

平成 25 年度 博士学位論文

抗体を活用した肺癌の血清・組織診断マーカー  
候補タンパク質の獲得

北里大学大学院医療系研究科

生体構造医科学群 応用腫瘍病理学

DM-11018 小林 信

指導教授 佐藤 雄一

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 要旨

### 【目的と背景】

肺癌は肺癌とともに難治性癌の代表であり、本邦では男性癌死の第1位、女性でも第2位を占めている。また初診時にすでに Stage III 以上の進行癌であることが多く、化学療法としてはプラチナ製剤を用いた多剤併用療法が用いられているが、その効果は依然として不十分であることが予後不良の原因と考えられる。

肺癌は約 80%を占める非小細胞性肺癌 (NSCLC) と、約 20%を占める小細胞性肺癌 (SCLC) に大別され、前者はさらに肺腺癌 (AC)、肺扁平上皮癌 (SCC) と大細胞癌等に分類されている。NSCLC の血清診断マーカーとして AC では CEA、SLX、SCC では CYFRA21-1 等が知られている。しかし、いずれも臓器特異性や腫瘍特異性が低く早期診断への応用は難しいのが現状であり、新たな診断マーカーの獲得が求められている。

新規マーカーの主な獲得方法は、患者血清中の腫瘍関連抗原タンパク質を直接探索する方法であるが、血清中に約 99 %含まれているアルブミン・免疫グロブリン等の主要血清タンパク質がその探索を困難にしている。そこで、ランダム免疫法を用いて作製した腫瘍と特異的に反応するモノクローナル抗体と、癌患者血清中で早期かつ高感度に検出が可能であると報告のある自己抗体の「2種の抗体を活用した」新規診断マーカー候補タンパク質の獲得を行った。特に前者では獲得したモノクローナル抗体の中から抗 Carbonic anhydrase XII (CAXII) 抗体に着目し、肺癌組織や肺癌患者血清等の臨床材料を用いた多検体評価を行い、臨床への応用を目指した検討を行った。後者では AC における同一患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の探索を行い、既存の方法では獲得できない腫瘍間質由来タンパク質を抗原とする自己抗体の獲得を試みた。

### 【材料と方法】

#### 1. モノクローナル抗体の作製及び有用性の評価

AC 由来細胞株 A549 細胞を免疫源に、BALB/c マウスに2週間おきに3回免疫を施行、脾臓摘出後にマウス骨髄腫細胞株 SP-2/O と細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製した。限界希釈を2回行い、モノクローナル抗体を樹立した。免疫源に用いた A549 細胞で発現亢進を認めた Ku-Lu-5 抗体については免疫沈降法による抗原タンパク質の同定を行ったのち、AC 由来細胞株 A549、LC-2/ad、SCC 由来細胞株 RERF-LC-AI、SCLC 由来細胞株 N231、大細胞性神経内分泌肺癌 (LCNEC) 由来細胞株 LCN1 を用いた免疫ブロット (IB) 法、免疫染色 (IHC) 法により発現の程度と局在の解析を行った。さらに、この抗体を用いて血清中のタンパク質量を肺癌患者 96 例、健常者 60 例を対象としたドットブロット法により測定した。

#### 2. 同一 AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の探索

北里大学病院にて外科切除された3例の肺腺癌組織と同一患者の血清を用いて、2次元電

気泳動 (2-DE) 法と IB 法を組み合わせた 2DE-IB 法を行い、自己抗体の認識する抗原タンパク質の獲得を行った。この中から Annexin A2 (ANXA2)、Transforming growth factor ig-h3 (BIGH3)、Macrophage capping protein (CAPG)、Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) の 4 種については抗原タンパク質が検出された肺癌組織と各種肺癌細胞株における発現と局在を解析した。

## 【結果】

### 1. CAXII モノクローナル抗体

本作製法により免疫に用いた A549 細胞の様々な部位に発現を認める 188 個の抗体産生クローンを樹立した。この中の Ku-Lu-5 抗体は各種肺癌細胞株を用いた IB 法、IHC 法より AD 由来細胞株にのみ強い発現を認め、免疫沈降法の結果 CAXII を認識する抗体であることが明らかとなった。AC 28 例、SCC 9 例の肺癌組織を用いた IHC 法より、AC 2/28 (7.1%)、SCC 2/9 (22.2%) で腫瘍細胞の細胞膜に染色を認めた。ドットブロット法による血清中 CAXII 抗原タンパク質の測定は Training set (肺癌 70 例、健常者 30 例) と Validation set (肺癌 26 例、健常者 30 例) の 2 群に分けて行った。前者では健常者に比して肺癌患者で有意な発現亢進 ( $P < 0.01$ ) を認め、ROC 解析により  $AUC = 0.794$  で両者を鑑別できることが分かった。さらに AC に比して SCC で有意 ( $P < 0.03$ )、SCC では低分化型に比して高・中分化型で有意な発現亢進を認めた ( $P < 0.02$ )。Validation set での測定においても健常者に比して肺癌患者で有意な発現の亢進を認めた ( $P < 0.03$ )。

### 2. 同一 AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の獲得

2DE-IB 法の結果、癌組織を用いた検討から計 58 スポット (45 種)、AC 由来細胞株を用いた検討から計 53 スポット (41 種) の自己抗体が認識する抗原タンパク質を検出、同定した。内訳は癌組織のみから検出されたもの 36 種、細胞株のみから検出されたもの 32 種、両者に共通に共通して検出されたものは 9 種のタンパク質であった。癌組織のみから検出されたものの中で、ANXA2、CAPG、HAPLN1 は腫瘍細胞に加えて腫瘍間質の線維芽細胞やリンパ球にも局在が認められ、BIGH3 は腫瘍細胞における発現は認められず、腫瘍間質の線維芽細胞やリンパ球に発現が認められた。

## 【考察】

### 1. CAXII モノクローナル抗体

NSCLC や浸潤性乳癌患者において、CAXII の発現亢進群の予後は低発現群に比して良好であるとの報告がされている。一方、星状細胞腫組織における発現の亢進は予後不良であるとの相反する報告もされている。腫瘍における CAXII タンパク質における報告の多くは腫瘍組織中の発現を対象にしており、患者の血清におけるタンパク質量の報告は未だされていない。今回の肺癌組織を用いた IB と IHC の相関性の検討では、IHC での腫瘍組織における陽性率の低さが影響し得られていない。よって、腫瘍組織での発現と患者血清中での

濃度の相関性は不明であるが、肺癌患者血清中の発現量は健常者に比して有意に高く、ROC解析からも CAXII は肺癌の新規血清診断マーカーとしての有用性が示唆された。

## 2. 同一AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の獲得と有用性の評価

生体内における「癌」は腫瘍細胞だけではなくリンパ球、マクロファージを含む炎症性細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞等のいわゆる腫瘍間質を構成する多種多様な成分から成り立っている。また、腫瘍細胞の周囲の微小環境を形成する腫瘍間質は腫瘍細胞の接着、増殖、進展に大きく関与しており、これらに由来する分子を探索することが新規バイオマーカーや抗癌剤の分子標的となり得ることが報告されている。さらに腫瘍間質に局在する繊維芽細胞は腫瘍の浸潤、転移に大きな影響を及ぼすとの報告からも、腫瘍細胞に加え、腫瘍間質成分に対する自己抗体に着目することでより幅広く腫瘍の浸潤や転移を予測するマーカーの獲得が可能と考えられた。

今回の研究で肺癌組織を用いた場合のみから獲得された ANXA2 は、約 38kDa のリン脂質結合タンパク質である。腫瘍においては胃癌、膵臓癌等の種々の癌において発現の亢進が報告されているが、前立腺癌では逆に発現の低下が報告されている。さらにこのタンパク質は S100A10 タンパク質等と相互作用し Tissue-plasminogen activator と結合、MMP の活性化を通して間接的に腫瘍の浸潤・転移に関与していることが報告されている。これまで、腫瘍における抗 ANXA2 自己抗体に関する詳細な報告はなく、同一 AC 患者の腫瘍組織と血清を用いた自己抗体解析により、癌の早期検出ならびに浸潤転移に関する分子の一つとして獲得に成功した。現在、AC に加え他組織型肺癌患者血清を追加した検討を行っている。

抗体を基盤としたプロテオミクス手法によるバイオマーカー探索は診断マーカー獲得法として有用であることが報告されている。しかしモノクローナル抗体あるいは自己抗体の片方のみに着目した報告が大半であり、両者を組み合わせた血清・組織診断マーカー獲得の試みはなされていない。自己抗体解析は疾患の早期診断に有用であると報告されており、血中の腫瘍関連タンパク質は腫瘍の進行と共に増加することも報告されている。この2つを組み合わせることで、腫瘍の早期から進行癌まで幅広いステージにおける腫瘍関連分子の獲得が可能であり、病態の変化を的確に捉えることができる可能性がある。

目次	
1. 諸言	1
2. 材料及び方法	
2.1 研究倫理	4
2.2 抗CAXIIモノクローナル抗体	
2.2.1 細胞株	4
2.2.2. 抗CAXII抗体測定のための患者血清	5
2.2.3. KU-Lu-5モノクローナル抗体の作製	5
2.2.4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法	5
2.2.5. 免疫ブロット (Immunoblot: IB) 法	6
2.2.6. 抗体サブクラスの決定	6
2.2.7. 免疫沈降 (Immunoprecipitation: IP) 法	6
2.2.8. In-gel digestion	7
2.2.9. タンパク質の同定	7
2.2.10. CAXII精製タンパク質を用いたIB法	8
2.2.11. 免疫組織化学 (Immunohistochemistry: IHC) 法	8
2.2.12. Dot blot解析のための血清サンプル調整法	8
2.2.13. Dot blot解析	9
2.2.14. 統計解析	9
2.3. 自己抗体解析	
2.3.1. 細胞株、肺癌組織及び抗体	10
2.3.2. 2次元電気泳動 (two-dimensional gel electrophoresis: 2-DE) 法のためのタンパク質抽出	10
2.3.3. 2DE-IB法	10
2.3.4. 自己抗原の同定	11
2.3.5. 各種肺癌細胞株、肺癌組織を用いたIB法	11
2.3.6. AC由来細胞株、肺癌組織を用いたIHC法	11
3. 結果	
3.1. 抗CAXIIモノクローナル抗体	
3.1.1. KU-Lu-5モノクローナル抗体の作製	13
3.1.2. CAXII抗原タンパク質の同定	13
3.1.3. IB法、IHC法による局在と発現解析	13
3.1.4. 肺癌患者血清中のCAXII抗原量	14
3.2. 自己抗体解析	
3.2.1. 2DE-IB法による自己抗原の検出	14
3.2.2. ANXA2、BIGH3、CAPGとHAPLN1のAC組織内局在	14
3.2.3. ANXA2、BIGH3、CAPGとHAPLN1の発現解析	15
4 考察	
4.1. 抗CAXIIモノクローナル抗体	16
4.2. 同一AC患者の癌組織と血清を用いた自己抗体解析	17
4.3. 総合考察	19
謝辞	21
参考文献	22
図表	27

## 1. 諸言

2012 年の厚生労働省の人口動態調査死亡統計によると、肺癌による死亡者数は男性 51,372 人、女性 20,146 人であり、男性は全癌死亡者数の 23.8%、女性は全癌死亡者数の 13.8%を占めている。肺癌粗死亡率の年次推移をみると、1960 年は人口 10 万人あたり男性で 7.9 人であったが、以降急速に増加し、1993 年には胃癌を抜いて第 1 位となり、2012 年には 83.8 人となった。女性では 1960 年の粗死亡率は同様に 3.2 人であったが、1960-2012 年まで増加を続け、1980 年以降は胃癌に次いで第 2 位となり、2012 年には 31.2 人まで上昇している。

