


平成30年度シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

令和元年6月5日提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿


報告者氏名：三浦 綾子 

研究課題： 検診への導入をめざした診断技術の開発に関する臨床疫学研究

(テーマ)

研究期間： 自 平成 30 年 4 月 1 日

至 平成 31 年 3 月 31 日

研究指導者：氏名 坪内 拡伸 

公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

### 1) 要旨

申請者らは、独自に開発した N 末端ペプチド選択単離法 (特願 2008-028091) を用い、尿中に排泄される癌細胞由来の蛋白質断片を高感度で網羅的に解析する手法を確立した。これまでに I 期肺腺癌患者の尿から 13 種の早期診断蛋白質断片を同定した (特願 2016-030267)。また、革新的がん医療実用化研究事業の研究課題 (がん細胞が生成する尿中蛋白質断片の検出を応用した肺腺癌早期診断システム樹立に関する研究) において、①肺腺癌で高頻度に尿中蛋白質断片のアミド化が生じること、②肺扁平上皮癌を高確率 (ROC-AUC > 0.8) に診断する 9 種の新規蛋白質断片の存在、③膵臓癌を高確率に診断する 2 種の新規蛋白質断片の存在を見出した。本研究の目的は、臨床情報を収集した手術例を含む肺腺癌と肺扁平上皮癌と膵臓癌ならびに健常者の尿と血清を多施設より前向きに収集し、前述の新規尿中腫瘍マーカーとなり得る蛋白質断片の診断精度を、最新の高精度絶対定量質量分析系である multiple reaction monitoring (MRM) 解析により前向きに検証することである。

本研究において、①手術検体と各種癌細胞株を用いた癌細胞での蛋白質断片の発現、②肺癌と膵臓癌の共通の発癌イニシエーターである KRAS 遺伝子変異と蛋白質断片の発現との関連、③各種癌細胞株へ蛋白質断片アミド化を生じる変異の挿入による癌細胞の生物学的特性 (増殖、浸潤能、アポトーシス抵抗性) の変化、④アミド化変異蛋白質の構造解析を申請者が解析する。本研究計画の実施を通して、新規の癌診断マーカーの発見、癌細胞の生物学的特性の解析、臨床データを用いた統計学的解析を実践し、見出した知見を特許協力条約に基づく国際出願 (PCT 出願) することで、世界をリードする次世代の癌研究の中心を担う女性研究者を目指す。

### 2) 序

肺癌と膵臓癌は、わが国で悪性腫瘍死亡数が第 1 位と第 4 位であり、年間約 11 万人が両癌種で死亡する。肺癌と膵臓癌で死亡数が高いことは、有効な早期診断マーカーを欠くことにも起因している。申請者らの、生体内酵素的切断反応監視システムという独創的な発想と独自の尿中蛋白質断片解析法は、多癌種に応用でき、複数の高精度早期癌診断マーカーを網羅的に同定できるという優れた実績に繋がっている。早期の肺癌と膵臓癌の検出を飛躍的に進歩

