

## —特集 [日本医科大学先端医学研究所 Cutting Edge Research (5)]—

がん早期診断・リスク層別化, 精密医療に資する  
バイオマーカー探索と社会実装を目指して

本田 一文

日本医科大学先端医学研究所生体機能制御学部門

## はじめに

癌は多彩な疾患で, 同一臓器・同一病期であってもその病態は様々である。各個人に発生するがんの個性を適切に捉えることができれば, 最適な治療法や効果的な予防法を各患者個別に提供できる可能性がある。われわれの研究室では, 臨床検体に真摯に向き合い, タンパク質網羅的解析 (プロテオミクス解析) や代謝物網羅的解析 (メタボロミクス解析) を基盤として, 創薬標的やがん 2 次予防・早期診断, 精密医療に資するバイオマーカー探索を進めている。特に, 「ベンチからベットへ」を目指す translational research だけでなく臨床サイドのアンメッドメディカルニーズにこたえるべく「ベッドからベンチへ」を目指す reverse translational research にも積極的に参画し, 「双方向性橋渡し医学研究を通じてオリジナル医療の実現」を目標に研究を行っている。

「①がん 2 次予防 (がん検診) に有用なバイオマーカー開発」, 「②がん転移活性を予測し再発を予防するバイオマーカーの開発」, 「③プロテオミクス解析とメタボロミクス解析による創薬標的の探索と抗悪性腫瘍剤の耐性機構の解明」, 「④液性バイオプシー (liquid biopsy) 検体を用いたがん病態診断マーカーの探索」, 「⑤早期診断バイオマーカー検証プラットフォームによる迅速検証と実用化支援」をメインプロジェクトに据え, 5 つの研究テーマを有機的に連携させながら研究の最大化を図っている。本総説では, 上記について解説する。

## 1-A. がん 2 次予防 (がん検診) に有用なバイオマーカー開発

がんに対するもっとも有効な治療戦略として, できるだけ早期からの治療介入があげられる。そのためには早期診断に貢献する技術革新が欠かせない。一部のがんでは過剰診断による早期治療の弊害が指摘され始めてきているが, 難治がんに対する早期診断法の確立は急務と言える。膵がんは, 死亡数はこの 30 年で約 3

倍に増加しており (出典: 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」(人口動態統計)), 5 年生存率が 9.2% と主要がんの中で最も生存率が低い難治がんの代表といえる。しかしながら, 米国予防医学専門委員会 (United States Preventive Services Taskforce, USPSTF) は無症状の集団に対して, 画像検査を利用した膵がん検診を推奨していない。その理由としては, 膵がんの, 年齢調整罹患率が 12.9 人/10 万人と低頻度であり, 無症状の一般集団への造影 CT, MRCP (magnetic resonance cholangiopancreatography), EUS (endoscopic ultrasound) によるスクリーニングによる潜在的な有益性は, 潜在的な有害性を上回るものではないと結論付けたからである<sup>1</sup>。一方で, 一般集団に比較して 5 倍以上の膵がんリスクを持つ集団や, 生涯膵がん発生リスクが 5% を超える集団には膵がんスクリーニングが有用である可能性が取りざたされている<sup>2</sup>。事実, 家族性膵がん家系 (第一度近親者に 2 名の膵がんが発症) の膵がんリスクは 6.3 倍と有意に高く, 膵がんスクリーニングの実施が検討されている<sup>3</sup>。膵がんの高リスク集団には, 先述した家族歴等があげられるが, 家族性膵がん集団は全体の 7% 程度であり<sup>4</sup>, 9 割以上が散発性膵がんであることを考え合わせると, 家族歴によるリスク層別化だけでは十分とは言いきれない。すなわち画像検査前に「膵がん発症に対して 5 倍以上の相対リスクを持つ高リスク群」を, 無症候性集団から濃縮できれば, 効率的な膵がんスクリーニング法を開発できる可能性がある。特に慢性膵炎や膵嚢胞, 膵がんの発生母地となる IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasm) は, 膵がん発症リスク疾患であるため, 高リスク群やリスク疾患を画像検査前に非侵襲的な方法で濃縮できれば, 効率的な医療資源の投入と緊密なフォローアップによる早期膵がんの検出が可能になると考えられる。

また昨今の新型コロナウイルス感染症の拡大により, がん検診の機会が減少していることが報告されている。がんの発見が遅れ, 将来がんによる死亡者数が

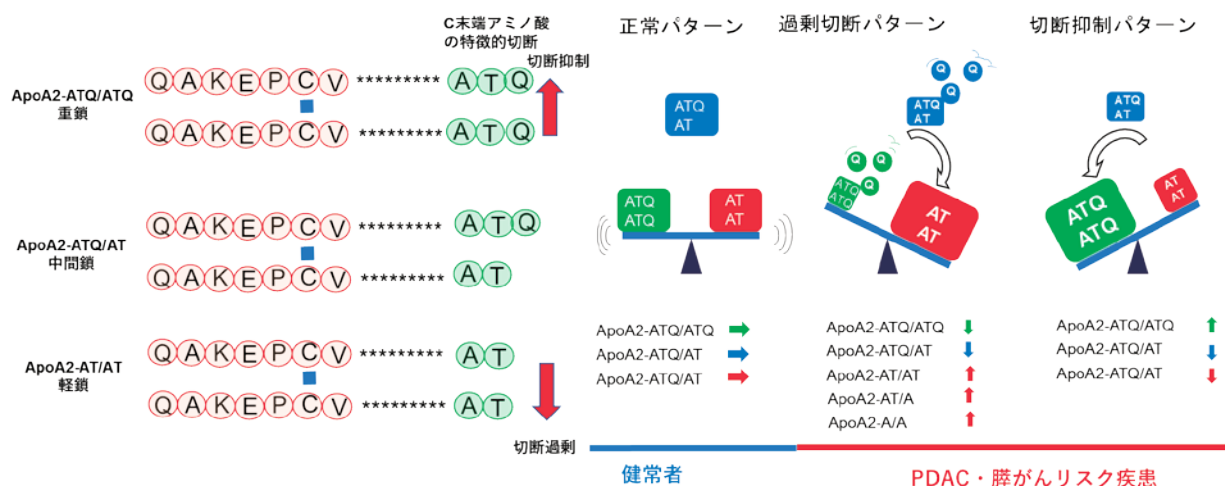


図1 膵がんリスク疾患における血液循環中の apoA2-isoforms の特徴的 C 末端アミノ酸の切断. (PLoS One. (文献6)より転載 ©2012 Public Library of Science) 浸潤性膵管がん (PDAC) またはリスク疾患では、切断過剰パターンもしくは切断抑制パターンに傾く。よって中間鎖の apoA2-ATQ/AT が減少する。

増加する事態を懸念され始めた。血液検査のような非接触型のがん検診の実現により、発症リスクの高い集団へのがん検診法の開発も今後は視野に入れて検討すべきであろう。

### 1-B. 膵がんやリスク疾患により異常切断を受ける apolipoprotein A2-2量体 (apoA2-isoforms) の発見

われわれはトップダウンプロテオミクスの手法を用いて、膵がんと健常者間の血液中の apolipoprotein A2 (apoA2)-2量体の C 末端アミノ酸に特徴的な切断がなされることを発見した<sup>5</sup>。ApoA2 は肝臓で生成されたのち、血液中を 2量体で循環する。その C 末端アミノ酸配列は最も重い重鎖 (apoA2-ATQ/ATQ)、中間鎖 (apoA2-ATQ/AT)、さらに軽い軽鎖 (apoA2-AT/AT) が健常者血液中を循環する (apoA2-isoforms)<sup>6</sup> (図 1)。

