

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Development of early diagnostic biomarkers of lung adenocarcinoma by the detection of cancer-derived protein fragments in the urine
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野 教授 中里 雅光  
(英語) Division of Neurology, Respiriology, Endocrinology and Metabolism  
Department of Internal Medicine, University of Miyazaki,  
Professor, Masamitsu Nakazato
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 蛋白質の質量解析  
(英語) Mass analyses of the protein
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人大阪大学 蛋白質研究所機能・発現プロテオミクス研究系 教授 高尾 敏文  
(英語) Laboratory of Protein Profiling and Functional Proteomics  
Institute for Protein Research, Osaka University,  
Professor Toshifumi Takao
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行  
(英語) Clinical study of lung cancer, structural analyses of the protein fragments in the urine
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 鳥取大学 大学院医学系研究科医学専攻  
教授 清水 英治

所属 役職 氏名： (英 語) Division of Medical Oncology and Molecular Respiriology, University of Tottori, Professor Eiji Shimizu

分担研究 (日本語) 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行

開発課題名： (英 語) Clinical study of lung cancer, structural analyses of the protein fragments in the urine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 徳島大学 大学院医師薬学研究部 呼吸器・膠原病内科学 分野 教授 西岡 安彦

所属 役職 氏名： (英 語) Department of Respiratory Medicine and Rheumatology Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, Professor, Yasuhiko Nishioka

分担研究 (日本語) 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行

開発課題名： (英 語) Clinical study of lung cancer, structural analyses of the protein fragments in the urine

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 呼吸器外科 医員 青景 圭樹

所属 役職 氏名： (英 語) Department of Thoracic Surgery, National Cancer Center Hospital East, Medical Doctor, Keiju Aokage

分担研究 (日本語) 肺癌試料と臨床情報の収集、臨床試験の施行

開発課題名： (英 語) Clinical study of lung cancer, structural analyses of the protein fragments in the urine

研究開発分担者 (日本語) 国立病院機構 宮崎東病院 呼吸器内科 医師 佐野ありさ

所属 役職 氏名： (英 語) National Hospital Organization Miyazaki Higashi Hospital, Medical Doctor, Arisa Sano

分担研究 (日本語) 研究データの統計学的解析

開発課題名： (英 語) Statistic analyses of the research data

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 宮崎大学医学部社会医学講座 データマネジメント分野准 教授 有村 保次

所属 役職 氏名： (英 語) Division of Data Management, Department of Social Medicine, University of Miyazaki, Associate Professor, Yasuji Arimura

分担研究 (日本語) 肺癌試料と臨床情報の収集、尿中蛋白質断片の構造解析  
開発課題名: (英語) Clinical study of lung cancer, structural analyses of the protein fragments in the urine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 宮崎大学医学部内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野  
助教 坪内 拓伸

所属 役職 氏名: (英語) Division of Neurology, Respiriology, Endocrinology and Metabolism,  
Department of Internal Medicine, University of Miyazaki,  
Assistant Professor, Hironobu Tsubouchi

分担研究 (日本語) 臨床試験のモニタリング  
開発課題名: (英語) Monitoring of clinical study

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 宮崎大学医学部内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野  
助教 松元 信弘

所属 役職 氏名: (英語) Division of Neurology, Respiriology, Endocrinology and Metabolism,  
Department of Internal Medicine, University of Miyazaki, Assistant  
Professor, Nobuhiro Matsumoto

分担研究 (日本語) 肺癌症例試料、非癌症例試料と臨床情報の収集  
開発課題名: (英語) Clinical study of lung cancer, structural analyses of the protein fragments in the urine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 宮崎大学医学部内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野  
助教 柳 重久

所属 役職 氏名: (英語) Division of Neurology, Respiriology, Endocrinology and Metabolism,  
Department of Internal Medicine, University of Miyazaki,  
Assistant Professor, Shigehisa Yanagi

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究者は、早期肺腺癌を高確率に検出できる新規蛋白質断片候補を同定している。本研究の目的は、この尿中蛋白質断片の有効性を、多面的かつ前向きに検証し、肺腺癌の早期診断技術を確立することである。新規尿中蛋白質断片の I 期肺腺癌診断における精度を独立コホートで確認した。I 期肺腺癌患者で尿中蛋白質断片は術後に低下することを証明した。平成 27 年 10 月に臨床検査製品企業との共同研究契約を締結した。さらに、平成 28 年 2 月に特許庁へ新規の尿中蛋白質断片を出願した(腺がんを体外にて評価する方法。出願番号 2016-030267)。これらの成果を受け、現在、国立研究開発法人日本医療研究開発機構による革新的がん医療実用化研究事業(H29-31)と次世代がん医療創生研究事業(H28-30)において肺癌早期診断システム確立へ向けた研究を継続している。

