

平成 30 年 4 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15645

研究課題名(和文)次世代プロテオミクスによる悪性グリオーマのバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Exploration of blood biomarker for glioblastoma

研究代表者

中田 光俊(Nakada, Mitsutoshi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20334774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：難治疾患である悪性脳腫瘍に対してバイオマーカーは同定されていない。本研究は、原発性脳腫瘍の中で最も高頻度かつ高悪性度の膠芽腫の診断を迅速・簡便・確実に可能とする血液バイオマーカーの開発を目的とした。革新型プロテオミクス法による膠芽腫および健常血漿内タンパクの比較定量を行った。962種類のタンパクを同定し、両者間で有意差を認め新規性の高い5種類の分子を抽出した。膠芽腫において高値を示した α -1-antichymotrypsinとcomplement component C9、低値を示したgelsolin、Ig γ -1 chain C region、apolipoprotein A-IVである。

研究成果の概要(英文)：Reliable blood biomarkers could be helpful for the management of glioblastoma (GBM) patients. Mass spectrometry (MS)-based proteomic analysis of human clinical blood is a powerful tool to investigate cancer biomarkers. To identify the biomarkers for GBM, we applied the highly accurate and reproducible SWATH (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical fragment ions)-MS technique. Quantitative comparisons of the plasma proteomes of GBM, IDH-wildtype patients (n = 14) and healthy controls (n = 15) were performed. Data dependent analysis mode of LC-MS/MS (Liquid chromatography tandem-MS) detected total 962 species of proteins in the samples used. Through the SWATH analysis, we identified five biomarker candidates for GBM: up-regulated proteins; α -1-antichymotrypsin (SERPINA3), and complement component C9 (C9), down-regulated proteins; gelsolin (GSN), Ig γ -1 chain C region (IGHA1), and apolipoprotein A-IV (APOA4).

研究分野：脳神経外科学

キーワード：バイオマーカー 膠芽腫 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、バイオマーカーを測定することで様々な疾病の診断や効率的な治療法の確立、さらに個別化医療が可能となっている。しかし、悪性グリオーマの早期診断や病勢を把握するバイオマーカーの同定はこれまで成功していない。悪性グリオーマの早期発見は、手術による腫瘍細胞の摘出効率を最大限に高め、この根治困難な疾患を克服に導く可能性がある。また、悪性グリオーマの初期治療後には **pseudoprogression** (偽再発) と呼ばれる病態がしばしば出現し、再発との鑑別に難渋することがある。この場合、治療方針が定まらず経過観察を行うが、腫瘍再発であった場合は、再発病変に対する治療が遅れることとなり大きな問題となっている。2者を鑑別するバイオマーカーの需要は極めて高い。以上の背景から、悪性グリオーマの早期発見を可能にし、非再発状態や疾患の増悪を感知する高感度かつ特異的なバイオマーカーの同定は喫緊の課題である。

一方で近年のプロテオミクステクノロジーの進化が目覚ましい。プロテオミクス研究の最先端は網羅的なタンパク質同定から包括的定量へと移行している。特にバイオマーカー探索は従来のレベルの定量精度及び再現性とデータの完全性のレベルをはるかに凌駕し、数千ものタンパク質の網羅的定量を可能にする **SWATH (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical fragment ions)** 法に注目が集まっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は「悪性グリオーマの病勢を反映するタンパク質が血液中に存在し、その分子の挙動を見ることによって悪性グリオーマの早期発見や病態の予測・判断が可能である。」との仮説に基づき、申請者がこれまで遂行してきた悪性グリオーマ組織の絶対定量プロテオミクスによるタンパク質発現解析を実験的土台として、悪性グリオーマの早期発見・病勢把握を可能にする血中のバイオマーカーを次世代プロテオミクス法により同定することにある。