膵がんやリスク疾患になると同 C 末端アミノ酸の切断様式が変化し、切断がされづらくなり apoA2-ATQ/ATQ が有意になる切断抑制タイプと、切断が亢進し apoA2-AT/AT が有意となる切断過剰タイプとなる集団が増えてくる。切断過剰タイプと切断抑制タイプのいずれの様式にしても、結果的にその中間鎖である apoA2-ATQ/AT は減少する (6) (8) (図 2A)。

この現象は膵がん患者にのみ観察される現象ではなく、膵がんリスク疾患である膵嚢胞や慢性膵炎、IPMN にも一定頻度で確認できる。一方で膵がん以外では、異常切断様式は観察できなかった<sup>6</sup>。そもそも膵実質にはタンパク質の C 末端を切断するカルボキシペプチダーゼが豊富に存在する。術前放射線療法を実施する

と apoA2-AT/AT が有意な過剰切断状態から apoA2-ATQ/ATQ が有意な切断抑制状態に顕著にシフトすることが確認されている。これは、放射線照射後により惹起される膵外分泌機能の低下により、apoA2-isoforms の切断が低下したものと考えられている。手術中に採取された膵液を in vitro で apoA2-ATQ 標準ペプチドに添加するとその消化が確認された<sup>10</sup>。本現象は apoA2-isoforms の切断様式が膵外分泌機能を鋭敏に反映している可能性が高いことを示している。同様に、自己免疫性膵炎でも重鎖タイプの apoA2-ATQ/ATQ が有意に確認され、自己免疫性膵炎が膵外分泌機能低下によるものとしても矛盾はない<sup>11</sup>。

### 1-C. apoA2-isoforms を計測するための ELISA 検査系の開発と国際共同研究によるブラインド試験

質量分析による切断様式の測定は探索系には威力を発揮したが、実臨床に応用するためにはスループットが悪く標準化が難しい。そこでわれわれは特異抗体を用いて apoA2-isoforms の血液濃度を測定する apoA2-isoforms ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を東レ (株) とともに開発した。全国 7 施設から収集した膵がんや類縁疾患の血液検体を用いて ELISA の診断精度を検証したところ、健常者から膵がん患者を判別する ROC 解析 (receiver operating characteristics) の AUC (area under the curve) は既存バイオマーカーである CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9) と比較してもいずれの臨床病期でも高かった (図 2B, C)。また、apoA2-isoforms と CA19-9 を組み合わせることで、特異度を下げることなく感度を

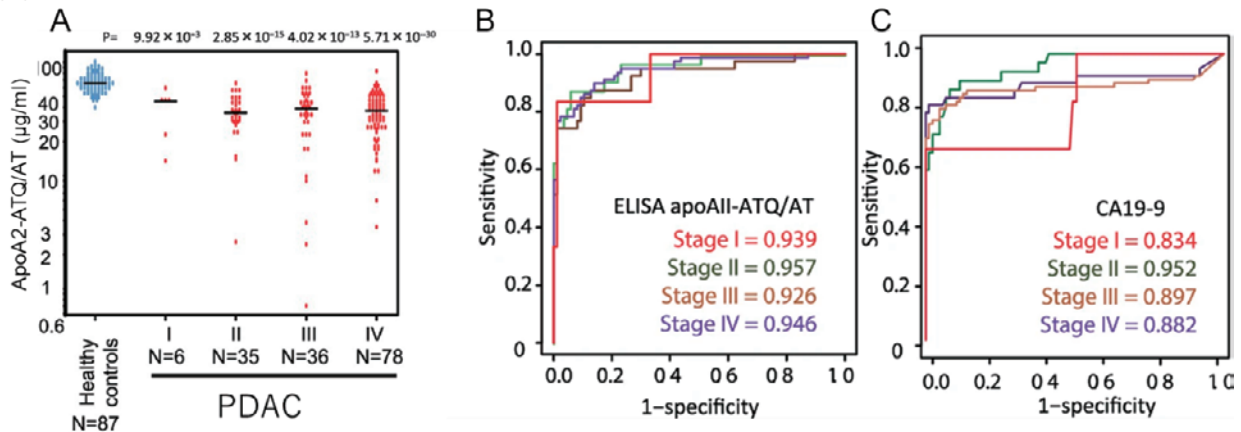


図2 膵がん患者ステージ毎における apoA2-ATQ/AT の血漿中の濃度 (A) と apoA2-ATQ/AT (B) と CA19-9 (C) 判別性能。(Sci Rep. (文献9)より転載 ©2015 Nature Publishing Group)

A. ELISA apoA2-isoforms キットで血漿中の濃度を計測。(青点: 健常者, 赤点: 浸潤性膵管がん (PDAC) 赤丸 (Student's t-test)).

B. C. 浸潤性膵管がんを健常者から判別する ROC 分析とその AUC (B: apoA2-ATQ/AT, C: CA19-9) (赤線: stage I, 緑線: stage II, 茶色線: stage III, 紫線: stage IV)

上昇させることができた<sup>9</sup>.

米国国立がん研究所 (National Cancer Institute, NCI) には, 早期診断バイオマーカーの探索から臨床開発, バイオマーカー診断精度のブラインド検証を公的研究費で実施する研究コンソーシアムとして早期診断研究ネットワーク (Early Detection Research Network, EDRN) が組織されている. NCI EDRN がバイアスなく検体集積するためのガイドラインとデータの取り扱い基準を設定し, 血液, 尿などの各種のがんや類縁疾患, 健常者で構成されるリファレンスサンプルを収集し管理している<sup>8</sup>. 有望なバイオマーカーが発見された場合には, それらバイオマーカーの臨床性能を迅速に検証するために, リファレンスセットの供出とデータ解析を公的研究費でブラインド検証してくれる. われわれは, NCI EDRN が収集したリファレンスサンプルセットを用いて apoA2-isoforms の盲検を行ったところ, CA19-9 より膵がんを健常者から判別する AUC は高く, CA19-9 と apoA2-isoforms を組み合わせることで, CA19-9 単独で検査するのに比較して有意に AUC を上昇させることを確認した (0.0978, 95% 信頼区間 0.04~0.169)<sup>9</sup>.

また WHO (World Health Organization) の機関である IARC (International Agency for Research on Cancer) が進めている欧州最大のコホート研究である EPIC study (The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. <https://epic.iarc.fr/>) が収集した血液検体から, 膵がん診断 5 年前までの検体と膵がん発症のない血液を用いてネステッ

ド・ケース・コントロール研究を行ったところ, 最大 3 年以上前でも apoA2-isoforms が反応する症例が存在することを明らかにした<sup>12</sup>.

#### 1-D. apoA2-isoforms を用いた実験的膵がん検診

ApoA2-isoforms の臨床性能が国内および国外の検体を用いて検証されてきたが, 実際の検診現場で使用した際の性能についてはわからないことが多い. そこで, 神戸大学を中心とした検診施設で, apoA2-isoforms ELISA を利用した実験的膵がん検診研究を 20 歳以上の男女に前向きに実施した. ApoA2-ATQ/AT のカットオフ値は 35 µg/mL 以下とし, カットオフ値未満の被験者には, 造影 CT, MRCP または EUS のいずれかの 2 次精密検査を勧めた. 本研究には 5,120 名の成人男女が登録され, 35 µg/mL 以下で陽性と判定された被験者は 84 名 (陽性率 1.5%) であった. そのうち 54 名が 2 次精密検査を受けたが, この中から膵がんおよび膵がんリスク疾患として 1 例の浸潤性膵管がん, 14 例の膵嚢胞性病変 (9 名の IPMN を含む), 3 例の慢性膵炎が発見された. また膵がんリスク疾患とは診断できなかったが, その他に膵臓の異常画像所見が 8 例指摘され, その内訳は 2 例の早期慢性膵炎疑診とそれぞれ 1 例毎の膵神経内分泌腫瘍, 膵体尾部形成不全, 膵腫瘍, 膵脂肪浸潤であった (図 3). 膵がんおよび膵がんリスクを判定する陽性反応の中率 (PPV, positive predictive value) は 33.3% で, 画像検査前に膵臓異常所見を指摘する PPV は, 48.1% であった<sup>13</sup> (図 3).

