

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
(先端計測分析技術・機器開発プログラム)  
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 自己抗体マーカー探索システムの開発  
(英語) **Development of autoantibody marker search system**

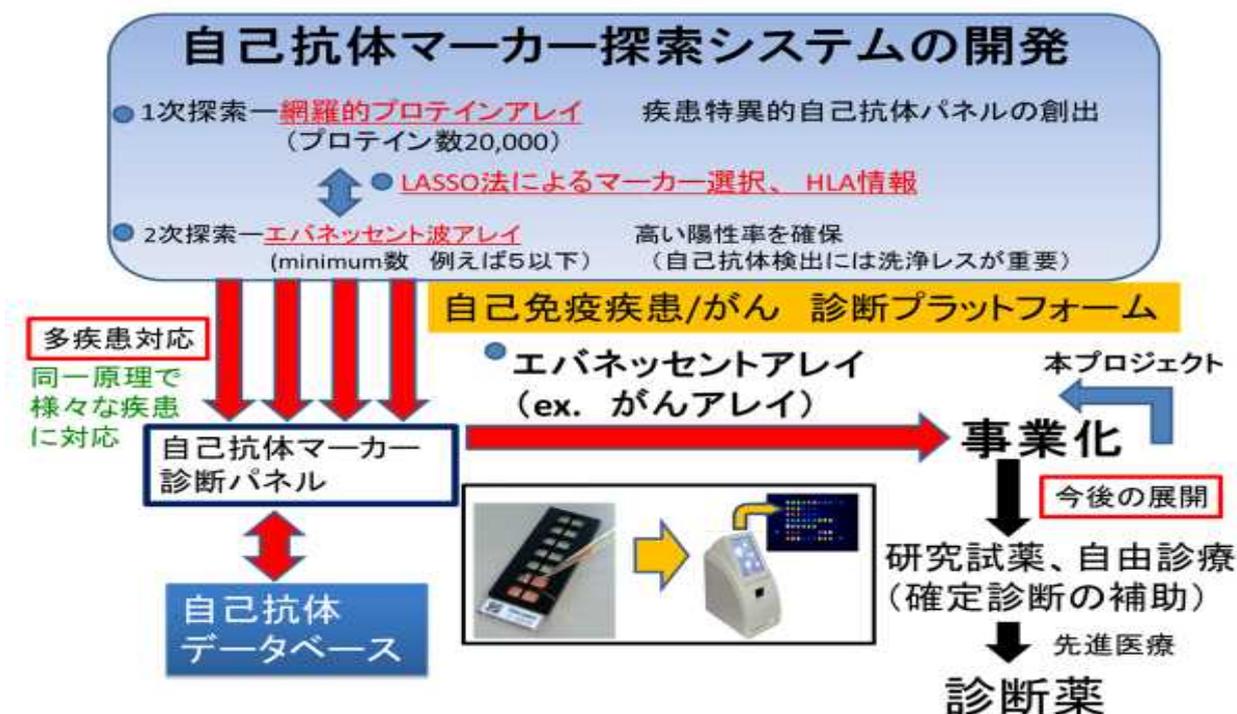
研究開発実施期間：2015年4月1日～2019年3月31日(予定)

研究開発代表者 氏名：(日本語) 五島直樹  
(英語) Naoki Goshima

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリングセンター・研究チーム長  
(英語) Team Leader, Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of  
Advanced Industrial Science and Technology

## II 研究開発の概要

1次探索として2万種プロテインアレイ(未変性タンパク質を搭載)の開発、網羅的自己抗体解析を行い、特異度の高いマーカー候補を情報解析によって選出した。2次探索としてエバネッセント波(EN)プロテインアレイを開発し、低親和性の自己抗体も検出することによって、陽性率の高い自己抗体マーカー候補の絞り込みを情報解析によって行った。これらの自己抗体データは、データベースに格納し、データの蓄積を可能にした。各参画機関の技術を連結、システム化して、自己抗体マーカー探索システムの確立を行い、汎用的疾患診断の加速を目指す体制を構築した。本プロジェクトの成果および開発技術を生かし、産総研開発ベンチャーを起業し、社会に成果を還元できる体制も整備した。



### (開発項目1) アレイ用タンパク質合成 (セルフリーサイエンス (CFS))

#### 1) 2万種の網羅的タンパク質合成

高密度プロテインアレイに搭載する各種タンパク質について、代表機関である産総研から2万種類ヒトタンパク質発現用PCR産物を貸与し、コムギ無細胞系タンパク質合成をCFSが担当した。ヒト2万種合成タンパク質クルード溶液を産総研に供給した。