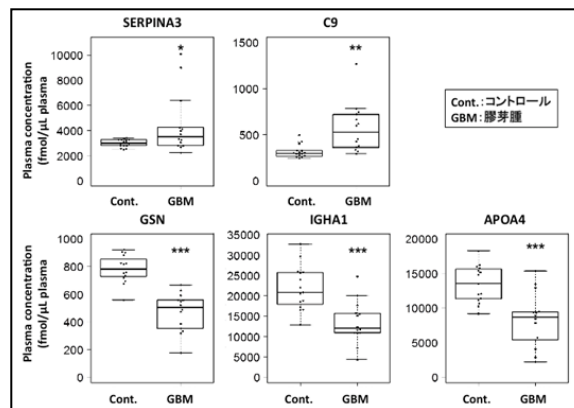
3. 研究の方法

本研究では悪性グリオーマの代表である膠芽腫 14 例の初発時と、コントロール群として健常人ボランティア 15 名の血液検体を解析対象とする。使用した実験手法は進化型の定量プロテオミクス **SWATH** 法および標的絶対定量プロテオミクスの 2 種類である。バイオマーカー探索において **SWATH** 法は従来法と比較して、定量精度及び再現性とデータの完全性のレベルをはるかに凌駕する。この手法を用いることでバイオマーカー探索が

困難な液性検体および微量であるがために従来法では同定すら不可能だった膜タンパク質に対して極めて高感度、高精度、膨大なタンパク質定量プロファイルを短期間のうちに得ることができる。**SWATH** で抽出したバイオマーカーの個別定量系に用いる標的絶対定量プロテオミクスは、抗体を使用する従来の方法とは全く異なり膜タンパク質などの疎水性で微量にも関わらず重要な役割を担うペプチドを **fmol** から **amol** のレベルで同定・定量可能な次世代技術である。手順として最初に各検体内のタンパク質をトリプシン消化しペプチド断片化する。**Data Dependent Acquisition** でそれぞれの検体でタンパク質の種類を同定し、**SWATH** 法のためのデータベースを構築した後に **SWATH** 法を実施した。候補バイオマーカー分子の基準としては健常人コントロール群よりも定量値が有意に高い分子と低い分子を抽出し、感度と特異度は統計学的因子である効果量と **ROC (Receiver Operating Characteristic)** 曲線の **AUC (Area Under the Curve)** 値で判定した。

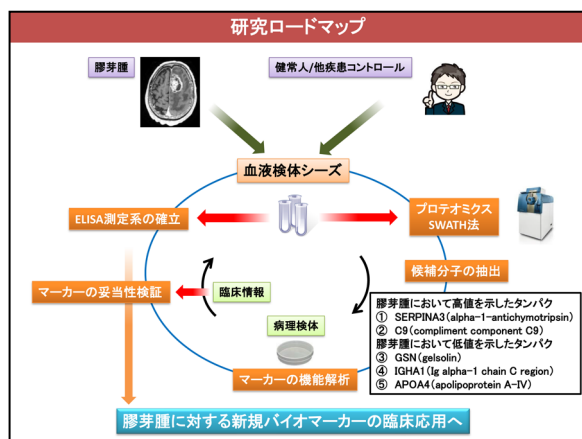
4. 研究成果

使用した血液検体から 962 種類のタンパク質分子を同定し、その中で膠芽腫症例群と健常群で有意差を認め新規性の高い 5 種類の分子を同定した (下図)。抽出された 5 分子とは、健常人と比べ膠芽腫症例において高値を示した **SERPINA3 (alpha-1-antichymotripsin)**、**C9 (compliment component C9)** と、逆に低値を示した **GSN (gelsolin)**、**IGHA1 (Ig alpha-1 chain C region)**、**APOA4 (apolipoprotein A-IV)** である。これらの分子は膠芽腫のバイオマーカーとして新規性が高いことから特許申請を行った (特願 2017-233838)。



今後、これらの分子の中から、単一あるいは適切な組合せにより、感度・特異度の高いバイオマーカーセットを決定したい。また、マーカー候補分子の定量値と膠芽腫症例の年齢、性別、受診時全身状態、腫瘍体積、腫瘍摘出率、治療法、無増悪生存期間、全生存期間などの臨床情報との相関関係を統計学的に解析することで再発診断マーカーとしてのみでなく代替マーカー・患者層別マーカー・予後マーカー・予測マーカー・他疾患除

