

1982 (30), no single tumor marker applicable to the clinical diagnosis of pancreatic cancer has been identified. The carcinogenesis of pancreatic cancer is probably mediated via a variety of molecular pathways (2, 31), and multimarker analysis of proteins with different specificities is a realistic alternative to a conventional single biomarker assay.

There are pros and cons to SELDI-MS with high-resolution instruments. Although the primary goal of our study was the development of a bioassay applicable to the detection of pancreatic cancer, attempts to purify proteins from these four low-intensity peaks without contamination by neighboring high-intensity peaks have not been successful to date. However, the high reproducibility of QqTOF-MS warrants direct clinical application of its measurements and does not necessitate the actual protein identification of these peaks. Zhang et al. (12) reported that a set of three peaks, at 3,272, 12,828, and 28,043 m/z , could be used to detect early-stage ovarian cancer. The 28,043 m/z peak was down-regulated in ovarian cancer patients and was found to be derived from apolipoprotein A1. The relatively abundant 28,080 m/z protein identified as one of the peaks down-regulated in pancreatic cancer patients in this study (Table 3; Fig. 3) may be related to apolipoprotein A1. The mass deviation of 0.3% seen in the low-resolution TOF-MS may represent a drift in this region as large as 84 m/z ($28,080 \times 0.003 = 84$). At least four peaks were detected between 28,000 and 28,100 m/z using the high-resolution QqTOF-MS instrument (Fig. 3). These peaks merged and were detected as a single peak with the low-resolution instrument (data not shown). The intensities of the 8,766, 17,272, and 14,779 m/z peaks were one magnitude smaller than that of the 28,080 m/z peak (Table 3) and were apparently below the sensitivity of tandem MS. So-called top-down proteomics using Fourier transform (FT)-MS (32) may be necessary to identify the proteins indicated by the low-intensity peaks of our classifier. However, an interface to the SELDI arrays is currently not available for FT-MS.

No significant differences in the detection rates for our classifier were observed among different stages of pancreatic cancer (Table 4). Koomen et al. (33) did plasma protein profiling of pancreatic cancer patients using MALDI-MS and identified a set of eight peaks distinguishing pancreatic cancer patients from controls with a sensitivity of 88% and a specificity of 75%. Protein identification revealed these peaks to be derived mainly from host response proteins. Many low molecular weight proteins detected by SELDI-MS in serum or plasma samples have also been reported to be metabolic products, proteolytic fragments, or peptide hormones. These proteins may not always be attributable to direct secretion or production by cancer cells, instead being the results of host responses in the microenvironment of the tumor (7, 18, 34), such as stromal desmoplastic reactions, inflammation, and angiogenesis. Two of eight pancreatic cancer patients who were classified as having "cancer," but none of normal controls in the TMUH validation cohort, had diabetes (data not shown). This raises the possibility that diabetic conditions, which are often

associated with pancreatic cancer patients, also may influence the classifier.

All the pancreatic cancers were detected by complementary use of CA19-9 and/or the SELDI classifier (Table 5). CA19-9 is a tumor marker widely used for the evaluation of therapeutic effects and the detection of pancreatic cancer recurrence but is not considered to be applicable to mass screening (35–38). Ten percent to 15% of humans do not secrete CA19-9 because of their genetic Lewis antigen status (39). The CA19-9 level is often within reference range when pancreatic cancer is still at an early stage and is often elevated in benign biliary and pancreatic diseases. When the cutoff value for CA19-9 was set at 37 units/mL, which is widely used for clinical purposes, the false-positive rate of the combined CA19-9 and SELDI strategy reached 15.4% (Table 5). To increase diagnostic accuracy, the CA19-9 cutoff value may need to be adjusted and the selection of SELDI peaks may need to be further refined.