従来の肺腺癌腫瘍マーカーは、早期癌での陽性率が低いことが問題となっている。研究代表者は、次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム「癌細胞が特異的に生成するシェディング産物の網羅的解析による癌の早期診断システムの開発」(以下、先行研究とする。平成 23 年度-27 年度)において、独自に開発した蛋白質網羅的末端構造解析法により、早期肺腺癌を高確率に診断する複数の新規蛋白質断片候補を同定した。肺腺癌の診断マーカー探索のための最適化を進め、尿 10 ml で測定が可能なハイスループットの解析系を確立した。I 期肺腺癌患者の尿検体を用い、multiple reaction monitoring 解析により、上記の候補蛋白質断片から早期肺腺癌を高精度に検出する新規の診断マーカー(蛋白質 A 断片; ROC-AUC 0.85, 蛋白質 B 断片; ROC-AUC 0.82, 蛋白質 C 断片; ROC-AUC 0.78)を同定している。本研究では、(1)肺腺癌診断での尿中マーカーの精度の検証と予後との関連、(2)肺腺癌罹患ハイリスク群(重喫煙者、特発性肺線維症、胸部画像上のスリガラス病変症例)を対象とした尿中マーカーの早期診断ツールとしての有効性、(3)I 期肺腺癌症例の術後再発率、既知予後予測マーカー、治療効果予測マーカーと新規尿中マーカーとの関連、の 3 つのプロジェクトを進めた。

国内 5 施設(宮崎大学、鳥取大学、徳島大学、国立がん研究センター東病院、宮崎東病院)の呼吸器内科と呼吸器外科の症例を対象に、平成 26 年 10 月 28 日の症例登録開始から 815 症例の症例登録(研究期間 3 年間の目標症例数 780 例に対し 104%を達成)を完了した。症例の内訳は、(1)肺腺癌例 211 例(うち I 期肺腺癌 95 例)、非悪性呼吸器疾患例 173 例、他癌腫 110 例、重喫煙者 31 例、健常者 83 例、(2)重喫煙者 50 例、特発性肺線維症症例 51 例、小型スリガラス病変症例 51 例、(3)肺腺癌例 55 例であった。

I 期肺腺癌患者 80 例の蛋白質 B 断片の ROC-AUC 値が 0.74 であった。これは先行研究と同等の結果で、従来用いられている血清 CEA (ROC-AUC: 0.58) を上回っていた。外科切除を行った I 期肺腺癌患者の 18 症例で、術後の尿中蛋白質断片が術前より低下することを証明した(蛋白質 C 断片。術前  $1.00 \pm 0.24$ 、術後  $0.67 \pm 0.18$ )。さらに、手術時に胸部 HRCT 上 20mm 以下のすりガラス状陰影を呈していた I 期肺腺癌 10 例(うち minimally invasive carcinoma 4 例、adenocarcinoma in situ 5 例、lepidic predominant adenocarcinoma 1 例)について、蛋白質 B 断片の陽性率は 50%であった一方、血清 CEA 値の陽性率は 20%であった。

肺腺癌組織と肺扁平上皮癌組織を用い、肺腺癌で蛋白質 A、B および C の発現が亢進していることを明らかにした。これまでに同定している新規尿中がん診断マーカー候補 7 種類について特異的に反応するポリクローナル抗体を作成し、実際の尿検体を用いてウエスタンブロッティング法にて検証を行った。肺腺癌細胞株で蛋白質断片 A の断片化率が正常肺細胞と比較して 2.35 倍上昇していることを見出した。

Lung cancer is the first leading cause of cancer deaths in Japan and United States. Early detection of lung cancers is quite limited because of the lack of sensitive and specific biomarkers. Using our own technique of comprehensive high-throughput protein profiling excreted into the urine that can detect small amount of protein fragments with only 10 ml of sample, and MRM (multiple reaction monitoring), a cutting edge of highly sensitive and selective method for the targeted quantitation of protein fragments excreted into the urine, we recently discovered multiple early diagnostic markers of lung adenocarcinoma. The purpose of our projects are (1) to validate the diagnostic accuracy of these markers in early lung adenocarcinoma, and (2) to establish the diagnostic methods for the introduction of comprehensive medical examination.