外マーカーとして有用であるかについても追求する。さらにマーカー候補分子の妥当性をさらに多面的に検証するため、マーカー分子の産生細胞を同定し、機能性分子や分泌性分子であるかを分子生物学的基礎実験で確認する。将来的には、選別された有力なバイオマーカーについて、一般化し臨床現場において実用化するため、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 定量系を確立し質量分析診断キットの開発を目指す (下図)。



本プロジェクトの成功は悪性グリオーマの臨床を根本的に変え、治療法のパラダイムシフトに至る可能性がある。早期診断マーカーとして有用であることが判明すれば、定期的な健康診断において本マーカーを加えることで無症候性の悪性グリオーマ症例を的確に発見でき、早期の治療介入が可能となる。また病勢反映マーカーとして pseudoprogression と早期の再発を的確に鑑別するのみならず、わずかな再発を簡便に発見することができれば、再発病変に対して早期に治療が開始できる。腫瘍の増大進展が進行する前の検知は予後の改善に直結するのみならず、進展病変には無効であっても小病変には有効な新規治療法の確立にも貢献し、さらなる治療成績改善に貢献すると思われる。近年、がんのシステムズバイオロジー研究が盛んである。悪性グリオーマ血液検体におけるタンパクの定量値情報は必要かつ重要な情報となると考えられる。今回新たに得られるタンパクの発現量データはがんや創薬の新たな研究領域の展開に寄与すると期待される。また、本研究により得られる定量値によって、悪性グリオーマのみならずがんや炎症など他疾患における病態分子機構の解明研究発展を飛躍的に加速する可能性がある。申請者が用いる SWATH 法によるバイオマーカー探索研究は黎明期で本法のがん領域への応用は現時点でわずかで、本邦からの報告は皆無である。この先駆的技術を応用し、悪性脳腫瘍のバイオマーカーを同定することは他の難治がんのバイオマーカー同定の普遍的方法論として確立され、がん全体の診断・治療の発展にも大いに貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8件)

(1) Miyauchi E, Furuta T, Ohtsuki S, Tachikawa M, Uchida Y, Sabit H, Obuchi W, Baba T, Watanabe M, Terasaki T, Nakada M.

Identification of blood biomarkers in glioblastoma by SWATH mass spectrometry and quantitative targeted absolute proteomics.

PLOS ONE 13: e0193799. 2018 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0193799

(2) Sadahiro H, Kang KD, Gibson JT, Minata M, Yu H, Shi J, Chhipa R, Chen Z, Lu S, Simoni Y, Furuta T, Sabit H, Zhang S, Bastola S, Yamaguchi S, Alsheikh HA, Komarova S, Wang J, Kim SH, Hambardzumyan D, Lu X, Newell EW, DasGupta B, Nakada M, Lee LJ, Nabors B, Norian LA, Nakano I.

Activation of the receptor tyrosine kinase AXL regulates the immune microenvironment in glioblastoma.

Can Res. [Epub ahead of print] Mar 12. 2018 査読有

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2433

(3) Nakajima N, Nobusawa S, Nakata S, Nakada M, Yamazaki T, Matsumura N, Harada K, Matsuda H, Funata N, Nagai S, Nakamura H, Sasaki A, Akimoto J, Hirato J, Yokoo H.

CNS high-grade neuroepithelial tumor with BCOR internal tandem duplication: a comparison with its counterparts in the kidney and soft tissue.

Brain Pathology [Epub ahead of print] Nov 4. 2017 査読有

doi: 10.1111/bpa.12585

(4) Dong Y, Furuta T, Sabit H, Kitabayashi T, Jiapaer S, Kobayashi M, Ino Y, Todo T, Teng L, Hirao A, Zhao SG, Nakada M.

Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug.

Oncotarget, 8: 111728-111741. 2017 査読有

doi: 10.18632/oncotarget.22904.

(5) Furuta T, Sabit H, Yu D, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Y, Hayashi Y, Minamoto T, Nakada M

Biological basis and clinical trial of glycogen synthase kinase-3 β -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma.

Oncotarget 8:22811-22824. 2017 査読有

doi: 10.18632/oncotarget.15206.