肺癌は、全体の約 85%を占める非小細胞性肺癌 (NSCLC) と、全体の約 15%を占める小細胞癌 (SCLC) に分類される。NSCLC は、男性 40%、女性 70%の割合を占める腺癌 (AC)、男性 40%、女性 15%の割合を占める扁平上皮癌 (SCC)、男女共に NSCLC 全体の約 10%を占める大細胞癌 (LCC) に分類される。また LCC には 1999 年に Travis 等によって新たに WHO 分類に加えられた大細胞性神経内分泌癌 (LCNEC) が含まれる。NSCLC の 5 年生存率は Stage IA では 72.1%だが、Stage IIA では 48.7%であり、Stage IV では 20.8%まで減少する [1]。また、神経内分泌癌である SCLC では、Stage I における 5 年生存率は 42.2%、Stage II では 38.9%であるのに対し、LCNEC においては Stage I における 5 年生存率は 57.8%、Stage II では 31.9%となっており[2]、組織型にかかわらず両者とも極めて予後不良である。

腫瘍マーカーとは、悪性腫瘍患者の血液、尿、組織中に検出される物質であり、腫瘍の存在の有無やその進行度を診断するだけでなく、原発臓器と良・悪性の鑑別、癌治療の経過観察や予後予測に有用である [3]。現在肺癌では、前立腺癌の PSA [4]、卵巣癌の CA125 [5] のようなスクリーニングに有用なマーカーは存在しておらず、臨床的には診断の補助 (癌の診断及び組織型の推定)、治療

効果の判定、再発の補助診断として使用されている。現在、血清診断マーカーとして用いられているものには、AC の Carcinoembryonic antigen、Sialyl Lewis x、SCC の Cytokeratin 19 fragment、Squamous cell carcinoma antigen 等が知られている [6]。陽性率はACではCEA と SLX がそれぞれ57%、40～50%、SCC では SCC-ag と CYFRA がそれぞれ 50～60%、60～80%と高値を示すが [7]、SLX は慢性肺疾患、CYFRA は肝疾患、腎不全で偽陽性を示すなど、腫瘍特異性や臓器特性は未だ十分とは言えない。よって現時点では、これら腫瘍マーカーは単独で肺癌のスクリーニングや確定診断に用いられてはいない [8, 9]。

プロテオミクス解析を用いた腫瘍マーカー探索法は質量分析を基盤とした方法、データベースを基盤とした方法、抗体を基盤とした方法の3法に大別されている。また、腫瘍マーカー開発は探索、検証、アッセイ系構築という3段階に分かれている。特に抗体を基盤とした探索法は前述のバイオマーカー開発における探索と検証におけるパイプラインとして、またハイスループットな検証を可能にすることから、バイオマーカー探索において最も有力な方法であると報告されている [10]。そこで本研究においては「モノクローナル抗体」と「自己抗体」の2種の抗体に着目し、新規腫瘍マーカー候補タンパク質の網羅的探索及び有用性の評価を行った。

モノクローナル抗体の作製に当たっては、Hirohashi らが報告しているランダム免疫法を用いた [11]。本方法は目的のタンパク質・ペプチドをマウス等に免疫し抗体作製を行う従来法とは異なり、細胞株からタンパク質を抽出しそのままマウスに免疫を行う方法である。従来法では獲得の難しい、腫瘍特異的な翻訳後修飾 (PTM) を受けた抗原に対する抗体や立体配座エピトープをもつ抗体の獲得も期待される方法である。本研究では、ランダム免疫法を用いて作製したモノクローナル抗体のうち、抗 Carbonic anhydrase XII 抗体に着目し、血清診断マーカーとしての有用性を多数症例の血清を用いて評価した。



一方、自己抗体は様々な癌患者血清中においても存在が報告されており、疾患の発症 5 年前より血清中の自己抗体量の増加が認められるケースも報告されている [12]。Tan らによると、自己抗体は腫瘍関連抗原タンパク質に比して、癌患者の免疫応答で増幅されており、より早期から検出可能であることを報告している [13]。さらに Hanash らの報告 [14] では自己抗体の検出感度は PCR 法に匹敵するとしており、さらに近年自己抗体が癌の早期発見に有用であるとする報告 [15-17] も相次いでされていることから、自己抗体は癌をより早期に、高感度で検出が可能なバイオマーカーとして有用であると思われる。このことから本研究においては、同一肺癌腺癌患者の癌組織と対になる血清を用いた自己抗体の獲得を行い、腫瘍組織を用いなければ得ることが困難な自己抗体の獲得とその有用性を評価することを目的とした。

## 2. 材料及び方法

### 2.1. 研究倫理

本研究に使用した全ての血清および患者組織は書面によるインフォームドコンセントを得て使用しており、北里大学医学部倫理委員会の承認を得ている (B 倫理 07-06: 原発性肺癌に関するプロテオーム解析による診断マーカーの探索)。

### 2.2. 抗 CAXII モノクローナル抗体

#### 2.2.1. 細胞株

AC 由来細胞株 A549、LC-2/ad を JCRB 細胞バンク (Tokyo, Japan)、理研バイオリソースセンター (Ibaraki, Japan)、SCC 由来細胞株 RERF-LC-AI を理研バイオリソースセンター、SCLC 由来細胞株 N231 を American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) よりそれぞれ購入した。また、本学医学部病理学教室にて Jiang らが樹立した LCNEC 由来細胞株 LCN1 [18] を含めて全ての細胞株は 10% 非働化牛胎児血清 (Biowest, Miami, FL, USA) 、100 units / ml Penicillin、100 ug / ml Streptomycin (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) 加 RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> / 95% Air の条件下で培養し、維持している。10 cm 径の Dish でサブコンフルエントにした細胞は、スクレーパーで剥がし、PBS (-) による洗浄を 2 回行いペレットとした。細胞ペレットは使用まで -80°C のディープフリーザーに保存しプロテオミクス解析に用いた。または 10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作製し、免疫組織化学染色に用いた。特に A549 細胞株は AMeX 固定パラフィン包埋ブロック [19] も作製し、モノクローナル抗体のスクリーニングに用いた。

マウスミエローマ細胞由来 SP2/O-14Ag 細胞株は理研バイオリソースセンターより購入し、10% 非働化牛胎児血清 (Biowest) 、100 units / ml Penicillin、100 ug

/ ml Streptomycin (Invitrogen Corp.), 1× 8-azaguanine (50× Hybri-Max, Sigma-Aldrich Corp.) 加 RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich Corp.) にて培養した。

#### 2.2.2. 抗 CAXII 抗体測定のための患者血清

肺癌患者血清 70 例 (AC 29, SCC 21, SCLC 17, LCNEC 3) 及び健常人血清 30 例を Training set として、肺癌患者血清 26 例 (AC 20, SCLC 5, LCNEC 1) 及び健常人血清 30 例を新たに収集、Validation set としてそれぞれ用いた。これら用いた症例の臨床病理学的因子は表 1 に示す。解析に用いた肺癌患者血清は 2005 年から 2011 年までに北里大学病院にて収集したもの、健常人血清は Kyowa Medex Co., Ltd. (Tokyo, Japan) にて収集したものを、使用まで -80℃ にて保存した。

#### 2.2.3. KU-Lu-5 モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体の樹立は Nagashio らの報告に基づき施行した [20]。A549 細胞株 50 mg に PBS (-) を 500 µL 加え、超音波破碎装置 (UH-50; SMT Company, Tokyo, Japan) を用いてタンパク質抽出液を作製した。この溶液を 15 週の BALB/c マウスに 2 週間おきに 3 回、腹腔内に注射し免疫を行った。1 週間後に AMeX 固定した A549 細胞株を用い、100 倍に希釈したマウスの血液を 1 次抗体とした免疫染色法により抗体価の確認を行った。抗体価の上昇が確認されたマウスに上記と同様の方法で boost を行い、その 3 日後に脾臓摘出後 B リンパ球を単離、SP2/O と細胞融合を行いハイブリドーマを作製した。スクリーニングには AMeX 固定 A549 細胞株の免疫染色 (IHC) 法を施行し、限界希釈を 2 回行うことで KU-Lu-5 モノクローナル抗体を樹立した。

#### 2.2.4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法

A549、LC-2/ad、RERF-LC-AI、N231、LCN1 の各細胞株に lysis buffer [21] を加え、超音波破碎を行いタンパク質を抽出した。各タンパク質 10  $\mu$ g につき、10% SDS-PAGE を行いタンパク質を分離した。SDS-PAGE 後は polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) にタンパク質を転写し、免疫ブロット法を行った。

#### 2.2.5. 免疫ブロット (Immunoblot: IB) 法

転写後の PVDF 膜は 0.5% casein from bovine milk (Sigma-aldrich Corp.) を用いて 30 分間室温にてブロッキングを行い、ハイブリドーマ (KU-Lu-5) の培養上清を 1 次抗体として 1 時間室温で反応した。2 次抗体として 1,000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を 45 分間室温にて反応し、Immobilon Western HRP reagent (Millipore Corp.) により化学発光を検出した。

#### 2.2.6. 抗体サブクラスの決定

KU-Lu-5 抗体のサブクラスの決定は IsoStrip<sup>TM</sup> Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用い、マニュアルに従い施行した。

#### 2.2.7. 免疫沈降 (Immunoprecipitation: IP) 法

免疫沈降法は Nitori らの報告 [22] に従い施行した。A549 細胞株を PBS (-) にて 2 回洗浄後、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer を加え、30 分間氷上にてタンパク質を抽出した。15,000 rpm, 4°C, 30 分間の遠心を行い上清を回収後、protein G sepharose beads (50 % slurry) (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を 20  $\mu$ L 加え、ローテーターを用いて 4°C overnight 処理をした。一方 RIPA buffer 800  $\mu$ L に KU-Lu-5 抗体 250  $\mu$ L を加え、さらに protein G

sepharose beads を 20  $\mu$ L 加え、ローテーターを用いて 4°C overnight 処理を行い、beads に抗体を結合させた。15,000 rpm, 4°C, 30 分間の遠心後、A549 細胞株のタンパク質抽出物 500  $\mu$ g と KU-Lu-5 抗体を 4°C, 4 時間 IP 反応させた。15,000 rpm, 4°C, 5 分間の遠心後、抗原抗体複合体は RIPA buffer にて洗浄を行い、15  $\mu$ L の 1 × Laemmli's buffer に溶解した。100°C, 5 分間の denature 処理の後、10 % polyacrylamide gel を用いた SDS-PAGE を行い、Negative Gel Stain MS kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いた Zn 染色により、産物の可視化を行った。

#### 2.2.8. In-gel digestion

Zn 染色後のタンパク質バンドはゲルから 1mm 各の大きさに切り出し、脱色液 (Wako Pure Chemical) を用いて脱色後、100% Acetonitrile (ACN) を加え脱水を行った。Vacuum 遠心機 (MV-100, TOMY SEIKO Co. Ltd, Tokyo, Japan) にて 45 分間処理した後、氷上で 20 ng/  $\mu$ L Trypsin (Mass Spec Grade, Promega Corp., Madison, WI, USA) / 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液を加え再水和させた。Trypsin 溶液を除いた後 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液を加え、37°C で 24 時間ゲル内消化を行った。消化後溶液を回収し、ゲルには 5% (v/v) trifluoroacetic acid / 50% (v/v) ACN を加え 1 回洗浄し、同チューブに回収、質量分析用サンプルとした。