IPMN の 3.7 年間の経過観察中における膵がん発生



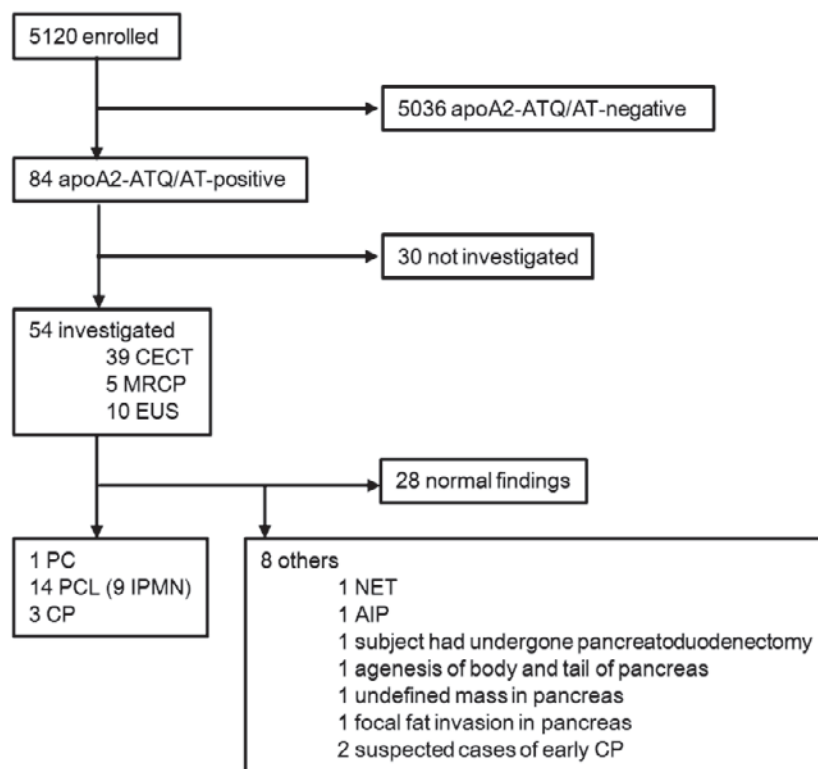


図3 神戸コンソーシアムにおける実験的膵がん検診結果. (Cancer (Basel). (文献 13) より転載 ©2020 MDPI)  
 CECT: 造影 CT, MRCP: 胆管膵管画像, EUS: 超音波内視鏡, PC: 膵がん, PCL: 膵嚢胞性病変, CP: 慢性膵炎

頻度は、IPMN 由来膵がん 2.2%、IPMN 併存膵がん 2.0%としてそれぞれ報告されている<sup>14</sup>。これら事実を鑑みると IPMN や慢性膵炎などのリスク疾患を画像検査前に濃縮し、フォローアップをすることで膵がんの早期診断の第 1 歩につながると考えられる。

今回の神戸大学を中心としたコンソーシアムで実施された実験的膵がん検診には、3つの大きなリミテーションがある。「膵がんの好発年齢は 50 歳以上であるが、今回の実験検診では対象集団を成人男女とし年齢制限をつけなかったこと」、「バイオマーカー陽性者 84 例に対して、2 次精密検査受診者が 54 名で、精密検査受診率が 64.2%と低率であったこと」、「バイオマーカー陰性者に対して追跡調査がデザインされていないこと」である。同リミテーションの解消のために、日本対がん協会と協力し、鹿児島県、北海道、兵庫県で「apoA2-isoforms を用いた実験的膵がん検診」の拡大を試みている。日本対がん協会が実施している検診では、対象者を 50 歳以上とし、バイオマーカー陽性者の 2 次精密検診を造影 CT 法に固定するだけでなくその検査費用も公的研究費でまかなうことで 2 次生検受診率を確保し、さらに地域がん登録と連動させることで

バイオマーカー陰性者から発症する膵がん患者の追跡も設計して実施している<sup>15</sup> (図 4)。本検診研究では現在までに 13,800 名が登録されている。今後の結果に期待がかかる。

## 2-A. がん転移活性を予測し再発を予防するバイオマーカーの開発

外科的に原発巣が完全に切除されているにも関わらず、原発以外の場所から再発により予後が不良となることがある。原発の制御だけでなく転移巣をいかに制御するかが治療戦略決定に大きくかわる。たとえマクロレベルでは原発巣を完全切除できる早期がんであったとしても、がん細胞自身が持つ生物学的な個性として転移活性が高い場合には、画像検査では検出できないミクロな転移巣の存在を否定できない。そもそも術後補助療法の有効な患者群とは、「切除範囲外に転移巣が存在し、補助療法が転移巣に対して奏効する患者群」と定義するとすれば、「補助療法実施を必要とする患者群」とは「転移活性の再発高リスク群」と言い換えることもでき、転移活性を評価するバイオマーカーに対するニーズは高い。

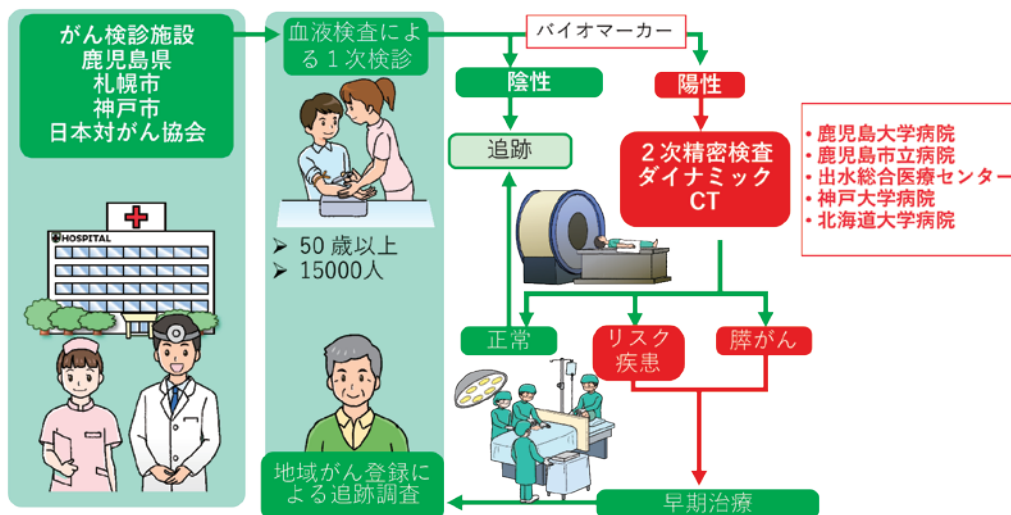


図4 apoA2-isoformを使った実験的膵がん検診（日本対がん協会協力により拡大）

日本対がん協会のもと、鹿児島県、札幌市、神戸市で apoA2-isoform を利用した実験的膵がん検診を実施。50歳以上男女を対象とし、地域健診、人間ドック等で実施された健診で希望者に apoA2-isoforms による膵がん検診を実施し、陽性者には介入研究で、指定医療機関でダイナミック CT を基本とした 2 次精密検査を実施している。膵がんリスク疾患や膵がんを発見することで早期より治療介入し、切除可能な膵がんの発見を目指す。バイオマーカー陰性者は、地域がん登録で追跡することで陽性者と陰性者間での膵がん発症に関するリスク比を求める。