#### 2) 膜タンパク質の合成

CFSが保有する技術により調製した膜タンパク質の、プロテインアレイへの搭載を検討した。モデルタンパク質として選定したT1R1およびDRD1について、至適条件を検討した結果、プロテオリポソームとして調製することに成功した。プロテオリポソームについて液相系では結合検出に問題なかったことから、プロテインアレイに搭載する場合に何らかの立体構造障害が起きている可能性が示唆され、濃度検討など今後の課題となった。

#### 3) エバネッセント波(EN)アレイ作製およびELISAプレート作製用タンパク質の供給

ENアレイ作製およびELISAプレート作製に使用する基板固定化用タンパク質として、検討用指定タンパク質(精製タンパク質8種および2種)、高密度プロテインアレイで絞り込まれたマーカー候補タンパク質(乳がん用39種(精製および未精製タンパク質)、肺扁平上皮がん用20種(未精製)、膀胱がん用

20種（未精製）、エバネッセント波アレイで絞り込まれたマーカー候補タンパク質（肺扁平上皮がん用6種（精製タンパク質））の合成および精製を行った。

#### （開発項目2）2万種タンパク質アレイ作製装置の開発（産総研）

グルタチオン（GSH）で表面コートしたアモルファスカーボン基板（aC基板、㈱日本軽金属）を使用し、ピンヘッド装置（1536ピン搭載）を使用して基板上に液滴を形成させ、非乾燥で目的タンパク質を基板に結合させた。スポット抜けを最小限にするため抜けの多いピンを特定し、交換することによって、約14,000スポット/基板のアレイのスポット抜けを防いだ。均一な2万種タンパク質アレイ作製のためのプロトコルを確立し、アレイ作製コストの低価格化、作製時間の短縮化を図り、事業化で対応可能なレベルに達した。

#### （開発項目3-1）プロテインアレイ基板の開発（日本軽金属）

プロテインアレイに使用するカーボン基板表面のアミノ基分布を均一にする表面コート方法の開発を行った。アミノ基の均一性は蛍光スキャナーで基板表面をスキャンしアミノ基に由来する蛍光強度のCV値で評価した。カーボン基材にポリマーを塗布する際に基材を固定する真空チャックの真空度を規定値に調整する際の空気流入による真空チャックの振動等の影響について検討し、最適な真空度調整法と真空チャックのメンテナンス頻度の設定によりCV値をほぼ7%以下に抑えることができた。さらに、カーボン基材と塗布したポリマーを共有結合させて固定化する際の条件に付いて検討した。固定化するには幾つかの因子があるが、特に因子AがCV値を安定的に低く抑えるために重要な因子であることを見出し、因子Aの最適範囲を決定した。

#### （開発項目3）-2 2万種タンパク質アクティブアレイの作製および（産総研）

#### （開発項目4）2万種タンパク質アクティブアレイによる網羅的自己抗体解析（産総研）

検出シグナルのSN比の改善を目的に、血清検体とプロテインアレイの効率的な反応条件を検討した。血清にバックグラウンド低減剤を添加して、血清中に含まれる抗コムギヒトIgGを吸収することにより、コントロール抗原検出のCV値を5.7%まで低減した。また、血清の基盤との反応のバックグラウンドを均一化し、高感度を行うために、アレイ基板の洗浄を均一に行うための補助器具の開発も行った。高密度アレイだけでなく、疾患領域に特化したフォーカスアレイの開発も行った。多くの種類の自己抗体を日常的に測定し、診断を行っている筋炎疾患に対する筋炎アレイを開発した。また、本プロジェクトの2次スクリーニングに使用するエバネッセント波アレイを効率よく作製するために、2万種タンパク質アクティブアレイの作製ノウハウを利用して、ガラス基板を用いたエバネッセント波アレイの作製基盤技術の開発にも成功した。

#### （開発項目5）自己抗体測定試料の収集（北里大学）

#### （開発項目7）エバネッセント波アレイの作製、エバネッセント波測定装置の開発、評価（北里大学）

#### （開発項目8）エバネッセント波アレイによる高感度自己抗体マーカー探索（北里大学）

エバネッセント光励起蛍光法（EN法）を原理とし、実用化を目指す測定システム（Bio-REX Scan 200；株式会社レクザム）を用いて、計画された癌種である乳癌、肺癌および膀胱癌患者の腫瘍関連自己抗体（TAAb）を検出した。