Early detection seems to be essential for improving the outcomes of pancreatic cancer patients. The SELDI classifier identified in this study has high potential for detecting pancreatic cancers (Tables 4 and 5), but one of the five pancreatitis patients in the TMUH validation cohort was classified into the pancreatic cancer category (Fig. 6). This pancreatitis patient may have a premalignant or preclinical condition and is currently being followed. Alternatively, because inflammatory conditions were not used in training, it is also possible that the classifier may not be entirely specific for the cancer phenotype. Machine learning was done with the training cohort, in which there were no cases with benign pancreatic diseases, because the discovery of biomarkers useful for pancreatic cancer screening in a large population made up mostly of healthy individuals was a primary goal of this study. The final diagnosis of pancreatic cancer is not made solely based on plasma protein profiling. CT, MRI, PET, ultrasound, and endoscopic and/or surgical approaches are employed as well. To evaluate the clinical significance of the biomarkers identified in this study and to refine the selection of biomarkers using a large number of subjects, including patients with pancreatic cancer and other pancreatic diseases, we need to undertake a prospective multi-institutional study.

Acknowledgments

Received 5/27/2005; revised 8/5/2005; accepted 9/9/2005.

Grant support: "Third Term Comprehensive Control Research for Cancer" from the Ministry of Health, Labor and Welfare; "Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences" of the National Institute of Biomedical Innovation of Japan; and Foundation for the Promotion of Cancer Research resident fellowship to Y. Hayashida (patent pending in Japan, no. 2005-070512).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Drs. T. Kakizoe, N. Moriyama, and T. Yoshida (National Cancer Center) for helpful discussions and encouragement, Y. Ishiyama for her secretarial assistance, and Dr. K. Aoshima, H. Kuwabara, T. Isobe, and H. Matsuzuki (Mitsui Knowledge Industry) for the statistical analyses.

References

1. Yamamoto M, Ohashi O, Saitoh Y. Japan Pancreatic Cancer Registry: current status. *Pancreas* 1998;16:238–42.
2. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004;34:238–44.
3. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8–31.
4. Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, et al. Dysadherin overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma reflects tumor aggressiveness: relationship to e-cadherin expression. *J Clin Oncol* 2003;21:659–67.
5. Berrington de Gonzalez A, Darby S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet* 2004;363:345–51.
6. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:845–67.
7. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein

- profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:587-92.
8. Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002;30:82-7.
 9. von Eggeling F, Junker K, Fiedle W, et al. Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis* 2001;22:2898-902.
 10. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.
 11. Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002;62:3609-14.
 12. Zhang Z, Bast RC, Jr., Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64:5882-90.
 13. Banez LL, Prasanna P, Sun L, et al. Diagnostic potential of serum proteomic patterns in prostate cancer. *J Urol* 2003;170:442-6.
 14. Baggerly KA, Morris JS, Coombes KR. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics* 2004;20:777-85.
 15. Coombes KR, Morris JS, Hu J, Edmonson SR, Baggerly KA. Serum proteomics profiling—a young technology begins to mature. *Nat Biotechnol* 2005;23:291-2.
 16. Ransohoff DF. Lessons from controversy: ovarian cancer screening and serum proteomics. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:315-9.
 17. Conrads TP, Fusaro VA, Ross S, et al. High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:163-78.
 18. Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:24-30.
 19. Koopmann J, Zhang Z, White N, et al. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004;10:860-8.
 20. Japanese Pancreas Society. General rule for the study of pancreatic cancer. Tokyo: Kanehara Shuppan; 2002.
 21. Hara T, Honda K, Ono M, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Identification of two serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Urol* 2005;174:1213-7.
 22. Hayashida Y, Honda K, Osaka Y, et al. Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling. *Clin Cancer Res*. In press.
 23. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 1978;8:283-98.
 24. Byvatov E, Schneider G. Support vector machine applications in bioinformatics. *Appl Bioinformatics* 2003;2:67-77.
 25. Kadota K, Nishimura S, Bono H, et al. Detection of genes with tissue-specific expression patterns using Akaike's information criterion procedure. *Physiol Genomics* 2003;12:251-9.
 26. Tolson J, Bogumil R, Brunst E, et al. Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid α in renal cancer patients. *Lab Invest* 2004;84:845-56.
 27. Howard BA, Wang MZ, Campa MJ, Corro C, Fitzgerald MC, Patz EF, Jr. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. *Proteomics* 2003;3:1720-4.
 28. Weinstein PS, Skinner M, Sipe JD, Lokich JJ, Zamcheck N, Cohen AS. Acute-phase proteins or tumour markers: the role of SAA, SAP, CRP and CEA as indicators of metastasis in a broad spectrum of neoplastic diseases. *Scand J Immunol* 1984;19:193-8.
 29. Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF, Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101:379-84.
 30. Herlyn M, Sears HF, Steplewski Z, Koprowski H. Monoclonal antibody detection of a circulating tumor-associated antigen. I. Presence of antigen in sera of patients with colorectal, gastric, and pancreatic carcinoma. *J Clin Immunol* 1982;2:135-40.
 31. Gansauge S, Gansauge F, Beger HG. Molecular oncology in pancreatic cancer. *J Mol Med* 1996;74:313-20.
 32. Gershon D. Proteomics technologies: probing the proteome. *Nature* 2003;424:581-7.
 33. Koomen JM, Shih LN, Coombes KR, et al. Plasma protein profiling for diagnosis of pancreatic cancer reveals the presence of host response proteins. *Clin Cancer Res* 2005;11:1110-8.
 34. Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003;425:905.
 35. Goggins M, Canto M, Hruban R. Can we screen high-risk individuals to detect early pancreatic carcinoma? *J Surg Oncol* 2000;74:243-8.
 36. Abrams RA, Grochow LB, Chakravarthy A, et al. Intensified adjuvant therapy for pancreatic and periampullary adenocarcinoma: survival results and observations regarding patterns of failure, radiotherapy dose and CA19-9 levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:1039-46.
 37. Ritts RE, Pitt HA. CA 19-9 in pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7:93-101.
 38. Safi F, Schlosser W, Kolb G, Beger HG. Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms. *J Gastrointest Surg* 1997;1:106-12.
 39. Narimatsu H, Iwasaki H, Nakayama F, et al. Lewis and secretor gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1998;58:512-8.

分子呼吸器病

別刷

腫瘍マーカーと包括的プロテオーム解析

：ペプチドの包括的プロファイリングによる非侵襲的腫瘍マーカー開発法

本田一文* 山田哲司*

はじめに

難治がんの治癒率向上の戦略の一つに、できるだけ早期のがんを効率よく発見し、治療をおこなうということがあげられる。そのためには、非侵襲的に採取できる検体から簡便な方法を使ってがん患者を高精度に選別できるスクリーニング法の開発が急務である。最近、血液成分に含まれる低分子量領域のペプチドを質量分析装置で網羅的にプロファイルし、疾患を高精度に診断するプロテオミクスプラットフォームが注目を集めている。とくに surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS 法) と機械学習法によって卵巣がんの診断マーカー候補を抽出した論文は注目を集め、米国などでは臨床現場への実用化をめざした大規模マーカー探索プロジェクトが進行中である¹⁾。国立がんセンター研究所 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクトでも、多種類担がん患者血漿・血清に含まれるペプチドプロファイルを SELDI-TOF-MS 法で取得し、病態診断マーカーや治療応答性予測マーカー開発を手がけている^{2)~4)}。