We validated the accuracy of these markers in the diagnosis of stage I lung adenocarcinoma. We measured the protein fragments in the urine and serum levels of CEA, a conventional tumor marker of lung adenocarcinoma, in independent cohort constituting of five independent institutes. The cohorts comprised healthy control subjects (n = 83), patients with lung adenocarcinoma (n = 211, including stage I lung adenocarcinoma: n = 95), lung cancer other than lung adenocarcinoma (n = 110), benign respiratory diseases (n = 173), idiopathic pulmonary fibrosis (n = 51), heavy smoker (n = 81), and patients with ground glass opacities in the lung HRCT (n = 51).

ROC-AUC of protein B fragment was 0.74. The ROC-AUC value of the urine protein fragments in the validation cohort was comparable with the counterparts of training cohort, and both were higher than those of CEA (ROC-AUC 0.58). The level of protein C fragment was decreased after resection of stage I lung adenocarcinoma (before resection:  $1.00 \pm 0.24$ , after resection:  $0.67 \pm 0.18$ ).

We observed the increased expressions of proteins A, B, and C in the lysates of lung adenocarcinoma tissues. We produced the polyclonal antibodies against seven types of early diagnostic marker protein fragments, and validated the accuracy of the antibodies in the detection of urinary protein fragments by western blotting. The ratio of fragment to protein A in the cell lines of lung adenocarcinoma was 2.35-fold higher than that of normal cell line.

We demonstrated that the urine protein fragments which can distinguish the stage I lung adenocarcinoma from healthy controls at high accuracy. We observed the decreased levels of urinary protein fragments after resection of stage I lung adenocarcinoma. We have applied a patent on the thirteen novel early diagnostic markers of stage I lung adenocarcinoma (Patent Application No. 2016-030267). We have conducted the licensing-out of our intellectual property right to the company of clinical laboratory products.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 13 件)

1. Yanagi S, Tsubouchi H, Matsumoto N, Nakazato M, et al. The Impacts of Cellular Senescence in Elderly Pneumonia in Age-Related Lung Diseases That Increase the Risk of Respiratory Infections. *International Journal of Molecular Science*. 2017, 18, 503.
2. Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, et al. MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion, and tumor formation. *Oncogene*. 2017, 1-11.
3. Numasaki M, Tsukamoto H, Tomioka Y, Nishioka Y, Ohrui T. A Heterodimeric Cytokine, Consisting of IL-17A and IL-17F, Promotes Migration and Capillary-Like Tube Formation of Human Vascular Endothelial Cells. *Tohoku J. Exp. Med*. 2016, 240, 47-56.
4. Hasegawa K, Tagawa M, Takagi K, Tsukamoto H, Tomioka Y, Suzuki T, Nishioka Y, Ohrui T, Numasaki M. Anti-tumor immunity elicited by direct intratumoral administration of a recombinant adenovirus expressing either IL-28A/IFN- $\lambda$ 2 or IL-29/IFN- $\lambda$ 1. *Cancer Gene Ther*. 2016, 23, 266-77.
5. Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Tezuka T, Toyoda Y, Tobiume M, Otsuka K, Sakaguchi S, Goto H, Arisawa K, Nishioka Y. Analysis of the Prognostic Factors of Extensive Disease Small-Cell Lung Cancer Patients in Tokushima University Hospital. *J Med Invest*. 2016, 63, 286-93.
6. Toyoda Y, Hanibuchi M, Kishi J, Kawano H, Morizumi S, Sato S, Kondo M, Takikura T, Tezuka T, Goto H, Nishioka Y. Clinical features and outcome of acute exacerbation of interstitial pneumonia associated with connective tissue disease. *J Med Invest*. 2016, 294-9.
7. Kakiuchi S, Hanibuchi M, Tezuka T, Saijo A, Otsuka K, Sakaguchi S, Toyoda Y, Goto H, Kawano H, Azuma M, Ogushi F, Nishioka Y. Analysis of acute exacerbation of interstitial lung disease associated with chemotherapy in patients with lung cancer: a feasibility of S-1. *Respir Investig*, 2016, 55, 145-52.
8. Toyoda Y, Ozaki R, Kishi J, Hanibuchi M, Kinoshita K, Tezuka T, Goto H, Ono H, Nagai K, Bando Y, Doi T, Nishioka Y. An autopsy case of aortic intimal sarcoma initially diagnosed as polyarteritis nodosa. *Intern Med*. 2016, 55, 3191-5.
9. Saijo A, Hanibuchi M, Goto H, Toyoda Y, Tezuka T, Nishioka Y. An analysis of the clinical features of lung cancer in patients with connective tissue diseases. *Respir Investig*. 2016, 55, 153-60.
10. Nishioka Y. Cancer immunotherapy as a promising fourth standard therapy for lung cancer: Beyond 20 years for the development of immunotherapy. *Respir Investig*. 2016, 54, 297.
11. Kaneko MK, Abe S, Ogasawara S, Fujii Y, Yamada S, Murata T, Uchida H, Tahara H, Nishioka Y, Kato Y. Chimeric Anti-Human Podoplanin Antibody NZ-12 of Lambda Light Chain Exerts Higher Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Complement-Dependent Cytotoxicity Compared with NZ-8 of Kappa Light Chain. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2017, 36, 1-5.
12. Oyama Y, Enomoto N, Suzuki Y, Kono M, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Kuroishi S, Yokomura K, Toyoshima M, Imokawa S, Oishi K, Watanabe S, Kasahara K, Baba T, Ogura T, Ishii H, Watanabe K, Nishioka Y, Suda T. Evaluation of urinary desmosines as a noninvasive diagnostic biomarker in patients with idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis (PPFE). *Respir Med*. 2017, 123, 63-70.