## 2-B. 細胞運動とがんの転移に関する ACTN4 遺伝子の同定とがん細胞における遺伝子増幅

われわれは、1998年にアクチン細胞運動とがん浸潤転移に関する ACTN4 遺伝子クローニングに成功した<sup>16</sup>。ACTN4 (タンパク質名 actinin-4) は、アクチンを束状化する actinin ファミリーの 4 番目の分子で、actinin-1 とともに細胞内に存在する非筋肉型の actinin である (図 4)<sup>17</sup>。Actinin-4 は免疫染色で確認すると、大腸がんの浸潤先進部に発現が強く、大腸がん細胞株に遺伝子導入すると細胞運動に必須な細胞突起形成を促進し、動物移植モデルではリンパ節転移を促した<sup>18</sup>。ホルマリン固定パラフィン包埋病理切片を用いて actinin-4 の局在と発現を確認すると、乳がん<sup>16</sup>、卵巣がん<sup>19</sup>、膵がん<sup>20</sup>、唾液腺がん<sup>21</sup>、舌がん<sup>22</sup>、肺がん<sup>23,24</sup> などで非発現症例に比して強発現症例では明らかに予後が不良であった<sup>17</sup>。ACTN4 は 19q13 に位置する。FISH (fluorescence in situ hybridization) 法を用いて、ACTN4 遺伝子増幅を確認したところ、膵がん<sup>25</sup>、卵巣がん<sup>26</sup>、唾液腺がん<sup>21</sup>、舌がん<sup>22</sup>、肺腺がん<sup>23</sup>、乳がん<sup>27</sup> で ACTN4 遺伝子増幅症例では正常コピー数症例に比較して全生存期間が短く、免疫染色によるタンパク質発現の確認より FISH による遺伝子コピー数解析のほうが厳密に予後を予測することが次々と発見されていった。特に肺腺がんと ACTN4 遺伝子増幅に関しては 2-C で詳述する。

## 2-C. I 期肺腺がん予後予測、補助化学療法効果予測バイオマーカーの可能性

術後補助化学療法が奏功する群を層別化できれば効果的な術後補助化学療法を実施できる可能性が高い。そのためには腫瘍が持つ転移活性を評価することで、切除部位以外の微小転移巣を予測することが重要な指標となる。肺がん診療ガイドラインによると、「病変全体径で 2 cm を超える術後病理病期 IA/IB/II 期 (第 8 版) 完全切除、肺腺がん症例に対して、テガフル・ウラシル配合剤 (UFT) による補助化学療法の実施」を強く推奨している (エビデンス A)。一方で、同ガイドラインには「なお、術後病期 I 期 (肺腺がん) の完全切除例では手術単独でも 74% が無再発であり、化学療法の安全性を十分考慮すべきである」との記載もある。肺腺がん術後の微小残存病変を有する可能性の高い患者群を層別化できれば、補助化学療法を必要とする患者群を層別化できる可能性が高い。

そこでわれわれは、国立がん研究センター中央病院および国立がん研究センター東病院で切除されかつ術後補助化学療法未実施の I 期肺腺がんの切除標本を免疫染色と FISH 法を用いて遺伝子増幅を確認した。独立した 2 つのコホートで、ACTN4 遺伝子増幅した I 期肺腺がん群 (23 例) は非増幅群 (267 例) に比較して全生存期間が有意に短縮し、5 年生存割合はそれぞれ増幅群が 95%、増幅陰性群が 57% であった (図 5)。

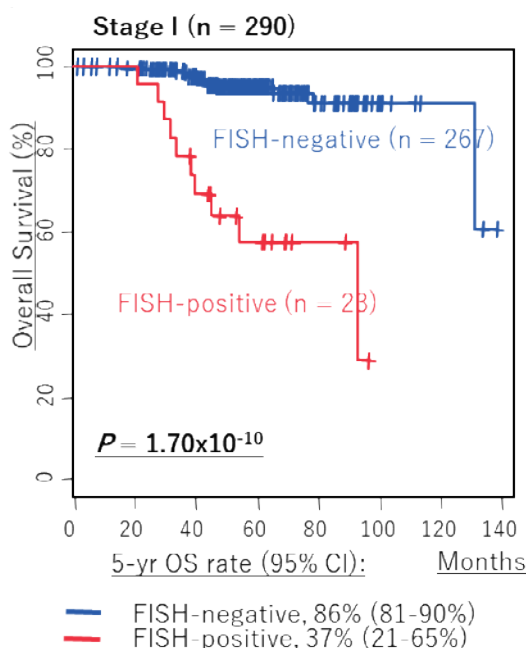


図5 ACTN4 遺伝子増幅を指標とした補助化学療法非実施 I 期肺腺がんの全生存期間解析。(Ann Oncol. (文献 23) より転載 ©2013 Kluwer Academic Publishers)  
赤線: ACTN4 遺伝子増幅症例, 青線: ACTN4 遺伝子非増幅例

Cox 比例ハザード法単変量解析によると, 「ACTN4 遺伝子増幅陰性群」に対する「増幅症例」の死亡に関する HR は 10.5 (hazard ratio; HR 95% CI 4.15~26.7) と有意に高く, 多変量解析を実施しても HR 6.78 (95% CI 2.59~17.7) と独立した有意に一番強い予後因子として抽出された. 本所見は, ACTN4 の遺伝子増幅は術後化学療法を実施しない I 期肺腺がんの強力な予後予測バイオマーカーであり, 完全切除手術がなされているにもかかわらず死亡の高リスク因子であることは, 画像でとらえきれない微小残存転移巣を予測するバイオマーカーであることを強力に示唆している<sup>23</sup>.

実際, 肺がん細胞株で ACTN4 の遺伝子増幅を認める A549 細胞に shRNA を用いて actinin-4 タンパク質発現をノックダウンしてみると細胞の浸潤能や糸状突起の形成は著しく減少した. ルシフェラーゼで発光する A549 細胞株を免疫不全マウスの尾静脈に注入し 40 日間観察すると肺転移が顕著に観察される. 一方で actinin-4 ノックダウン A549 細胞株を尾静脈に注入しても肺への転移は確認できなかった<sup>28</sup>. すなわち, ACTN4 はがん浸潤転移活性に深く関与する分子だと考えると, ACTN4 遺伝子増幅は転移活性亢進による切除範囲以外の微小転移巣の存在を予測する代理バイオマーカーの可能性が高い. 今後は肺腺がん周術期の治

療戦略決定のためのバイオマーカーとして臨床開発が望まれる.

### 3. プロテオミクス解析とメタボロミクス解析による創薬標的の探索と抗悪性腫瘍剤の耐性機構の解明

臨床検体を用いたタンパク質網羅的解析 (プロテオミクス解析) や代謝物網羅的解析 (メタボロミクス解析) が創薬や治療薬の薬理作用点の決定に多くの成果を上げてきている. われわれの研究室では組織マイクロアレイ (tissue microarray, TMA) と抗体ライブラリーを用いた創薬標的の探索研究を行っている. 患者臨床情報が付帯した TMA を多種類の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い, 腫瘍内で発現するタンパク質を定量しながら全生存期間や化学療法奏効性との相関を自動判定するバイオインフォマティクス手法を新規で考案した (automated quantitative virtual immunofluorescence pathology, AQVIP)<sup>29</sup> (図 6).

