

【要約】

Discovery of cancer biomarker candidates in the secreted peptides of  
cholangiocarcinoma cells

(胆管癌細胞株の分泌物解析による疾患バイオマーカー探索)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(指導教員：松下一之准教授)

陳 健嘉

胆管癌(Cholangiocarcinoma: CCA)は胆管上皮細胞から発生する悪性腫瘍であり、欧米に少なく、アジアに多い悪性腫瘍である。原発性肝癌の3%を占める肝内胆管癌は、早期発見が困難であり、外科的切除の適応にならないこともしばしばで、また化学療法にも反応性が乏しく、予後不良とされている。肝内胆管癌を含む胆管癌を検出するために臨床応用されている胆管癌血液マーカーとして、CA19-9やCEAが使用されているが、どちらも感度が低い。もしも胆管癌において感度がよく、また疾患特異性の高いバイオマーカーが確立されれば、正確かつ早期の診断に寄与するところは大きく、そのようなマーカーによる臨床検査が求められていると考えられる。侵襲性が低く汎用される検査のひとつに血液検査があり、したがってそのようなマーカーは血液マーカーであることが望ましい。本研究では、胆管癌細胞の分泌物を質量分析計ベースで網羅的プロテオミクスの対象とすることで、発現された mRNA (トランスクリプトーム解析) との組み合わせた結果から CCA 診断に有用なマーカータンパク質候補の探索を試みた。

## 材料及び方法

1. 細胞株：実験に用いた細胞株は、ヒト胆管由来細胞株 HuCCT-1 (human cholangiocarcinoma cell line)。
2. 臨床検体：(a) 悪性疾患 (CCA)、(b) 良性疾患 (結石症、胆管炎、狭窄症)、千葉大学附属病院に得られた。および (c) 健常群ボランティア。
3. LC-MS/MS 解析及びタンパク質の同定：2000 年 Minami らの研究  
方法より HuCCT-1 細胞株分泌物の抽出し、濃縮・脱塩後、一次

元電気泳動を用いて、タンパク質を分離した。ゲルを染色し、可視化されたタンパク質バンドを切り出し、インゲル消化を行い、LC-MS/MS 測定を行った。

4. トランスクリプトーム解析 (Meta-Analysis) : データは GEO(GSE26566) からダウンロードし、統計分析ソフト「R」より解析を行った。
5. 候補バイオマーカーの測定 : プロテオーム解析とトランスクリプトームデータと合わせた結果から、市販酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を用いて、CCA 患者血清中の濃度を検証した。
6. 統計解析 : Mann-Whitney U-test 法で CCA 患者群、良性疾患群、と CCA のない健常群の有意差を求めた。7 つの候補バイオマーカーは ROC curve 解析を用いて、CA19-9 と比較した。解析ソフト XLSTAT を用い、AUC を計算した。

## 結果

1. プロテオーム解析における CCA 細胞株から分泌物タンパク質の同定 : CCA 細胞株 HuCCT-1 から、303 個分泌タンパク質が同定された。
2. トランスクリプトーム解析における CCA 組織から遺伝子の同定 : NCBI GEO から GEO (GSE26566) Raw データを使用した。CCA 組織に由来するサンプルとを比較して発現量に差がある遺伝子は 4623 個、発現量が 2 倍以上に増加されたのは 405 個遺伝子。プロテオームとトランスクリプトームデータから、26 個バイオマーカー候補を絞り込んだ。そのうち、7 個 (mesothelin:MSLN、annexin A2:ANXA2、desmoplakin:

DSP、 laminin gamma 2:LAMC2、 galectin-3 Binding Protein:LGALS3BP、 macrophage migration inhibitory factor:MIF、 cystatin B : CSTB)は、ELISA を用いて、CCA 患者血清中の濃度を検証した。

3. CCA 患者群血清中バイオマーカー候補の発現レベル：健常者群に対し、CCA 群の MSLN、MAC-2BP、ANXA2 発現レベルが著しく増加した(MSLN:P<0.0001、MAC-2BP:P=0.007、ANXA2:P=0.002)。
4. CCA 診断効果におけるバイオマーカー候補と CA19-9 の評価：ROC 曲線を用いて、CCA の診断効果におけるバイオマーカー候補と CA19-9 の評価した結果、AUC が 1 番高いのは CA19-9(AUC=0.893)ということが分かった。その次は elisa 結果で、有意差は認められた MSLN(AUC=0.808)、MAC-2BP(AUC=0.773)、ANXA2(AUC=0.761)。MSLN と MAC-2BP は、CA19-9 と組み合わせることによって、CA19-9 単独での測定と比較し、偽陰性率と偽陽性率が改善された。

## 結論

プロテオミクス解析技術を利用した細胞の secretome 研究は、近年になり発展してきた分野で、疾患マーカー探索を目的に研究が進められるようになった。また、胆管癌 secretome の研究では、2010 年 Srisomsap らの研究が始めての報告である。彼らは CCA(HuCCA-1)と四つの肝癌(Hepatocellular carcinoma: HCC)細胞株(HCC-S102, HepG2, SK-Hep-1, and Alexander)の secretome 解析を行った。本研究では、プロテオミクス解析技術とトランスクリプトー

ム解析と組み合わせ、CCA 細胞株の secretome を同定した結果、26 個バイオマーカー候補を絞り込んだ。26 個血中バイオマーカー候補のうち、海外の先行研究より、LAMA3、LAMB3、LAMC2 は癌の転移に関係している。DSP タンパク質と LAMB3 タンパク質では、肝細胞癌細胞株中発現しない、CCA 細胞株のみ発現された。また、ANXA8 は CCA の転移、MIF は炎症に関連する報告がある。MAC-2BP は胆道癌の診断マーカー、LAMC2 は CCA 予後バイオマーカーになる可能性があると報告されておる。ROC の結果では、曲線下面積が 1 番高いのは CA19-9 ということがわかりました。しかし、CA19-9 と組み合わせることによって、MSLN、MAC-2BP、は、CA19-9 単独での測定と比較し、偽陰性率と偽陽性率が改善されることがわかった。CA19-9 との組み合わせることが、そのより正確な診断に寄与する可能性が示唆された。結論として、これらの血液マーカー候補は、CA19-9 と組み合わせることによって、CA19-9 単独より改善が見られ、このような組み合わせ検査が、CCA 診断に有用である可能性が示された。以上が示唆される事により、CCA 細胞分泌物研究の有用性が示されたと考える。