#### **【乳癌】**

治療前の乳癌患者14例（ステージI；5例、II；7例、III；2例）を対象に、陽性率が高かったTAAbは、TP53が64.3%、FLJ32XXXAAAFおよびLOC100132XXXが57.1%、FLJ43XXXAAAF、FLJ45XXXAAAFおよびPOTED

が 50.0%であった。CEA は全例陰性、CA15-3 は 14.3%と、陽性率は TAAb の方が高値であった。また、FLJ32XXXAAAF、FLJ45XXXAAAF、TP53 を組合せると、陽性率は 85.7%にまで増加した (特異度も 85.7%)。早期乳癌の CEA や CA15-3 の陽性率は 10%前後 (乳腺. 腫瘍マーカー臨床マニュアル、医学書院、1999) であり、TAAb の組合せ測定は早期乳癌発見に有用である。

#### **【肺癌】**

治療前の肺癌 (扁平上皮癌) 患者 80 例 (ステージ I ; 36 例、II ; 17 例、III ; 22 例、IV ; 5 例) を対象に、陽性率が高かった TAAb は、TP53 が 44.0%、BTBD1 が 37.1%、MAGEB6 が 32.2%であった。単独では低い陽性率であったが、乳癌同様組合せ測定すると、ステージ 1 で 38.9%、II で 52.9%と早期肺癌でも高値を示した。

#### **【膀胱癌】**

治療前の膀胱癌患者 102 例 (Ta; 25 例、T1; 40 例、T2; 8 例、T3; 23 例 T4; 6 例) を測定した。FLJ23XXXAAAF、HXXXX、HXXXX、PXXXX を組合せると、早期膀胱癌 (T1) で陽性率は 40.0%に達した。尿中 NMP22 や尿中 CK8-18 も高感度であるが、膀胱癌に血清マーカーは存在しないため、今後の発展が期待される。

#### **（開発項目 5） 自己抗体測定試料の収集 (千葉大学)**

各年代、性別のヒト正常対照群の収集と川崎病発症後、標準治療である超大量 IgG 静注療法 (IVIG) 開始前の血清およびゲノムシーケンスによる HLA タイピングに供するための DNA の提供が目標であった。前者の正常対照群の血清および DNA は、10 歳未満、10 代、20 代、30 代、40 代、50 代、60 代の各年代の女性 10 名、男性 10 名を収集することを目標とした結果、全体で女性 63 名、男性 63 名の総計 126 名の血清と DNA を収集することができた。後者は他のプロジェクトで共同研究を行っている東京女子医大八千代医療センター小児科の濱田洋通教授の協力を得て合計 70 症例を収集した。

我々のこれまでの川崎病研究から *ITPKC*, *CASP3*, *ORAI1* の 3 遺伝子は  $Ca^{2+}$ /NFAT 経路に関与し、リスクアレルは細胞内 Ca を上昇させる事が発症に関与する機序である可能性が高いことを明らかにした (Hamada H et al., Lancet 16, 1128-1137, 2019)。

#### **（開発項目 6） 網羅的自己抗体解析の情報解析 (ダイナコム)**

川崎病、乳がん、肺扁平上皮癌、膀胱癌、および各疾患の対象サンプル全 150 例の血清サンプルに対する 2 万種タンパク質アクティブアレイ (以下プロテインアレイと記載) の検出結果について疾患関連マーカー候補の探索を行った。IgG タンパク質による標準化、Smirnov - Grubbs 検定によるノイズ除去の後、Permutation 法でシグナル値を算出した。疾患ごとに LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) または Elastic Net でモデル (最適解) を構築し、疾患関連マーカー候補を選定した。また最適解に加え、第 1, 2 番目のマーカー候補を除外したモデル (準最適解, 準々最適解)、および効果量 (Cohen's D) による判定結果を勘案し、疾患ごとに約 40 種のマーカー候補を選定した (表 6-1)。これらの一連の情報解析システムは R を用いて解析パイプラインを実装した。

また、川崎病患者群で免疫グロブリン大量療法に対して結果良好な応答群と結果不良な不応群についてプロテインアレイおよび疾患カルテ情報、HLA 情報を組み合わせた疾患マーカー候補の探索を行い、臨床データ 1 件と HLA データ 3 件がマーカー候補として得られた (AUC=0.945)。また、クラスタ解析、主成分分析を行いデータの可視化を行った。臨床情報と自己抗体シグナル、HLA 型を統合した解析プログラムを構築した。