#### 2.2.9. タンパク質の同定

回収されたペプチド断片は、MALDI-TOF / TOF MS (autoflex III TOF/TOF, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) によりタンパク質の同定を行った。測定には、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) マトリックスとキャリブレーション用 Prespotted AnchorChip Peptide CalibStandard がスポットされたディスポーザブルプレート (Prespotted AnchorChip 96 set for Proteomics, Bruker Daltonics GmbH) を用いた。MALDI-TOF / TOF MS を用いて Peptide mass fingerprints (PMF) を測定し、

さらに、PMF より 2~3 本のピークを親 mass として選択し、その fragment を測定した。これら両者の結果をデータベース IPI Human (93,289 sequences; 36,994,704 residues) を用いた MASCOT (<http://www.matriscience.com/>) により検索し、タンパク質を同定した。

#### 2.2.10. CAXII 精製タンパク質を用いた IB 法

GST-tag 付き CAXII 精製タンパク質および negative control として用いた GST-tag 付き Venus タンパク質はコムギ胚芽無細胞生成タンパク質合成系により作製した [23]。各タンパク質 10 µg に対し 100°C, 5 分間の denature 処理を行い、SDS-PAGE 法により分離後、2.2.5.に示す方法と同様にして IB 法を施行した。

#### 2.2.11. 免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry: IHC) 法

10 %ホルマリン固定パラフィン包埋した肺癌細胞株及び 37 例の肺癌組織 (AC 28, SCC 9) は 3µm に薄切した。切片は脱パラフィン、脱キシレンを行い、3 %過酸化水素水にて 20 分間内因性ペルオキシダーゼの失活処理を行い、続いて 0.1 %Tween 20 加 0.01 mol/L のクエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて抗原の賦活化を行い、0.5 % Casein/ TBS を用いて室温 10 分間ブロッキングを行った。切片は KU-Lu-5 抗体の培養上清を 1 次抗体として室温 2 時間、ChemMate ENVISION reagent (Dako) を 2 次抗体として室温 30 分間それぞれ反応させ、Stable DAB solution (Invitrogen) により反応産物の可視化を行った。

#### 2.2.12. Dot blot 解析のための血清サンプル調整法

血清中のアルブミン・IgG を ProteoExtract Albumin/IgG Removal kit (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて、マニュアルに従い施行した。血清 60 µL に binding buffer 540 µL を加え、重力滴下により血清中のアルブミンと IgG を除去した。除

去後の血清は 10-kDa molecular-weight cut-off ultra-filtration VIVASPIN 2 (Sartorius, Gottingen, Germany) を用いて限外濾過および濃縮を行った。血清サンプルは  $6000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  にて  $100 \mu\text{L}$  以下まで濃縮を行い、PBS (-) に溶媒置換し再度  $6000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  にて  $50 \mu\text{L}$  以下まで濃縮、PBS (-) にて最終液量  $60 \mu\text{L}$  として調整した。

#### 2.2.13. Dot blot 解析

上記 2.2.12. にて処理した血清  $1 \mu\text{L}$  を PBS (-) にて 20 倍に希釈、またポジティブコントロールとして無標識マウス IgG をそれぞれサンプルとして使用し、256 ピン自動 Dot blot 装置 (Kakengeneqs Inc., Chiba, Japan) により PVDF 膜にプリントした。1 回の実験に 2 枚の PVDF 膜を用意し使用した。プリント後の PVDF 膜は 0.5 % Casein にて室温 1 時間ブロッキング処理を行い、1 枚の PVDF 膜は KU-Lu-5 抗体を 1 次抗体として室温 30 分間、1,000 倍希釈した HRP 標識マウス IgG 抗体を 2 次抗体として室温 30 分間、反応を行った。他方 1 枚の PVDF 膜は 0.1% Tween20 加 TBS (TBS-T) にて 20 倍希釈した 0.5 % Casein を 1 次抗体として室温 30 分間反応させ、1,000 倍希釈した HRP 標識マウス IgG 抗体を 2 次抗体として室温 30 分間、反応を行った。Immobilin Western HRP reagent (Millipore Corp.) にて化学発光を検出し、DotBlotChipSystem Ver. 4.0 (Dynacom Co., Ltd., Chiba, Japan) によりシグナルの数値化を行った。

#### 2.2.14. 統計解析

血清中の CAXII タンパク質レベルは SPBS software package (Ver. 9.42 for Windows) の Mann-Whitney *U*-test を用いて有意差検定を行い、感度、特異度算出のため、同ソフトウェアを用いて Receiver operating characteristic (ROC) 解析を施行した。本研究においては  $P < 0.05$  を有意差ありと評価した。

## 2.3. 自己抗体解析

### 2.3.1. 細胞株、肺癌組織及び抗体

2.2.1 に示した 5 種の肺癌細胞株、及び北里大学病院にて外科切除された肺癌組織 3 例（男性 1、女性 2、年齢平均  $66.3 \pm 4.03$ ）を用いた。これら全てのサンプルは使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存し、肺癌組織の一部は 10% ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを作製し、IHC 法に用いた。また使用した抗体と各実験における希釈率は表 3 に示した。

### 2.3.2. 2 次元電気泳動 (two-dimensional gel electrophoresis: 2-DE) 法のためのタンパク質抽出

A549、LC-2/ad および 3 例の肺癌組織それぞれ 20mg に対し lysis buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 10 mM tris (2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, 2.5% pharmalyte pH 3-10 for IEF (GE Healthcare Bio-Sciences), and complete mini EDTA-free protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH)] を 200  $\mu\text{L}$  加え、超音波破碎を行いタンパク質を抽出した。20,000 $\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分間の遠心後、1/20 量の 400 mM 4-vinylpyridine を加え室温 1 時間 mixing、同量の 400 mM dithiothreitol を加え、再度 20,000 $\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心を行い上清を回収した。2-D Clean-up kit (GE Healthcare Bio-Sciences) による処理をマニュアルに従い施行し、Bio-Rad Protein Assay solution (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) によりタンパク濃度を測定した。

### 2.3.3. 2DE-IB 法

本研究では Matsumoto ら [24] が報告している 2-DE 法と IB 法を組み合わせた 2DE-IB 法を施行した。1 次元目の等電点電気泳動には pharmalyte pH 3-10 for IEF (GE Healthcare Bio-Sciences) を使用してタンパク質 100  $\mu\text{g}$  を 300V,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 時間に



て分離し、2次元目には10% SDS-PAGE を施行した。同時に2枚のゲルを作製し、1枚は coomassie brilliant blue R-350 (CBB, PhastGel Blue R, GE Healthcare Bio-Sciences) を用いて染色を行いタンパク質を可視化した。他方は PVDF 膜にタンパク質を転写し、0.05% Casein/ TBS により室温 30 分間ブロッキングを行った。1次抗体として 100 倍希釈した血清を室温 1 時間、2次抗体として 1,000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体を室温 30 分間それぞれ反応させ、Stable DAB solution (Invitrogen) を室温 15 分間反応させることで、自己抗体の認識した抗原タンパク質 (自己抗原) を可視化した。

#### 2.3.4. 自己抗原の同定

自己抗体の反応を認めたタンパク質スポットは全てゲルから切り出し、2.2.8、2.2.9 と同一の手法を用いて抗原同定を行った。

#### 2.3.5. 各種肺癌細胞株、肺癌組織を用いた IB 法

各サンプル 10 µg を 10% SDS-PAGE を行いタンパク質を分離後、PVDF 膜に転写した。0.5% Casein/ TBS にて 30 分間ブロッキングを行い、抗 Annexin A2 (ANXA2) 抗体、抗 Transforming growth factor beta induced ig-h3(BIGH3) 抗体、抗 Macrophage capping protein (CAPG) 抗体、抗 Hyalronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) 抗体をそれぞれ表 3 に示す濃度に希釈し、室温 1 時間反応させた。2次抗体として共に 1,000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体もしくは、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (共に Dako) を室温 30 分間反応させ、Immobilin Western HRP reagent (Millipore corp.) により化学発光を検出した。

#### 2.3.6. AC 由来細胞株、肺癌組織を用いた IHC 法

2.2.11.と同様の方法で脱パラフィン、脱キシレン、内因性ペルオキシダーゼの失活処理と抗原の賦活化を行った。抗 ANXA2、BIGH3、CAPG の各抗体においては 0.5 % Casein にて、抗 HAPLN1 抗体は 2% normal swine serum /TBS をそれぞれ用いてブロッキング処理を行い、2DE-IB に用いた AC 組織を対象として、各抗体を室温 17 時間反応させた。ChemMate ENVISION reagent (Dako) を 2 次抗体として室温 30 分間それぞれ反応し、Stable DAB solution (Invitrogen Corp.) により反応産物の可視化を行った。

### 3. 結果

#### 3.1. 抗 CAXII モノクローナル抗体解析

##### 3.1.1. KU-Lu-5 モノクローナル抗体の作製

A549 細胞株のタンパク質抽出物を免疫源として、ランダム免疫法を用いてモノクローナル抗体を 188 クローン作製することに成功した。AMeX 固定 A549 細胞株を免疫したマウスの血液を 1 次抗体とした IHC 法により染色し、抗体価の確認を行った結果を図 1A に示す。腫瘍細胞の細胞膜、核、細胞質等に様々な染色が見られた。

##### 3.1.2. CAXII 抗原タンパク質の同定

KU-Lu-5 抗体を用いた IP 法の結果を図 1B に示す。IP 法の結果より、本抗体の認識する抗原は 40 kDa 付近にバンドが認められた。質量分析の結果 KU-Lu-5 抗体の抗原は 343 アミノ酸で構成され、38,384 Da の Isoform 2 of carbonic anhydrase XII (CAXII, accession: IPI00221392) であることが明らかとなった。また CAXII 精製タンパク質との反応が認められたことから、抗原タンパク質が CAXII であることが確かめられた (図 1C)。さらにモノクローナル抗体の Ig サブタイプ解析の結果、この抗体のサブタイプは IgG1,  $\kappa$  であることが明らかとなった。

##### 3.1.3. IB 法、IHC 法による発現と局在解析

CAXII の発現は AC 由来細胞株である A549 のみ、約 40 kDa に認められた (図 2A)。また IHC 法の結果、CAXII は A549 細胞株の細胞膜にのみ局在し (図 2Ba)、肺癌組織では AC 2/28 例 (7.1%)、SCC 2/9 例 (22.2%) において腫瘍細胞の細胞膜に局在を認めた (図 2Bb,c)。

#### 3.1.4. 肺癌患者血清中の CAXII 抗原量

Training set では、肺癌患者血清中の CAXII 抗原量は健常人に比して肺癌患者血清において有意な亢進を認めた ( $P < 0.0001$ , 図 3A)。特に肺癌患者血清では AC に比して SCC において有意に亢進しており ( $P = 0.03$ )、さらに SCC では高・中分化型に比して低分化型で発現の減少が(図 4A)、腫瘍径 3cm 以上で 3cm 未満に比して発現亢進の傾向 ( $P = 0.0538$ ) も明らかとなったが (data not shown)、喫煙の有無とは相関しなかった (図 4B)。診断有用性を評価するため ROC 解析を行ったところ、肺癌患者と健常者を感度 82.9%、特異度 70.0%、 $AUC = 0.793$  をもって鑑別可能であることが明らかとなった (図 3B)。各ステージ、分化度における CAXII の測定値の平均値は表 2 にまとめた。さらに有用性を検討するため Validation set においても測定を行ったところ、健常人に比して肺癌患者血清における有意な亢進が明らかとなった ( $P = 0.03$ , 図 5)。

### 3.2. 自己抗体解析

#### 3.2.1. 2DE-IB 法による自己抗原の検出

AC 組織と同一患者血清を用いて検出した自己抗体の反応パターンを図 6A-C、AC 由来細胞株と患者血清との反応パターンを図 6D-F に示す。質量分析の結果、AC 由来組織を用いた解析からは計 58 スポット 45 種、AC 由来組織を用いた解析からは 53 スポット 41 種の自己抗原をそれぞれ検出し、両者で共通して検出された自己抗原は 9 種のみであった。なお、詳細な内訳は図 7 及び表 4-6 にまとめた。

