

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：癌細胞由来分泌小胞を標的とした膵癌早期診断バイオマーカー開発
2. 研究開発代表者： 植田 幸嗣 （公益財団法人がん研究会）
3. 研究開発の成果

- ・膵癌早期診断エクソソームバイオマーカー候補タンパク質同定

平成 26 年度に実施した網羅的 LC-MS/MS 解析で検出されたバイオマーカー候補ペプチドのうち、ペプチド配列解読が不可能だった 20 ペプチドについて、2D-LC-MS/MS 解析による追加同定を試みた。その結果、14 ペプチド（10 タンパク質由来）について有意基準（FDR < 1%）を満たす配列決定に成功した。ただし追加同定された 10 タンパク質は全て細胞質内に局在するタンパク質であり、エクソソームサンドイッチ ELISA による検証試験の対象となりうる細胞膜タンパク質は含まれなかったためエクソソームサンドイッチ ELISA キットの構築やそれに続く検証試験には使用しないこととした。

- ・エクソソームサンドイッチ ELISA による膵癌早期診断エクソソームバイオマーカー検証

探索フェーズにて同定された膵癌バイオマーカー候補に対して、市販の安定供給可能なモノクローナル抗体を複数種類ずつ入手してエクソソームサンドイッチ ELISA 測定系の構築を試みた結果、膵癌早期診断バイオマーカー候補となっている 5 種類のエクソソーム表面抗原タンパク質（JFCR-P00197, P00269, P00288, P00510, P00693）について健常者血中レベルから膵癌患者血中レベルまで十分な測定濃度幅（ダイナミックレンジ）を定量的に検出可能な ELISA キットを構築できた。大規模な検証試験で安定的に利用可能な相対定量用スタンダードについても、上記 5 タンパク質をそれぞれ強制発現させた膵がん細胞株から分泌されたエクソソームを培地中から大量調製して濃縮ストックを構築した。これらの系を次年度に実施する大規模検証試験に使用する。

- ・質量分析マルチマーカー診断法の構築

早期膵がんの検出感度を最大化するため、高速質量分析定量技術である Multiple Reaction Monitoring（MRM）法を用いて複数種類のバイオマーカーを 15 分間の 1 分析で定量する新規多項目診断アルゴリズムの構築を試みた。これまでに同定された 5 種の膵癌早期診断用エクソソーム表面抗原タンパク質（JFCR-P00197, P00269, P00288, P00510, P00693）のアミノ酸配列のうち、それぞれのタンパク質を最も高感度、高特異度に検出可能な部分配列質量（MRM チャネル）を多くの異なる条件（測定対象部分配列、衝突誘起解離エネルギー、定量用フラグメントイオンの選択）での実測定により特定した。次年度は本法を用いて、エクソソームサンドイッチ ELISA 測定系によるシングルマーカーでの診断に比べてさらに感度、特異度を増幅できるかどうかを検証する。