### IV.

1. Kaneko MK, Nakamura T, Honma R, Ogasawara S, Fujii Y, Abe S, Takagi M, Harada H, Suzuki H, Nishioka Y, Kato Y. Development and characterization of anti-glycopeptide monoclonal antibodies against human podoplanin using glycan-deficient cell lines generated by CRISPR/Cas9 and TALEN. Cancer Med. 2017, 6, 382-96.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 肺癌悪液質における摂食関連分子の発現の検討 ポスター, 小野村仁美、坪内拓伸、三浦綾子、柳重久、松元信弘、中里雅光, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016/4, 国内.
2. Role of fibrocytes and growth factors in lung fibrosis and cancer, 口頭, 西岡安彦, 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016/4, 国内.
3. Repair pathways: from lung development to aging of the lung. 口頭, Nishioka Y. ERS2016 Internathional Conference, 2016/9/4, 海外.
4. Anti-fibrotic efficacy of nintedanib on pulmonary fibrosis via suppression of fibrocyte activity. ポスター, Morizumi S, Sato S, Abe S, Okazaki H, Yanjuan C, Goto H, Hanibuchi M, Aono Y, Ogawa H, Hanibuchi M, Uehara H, Nishioka Y. ERS2016 International Conference, 2016/9/4, 海外.
5. 呼吸器疾患のトランスレーショナルリサーチ～アカデミア発の創薬を目指した多職種連携～, 口頭, 西岡安彦, 第 64 回医療薬学公開シンポジウム, 2016/11/20, 国内.
6. 腫瘍免疫学の基礎と肺癌免疫療法の歩み, 口頭, 西岡安彦, 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/21, 国内.
7. 徳島大学病院における進展型小細胞肺癌患者の予後因子に関する後ろ向き研究, ポスター, 荻野広和, 後東久嗣, 西條敦郎, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/19, 国内.
8. 悪性胸水を伴った非扁平上皮非小細胞肺癌に対する Bevacizumab 併用化学療法の評価, ポスター, 西條敦郎, 手塚敏史, 荻野広和, 豊田優子, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/19, 国内.
9. 当科における高齢者肺癌の若年者との比較検討, ポスター, 埴淵昌毅, 手塚敏史, 西條敦郎, 荻野広和, 後東久嗣, 西岡安彦. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/21, 国内.
10. 多発性胃十二指腸潰瘍を伴った MTX 関連リンパ増殖性疾患の 1 例, 口頭, 米田浩人, 手塚敏史, 河野弘, 後東久嗣, 岸潤, 吾妻雅彦, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 115 回日本内科学会四国地方会, 2016/11/27, 国内.
11. Gefitinib 投与中に Achromobacter Xylosoxidans による菌血症を発症した肺腺癌の 1 例, 口頭, 香西博之, 手塚敏史, 山下雄也, 西條敦郎, 河野弘, 後東久嗣, 岸潤, 吾妻雅彦, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 115 回日本内科学会四国地方会, 2016/11/27, 国内.
12. 関節リウマチの薬物療法における栄養状態の変化の検討, 口頭, 荻野広和, 岸潤, 河野弘, 手塚敏史, 豊田優子, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 吾妻雅彦, 西岡安彦. 第 27 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会, 2016/12/2, 国内.