#### 3.2.2. ANXA2, BIGH3, CAPG と HAPLN1 の AC 組織内局在

4種の自己抗原に対し2DE-IB法に用いたAC組織を対象としたIHC法の結果、ANXA2の発現は腫瘍細胞の細胞質、細胞膜と間質の線維芽細胞に局在が認められ(図8A)、BIGH3の発現は主に間質の線維芽細胞等に局在が認められたが、腫瘍細胞における発現は認められなかった(図8B)。またCAPGの発現は主として線維芽細胞とマクロファージに局在しており、腫瘍細胞では細胞質に弱い染色が認められた(図8C)。HAPLN1は主に浸潤性リンパ球に局在が認められ、腫瘍細胞には細胞質と核に弱い発現が認められた(図8D)。

### 3.2.3. ANXA2, BIGH3, CAPG と HAPLN1 の発現解析

3.2.2に用いた4抗体に関して、AC組織における発現の特異性検討を行う目的でIB法による解析を施行した結果を図9に示す。肺癌細胞株5種を対象とした解析の結果、ANXA2とCAPGではNSCLC細胞株であるA549, LC-2/ad, RERF-LC-AIのみに発現を認めるが、SCLC, LCNEC由来細胞株における発現は認めなかった(図9A, B)。HAPLN1ではLC-2/adとRERF-LC-AIに弱い発現を認めたが、その他の細胞株における発現を認めず(図9C)、BIGH3では全ての細胞株において発現を認めなかった(図9D)。各自己抗原を検出したAC組織を用いた解析では全ての抗原の発現を確認できた(図9E-H)。

## 4. 考察

### 4.1. 抗 CAXII モノクローナル抗体

肺癌の新規血清診断マーカー獲得のため、従来法では獲得の困難な抗体作製が可能なランダム免疫法を駆使した抗体作製を行い、AC 由来細胞株に特異的に反応する抗 CAXII 抗体の獲得に成功した。CAXII が属する Carbonic anhydrase (CA) はヒトでは 16 の isoform が報告されており、生体内においては以下に示す二酸化炭素と重炭酸イオンの相互変換を触媒する酵素であり、細胞内の pH 調節を行っていることが報告されている [25-30]。



腫瘍における発現は Watson らの IHC 法を用いた解析 [31] では、75%の浸潤性乳管癌で認められ、High grade に比して Low grade において ( $P = 0.001$ )、ER- に比して ER+ において ( $P < 0.01$ )、EGFR- に比して EGFR+ において ( $P < 0.001$ ) それぞれ有意な発現亢進が報告されている。さらに単変量解析の結果、CAXII-positive の腫瘍は再発率が有意に低く ( $P = 0.04$ )、全生存期間の有意な延長も明らかになっている ( $P=0.01$ )。一方、同様の IHC 法を用いた星状細胞腫の解析 [32] によると、用いた星状細胞腫の 98%において CAXII の発現が確認されたが、組織学的 grade と CAXII の発現亢進とは相関しており ( $P = 0.01$ )、生存解析においても高発現群は低発現群に比して予後不良であることを証明している ( $P = 0.039$ )。

NSCLC における報告では Ilie らが 555 例の NSCLC 組織を対象とした IHC 法を用いた解析を報告している [32]。Ilie らによると CAXII は 105/555 例の NSCLC において発現が認められ、低分化型に比して高分化型において ( $P = 0.015$ )、AC に比して SCC において ( $P < 0.001$ )、それぞれ有意に発現の亢進が認められたと報告している。さらに CAXII の発現亢進群は全生存期間と無病生存期間におい

て予後良好であることも報告している。しかし、現在まで CAXII の組織内における発現と臨床病理学的因子との相関は検討されているが、患者血清中の抗原量測定はいかなる腫瘍においても報告されていない。本実験結果より、血清中の CAXII 抗原量は AC に比して SCC において有意に高く (図 3A)、特に SCC においては分化度と相関しており、NSCLC 組織を解析した Ilie らの報告を支持するものである。特に Training set と Validation set の両コホートにおいて健常者に比して癌患者血清中における抗原量の亢進が示唆されたことから、CAXII は肺癌の新規血清診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

さらに Mazzone ら [33, 34] によると、肺癌のスクリーニングは現在 CT スキャンと X 線撮影が主であると報告しているが、同時に低コストでかつ侵襲性の低い血液検査がこれからは重要であるとも述べている。よって本実験で得られた血中 CAXII 抗原量の腫瘍マーカーとしての有用性をさらに検証するため、今後はさらに多数例の血清を用いた検討を行う予定である。

#### 4.2. 同一 AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体解析

AC 患者血清と同一患者の癌組織、もしくは AC 由来細胞株を組み合わせた包括的自己抗体の獲得を行うことにより、合計 86 種の自己抗原が同定された。さらに同患者の血清と癌組織を用いなければ得ることの困難な、腫瘍細胞だけ得なく腫瘍間質にも発現・局在する BIGH3、HAPLN1 を検出した。

自己抗体獲得法は現在 5 種が知られており、serological screening with recombinant cDNA expression libraries (SEREX) 法、2D-immunochromatography 法、protein microarray 法、phage display 法と本実験で用いた 2DE-IB 法を含む serological proteome analysis (SERPA) 法である [13]。しかし本研究に用いた SERPA 法を除き、他の方法では PTM を受けた抗原タンパク質は検出できない欠点がある。Doyle らによると生体内のタンパク質の 50-90%はその機能発現にお

いて PTM を受けていると報告されており [35]、自己抗原の大半は PTM を受けていると考えられる。また 2-DE 法は現在でも、最もタンパク質の分離に優れた方法であると報告があることから [13]、本法を用いることにより、PTM を含めたタンパク質を対象とした網羅的な自己抗体の探索が可能である。

生体内における「癌」は腫瘍細胞だけではなくリンパ球、マクロファージを含む炎症性細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞等の「腫瘍間質」などの多種多様な細胞から構成されている [36]。また、腫瘍細胞周囲の微小環境を形成する腫瘍間質は腫瘍細胞の接着、増殖、進展に大きく関与しており、これらに由来する分子を探索することが新規バイオマーカーや抗癌剤の分子標的となり得ることも報告されている [37]。しかし現在までに本発想を基にした自己抗体の探索は行われていない。

本結果から得られた自己抗体のうち、特に BIGH3 は AC 組織の腫瘍間質にのみ局在が認められ、従来の腫瘍細胞株を用いた探索では獲得できない自己抗体である。さらに ANXA2 については AC 組織内、腫瘍間質の線維芽細胞に局在が認められた (図 8A, B)。獲得された各分子は、抗原タンパク質についての腫瘍マーカーとしての報告はされているものの、自己抗体としての有用性は示唆されていない [38-41]。

腫瘍細胞と線維芽細胞の共培養を行い、腫瘍細胞が細胞外へ浸潤する過程を調べた Gaggioil らの実験によると [42]、まず線維芽細胞が先行し、腫瘍細胞がその後を追って浸潤すると報告している。ANXA2 については Lockman らの報告 [40] によると、細胞表面の ANXA2 は組織プラスミノゲン活性化因子をプラスミンに転換させ、プラスミンは細胞外基質の degradation や MMP の活性化を引き起こし、最終的に腫瘍の浸潤・転移を引き起こす一連のメカニズムが明らかになっている。また Micke ら [43] が、腫瘍細胞は単独でなく腫瘍周囲の血管内皮細胞や線維芽細胞と相互作用を行い浸潤・転移を引き起こしていると報告



していることから、本実験を行うことで、自己抗体探索の従来法では得られない、腫瘍の浸潤・転移に関する自己抗体の獲得に成功したと考えられる。今後は多検体患者血清を用いた血清中自己抗体の解析を行うとともに、PTM 部位を考慮した新たな自己抗体の測定法を行い、現在までに報告されていない自己抗体のエピトープを明らかにしたいと考えている。

#### 4.3. 総合考察

本研究においては、肺癌の新規血清診断マーカー候補タンパク質を腫瘍特異的に反応する「モノクローナル抗体」と、癌患者血清中に存在する「自己抗体」の2種の抗体を活用し、両方向から探索とその有用性の検討を行った。

ランダム免疫法に関しては当研究室の Nagashio ら [20] や Akishima-Fukusawa ら [44] により、同方法で獲得した抗 RACK1 抗体、抗 PGP9.5 抗体がそれぞれ肺癌、大腸癌の各臨床病理学的因子と相関し、新規の組織診断マーカーとしての可能性が報告されている。しかしランダム免疫法を用いて獲得した抗体を用いた血清中の抗原量測定は行われていない。現在血清中の抗原量測定は ELISA 法によって行われているが、必要とする血清量が多いことから有用性を評価するためのスクリーニングには適さない。しかし本研究で用いた Dot blot 法は当研究室と企業の共同開発により完成した方法であり、血清 1  $\mu$ L から測定可能なことから、よりハイスループットかつ高感度に腫瘍マーカー候補タンパク質のスクリーニングが可能である。そこで Dot blot 法を用いて抗 CAXII 抗体の血清中抗原量を測定したところ、前述のように各臨床病理学的因子との相関が認められた [45: 主学術論文]。一方自己抗体に関しても ELISA 法によるハイスループットなスクリーニングは現状では厳しく、本研究で用いた方法が有用と思われる。

現在、モノクローナル抗体と患者血清中の自己抗体の両者を用いて、患者血清中の抗原と抗体の両方の存在量を研究している報告はない。近年、鎌田ら [46] が提唱しているように「抗体プロテオミクス技術」はバイオマーカー開発における基盤技術であり、スクリーニングのハイスループット化、創薬ターゲットの同定になくてはならない技術である。また本研究で用いたランダム免疫法、2DE-IB 法を基盤とする解析は、今まであまり焦点を当てた研究が行われていない「PTM」を網羅的に検出できる唯一の実験系である。よって今後はモノクローナル抗体、自己抗体さらに PTM にも焦点を当てた包括的な研究を行い、一つでも多くの腫瘍マーカー候補タンパク質の臨床応用を考えている。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、全ての実験過程において終始ご指導及び多くのご鞭撻を賜りました北里大学大学院医療系研究科応用腫瘍病理学特論の佐藤雄一先生、鉢村和男先生、長塩 亮先生に心から感謝申し上げます。

研究について厳しいご指摘や多くの議論の時間を賜りました北里大学名誉教授の前田忠計先生、医療衛生学部病理学の土屋紅緒先生、医学部病理学の松本俊英先生に深く感謝いたします。

研究のみならず、研究室の生活に至るまで、様々なご助言及びご協力をいただきました北里大学大学院医療系研究科応用腫瘍病理学特論、南 尚氏、柳田憲吾氏、及川将太氏、杉本 愛氏、上田惇平氏、萩生田大介氏と臨床検査学研究室の全卒業研究生に感謝いたします。

最後に、研究を続けることを全面的に協力、最後まで暖かく見守っていただきました両親に心より深く感謝いたします。

## 参考文献

- [1] Goya T, Asamura H, Yoshimura H, Kato H, Shimokata K, Tsuchiya R *et al.*  
Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: A Japanese lung cancer registry study. *Lung Cancer* 2005; 50: 227-234
- [2] Asamura H, Kameya T, Matsumoto Y, Noguchi M, Tada Y, Ishikawa Y *et al.*  
Neuroendocrine neoplasms of the lung: A prognostic spectrum. *J Clin Oncol* 2006; 24: 70-76
- [3] 中西豊文 他、自己抗体を標的としたプロテオーム手法による癌マーカー検索、*生物物理化学*、2008; 52: 35-38
- [4] Potts JM, Lutz M, Walker E, Modlin C, Klein E. Trends in PSA, Age and prostate cancer detection among black and white men from 1990-2006 at a tertiary cancer center. *Cancer* 2010; 116: 3910-3915
- [5] Gupta D, Lammersfeld CA, Vashi GV, Braun DP. Longitudinal monitoring of CA125 levels provides additional information about survival in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2010; 3: 22-29
- [6] Patel JL, Erickson JA, Roberts WL, Grenache DG. Performance characteristics of an automated assay for the quantitation of CYFRA21-1 in human serum. *Clin Biochem* 2010; 43: 1449-1452
- [7] 六車裕昭、矢野聖二、曾根三郎：肺癌の腫瘍マーカーの読み方。臨床と研究 82: 224-228, 2005
- [8] 樋田豊明：肺癌の腫瘍マーカー。日本臨床 2008; 66: 282-285
- [9] 西村俊秀：プロテオミクス・バイオマーカー。臨床プロテオミクス、中村和行（編集代表）、金原出版株式会社、東京、2012、p23-33
- [10] Honda K, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura M *et al.* Proteomic approached to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43: 103-109.

