにより NBS 標識した。その後、それぞれ標識されたサンプルは同一患者由来の腎がん組織サンプルと正常組織サンプル同士で混合された。

Sephadex LH-20(GE Healthcare)で未反応 NBS を除去した後、遠心乾燥させた。48  $\mu\text{L}$  の 50 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH8.8 で溶解後、1  $\mu\text{L}$  の 200 mM TCEP を加えて 37°C、30 分間インキュベーションすることによりジスルフィド結合を還元した。さらに、1  $\mu\text{L}$  の 500 mM iodoacetamide を加えて室温、45 分間インキュベーションすることによりチオール基をアルキル化した。20  $\mu\text{g}$  のトリプシンを含む 900  $\mu\text{L}$  の消化溶液 (50 mM Tris-HCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH7.8) を加えて 37°C、オーバーナイトで消化した。50  $\mu\text{L}$  の 1% TFA を加えてトリプシン消化反応を停止させた後、NBS 標識ペプチドをフェニルセファロース(GE Healthcare)で濃縮・分画した。分画方法は、0.1% TFA を含む 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50% アセトニトリルを 1 mL ずつ順番に通すことで分画溶出した。10%および 15%のアセトニトリル濃度で溶出された各画分をプールして乾燥濃縮機で乾燥させた後、0.1% TFA 20  $\mu\text{L}$  で溶解した。20 と 25%、30 と 35%、40 と 50%のアセトニトリル濃度で溶出された各画分も同様の方法で処理された。プールされた 4 つのサンプルは逆相クロマトグラフィー (RP-LC ; LC-10ADvp  $\mu\text{HPLC}$  System, shimadzu) に供された。移動相は溶媒 A (5%アセトニトリル、0.1 % TFA) と溶媒 B (90%アセトニトリル、0.1 % TFA) を用いた。流速は 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で、B:A 比は 0.14:0.86 から 0.80:0.20 まで 30 分間を要してグラジエント法により溶出した。検出波長は 220nm と 340 nm の設定で行った。340 nm は NBS 試薬の最大波長である。溶出液は LC spotting system (AccuSpot, Shimadzu)を用いて自動的にマトリックス液と混合された後 MALDI ターゲットプレート上に沈着された。マトリックスは 80%アセトニトリル/0.1 % TFA に 10 mg/mL CHCA と 10 mg/mL HNBA を含むマトリックス液を用いた。

#### MALDI-TOF MS

MALDI ターゲットプレート上に沈着されたサンプルは MALDI-TOF MS (AXIMA-CFR Plus; Shimadzu/Kratos, Manchester, UK)によって自動測定された。それぞれの NBS 標識ペプチドペアの相対定量は TWIP version 1.0 (Dynacom, Kobe, Japan)を用いて行われた。本研究において、ペプチドペアの比率が 2 倍以上だった場合を発現増加、0.5 倍以下だった場合を発現減少の閾値として定めた。少なくとも全患者の 60%で共通に発現増加、もしくは発現減少と観測されたピークを選び、MS/MS 解析 (AXIMA-QIT-TOF; Shimadzu/Kratos) に供した。得られた MS/MS スペクトルから Mascot Distiller software Version 1.1.2 (Matrix Science,

Boston, MA)を用いて MS/MS ピークリストは作成され、Mascot software Version 2.0 (Matrix Science)で解析された。Mascot search の各パラメーターは下記の通りである : 1 missed cleavage までのトリプシン消化、(<sup>13</sup>C)NBS (もしくは(<sup>12</sup>C) NBS) とカルバミドメチル(C)の fixed modification、オキシデーション(M)の variable modification、0.3 Da の peptide tolerance、0.5 Da の MS/MS tolerance。P 値<0.05 のサーチ結果だった場合に同定できたと判断した。

## 結果

### 2-1-1 MS ディファレンシャル解析

同一患者における腎がん部位とその隣接する正常部位のプロテオーム解析は NBS 法を用いて行われた。組織に存在するタンパク質を安定同位体標識法と質量分析を組み合わせることで網羅的に解析しようとする、多くのタンパク質を酵素消化することによって生まれる膨大な数のペプチドを検出することになり、解析が煩雑になる。したがって、MS で解析する前にそれらのタンパク質を溶解液やクロマトグラフィーを用いて分離しなければならない。まず、ホモジナイズされた組織から Tris 緩衝液で抽出される画分（可溶性画分）と、変性剤（urea, thiourea）と界面活性剤（CHAPS, Triton X-100）を含む緩衝液で抽出される画分（難溶性画分）に分離した。それらに含まれるタンパク質を NBS で標識してトリプシンで消化後、ペプチド断片をフェニルセファロースで精製と粗分画を行った。さらに逆相 HPLC で分離しながら MALDI プレートに添加して、MS 測定を行った。NBS 法によるプロテオーム解析プロトコールの概要を Figure 2 に示した。

Figure 3 は NBS 法による相対定量の代表的なマススペクトル例を示している。 $^{12}\text{C}$ NBS と  $^{13}\text{C}$ NBS で標識されると同じアミノ酸配列のペプチド由来のピークが 2 本検出され、その質量差は 6Da となる。この 2 本のピークをペアピークと呼ぶ。がん組織サンプルに対して  $^{13}\text{C}$ NBS を標識し、正常組織サンプルに対して  $^{12}\text{C}$ NBS を標識した場合、がん組織で減少していると  $^{12}\text{C}$ NBS 標識ペプチドのピーク強度に比べて  $^{13}\text{C}$ NBS 標識ペプチドのピーク強度が低くなり、逆にがん組織で増加していると  $^{13}\text{C}$ NBS 標識ペプチドのピーク強度が高く検出される。一方、正常組織、もしくはがん組織のみで発現しているタンパク質はシングルピークしか検出されないが、 $^{12}\text{C}$ NBS と  $^{13}\text{C}$ NBS の標識を逆にすることで 6Da 差の位置にシングルピークが現れる。トリプトファンに含まれていないペプチドは標識されないため、 $^{12}\text{C}$ NBS と  $^{13}\text{C}$ NBS の標識を逆にしてもピーク位置は変動しない。このような MS スペクトル情報をもとにプロテオーム解析を行った結果、約 6000-7000 のペアピークが検出された。検出されたペアピークの半分以上が腎がん組織と正常組織間において 2 倍以上のシグナル強度差、すなわち 0.5 倍以下、もしくは 2 倍以上を示した。解析された患者のうち 60%以上で 2 倍



以上のシグナル強度差を示したペプチドは合計 225 個であった。

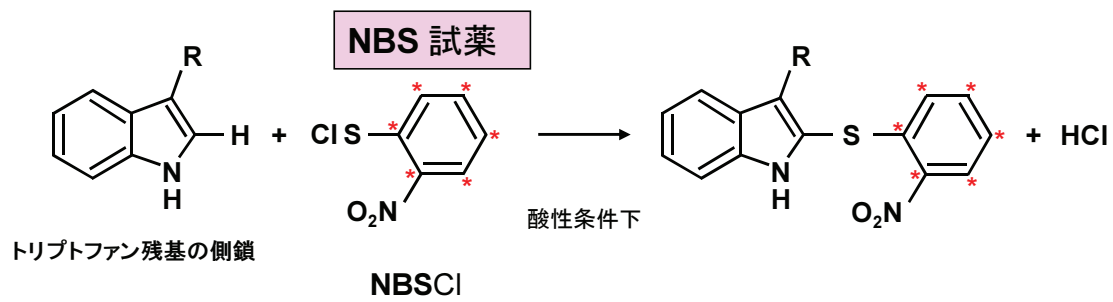
## 2-1-2 MS/MS 解析による腎がん関連タンパク質の同定

これら腎がん組織と正常組織でシグナル強度差があったペプチドは CID により MS/MS スペクトルを取得した。Mascot search を利用してデータベースからアミノ酸配列を決定し、その配列を含むタンパク質を同定した。アミノ酸配列決定に際し、NBS 法の利点として Mascot search でリストアップされたアミノ酸配列においてトリプトファンが含まれているかどうかで同定の正確性を判断することができる。MS/MS で得られたフラグメントイオンから一定のアルゴリズムでアミノ酸配列候補が優先度の高い順番で Mascot により提示されるが、稀にこれらの中にトリプトファンを含まないアミノ酸配列が最も優先度高く提示される時がある。この場合は明らかに誤ったアミノ酸配列であることが判別できる。これにより、タンパク質同定の正確性が向上する。同定されたペプチド配列とそれに対応するタンパク質を Table 2 に示す。Fibrinogen gamma chain precursor と Phosphoglycerate mutase 1、Pyruvate kinase isozymes M1/M2、Trioisophosphate isomerase はそれぞれのタンパク質由来のペプチドを 2 つずつ同定することができた。

腎がん組織でシグナル強度の強かったペプチドが 38 種類同定でき、それに対応するタンパク質が 34 種類であった。そのうち、可溶性画分で見つかったタンパク質は 18 種類、難溶性画分は 16 種類だった。逆に、腎がん組織でシグナル強度が減少していたペプチドは 70 種類同定でき、それに対応するタンパク質は 58 種類だった。そのうち、可溶性画分で見つかったタンパク質は 29 種類、難溶性画分は 29 種類だった。

同定されたタンパク質の性質を Uniprot に基づいて、それぞれの機能と細胞内局在で分類し、円グラフで表示した (Figure 4)。まず、機能別分類ではがん組織にて発現が上昇していたタンパク質はエネルギー代謝に関与するタンパク質 (Metabolism) が 34% を占めて最も多かった。続いて、タンパク質の生成や分解に関わる機能を持つタンパク質 (Protein metabolism) が 2 番目で 18%、細胞増殖に関わるタンパク質 (Cell growth) は 15% だった (Figure 4A)。一方、がん組織にて発現が減少していたタンパク質は、発現上昇タンパク質の場合と同じくエネルギー代謝系タンパク質 (Metabolism) が 63% で一番多かった。そして、細胞増殖と輸送に関わるタンパク質 (Cell growth と Transport) がそれぞれ 12%

を占めた (Figure 4C)。局在別に分類すると、がん組織にて発現上昇していたタンパク質は、細胞質に存在しているタンパク質 (Cytoplasm) が多く (49%)、続いて細胞外と核に局在しているタンパク質 (Extracellular と Nucleus) がそれぞれ 12%ずつだった (Figure 4B)。がん組織で発現低下していたタンパク質はミトコンドリア局在 (Mitochondrion) が最多 (45%) で、細胞質に局在しているタンパク質 (Cytoplasm) が 2 番目だった (Figure 4D)。



アスタリスク\*は  $^{12}\text{C}$ (Light) 又は  $^{13}\text{C}$ (Heavy)であることを示す

Figure 1

トリプトファン残基と NBS 試薬との結合反応

Table 1

プロテオーム解析および mRNA 発現解析で用いた腎がん患者の特徴  
 29 症例の腎がん患者から腎摘出術により取り出した腎がん組織と正常組織が  
 mRNA 発現の解析に用いられて、そのうち 14 症例がプロテオーム解析に供され  
 た。

Patient ID	Gender	Age	Histological Subtype	pT class	Proteome Analysis	mRNA Expression
3	Male	54	Clear cell	pT3a	Yes	Yes
9	Male	65	Clear cell	pT3b	No	Yes
10	Female	70	Clear cell	pT3b	Yes	Yes
11	Male	65	Clear cell	pT3b	No	Yes
12	Male	72	Clear cell	pT1a	No	Yes
13	Female	81	Clear cell	pT3a	Yes	Yes
14	Female	69	Clear cell	pT1a	No	Yes
15	Female	52	Clear cell	pT3b	No	Yes
16	Male	77	Clear cell	pT3a	No	Yes
18	Male	75	Clear cell	pT1a	No	Yes
19	Male	54	Clear cell	pT1a	No	Yes
20	Male	54	Clear cell	pT3b	No	Yes
21	Female	71	Clear cell	pT1a	No	Yes
23	Female	51	Clear cell	pT3b	No	Yes
25	Male	29	Clear cell	pT1a	No	Yes
27	Male	64	Clear cell	pT1b	No	Yes
28	Female	49	Clear cell	pT3a	Yes	Yes
29	Male	51	Clear cell	pT1a	No	Yes
31	Male	72	Clear cell	pT3b	Yes	Yes
33	Male	65	Clear cell	pT1a	Yes	Yes
35	Male	67	Clear cell	pT1b	Yes	Yes
36	Male	63	Clear cell	pT3a	Yes	Yes
37	Male	47	Clear cell	pT1a	Yes	Yes
38	Male	58	Clear cell	pT3b	No	Yes
39	Female	33	Clear cell	pT3b	Yes	Yes
41	Female	50	Clear cell	pT1b	Yes	Yes
42	Female	58	Clear cell	pT1b	Yes	Yes
43	Male	66	Clear cell	pT1a	Yes	Yes
44	Female	50	Clear cell	pT3a	Yes	Yes

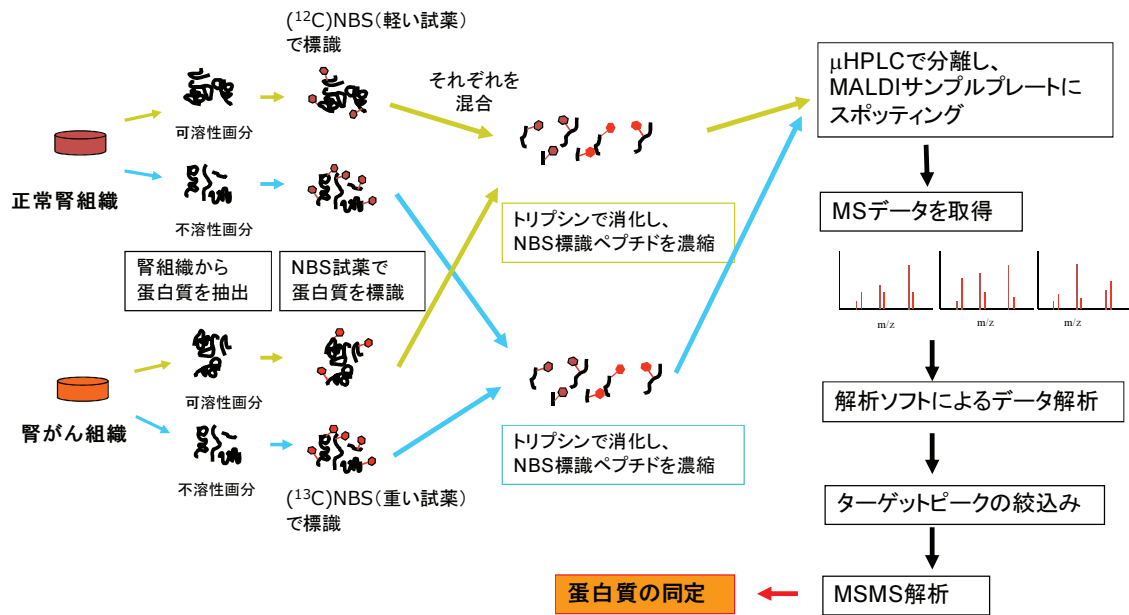


Figure 2

NBS 法によるプロテオーム解析プロトコールの概要

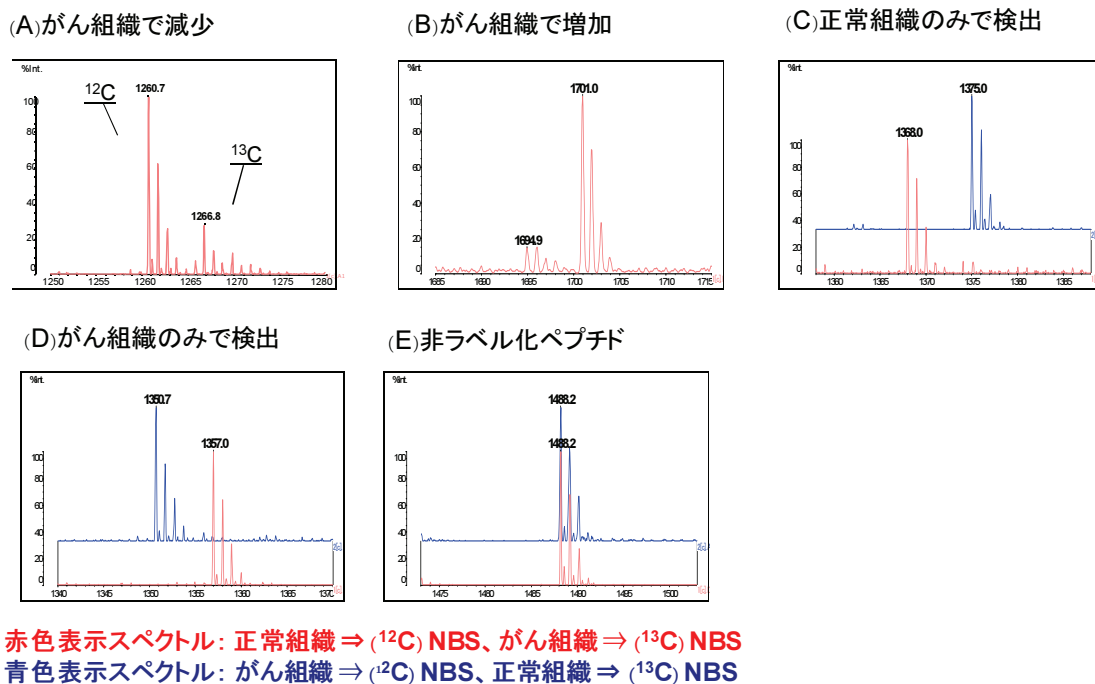


Figure 3

NBS 標識したペプチドのマスマスペクトル例

腎がん組織と正常組織由来のサンプルを( $^{12}\text{C}$ )NBS、もしくは( $^{13}\text{C}$ )NBS で標識したときに検出されたペプチドピークの例。がん組織で減少しているタンパク質では( $^{12}\text{C}$ )NBS よりも( $^{13}\text{C}$ )NBS で標識されたペプチドの方がシグナルは低い(A)。がん組織で増加しているタンパク質は逆に( $^{12}\text{C}$ )NBS よりも( $^{13}\text{C}$ )NBS で標識されたペプチドの方が高い(B)。正常組織、もしくはがん組織のみで検出されるペプチドはシングルピークとして検出されるが、腎がん組織と正常組織へのラベリングを( $^{12}\text{C}$ )NBS と( $^{13}\text{C}$ )NBS で逆に標識すると 6Da 差のシングルピークが検出される(C, D)。非標識ペプチドが検出される場合は、( $^{12}\text{C}$ )NBS と( $^{13}\text{C}$ )NBS で逆に標識しても同じ m/z にピークが検出される(E)。

Table 2

プロテオーム解析で同定された腎がん関連タンパク質

MS/MS で同定されたペプチド配列とその配列を有するタンパク質名と

Accession No., Mascot search で示された Mascot score と Expected value を示した。

Frequency は、それぞれのペプチドピークが検出された症例数のうち、2 倍以上の増加、もしくは 0.5 倍以上の減少が観察された症例数の割合を示している。

Protein name	Accession No.	Peptide sequence identified	Mascot Score	Expected score (p value)	Frequency
Up-regulation more than two-fold					
6-phosphofructokinase type C	Q01813	EWSGLLEELAR	35	0.034	8/9
6-phosphofructokinase, liver type	P17858	GQVQEVGWHVDVAGWLGR	77	3.40E-06	7/8
Alpha-crystallin B chain	P02511	APSWFDTGLSEMR	28	0.012	8/14
Alpha-enolase	P06733	LAQANGWGVMSHR	60	0.00019	10/13
Annexin A4	P09525	KWGTDEVK	25	0.014	11/13
Apolipoprotein A-I precursor	P02647	LLDNWDSVTSTFSK	63	0.00011	8/8
Calnexin precursor	P27824	IVDDWANDGWGLK	38	0.036	8/11
Cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP dipeptidase 2)	Q96KP4	WVAIQSVSAWPEKR	27	0.011	9/9
Ezrin	P15311	IQVWHAEHR	26	0.016	8/12
Fibrinogen gamma chain precursor	P02679	NWIQYK	23	0.018	8/9
	P02679	VELEDWNGR	29	0.0058	8/8
Fibronectin precursor	P02751	FLATTPNSLLVSWQPPR	57	0.00025	9/11
Four and a half LIM domains protein 1	Q13642	FWHDTCFR	34	0.0018	12/14
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	CPLLPWALTFSYGR	50	0.00098	11/13
Galectin-1	P09382	DGGAWGTEQR	53	0.0015	11/14
Galectin-3	P17931	LDNNWGR	24	0.014	7/10
Glucosidase 2 subunit beta precursor	P14314	YEQGTGCWQGNR	49	0.0022	10/14
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406	LISWYDNEFGYSNR	43	0.002	10/14
Heat shock protein beta-1 (HspB1) (Heat shock 27 kDa protein)	P04792	GPSWDPPR	19	0.012	9/12
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	NYEQWQWK	27	0.012	9/14
HLA class I histocompatibility antigen, A-25 alpha chain precursor	P18462	WASVVVPSGQEQR	39	0.00068	10/10
HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain precursor	P01889	WAAVVVPSGEEQR	36	0.035	10/10
Lamin-A/C	P02545	AQNTWCGGNSLR	28	0.0088	8/10
L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	SADTLWGIQK	24	0.025	9/9
Phosphoglycerate mutase 1	P18669	HGESAWNLENR	46	0.0059	10/12
		ALPFWNEEIVPQIK	27	0.0094	9/11
Plectin-1	Q15149	ESADPLGAWLQDAR	20	0.035	10/13
PRA1 family protein 3	O75915	AWDDFFPGSDR	36	0.0012	9/10
Prostaglandin E synthase 3	Q15185	KGESGQSWPR	42	0.014	10/10
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	DPVQEAWAEDVDLR	72	1.30E-05	10/13
		CDENLWLDYK	43	0.014	9/11
Reticulocalbin-1 precursor	Q15293	HWILPQDYDHAQAEAR	56	0.00015	9/11
Retinal dehydrogenase 1	P00352	QAFQIGSPWR	27	0.014	10/13
Triosephosphate isomerase (TIM)	P60174	DCGATVVLGHSER	56	0.0004	9/14
		VVLAYEPVWAIGTGK	40	0.022	9/12
Tripeptidyl-peptidase 1 precursor	O14773	AYPDVAALSDGYWVSNR	43	0.025	6/9
Vesicular integral-membrane protein VIP36 precursor	Q12907	NLHGDGIALWYTR	22	0.015	9/14
Vimentin	P08670	NLQEAEEWYK	50	0.00026	12/14
Down-regulation more than two-fold					