(6) 中田光俊

脳腫瘍に対するドラッグリポジショニング研究

Neuro-Oncology の進歩 23-3: 1-8, 2016 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/neurooncology/23/3/23_1/_pdf/-char/en

(7) Kim SH, Ezhilarasan R, Chhipa R, Ladner K, Phillips E, Sparks A, Taylor D, Furuta T, Sabit H, Kurozumi K, Kuroiwa T, Akio A, Gallego-Perez I D, Sulman EP, Cheng S, Lee J, Nakada M, Guttridge D, DasGupta B, Goidts V, Bhat KP, Walker J, Nakano I
Serine/Threonine kinase MLK4 determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NFkB-dependent manner.

Cancer Cell 29: 201-213, 2016 査読有
doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.005.

(8) Joy A, Kapoor M, Georges J, Butler L, Chang Y, Li C, Crouch A, Smirnov I, Nakada M, Hepler J, Marty M, Feuerstein BG
The role of AKT isoforms in glioblastoma: AKT3 delays tumor progression.

J Neurooncol. 130: 43-52, 2016 査読有

[学会発表] (計 13件)

(1) Nakada M, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Kitabayashi Y, Jiapaer S, Hirao A.
Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma drug.
The 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS), 2017, Zurich, Switzerland

(2) 中田光俊
グリオーマ浸潤: 最新の分子生物学的知見
第18回日本分子脳神経外科学会, 平成29年, 山梨

(3) 中田光俊
グリオーマ浸潤のメカニズム
第37回日本脳神経外科コンgres総会, 平成29年, 横浜

(4) 中田光俊
脳腫瘍浸潤の病理と分子生物学
脳神経外科疾患の臨床と病理の JOINT CONFERENCE, 平成29年, 東京

(5) 中田光俊
悪性脳腫瘍治療の進歩
第113回 道南脳神経外科懇話会, 平成29年, 函館

(6) 中田光俊, 董宇、北林朋宏、淑瑠へムラサビット、古田拓也、平尾敦
既存薬による膠芽腫に対する新規化学療法
第34回日本脳腫瘍学会, 平成28年, 甲府

(7) Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A.
Drug repositioning targeting glioma stem cells.

Society for Neuro-Oncology 21st Annual Meeting
2016, 2016, Scottsdale, Arizona, USA

(8) 中田光俊
悪性神経膠腫の最新知見
第11回岐阜脳腫瘍研究会, 平成28年, 岐阜

(9) 中田光俊
脳腫瘍に対するドラッグリポジショニングの試み
第9回香川県脳腫瘍学術講演会, 平成28年, 高松

(10) 中田光俊, 董宇、北林朋宏、淑瑠へムラサビット、古田拓也、平尾敦
既存薬の応用による膠芽腫に対する新規化学療法
第75回日本脳神経外科学会総会, 平成28年, 福岡

(11) 中田光俊
悪性グリオーマ浸潤の分子生物学
第17回日本分子脳神経外科学会, 平成28年, 東京

(12) 中田光俊
グリオーマの集学的治療と今後の動向
第36回日本脳神経外科コンgres総会, 平成28年, 大阪

(13) Nakada M, Miyauchi E, Tachikawa M, Furuta T, Sabit H, Ohtsuki S, Terasaki T.
Biomarkers of glioblastoma identified by quantitative proteomics with SWATH mass spectrometry.
The 21st International Conference on Brain Tumor Research & Therapy, 2016, Okinawa, Japan

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 膠芽腫マーカー及びその使用
発明者: 中田光俊, 寺崎哲也, 大槻純男
権利者: 金沢大学、東北大学、熊本大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-233838
出願年月日: 平成29年12月5日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]
ホームページ等
<http://neurosurgery.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

中田 光俊 (NAKADA, Mitsutoshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：20334774

(2) 連携研究者

寺崎 哲也 (TERASAKI, Tetsuya)
東北大学・薬学部・教授
研究者番号：60155463

(3) 連携研究者

大槻 純男 (OHTSUKI, Sumio)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号：60323036

(4) 研究協力者

淑瑠 ヘムラサビット (SHUKURU,
Hemurasabit)
金沢大学・医学系・博士研究員
研究者番号：10432113