本稿では、当研究所でおこなわれている質量分析装置を用いた、網羅的ペプチド腫瘍マーカー開発法を紹介する。

1 SELDI-TOF-MS 法はどのような原理で、何がわかるのか?

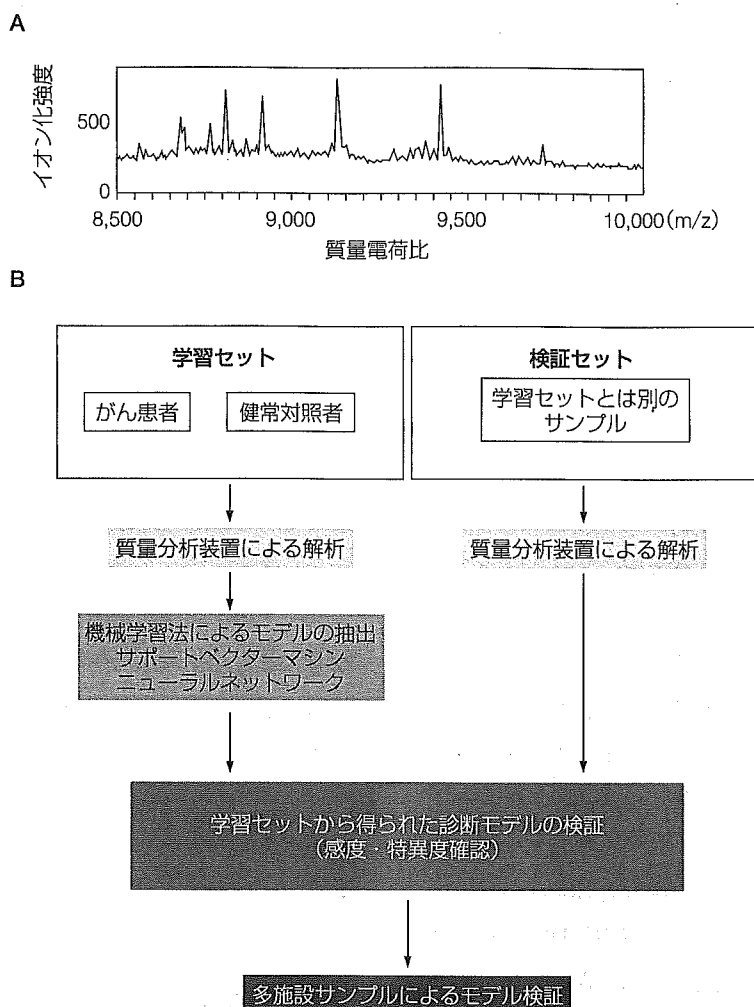
SELDI-TOF-MS 法とは、金属表面に官能基が修飾されているプロテインチップ[®] (サイファージェン社製)

と質量分析装置を組み合わせた分析法のことをいう。プロテインチップ[®] の表面には、蛋白質の性質に従い親和性を有する官能基が修飾されているため、この上に検体をごく微量添加し、官能基の性質に応じて蛋白質を精製することができる。精製された蛋白質は、直接質量分析装置で解析される。解析結果は、横軸が蛋白質の質量電荷比、縦軸がそのイオン化強度の 2 次元データとして示される (図 1 A)。このグラフに表されたピーク 1 本 1 本が、ペプチドの質量電荷比とイオン化強度になる。性質の違う官能基をもったプロテインチップ[®] を用いることにより、より多くのペプチドデータを網羅的に取得することができる⁵⁾。

2 病態診断マーカーをどのように抽出するのか?

質量分析装置から取得されるペプチドプロファイルはすべてデジタルデータである。これをすべて検体ごとに整理統合し、ペプチドプロファイルデータベースを作成する。担がん状態にある患者は、健康人に比べて血液内に含まれる蛋白質の構成が変化していることが考えられる。そこで、このデータベースのなかから網羅的にペプチドの質量情報を調べ、がん患者と健康人群間の差を抽出する。ここでは、機械学習法とよばれる人工知能などの分野で注目を集めているアルゴリズムを用いて、膨大な情報のなかからがん患者と健康人に特徴的なパターンをコンピュータに学習させる。学習セットには疾患以外には背景が異なるないように、性差などを厳密に調整したものを用意する。一つのペプチド情報からがん患者

* HONDA Kazufumi, YAMADA Tesshi / 国立がんセンター研究所 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト



図① SELDI-TOF-MS 法によって取得されたピークスペクトル (A) と診断マーカー抽出と検証の流れ (B)
(著者作成)

と健康人が精度よく判別できるマーカーを抽出できれば最もよいが、たとえこのようなものが見つからなかったとしても、複数のペプチド情報を組み合わせて診断することができるマーカーを抽出する。ここで定義された判定基準に従い、学習セットとは別に用意した症例を用いて、その有効性を検証する。検証には、できるだけ多くの施設から同一条件で集められた検体を用いて検証をくり返し、信頼性の高い診断モデルを構築していく(図①B)。

3 再現性を高めるための工夫とは?