4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor	P80404	IDIPSFWDWPIAPFPR	94	6.90E-08	9/9
Abhydrolase domain-containing protein 14B	Q96IU4	FSSETWQNLGTLHR	38	0.035	7/10
Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	Q99798	WVVGIDENYGEGRSSR	53	0.001	9/9
Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial precursor	P49753	ASLHALVGSPIIWGGEPFR	53	0.00095	11/11
Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	P27144	GQHWLLDGFPR	44	0.0092	11/12
ADP/ATP translocase 2	P05141	EQGVLSFWR	62	0.00014	14/14
ADP/ATP translocase 3	P12236	EQGVLSFWR	62	0.00014	14/14
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P05091	AAFQLGSPWR	32	0.0033	12/12
Aldose 1-epimerase	Q96C23	FPVLLRPGEEYDHTTWFK	23	0.03	9/10
Alpha-actinin-4	O43707	LASDLEWIR	51	0.0036	9/9
Aminoacylase-1	Q03154	SPWVVR	23	0.025	10/10
Aminopeptidase N	P15144	ELWILNR	20	0.016	13/13
Apolipoprotein A-I precursor	P02647	LLDNWDSVTSTFSK	58	0.00032	8/9
	P02647	WQEEMELYR	42	0.012	9/12
Aquaporin-1	P29972	VWTSGGVVEEYDLDDADDINS	37	0.038	10/10
ATP synthase D chain, mitochondrial	O75947	LAALPENPPAIDWAYYK	56	0.0002	12/13
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core	P98160	AAGVPSATITWR	37	0.023	11/12
		CQVSGSPPHYFYWSR	47	0.0023	9/9
		LLSGPYFWSLPSR	42	0.014	13/13
Beta-enolase	P13929	AAVPSGASTGIYEALRLR	83	9.00E-07	11/11
Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	Q93088	AGPWTPEAAVEHPEAVR	71	1.40E-05	12/12
Carbonyl reductase [NADPH] 1	P16152	ILLNACCPGWVR	21	0.053	10/10
Choline dehydrogenase	Q8NE62	YNWCYHTEVQR	34	0.002	8/8
Collagen alpha-1(XIV) chain precursor	Q05707	VSEEWYNR	18	0.024	9/9
Collagen alpha-1(XVIII) chain precursor	P39060	SVWHGSDPNR	31	0.0035	13/13
	P39060	LTESYCETWR	33	0.0027	14/14
Complement component C9 precursor	P02748	RPWNVASLIYETK	26	0.036	10/10
Creatine kinase B-type	P12277	TFLVWVNEEDHLR	27	0.011	8/9
Cytochrome c oxidase subunit VIIb isoform 1 (COX VIIb-1)	P14854	GGDISVCEWYQR	52	0.0014	9/9
	P14854	NCWQNYLDFHR	35	0.044	12/12
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	P30084	HWDHLTQVK	42	0.011	14/14
Fibrinogen beta chain precursor	P02675	EDGGGWYNR	22	0.006	11/12
Fructose-bisphosphate aldolase B (Liver-type aldolase)	P05062	ALQASALAAWGGK	47	0.0047	12/12
Gamma-glutamyltranspeptidase 1 precursor	P19440	TAGGWAAASDSR	39	0.022	13/13
Glycine amidinotransferase, mitochondrial precursor	P50440	YWPFYQK	21	0.029	10/10
	P50440	RPDPIDWSLK	21	0.035	13/13
	P50440	NANSLGGGFHCWTCDVR	32	0.0039	10/10
Glycine N-acyltransferase	Q6IB77	FWHFGGNER	38	0.00071	12/12
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O75874	LVSGWVKPIIIGR	43	0.0028	10/10
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	P48735	GRPTSTNPIASIFAWTR	26	0.015	10/10
L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	SADTLWDIQQ	35	0.0018	9/9
Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating],	Q02252	AFPADWTSVLSR	48	0.0018	14/14
	Q02252	SDKWIDIHNPATNEVIGR	109	1.10E-09	11/11
Moesin	P26038	IQVWHEEHR	23	0.015	12/13
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	O00483	LALFNPDVCWDR	34	0.027	14/14
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8,	O95169	DPWYSWDQPGLR	32	0.0043	12/12
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	Q9Y6M9	HLESWCVQR	22	0.033	10/10
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3,	O75489	FDLNSPWEAFPVYR	46	0.0009	10/10
	O75489	KFDLNSPWEAFPVYR	83	2.60E-06	11/11
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	P28331	GLLTYTSWEDALSR	24	0.021	9/9
Nidogen-1 precursor	P14543	NIFWTDNSLDR	29	0.0084	8/9
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P30086	NRPTSISWDGLDSGK	39	0.027	12/12
		APVAGTCYQAEWDDYVPK	47	0.0025	10/10
		YVWLVEQDRPLK	45	0.0057	10/11
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	Q16822	DEAGHFLWPGFGENAR	48	0.0025	10/10
	Q16822	GQLGNWMSPADFQR	70	1.80E-05	11/11
Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic	P35558	IFHVNWFR	33	0.096	13/13



Retinol Binding Protein	P02753	GNDDHWIVDTDYDTYAVQY	86	7.30E-08	12/12
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 precursor	P05023	TSATWLALSR	21	0.0088	14/14
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Q9Y512	VTGQFPWSSLR	26	0.017	10/10
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit,	P31040	KPFEEHWR	41	0.019	12/13
Sulfite oxidase, mitochondrial precursor	P51687	VSVQPEESYSHWQR	40	0.012	11/11
Thiosulfate sulfurtransferase	Q16762	VLDASWYSPGTR	33	0.0029	9/9
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial precursor	P55084	FNNWGGSLSLGHPFGATGC	54	0.00051	8/8
Tubulointerstitial nephritis antigen-like precursor	Q9GZM7	ITGWGEETLPDGR	36	0.041	13/13
Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein	P14927	KWYYNAAGFNK	55	0.0015	10/10
Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein 1,	P31930	RIPLAEWESR	39	0.016	11/11
Uromodulin precursor	P07911	DWVSVVTPAR	52	0.00092	11/11
Vitronectin, precursor	P04004	DVWGIEGPIDAAFTR	41	0.014	10/11
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	YRWTEYGLTFTEK	37	0.04	7/8

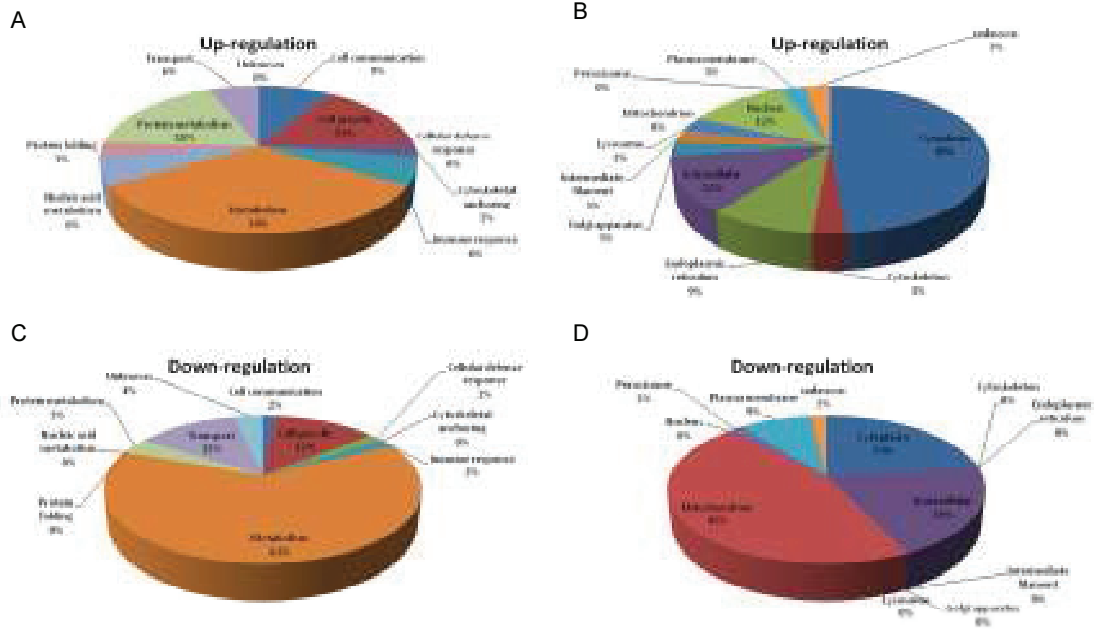


Figure 4

プロテオーム解析で同定されたタンパク質の機能別と細胞内局在別の分類  
UniProt の情報を元にプロテオーム解析で同定されたタンパク質を機能別 (A, C) と細胞内局在別 (B, D) で分類した。

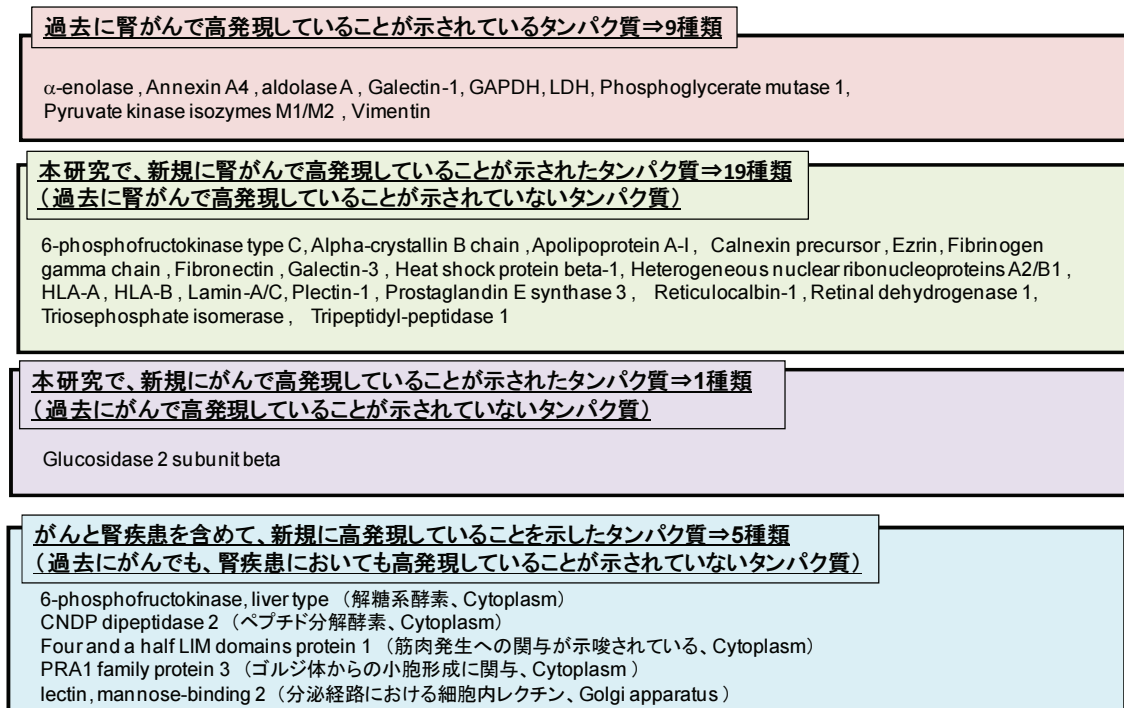


Figure 5

がんと関連が過去に報告されているタンパク質の分類  
 本研究で高発現が示されたタンパク質の中で、がんと関連が過去に報告されているタンパク質を分類分けした。

## 考察

摘出手術は、化学療法や放射線治療に耐性のあることが知られている腎がんの一般的な治療手段である。早期ステージで発見することができれば、腎がんは良好な予後を示すけれども、遠隔転移のある後期ステージでは5年生存率が10%以下となる(Amato, 2005)。したがって、腎がんの早期発見を可能とする有力な血中マーカーの発見が必要とされている。がん関連シグナル伝達経路の分子学的な研究の発展によって、抗 VEGF ヒト化抗体のベバシズマブやキナーゼ阻害剤であるソラフェニブ、スニチニブを含む、FDA に認可された後期ステージ腎がん用の新薬が開発されてきた(Garcia & Rini, 2007)。これらの新薬は生存率を改善させるが、十分な治療はできない。ヒトゲノムプロジェクトの完了と MS 技術の発展により、プロテオーム解析技術はバイオマーカーや治療標的分子を発見するための方法として注目を浴びている。これまでに 2-DE や SELDI-TOF MS を含むいくつかのプロテオーム解析方法ががん組織や血清などの臨床サンプルを対象に使われてきた。しかし、これらのアプリケーションは諸論で述べたように技術的に限界がある。そこで我々は網羅的に相対定量可能なプロテオーム解析方法である NBS 法を用いて、腎がんのバイオマーカーを開発することにした。本節では、腎がん組織と正常組織で有意に発現差があったタンパク質をスクリーニングして 92 種類のタンパク質（増加タンパク質 34 種類、減少タンパク質 58 種類）を同定した。その中には、以前に報告されていたタンパク質もあった(Perroud et al., 2006; Unwin et al., 2003)。既報告論文の結果と一致していることから解析手法としての正確性も良好であることを示している。例えば、解糖系に関わるタンパク質（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase や fructose-bisphosphate aldolase A など）が発現上昇しており、Unwin らや Perroud らの報告と一致している。

正常組織と比べて腎がん組織で変動のある事が示された腎がん関連タンパク質の中で、高発現タンパク質と低発現タンパク質共に代謝に関わるタンパク質が多く同定された。一方、細胞内局在別に分析すると高発現タンパク質は細胞質に局在しているタンパク質が多く、低発現タンパク質はミトコンドリアに局在しているタンパク質が多かった。このことから、細胞質に局在する代謝系のタンパク質、つまり解糖系に関わる酵素（6-phosphofructokinase type C、および liver type や Alpha-enolase、Fructose-bisphosphate aldolase A、

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、L-lactate dehydrogenase A chain など 9 種類 ; Table 2) が腎がんで発現上昇していること、そして、ミトコンドリアに局在するタンパク質、つまり TCA 回路に関わる酵素 (4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial precursor や Aconitate hydratase, mitochondrial precursor、Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial、ADP/ATP translocase 2、Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor など 23 種類 ; Table 2) が腎がんで発現低下していることが分かる。腎がんに特徴的な遺伝子変異として、VHL 遺伝子の突然変異があり、腎がんの半分以上で VHL 遺伝子の異常が発見されている。もともと VHL は HIF の分解に関与するタンパク質である。細胞が低酸素条件下に置かれると VHL タンパク質の発現が減少し、そのことにより HIF が分解されずに過剰蓄積される。HIF は成長因子や解糖系酵素などの低酸素応答遺伝子の発現を亢進させる。がん組織内部では、がん細胞の異常増殖により血管新生が間に合わず、酸素が行き届きにくい低酸素状態になるが、その環境に対応するために解糖系酵素が亢進し、ミトコンドリアの酵素は抑制されると考えられおり、この現象をワールブルク効果と呼ぶ(Dang & Semenza, 1999)。近年の研究では解糖系酵素の亢進ががん細胞の不死化に必要であることを示している(Kondoh, 2008)。細胞増殖に伴う血管新生の誘導と解糖系酵素の亢進は HIF-1 によって引き起こされる(Semenza, 1998)。HIF は解糖系酵素のほとんどに関わる遺伝子群を直接発現上昇させる。また、HIF は acetyl CoA の生成を抑制させ、pyruvate dehydrogenase を阻害する pyruvate dehydrogenase kinase を発現亢進させることにより、TCA 回路への基質供給を減少させる(Godinot, de Laplanche, Hervouet, & Simonnet, 2007)。このことから、プロテオーム解析で示された腎がん組織における解糖系酵素の増加と、TCA に関わる酵素の減少は VHL 遺伝子の変異、もしくは、低酸素状態により誘導されたと推測される。

第 2 章の最後に、本研究で高発現が示されたタンパク質の中で、がんとの関連が報告されているタンパク質をデータベース (GeneCards) や過去の論文で調べ、Figure 5 に示すように分類した(Dissemond et al., 2004; Watanabe et al., 2008)。プロテオーム解析によって示された全 34 種類中、過去に腎がんで高発現していることが示されているタンパク質は 9 種類あった。本研究において腎がんで高発現していることが新規に示されたタンパク質、つまり過去に腎がんで高発現していることが示されていないタンパク質は 19 種類あった。全ての臓器を含めたがんの中で高発現していることが新規に示されたタンパク質、つまり過去にがん

で高発現していることが示されていないタンパク質は 1 種類あった。さらに、がんと腎疾患を含めても、疾患組織で高発現していることを新規に示したタンパク質、つまり過去にがんでも、腎疾患においても高発現していることが示されていないタンパク質を 5 種類見つけた。これら 34 種類のタンパク質は腫瘍マーカーとなりえる可能性を示しており、さらにがんと腎疾患を含めて疾患組織で高発現していることを新規に示したタンパク質 5 種類のタンパク質は腎がん特異的なマーカーになりえる可能性を示している。

## 第2節 プロテオーム解析結果のバリデーション

### 諸論

プロテオーム解析は病気の状態や進展度、薬剤に対する反応などの生化学的なプロセスにおけるタンパク質の変動を網羅的に調査するための有力な手段であるが、得られたタンパク質変動の結果のバリデーションを他の手法を用いて検証しなければならない。

安定同位体標識法によるプロテオーム解析において質量分析装置を用いて相対定量、もしくは絶対定量を行った結果は、安定同位体標識されたペプチドに限定された定量結果となる。つまり、検出されたペプチドの親となるタンパク質の全体的な翻訳後修飾がどのような状態にあるのかは質量分析の結果からは判別できず、プロセッシングを受けたタンパク質なのか、それともタンパク質分解を受けて半分ほどに分解されたタンパク質なのか、または、多くの部分が酵素切断を受けて粉々になったポリペプチドを検出したのか、プロテオーム解析で検出したペプチドの親となるタンパク質の状態は不明である。Haqqani らは、ラットの脳上皮細胞のプロテオーム解析を 2-DE と ICAT 法を用いて解析しているが、二つの方法で発現の増減が異なるタンパク質も含まれていた(Haqqani et al., 2007)。2DE はタンパク質全体を検出している方法であるのに対して、ICAT 法はタンパク質から人為的に酵素分解させたペプチド断片を解析しているため、このような差異が生じたのであろう。しかしながら、タンパク質解析の網羅性に関しては ICAT 法の方が検出できたタンパク質数は多く、2DE の約 6 倍であった。Rene' Frydensbjerg Andersen らは iTRAQ 法を用いて見つけたタンパク質を ELISA で検証している(Andersen, Palmfeldt, Jespersen, Gregersen, & Rittig, 2012)。ネフローゼ症候にあるグループと治療による寛解状態のグループで、MS によるプロテオーム解析により差が見つかってきたタンパク質のうち、E-cadherin や hemopexin が ELISA の測定結果も MS の結果と一致していた一方、antithrombin III においては ELISA の測定結果は MS の結果ほど差が無いことを示していた。

タンパク質の発現と遺伝子(RNA)の発現の増減はパラレルではないことが数多く報告されている(Fu et al., 2007; Griffin et al., 2002; Tian et al., 2004)。Yet-Ran Chen らは ICAT 法とマイクロアレイにおける変動が一致しないことを報告しており、mRNA 発現とタンパク質発現の相関係数は  $r^2=0.2872$  と弱い相関を示して