#### **（開発項目 7） エバネッセント波アレイの作製、エバネッセント波測定装置の開発、評価**

## (レクザム)

本プロジェクトにおいては、抗原が最大 21 種スポットでき、1 枚のチップで 7 つの検体を同時観察可能な規格を策定し、北里大学側が選定した抗原を最大 21 種までチップ化して 100 枚以上のチップを北里大学側に供給することができた。

またエバネッセントスキャナーの装置本体側についても改良検討も実施し、「21 種スポット規格自動解析ソフトウェア」を開発し、北里大学に供給した。本成果は以降の北里大学様でのエバネッセントスキャナーを用いた抗原チップ解析業務の推進に結びついた。

### (開発項目 9) マーカー候補自己抗体の絞り込み (ダイナコム)

肺扁平上皮癌、および膀胱癌のエバネッセント波アレイ数値化 (mock による back ground 処理後および IgG での補正処理後) データを用いて、疾患判定モデル構築およびマーカー候補の選定を行った。これらの情報解析は開発項目 6 で構築した解析パイプラインをベースにした。AUC や効果量等による判定性能の評価に加え、repeated cross validation 機能を追加した。肺扁平上皮癌については、ELISA 測定実験に向けてマーカー数を 3 個までに絞り込んだモデルを選定した。

### (開発項目 10) データベースシステム整備 (ダイナコム)

2 万種タンパク質アクティブアレイの検出結果により得られる自己抗体プロファイリングデータおよび疾患との関連解析データ、またエバネッセント波アレイにより得られる自己抗体と疾患との関連解析データについて検索可能な形でのデータベース化を行った。

### (開発項目 7) エバネッセント波アレイの作製、エバネッセント波測定装置の開発、評価

(コスミックコーポレーション)

### (開発項目 11) ELISA による単一有用自己抗体測定キットの開発

(コスミックコーポレーション)

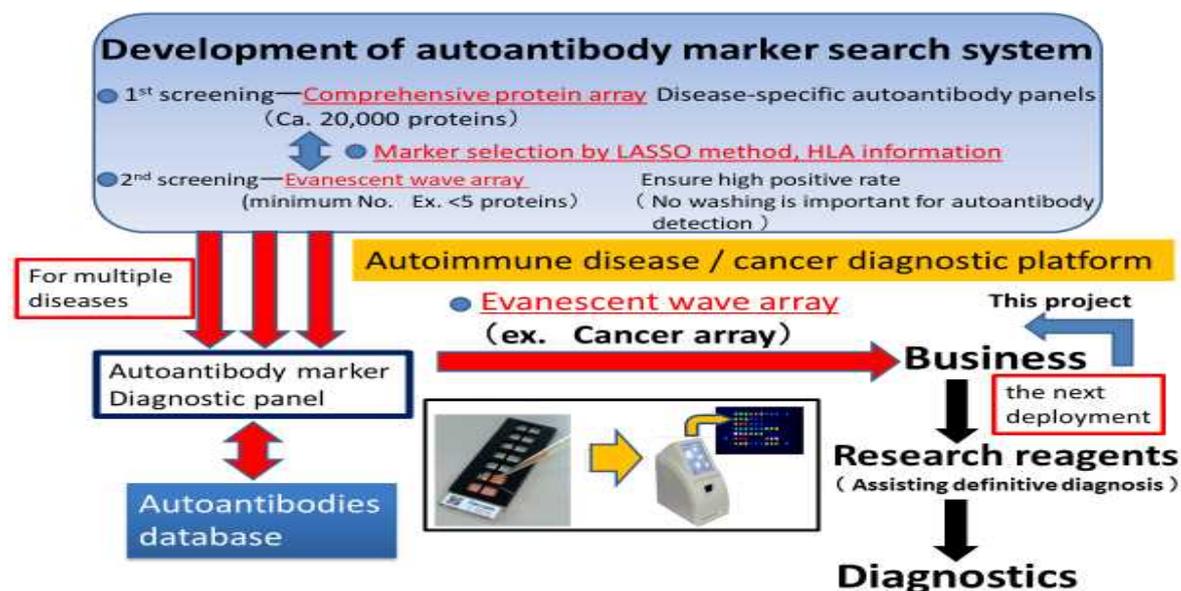
### (開発項目 12) EN (エバネッセント) 法による自己抗体測定キットの評価

(コスミックコーポレーション)