AQVIP を用いて減量手術後に白金抗悪性腫瘍剤で化学療法が実施された卵巣がん構成された TMA を, 1,000 種類を超える抗体ライブラリーでスクリーニングしたところ, cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) が高発現している症例では, 発現していない症例に比較して化学療法の奏効性が悪く, 全生存期間が有意に短いことを発見した. CSE (図 7) はシステイン, グルタチオン, ポリスルフィド, 硫化水素などの生成酵素の一つである. 慶應大学医化学教室と共同研究で, 表面増強ラマンイメージング技術 [gold-nanoparticle (AuN)-based surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)] を利用して, 卵巣がんの凍結組織検体に対してイメージングメタボロミクス解析を実施したところ, ポリスルフィドが高い症例で白金製剤に対する効果の減弱が確認された.

特に卵巣明細胞性腺がんではポリスルフィドの発現値を中央値で 2 群に分けて全生存割合を計算すると高発現症例が低発現症例に比較して有意に予後が不良であった.

白金製剤であるシスプラチン (CDDP) は DNA に対して架橋することで, 細胞分裂を抑制する. ポリスルフィドの存在下では CDDP の DNA 架橋能力を有意に減弱させることを in vitro で見出した. さらに去痰剤として現在臨床で汎用されている ambroxol には, ポリスルフィドを分解する効果がある. そこで, CSE が高発現し CDDP 抵抗性の卵巣がん細胞株を免疫不全マウスに移植した動物モデルを作成し, CDDP 単剤と CDDP と ambroxol の併用投与を行ったところ, CDDP 単剤に比較して CDDP と ambroxol 併用投与群



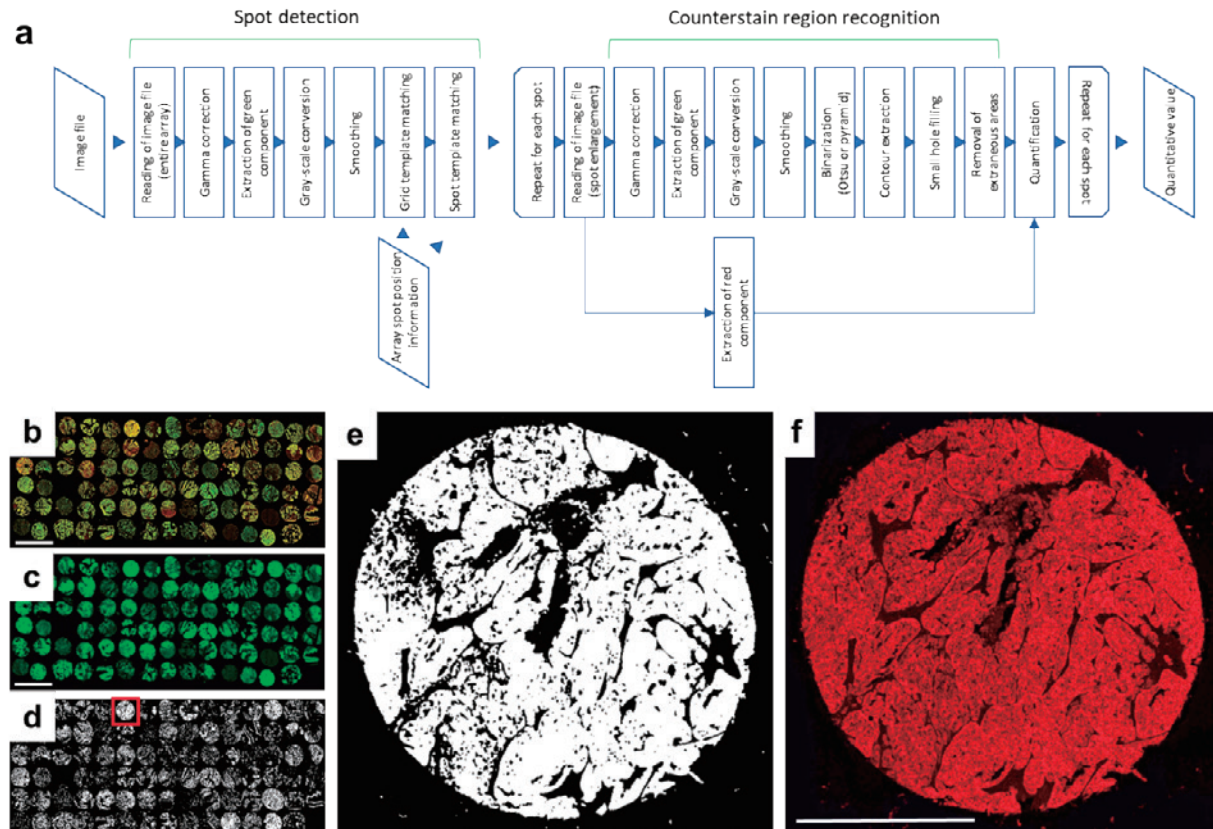


図6 AQVIPの原理と自動定量アルゴリズム。(Redox Biol. (文献29)より転載 ©2021 Elsevier)

a: 組織マイクロアレイのバーチャル蛍光免疫染色画像からコンピュータで腫瘍病巣を自動判別し、蛍光抗体法の染色強度から自動的に各症例で腫瘍内に発現するタンパク質発現量を定量化するアルゴリズム。b~d: 組織マイクロアレイをサイトケラチン19 (c; 緑色) と標的抗体 (赤色) で2重免疫染色し、サイトケラチン染色部を2値化することで腫瘍病巣部を描出 (d, e), 症例毎でコンピュータが2値化により描出した腫瘍病巣 (e; 白色部) 内部に存在する標的抗体 (CSE, 赤色蛍光) の染色強度をタンパク質の発現量としてとらえ、各症例の臨床情報から自動的に生存期間をすべてのカットオフで計算していく。

が有意に腫瘍を小さくさせた。CDDPの抵抗性にポリスルフィドが関与するだけでなく、ポリスルフィドを消去することによりCDDP抵抗性を解除できる可能性を示した最初の研究である<sup>29</sup>。

また舌がんでは、チロシンキナーゼであるinterleukin2-inducible T-cell kinase (ITK) が高発現している症例では、発現していない症例より全生存期間が有意に短いことを見出した。ITK遺伝子を導入した舌がん細胞株を樹立し、免疫不全動物に移植したところ遺伝子導入細胞で腫瘍体積が増加した。ITKがリン酸化する基質を明らかにする目的で、遺伝子導入細胞株に対してリン酸化プロテオミクス解析を実施したところ、導入細胞ではその対象細胞株に比較してtrifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 (GART) のチロシン残基が30倍を超えてリン酸化することを確認した。GARTはプリン合成に関与する酵素である。ITK導入細胞のメタボロミクス解析を実施

ところ、ITK導入細胞では乳酸やクエン酸代謝には変化が見られなかったが、ホスホリボシル二リン酸 (PRPP) やイノシン酸 (IMP) の単位時間当たりの合成が高いことを見出した。ITKキナーゼ活性を抑制する小分子化合物を導入細胞株に添加すると、ITK導入により増加した細胞増殖を抑制し、プリン合成も減少した。がんでは活発な細胞増殖のため、プリン代謝が亢進していることが知られており、抗がん剤の中にはプリン代謝拮抗を薬理作用点とするものも存在する。本研究では、ITKが舌扁平上皮がんの治療標的の可能性について示すことができた<sup>30</sup>。

#### 4. 液性バイオプシー (liquid biopsy) 検体を用いたがん病態診断マーカーの探索

昨今、腫瘍細胞から逸脱し、血液中を循環する末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTCs) や末梢循環腫瘍DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)