いた。その原因として、タンパク質の合成とターンオーバーの速度による制御や、遺伝子特異的なクロマチン構造や補助タンパク質の結合などの影響が考えられている。例えば galectin-1 は ICAT 法では増加しているのに対して、マイクロアレイでは変動が無かった。がん化の原因は遺伝子変異であるが、生物学的な機能を果たす本体はタンパク質である。そして、現在血中腫瘍マーカーとして利用されている物質のほとんどはタンパク質である。タンパク質の発現と遺伝子(RNA)の発現の増減が一致しないことが明らかになっていることから、血中腫瘍マーカーの探索には、マイクロアレイなどを用いて mRNA を解析することよりも、タンパク質をターゲットとしてプロテオーム解析を実施した方が研究戦略として合理的である。



## 実験材料・方法

### ウェスタンブロット解析

第1節で得られたプロテオミクス解析の結果はウェスタンブロットで確認された。およそ 20mg の腎がん組織、もしくは正常組織は第2章第1節の「MALDI-TOF MS のためのサンプル前処理」と同様の処理でホモジナイズされた。ホモジナイズされたサンプルは 20,000 × g で 15 分間遠心した後、その上清、つまり、第1節のプロテオーム解析における可溶性画分をタンパク質量 20 µg 分とローディングサンプルバッファー(0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% sucrose, and 0.004% Bromophenol blue)を等量で混ぜ合わせ、95°C で 5 分間インキュベートし、ゲルへ供した。タンパク質を 12.5% SDS-polyacrylamide gel で 150V 一定で泳動した。PVDF 膜(GE Healthcare)をメタノールに浸した後、Milli Q 水で洗い、A2 バッファー (25 mM Tris, 10% メタノール) に浸した。泳動が完了したゲルを PVDF 膜に接触させて、セミドライ式ブロッティング装置 (BioRad) を用いて 120 mA 一定で 50 分間通電することによって PVDF 膜へ転写した。1 次抗体はウサギ抗ヒト galectin-1 ポリクローナル抗体(Abcam, Cambridge, UK)とウサギ抗ヒト cytosolic nonspecific dipeptidase 2 (CNDP2) ポリクローナル抗体を用いた。ウサギ抗ヒト cytosolic nonspecific dipeptidase 2 (CNDP2) ポリクローナル抗体は GenBank に登録されている CNDP2 diopeptidase 配列(accession no. AAH03176)のアミノ酸残基 364-376 の合成ペプチド CKFAELRSPNEFKV をウサギへ免疫することにより作製された。転写された PVDF 膜は TBS-0.1% Tween 20 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH7.6) 中で 5 分間振とうし、この操作をもう一回行った後、TBSM-0.1% Tween 20 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% skim milk, pH7.6) 中で一晩インキュベートすることによりブロッキングを行った。その後、TBSM-0.1% Tween 20 で希釈された galectin-1 もしくは CNDP2 抗体溶液中で室温、2 時間インキュベートした。1 次抗体に対するプロービングは Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)で行われた。シグナルの現像には Immunostain HRP-1000 (Konica, Tokyo, Japan)を使用した。さらにこの膜は TBSM-0.1% Tween 20 で希釈されたマウス抗ヒトβ-actin ポリクローナル抗体(Abcam)の溶液中で室温、1 時間インキュベートした。その後、TBSM-0.1% Tween 20 で希釈されたヒ

ツジ抗マウス IgG 抗体-HRP (GE Healthcare) の溶液中で室温、1 時間インキュベートした。その後、ECL Plus detection reagents (GE Healthcare)によって現像した。抗体の希釈率は抗 galectin-1 (1:200)、抗 CNBP2 (1:500)、抗 $\beta$ -actin (1:10,000)、抗マウス IgG (1:5000)で行った。

#### 定量的リアルタイム RT-PCR

Galectin-1 mRNA 量は定量的リアルタイム PCR 法によって測定された。Total RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)と RNase-Free DNase Set (Qiagen)を用いて組織から抽出した。Poly(A)<sup>+</sup> mRNA は Oligotex-dT30 (Takara Shuzo, Kyoto, Japan)により精製された。逆転写反応は 4  $\mu$ L の抽出された Poly(A)<sup>+</sup> mRNA と 1 $\times$  TaqMan reverse transcription buffer、5.5 mmol/L magnesium chloride、500- $\mu$ mol/L deoxyadenosine triphosphate、500  $\mu$ mol/L deoxyguanosine triphosphate、500  $\mu$ mol/L deoxycytidine triphosphate、500  $\mu$ mol/L deoxyuridine triphosphate、2.5  $\mu$ mol/L random hexamer、0.4 U/ $\mu$ l ribonuclease inhibitor、1.25 U/ $\mu$ l MultiScribe 逆転写酵素 (Applied Biosystems, Foster City, Calif)を含む 20  $\mu$ L の Two-step RT reaction mix 中で行われた。この混合液を 25°C で 10 分間の後、48°C で 30 分間インキュベーションした。95°C で 5 分間熱することにより逆転写反応を止めて、4°C で 5 分間冷却した。

Forward primer と Reverse primer と TaqMan probe の配列は Table 3 に記載した。TaqMan probe は 5'末端におけるレポーター色素 (6-carboxy-fluorescein) と 3'末端におけるクエンチャー色素 (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) でラベルされた。1 $\times$  TaqMan buffer A、5.5 mmol/L magnesium chloride、400  $\mu$ mol/L deoxyuridine triphosphate、200  $\mu$ mol/L deoxyadenosine triphosphate、200  $\mu$ mol/L deoxycytidine triphosphate、200  $\mu$ mol/L deoxyguanosine triphosphate、0.01 U/ $\mu$ l AmpErase uracil-N-glycosylase、0.025 U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold deoxyribonucleic acid (DNA) ポリメラーゼ、200 nmol/L of each forward and reverse primer、100-nmol/L TaqMan probe (Applied Biosystems)と 1  $\mu$ l の逆転写反応生成物を含む 25  $\mu$ L の反応液を用意した。反応はそれぞれの転写反応物に対して、トリプレットで行われた。PCR の伸長期では、最初の変性期にて 95°C で 10 分間とし、その後 95°C で 10 分間と 60°C で 1 分間の 40 サイクルで行い、DNA ポリメラーゼでプローブを解離させた。レポーター蛍光色素の蛍光の相対増加は Sequence Detector (ABI prism 7700 Sequence Detector; Applied Biosystems) でリアルタイムにモニタリングした。蛍光色素の

蛍光は Sequence Detector software (Applied Biosystems) で定量されて PCR 増幅が有意な閾値に達したサイクル数 ( $C_T$ ) が決まった。 $C_T$  の値はゲノム DNA 量の対数値を直線的な相関を示した。galectin-1 mRNA の濃度は  $\beta$ -actin 量に対する相対量として表した。平均値の統計的な有意差は Paired t-test で検定され、 $P < 0.05$  であれば有意であると判断した。

## 結果

### 2-2-1 ウェスタンブロット

プロテオーム解析により、腎がん組織の Galectin-1 と CNBP2 の発現上昇が確認された。この結果を検証するために、これら 2 種類のタンパク質についてのウェスタンブロットを行い腎がん組織と正常組織の各発現レベルを比較した。プロテオーム解析の NBS 法において、Galectin-1 と CNBP2 は可溶性画分で検出されていたため、各組織からの可溶性画分をウェスタンブロットで解析した。また、NBS 法では各サンプルの全タンパク質量を一定にして比較解析したので、ウェスタンブロットでも同様に各サンプルの全タンパク質量を揃えて解析した。参考程度に、同じサンプルの $\beta$ -actin 発現レベルも抗体で検出した。Figure 6 で示されたように、Galectin-1 と CNBP2 のバンドを比較するとタンパク質発現量はいずれの症例においても腎がん組織の方で高いことが確認された。Galectin-1 と CNBP2 で解析した検体は同じサンプルである方が好ましかったが、解析できる各サンプル量が少なかったため、それぞれ異なる検体を解析した。

### 2-2-2 定量的リアルタイム RT-PCR

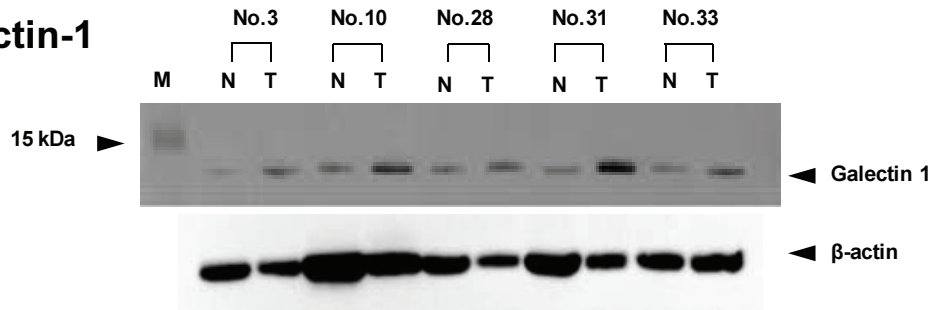
Galectin-1 の mRNA 量は定量的リアルタイム RT-PCR 法で測定され、 $\beta$ -actin mRNA 量との相対値で評価した。今回解析した 29 症例全体で評価すると、正常組織の galectin-1/ $\beta$ -actin の平均値は 0.0151 で、腎がん組織の平均値は 0.0998 を示しており、腎がん組織における galectin-1 の mRNA 量が有意に高い ( $p < 0.001$ ) ことが確認された (Figure 7A)。また、ステージ別で比較すると pT1 患者では正常組織の galectin-1/ $\beta$ -actin の平均値は 0.0196 で、腎がん組織の平均値は 0.0983 を示しており、pT3 患者では正常組織の平均値は 0.0102 で、腎がん組織の平均値は 0.102 を示していた (Figure 7B)。Galectin-1 mRNA 量は pT1 と pT3 共に腎がん組織で有意に増加しており (pT1:  $P < 0.001$ 、pT3:  $P = 0.003$ )、ステージ間で違いは見られなかった。つまり、腎がんの早期 (pT1) から galectin-1 mRNA 量は上昇していることが示された。

Table 3

リアルタイム PCR で用いられたプライマーおよび TaqMan プローブ

Target Gene	Accession No	Primers	Probes
Galectin 1	NM_002305	Forward AGGCTGTCTTCCCTTCCA	CCTGGAAGTGTGCAGAGGTGTGC
		Reverse AGGTTGGCCTGGTCGAA	
$\beta$ -actin	NM_001101	Forward TCGTCATACTCCTGCTTGCTGAT	AGTACTTGCCTCAGGAGGAGCAATGATC
		Reverse GGCACCCAGCACAAATGAAG	

## Galectin-1



## CNDP2

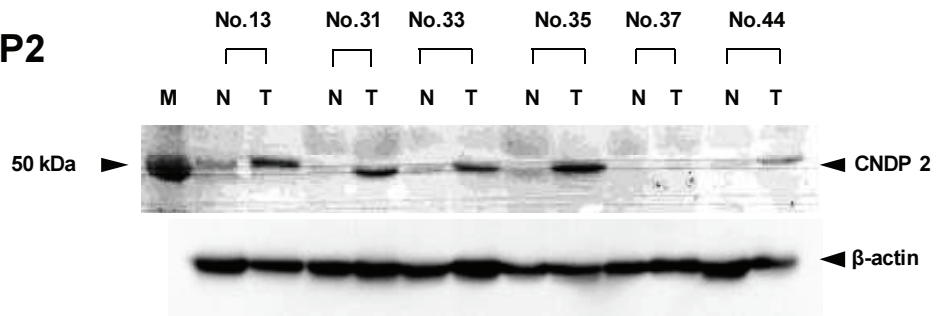


Figure 6

Galectin-1 および CNDP2 のウェスタンブロット解析

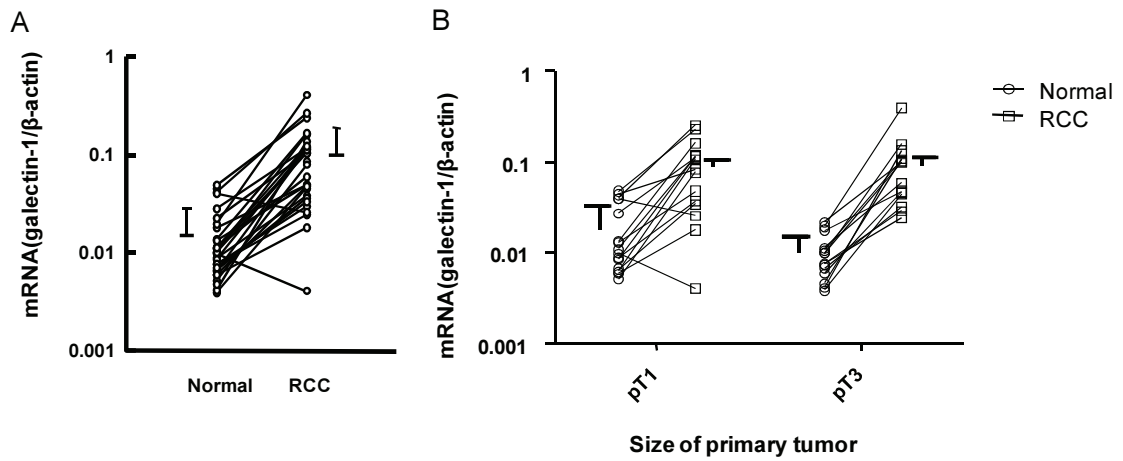


Figure 7

リアルタイム PCR による腎がん組織と正常組織の galectin-1 mRNA 発現解析  
 それぞれの点は 1 症例を示しており、結ばれている点が同一症例の腎がん組織  
 と正常組織を表している。横棒は平均値 $\pm$ SD を示している。

## 考察

本節にて、腎がん組織で発現上昇していたタンパク質が診断マーカー応用の可能性があると考えられるため、腎がん高発現タンパク質に注目した。本研究で見つかった発現上昇タンパク質の中で、本節の解析時では、*galectin-1* と *CNDP2* は腎がんとの関連は報告されていないという特徴を有していたため、これら 2 種類のタンパク質に着目し、プロテオーム解析結果のバリデーションを行った。これら両タンパク質とも多くの腎がん患者において腎がん組織で高発現を示していた。その割合は、*galectin-1* は 14 患者中 11 症例、*CNDP2* は 9 患者の中で全ての症例において腎がん組織で発現上昇していた。

*galectin-1* はβ-ガラクトシドに親和性を持つ糖結合タンパク質ファミリーの一つである。*galectin-1* は p27 や Ras、Raf、PI-3K と相互作用すると考えられている(André et al., 2005; Camby, Le Mercier, Lefranc, & Kiss, 2006; Elad-Sfadia, Haklai, Ballan, Gabius, & Kloog, 2002; Fischer et al., 2005; Ingrassia et al., 2006)。*galectin-1* は、多くの組織の正常時と病態時の両方の状態において細胞外に発現しており、その発現量は大腸がん、膵がん、非小細胞肺癌で高くなることが示されている(Gabius et al., 2002; Grützmann et al., 2004; Shen, Person, Zhu, Abbruzzese, & Li, 2004; Szoke et al., 2005)。しかし、*galectin-1* と腎がんとの関連を示した報告はこれまでになかった。そのため本研究では、プロテオーム解析やウェスタンブロット法で腎がん組織において高発現を示した *galectin-1* に注目した。さらにリアルタイム RT-PCR は *galectin-1* mRNA も腎がん組織の早期から高発現していることを示していた。がんの進行に関連して転写的に発現上昇している遺伝子は RNAi のような遺伝子治療のターゲットになりうる。したがって、現時点において *galectin-1* は診断マーカーのみならず遺伝子治療のターゲットへの応用も可能性がある。

*CNDP2* はメタロプロテアーゼの一種であるカルノシナーゼである。カルノシナーゼは 2 つのアイソフォームが存在する。*CNDP2* は肝臓や腎臓、脾臓で発現しており、*CNDP1* は血清や脳、脊髄液で見つかっている(Teufel et al., 2003)。*CNDP1* は腎症と関連があり(Janssen et al., 2005)、その減少が細胞増殖や肝がんの転移に関わっているという報告もある(P. Zhang et al., 2006)。しかし、*CNDP2* の機能については解明されておらず、いずれの種類のがんにおいても関連性を示す結果は示されていない。我々は腎がん組織における *CNDP2* の高発現を明らか



にし、症例数は少ないけれども初めて腎がんとの関連性を示したことになる。将来的には、より多くの正常組織とがん組織のサンプルセットに対して、免疫染色など他の手法で腎がんとの関連を確認する必要がある。加えて、診断マーカーとしての可能性を検証するために、CNDP2 が血液中へ分泌されているかどうかを調べて、健常者と比べて腎がん患者において有意に高濃度で存在することを確認しなければならない。

### 第3章 候補タンパク質の血中診断マーカー応用へ向けた検証

#### 第1節 マーカー候補タンパク質の血中濃度解析による評価

##### 諸論

腎がんの罹患数は全悪性腫瘍罹患者数のうち 2-4%を占める(Chow, Devesa, Warren, & Fraumeni, 1999)。pT1a と pT1b の患者の 5 年生存率はそれぞれ 97%と 87%であるが、一方 pT4 の患者は 20%になる(Frank et al., 2005)。生存率を改善するためには、腎がんを早期発見できる方法を開発することが必要となる。現在、腎がん診断は CT や MRI などの画像診断でのみ実施されている。それゆえ、腎がんは人間ドックや他の疾患の検査で偶然発見されるか、血尿や腹痛、発熱などの症状で発見されることが多い。しかしながら、これらの症状が現れた時には進行がんであることが多い。したがって、血液診断のように簡易的で非侵襲的な診断方法が腎がんの早期発見には必要とされている。しかし現在、腎がんに適用されている血液診断は存在しない。

外科的切除は局所腎がんの最も有効な治療方法である。転移のある腎がんに対してはインターフェロン- $\alpha$ やインターロイキン-2 のようなサイトカインを用いた免疫療法が使われるが、その奏効率は 11-26%しかない(Garcia & Rini, 2007)。スニチニブやテムシロリムスなどの分子標的薬が転移性腎がんの治療法として最近 FDA に認可されたが、スニチニブとテムシロリムスそれぞれの奏効率は 31%と 8.6%である。このように腎がんに対する新しい薬が徐々に開発されて、腎がんの治療に使用されている(Bullock, McDermott, & Atkins, 2010)。それゆえ、投薬中の患者のがん組織の縮小や増大をモニタリングする経過観察用マーカーの開発も重要となってくる。実際、臨床現場で実用化されているほとんどの腫瘍マーカーはこの目的のために使用されている(Coussy et al., 2011; Yakabe et al., 2010; Yamamoto et al., 2010)。

これまでに腎がんのバイオマーカー探索を目的とした研究が行われてきたが(Eichelberg, Junker, Ljungberg, & Moch, 2009; Semenza, 1998)、腎がんの初期診断や経過観察のために用いられる臨床マーカーは存在しなかった。第 2 章において NBS 法(E. Matsuo, Watanabe, Kuyama, & Nishimura, 2009) を用いて腎がん組織のプロテオーム解析を行い、多くの腎がん関連タンパク質を同定してきた。もし

腎がんで高発現しているタンパク質が血液へ漏出していたら、それは血中腫瘍マーカーとなりうる。NBS 法によって腎がんでの高発現が確認できた aldolase A や pyruvate kinase isozymes M1/M2 は腎がん患者の血液中で高濃度に存在していることが報告されている(Nisman et al., 2010; Roigas et al., 2001; Takashi, Zhu, Nakano, Miyake, & Kato, 1992a)。そこで我々は、他の腎がん組織高発現タンパク質でも腎がん患者の血中で高濃度に存在すれば、そのうちのいくつかは腫瘍マーカーの有力な候補となりうると思った。本研究では、腎がん組織で高発現していたタンパク質の血中濃度を測定して、腎がんの初期診断用マーカーや、再発、薬効等のモニタリングのための経過観察用マーカーとして使える可能性があるかどうかを調べることにした。