- [11] Hirohashi S, Watanabe M, Shimosato Y, Sekine T. Monoclonal antibody reactive with the sialyl-sugar residue of a high molecular weight glycoprotein in sera of cancer patients. *Gann* 1984; 75: 485–488.
- [12] Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, Sahin U, Luxemburger U, Türeci O *et al.* Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax* 2008; 63: 228-233.
- [13] Tan HT, Low J, Lim SG, Chung MC. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection, *FEBS J* 2009; 276: 6880-6904.
- [14] Hanash S. Harnessing immunity for cancer marker discovery. *Nature Biotechnol* 2003; 21: 37-39
- [15] Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA. Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer. *J Thor Oncol* 2006; 1: 513-519.
- [16] Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EK, Tan EM. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2003; 12: 136-143.
- [17] Storr SJ, Chakrabarti J, Barnes A, Murray A, Chapman CJ, Robertson JF. Use of autoantibodies in breast cancer screening and diagnosis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 1215-1223.
- [18] Jiang SX, Kameya T, Asamura H, Umezawa A, Sato Y, Shinada J *et al.* hASH1 expression is closely correlated with endocrine phenotype and differentiation extent in pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 2004; 17: 222–229.
- [19] Sato Y, Mukai K, Watanbe S, Goto M, Shimosato Y. The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J pathol* 1986; 125: 431–435.
- [20] Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S *et al.* Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2010; 69: 54–59.

- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- [22] Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K Yanagihara K, *et al.* Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2531–2539.
- [23] Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, Miura A, Honma R Satoh R, *et al.* Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro expressed proteome. *Nature Methods* 2008; 5: 1011–1017.
- [24] Matsumoto T, Ryuge S, Kobayashi M, Kageyama T, Hattori M, Goshima N *et al.* Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential sero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Int J Oncol* 2012; 40: 1957-1962.
- [25] Kivelä A, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivelä J, Parkkila AK *et al.* Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 577-584.
- [26] Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK *et al.* Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor and tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII i.n normal and neoplastic colorectal mucosa. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2616–2625.
- [27] Wykoff CC, Beasley N, Watson PH, Campo L, Chia SK, English R *et al.* Expression of the hypoxia-inducible and tumorassociated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 2001; 158: 1011-1019.
- [28] Haapasalo J, Hilvo M, Nordfors K, Haapasalo H, Parkkila S, Hyrskyluoto A *et al.* Identification of an alternatively spliced isoform of carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas. *Neuro Oncol* 2008; 10: 131-138.
- [29] Hynninen P, Vaskivuo L, Saarnio J, Haapasalo H, Kivelä J, Pastoreková S *et al.* Expression of transmembrane carbonic anhydrases IX and XII in ovarian tumours. *Histopathology* 2006; 49: 594–602.

- [30] Parkkila S, Parkkila AK, Saarnio J, Kivelä J, Karttunen TJ, Kaunisto K *et al.* Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1601–1608.
- [31] Watson PH, Chia SK, Wykoff CC, Han C, Leek RD, Sly WS *et al.* Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 1065–1070.
- [32] Ilie MI, Hofman V, Ortholan C, Ammadi RE, Bonnetaud C, Havet K *et al.* Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. *Int J Cancer* 2010; 128: 1614–1623.
- [33] Mazzone PJ, Mekkail T. Lung cancer screening. *Curr Oncol Rep* 2007; 9: 265–274.
- [34] Mazzone PJ. Lung cancer screening: an update, discussion, and look ahead. *Curr Oncol Rep* 2010; 12: 226–234.
- [35] Doyle HA, Mamula MJ. Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol* 2001; 22: 443-449.
- [36] Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N *et al.* Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction, *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 232-240.
- [37] Rho JH, Roehrl MH, Wang JY. Tissue proteomics reveals differential and compartment-specific expression of the homologs transgelin and transgelin-2 in lung adenocarcinoma and its stroma. *J Proteome Res* 2009; 8:5610-5618.
- [38] Ivanova AV, Goparaju CM. Protumorigenic role of HAPLN1 and its IgV domain in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2602-2611.
- [39] Li MX, Xiao ZQ, Chen YH, Peng F, Li C, Zhang PF *et al.* Proteomic analysis of the stroma-related proteins in nasopharyngeal carcinoma and normal nasopharyngeal epithelial tissues. *Med Oncol* 2010; 27: 134-144.

- [40] Lokmam NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The role of Annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenviron* 2011; 4:199-208.
- [41] Thapa N, Lee BH, Kim IS. TGFBIp/betaig-h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2183-2194.
- [42] Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPase in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1392-1400.
- [43] Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; Supple 2: S163-S175.
- [44] Akishima-Fukusawa Y, Ino Y, Nakanishi Y, Miura A, Moriya Y, Kondo T *et al.* Significance of PGP9.5 expression in cancer-associated fibroblasts for prognosis of colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 71–79.
- [45: 主学術論文] Kobayashi M, Matsumoto T, Ryuge S, Yanagita K, Nagashio R, Kawakami Y *et al.* CAXII is a sero-diagnostic marker for lung cancer. *PLoS ONE* 2012; 7: e33952.
- [46] 鎌田春彦 他：抗体プロテオミクス技術. 臨床プロテオミクス、中村和行 (編集代表)、金原出版株式会社、東京、2012、p153-160.



## 図表

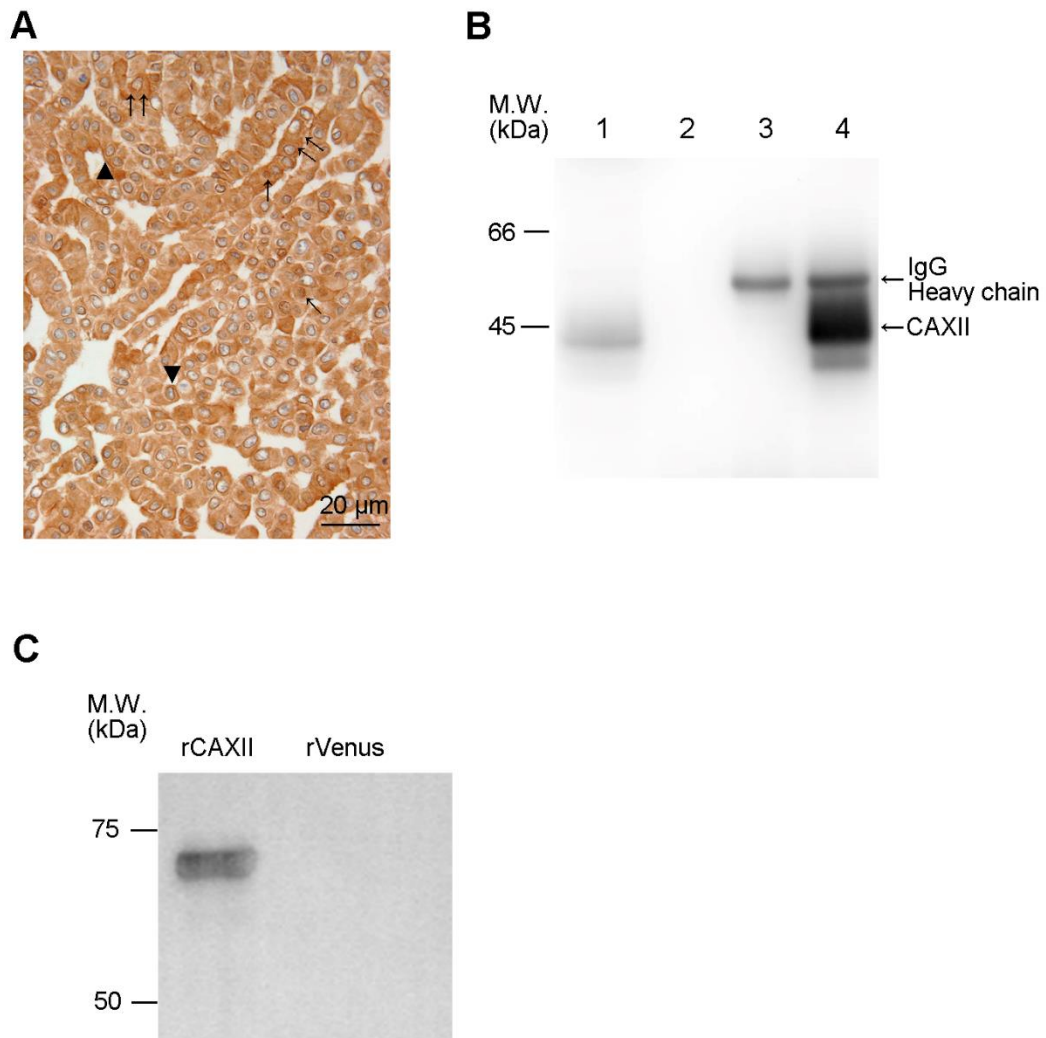
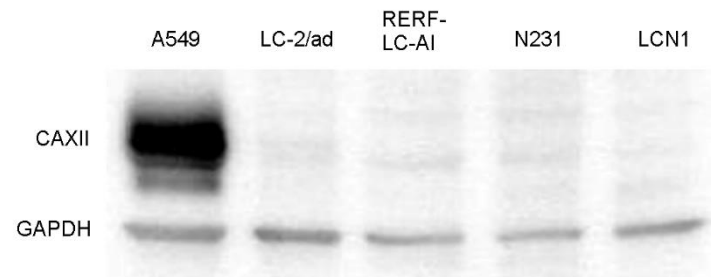


図 1. 抗 CAXII モノクローナル抗体の作製と抗原同定

(A) 100 倍希釈したマウス血清を 1 次抗体とした IHC 法による抗体価上昇の確認。(↑) 核、(▲) 細胞膜、(↑↑) 細胞質等、様々な部位に局在するタンパク質に対する抗体が確認できる。(B) IP 法による KU-LU-5 抗体の抗原同定。1: A549 細胞株、2: A549 細胞株と Protein G、3: KU-Lu-5 抗体と Protein G、4: A549 細胞株と KU-Lu-5 抗体。2, 3 の negative control に比して 4 の 45kDa に抗原を検出した。(C) KU-Lu-5 抗体の CAXII 精製タンパク質を用いた IB 法。

