

# 胆道癌新規診断バイオマーカー候補のSRM MSマルチプル検証アッセイ Verification of Diagnostic Biomarker Candidates for Biliary Tract Carcinoma by SRM MS- based Multiple Assay

○福田哲也<sup>1</sup>・前田晋平<sup>2</sup>、小野川徹<sup>2,3</sup>、高館達之<sup>2</sup>、三上紗弥香<sup>4</sup>、森川孝則<sup>2</sup>、カ山敏樹<sup>2</sup>、片寄友<sup>2,5</sup>、江川新一<sup>2</sup>、板東泰彦<sup>1</sup>・海野倫明<sup>2,3</sup>、西村俊秀<sup>6</sup>  
株式会社バイオシス・テクノロジーズ<sup>1</sup>・東北大学病院肝胆膵外科<sup>2</sup>・東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター<sup>3</sup>・エーエムアール株式会社<sup>4</sup>・東北大学大学院医学系研究科統合がん治療外科学分野<sup>5</sup>・東京医科大学外科学第一<sup>6</sup>

## 研究の背景

胆道癌は胆汁の通り道である胆道系に発症する悪性疾患で、肝外胆管癌・胆嚢癌・十二指腸がんが大別される。初期には症状がなく、癌が進行して胆管が塞がれると、黄疸・尿黄染・掻痒感などの症状がでてくる。早期診断症例は少なく予後不良な疾患であり、部位別がん死亡数では国内6番目に位置する。この30年間で治療成績の大きな改善は得られていない。また特異的な腫瘍マーカーはなく、診断・治療に有用な新規腫瘍マーカーの開発が求められる。

我々研究グループでは、これまでホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片から同定されたバイオマーカー候補タンパク質に対し、Triple-Q-MSによる定量プロテオーム解析による検証を行ってきた。今回、胆道癌のFFPEサンプルよりスクリーニングしたより多くのマルチプル・バイオマーカー候補の定量的検証を可能とする Scheduled-SRM法によって実施したので報告する。

### 胆管がんの確定診断のための必須検査

- A) 胆道造影時の生検組織 (生検できないほど細いところなどは擦過細胞診)
- B) 胆道外瘻チューブから得られた胆汁細胞診

臨床現場ではCT等の画像診断では胆管癌が強く疑われても、生検や細胞診で胆管癌と確定診断がつかないケースが少なくない

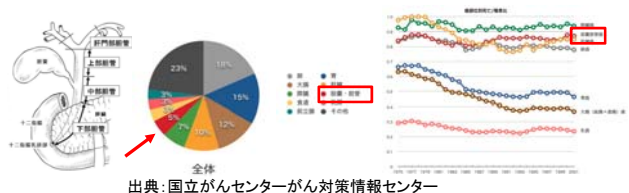
### 上記の臨床上の問題点と本研究結果の意義

上記検査にて「胆管がんである」と確定診断がつけられる(=感度)は東北大学病院肝胆膵外科では全体で約50%にすぎない。文献上の報告も60%と報告されている。

早期発見の場合は、生検や擦過細胞診のための採取部位特定が難しい。アプローチ手技自体も侵襲的で難しい。

2:胆道臨床医からみた血清CEA・CA19-9の推移の仕方と経験的判断基準  
文献上、両者ともに感度は40~60%程度、当科では肝転移や遠隔転移などが顕在化していない切除可能症例を対象としているためか、術前血清CEAに関しては感度15%とわかって低い。

早期 (stage 1) から十分に胆道がんであることが診断できるマーカーが必要である。



## 方法:

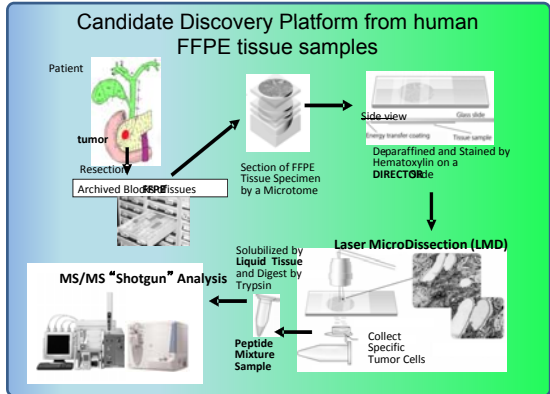
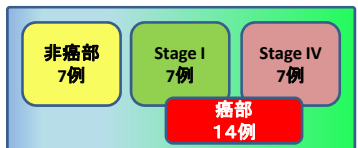