過去に腎がんを含めたすべての臓器のがん組織においても腎疾患組織においても高発現していることが確認されていないタンパク質が腎がん特異的なマーカーとなりうる。第 2 章のプロテオーム解析により示された腎がん高発現タンパク質の中では、6-phosphofructokinase, liver type (解糖系酵素、Cytoplasm)、CNDP dipeptidase 2 (ペプチド分解酵素、Cytoplasm)、Four and a half LIM domains protein 1 (筋肉発生への関与が示唆されている、Cytoplasm)、PRA1 family protein 3 (ゴルジ体からの小胞形成に関与、Cytoplasm)、lectin, mannose-binding 2 (分泌経路における細胞内レクチン、Golgi apparatus) の 5 種類のタンパク質が、過去にすべての臓器のがん組織においても腎疾患組織においても高発現していることが確認されていないタンパク質であったため、これらの 5 種類のタンパク質が、もし腎がん患者の血漿で高濃度に存在していたならば、腎がん特異的なマーカーとなりうる。しかし、これら 5 種類のタンパク質だけ血中濃度解析を行っても、腎がんに対する診断マーカーとして有用な特性を示さないリスクもある。腫瘍マーカーが存在しない腎がんの血中腫瘍マーカーを一つでも探し出すという観点から、腎がん特異的のみならず、他のがんも含めた広域な腫瘍マーカーの可能性も含めて、可能な限り広く、マーカーとなりうるタンパク質を探し出すために、過去に腎がん患者において血中濃度が増加していたと報告されていた Fibronectin, aldolase A, Pyruvate kinase isozymes M1/M2(Oremek, Teigelkamp, Kramer, Eigenbrodt, & Usadel, 1999a; Takashi, Zhu, Nakano, Miyake, & Kato, 1992b; Yokomizo et al., 2012a)を除外した 31 種類のタンパク質の中で ELISA 測定系の構築を試みることから始めた。

## 実験材料・方法

### 臨床サンプル

末梢血サンプルは EDTA-2K の入った真空管に集めて、3,000 rpm で 10 分間遠心した。上清の血漿は測定前まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。臨床データは Table 4 にまとめた。コントロールサンプルは悪性腫瘍の無いことが確認された 51 名の健常ボランティアから採血した。腎がん血漿サンプルは術前の 15 患者と術後 1 (n=14)、2 (n=14)、4 (n=13)、12 (n=8) 週目の患者から得られた。そのうち、手術中に遠隔転移があった患者は 4 症例であった。健常者と腎がん患者の性別の割合と年齢層はほぼ同レベルであった。この研究は、武庫川女子大学、兵庫県立尼崎病院、六甲病院、姫路獨協大学の倫理委員会から承認され、患者や健常者から同意書を得て実施された。

### サンドイッチ ELISA による血漿中タンパク質の測定

$\gamma$ -enolase の測定は市販の ELISA キット('CanAg NSE EIA'; FUJIREBIO Diagnostics, Malvern, PA)を用いて、その手順書通りに実施した。他のタンパク質については下記の通りである。

galectin-1 と galectin-3 の捕捉抗体の固相化は IMMUNO-TEK ELISA Construction System (ZeptoMetrix, Buffalo, NY)を用いて、その手順書通りに実施した。捕捉抗体は Table 5 に記載の濃度まで希釈し、それを 1 ウェルにつき 100  $\mu\text{L}$  入れることで固相化した。一方、 $\alpha$ -enolase、calnexin、CNDP dipeptidase 2、lectin mannose-binding 2、MHC class I antigen A、triosephosphate isomerase に関しては、まず捕捉抗体を炭酸バッファー(16 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 34 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6)で Table 5 に記載の濃度まで希釈した溶液を 96 ウェルプレート (maxisorp) に 100  $\mu\text{L}$  ずつ入れてプレートシールで蓋をした。 $4^{\circ}\text{C}$  オーバーナイトでインキュベーションした後、10% bovine serum albumin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を含む炭酸バッファーを各ウェルに 200  $\mu\text{L}$  ずつ入れて、室温 2 時間でブロッキングを行うことでサンドイッチ ELISA 用の抗体プレートを作製した。

血漿サンプルは ELISA reaction buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 400 mM NaCl, 0.1% Tween-20)を用いて Table 5 に記載の希釈率まで希釈した。標準タンパク質は ELISA reaction buffer で段階希釈した。希釈された血漿サンプルと標準タンパ

ク質は1 ウェルにつき 100  $\mu$ L ずつ抗体プレートに入れて、室温 1 時間インキュベートした。ELISA reaction buffer 200  $\mu$ L でウェルを 6 回洗浄した後、HRP 標識された検出抗体 ( $\alpha$ -enolase と galectin-3)、AP 標識された検出抗体 (galectin-1)、もしくは HRP 標識していない検出抗体 (calnexin、CNDP dipeptidase 2、lectin mannose-binding 2、MHC class I antigen A、triosephosphate isomerase) を 100  $\mu$ L ずつプレートに入れて室温 1 時間インキュベーションした。 $\alpha$ -enolase と galectin-3 で用いた検出抗体の HRP 標識はキット(Peroxidase Labeling Kit-SH, Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)を用いて行った。galectin-1 で用いた検出抗体の AP 標識はキット(Alkaline Phosphatase Labeling Kit – NH<sub>2</sub>, Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)を用いて行った。酵素標識していない検出抗体の ELISA 操作では、さらに ELISA reaction buffer 200  $\mu$ L で 6 回洗浄後、HRP 標識された 2 次抗体を 100  $\mu$ L ずつプレートに入れて室温 1 時間インキュベーションした。ELISA reaction buffer 200  $\mu$ L で 6 回ウェルを洗浄した後、標識酵素の種類に応じて発色を行った。HRP に関しては、HRP 発色試薬(TMB Two Component HRP Microwell Substrate; BioFX Laboratories, Owing Mills, MD) 100  $\mu$ L をプレートに入れて、室温 15 分間発色させた。1 N 塩酸を 100  $\mu$ L 加えることにより発色反応を止めた後、MTP-450Lab (CORONA ELECTRIC, Ibaraki, Japan)を用いて 450 nm と、リファレンスとして 595 nm の吸光度を測定した。AP に関しては、AP 発色試薬 (AP-Blue SpectraFX Microwell and/or Membrane Substrate; BioFX Laboratories) 200  $\mu$ L をプレートに入れて室温 30 分間発色させた。BioFX AP Stop Solution (BioFX Laboratories) を 50  $\mu$ L 加えることにより発色反応を止めた後、MTP-450Lab を用いて 595 nm の吸光度を測定した。

ELISA に用いた標準タンパク質と抗体の濃度および希釈率は Table 5 にまとめた。ELISA の正確性は添加回収試験で評価された。この試験は既知の量の標準タンパク質を血漿サンプルに添加することによって行われた。回収率は理論値に対する実測値の割合で計算された。

#### データ解析

腎がん患者と健常者間の各タンパク質濃度を比較するために Mann-Whitney test が用いられた。この検定は両側検定で行い、有意差を決定する P 値は  $P < 0.05$  に設定した。各タンパク質の診断能力の評価と、カットオフ値を決めるために、ROC 曲線 (受信者動作特性曲線) をプロットした。腎がんの外科的摘出手術前

と摘出手術後の患者の各タンパク質濃度変化は Bonferroni 補正 Wilcoxon signed-rank test を用いて評価した。5 グループ間の比較をするために、補正していない場合の  $P < 0.05$  の有意差に相当する  $P < 0.01$  を Bonferroni 補正の有意差とした。統計解析とグラフ作製は JMP software version 8 (SAS Institute, Cary, NC) を使って行われた。

## 結果

### 3-1-1 サンドイッチ ELISA の構築

血中濃度測定の対象とするタンパク質としては、まず、Figure 5 で示されている、がんと腎疾患を含めて新規に高発現していることを示したタンパク質の 5 種類を選んだ。これらの ELISA 測定系の構築を試みたが、そのうち CNDP dipeptidase 2 と lectin, mannose-binding 2 は ELISA 測定系を構築でき、かつ、血漿で測定可能だったため、これら 2 種類のタンパク質の血漿中濃度を測定することにした。さらに、測定対象タンパク質を増やすため、過去の血中濃度解析の報告を調べた (Figure 8)。プロテオーム解析で高発現が示された 34 種類のタンパク質の中で、がん患者において血中濃度が増加していると報告されているタンパク質は 9 種類あり、その中で腎がん患者において血中濃度が増加していると報告されているタンパク質は 3 種類あった (Barrow, Rhodes, & Yu, 2013; Henry et al., 2013; Huang et al., 2010; Iurisci et al., 2000a; Liao, Wu, Wang, Tien, & Lin, 2009; Limmahakhun et al., 2011; Lüftner et al., 2003; Oremek, Teigelkamp, Kramer, Eigenbrodt, & Usadel, 1999b; Ruiz-Garcia et al., 2010; Saussez, Lorfèvre, et al., 2008a; Schneider, Morr, Velcovsky, Weisse, & Eigenbrodt, 2000; Takashi, Zhu, Nakano, Miyake, & Kato, 1992c; Watanabe et al., 2011; Wong & Luk, 2012; Xie et al., 2012; Yokomizo et al., 2012b; X. Zhang et al., 2009; Zimmermann et al., 2012)。そして、大半の 23 種類のタンパク質が過去にがん患者において血中濃度との相関が報告されていないタンパク質だった。報告が無い理由は、調べられていない、がんと関連性が無い、もしくは、血中に存在しない、測定検出限界以下といったことが挙げられるが、どちらかは不明である。過去にがん患者において血中濃度との相関が報告されていないタンパク質ゆえ、腎がん特異的なマーカーになる可能性を秘めているが、逆に、ELISA 測定系を構築しても血漿中に存在しないというリスクも抱える。腫瘍マーカーが存在しない腎がんの血中腫瘍マーカーを一つでも探し出すという観点から、腎がん特異的のみならず、他のがんも含めた広域な腫瘍マーカーの可能性も含めて、可能な限り、広く、マーカーとなりえるタンパク質を探し出すために、すでに腎がん患者において血中濃度解析が行われていたタンパク質 3 種類を除外した 31 種類のタンパク質を対象に ELISA 測定系の構築を試みた。その結果、8 種類のタンパク質 ( $\alpha$ -enolase, calnexin,

CNDP dipeptidase 2, galectin-1, galectin-3, lectin mannose-binding 2, MHC class I antigen A and triosephosphate isomerase)に対するサンドイッチ ELISA の作製に成功した。それぞれのタンパク質に対する検量線は Table 6 に記載されている範囲において二次関数曲線で引かれた (相関係数:  $R^2 \geq 0.998$ )。検出限界の下限は 3 つのブランクの平均値+2×SD 値と設定した。測定値が検出限界以下であった場合は、そのサンプル値は”0”と定義した。添加回収試験は Table 6 に示してある希釈率で血漿を希釈したサンプルで行った。各 ELISA の回収率は 81.0-108%の範囲であったことから、これら構築した ELISA は十分な正確性があることが確認された。哺乳類の enolase は 3 種類のアイソフォーム ( $\alpha$ -enolase と  $\beta$ -enolase と  $\gamma$ -enolase) があり、それらはお互いに相同性がある。例えば、 $\alpha$ -enolase と  $\gamma$ -enolase の間では 83.5%のアミノ酸配列で相同性がある。そのため、 $\alpha$ -enolase ELISA では他の 2 つのアイソフォームに対する交差性を調べた。その結果、 $\beta$ -enolase との交差性は 0.00%であり、 $\gamma$ -enolase との交差性は 1.41%であったため、ほとんど無視できるレベルであることが確認された。また、galectin-1 と galectin-3 も同じファミリーに属するため、お互いのタンパク質に対するサンドイッチ ELISA の交差性を調べた。その結果、galectin-1 に対する galectin-3 ELISA の交差性は 0.00%で、galectin-3 に対する galectin-1 ELISA の交差性も 0.00%であることがわかった。galectin-1 および galectin-3 のサンドイッチ ELISA はお互いに交差性がないことが示された。

### 3-1-2 腎がん患者と健常者の各タンパク質の血中濃度の比較

上記の ELISA を用いて、8 つのタンパク質について腎がん患者 15 症例と健常者 51 症例の血漿中濃度を測定した (Figure 9)。 $\alpha$ -enolase と calnexin、galectin-1、galectin-3、lectin mannose-binding 2 の血漿中濃度は健常者よりも腎がん患者の方で統計的に有意に高かった。しかし、calnexin に関しては腎がん患者よりも健常者の方が calnexin 濃度最大値は高かった。lectin mannose-binding 2 に関しても、健常者群で高濃度患者が複数存在した。今回測定した健常者の症例数が腎がん患者数に比べて 3 倍近く多いため、健常者群の方が確率的に高濃度の症例が多く出てくることはあるが、それを考慮してもこれら二つのタンパク質は、腎がん診断における特異性という点で有効性が低いと考えられる。

### 3-1-3 腎がん患者と健常者の各タンパク質の受信者動作特性



腎がん患者群と健常者群との間で統計学的に有意な差があっても、それだけでは有効な腫瘍マーカーとは到底言えない。感度と特異性の評価、つまり、健常者と腎がん患者が混在する中で健常者の偽陽性を少なくし、かつ、腎がん患者の陽性率が高いタンパク質を選別することが必要である。腎がん患者を正しく判定できるかどうかを調べるために、これら5つのタンパク質のROC曲線を描いた(Figure 10)。ROC曲線以下の面積(AUC)は calnexin と galectin-1、galectin-3、lectin mannose-binding 2 で 0.7 以上だった。しかしながら、calnexin と lectin mannose-binding 2 は Figure 9 で示されたようにいくらかの健常者で高い濃度を示していた。この2つのマーカーは高い確率で擬陽性を検出してしまう。一方、galectin-1 と galectin-3 は 80-100%の Specificity の範囲において calnexin と lectin mannose-binding 2 よりも高い Sensitivity を示した。このことから、galectin-1 と galectin-3 は腎がん患者と健常者を区別するための診断マーカーとしてより好適であることがわかった。

#### 3-1-4 galectin-1 と galectin-3 の診断能力

galectin-1 と galectin-3 の診断マーカーとしての有用性を調べるために、Youden Index(YOUDEN, 1950)が一番高い値 (galectin-1 : 48.4 ng/mL、galectin-3 : 18.4 ng/mL) を各タンパク質のカットオフ値に定めた。これらのカットオフ値を用いると galectin-1 と galectin-3 の Specificity は 82%(42/51)と 92%(47/51)で、Sensitivity は 53%(8/15)と 60%(9/15)だった (Figure 9A, B)。次に、galectin-1 と galectin-3 の関連を調べるために散布図を作成した (Figure 11)。この図を見ると、腎がん患者は galectin-1 と galectin-3 の両方が高濃度を示していることがわかる。galectin-1 と galectin-3 の両方のカットオフ値以上の検体を陽性と設定すると、その Specificity は 98%(50/51)で Sensitivity は 47%(7/15)であった。このことから、galectin-1 と galectin-3 を組み合わせることによって腎がん診断の精度、特に Specificity の点で、改善されることがわかった。

galectin-1 と galectin-3 の単独、およびそれらの組み合わせによる診断能力を pT クラス別に分けて比較すると、Control と比べて pT1 の陽性率が高いことが分かった (Figure 12)。その中でも galectin-3 単独、および galectin-1 と galectin-3 の組み合わせは偽陽性を抑えつつ、初期の pT1 から腎がん患者を診断できる能力が高いことが分かった。100%の診断率を持つ腫瘍マーカーはこれまで存在していない。pT1 の陽性率は 33%や 56%ではあるが、現在臨床で使用されている PSA

の陽性率が 36～50%であることから(Bunting, 2002)、galectin-1 と galectin-3 は初期診断用マーカーとしての利用の可能性を示唆している。

### 3-1-5 外科的摘出前後における腎がん患者の血漿タンパク質の変化

外科的摘出前後の腎がん患者における血漿タンパク質濃度の時間経過を追った。CNDP dipeptidase 2 と lectin mannose-binding 2、triosephosphate isomerase の血漿中濃度は術後 1 週目や 4、12 週目で一時的ではあるが減少傾向が見られた (Table 7)。 $\alpha$ -enolase 濃度のみが術後 4 週間後で統計的有意に減少しており、その低濃度状態が 12 週目も続いていた (Table 7)。 $\alpha$ -enolase は前述したようにコントロールよりも腎がん患者の方が統計的有意に高値を示しており、腫瘍マーカー応用の可能性を有している (Figure 9)。このことから、我々はさらに腎がん患者の個々の $\alpha$ -enolase 濃度の変化を調べた。カットオフ値は前述のヨーデンインデックスを用いて 122 ng/mL と設定したところ、術前の腎がん患者に対して 88%(42/51)の Specificity と 47%(7/15)の Sensitivity を示した (Figure 13A)。術前でカットオフ値よりも高い値を示していた 7 症例の中で、術後に採血できなかった 1 症例を除く 6 症例の $\alpha$ -enolase 濃度が術後 4 週目と 12 週目で大きく減少した。さらにその 6 症例のうち 5 症例の $\alpha$ -enolase 濃度は術後 4 週目でカットオフ値を下回っていた。過去の文献で、 $\alpha$ -enolase と同じファミリーの一つである $\gamma$ -enolase が腎がんのマーカー候補として報告されている(Takashi et al., 1988)。 $\gamma$ -enolase も腎がんマーカーになりうるか確かめるために、今回使用された検体の $\gamma$ -enolase 濃度を測定した。腎がん患者と健常者で $\gamma$ -enolase 濃度に統計的有意な差は無かった (Figure 9I)。しかしながら、腎がん患者の術前と術後 12 週目のサンプルでは、統計的有意差ではないけれども減少傾向が見られた (Figure 13B; P=0.0391)。

Table 4

血中濃度測定研究で測定された健常者と腎がん患者の特徴。腎がん患者は pT クラス、遠隔転移、がん局在で分類した。

<b>Healthy volunteers</b>	
Number	51
Female (%)	15 (29)
Male (%)	36 (71)
Age, Mean (range)	62.8 (40-82)
<b>RCC patients</b>	
Number	15
Female (%)	3 (20)
Male (%)	12 (80)
Age, Mean (range)	65.1 (39-79)
<b>pT classification</b>	
pT1	9
pT2	2
pT3	4
<b>Distant metastasis</b>	
w/o	11
w/	4
<b>Tumor location</b>	
Left	6
Right	9

Table 5

## ELISA に用いたスタンダードタンパク質と抗体

リコンビナントタンパク質は検量線を引くために用いられた。捕捉抗体と検出抗体は各抗体名の下段に記載されている濃度で使用された。HRP もしくは AP で標識されていない検出抗体に関しては、2 次抗体をそれぞれ下記に記載されている希釈率で使用された。

タンパク質名	リコンビナントタンパク質	捕捉抗体	検出抗体	2 次抗体
$\alpha$ -enolase	Recombinant ENO1 (Abnova)	Mouse anti-human $\alpha$ -enolase mAb (Abnova) 3 $\mu$ g/mL	Rabbit anti-human $\alpha$ -enolase pAb (Proteintech Group, Chicago, IL) 0.2 $\mu$ g/mL	-
Calnexin	Recombinant Calnexin (assay designs, Ann Arbor, MI)	Rabbit anti-human Calnexin pAb (GenScript USA Inc, Piscataway, NJ) 5 $\mu$ g/mL	Mouse anti-human Calnexin mAb (BD, Franklin Lakes, NJ) 4 $\mu$ g/mL	Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1/10000
CNDP dipeptidase 2	Recombinant CNDP2 (R&D Systems)	Rabbit anti-human CNDP2 pAb 5 $\mu$ g/mL	Sheep anti-human CNDP2 pAb (R&D Systems) 0.5 $\mu$ g/mL	Anti-Sheep IgG HRP (Invitrogen) 1/50000
galectin-1	Recombinant galectin-1 (Abnova, Taiwan)	Rabbit anti-human galectin-1 pAb ( R&D Systems, Minneapolis, MN) 5 $\mu$ g/mL	Mouse anti-human galectin-1 mAb (Abnova) 0.5 $\mu$ g/mL	
galectin-3	Recombinant galectin-3 (Abnova)	Rabbit anti-human galectin-3 pAb (R&D Systems) 5 $\mu$ g/mL	Mouse anti-human galectin-3 mAb ( R&D Systems) 0.1 $\mu$ g/mL	
Lectin mannose-binding 2	Recombinant LMAN2 (Abnova)	Rabbit anti-human LMAN2 pAb (Aviva Systems Biology ) 5 $\mu$ g/mL	Mouse anti-human LMAN2 mAb (Abcam, Cambridge, UK) 1 $\mu$ g/mL	Anti-Mouse IgG HRP (Invitrogen) 1/10000
MHC class I antigen A	Recombinant HLA-A (Abnova)	Rabbit anti-human HLA-A pAb (Proteintech Group) 5 $\mu$ g/mL	Goat anti-human HLA-A pAb (Santa cruz biotechnology, Santa cruz, CA) 0.5 $\mu$ g/mL	Anti-Goat IgG HRP (Invitrogen) 1/50000
Triosephosphate isomerase	Recombinant TPI1 (Abnova)	Mouse anti-human TPI1 mAb (Abnova) 3 $\mu$ g/mL	Rabbit anti-human TPI1 pAb (Proteintech Group) 0.1 $\mu$ g/mL	Anti-Rabbit IgG HRP (Invitrogen) 1/50000