させる高感度の診断システムの創出は、根治可能な患者数の増加と肺癌・膵臓癌死亡数の大幅な減少に繋がり、社会への著しい貢献が期待される。申請者らは、癌医療の向上を目指す知財の成果(特願 2016-030267)を最大化するために、既に企業と体外診断薬の研究開発に着手している。多癌種で微小病変の早期診断尿中マーカーが確立され、産学連携が推進されれば、経済や産業上の波及効果も計り知れない。これまでの革新的がん研究(研究代表者 宮崎大学 中里雅光)により、肺扁平上皮癌の新規診断マーカーや、癌患者で特異的に生じる蛋白断片末端のアミド化という新たな事象を発見しており、さらなる知財の特許化が望める。本研究は、これまでにない独自の手法で癌生物学に迫るもので、科学・技術的な波及効果も高い。本研究は、発癌や癌進展や再発の分子生物学的機構の理解の一助となり、precision medicine の実現や診療ガイドライン改訂への貢献も期待できる。尿検体から癌患者の予後予測、術後再発予測に関する情報が得られれば、新規癌治療開発における患者選択にも有益であり、臨床試験の質の向上に繋がる。尿検体を用いる検診は安全で廉価であり、医療の地域格差の改善を含めた受診率の大幅な向上が期待できる。本事業では、申請者らが発見した肺腺癌、肺扁平上皮癌、膵臓癌の早期診断マーカーの有用性を多施設共同で実証し、各癌種で2種以上の早期診断マーカーを確定する。開発したELISAキットを用い、肺癌と膵臓癌の尿検体で早期癌診断マーカー測定し、判別性能を確認する。得られた知財の特許申請を行う。将来的に、企業と共同によりELISAキットを用いた多施設大規模共同研究と模擬検診を実施し、検診への実用化を実証する。早期肺癌・膵臓癌診断マーカー測定ELISAキットの体外診断薬としての承認を目指す。

### 3) 実験方法

- ① 新規尿中マーカー断片の肺腺癌における診断精度の検証
- ② 患者予後とバイオマーカーとしての有効性の検証
- ③ 予後・治療効果予測マーカーの発現との連関の検証
- ④ 新規尿中マーカーの肺癌組織における発現の検証

### 4) 結果

#### ①新規尿中マーカー断片の肺腺癌における診断精度の検証

患者への研究計画の説明、研究参加の同意のための準備を行い、研究分担者(坪内)と共に、肺腺癌と非悪性呼吸器疾患と重喫煙者と健常人に研究計画の説明を行い、研究参加の同意を取得し、尿検体および血清検体を回収した。肺腺癌症例において、新規尿中マーカーA断片は血清

CEA と比較して陽性率が高かった（マーカーA 断片：78.5%、CEA：28.5%）。早期肺腺癌 40 例 および健常者 26 名の尿中マーカー断片値を比較した結果、特異度 97.5%かつ ROC-AUC 値が 0.83 と高値であった（Fig. 1）。

### ②患者予後とバイオマーカーとしての有効性の検証

上記の患者の新規尿中マーカー値を測定後、前向きに予後を調査した。生存期間について、それぞれ 2 種の尿中マーカーについて中央値を基準に尿中マーカー高値群と低値群に群別化し、ログランク検定で検討した。また多変量解析を、Cox 比例ハザードモデルを用いて検討する。交絡因子は年齢、性別、進行度、脳転移/脊椎転移の有無、癌の既往、累積喫煙量とする。2 年生存率の比較について、それぞれ 2 種の尿中マーカーについて中央値を基準に尿中マーカー高値群と低値群に群別化し、カイニ乗検定あるいはフィッシャー正確確率検定で比較検討した。

### ③予後・治療効果予測マーカーの発現との関連の検証

早期肺腺癌患者を対象として、手術検体を用いた既存予後予測因子の発現を免疫染色(TTF-1、EML4-ALK 融合遺伝子)と Polymerase chain reaction(p16/CDH13 プロモーター領域メチル化、EGFR 遺伝子変異)にて解析した。(1) TTF-1 発現(high-TTF-1 群/low-TTF-1 群)、(2) p16/CDH13 プロモーター領域メチル化(陽性群/陰性群)、(3) EGFR 遺伝子変異(陽性群/陰性群)、(4) EML4-ALK 融合遺伝子(陽性群/陰性群)との関連をカイニ乗検定あるいはフィッシャー正確確率検定で解析した。12 症例の早期肺腺癌患者の TTF-1、p16/CDH13 プロモーター領域のメチル化を解析した。