13. 当院におけるループス腎炎に対する IVCY と MMF の治療経験, 口頭, 山下雄也, 豊田優子, 荻野広和, 河野弘, 手塚敏史, 岸潤, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 吾妻雅彦, 西岡安彦. 第 27 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会, 2016/12/2, 国内.
14. 15 年前より認める慢性腎機能障害に対してステロイド加療が奏功した腎サルコイドーシスの 1 例, 口頭, 田中こころ, 荻野広和, 宮田淳也, 山下雄也, 森住俊, 近藤真代, 河野弘, 手塚敏史, 豊田優子, 岸潤, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 吾妻雅彦, 西岡安彦. 第 27 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会, 2016/12/2, 国内.
15. 当院における膠原病関連間質性肺炎の急性憎悪の臨床的検討, 口頭, 豊田優子, 山下雄也, 森住俊, 近藤真代, 荻野広和, 河野弘, 手塚敏史, 岸潤, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 吾妻雅彦, 西岡安彦. 第 27 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会, 2016/12/3, 国内.
16. Exon19 と exon21 の遺伝子変異を同時に認めた肺腺癌の 1 例, 口頭, 高島拓也, 手塚敏史, 近藤真代, 飛梅亮, 河野弘, 後東久嗣, 岸潤, 吾妻雅彦, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 56 回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2016/12/23, 国内.
17. Stevens-Johnson 症候群後に発症した閉塞性細気管支炎にステロイドおよびタクロリムスが有効であった 1 例, 口頭, 菊池高史, 手塚敏史, 近藤真代, 荻野広和, 河野弘, 後東久嗣, 岸潤, 吾妻雅彦, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 56 回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2016/12/23, 国内.
18. EBUS-TBNA 後に縦隔炎を発症した縦隔原発セミノーマの 1 例, 口頭, 杉峯優人, 手塚敏史, 香川耕造, 米田浩人, 大塚憲司, 河野弘, 後東久嗣, 岸潤, 吾妻雅彦, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 25 回日本呼吸器内視鏡学会中国四国支部会, 2016/12/23, 国内.
19. EB による末梢神経障害を呈した結核性胸膜炎の 1 例, 口頭, 原倫世, 手塚敏史, 近藤真代, 河野弘, 後東久嗣, 岸潤, 吾妻雅彦, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 第 67 回日本結核病学会中国四国支部会, 2016/12/23, 国内.
20. Yanagi S, Ihi T, Kuroki H, Higa T, Nakazato M: Link between clinical severity of osteoarticular tuberculosis and the combined presence of pulmonary tuberculosis. ポスター, The 26<sup>th</sup> European Respiratory Society International Congress, 2016. 9, 海外.
21. Tsuchida S, Tsubouchi H, Kitamura A, Matsumoto N, Nakazato M: Risk factors of febrile neutropenia induced by chemotherapy in lung cancer patients. ポスター, The 26<sup>th</sup> European Respiratory Society International Congress, 2016. 9, 海外.
22. Miura A, Tsubouchi H, Yanagi S, Matsumoto N, Nakazato M: The role of Pten in the cell-fate determination of epithelial cells in lung development. ポスター, The 26<sup>th</sup> European Respiratory Society International Congress, 2016. 9, 海外.
23. Tsubouchi H, Yamagi S, Nakazato M: Ghrelin attenuates lung cancer cachexia through mediating the expression of energy homeostasis related molecules. ポスター, The 21<sup>st</sup> Congress of Asian Pacific Society Respiriology, 2016.11, 海外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 一般市民向け公開講座