**A**



**B**

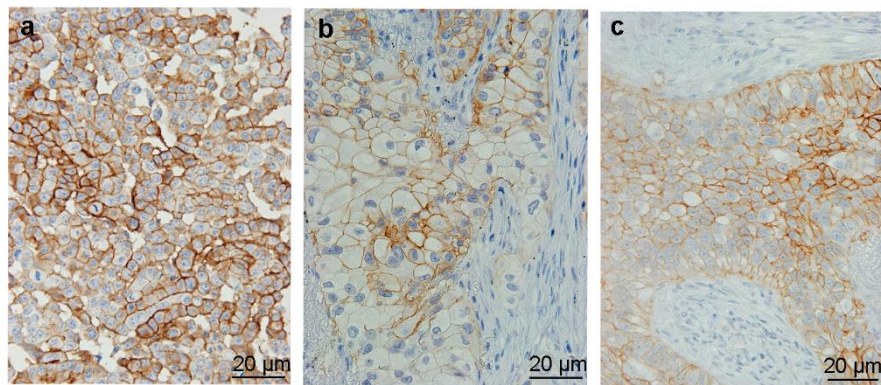


図 2. 肺癌細胞株、肺癌組織における抗 CAXII 抗体の発現と局在解析  
(A) 肺癌細胞株を用いた IB 法、(B) 肺癌細胞株・組織における CAXII 抗原の局在 (a) A549 細胞株、(b), (c) AC 組織

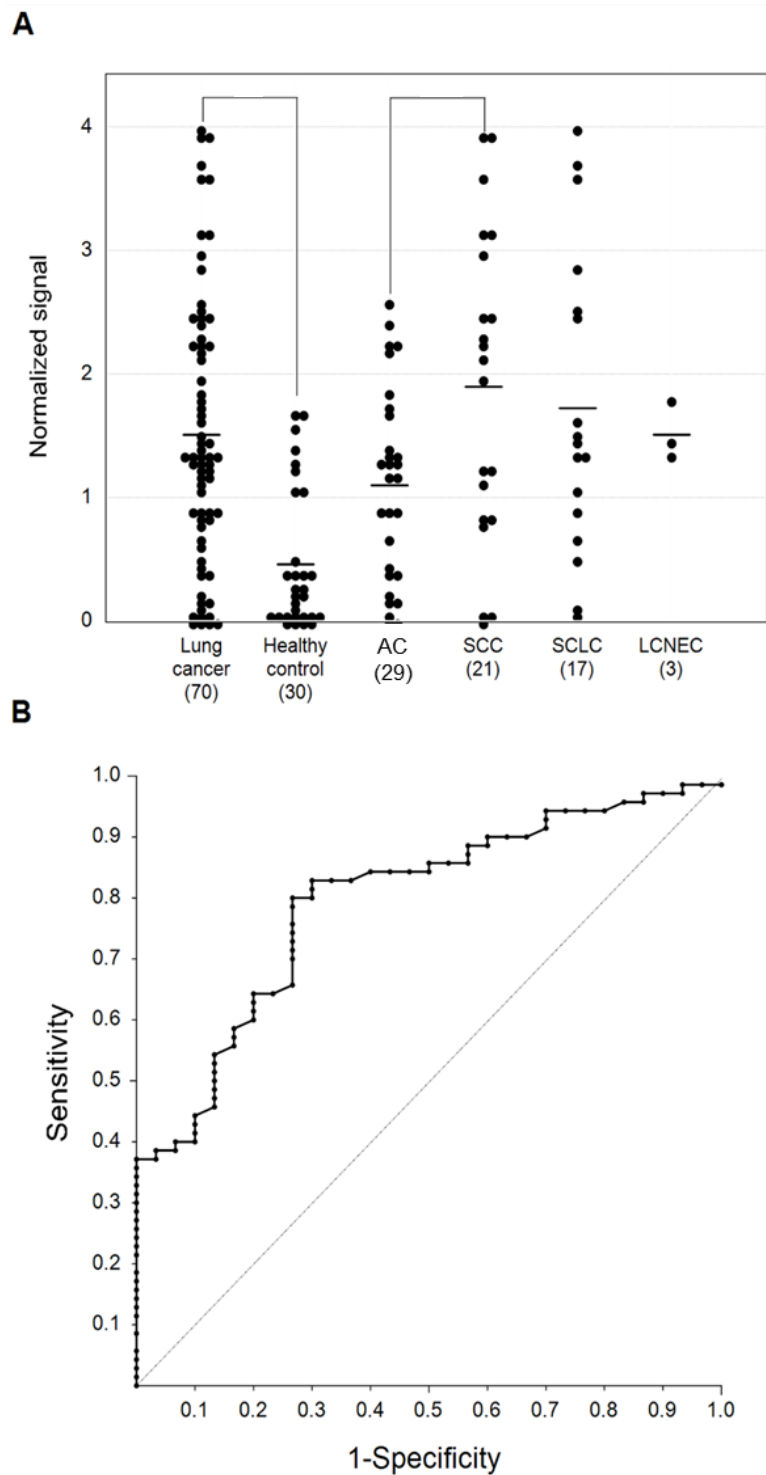


図 3. 肺癌患者血清と健常者血清における CAXII 抗原量 (Training set)

(A) 健常者に比して肺癌患者血清において ( $P < 0.001$ )、AC に比して SCC において ( $P = 0.0381$ ) それぞれ有意な亢進を認める。(B) 肺癌患者と健常者を対象にした ROC 解析。感度 82.9%、特異度 70.0%、AUC 0.794 をもって両者を鑑別可能である。

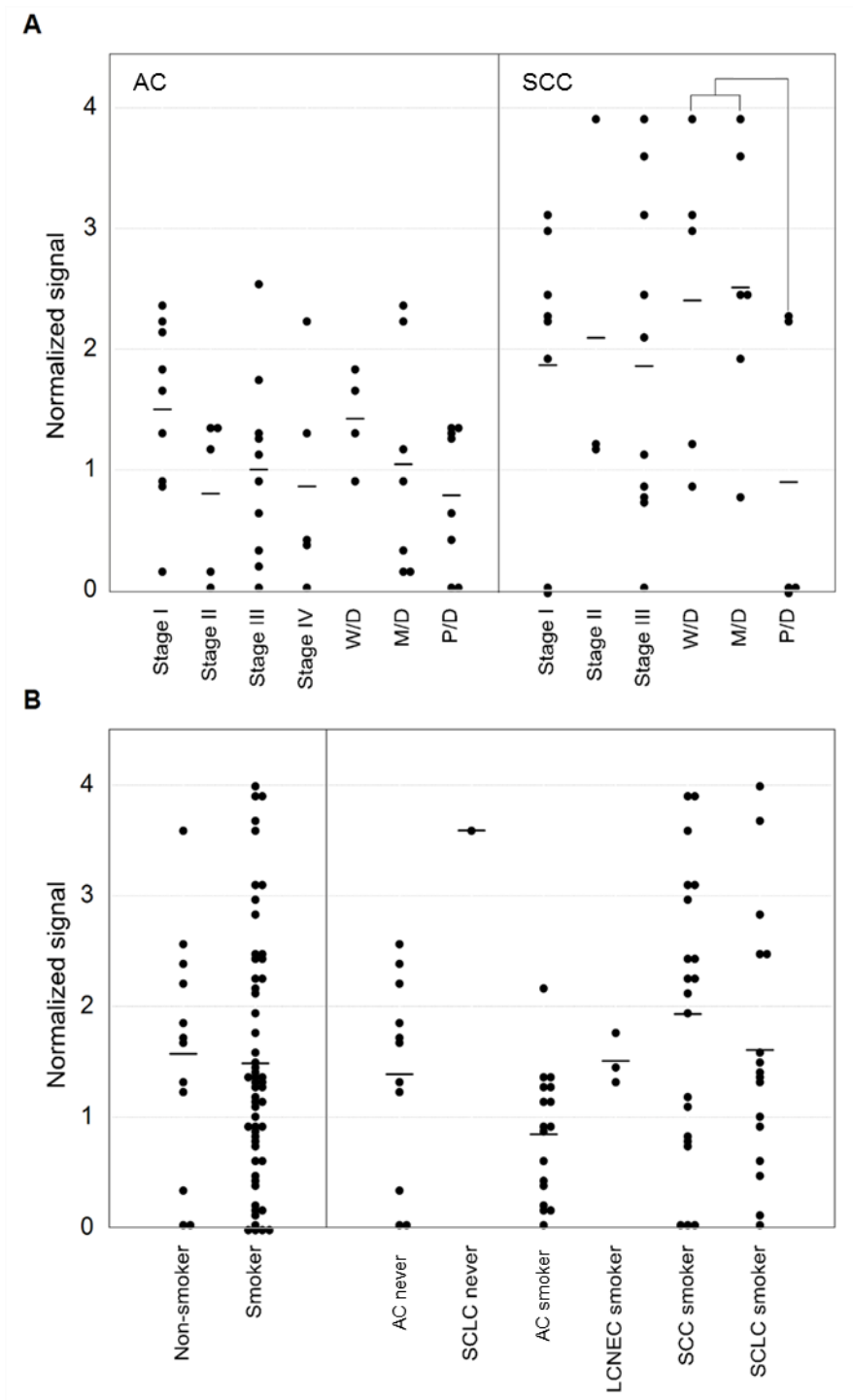


図 4. CAXII 抗原量と臨床病理学的因子との相関

(A) AC, SCC のステージ、分化度との相関。SCC の分化度と相関性が認められるが ( $P = 0.0272$ )、(B) 喫煙歴との相関は認められない。

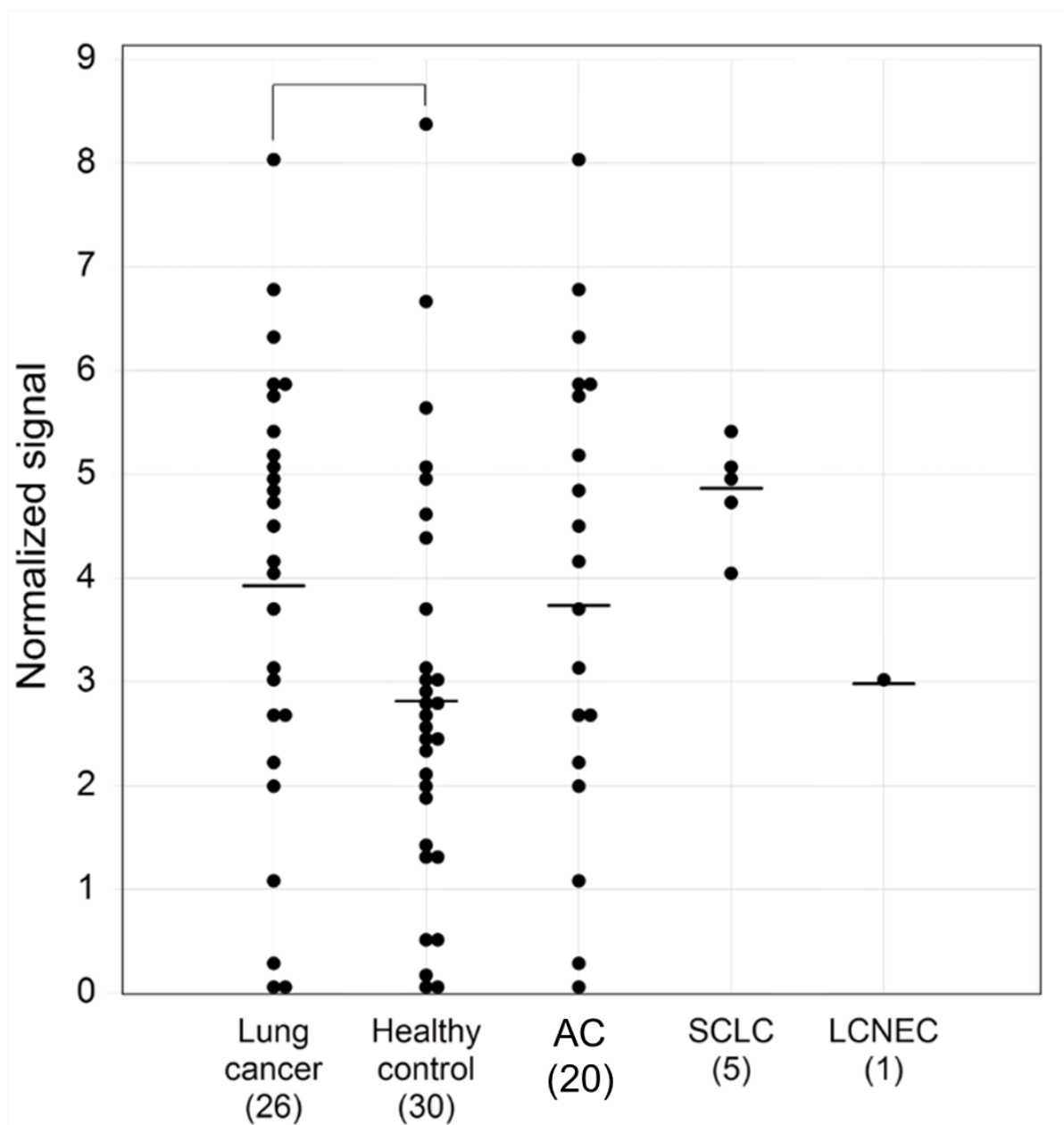


図 5. 肺癌患者血清と健常者血清における CAXII 抗原量 (Validation set)  
健常者に比して肺癌患者において有意な ( $P = 0.03$ ) 抗原量の亢進を認める。