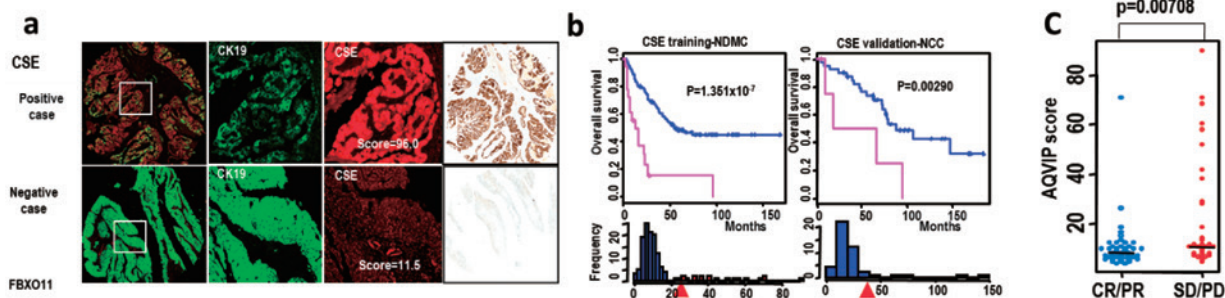


図7 AQVIPによって同定されたCSEの発現と全生存期間の関係、高発現症例でのシスプラチンへの抵抗性。(Redox Biol. (文献29)より転載 ©2021 Elsevier)

a: AQVIPでの蛍光免疫染色画像のバーチャル病理スライド化(上段:CSE陽性症例, 下段:CSE陰性症例, 緑色: サイトケラチン19による染色, 赤色:CSEによる染色, 茶色:DABによる染色). b: CSE陽性症例と陰性症例に対する全生存解析と発現頻度. 全症例は減量手術後, 白金抗悪性腫瘍剤を中心に化学療法を実施. 左: 国立がん研究センター中央病院での症例, 右: 防衛医科大学校での症例, 赤線:CSE陽性判定症例, 青線:CSE陰性判定症例. c: AQVIP scoreと化学療法奏功性の関係. 青点(奏効群, CR:完全奏効, PR:部分奏効), 赤点(非奏効群, SD:安定, PD:進行), 赤矢頭(CSE発現判定のカットオフポイント).

が注目を集めている<sup>31</sup>. 腫瘍病巣から逸脱するものは ctDNA や miRNA などの核酸断片だけでなく, 腫瘍によって特異的に産生されるタンパク質や糖鎖修飾なども存在する. これらの腫瘍由来物質を体液(血液, 尿など)から採取することを総じて liquid biopsy と呼び, 多くの研究がなされてきている. われわれの研究グループも国立シンガポール大学が開発した「微小流路による遠心力と揚力を利用してラベルフリーで CTCs を回収する技術 (label-free inertial microfluidics approach, LFIMA)」を用いて<sup>32</sup>, 口腔がんや消化器がんの CTCs を回収するプロジェクトを行っている. 次世代シーケンサーを用いて大腸がん患者から回収した CTCs の遺伝子変異プロファイル解析を行ったところ, 抗 EGFR 抗体療法実施後の PD 患者から, 実施前には確認できなかった EGFR 変異を確認している<sup>33</sup>. 実臨床では, 2021 年から「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル」が日本初の血液検体を用いた固形がんに対する包括的ゲノムプロファイリングとして, liquid biopsy 検査の承認を厚生労働省から取得した. 今後は ctDNA を用いたがん精密医療はより発展を遂げていくことになる.

一方で, CTCs の解析は ctDNA に比べて臨床応用が遅れている. しかしながら CTCs は原発巣や転移巣から逸脱した腫瘍細胞そのものと考えれば腫瘍の個性や生物学的悪性度を見極めるうえで極めて情報を持った材料である. われわれは理化学研究所と共同研究で LFIMA を用いて分離した CTC1 細胞から回収した細胞内液を質量分析することで, 世界で初めて CTC1 細胞からのメタボローム解析に成功している (図8)<sup>34</sup>. 本

解析から, 胃がんの CTC と大腸がんの CTC では代謝物プロファイルが異なることを見出した. 本所見は, 各臓器に発生するがん種の CTC 毎に特殊な代謝系が存在することを示唆している. CTC の生物学はほとんどわかっていない. 代謝物プロファイルが取得できれば, CTC 特有な酵素活性や生化学を外挿できる可能性もある.

### 5. 早期診断バイオマーカー検証プラットフォームによる迅速検証と実用化支援

バイオマーカー候補が実際の臨床現場で体外診断医薬品 (in vitro diagnostics, IVD) として利用されるためには, 様々なハードルが存在する. バイオマーカー候補の感度・特異度等を薬機法に従い客観的に検証し, PMDA から IVD 認証を受けるための臨床性能試験が必須になる. 米国では, バイオマーカーの有効性を評価し, IVD の米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) 承認を支援する組織として先述した NCI EDNRN が存在するが, 日本では性能評価を実施する過程がボトルネックになっている. 腫瘍早期診断バイオマーカーの IVD 承認を目指し, 現在臨床開発を進めているが, 検体収集, PMDA 相談, 臨床統計, レギュラトリーサイエンスなど乗り越えるべき点は数多い. そこでわれわれは, 臨床医, オミクス研究者, レギュラトリーサイエンスの専門家, 臨床統計家がタッグを組み, 探索されたバイオマーカーシーズを迅速に検証し社会実装を支援するプラットフォームを日本医療研究開発機構 (AMED) の支援を受け立ち上げた (Platform of Evaluation for Biomarker of Cancer