期日：2016年11月13日（日）13時30分～16時10分

場所：宮崎市民プラザ・オルブライトホール

公開講座名：世界糖尿病デーin 宮崎 2016 市民講座

糖尿病と癌、柳 重久（宮崎大学医学部 内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野）

(4) 特許出願

特許出願 1

出願番号・公開番号	2016-030267
発明の名称	膵がんを体外にて評価する方法
出願日（優先日）	2016年2月19日
出願人（特許権者）	国立大学法人宮崎大学 国立大学法人大阪大学
出願国	日本
登録日	
登録番号	

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Development of early diagnostic biomarkers of lung adenocarcinoma by the detection of cancer-derived protein fragments in the urine

研究開発担当者 (日本語) 蛋白質研究所 機能・発現プロテオミクス研究室 教授 高尾 敏文  
所属 役職 氏名： (英語) Laboratory of Protein Profiling and Functional Proteomics  
Institute for Protein Research, Osaka University,  
Professor Toshifumi Takao

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究者は、早期肺腺癌を高確率に検出できる新規蛋白質断片候補を同定している。本研究の目的は、この尿中蛋白質断片の有効性を、多面的かつ前向きに検証し、肺腺癌の早期診断技術を確立することである。新規尿中蛋白質断片の I 期肺腺癌診断における精度を独立コホートで確認した。I 期肺腺癌患者で尿中蛋白質断片は術後に低下することを証明した。平成 27 年 10 月に臨床検査製品企業との共同研究契約を締結した。さらに、平成 28 年 2 月に特許庁へ新規の尿中蛋白質断片を出願した(腺がんを体外にて評価する方法。出願番号 2016-030267)。これらの成果を受け、現在、国立研究開発法人日本医療研究開発機構による革新的がん医療実用化研究事業(H29-31)と次世代がん医療創生研究事業(H28-30)において肺腺癌早期診断システム確立へ向けた研究を継続している。

従来の肺腺癌腫瘍マーカーは、早期癌での陽性率が低いことが問題となっている。研究代表者は、次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム「癌細胞が特異的に生成するシェディング産物の網羅的解析による癌の早期診断システムの開発」(以下、先行研究とする。平成 23 年度-27 年度)において、独自に開発した蛋白質網羅的末端構造解析法により、早期肺腺癌を高確率に診断する複数の新規蛋白質断片候補

を同定した。肺腺癌の診断マーカー探索のための最適化を進め、尿 10 ml で測定が可能なハイスループットの解析系を確立した。I 期肺腺癌患者の尿検体を用い、multiple reaction monitoring 解析により、上記の候補蛋白質断片から早期肺腺癌を高精度に検出する新規の診断マーカー(蛋白質 A 断片; ROC-AUC 0.85, 蛋白質 B 断片; ROC-AUC 0.82, 蛋白質 C 断片; ROC-AUC 0.78)を同定している。本研究では、(1) 肺腺癌診断での尿中マーカーの精度の検証と予後との関連、(2) 肺腺癌罹患ハイリスク群(重喫煙者、特発性肺線維症、胸部画像上のスリガラス病変症例)を対象とした尿中マーカーの早期診断ツールとしての有効性、(3) I 期肺腺癌症例の術後再発率、既知予後予測マーカー、治療効果予測マーカーと新規尿中マーカーとの関連、の 3 つのプロジェクトを進めた。

国内 5 施設(宮崎大学、鳥取大学、徳島大学、国立がん研究センター東病院、宮崎東病院)の呼吸器内科と呼吸器外科の症例を対象に、平成 26 年 10 月 28 日の症例登録開始から 815 症例の症例登録(研究期間 3 年間の目標症例数 780 例に対し 104%を達成)を完了した。症例の内訳は、(1) 肺腺癌例 211 例(うち I 期肺腺癌 95 例)、非悪性呼吸器疾患例 173 例、他癌腫 110 例、重喫煙者 31 例、健常者 83 例、(2) 重喫煙者 50 例、特発性肺線維症症例 51 例、小型スリガラス病変症例 51 例、(3) 肺腺癌例 55 例であった。

I 期肺腺癌患者 80 例の蛋白質 B 断片の ROC-AUC 値が 0.74 であった。これは先行研究と同等の結果で、従来用いられている血清 CEA (ROC-AUC: 0.58) を上回っていた。外科切除を行った I 期肺腺癌患者の 18 症例で、術後の尿中蛋白質断片が術前より低下することを証明した(蛋白質 C 断片. 術前  $1.00 \pm 0.24$ 、術後  $0.67 \pm 0.18$ )。さらに、手術時に胸部 HRCT 上 20mm 以下のすりガラス状陰影を呈していた I 期肺腺癌 10 例(うち minimally invasive carcinoma 4 例、adenocarcinoma in situ 5 例、lepidic predominant adenocarcinoma 1 例)について、蛋白質 B 断片の陽性率は 50%であった一方、血清 CEA 値の陽性率は 20%であった。