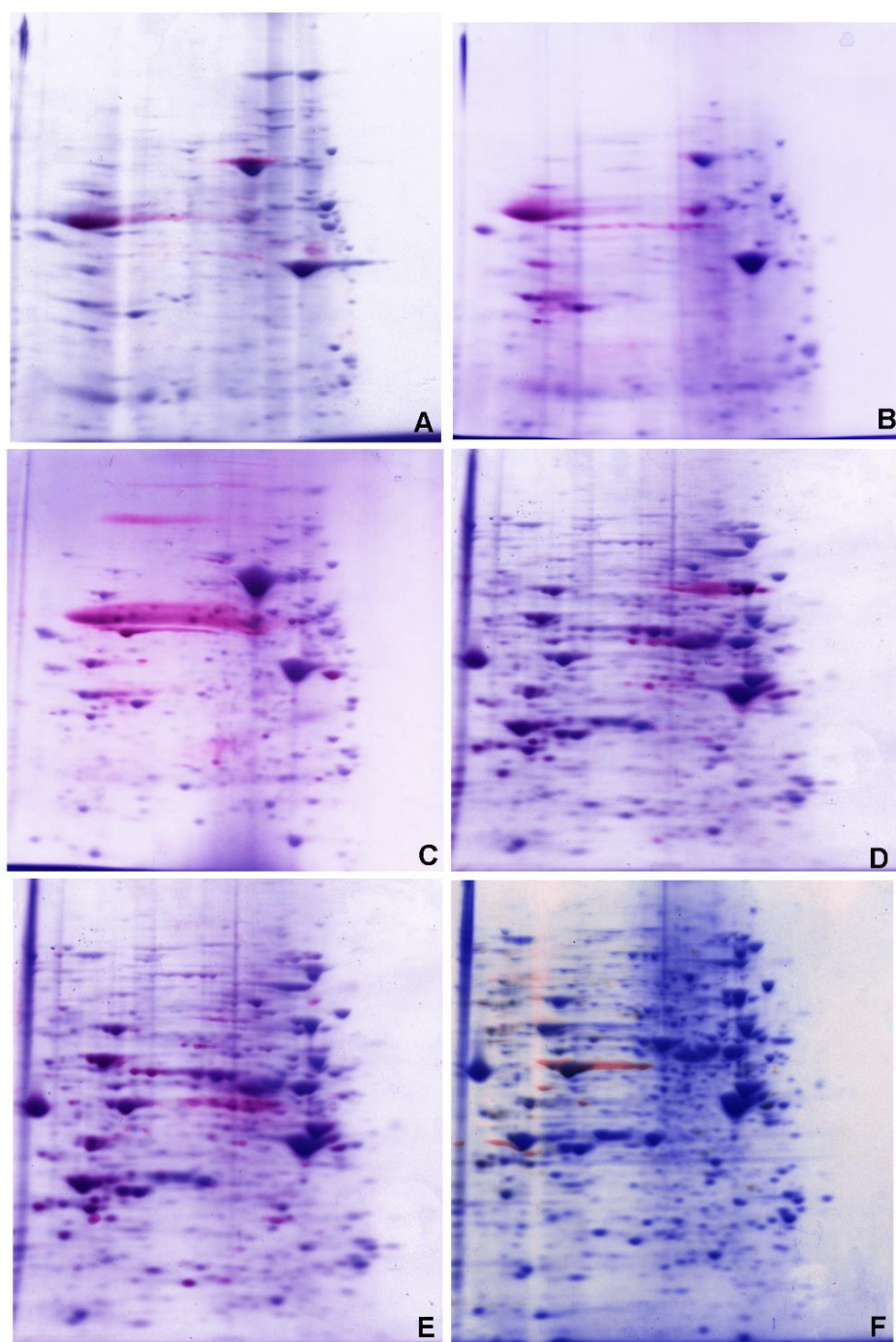


図 6. 2DE-IB 法による自己抗原の検出

(A-C) AC 組織、(D-F) AC 由来細胞株を対象とした検出。AC 組織と AC 細胞株よりタンパク質を抽出し、2-DE 法にて分離後 CBB 染色を行った。他方、患者血清を 1 次抗体とした IB 法を行い、DAB による可視化を行った後、両者のパターンを合成した。



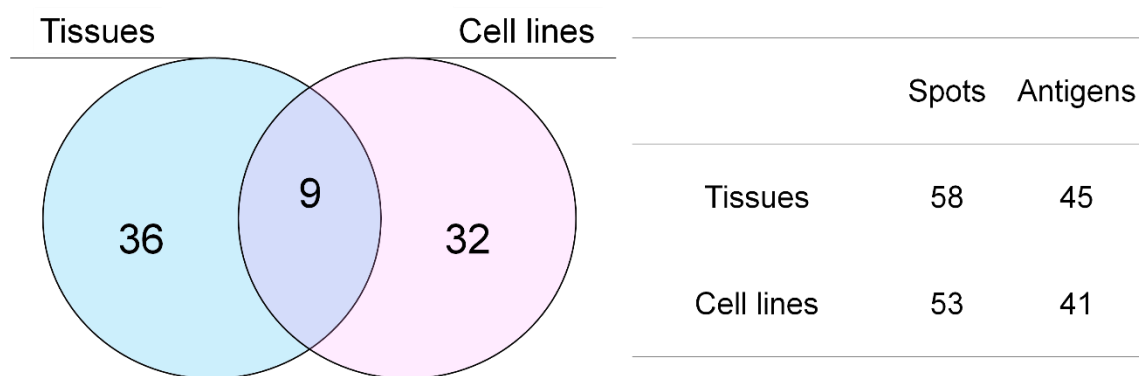


図 7. 抗原同定結果

AC 組織から 58 スポット 45 種、AC 由来細胞株から 53 スポット 41 種の自己抗原を同定した。内訳は AC 癌組織のみに 36 種、AC 由来細胞株のみに 32 種、共通は 9 種。

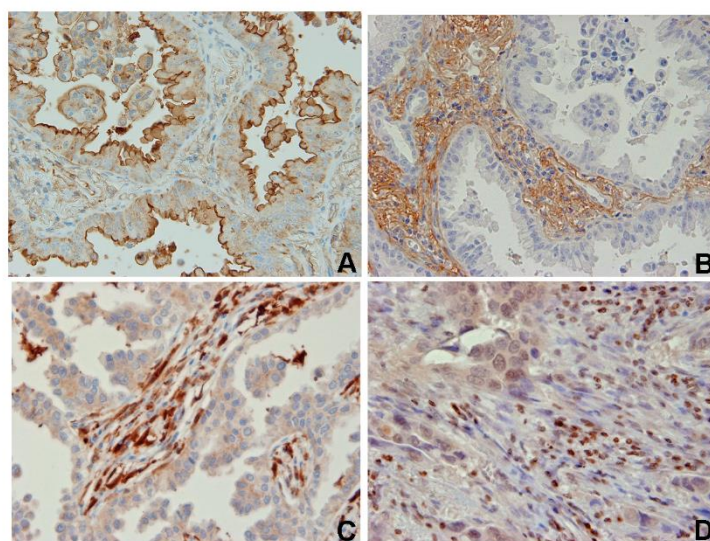


図 8. ANXA2、BIGH3、CAPG、HAPLN1 の AC 組織における局在。

(A) ANXA2、(B) BIGH3、(C) CAPG、(D) HAPLN1。腫瘍細胞および線維芽細胞、リンパ球を含む腫瘍間質に局在が認められる (400×)。

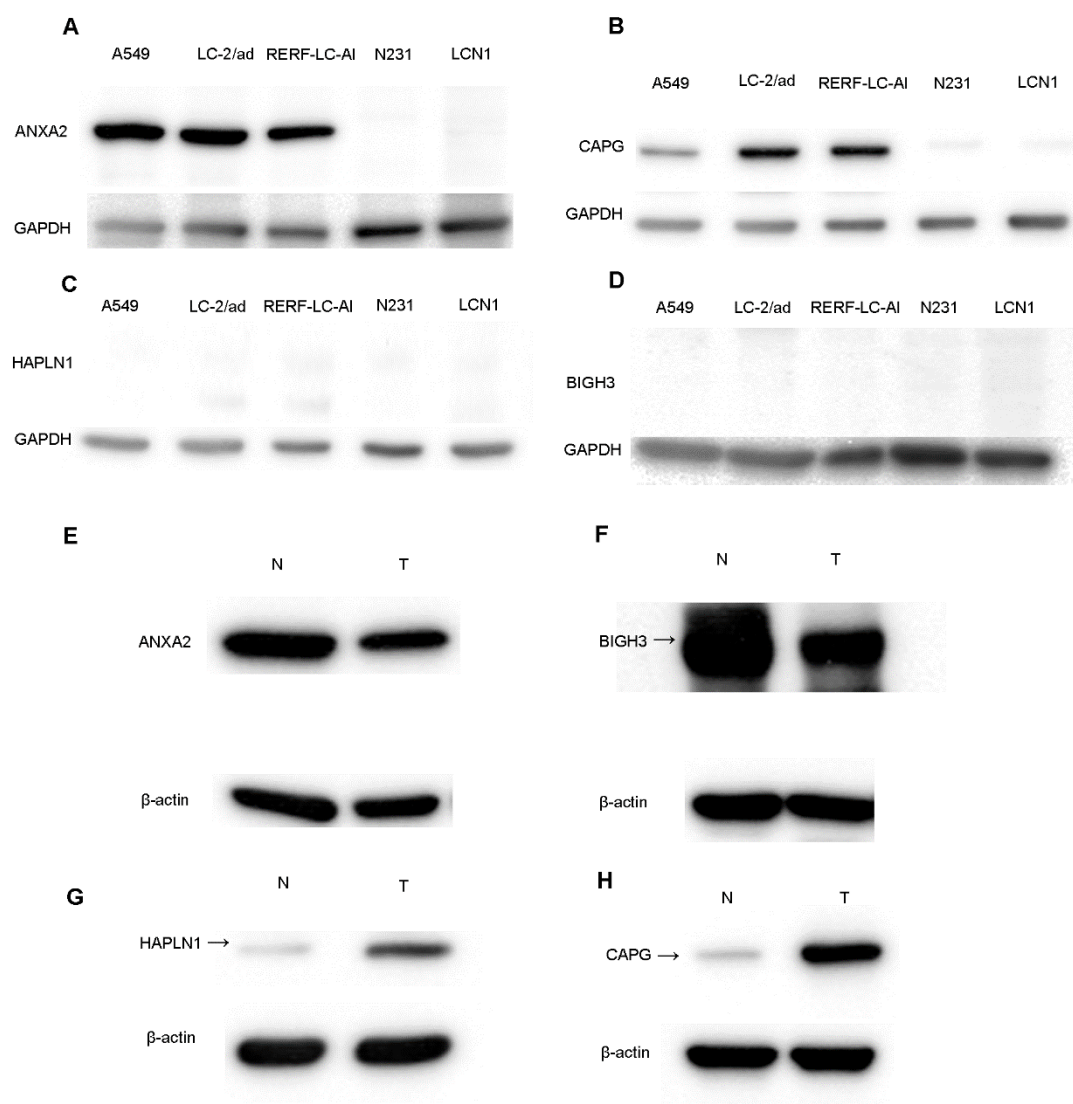


図 9. (A, E) ANXA2、(B, H) CAPG、(C, G) HAPLN1、(D, F) BIGH3 の AC 組織、AC 由来細胞株における発現解析。ANXA2、CAPG は約 36-38kDa、AC、SCC 由来細胞株にそれぞれ発現が認められたが、BIGH3、HAPLN1 は AC 組織のみに認められる。