**がん患者において血中濃度が増加していると報告されているタンパク質⇒9種類**

Galectin-1(大腸がん、頭頸部がん、甲状腺がん), Galectin-3(乳がん、胃がん、肺がん、卵巣がん、大腸がん、頭頸部がん、甲状腺がん、膵臓がん), Heat shock protein beta-1(非小細胞性肺がん、胃がん、膵臓がん), LDH(骨肉腫), Triosephosphate isomerase(肺がん), Vimentin(肝がん)

**腎がん患者において血中濃度が増加していると報告されているタンパク質⇒3種類**

Fibronectin, aldolase A, Pyruvate kinase isozymes M1/M2

**がん患者において血中濃度が減少していると報告されているタンパク質⇒2種類**

HLA-A(胃がん), HLA-B(胃がん)

**がん患者において血中濃度との相関が報告されていないタンパク質⇒23種類**

6-phosphofructokinase type C, 6-phosphofructokinase, liver type, Alpha-crystallin B chain,  $\alpha$ -enolase, Annexin A4, Apolipoprotein A-I precursor, Calnexin, CNDP dipeptidase 2, Ezrin, Fibrinogen gamma chain, Four and a half LIM domains protein 1, Glucosidase 2 subunit beta, GAPDH, Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1, Lamin-A/C, Phosphoglycerate mutase 1, Plectin-1, PRA1 family protein 3, Prostaglandin E synthase 3, Reticulocalbin-1, Retinal dehydrogenase 1, Tripeptidyl-peptidase 1, lectin, mannose-binding 2

Figure 8

NBS 法により示された高発現タンパク質の中で、過去の論文でがん患者の血中濃度が解析されているタンパク質

プロテオーム解析で高発現が示された 34 種類のタンパク質の中で、がん患者の血中濃度解析に関する過去の報告を調べた。赤字で示したタンパク質は本研究で解析可能だったタンパク質を示す。

Table 6

構築された ELISA の基本的な測定性能評価の結果

タンパク質名	Swiss-Prot accession no.	検量線範囲 (ng/mL)	検出限界 (ng/mL)	血漿希釈率 (%)	回収率 (%)
$\alpha$ -enolase	P06733	0.625-40	0.534	5	108
Calnexin	P27824	12.5-200	2.59	20	81.9
CNDP dipeptidase 2	Q96KP4	6.25-800	4.83	2	94.1
Galectin-1	P09382	1.95-125	0.0273	10	96.1
Galectin-3	P17931	0.313-40	0.275	10	81.0
Lectin mannose-binding 2	Q12907	23.4-3000	3.90	5	83.8
MHC class I antigen A	P18462	25-1600	20.0	20	81.2
Triosephosphate isomerase	Q14773	12.5-1600	0.617	5	89.7

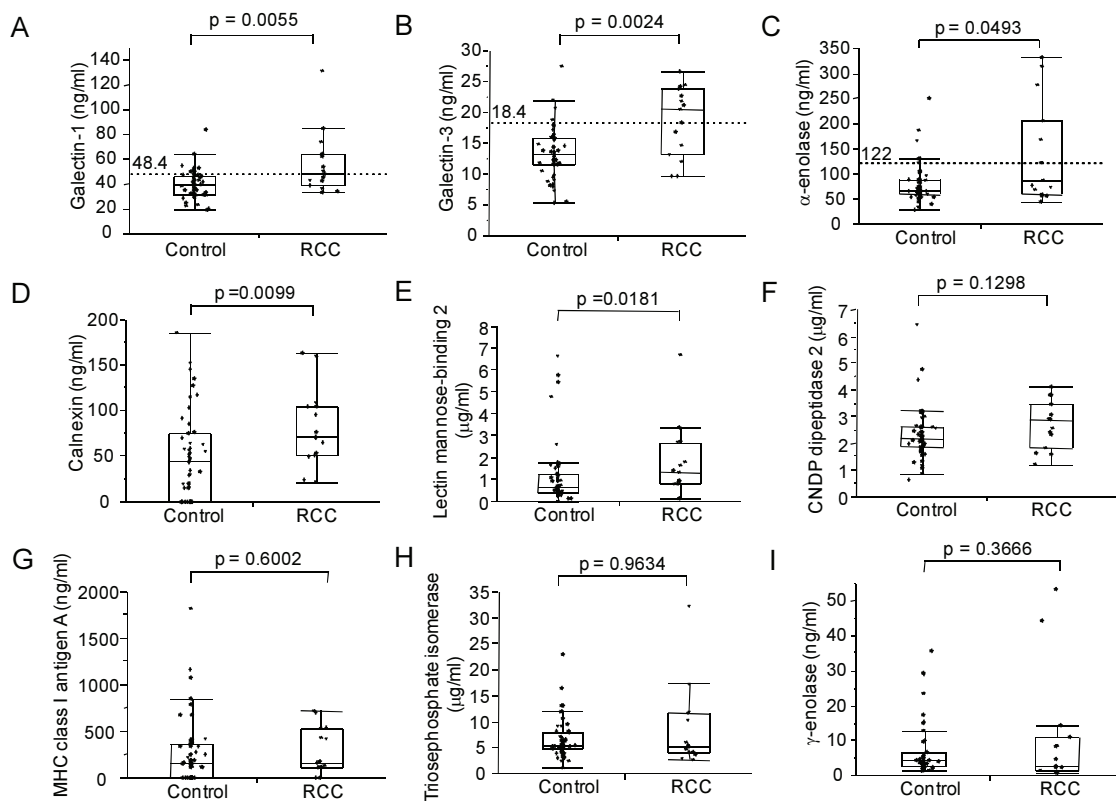


Figure 9

健常者群と腎がん患者群間の各血漿中タンパク質濃度の比較

健常者と腎がん患者の galectin-1 (A)、galectin-3 (B)、α-enolase (C)、calnexin (D)、lectin mannose-binding 2 (E)、CNDP dipeptidase 2 (F)、MHC class I antigen A (G)、triosephosphate isomerase (H)およびγ-enolase (I)の血漿中濃度をプロットした。各濃度値の分布は箱ひげ図で表した。箱の上辺と下辺は四分位範囲を示す。箱の中間線は中央値を示す。ひげの両端は箱の下辺（もしくは上辺）から四分位範囲の 1.5 倍以内の範囲にある最小値（もしくは最大値）を示す。P 値は Mann-Whitney test で計算して、術前の腎がん患者群と健常者群との各タンパク質濃度を比較した。galectin-1 (48.4 ng/mL)、galectin-3 (18.4 ng/mL)およびα-enolase (122 ng/mL)のカットオフ値は破線で示された。

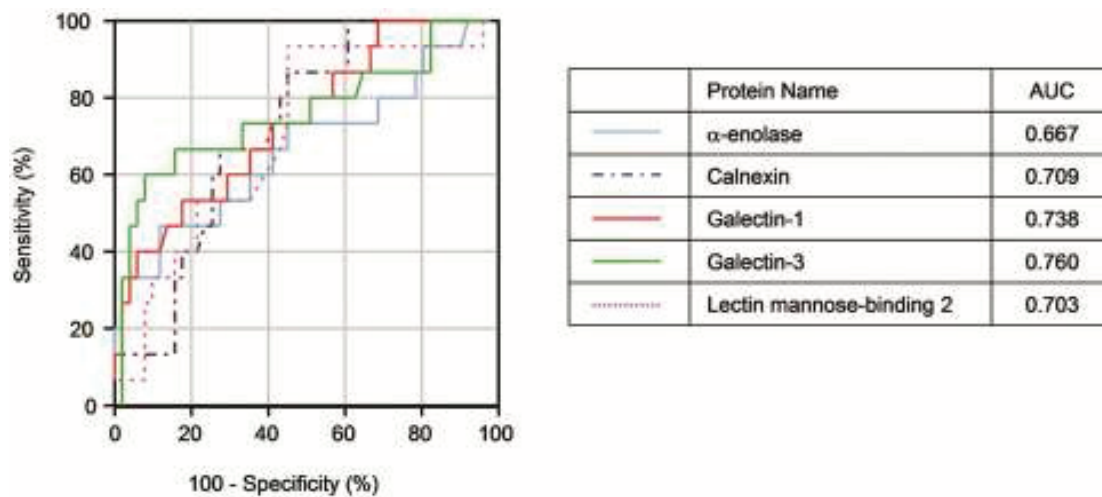


Figure 10

腎がん患者検出評価のための $\alpha$ -enolase、calnexin、galectin-1、galectin-3 および lectin mannose-binding 2 の ROC 解析

ROC 曲線は左のパネルで示され、ROC 曲線以下の面積 (AUC) は右のパネルにリスト化した。



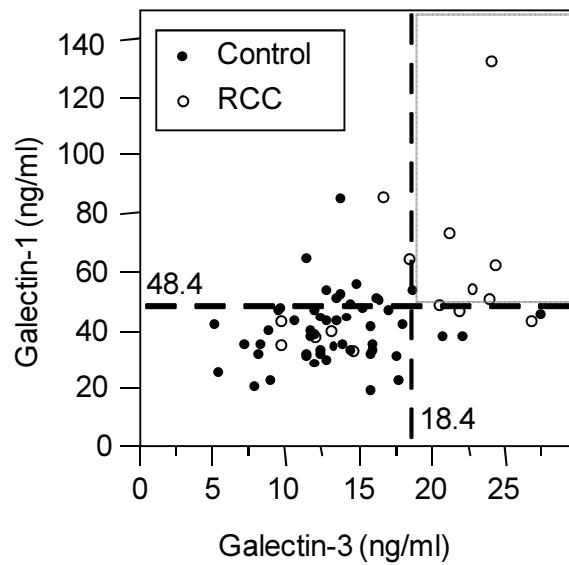


Figure 11

血漿中 galectin-1 濃度と galectin-3 濃度の相関

各検体における galectin-1 と galectin-3 の濃度をドットプロットで表した。各 galectin のカットオフ値は破線で示された。カットオフ値以上の区域を灰色の線で囲った。○は健常者を、●は腎がん患者を表す。

## 陽性率

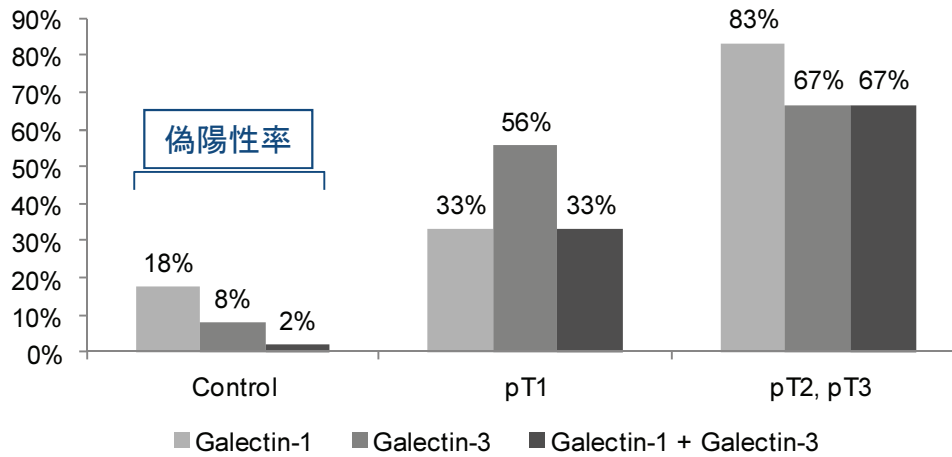


Figure 12

pTクラス別の galectin-1 と galectin -3 診断能力評価

健常者 (control) と腎がん患者 (pT1 および pT2, pT3) の galectin-1 濃度、および galectin-3 濃度がカットオフ値 (galectin-1 ; 48.4 ng/mL、galectin-3 ; 18.4 ng/mL) 以上だった症例を陽性とした時の陽性率を棒グラフで示した。

Table 7

腎がん患者の術前術後における ELISA 測定とそれらの統計解析  
術前 (Before surgery) と術後 (After surgery) における腎がん患者の血漿中濃度を表にした。各群の濃度値は中央値と四分位範囲 (IQR) で示した。P 値†は Bonferroni-adjusted Wilcoxon signed-rank test で計算して、腎がん患者における術前術後の変化を調べた。0.01 以下の P 値(P < 0.01)は太字で表した。

Protein Name	Before surgery (n=15)	After surgery				P 値† (Before vs 12 weeks)			
	中央値; IQR	1 week (n=14) 中央値; IQR	2 weeks (n=14) 中央値; IQR	4 weeks (n=13) 中央値; IQR	12 weeks (n=8) 中央値; IQR				
$\alpha$ -enolase (ng/mL)	87.7; 60.7-206	77.6; 57.8-245	0.358	134; 64.7-315	0.194	68.2; 53.7-87.6	<b>0.0034</b>	62.6; 49.5-80.7	0.0156
Calnexin (ng/mL)	70.9; 51.2-104	60.5; 38.2-109	0.104	75.4; 45.8-114	0.851	69.0; 44.5-162	0.685	91.8; 19.5-159	0.945
CNDP dipeptidase 2 ( $\mu$ g/mL)	2.88; 1.82-3.48	2.57; 1.82-3.36	0.0134	2.83; 2.30-3.40	1.00	2.85; 1.15-3.34	0.893	2.40; 1.49-3.27	0.742
Galectin-1 (ng/mL)	48.5; 39.1-64.6	60.4; 52.1-70.9	0.194	77.2; 61.6-110	0.0353	67.1; 54.1-92.2	0.0942	69.9; 54.9-81.1	0.250
Galectin-3 (ng/mL)	20.5; 13.1-23.9	18.6; 13.2-22.4	0.808	20.3; 15.1-27.7	0.0295	17.6; 14.9-26.0	0.893	22.3; 12.3-24.7	0.547
Lectin mannose-binding 2 ( $\mu$ g/mL)	1.34; 0.860-2.71	1.01; 0.565-1.52	0.0203	1.15; 0.744-1.70	0.497	1.27; 0.848-1.71	0.414	1.00; 0.672-2.11	1.00
MHC class I antigen A (ng/mL)	170; 114-534	130; 0.00-396	0.151	202; 107-526	0.695	373; 80.2-728	0.520	461; 0.00-778	1.00
Triosephosphate isomerase ( $\mu$ g/mL)	5.31; 4.06-11.7	5.11; 3.32-10.9	0.426	6.66; 5.09-12.7	0.326	4.20; 3.09-6.24	0.0266	3.58; 2.62-4.44	0.0156

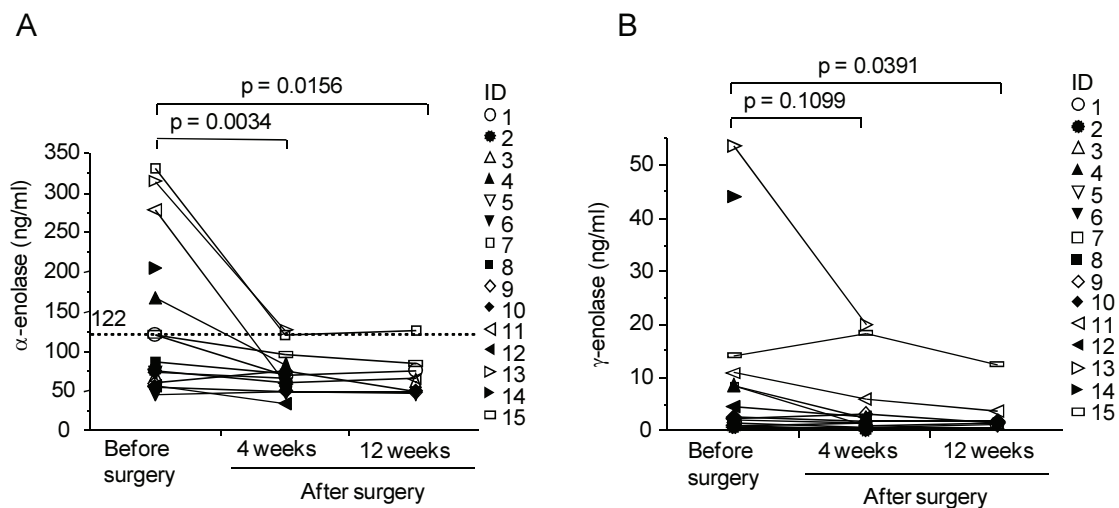


Figure 13

腎摘除術前後における $\alpha$ -enolase 濃度と $\gamma$ -enolase 濃度の変化

腎摘除術前と術後 4 週間後、および 12 週間後における血漿中の $\alpha$ -enolase 濃度 (A)と $\gamma$ -enolase 濃度(B)の変化を折れ線グラフで表した。術後 1、および 2 週間後の血中濃度は大きくばらついていたので、ここでは示されていない。 $\alpha$ -enolase のカットオフ値は 122 ng/mL とし、破線で示した。

## 考察

本研究の目的は腎がんの新たな血中マーカーを見つけることである。我々は小さいサンプルサイズからの結果ではあるが、術後経過観察や初期診断で利用可能性がある3種類の有力なマーカータンパク質を発見した。

腎がんの診断方法として、血中の腫瘍マーカーは現在存在していない。他の臓器のがんに関しては、これまでに大腸がんや胃がんなどで用いられるCEAや前立腺がんの特異的なPSAなどが臨床で使用されている。現在の臨床現場で使用されている腫瘍マーカーの利用方法は主に2通り存在する。一つは早期検診マーカーとしての役割で、定期健康診断等で実施され、基準値を超えた被験者には、より正確な詳細検査を実施する、といった、一次スクリーニングとして用いられる。現在、早期検診マーカーとして有効な腫瘍マーカーは前立腺がんのPSAただ一つである。PSAは臓器特異的であり、前立腺がんの場合のみ有効なマーカーであるため、がんが発症している臓器を特定しやすい特徴を持つ。PSAのカットオフ値は主に4 ng/mLと10 ng/mLの2種類用いられており、4~10 ng/mLの範囲はグレイゾーンと呼ばれている。PSAは前立腺がん以外にも前立腺肥大でも血中濃度が高くなることが知られており、4~10 ng/mLのグレイゾーンは前立腺がんと前立腺肥大が混在している範囲となる。10 ng/mL以上であれば前立腺がんの可能性が非常に高いことになる。カットオフ値を4 ng/mLにした場合、平均的な感度と特異度はそれぞれ71%、75%となり、10 ng/mLでは36~50%の感度と93~96%の特異性を示している(Bunting, 2002)。グレイゾーンに対処するために臨床現場でよく用いられている方法として、total PSAとfree PSAを用いた前立腺がんスクリーニングがあり、効率良くがん患者と非がん患者を識別し前立腺がん早期発見へと繋げる手段として広く利用されている。血中のPSAは、主に $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン(ACT)と結合した結合型PSA(PSA-ACT)と $\alpha$ -2マクログロブリン(AMG)との結合型PSA(PSA-AMG)および遊離型PSA(free PSA)の3タイプ型で存在すると報告されている。PSA-AMGは、PSA分子の表面がAMGによりすべて覆われているため、免疫学的方法を用いる測定は不可能である。したがって、血中のtotal PSAとはPSA-ACTとfree PSAの総和と考え、free PSA/total PSAの濃度比が25%以下の場合、前立腺がん陽性の患者と判断される。

もう一つは経過観察マーカーとしての役割で、がんの摘出手術の前と後で血中マーカー濃度を測定し、術後にマーカー値が減少した患者では、そのマーカーががんの指標として有効であると考え、術後のマーカー値の変動をモニタリングすることにより転移や再発をいち早く発見することができる。実際に臨床現場で用いられているマーカーは経過観察用マーカーが多い。CEAは大腸がんや胃がんなどの消化器系のがんに使用されている。CEAのカットオフ値を2.5 ng/mLとした場合の感度はステージ毎に異なり、大腸がんの場合Dukes' Aは28%、Dukes' Bは45%、Dukes' Cは75%、そしてDukes' Dは84%と、進行がんに対しては高感度になる(Duffy, 2001)。また、そのカットオフ値における特異度は87%であるため、早期がんを発見するための一次スクリーニングとしての有効性は低い。しかし、大腸がん摘出手術後の再発における感度は80%、肝転移における感度は96%と非常に高い検出率を示しているため、臨床現場では主に手術後の再発や転移の血中診断マーカーとして利用されている。

今回の重要な発見は血漿中 $\alpha$ -enolaseの腎がん経過観察用マーカーとしての利用可能性を示したことである。経過観察用マーカーは術後患者のがん転移や再発の発見や、薬の治療効果評価の目的で投薬中の患者のがんの状態をモニタリングするために必要である。がんによる主な死因は転移や再発であるため、がん治療薬の開発は重要である。それと共に、がんの進行状況をモニターできる腫瘍マーカーを見つけることも大切である。経過観察のために使用されるマーカーはがんの進行や退縮と並行して濃度が変動する分子である。 $\alpha$ -enolase陽性の腎がん患者のほとんどで、術後にその血漿中濃度がカットオフ値以下に減っていた。 $\alpha$ -enolase濃度が腎摘除術に応じて減少したため、その濃度ががんの再発や進行に伴って上昇することが推測される。これに関しては、今後の研究で確かめなければならない。CEAやCA15-3、CA125のような以前から臨床で用いられている腫瘍マーカーは手術後に有意な濃度低下を示しており、そういったマーカーは転移や再発のみならず、化学療法の効果モニタリングするためにも使われている(Finek J et al., 2005)。そのことから、血漿中の $\alpha$ -enolaseは新たに開発される治療薬(sunitinib、sorafenib、temsirolimusなど)の抗腫瘍効果を評価するための有効な指標となるかもしれない。