本研究開発課題のアウトプットに位置する自己抗体測定系の構築と評価を行った。先行研究では、エバネッセント波アレイによって 3 種類の自己抗体が肺扁平上皮がんの腫瘍マーカー候補として提示された (平成 27~29 年度)。それを受けて、弊社では各抗原を同時に固相化した 96 穴プレートを用いたカクテル ELISA (Enzyme-linked Immuno-solvent Assay) 系を構築し、診断性能を臨床病期別に評価した (平成 30 年度)。すると、肺扁平上皮がんの発症早期 (ステージ 1、2) の陽性率が約 36% となり、既存の肺扁平上皮がんのマーカー (後述) に比べて診断感度が高いことが示唆された。

## II Outline of R & D

In 1<sup>st</sup> screening, comprehensive autoantibody analysis using 20,000 protein-array was performed, and marker candidates with high specificity were selected by information analysis. In 2<sup>nd</sup> screening, an evanescent wave protein-array was prepared, and autoantibodies with a high positive rate were narrowed down by analysis by detecting low-affinity autoantibodies. These autoantibody data were stored in a database to enable data accumulation. The technology of each participating organization was linked and systematized to establish an autoantibody marker search system, and a volume aimed at accelerating general-purpose disease diagnosis was constructed. Utilizing the achievements and technical development of this project, we established an AIST venture and established a company that can return results to society.



### Development of protein active array

Droplets are formed on an amorphous carbon array-plate (aC array-plate, Nippon Light Metal Co., Ltd.) coated with glutathione (GSH) by using a pin head device (1536 pins). By identifying and replacing pins with many missing points in order to minimize spot missing, the ratio of spot missing in an array of about 14,000 spots / substrate was reduced to 0.01% or less. Established a protocol for the production of uniform 20,000 protein arrays, reduced the cost of producing the array, and shortened the production time.

Using the know-how of manufacturing protein arrays (ca. 20,000 proteins), we have succeeded in developing the fundamental technology for manufacturing Evanescent wave arrays using glass substrates.

### Analysis of autoantibody by using Evanescent wave array

Based on the evanescent light excitation fluorescence method (EN method) and using a measurement system (Bio-REX Scan 200; Rexam Co., Ltd.) aiming for practical use, tumor-related autoantibodies (TAAb) in patients with breast cancer, lung cancer and bladder cancer were detected.

#### **【breast cancer】**

In 14 pre-treatment breast cancer patients (Stage I; 5 cases, II; 7 cases, III; 2 cases) FLJ45XXXXAAF and POTES were 50.0%. CEA was negative in all cases, CA15-3 was 14.3%, and the positive rate was higher for TAAb. When FLJ32XXXXAAF, FLJ45XXXXAAF, and TP53 were combined, the positive rate increased

to 85.7% (specificity was also 85.7%). The positive rate of CEA and CA15-3 in early breast cancer is around 10% (mammary gland. Tumor marker clinical manual, medical school, 1999), and the combined measurement of TAAb is useful for early breast cancer detection.

#### **【lung cancer】**

In 80 patients with pre-treatment lung cancer (squamous cell carcinoma) (stage I; 36, II; 17, III, 22; vaginal; 5), TAAb with a high positive rate was 44.0% for TP53 BTBD1 was 37.1% and MAGEB6 was 32.2%. Although it was a low positive rate by itself, it was 38.9% for stage 1 and 52.9% for stage II, which was also high in early lung cancer.

#### **[Bladder cancer]**

102 patients with bladder cancer before treatment (Ta; 25 cases, T1; 40 cases, T2; 8 cases, T3; 23 cases T4; 6 cases) were measured. When FLJ23XXXXAAAF, HXXXX, HXXXX, and PXXXX were combined, the positive rate reached 40.0% in early bladder cancer (T1). Urinary NMP22 and urinary CK8-18 are also highly sensitive, but since there are no serum markers for bladder cancer, future development is expected.

#### **[Kawasaki disease]**

From our previous studies of Kawasaki disease, it is likely that ITPKC, CASP3, and ORAI1 genes are involved in the Ca<sup>2+</sup> / NFAT pathway, and that the risk allele is a mechanism involved in the onset of elevated intracellular Ca (Hamada H et al., Lancet 16, 1128-1137, 2019).

#### **Database**

Create a searchable database of autoantibody profiling data and disease-related analysis data obtained from detection results of 20,000 protein active arrays and autoantibody-disease analysis data obtained by evanescent wave arrays went.

#### **System verification**

We constructed and evaluated an autoantibody measurement system located at the output of this research and development project. The positive rate of early squamous cell carcinoma onset (stages 1 and 2) was about 36%, suggesting higher diagnostic sensitivity than existing markers for lung squamous cell carcinoma.