表 1. 解析に使用した患者血清の臨床病理学的因子

Charactoristics		Discovery cohort (N=70)	Validation cohort (N=26)
Age	< 70	40 (57.1%)	19 (73.1%)
	≥70	30 (42.9%)	7 (26.9%)
Sex	Male	52 (74.3%)	16 (61.5%)
	female	18 (25.7%)	10 (38.5%)
Pathological stage	I	19 (27.2%)	17 (65.4%)
	II	11 (15.7%)	2 (7.7%)
	III	26 (37.1%)	4 (15.4%)
	IV	14 (20.0%)	3 (11.5%)
Tumor differentiation	Well	7 (10.0%)	11 (42.4%)
	Well~Moderate	3 (4.3%)	1 (3.8%)
	Moderate	7 (10.0%)	4 (15.5%)
	Moderate~Poor	5 (7.1%)	1 (3.8%)
	Poor	13 (18.6%)	3 (11.5%)
	ED	7 (10.0%)	3 (11.5%)
	LD	10 (14.3%)	2 (7.7%)
	Unknown	18 (25.7%)	1 (3.8%)
Tumor size	< 3cm	24 (34.3%)	15
	≥3cm	45 (64.3%)	6
	Unknown	1 (1.4%)	
Regional lymph nodes	N0	23 (32.9%)	18 (69.3%)
	N1	12 (17.1%)	1 (3.8%)
	N2	23 (32.9%)	5 (19.2%)
	N3	12 (17.1%)	2 (7.7%)
Distant metastasis	M0	56 (80.0%)	23 (88.5%)
	M1	14 (20.0%)	3 (11.5%)
Histological types	AC	29 (41.4%)	20 (77.0%)
	SCC	21 (30.0%)	0 (0.0%)
	SCLC	17 (24.3%)	5 (19.2%)
	LCNEC	3 (4.3%)	1 (3.8%)

表 2. 各ステージ、分化度における CAXII 抗原量の平均値

Charactoristics		Average value (AC)	Average value (SCC)
Stage	I	1.501	1.764
	II	0.704	2.093
	III	1.001	1.854
	IV	0.654	0.000
Tumor diffrenrtiation	Well	1.424	2.403
	Moderate	1.046	2.511
	Poor	0.727	0.742

表 3. 解析に用いた抗体と IB, IHC 法における希釈倍率

Alias	Antigen	Antibody order no.	Distributor	Dilution (IB)	Dilution (IHC)
ANXA2	Annexin A2	610069	BD Biosciences, Heidelberg, Germany	1:5,000	1:1,000
BIGH3	Transforming growth factor, beta induced, 68k	10188-1-AP	Proteintech Group Inc., Campbell Park, IL, USA	1:1,000	1:50
CAPG	Macrophage-capping protein	10194-1-AP	Proteintech Group Inc., Campbell Park, IL, USA	1:1,000	1:100
HAPLN1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	AP9791a	Abgent Inc., Flanders Court, CA, USA	1:300	1:50

表 4. AC 組織のみに検出された自己抗原

Gene Symbol	Protein Name	MW	IPI	Localization	Molecular Function
ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	46,559	00005040	Mitochondrion	Catalytic activity
ADH1A	Alcohol dehydrogenase 1A	39,832	00218896	Cytoplasm	Oxidoreductase activity
ADH1B	Alcohol dehydrogenase 1B	39,829	00473031	Mitochondrion	Catalytic activity
ADH1C	Alcohol dehydrogenase 1C	39,842	00465343	Cytoplasm	Catalytic activity
AK1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1	36,765	00909130	Cytoplasm	Catalytic activity
ALB	ALB Uncharacterized protein	71,658	00022434	Extracellular	Transporter activity
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,395	00465439	Cytoplasm	Lyase activity
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	39,431	00418262	Mitochondrion	Lyase activity
ANXA2	Annexin A2	38,580	00418169	Nucleus	Calcium ion binding
ANXA5	Annexin A5	35,914	00329801	Cytoplasm	Calcium ion binding
ANXA6	Annexin A6	75,229	00002459	Endoplasmic reticulum	Calcium ion binding
CAPG	Macrophage-capping protein	38,474	00027341	Cytoplasm	Cytoskeletal protein binding
DES	Desmin	53,503	00465084	Cytoplasm	Structural constituent of cytoskeleton
EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	46,841	00009328	Nucleus	Molecular function unknown
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,030	00219018	Cytoplasm	Catalytic activity
HAPLN1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	40,140	00023601	Extracellular	Extracellular matrix structural constituent
HSPA1L	cDNA FLJ56386, highly similar to Heat shock 70-kDa protein	77,513	00643152	Cytoplasm	Heat shock protein activity
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	72,288	00003362	Endoplasmic reticulum	Chaperone activity
HSPA8	Isoform 1 of Heat shock cognate 71-kDa protein	70,854	00003865	Cytoplasm, Nucleolus	Heat shock protein activity
KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	48,029	00554778	Cytoplasm	Structural constituent of cytoskeleton
KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	51,373	00306959	Cytoplasm Plasma membrane	Structural constituent of cytoskeleton
KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8	53,671	00554648	Cytoplasm	Structural molecule activity
LGALS4	Galectin-4	35,918	00009750	Cytoplasm	Cell adhesion molecule activity
MBNL1	Muscleblind-like protein 1	35,798	00946481	Nucleus	RNA binding
MDH2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35,481	00291006	Mitochondrion	Catalytic activity
MSN	Moesin	67,778	00219365	Cytoplasm	Structural constituent of cytoskeleton
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	72,887	00009904	Endoplasmic reticulum	Chaperone activity
PDIA6	Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6	53,867	00299571	Endoplasmic reticulum	Isomerase activity
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	44,586	00169383	Cytoplasm	Catalytic activity
ST13	Hsc70-interacting protein	41,305	00032826	Lysosome	Receptor signaling complex scaffold activity
TF	Serotransferrin	77,000	00022463	Extracellular	Transporter activity
BIGH3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	74,634	00018219	Extracellular	Receptor binding
TPM3	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain	29,015	00218319	Cytoplasm	Cytoskeletal protein binding
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	30,754	00216308	Mitochondrion	Voltage-gated ion channel activity
VIM	Vimentin	53,609	00418471	Intermediate filament	Structural constituent of cytoskeleton
YWHAG	14-3-3 protein gamma	28,285	00220642	Cytoplasm	Receptor signaling complex scaffold activity

表 5. AC 由来細胞株のみに検出された自己抗原

Gene Symbol	Protein Name	MW	IPI	Localization	Molecular Function
AHCY	Adenosylhomocysteinease	47,685	00012007	Cytoplasm	Hydrolase activity
ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56,525	00303476	Mitochondrion	Transporter activity
CDK8	Cell division protein kinase 8	53,250	00470693	Nucleus	Protein serine/threonine kinase activity
CS	Citrate synthase	51,680	00025306	Mitochondrial matrix	Acyltransferase activity
FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	37,763	00025039	Nucleus	Ribonucleoprotein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrase	36,030	00219018	Cytoplasm	Catalytic activity
GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	61,359	00016801	Mitochondrion	Catalytic activity
GNB2	Guanine nucleotide-binding protein G (I) / G (S) / G (T) subunit beta-2	37,307	00003348	Cytoplasm	GTPase activity
GPD	6-phosphogluconase dehydrogenase	53,106	00219525	Cytoplasm	Catalytic activity
GSTP1	Glutathione S-transferase P	23,341	00219757	Cytoplasm	Glutathione transferase activity
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	38,723	00215965	Nucleus	RNA binding
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	73,635	00007765	Mitochondrion	Chaperone activity
IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46,630	00027223	Cytoplasm	Catalytic activity
IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	39,566	00030702	Mitochondrion	Catalytic activity
LDHB	L-lactate dehydrogenase B	36,615	00219217	Cytoplasm	Catalytic activity
LMNB1	Lamin-B1	66,368	00217975	Nucleus	Structural molecule activity
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54,197	00304569	Nucleus	RNA binding
OLA1	Obg-like ATPase 1	44,715	00216106	Nucleus	Molecular function unknown
OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1	31,264	00000581	Unknown	Ubiquitin-specific protease activity
PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4	43,759	00299000	Nucleus	Transcription regulator activity
PAICS	Multifunctional protein ADE2	47,049	00217223	Nucleus	Ligase activity
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	28,750	00021700	Nucleus	DNA binding
PLS3	Plastin-3	70,766	00216694	Cytoplasm	Structural molecule activity
PRDX6	Peroxioredoxin-6	25,019	00220301	Lysosome	Peroxidase activity
PSMB2	Proteasome subunit beta type-2	22,822	00028006	Cytoplasm	Ubiquitin-specific protease activity
RBBP4	histone-binding protein RBBP4	47,626	00328319	Nucleus	Transcription regulator activity
RPSA	40S ribosomal protein SA	32,833	00411639	Cytoplasm	Cell adhesion molecule activity
RuvBL1	RuvB-like 1	50,196	00021187	Nucleus	DNA binding
SEPT7	Septin-7	50,648	00033025	Cytoskeleton	Protein binding
SFRS6	Splicing factor, arginine/ Serine-rich 6	39,563	00556297	Nucleus	RNA binding
STIP1	Stress-induced phosphoprotein 1	62,599	00013894	Nucleus	Receptor signaling complex scaffold activity
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	54,989	00031420	Unknown	Catalytic activity

表 6. 両者共通に検出された自己抗原

Gene Symbol	Protein Name	MW	IPI	Localization	Molecular Function
ENO1	Alpha-enolase	47,139	00465248	Cytoplasm	Catalytic activity
EZR	Ezrin	69,370	00843975	Cytoplasm	Cytoskeletal anchoring activity
GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	35,055	00964313	Cytoplasm	Receptor signaling complex scaffold activity
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37,407	00396378	Nucleus	Transcription factor binding
HSPA1A	Heat Shock 70 kDa protein A/B	70,009	00304925	Cytoplasm	Chaperone activity
KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19	44,065	00479145	Cytoplasm	Structural constituent of cytoskeleton
LDHA	L-lactate dehydrogenase A	36,665	00217966	Cytoplasm	Catalytic activity
LMNA	Lamin-A/C	74,095	00021405	Nucleus	Structural molecule activity
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	50,104	00180675	Cytoplasm	Structural constituent of cytoskeleton