Enolaseは多くの生物種で発現されており、2-phospho-D-glycerateをphosphoenolpyruvateへ脱水変換させる解糖系の酵素である。哺乳類においては、3種類のアイソフォーム( $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -enolase)があり、ヘテロダイマー、もしくは

はホモダイマー ( $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\gamma\gamma$ ) として機能している。それらの発現量は組織特異的に制御されている。 $\alpha$ -enolase は肝臓や脳神経、脾臓、脂肪、そして腎臓などの組織に広く存在している。 $\beta$ -enolase は筋組織で、 $\gamma$ -enolase は神経組織で主に発現している。これまでに、頭頸部がんや肝がんで $\alpha$ -enolase が高発現していることが示されていた(Tsai et al., 2010)(Hamaguchi et al., 2008)。局在に焦点を当てると、乳がんや肺がん、膵臓がんにおいてがん細胞の表面に存在していることや、メラノーマ細胞や非小細胞肺がんではエクソソームによって分泌されることが報告されている(Capello, Ferri-Borgogno, Cappello, & Novelli, 2011)。これらの報告は、同様の分泌システムが腎がんで高発現している $\alpha$ -enolase を細胞外へ移行させて、結果として腎がん患者の血漿 $\alpha$ -enolase 濃度を増加させていることを示唆している。

高士らは、腎がん患者血清中の $\gamma$ -enolase 濃度が健常者の濃度よりも高く、摘出手術後にはその濃度が減少したことを報告した(Takashi et al., 1988)。我々のデータでは、腎がん患者の血漿中 $\gamma$ -enolase 濃度は健常者と比べても有意な違いはみられなかった。この矛盾の原因は不明であるが、一つの可能性としては血液サンプルの種類の違い、つまり我々は血漿を測定し、高士らは血清を測定したことが要因として考えられる。血漿サンプルと比べて、血清サンプルは血小板から漏出される内容物を多く含有しており(J. N. George, Thoi, McManus, & Reimann, 1982)、その中には $\alpha$ -enolase や $\gamma$ -enolase も含まれる(Marangos, Campbell, Schmechel, Murphy, & Goodwin, 1980)。したがって、 $\alpha$ -enolase や $\gamma$ -enolase の血中濃度を測定する時には、血小板由来の内容物の影響が少ない血漿を用いた方が好ましいと言える。血清ではなく血漿サンプルを使用したことが、我々の実験で $\alpha$ -enolase 濃度に差があり、高士らの実験では $\alpha$ -enolase 濃度に差が見られなかった理由だと考えられる。

この研究のもう一つの重要な発見は galectin-1 と galectin-3 の両方を用いることで高い特異性で腎がんを診断できる可能性がある点である。前立腺がんの初期診断で臨床的に用いられている PSA の診断能力は、カットオフ値を 10  $\mu\text{g/mL}$  とした場合 36-43%の感度と 93-96%の特異性を示している(Bunting, 2002)。galectin-1 と galectin-3 の組み合わせは47%の感度と 98%の特異性を示したことから、この二つの galectin の精度は PSA よりと同等、もしくはそれよりも高い結果であった。galectin は $\beta$ -ガラクトシドに親和性がある糖認識ドメインを持つ動物性レクチンのファミリータンパク質である。これまでに 15 種類の galectin ア

イソフォームが同定されている。それらは、細胞表面上や細胞外マトリックスにある糖タンパク質と相互作用することによって、細胞接着や免疫反応に寄与していることが知られている。がん細胞では、NFκB が galectin-1 の発現上昇を誘導していることが報告されている(Toscano et al., 2011)。最近の研究では galectin が細胞内外でがん形成やがん細胞の生存、血管新生、がん転移を調節していることが示唆されている(Liu & Rabinovich, 2005)。Galectin-1 や Galectin-3 は Ras の活性化を促進させる機能を持ち、がん細胞の異常な増殖を促す。また、Galectin-3 の高発現はアポトーシスを引き起こしにくくし、抗がん剤に対する耐性を強くする。また、がん転移にも関与していると言われ、Galectin-1 や Galectin-3 は細胞外へ分泌されて、Integrin へ結合することにより細胞間接着や細胞外マトリックスとの結合を阻害し、がん細胞を遊走し易くする。腎がんにおけるプロテインチップを用いた研究では、galectin-1 が正常腎組織と比べてがん組織で高発現していることが報告されている(Dihazi et al., 2007)。Dancer らはオンコサイトマやクロモフォブの腎がん細胞で強く高発現していることを確認している(Dancer, Truong, Zhai, & Shen, 2010)。このような報告や第2章の結果から考えると、血漿中における高濃度の galectin-1 と galectin-3 は、それらタンパク質を多く発現している腎がん細胞から漏出されたため引き起こされた可能性が高い。

がん患者血漿において galectin-1 や galectin-3 が高濃度である事象は他のがん組織でも報告がある。頭頸部がんや甲状腺がんでは galectin-1 と galectin-3 の両方が血中で高濃度であると報告されており(Saussez, Lorfèvre, et al., 2008b)(Saussez, Glinoe, et al., 2008)、乳がん、胃がん、肺がん、卵巣がんでは galectin-3 が高濃度であることが報告されている(Iurisci et al., 2000b)。また、大腸がんに関しても血中 galectin の臨床的なマーカー有効性も論じられている(Watanabe et al., 2011)。多くの研究において、様々なタイプのがん患者の血中で galectin-1 や galectin-3 が高濃度であると報告されていることから、galectin-1 と galectin-3 の血中濃度上昇は臓器特異性が無い。しかし逆に、これらは広範囲のがんに適用できるマーカーとして利用できる可能性を示している。一般的に、健康診断などで腫瘍マーカーが異常値を示した人は、続いて精密検査を受診することになる。臓器特異性の無い腫瘍マーカーであっても、血液検査で異常が見つかったあとの精密検査における画像診断で正確にがんの発症部位を特定することができる。したがって、広域ながんの腫瘍マーカーも十分に利用価値はあり、galectin-1 と galectin-3



は腎がんを含む広域ながんに対する腫瘍マーカーとしての利用可能性を示唆している。

本節の研究において、血漿中 $\alpha$ -enolase は腎がん患者の術後経過観察用に利用でき、galectin-1 と galectin-3 は高い Specificity で腎がんの初期診断マーカーとして利用できる可能性を示した。これらのタンパク質が腫瘍マーカーとして臨床現場で応用可能であるかどうかを検証するためには、さらに多くの症例数を用いた研究が必要である。しかしながら今回のスモールサイズの研究は、正確な臨床的腫瘍マーカーを必要としている腎がんにおいて初期診断や術後経過観察用のマーカーとして応用可能性のあるタンパク質を示した結果として大変価値がある。

## 第2節 マーカー候補タンパク質の細胞外移行の確認

### 諸論

第3章第1節で示されたように腎がん患者群と健常者群との比較や腎摘除術の前後における血中濃度変化の観察はマーカー候補タンパク質の血中診断マーカーとしての有効性を評価するために重要な方法である。一方、血液中には各臓器から分泌・排出されたタンパク質や脂質、糖などが混在しており、ヒト血漿は生物個体サンプルゆえの様々な外的要因からの影響を受けている。したがって、そのような影響を排除した環境下で腎がん細胞から血中へ分泌されることを直接的に立証する必要がある。ヒトからがん細胞と正常細胞を取り出して初代培養し、その培養上清を調べることは容易には出来ないため、すでに樹立されている細胞株を用いてマーカー候補タンパク質の分泌量を調べることにした。

第3章第1節において腎がん患者で高濃度を示した galectin-1 と galectin-3 が属する galectin ファミリーには約 130 アミノ酸からなる糖鎖結合ドメイン (CRD) を1つ持つタイプと2つの CRD から成るタイプが存在する。Galectin-3 は CRD を1つ持つタイプであるが、その中で唯一糖鎖とは結合しない別のドメインが繋がった構造を持つ。CRD を1つ持つタイプはダイマー形成によって2つの糖鎖と結合できる。2つの糖鎖結合ドメインを持つ galectin は細胞外に分泌されて、細胞表面にある糖鎖を認識し、細胞同士を架橋する役割を持つ。Galectin は小胞体とゴルジ体を通る、いわゆる古典的な分泌経路を通るためのシグナル配列は存在しない。しかし、いくつかの galectin は細胞から分泌されて細胞外で見つかっている。例えば、細胞内の galectin-3 は細胞膜へ移行し、細胞膜から押し出されることが報告されている。(Hughes, 1999)。また、galectin-3 がエクソソームに存在していることを証明している報告もある(Théry et al., 2001)。Galectin-3 の細胞外への分泌には calpain 4 が必要であるという報告もされている(Menon, Kang, & Beningo, 2011)。しかし、galectin-3 が細胞外へ分泌される明確な経路はわかっていない。

第3章第1節で、galectin-1 や galectin-3 は腎がん患者の血液で高濃度で存在していることが示され、それらは細胞外へ分泌されることも知られてはいたが、これまでの知見のように、シグナル配列の無い galectin がどのような機構で細胞外へ分泌されるのかは未解明である。Galectin のようにシグナル配列を持たない

タンパク質であっても、未知の分泌経路で細胞外へ分泌されるタンパク質が存在する可能性は高い。そこで我々は、第3章第1節において、健常者よりも腎がん患者の血漿で高濃度だったタンパク質が腎がん細胞から分泌されるかどうかを検証することにした。

## 実験材料・方法

### 細胞培養

各細胞株の培養に用いた培地は次の通りである。ヒト肺由来正常2倍体線維芽細胞 WI-38 には E-MEM 培地を、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 293 には MEM- $\alpha$  培地を、ヒト腎臓がん由来細胞株 VMRC-RCW とヒト腎臓がん由来細胞株 OS-RC-2 には RPMI1640 培地を、ヒト腎臓がん由来細胞株 TUHR4TKB とヒト腎臓がん由来細胞株 RCC10RGB には D-MEM/Ham's F-12 培地を用いた。それぞれの培地には 10% FBS (GIBCO)、100 units/ml ペニシリン G カリウム (明治製菓)、0.1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) を添加し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養器には 10 cm 培養皿 (TPP) を用いた。

### ウェスタンブロット用サンプル調整

細胞を培養した 10 cm 培養皿 (TPP) 1 枚に対し、4°C で冷やした PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で 3 回洗浄し、5  $\mu$ l のプロテアーゼ阻害剤カクテル (nacalai tesque Lot No.L19810) と 500  $\mu$ l の Lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) を添加し、氷上に 15 分静置した。セルスクレーパーで集めて 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに移し替え、ピペッティングした後、テーブルトップマイクロ冷却遠心機 3500 (KUBOTA) を用いて 4°C、10,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を回収した後、BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible (Thermo) を用いてタンパク定量を行い、タンパク質濃度が 1.0 mg/ml となるように希釈した。このサンプルと 3×sample buffer (187.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 15% Glycerol, 3% SDS, 15% 2-mercaptoethanol, 5% クリスタルバイオレット) を 2:1 で混合し、100°C で 10 分間煮沸してウェスタンブロットに用いた。

### SDS-PAGE

組み立てたゲル板に、10-15% 分離ゲルを 6 ml 流し込み、その上に水を 850  $\mu$ l 重層し、室温で 30 分静置して分離ゲルを固めた。水を取り除き、4.5% 濃縮ゲルをゲル板の切れ込みの 1~2 mm 下まで重層し、コームを差し込み、室温で 15 分静置して濃縮ゲルを固めた。サンプルをアプライし、電気泳動装置 (ATTO) を用

いて、Running Buffer (25 mM Tris、195 mM グリシン、0.1% (w/v) SDS)中で、ゲル一枚あたり 20 mA 定電流で1時間程度電気泳動を行った。

#### ウェスタンブロット

PVDF膜(Millipore)をメタノールに10秒間浸した後、Transfer Buffer (0.1 M Tris、0.192 M グリシン、5%メタノール)に浸して振盪することにより平衡化した。セミドライ式ブロッティング装置(ATTO)の下部電極をTransfer Bufferで濡らした後、その上にTransfer Bufferに浸した17Chr濾紙(Whatman)を3枚重ねて置き、さらにその上に平衡化したPVDF膜を置いた。SDS-PAGE後のゲルの濃縮ゲル部分を切り落とした後、PVDF膜の上に分離ゲルのみを重ねて、その上にTransfer Bufferで濡らした17Chr濾紙を3枚重ね、上部電極板をかぶせることにより固定した。2.4 mA/cm<sup>2</sup>定電流で65分間転写した。

タンパク質が転写されたPVDF膜をTBSM-0.05% Tween 20(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20, 5% skim milk)の中で室温、30分間振盪させることにより膜をブロッキングした。ブロッキング後、PVDF膜を50 ml TBS-0.05% Tween 20(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20)で5分間振盪させることにより洗浄した。galectin-1抗体(Galectin-1,R&D SYSTEMS)を0.1 µg/mlに希釈した溶液2 ml、またはgalectin-3抗体(Galectin-3, R&D SYSTEMS)を0.1 µg/mlに希釈した溶液2 ml、またはcalnexin抗体(Calnexin,Genscript)を0.25 µg/mlに希釈した溶液2 ml、またはα-enolase抗体(ENO 1,Abnova)を0.1 µg/mlに希釈した溶液2 ml、またはlectin,mannose-binding 2抗体(LMAN2,AVIVA SYSTEMS BIOLOGY)を0.25 µg/mlに希釈した溶液2 ml、またはTriosephosphate isomerase 1抗体(TPI 1,Abnova)を0.5 µg/mlに希釈した溶液2 mlにPVDF膜を浸して4°Cで一晩静置した。希釈液はTBSM-0.05% Tween 20を用いた。翌日、TBS-0.05% Tween 20に浸して1分間、さらに5分間で3回洗浄した。Galectin-1抗体とGalectin-3抗体に対する二次抗体としてHRP標識抗ヤギイムノグロブリン抗体(Dako)を0.5 µg/mlに希釈した溶液を、α-enolase抗体とtriosephosphate isomerase 1抗体にはHRP標識抗マウスイムノグロブリン抗体(Dako)を1.0 µg/mlに希釈した溶液を、lectin,mannose-binding 2抗体とcalnexin抗体にはHRP標識抗ウサギイムノグロブリン抗体(Dako)を0.34 µg/mlに希釈した溶液を、それぞれ2 mL使用して、室温で1時間30分反応させた。希釈液はTBSM-0.05% Tween 20を用いた。続いて、PVDF膜をTBS-Tに浸して1分間、さらに5分間

で3回洗浄し、さらに TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.9% NaCl) を用いて5分間で2回洗浄した。

ECL Plus Western Blotting Detection System (GE ヘルスケア) または ECL Prime Western Blotting Detection System (GE ヘルスケア) を用いて抗体が結合した PDVF 膜上のタンパク質バンドを発光させた。暗室で Hyperfilm MP (GE ヘルスケア) に感光、現像液 HI-RENDOL (フジフィルム) と定着液 HI-RENFIX (フジフィルム) で現像処理してバンドを検出した。各バンドの強度は Image J により数値化した。

#### 培養上清 Galectin-1 測定用サンプル調整

各細胞を播種後、48 時間培養した。その後、培養上清を取り除き、培養 dish を PBS で洗浄してから 10 ml の培地を入れてさらに培養を続けた。24 時間後、培養上清をエッペンドルフチューブに回収し、10,000 g で遠心したのち、上清を回収し、ELISA 用のサンプルとした。培養上清回収時の細胞数は、計数盤を用いて光学顕微鏡で計数した。

#### 培養上清 Galectin-1 の ELISA

回収した培養上清を TBST で 20% に希釈した。このサンプルを第3章第1節に記載の方法で ELISA を行った。Galectin-1 ELISA で用いた捕捉抗体の濃度は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AP 標識抗体の濃度は 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で使用した。発色基質の吸光度測定はモデル 680 マイクロプレートリーダーアクセサリ (BioRad) を用いて測定された。検出限界の下限は3つのブランクの平均値+2 $\times$ SD 値と設定した。

## 結果

### 3-2-1 培養細胞における各タンパク質の発現量比較

ヒト肺由来正常 2 倍体線維芽細胞 WI-38、ヒト胎児腎細胞由来細胞株 293、ヒト腎臓がん由来細胞株 VMRC-RCW、OS-RC-2、TUHR4TKB、RCC10RGB の各細胞溶解液からウェスタンブロットで 6 種類のタンパク質のバンドを検出し、各バンドの強度を数値化して棒グラフで表示した (Figure 14)。非がん細胞である 2 種類の細胞株 WI-38 と 293 を比較すると、galectin-1 と galectin-3 では WI-38 の方が発現量は高く、 $\alpha$ -enolase と triosephosphate isomerase では 293 の方が発現量は高かった。臓器別で、つまり今回の場合は腎臓と肺でこれらのタンパク質の発現量が異なっていることを示している。

一方、今回は 4 種類の腎がん細胞株を解析しており、ほとんどのタンパク質において 4 種類の腎がん細胞の中では大きな差はみられなかったが、VMRC-RCW の galectin-3 発現量だけ他 3 種類の腎がん細胞株と比べて大きく発現量が低下していた。同じ腎がん細胞由来ではあるが、クローンによって発現量にばらつきがあることを示している。

腎臓由来の非がん細胞である 293 細胞と 4 種類の腎がん細胞株を比較すると、4 種類の腎がん細胞株全てにおいて galectin-1 が高発現していた。Galectin-3 では 3 種類の腎がん細胞株において発現量が高かった。Calnexin と triosephosphate isomerase は 2 種類の腎がん細胞株において、 $\alpha$ -enolase については 1 種類の腎がん細胞株において、293 細胞よりも発現量が高かった。

### 3-2-2 Galectin-1 の細胞外分泌量比較

同じ腎組織由来の 293 と比べて腎がん細胞で上昇していた galectin-1 と galectin-3 はがんの形成や維持に伴って発現上昇するのではないかと考えられる。そして、これらのタンパク質が腎がん血中マーカーとして利用できる可能性も示唆されたため、細胞の培養上清に分泌されている galectin-1 量を測定した (Figure 15)。293 からの galectin-1 分泌量は ELISA の検出限界以下であったのが、4 種類の腎がん細胞の全ての細胞株は測定範囲以内になるまで分泌量が増加していた。すなわち、腎細胞のがん化により galectin-1 の細胞内発現量の増加と

共に細胞外分泌量も増加していることが示された。しかし **galectin-3** に関しては、今回測定された全ての細胞株において ELISA 検出限界以下であり検証できなかった。