肺腺癌組織と肺扁平上皮癌組織を用い、肺腺癌で蛋白質 A、B および C の発現が亢進していることを明らかにした。これまでに同定している新規尿中がん診断マーカー候補 7 種類について特異的に反応するポリクローナル抗体を作成し、実際の尿検体を用いてウエスタンブロッティング法にて検証を行った。肺腺癌細胞株で蛋白質断片 A の断片化率が正常肺細胞と比較して 2.35 倍上昇していることを見出した。

## 英文

Lung cancer is the first leading cause of cancer deaths in Japan and United States. Early detection of lung cancers is quite limited because of the lack of sensitive and specific biomarkers. Using our own technique of comprehensive high-throughput protein profiling excreted into the urine that can detect small amount of protein fragments with only 10 ml of sample, and MRM (multiple reaction monitoring), a cutting edge of highly sensitive and selective method for the targeted quantitation of protein fragments excreted into the urine, we recently discovered multiple early diagnostic markers of lung adenocarcinoma. The purpose of our projects are (1) to validate the diagnostic accuracy of these markers in early lung adenocarcinoma, and (2) to establish the diagnostic methods for the introduction of comprehensive medical examination.

We validated the accuracy of these markers in the diagnosis of stage I lung adenocarcinoma. We measured the protein fragments in the urine and serum levels of CEA, a conventional tumor marker of lung adenocarcinoma, in independent cohort constituting of five independent institutes. The cohorts comprised healthy control subjects (n = 83), patients with lung adenocarcinoma (n = 211, including stage I lung adenocarcinoma: n = 95), lung cancer other than lung adenocarcinoma (n = 110), benign

respiratory diseases (n = 173), idiopathic pulmonary fibrosis (n = 51), heavy smoker (n = 81), and patients with ground glass opacities in the lung HRCT (n = 51).

ROC-AUC of protein B fragment was 0.74. The ROC-AUC value of the urine protein fragments in the validation cohort was comparable with the counterparts of training cohort, and both were higher than those of CEA (ROC-AUC 0.58). The level of protein C fragment was decreased after resection of stage I lung adenocarcinoma (before resection:  $1.00 \pm 0.24$ , after resection:  $0.67 \pm 0.18$ ).

We observed the increased expressions of proteins A, B, and C in the lysates of lung adenocarcinoma tissues. We produced the polyclonal antibodies against seven types of early diagnostic marker protein fragments, and validated the accuracy of the antibodies in the detection of urinary protein fragments by western blotting. The ratio of fragment to protein A in the cell lines of lung adenocarcinoma was 2.35-fold higher than that of normal cell line.

We demonstrated that the urine protein fragments which can distinguish the stage I lung adenocarcinoma from healthy controls at high accuracy. We observed the decreased levels of urinary protein fragments after resection of stage I lung adenocarcinoma. We have applied a patent on the thirteen novel early diagnostic markers of stage I lung adenocarcinoma (Patent Application No. 2016-030267). We have conducted the licensing-out of our intellectual property right to the company of clinical laboratory products.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 4 件)

1. Okumura N, Tamura J, Takao T. Evidence for an essential role of intradimer interaction in catalytic function of carnosine dipeptidase II using electrospray-ionization mass spectrometry. *Protein Science*. 2016, 25, 2, 511-22.
2. Kaimori JY, Maehara K, Takao T, et al. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Scientific Reports*. 2016, 6, 24318.
3. Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein (BEGAIN) in Chronic Pain after Peripheral Nerve Injury. *eNeuro*. 2016, 3. Pii:ENEURO.0110-16.
4. Harada T, Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Awada C, Takao T, Kikuchi A. Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation. *Cancer Sci*. 2017, 108, 42-52.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当無し

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

特許出願 1

出願番号・公開番号	2016-030267
発明の名称	腺がんを体外にて評価する方法
出願日（優先日）	2016年2月19日
出願人（特許権者）	国立大学法人宮崎大学 国立大学法人大阪大学
出願国	日本
登録日	
登録番号	