

## 平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研 究 種 目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研 究 課 題 名	新規大腸癌早期診断マーカーの開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：薬学部 医療薬学科 助教 山本 哲志 共同研究者：	

### 1. 研究目的・内容

大腸癌は、罹患者数、死亡者数が年々増加傾向にある疾患の一つであり、新たな早期診断マーカーの開発が重要な課題となっている。申請者はこれまでに大腸癌組織を用いたプロテオーム解析を行い、cyclophilin A、aldolase A、annexin A2 の新たな3種類の診断マーカー候補を同定した。本研究では、これらの候補タンパク質の有用性の検討と検出法の開発に関する基礎的検討を行う。

### 2. 研究経過及び成果

これまでの検討により明らかとなった候補タンパク質が、大腸癌診断のためのバイオマーカーとして適しているかを調べるため、培養大腸癌細胞における候補タンパク質の mRNA 及びタンパク質の発現を定量 PCR とウェスタンブロットで確認した。今回、培養正常大腸細胞 1 種類 (CCD841) と培養大腸癌細胞 3 種類 (DLD-1, SW480, SW620) を用いて検討したところ、検討した培養細胞全てで候補タンパク質の mRNA 及びタンパク質が発現しており、またその発現量は正常細胞に比べて大腸癌細胞で全体的に上昇している傾向が見られた。さらに、cyclophilin A 及び annexin A2 は、大腸癌原発巣由来株である SW480 と転移巣由来株である SW620 を比較したとき、SW620 において顕著に発現量が低下していたことから、これらの候補タンパク質の発現は、大腸癌細胞の転移機構に重要な役割を果たしている可能性があり、診断マーカーとしてのみではなく、新規抗癌剤開発の標的としても有用であることが示唆された。

次に、これらの候補タンパク質を診断マーカーとして用いるためには、血中で検出できる必要がある。そこで候補タンパク質が細胞外に分泌されているかを検討したところ、aldolase A は、正常大腸上皮細胞では培養液中に分泌が認められたのに対し、3 つの大腸癌細胞では培養液中への分泌が認められなかった。また、cyclophilin A は、今回検討した全ての培養細胞で分泌が認められなかった。一方、annexin A2 は、今回検討した全ての培養細胞で培養液中への分泌が認められたが、その分泌量はそれぞれの培養細胞の細胞質中における発現量と類似していた。これらのことから、aldolase A は、大腸癌の進行に伴う遺伝子異常の蓄積などにより細胞外への分泌機構に異常が生じたことが示唆された。それゆえ、血中における aldolase A の発現低下は、大腸癌の早期発見のためのバイオマーカーとして有用である可能性がある。

現在臨床検査で用いられているバイオマーカーの多くは、疾患に罹患することでその値が上昇することを指標としていることが多いが、本研究で見出した aldolase A は、大腸癌になることで発現量が減少することを検出する必要がある。そのため、従来の臨床検査で用いられている検出法よりもより高感度かつ高精度の検出系を検出する必要があると考えられた。そこで、液体クロマトグラフィー (LC) -質量分析計を用いた多重反応モニタリング (MRM) 法による aldolase A の選択的検出法の構築を行うこととした。まず初めに、MRM 法においてモニタリングする aldolase A に特異的なペプチドの配列を、データベース解析を行うことで同定することとした。その結果、2 種類の aldolase A 特異的なペプチドを明らかにすることができた。次にこれらの 2 種類のペプチドを合成し、これらを標品とすることで、MRM 法による aldolase A の検出条件の最適化を行うこととした。現在、条件の最適化を実施しているところであり、LC を用いたおよそ 20 分間での分析にて、数十 ng/ml の aldolase A を検出することが可能となった。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

現在行っている aldolase A の検出法について、さらなる検討を進め、より短時間で好感度に分析できる条件を開発していく。検出法が確立できた後は、血液中の aldolase A の検出に最適な前処理の条件検討を行い、その後大腸癌患者の血液サンプルを用いた検討を実施していく予定である。

また、今回の検討で見出された cyclophilin A 及び annexin A2 の大腸癌細胞の転移機構における役割についても検討を行い、新規大腸癌治療薬開発のための標的としての有用性についても検討を行っていく。

### 4. 成果の発表等

発 表 機 関 名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Tumor Biology	雑誌	2016 年 7 月 28 日