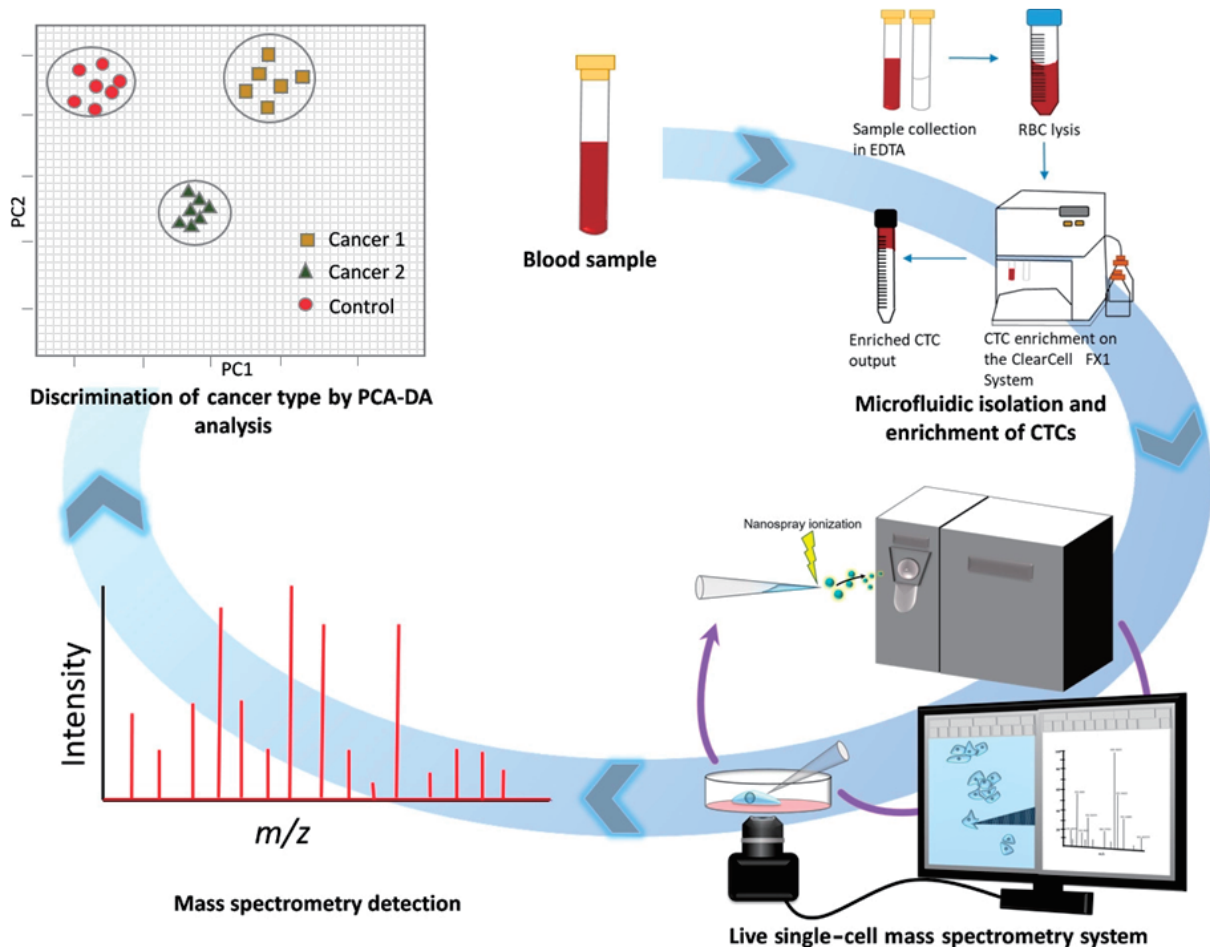


図8 末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC) 1細胞から高分解能質量分析装置を用いたメタボローム解析の概念実証。(Cancer Sci. (文献34)より転載 ©2019 Japanese Cancer Association)  
 大腸がん・胃がん患者からCTCを非標識CTC分離システムを用いて分離後、CTCを1細胞毎でピックアップ、細胞質内の代謝物を質量分析装置を用いて一斉分析。大腸がんと胃がんのCTCにおけるメタボロームプロファイルが異なることを前向き臨床研究で証明。

**バイオマーカー迅速検証プラットフォーム**

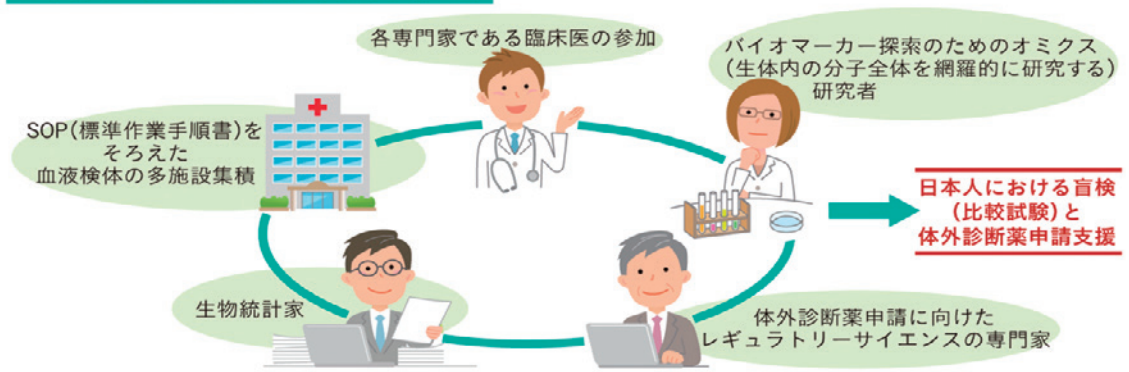


図9 バイオマーカー迅速検証プラットフォーム。(日本医科大学広報誌ヒポクラテス 2021 Winter Extra Qualityより転載 @2021 日本医科大学)

Early Detection, P-EBED). P-EBEDには、バイオマーカーに造詣の深い臨床医、オミクス研究者、医薬

品規制に詳しいレギュラトリーサイエンスの専門家、臨床統計家が参加し、バイオマーカー探索、検証研究

のための臨床検体の収集、リアルワールドデータを用いたバイオマーカーの概念実証 (proof of concept, POC), IVD 薬事承認のための臨床性能試験デザイン支援、臨床統計解析支援などを行っている (図9)。現在までに、国立がん研究センター中央病院、東邦大学、日本医科大学付属病院などから同一の標準手順書で採集された膵がんや大腸がんなどの悪性疾患、類縁疾患の血漿検体が1,000例強、また先述した鹿児島県、北海道で収集している健診データが付帯した健常者検体を13,800例保有し、アカデミアや企業が新規で開発したバイオマーカーのPOC取得やIVDの研究支援を行っている。2021年度からは日本医科大学付属病院だけでなく、武蔵小杉病院、千葉北総病院も参加し、より多くのがん検体や類縁疾患を集めていく予定である。これら検体やノウハウを用いて、現在までにIVD研究支援やアカデミアのPOC取得に関する共同研究を行っている。

企業との共同研究としては、先述した apoA2-isoforms の IVD 申請に向けた臨床開発が (株) 東レと共同研究で進行中である。アカデミアとの共同研究としては慶應大学とケンウッド社が開発した抗体やレクチンを張り付けたコンパクトディスクを用いてエクソソームの絶対数を計測する ExoCounter を用いて、膵がんを血液試料で判別する方法について POC の取得を支援した<sup>35</sup>。また東京大学と共同研究で血液中に含まれる複数の酵素活性を「1分子」レベルで判別し、デジタルカウントする技術 (Single-molecule enzyme activity-based protein profiling; SEAP) の POC を、膵がん血液を用いて取得した。従来、酵素活性の計測には煩雑な研究手法とサンプル量を必要としたが、本方法が開発されたことにより微量検体からの複数種類の酵素活性が簡便かつ迅速に計測できるようになることが期待される。今回の研究では、膵がん患者血液中では、ENPP3 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) 活性が健常者に比べて有意に上昇していることを確認した<sup>36</sup>。

## 6. 終わりに

バイオマーカーの探索から社会実装に向けて研究を展開してきたが、双方向性の橋渡し研究の重要性を痛感した。われわれは「オリジナルな研究を通じて真に医療に還元する」、「臨床現場の課題を抽出して、新しい基礎研究課題を探索して解決する」をモットーに研究を行ってきている。今まではがんにかかわる探索研究が多かったが、膵がんバイオマーカーである apoA2 は循環器系疾患と関連が深い HDL コレステロール

(high density lipoprotein cholesterol) の構成要素であり<sup>37</sup>、ACTN4 は家族性巣状硬化症の責任遺伝子としてハーバード大学から報告されてきている<sup>38</sup>。さらにポリスルフィドを含む活性硫黄はミトコンドリアにおける硫黄呼吸を利用したエネルギー産生に深く関与することが報告され<sup>39</sup>、疾患との関連に関しては慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) への関与や<sup>40</sup>、糖尿病性網膜症などの良性疾患との関連が報告され始めた<sup>41</sup>。今後は悪性腫瘍だけでなく、良性疾患に対する創薬標的やバイオマーカー探索にも挑戦したいと考えている。