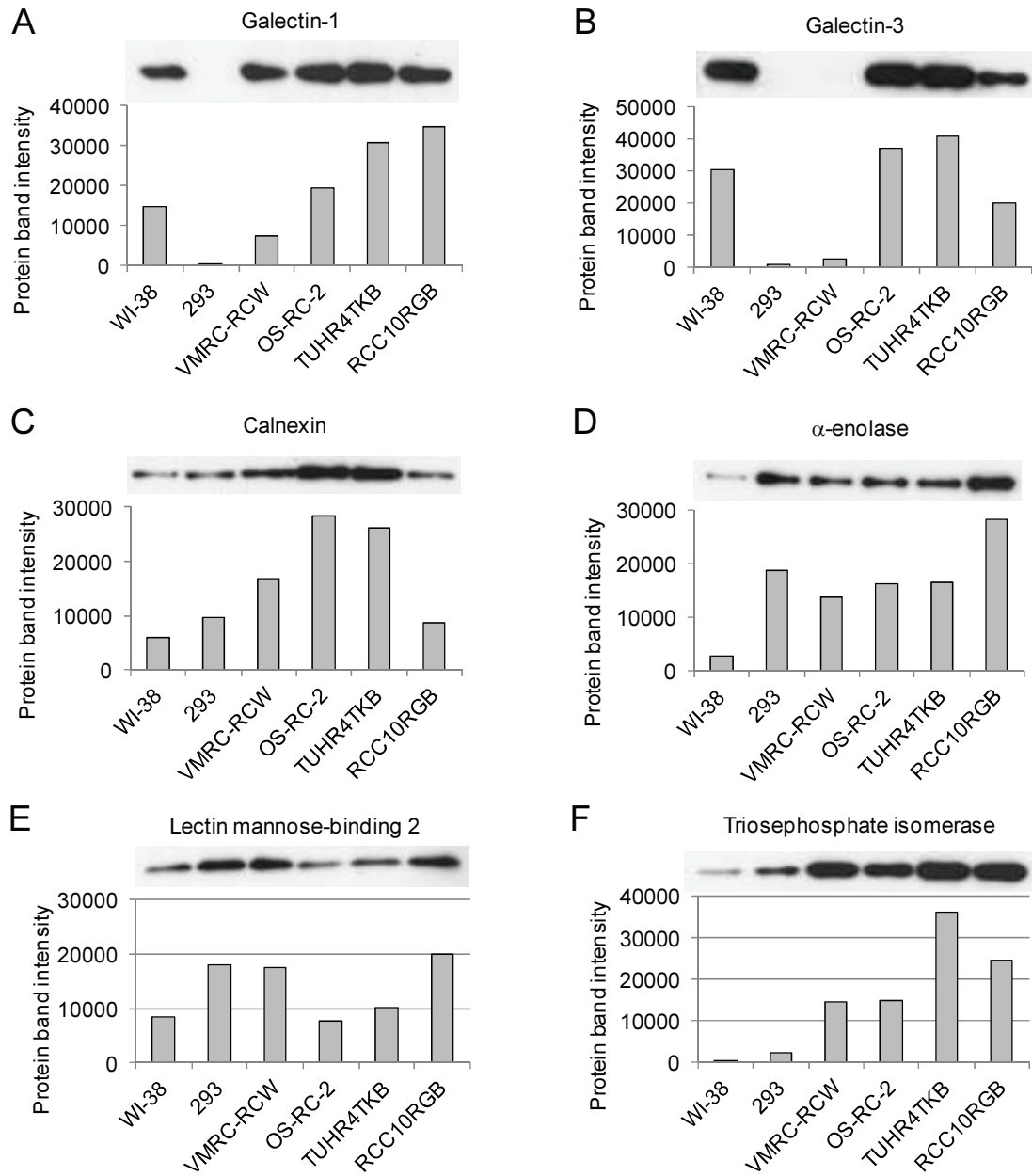


Figure 14

ウェスタンブロットによる各細胞株のタンパク質発現量解析

ヒト肺由来正常2倍体線維芽細胞 WI-38 とヒト胎児腎細胞由来細胞株 293、および4クローンのヒト腎臓がん由来細胞株 VMRC-RCW、OS-RC-2、TUHR4TKB、RCC10RGB に対して、6種類のタンパク質のウェスタンブロットを行った。各バンドの強度は Image J により数値化した。

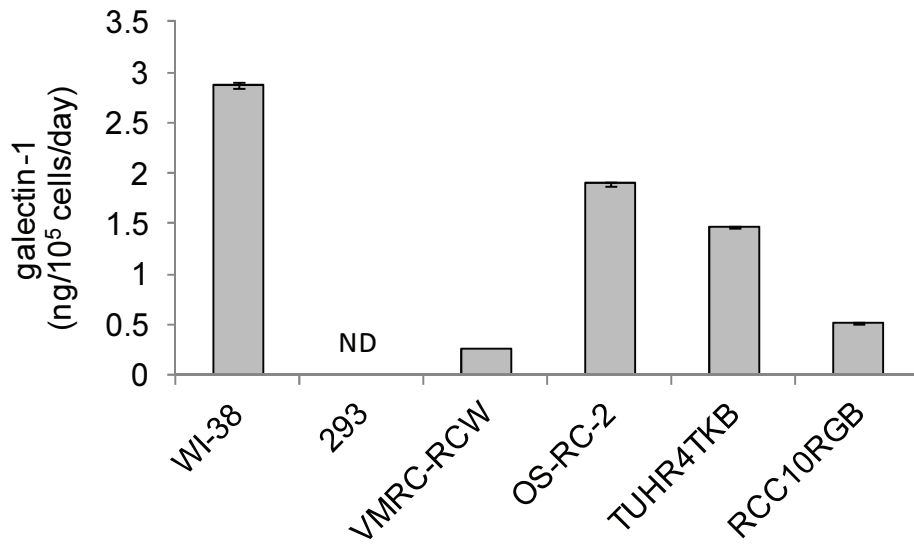


Figure 15

各細胞株の培養上清へ分泌された galectin-1 量の比較

各細胞を 24 時間培養したときの培養上清の galectin-1 濃度をサンドイッチ ELISA で測定した。その濃度と回収時の細胞数から  $10^5$  cells あたりの galectin-1 量を算出した。ND=検出限界以下

## 考察

異なる組織間でタンパク質の発現量が違うことは一般的に知られている。各組織で生物個体を維持するための役割が異なることからタンパク質の発現量にも差があるのは自明である。その点で、非がん細胞として用いた 2 種類の細胞株、ヒト肺由来の WI-38 とヒト胎児腎細胞由来の 293 の比較で、galectin-1、galectin-3 や  $\alpha$ -enolase、triosephosphate isomerase で確認されたような発現量の違いがあることも当然である。同じ腎組織由来の 293 と比べて腎がん細胞で上昇していた galectin-1 と galectin-3 はがん形成や維持に伴って発現上昇するのではないかと考えられ、第 2 章の組織レベルでの解析結果と一致している。そして、これらのタンパク質が腎がんマーカーとして利用できる可能性も示唆している。一方、 $\alpha$ -enolase、calnexin、triosephosphate isomerase に関しては 293 との比較で発現量の高い腎がん細胞株はいくつかあったものの大きな差は見られなかった。

今回の研究により galectin-1 と galectin-3 は腎がんを高発現することが示唆されたが、正常細胞からがん細胞への形質転換にどのように関連しているのかを調べるためにはさらなる研究が必要である。特に、これらのタンパク質が腎がんの形成や増殖、維持、浸潤、転移にどのように関わっているかを調べる必要がある。その為には、galectin-1 や galectin-3 の過剰発現やノックダウンを行い、がんの形成、増殖、維持等への影響を解析しなければならない。また、VMRC-RCW 細胞は galectin-1 のみ発現上昇しており、galectin-3 の発現量は増加していなかった。これは galectin-3 の機能を調べる上で重要な細胞になるかもしれない。一方、galectin はガラクトースを結合する動物レクチンということからその名がつけられた。galectin-1 や galectin-3 がどのような分子のガラクトースに結合して、腎がん細胞の形成や維持に関連するのか、分子間相互作用も興味深いところである。しかし、我々の目的とする腎がん血中マーカーのターゲットとしては細胞外へ分泌されている事実を立証することが重要となる。今回の実験で確認できたタンパク質は galectin-1 のみではあるが、galectin-1 を高発現している腎がん細胞株が細胞上清へも galectin-1 を多量に分泌していたことから、腎がんの存在を示す血中腫瘍マーカーとしての必要条件を有していることが言え、第 3 章第 1 節の血中 galectin-1 の結果を裏付けている。また、ヒト肺由来の WI-38 でも galectin-1 が高濃度で分泌されていたことから、肺では正常な細胞からでも多量の

galectin-1 を血中へ分泌している可能性があることも考慮しなければならない。つまり、第3章第1節で健常者の血漿中でも存在が確認された galectin-1 の派生源の一つとして肺があると推測される。

ヒト胎児腎細胞由来の293細胞は解糖系酵素の発現が上昇していることが報告されている(Sawa, Khan, Hester, & Snyder, 1997)。これは不死化のためにアデノウィルス5型を用いて形質転換したことが原因であると考えられる。この影響があるため、293細胞の解糖系で働く $\alpha$ -enolase と triosephosphate isomerase の発現量に関する考察は慎重に行った方がよい。今回の結果では、これら2つの解糖系酵素において293細胞の発現量は高く、腎がん細胞株との比較では発現差が見られなかったのは、形質転換による影響も考えられる。したがって、これら解糖系酵素が腎がんに関連性が無いと結論付けることは言いきれない。腎がん細胞において、HIFという転写因子が低酸素状態のがん細胞で解糖系の発現を誘導しているという報告が多く(Kondoh, 2008)、プロテオーム解析でも多くの腎がん症例において解糖系酵素の発現量は腎がん組織で高レベルであることを証明している。したがって、*in vitro* で解糖系酵素と腎がんとの関与を調査するためには、解糖系酵素の発現に変化を与えられずに株化された正常腎細胞を用いて解析することが必要となる。

## 第4章 総合討論

### 今後の課題と展望

血中 galectin-1 と galectin-3 濃度の上昇は大腸がん、頭頸部がん、甲状腺がんなど、他の組織のがんでも報告があるため、galectin-1 と galectin-3 は腎がんの特異的なマーカーとしては利用できない。逆に、galectin-1 と galectin-3 は広域ながんに対する腫瘍マーカーとして利用できる可能性がある。本研究により galectin-1 と galectin-3 の組み合わせによる診断は control と比べて pT1 の陽性率が高いことが明らかとなった。また、本研究により pT1 から galectin-1 mRNA の発現が上昇していることが確認されたことから、がんの初期の段階から galectin-1 のタンパク質発現が上昇していると考えられる。したがって、galectin-1 と galectin-3 は初期診断用マーカーとして利用できる可能性がある。血液検査のメリットとしては多くの人を受診できることである。一方、galectin-1 と galectin-3 は組織特異性が無いというデメリットもあるが、それを血液診断後の精密検査の画像診断を併用することでがんの発症している臓器を特定できる。無症状の初期の段階の腎がんを発見することが生存率向上に重要であり、本研究にて、1次スクリーニングとして、その初期の腎がんを含めた広域ながん診断のマーカーとしての可能性が galectin-1 と galectin-3 にあるということが示唆された。

$\alpha$ -enolase の腫瘍マーカーの可能性について述べる。第2章のプロテオーム解析により、腎がん組織における解糖系酵素の増加と、TCA に関わる酵素の減少が示されたことから、腎がん組織では HIF の過剰蓄積が引き起こされていると考えられる。そして第3章にて、解糖系酵素の一つである  $\alpha$ -enolase が健常者よりも腎がん患者において高濃度に存在することが示された。Yeo EJ らは、HIF が  $\alpha$ -enolase の発現を誘導することを示している(Yeo et al., 2003)。HIF が過剰に蓄積される原因として、低酸素状態と VHL 遺伝子の異常の二通りが考えられる。低酸素状態が原因であると仮定すると、がん細胞の異常増殖により酸素が行き届かない状態であり、末梢血とがん細胞の間で分子のやり取りもできない状態のはずである。そのため、低酸素状態のがん細胞のタンパク質が末梢血へ移行することは考えにくい。一方、VHL 遺伝子の異常による HIF の過剰蓄積は血液から酸素が行き届く状態でも生じる現象である。つまり、がん細胞の高発現タンパク質が末梢血へ移行する可能性は十分にある。そのため、 $\alpha$ -enolase の血中

濃度上昇は腎がん特有の VHL 遺伝子の異変によって誘導された解糖系酵素発現の亢進が原因である可能性が高い。それを示唆するように、他の組織のがんでは組織レベルで発現上昇が示されても血中 $\alpha$ -enolase 濃度上昇に関する報告は全くない。他の組織のがんにおいて報告された組織レベルでの $\alpha$ -enolase 発現上昇は低酸素状態から引き起こされたワールブルク効果の結果であろう。今後の研究にて血中 $\alpha$ -enolase 発現上昇のメカニズムを解明するためには、腎がん細胞の VHL 遺伝子の変異、腎がん組織における HIF の免疫染色やウェスタンブロットなどによる HIF 蓄積量、腎がん組織における $\alpha$ -enolase 量、腎がん患者の血中 $\alpha$ -enolase 濃度を個々の腎がん患者で調べ、これら変数の相関を解析することが必要になってくる。

外科的手術のアフターケアも患者の生存率を高めるためには重要であり、手術後の再発、投薬中の薬効評価をモニタリングする経過観察用のマーカーも必要とされている。他のがんで臨床的に用いられている血中腫瘍マーカーのほとんどはこの目的で有効に使用されており、例えば CEA や CA19-9 の特徴は外科的手術前で高かったマーカー値が術後で減少している患者は、必ずと言っていいほど、その患者において再発時にはマーカー値が再上昇する。また、投薬によるがん組織の増減に伴ってマーカー値が増減する特徴を持つ。 $\alpha$ -enolase は腎がんの摘出に伴い、その濃度が低下していた。そのため、腎がんに対する経過観察用マーカーとして利用できる可能性がある。それを検証するためには今後、腎がん患者の術後の経過を 5 年や 10 年にわたり追って再発、または投薬前後の濃度変化を、画像診断(CT や MRI)によるがん組織の増減確認と共に調べていく必要がある。

本研究にて、いくつかのタンパク質が血中診断マーカーとしての可能性があることを示したが、腫瘍マーカーとしての実用化に向けた課題点もある。その一つ目が、血中タンパク質濃度を測定した症例のサンプルサイズが小さいことである。in vitro の実験系のようなクローン化された細胞や制御された同一環境下で育てられたマウスを用いた比較解析とは異なり、ヒト由来の臨床サンプルは症例毎に家系や育ってきた環境は異なるため個体間の差が大きい。そのため、数多くの症例数が必要であり、一般的には健常者とがん患者それぞれ 100 症例ずつで比較することが理想である。二つ目は、腎がんに対する特異性を検証していないことである。今回発見したマーカータンパク質を臨床的に腫瘍マーカーとして利用した場合に、そのマーカー陽性反応が出た患者の次の精密検査の

項目を判断するために、マーカーの特異性を調査する必要がある。galectin-1 と galectin-3 は、腎がん特異的ではないことが分かっているため、多くのがんに対する広域な腫瘍マーカーとしての利用を考えるべきであろう。しかし、 $\alpha$ -enolase に関しては現時点で腎がんに対する特異性を否定できない。腎がん以外にも増加するがんが存在するのかどうかを調べるために、他の臓器のがんに対する各タンパク質の関連性の有無も評価する必要がある。そして、もう一つ解析対象とするべきグループがあり、それは腎臓で発症する、がん以外の疾病（腎炎、腎不全、腎硬化症など）を持った症例である。がんの特異的なのか、それとも他の腎疾患でもマーカー値の変動があるか、その関連も調べる必要がある。

これら症例数や疾患別の関連性に加えて、同一症例においてがん転移や再発が発症したときのマーカー値の変動を調べていくことも重要である。前述したように、現在使用されているほとんどの腫瘍マーカーは、定期健康診断などで多くの受診者からがんに罹っている人を見つけるための初期診断よりも、がんにかかった人の中で腫瘍マーカー値の高かった患者の手術後の経過観察における再発やがん転移の発症、および投薬中のがんの寛解や再燃のモニタリングとしての方が有用性は高い。本研究にて、 $\alpha$ -enolase が経過観察用マーカーとしての可能性があることを発見したが、それを検証するためには、同一の腎がん患者において、腎摘除術前と術後のマーカー値の減少、そして定期的に採血をして再発やがん転移が見つかったとき、もしくは見つかる少し前においてマーカー値の増加を確認しなければならない。この解析のためには、経時的に腎がん患者を追跡していくために長い時間（5～20年）を要する。また、解析対象の症例はボランティアとして協力しているため、個人の都合により採血できなくなることや、全く別の疾患に罹る可能性も大いにあるため、そのリスクを考慮して多くの症例数が必要になってくる。したがって、大学病院やクリニックなどの協力なくしては、初期診断や経過観察用のマーカーの解析はできないであろう。

本研究の *in vitro* の実験において、galectin-1 が腎がん細胞で高発現しており、それと共に細胞外への分泌量も上昇していたことを示した。しかしながら他のタンパク質に関しては細胞外への分泌量の解析にまでは至らなかった。さらに、コントロールとして用いた腎臓由来の非がん細胞は 1 クローンのみであったため、腎がんとの発現量の比較解析では真の意味での有意な結論をだすことはできない。1 クローンでは、そのクローン特異的な発現量しか解析していないことになり、腎細胞の群としての平均的な発現量を示しているわけではない。本研

究で解析した 293 細胞が不死化のためにアデノウイルス 5 型を用いて形質転換したことにより解糖系酵素の発現が上昇している事実があるように、1 クローンでは真に腎がん細胞で発現が変化しているかどうかは検証できない。したがって、腎がん細胞株で 4 クローン用いたように腎臓由来の非がん細胞でも多クローンをを用いた解析が必要となる。

現在、腎がんに対する血中腫瘍マーカーは存在しない。そのため、簡易的な定期健康診断で腎がんの診断をすることはできず、人間ドックなどで実施される CT や MRI などの画像診断などで診断が可能となる。しかし、人間ドックは診察時間、被爆による身体への負荷、そして高額な医療費などの理由により頻繁に受診できる方法ではない。一方、受診者にとって血液検査は採血するだけでよく、医療費も安価であり、企業などで行われている定期健康診断でも受診できるため、高頻度で広く国民に検査を受けてもらうことが可能である。多くのがんは初期ステージ、つまり腫瘍が小さいうちに発見して、早期の治療を施せば生存率は大幅に向上する。したがって、初期診断のための腫瘍マーカーの発見はがんによる死亡率を減少させる上で非常に重要であり、腫瘍マーカーが存在しない腎がんでそれを見つけることは大きな意義がある。一方、腎がん患者に対する経過観察用の腫瘍マーカーも大変重要な役割を担っている。腎摘除術後のリスクは再発や転移である。CT により経過観察はできるが、被爆の影響があるため短期間に何回も受診することはできない。また、受診回数を増やすことは医療費の増額にも繋がる。高頻度で受診できる検査方法があることは再発や転移をいち早く見つけるために効果的であり、その一つが血液検査における腫瘍マーカーである。また、手術により摘出できない腫瘍に対して処方する抗がん剤の薬効の指標としても腫瘍マーカーは使用される。投薬中における腫瘍の縮小や肥大は薬効を示しており、そのモニタリングを腫瘍マーカーが担うことができる。科学技術の発展により新たな分子標的薬が開発されているが、これらの薬効評価にも役立つことができる。本研究において、初期診断用マーカーや経過観察用マーカーの可能性を示したが、将来的に腫瘍マーカーとして十分な有効性を示すことができれば、腎がん治療への大きな貢献となるであろう。一方、本研究では腫瘍マーカーを血液検査へ応用することを目的に進めてきたが、腎細胞から細胞外へ移行したタンパク質は尿中へ漏出しやすいことから、本研究で腫瘍マーカーとしての可能性が示されたタンパク質は尿検査へも応用できるかもしれない。galectin-3 や  $\alpha$ -enolase は尿に出てくることが報告され



ている(Balasubramanian et al., 2009; Cho et al., 2012)。そのため、尿中マーカーとして応用できる可能性がある。しかし、検査試料を尿にする場合は血液とは異なり、尿量に応じてタンパク質濃度が簡単に変化するため、クレアチニン濃度との比をとって解析する必要がある。また、タンパク質濃度が低いため ELISA の前にタンパク質を濃縮する前処理も必要となるかもしれない。検査試料を尿にすることにより新たな課題が発生するが、今後の展開として尿中腫瘍マーカーへ応用できる可能性はある。

## 総括

血液検査において腫瘍マーカーとなりうるタンパク質は、がんへの形質変換において発現量が上昇するタンパク質であり、かつ、それが細胞外へ分泌されて血中へ漏出する特徴を持つ。本研究において、組織レベルでプロテオーム解析を行い多くの腎がん高発現タンパク質をスクリーニングしてきた。培養細胞株において、galectin-1 が高発現している腎がん細胞株から galectin-1 が多量に細胞上清へ移行していることを確認した。そして腎がん患者と健常者の血漿中タンパク質濃度の解析において腎がん患者で高濃度に存在しているタンパク質を見つけ、それらの腎がん診断能力を解析した。その結果、腎がんを含む広域ながんの初期診断には galectin-1 や galectin-3 が、腎がんの手術後の経過観察には  $\alpha$ -enolase が有用な血中マーカーとなる可能性を発見することができた。本研究は小さいサンプルサイズから得られた結果ではあるが、腎がんの早期発見やモニタリングに向けた新たな血中腫瘍マーカー開発の第一歩となることを示している。

## 謝辞

始めに、東京理科大学の学部、修士課程、博士課程における研究活動でご指導を賜りました東京理科大学理工学部応用生物科学科教授、池北雅彦先生に深く感謝いたします。

次に、5年間の間、大阪大学蛋白質研究所にてご指導していただきました現神戸大学客員教授、西村紀先生に感謝いたします。また、臨床検体のご提供と共に腎がんに関して臨場的な立場からご助言をいただきました兵庫医科大学教授、後藤章暢先生、および武庫川女子大学教授、岡村昇先生に感謝いたします。プロテオーム解析について多くのご助言をいただきました京都大学助教、増田太郎先生、および株式会社島津製作所、松尾英一様、渡辺真様に感謝いたします。本研究について討論を交わしました東京理科大学池北研究室の助教、吉見陽児先生、田中信太郎様に感謝いたします。

## 参考文献

- Amato, R. J. (2005). Renal cell carcinoma: review of novel single-agent therapeutics and combination regimens. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(1), 7–15. doi:10.1093/annonc/mdi002
- Andersen, R. F., Palmfeldt, J., Jespersen, B., Gregersen, N., & Rittig, S. (2012). Plasma and urine proteomic profiles in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Proteomics. Clinical applications*, 6(7-8), 382–93. doi:10.1002/prca.201100081
- André, S., Kaltner, H., Lensch, M., Russwurm, R., Siebert, H.-C., Fallsehr, C., ... Kopitz, J. (2005). Determination of structural and functional overlap/divergence of five proto-type galectins by analysis of the growth-regulatory interaction with ganglioside GM1 in silico and in vitro on human neuroblastoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 114(1), 46–57. doi:10.1002/ijc.20699
- Balasubramanian, K., Vasudevamurthy, R., Venkateshaiah, S. U., Thomas, A., Vishweshwara, A., & Dharmesh, S. M. (2009). Galectin-3 in urine of cancer patients: stage and tissue specificity. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(3), 355–63. doi:10.1007/s00432-008-0481-4
- Barrow, H., Rhodes, J. M., & Yu, L.-G. (2013). Simultaneous determination of serum galectin-3 and -4 levels detects metastases in colorectal cancer patients. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 36(1), 9–13. doi:10.1007/s13402-012-0109-1
- Brugarolas, J. B., Vazquez, F., Reddy, A., Sellers, W. R., & Kaelin, W. G. (2003). TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer cell*, 4(2), 147–58.
- Bullock, A., McDermott, D. F., & Atkins, M. B. (2010). Management of metastatic renal cell carcinoma in patients with poor prognosis. *Cancer management and research*, 2, 123–132.