### ④新規尿中マーカーの肺癌組織における発現の検証

早期肺腺癌の手術検体の余剰サンプルを用いて、新規尿中マーカーB断片の発現を、免疫染色およびwestern blotting法により解析した。その結果、肺腺癌組織において新規尿中マーカーB断片が健常肺と比較して高率に発現していることが示された（Fig. 2）。現在、日本人由来肺腺癌細胞株を用いて新規尿中マーカー断片の発現および責任酵素の探索を行っている。

Fig. 1

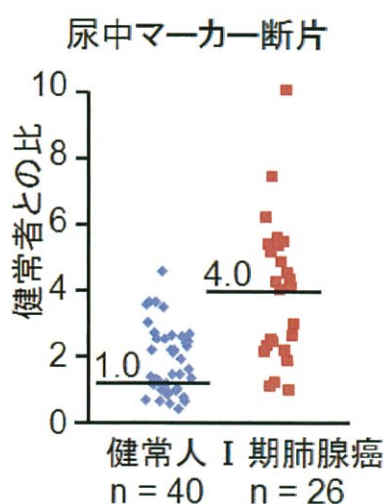
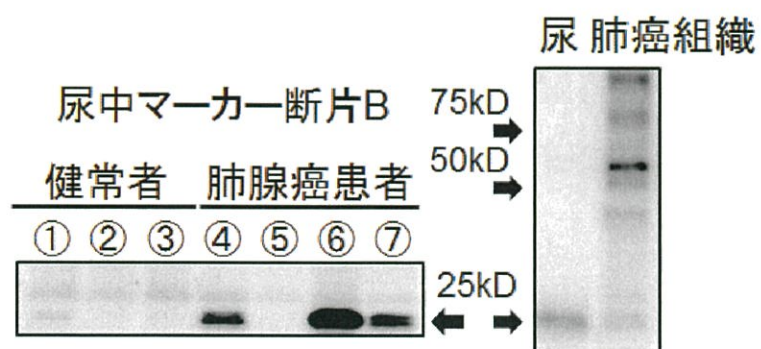


Fig. 2



## 5) 考察

本研究では、臨床情報を収集した手術例を含む肺腺癌と肺扁平上皮癌、肺癌リスク疾患である慢性閉塞性肺疾患、膵臓癌、膵臓癌リスク疾患である慢性膵炎、ならびに健常者の尿と血清を多施設より前向きに収集し、前述の新規尿中マーカ―の診断精度を最新の高精度定量質量分析系である multiple reaction monitoring(MRM)解析により検証した。手術症例について、手術前後で尿中蛋白質断片値が低下することを検証し、尿中蛋白質断片値の術後再発率と予後との相関を解析した。今後さらに、手術検体を用い、癌細胞での蛋白質断片発現および、肺癌と膵臓癌の共通の発癌イニシエーターである KRAS 遺伝子変異と蛋白質断片発現との関連を解析する。早期の肺癌と膵臓癌の検出を飛躍的に進歩させる高感度の診断システムの創出は、根治可能な患者数の増加と肺癌・膵臓癌死亡数の大幅な減少に繋がり、社会への著しい貢献が期待される。肺癌と膵臓癌の早期発見は、抗癌剤治療患者数の減少に繋がり、医療経済に対する効果も大きい。

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか。

近年、癌の罹患率の上昇、早期発見の難しさ、再発の問題点から新規診断システムの開発が必要とされている。生体内酵素的切断反応監視システムという独創的な発想と独自の尿中蛋白質断片解析法は、多癌種に応用でき、複数の高精度早期癌診断マーカ―を網羅的に同定できるという優れた実績に繋がっている。早期の肺癌と膵臓癌の検出を飛躍的に進歩させる高感度の診断システムの創出は、根治可能な患者数の増加と肺癌・膵臓癌死亡数の大幅な減少に繋がり、社会への著しい貢献が期待される。

私は、シニア・リサーチフェロー期間中に実施した研究成果、手法、考察、得られた成果を活かし、今後も高精度早期癌診断マーカ―の同定・健康診断への導入を目指して研究に邁進したいと考えています。