## 謝辞

本総説に紹介した研究の成果は多くの共同研究者と行ったものです。

特に、①膵がんのバイオマーカー apoA2-isoforms では、神戸大学消化器内科：故東健教授、小林隆助教、ハイデルベルグ大学：Felix K. 博士、Buchler M. W. 教授、ドイツがん研究センター (DKFZ)：Canzian F. 博士、Kaaks R. 教授、(株) 東レ：小林道元博士、日本対がん協会：垣添忠生会長、小西宏マネージャー、米国国立がん研究所 (NCI)：Srivastava S. 博士、②転移活性バイオマーカー ACTN4 の開発では、日本医大呼吸器内科：野呂林太郎講師、久保田馨教授、③プロテオミクス・メタボロミクス解析を用いた卵巣がんの化学療法耐性機序の解明では、慶應大学医学部医化学教室：末松誠教授、菱木貴子講師、防衛医科大学校病理学教室：津田均教授、口腔がんの創薬標的の探索は、国立がん研究センター中央病院：吉本世一頭頸部外科科長、森泰昌病理科医員、東京歯科大学口腔学顔面外科学講座：柴原孝彦前教授、医薬基盤研究所：朝長毅上級研究員、足立淳プロジェクトリーダー、④リキッドバイオプシー研究では、国立がん研究センター中央病院：加藤健頭頸部内科科長、庄司広和消化管内科医員、理化学研究所 QVIC：故升島努博士、清水義宏ユニットリーダー、⑤ P-EBED の立ち上げには、滋賀医科大学付属病院臨床研究センター：久津見弘教授、小畑大輔助教、慶應大学医学部付属病院臨床研究推進センター：長島健悟准教授、また検体収集に参加していただいた国立がん研究センター中央病院、日本医科大学付属病院、東京歯科大学、東邦大学、大阪大学、兵庫医大、横浜市立大学、東京医科大学などの多くの臨床の先生方に、多大なるご指導をいただきました。国立がん研究センター研究所早期診断バイオマーカー部門の時代を含め、日本医大先端医学研究所生体機能制御分野でも研究を支えてくれた特任研究員、研究補助

員, レジデント, 研究生の皆様にご心より感謝いたします。

本研究は, 文部科学科研費基盤 (B), AMED 革新的がん医療実用化研究事業, AMED 次世代がん医療創生研究事業, AMED-CREST, AMED 先端計測, 厚生労働科研費の支援で行われました。

Conflict of Interest : 本研究は, 東レ株式会社から日本医科大学への共同研究費を受領して行われました。

## 文 献

- Force USPST, Owens DK, Davidson KW, Krist AH, et al.: Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *JAMA* 2019; 322: 438-444.
- Canto MI, Harinck F, Hruban RH, et al.: International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut* 2013; 62: 339-347.
- Grover S, Syngal S: Hereditary pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2010; 139: 1076-1080, 80 e1-2.
- Hruban RH, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP. Update on familial pancreatic cancer. *Adv Surg* 2010; 44: 293-311.
- Honda K, Hayashida Y, Umaki T, et al.: Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* 2005; 65: 10613-10622.
- Honda K, Okusaka T, Felix K, et al.: Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer: protein characterization and multi-institutional validation. *PLoS One* 2012; 7: e46908.
- Honda K, Katzke VA, Husing A, et al.: CA19-9 and Apolipoprotein-A2 isoforms as detection markers for pancreatic cancer-a prospective evaluation. *Int J Cancer* 2018.
- Honda K, Srivastava S: Potential usefulness of apolipoprotein A2 isoforms for screening and risk stratification of pancreatic cancer. *Biomark Med* 2016; 10: 1197-1207.
- Honda K, Kobayashi M, Okusaka T, et al.: Plasma biomarker for detection of early stage pancreatic cancer and risk factors for pancreatic malignancy using antibodies for apolipoprotein-AII isoforms. *Sci Rep* 2015; 5: 15921.
- Hayasaki A, Murata Y, Usui M, et al.: Clinical Significance of Plasma Apolipoprotein-AII Isoforms as a Marker of Pancreatic Exocrine Disorder for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma Undergoing Chemoradiotherapy. Paying Attention to Pancreatic Morphological Changes. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 5738614.
- Kobayashi T, Sato Y, Nishiumi S, et al.: Serum apolipoprotein A2 isoforms in autoimmune pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497: 903-907.
- Honda K, Katzke VA, Husing A, et al.: CA19-9 and apolipoprotein-A2 isoforms as detection markers for pancreatic cancer: a prospective evaluation. *Int J Cancer* 2019; 144: 1877-1887.
- Sato Y, Kobayashi T, Nishiumi S, et al.: Prospective Study Using Plasma Apolipoprotein A2-Isoforms to Screen for High-Risk Status of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12.
- Maguchi H, Tanno S, Mizuno N, et al.: Natural history of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a multicenter study in Japan. *Pancreas* 2011; 40: 364-370.
- Kato S, Honda K: Use of Biomarkers and Imaging for Early Detection of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12.
- Honda K, Yamada T, Endo R, et al.: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 1998; 140: 1383-1393.
- Honda K: The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell Biosci* 2015; 5: 41.
- Honda K, Yamada T, Hayashida Y, et al.: Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128: 51-62.
- Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, et al.: Actinin-4 expression in ovarian cancer: a novel prognostic indicator independent of clinical stage and histological type. *Mod Pathol* 2007; 20: 1278-1285.
- Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, et al.: Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5348-5356.
- Watabe Y, Mori T, Yoshimoto S, et al.: Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma. *Cancer Med* 2014; 3: 613-622.
- Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, et al.: Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2017; 46: 968-976.
- Noro R, Honda K, Tsuta K, et al.: Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. *Ann Oncol* 2013; 24: 2594-2600.
- Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, et al.: Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. *Ann Oncol* 2013; 24: 84-90.
- Watanabe T, Ueno H, Watabe Y, et al.: ACTN4 copy number increase as a predictive biomarker for chemoradiotherapy of locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2015; 112: 704-713.
- Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, et al.: Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol* 2009; 22: 499-507.
- Sugano T, Yoshida M, Masuda M, et al.: Prognostic impact of ACTN4 gene copy number alteration in hormone receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2020; 122: 1811-1817.
- Miura N, Kamita M, Kakuya T, et al.: Efficacy of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung



- cancer assessed by metastatic potential associated with ACTN4. *Oncotarget* 2016; 7: 33165–33178.
29. Honda K, Hishiki T, Yamamoto S, et al.: On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity. *Redox Biol* 2021; 41: 101926.
  30. Onidani K, Miura N, Sugiura Y, et al.: Possible Therapeutic Strategy Involving the Purine Synthesis Pathway Regulated by ITK in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021; 13.
  31. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T, et al.: How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol* 2019; 30: 1580–1590.
  32. Hou HW, Warkiani ME, Khoo BL, et al.: Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci Rep* 2013; 3: 1259.
  33. Onidani K, Shoji H, Kakizaki T, et al.: Monitoring of cancer patients via next-generation sequencing of patient-derived circulating tumor cells and tumor DNA. *Cancer Sci* 2019; 110: 2590–2599.
  34. Abouleila Y, Onidani K, Ali A, et al.: Live single cell mass spectrometry reveals cancer-specific metabolic profiles of circulating tumor cells. *Cancer Sci* 2019; 110: 697–706.
  35. Yokose T, Kabe Y, Matsuda A, et al.: O-Glycan-Altered Extracellular Vesicles: A Specific Serum Marker Elevated in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 2020; 12.
  36. Sakamoto S, Komatsu T, Watanabe R, et al.: Multiplexed single-molecule enzyme activity analysis for counting disease-related proteins in biological samples. *Sci Adv* 2020; 6: eaay0888.
  37. Kihara T, Yamagishi K, Honda K, et al.: Apolipoprotein A2 Isoforms in Relation to the Risk of Myocardial Infarction: A Nested Case-Control Analysis in the JPHC Study. *J Atheroscler Thromb* 2021; 28: 483–490.
  38. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al.: Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251–256.
  39. Akaike T, Ida T, Wei FY, et al.: CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 2017; 8: 1177.
  40. Numakura T, Sugiura H, Akaike T, et al.: Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2017; 72: 1074–1083.
  41. Kunikata H, Ida T, Sato K, et al.: Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci Rep* 2017; 7: 41984.

(受付：2021年8月20日)

(受理：2021年9月21日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。