- Bunting, P. S. (2002). Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. *Clinica chimica acta international journal of clinical chemistry*, 315(1-2), 71–97.
- Cagney, G., Amiri, S., Premawaradena, T., Lindo, M., & Emili, A. (2003). In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome science*, 1(1), 5. doi:10.1186/1477-5956-1-5
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., & Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16(11), 137R–157R. doi:10.1093/glycob/cwl025
- Capello, M., Ferri-Borgogno, S., Cappello, P., & Novelli, F. (2011). Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *The FEBS journal*, 278(7), 1064–1074. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x
- Cho, S., Choi, Y. S., Yim, S. Y., Yang, H. I., Jeon, Y. E., Lee, K. E., ... Lee, B. S. (2012). Urinary vitamin D-binding protein is elevated in patients with endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(2), 515–22. doi:10.1093/humrep/der345
- Chow, W. H., Devesa, S. S., Warren, J. L., & Fraumeni, J. F. (1999). Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 281(17), 1628–31.
- Coussy, F., Chéreau, E., Daraï, E., Dhombres, F., Lotz, J.-P., Rouzier, R., & Selle, F. (2011). Interest of CA 125 level in management of ovarian cancer. *Gynecologie obstetrique fertilite*, 39(5), 296–301.
- Dancer, J. Y., Truong, L. D., Zhai, Q., & Shen, S. S. (2010). Expression of Galectin-3 in renal neoplasms: a diagnostic, possible prognostic marker. *Archives of pathology laboratory medicine*, 134(1), 90–94.
- Dang, C. V., & Semenza, G. L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences*, 24(2), 68–72.
- Dihazi, H., Müller, C., Asif, A. R., Flad, T., Elmaouhoub, A., & Müller, G. A. (2007). Whole cell profiling and identification of galectin-1 as a potential marker of renal

cell carcinoma. *Proteomics Clinical applications*, 1(2), 200–214.  
doi:10.1002/prca.200600481

- Dissemond, J., Busch, M., Kothen, T., Mörs, J., Weimann, T. K., Lindeke, A., ... Wagner, S. N. (2004). Differential downregulation of endoplasmic reticulum-residing chaperones calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma. *Cancer letters*, 203(2), 225–31.
- Duffy, M. J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clinical chemistry*, 47(4), 624–30.
- Eichelberg, C., Junker, K., Ljungberg, B., & Moch, H. (2009). Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *European Urology*, 55(4), 851–863.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H.-J., & Kloog, Y. (2002). Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*, 277(40), 37169–75. doi:10.1074/jbc.M205698200
- Finek J, Jr, H. L., O, T., J, S., Pikner R, S, H., ... E., H. (2005). Clinical relevance of tumor markers for the control of chemotherapy. *Anticancer Research*, 25(3A), 1655–1658.
- Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., André, S., ... Rosewicz, S. (2005). Galectin-1 interacts with the  $\alpha 5 \beta 1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *The Journal of biological chemistry*, 280(44), 37266–77. doi:10.1074/jbc.M411580200
- Frank, I., Blute, M. L., Leibovich, B. C., Cheville, J. C., Lohse, C. M., & Zincke, H. (2005). Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. *The Journal of Urology*, 173(6), 1889–1892.
- Fu, N., Drinnenberg, I., Kelso, J., Wu, J.-R., Pääbo, S., Zeng, R., & Khaitovich, P. (2007). Comparison of protein and mRNA expression evolution in humans and chimpanzees. *PloS one*, 2(2), e216. doi:10.1371/journal.pone.0000216

- Gabius, H.-J., André, S., Gunsenhäuser, I., Kaltner, H., Kayser, G., Kopitz, J., ... Kayser, K. (2002). Association of galectin-1- but not galectin-3-dependent parameters with proliferation activity in human neuroblastomas and small cell lung carcinomas. *Anticancer research*, 22(1A), 405–10.
- Garcia, J. A., & Rini, B. I. (2007). Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 57(2), 112–125. doi:10.3322/canjclin.57.2.112
- George, D. J., & Kaelin, W. G. (2003). The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *The New England journal of medicine*, 349(5), 419–21. doi:10.1056/NEJMp030061
- George, J. N., Thoi, L. L., McManus, L. M., & Reimann, T. A. (1982). Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*, 60(4), 834–840.
- Godinot, C., de Laplanche, E., Hervouet, E., & Simonnet, H. (2007). Actuality of Warburg's views in our understanding of renal cancer metabolism. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39(3), 235–41. doi:10.1007/s10863-007-9088-8
- Griffin, T. J., Gygi, S. P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L., & Aebersold, R. (2002). Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 1(4), 323–33.
- Grützmann, R., Pilarsky, C., Ammerpohl, O., Lüttges, J., Böhme, A., Sipos, B., ... Saeger, H. D. (2004). Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(5), 611–22. doi:10.1593/neo.04295
- Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y., & Aebersold, R. (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9390–5. doi:10.1073/pnas.160270797

- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology*, *17*(10), 994–9. doi:10.1038/13690
- Hamaguchi, T., Iizuka, N., Tsunedomi, R., Hamamoto, Y., Miyamoto, T., Iida, M., ... Oka, M. (2008). Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, *33*(4), 725–731.
- Han, D. K., Eng, J., Zhou, H., & Aebersold, R. (2001). Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nature biotechnology*, *19*(10), 946–51. doi:10.1038/nbt1001-946
- Haqqani, A. S., Kelly, J., Baumann, E., Haseloff, R. F., Blasig, I. E., & Stanimirovic, D. B. (2007). Protein markers of ischemic insult in brain endothelial cells identified using 2D gel electrophoresis and ICAT-based quantitative proteomics. *Journal of proteome research*, *6*(1), 226–39. doi:10.1021/pr0603811
- Henry, L., Fabre, C., Guiraud, I., Bastide, S., Fabbro-Peray, P., Martinez, J., ... Stoebner, P.-E. (2013). Clinical use of p-proteasome in discriminating metastatic melanoma patients: comparative study with LDH, MIA and S100B protein. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *133*(1), 142–8. doi:10.1002/ijc.27991
- Huang, Q., Ye, J., Huang, Q., Chen, W., Wang, L., Lin, W., ... Lin, X. (2010). Heat shock protein 27 is over-expressed in tumor tissues and increased in sera of patients with gastric adenocarcinoma. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM/ FESCC*, *48*(2), 263–9. doi:10.1515/CCLM.2010.043
- Hughes, R. C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta*, *1473*(1), 172–85.
- Iida, T., Kuyama, H., Watanabe, M., Toda, C., Matsuo, E., Kido, A., ... Nishimura, O. (2006). Rapid and efficient MALDI-TOF MS peak detection of 2-nitrobenzenesulfonyl-labeled peptides using the combination of HPLC and an automatic spotting apparatus. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, *17*(5), 333–41.



- Ingrassia, L., Camby, I., Lefranc, F., Mathieu, V., Nshimyumukiza, P., Darro, F., & Kiss, R. (2006). Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. *Current medicinal chemistry*, 13(29), 3513–27.
- Iurisci, I., Tinari, N., Natoli, C., Angelucci, D., Cianchetti, E., & Iacobelli, S. (2000a). Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(4), 1389–93.
- Iurisci, I., Tinari, N., Natoli, C., Angelucci, D., Cianchetti, E., & Iacobelli, S. (2000b). Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1389–1393.
- Janssen, B., Hohenadel, D., Brinkkoetter, P., Peters, V., Rind, N., Fischer, C., ... van der Woude, F. J. (2005). Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: association with a leucine repeat of the carnosinase gene CNDP1. *Diabetes*, 54(8), 2320–7.
- Kaelin, W. G. (2009). Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer*, 115(10 Suppl), 2262–72.  
doi:10.1002/cncr.24232
- Kondoh, H. (2008). Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental cell research*, 314(9), 1923–8. doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.007
- Kuyama, H., Watanabe, M., Toda, C., Ando, E., Tanaka, K., & Nishimura, O. (2003). An approach to quantitative proteome analysis by labeling tryptophan residues. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 17(14), 1642–50.  
doi:10.1002/rcm.1100
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105–32.
- Liao, W.-C., Wu, M.-S., Wang, H.-P., Tien, Y.-W., & Lin, J.-T. (2009). Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 38(4), 422–6. doi:10.1097/MPA.0b013e318198281d

- Limmahakhun, S., Pothacharoen, P., Theera-Umpon, N., Arpornchayanon, O., Leerapun, T., Luevitoonvechkij, S., & Pruksakorn, D. (2011). Relationships between serum biomarker levels and clinical presentation of human osteosarcomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, *12*(7), 1717–22.
- Liu, F.-T., & Rabinovich, G. A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, *5*(1), 29–41.
- Lüftner, D., Mazurek, S., Henschke, P., Mesterharm, J., Schildhauer, S., Geppert, R., ... Possinger, K. (2003). Plasma levels of HER-2/neu, tumor type M2 pyruvate kinase and its tyrosine-phosphorylated metabolite in advanced breast cancer. *Anticancer research*, *23*(2A), 991–7.
- Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., ... Sellers, W. R. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nature medicine*, *10*(6), 594–601. doi:10.1038/nm1052
- Marangos, P. J., Campbell, I. C., Schmechel, D. E., Murphy, D. L., & Goodwin, F. K. (1980). Blood platelets contain a neuron-specific enolase subunit. *Journal of Neurochemistry*, *34*(5), 1254–1258.
- Matsuo, E., Watanabe, M., Kuyama, H., & Nishimura, O. (2009). A new strategy for protein biomarker discovery utilizing 2-nitrobenzenesulfonyl (NBS) reagent and its applications to clinical samples. *Journal Of Chromatography B Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, *877*(25), 2607–2614.
- Matsuo, E.-I., Toda, C., Watanabe, M., Iida, T., Masuda, T., Minohata, T., ... Nishimura, O. (2006). Improved 2-nitrobenzenesulfonyl method: optimization of the protocol and improved enrichment for labeled peptides. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, *20*(1), 31–8. doi:10.1002/rcm.2262
- Matsuo, E.-I., Toda, C., Watanabe, M., Ojima, N., Izumi, S., Tanaka, K., ... Nishimura, O. (2006). Selective detection of 2-nitrobenzenesulfonyl-labeled peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry using a novel matrix. *Proteomics*, *6*(7), 2042–9. doi:10.1002/pmic.200500575

- Menon, S., Kang, C.-M., & Beningo, K. A. (2011). Galectin-3 secretion and tyrosine phosphorylation is dependent on the calpain small subunit, Calpain 4. *Biochemical and biophysical research communications*, 410(1), 91–6.  
doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.112
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., ... Figlin, R. A. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*, 356(2), 115–24.  
doi:10.1056/NEJMoa065044
- Nisman, B., Yutkin, V., Nechushtan, H., Gofrit, O. N., Peretz, T., Gronowitz, S., & Pode, D. (2010). Circulating tumor M2 pyruvate kinase and thymidine kinase 1 are potential predictors for disease recurrence in renal cell carcinoma after nephrectomy. *Urology*, 76(2), 513.e1–e6.
- Oremek, G. M., Teigelkamp, S., Kramer, W., Eigenbrodt, E., & Usadel, K. H. (1999a). The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer research*, 19(4A), 2599–601.
- Oremek, G. M., Teigelkamp, S., Kramer, W., Eigenbrodt, E., & Usadel, K. H. (1999b). The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer research*, 19(4A), 2599–601.
- Perkins, G. L., Slater, E. D., Sanders, G. K., & Prichard, J. G. (2003). Serum tumor markers. *American family physician*, 68(6), 1075–82.
- Perroud, B., Lee, J., Valkova, N., Dhirapong, A., Lin, P.-Y., Fiehn, O., ... Weiss, R. H. (2006). Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Molecular cancer*, 5, 64. doi:10.1186/1476-4598-5-64
- Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2(1), 3–10.
- Rini, B. I., & Small, E. J. (2005). Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(5), 1028–43. doi:10.1200/JCO.2005.01.186

- Roessler, M., Rollinger, W., Mantovani-Endl, L., Hagmann, M.-L., Palme, S., Berndt, P., ... Tacke, M. (2006). Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(11), 2092–101. doi:10.1074/mcp.M600118-MCP200
- Roigas, J., Schulze, G., Raytarowski, S., Jung, K., Schnorr, D., & Loening, S. A. (2001). Tumor M2 pyruvate kinase in plasma of patients with urological tumors. *Tumour biology the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 22(5), 282–285.
- Ruiz-Garcia, E., Scott, V., Machavoine, C., Bidart, J. M., Lacroix, L., Delalogue, S., & Andre, F. (2010). Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *British journal of cancer*, 102(3), 462–8. doi:10.1038/sj.bjc.6605511
- Sarkissian, G., Fergelot, P., Lamy, P.-J., Patard, J.-J., Culine, S., Jouin, P., ... Darbouret, B. (2008). Identification of pro-MMP-7 as a serum marker for renal cell carcinoma by use of proteomic analysis. *Clinical chemistry*, 54(3), 574–81. doi:10.1373/clinchem.2007.090837
- Saussez, S., Glinoyer, D., Chantrain, G., Pattou, F., Carnaille, B., André, S., ... Laurent, G. (2008). Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid official journal of the American Thyroid Association*, 18(7), 705–712.
- Saussez, S., Lorfèvre, F., Lequeux, T., Laurent, G., Chantrain, G., Vertongen, F., ... Kiss, R. (2008a). The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral oncology*, 44(1), 86–93. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.12.014
- Saussez, S., Lorfèvre, F., Lequeux, T., Laurent, G., Chantrain, G., Vertongen, F., ... Kiss, R. (2008b). The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy. *Oral Oncology*, 44(1), 86–93.

- Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D., & Snyder, S. H. (1997). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11669–74.
- Schneider, J., Morr, H., Velcovsky, H. G., Weisse, G., & Eigenbrodt, E. (2000). Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Cancer detection and prevention*, 24(6), 531–5.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Current opinion in genetics & development*, 8(5), 588–94.
- Shen, J., Person, M. D., Zhu, J., Abbruzzese, J. L., & Li, D. (2004). Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer research*, 64(24), 9018–26.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3262
- Szoke, T., Kayser, K., Baumhakel, J.-D., Trojan, I., Furak, J., Tiszlavicz, L., ... Andre, S. (2005). Prognostic significance of endogenous adhesion/growth-regulatory lectins in lung cancer. *Oncology*, 69(2), 167–74. doi:10.1159/000087841
- Takashi, M., Tanaka, J., Mitsuya, H., Murase, T., Haimoto, H., & Kato, K. (1988). Serum gamma-enolase as a marker for renal cell carcinoma. *Nippon Hinyokika Gakkai zasshi The japanese journal of urology*, 79(2), 220–226.
- Takashi, M., Zhu, Y., Nakano, Y., Miyake, K., & Kato, K. (1992a). Elevated levels of serum aldolase A in patients with renal cell carcinoma. *Urological Research*, 20(4), 307–311.
- Takashi, M., Zhu, Y., Nakano, Y., Miyake, K., & Kato, K. (1992b). Elevated levels of serum aldolase A in patients with renal cell carcinoma. *Urological research*, 20(4), 307–11.
- Takashi, M., Zhu, Y., Nakano, Y., Miyake, K., & Kato, K. (1992c). Elevated levels of serum aldolase A in patients with renal cell carcinoma. *Urological research*, 20(4), 307–11.

- Teufel, M., Saudek, V., Ledig, J.-P., Bernhardt, A., Boularand, S., Carreau, A., ... Smirnova, T. (2003). Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), 6521–31. doi:10.1074/jbc.M209764200
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), 7309–18.
- Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., ... Hood, L. E. (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 3(10), 960–9. doi:10.1074/mcp.M400055-MCP200
- Toscano, M. A., Campagna, L., Molinero, L. L., Cerliani, J. P., Croci, D. O., Ilarregui, J. M., ... Rabinovich, G. A. (2011). Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Molecular immunology*, 48(15-16), 1940–9. doi:10.1016/j.molimm.2011.05.021
- Tsai, S.-T., Chien, I.-H., Shen, W.-H., Kuo, Y.-Z., Jin, Y.-T., Wong, T.-Y., ... Wu, L.-W. (2010). ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction. *European Journal of Cancer*, 46(9), 1712–1723.
- Unwin, R. D., Craven, R. A., Harnden, P., Hanrahan, S., Totty, N., Knowles, M., ... Banks, R. E. (2003). Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*, 3(8), 1620–32. doi:10.1002/pmic.200300464
- Watanabe, M., Takemasa, I., Kaneko, N., Yokoyama, Y., Matsuo, E.-I., Iwasa, S., ... Nishimura, O. (2011). Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncology Reports*, 25(5), 1217–26. doi:10.3892/or.2011.1198
- Watanabe, M., Takemasa, I., Kawaguchi, N., Miyake, M., Nishimura, N., Matsubara, T., ... Nishimura, O. (2008). An application of the 2-nitrobenzenesulfonyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for

biomarker discovery. *Proteomics. Clinical applications*, 2(6), 925–35.  
doi:10.1002/prca.200780111

Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., ... Trail, P. A. (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research*, 64(19), 7099–109.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1443

Wong, K.-F., & Luk, J. M. (2012). Discovery of lamin B1 and vimentin as circulating biomarkers for early hepatocellular carcinoma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 909, 295–310. doi:10.1007/978-1-61779-959-4\_19

Xie, L., Ni, W.-K., Chen, X.-D., Xiao, M.-B., Chen, B.-Y., He, S., ... Ni, R.-Z. (2012). The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 138(6), 1035–43. doi:10.1007/s00432-012-1178-2

Yakabe, T., Nakafusa, Y., Sumi, K., Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sato, S., ... Miyazaki, K. (2010). Clinical significance of CEA and CA19-9 in postoperative follow-up of colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 17(9), 2349–2356.

Yamamoto, K., Imamura, H., Matsuyama, Y., Kume, Y., Ikeda, H., Norman, G. L., ... Kokudo, N. (2010). AFP, AFP-L3, DCP, and GP73 as markers for monitoring treatment response and recurrence and as surrogate markers of clinicopathological variables of HCC. *Journal of Gastroenterology*, 45(12), 1272–1282.

Yeo, E.-J., Chun, Y.-S., Cho, Y.-S., Kim, J., Lee, J.-C., Kim, M.-S., & Park, J.-W. (2003). YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(7), 516–25.

Yokomizo, A., Takakura, M., Kanai, Y., Sakuma, T., Matsubara, J., Honda, K., ... Ono, M. (2012a). Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 10(3-4), 175–83.  
doi:10.3233/CBM-2012-0243

Yokomizo, A., Takakura, M., Kanai, Y., Sakuma, T., Matsubara, J., Honda, K., ... Ono, M. (2012b). Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 10(3-4), 175–83. doi:10.3233/CBM-2012-0243

YOU DEN, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, 3(1), 32–35.

Zhang, P., Chan, D. W., Zhu, Y., Li, J. J., Ng, I. O.-L., Wan, D., & Gu, J. (2006). Identification of carboxypeptidase of glutamate like-B as a candidate suppressor in cell growth and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(22), 6617–25. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1307

Zhang, X., Xiao, Z., Li, C., Xiao, Z., Yang, F., Li, D., ... Chen, Z. (2009). Triosephosphate isomerase and peroxiredoxin 6, two novel serum markers for human lung squamous cell carcinoma. *Cancer science*, 100(12), 2396–401. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01314.x

Zimmermann, M., Nickl, S., Lambers, C., Hacker, S., Mitterbauer, A., Hoetzenecker, K., ... Ankersmit, H. J. (2012). Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: a multi-institutional case-control study. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 413(13-14), 1115–20. doi:10.1016/j.cca.2012.03.008