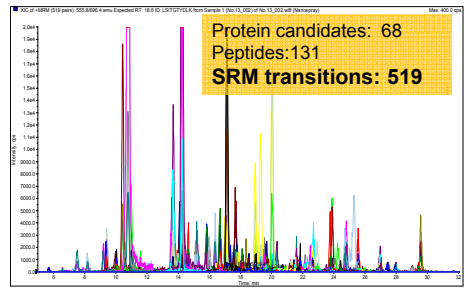
Fig.1 Candidate Discovery Platform from Formalin Fixed Paraffin Embedded tissue Samples

## 結果:



●Discovery stageで同定された1993のタンパク質のうち、スペクトラルカウント解析によって有意に変動すると見られる77種類のうち68種類についてSRM定量解析を行った。

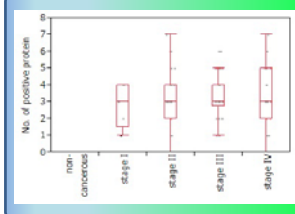
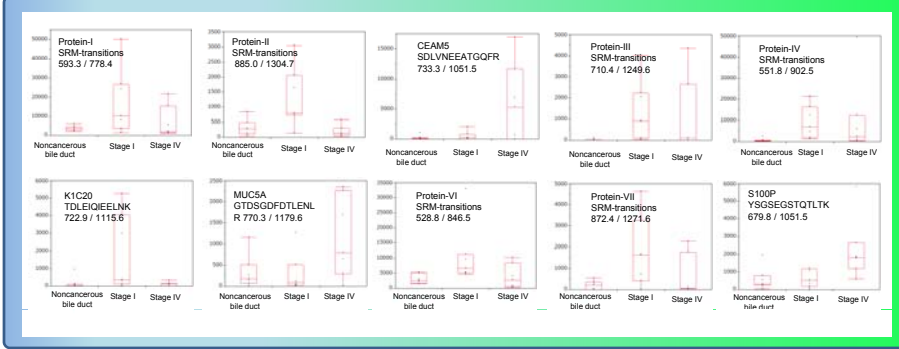
●以下の基準を定義しマーカー候補タンパク質の発現変動を判定した。  
Up regulation(↑): Normalized peak areaの群平均値が正常の200%  
Down regulation(↓): Normalized peak areaの群平均値が正常の50%  
上記の判定結果による「正常 vs St1」または「正常 vs St4」で定量値200%以上のもの10タンパク (Fig. 5)についてIHCによるvalidationを行った。



Sample preparation	
FFPE Tissue	DIRECTOR slide (Expression Pathology)⇒10 um thick selection
Laser Microdissection	LMD6000 (Leica Microsystems)⇒8,000,000um2
Peptide Extraction	Liquid Tissue MS protein Prep Kit (Expression Pathology)⇒0.1%TFA/2%ACN

SRM LC/MS conditions	
nano-ESI LC/MS/MS	ZAPLOUS System, (AMR Inc.)
HPLC	Paradigm MS4 (Microm BioResources, Inc.)
Autosampler	HTS-PAL
Column	L-column C18, 0.1x150mm, 3um, 12nm (CERI)
Ion Source	AD-H6 closed nano-ESI interface (AMR Inc.)
Mass spectrometry	4000QTRAP (AB Sciex)
Mobile phase	A:0.1%HCOOH/2%ACN, B:0.1%HCOOH/90%ACN
Gradient	5-55%B in 45min
Flow rate	500 nl/min



●IHCによるValidationの結果、  
公知4種: CEAM5 (感度74.8%)・S100P (84.1%)・MUC5A (62.2%)・K1C20 (17.8%)  
新規6種: Protein IV (37.7%)・Protein I (29.8%)・Protein III (21.9%)・Protein VII (評価中)・Protein VI (評価中)・Protein II (評価中)  
→すべて癌特異度は100%であった。診断感度は74.8%(CEA)→97%(7 proteins)となった。

## 考察:

●现阶段で「7種のタンパク質 (新規3+公知4)を一斉検出することにより、胆管がんの診断感度が97%(特異度100%)に向上する」ことが認められた。  
●今後は胆汁に含まれる癌細胞からタンパク質を抽出し、この10タンパクパネルをもとに一斉定量による確定診断の可能性を検証する必要がある。

Fig.4 Experimental flow of Validation stage

Validation set  
Cancer-151(I/II/III/IV:5/37/50/59)  
Noncancerous bile duct-14