血液中に含まれる微量なペプチドは他に豊富にあるペプチドに隠されて検出されないことが多い。このことを

担保するために血液サンプルから豊富な蛋白質を取り除き、液体クロマトグラフィーなどの方法を用いて微量蛋白質を濃縮し検討することが試みられている。この方法は、多検体を処理する場合には処理スピードが遅くなり、さらに再現性の低下などが起こりえる。われわれは再現性の高い実験をおこなうために、実験の前処理はできるだけ簡素化し、そのかわり高い分解能を有する質量分析装置を用いることにより、微量蛋白質の測定を補償するように心がけている。また、正確な質量情報を取得するため、4重極を搭載した直行型質量分析装置を用いて計測をおこなっている²⁾。

4 質量分析装置を用いた臨床検査への応用

診断モデルに寄与するペプチドを高度に精製してアミノ酸配列を決定することは可能である。しかしながら、そのピークが単一のペプチドで構成されているかどうかは注意する必要がある。分解能の低い質量分析装置でみたときは1本にみえたピークも、高分解能をもつ質量分析装置でみると、数本のピークで構成されていることがしばしばみられるからである。このような場合、標的ピークを分離同定することは困難なことが多い。最近、ペプチドマーカー候補の多くは、病態によって活性化された消化酵素などにより蛋白質が断片化され、その結果を質量分析装置が質量の変化としてとらえているのではないかということが指摘されはじめた⁶⁾。そうであるならば、酵素抗体法などにより蛋白質の発現量そのものの定量をおこなったとしてもその絶対量には変化がみられず、むしろ正確な質量情報を加味しなければ検査として成り立たない可能性がある。今後は、質量分析装置を用いた臨床検査技術の開発を真剣に考慮する必要があると思われる。

おわりに

われわれは、質量分析装置を用いた網羅的ペプチドプロファイル法を用いて膵がんの血漿診断マーカーの開発に成功してきた。現在まで膵がんの血漿サンプルは健常対照者や良性膵臓疾患を含めて計245名分の解析が終了しており、4つのペプチドの変化から90%以上の正確さで、膵がんを診断できるモデルを構築している²⁾。また、食道がんの術前化学放射線療法に対する治療奏効性予測血清マーカーの開発もおこなった。27例の施術前患者血清を学習セットとして予測モデルを構築し、さらに別の

検証セットを用いて15例中14例の奏効性予測に成功している⁴⁾。今後はさらなる基盤整備をおこない、これらマーカーの実用化に向けた大規模多施設共同試験に移りたいと考えている。

文 献

- 1) Petricoin EF *et al* : Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **359** : 572-577, 2002
- 2) Honda K *et al* : Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* **65** : 10613-10622, 2005
- 3) Hara T *et al* : Identification of 2 serum biomarker of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Urol* **174** : 1213-1217, 2005
- 4) Hayashida Y *et al* : Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling. *Clin Cancer Res* **11** : 8042-8047, 2005
- 5) Issaq HJ *et al* : The SELDI-TOF MS approach to proteomics : protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* **292** : 587-592, 2002
- 6) Petricoin EF *et al* : SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* **15** : 24-30, 2004

本田一文 : HONDA Kazufumi

国立がんセンター研究所 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト 室長

1965年 千葉県松戸市出身
専門分野 : 腫瘍病理学, 疾患プロテオミクス, 口腔外科学

研究テーマ : がん浸潤・転移の分子機構の解明, プロテオーム技術による新規腫瘍マーカーの開発



BIO

バイオ
テクノロジー
ジャーナル

ブレイクスルーを生む、注目の新技術と実験メソッド

隔月刊

別刷

株式会社 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1神田三和ビル

TEL 03-5282-1211 FAX 03-5282-1212

E-mail : btjournal@yodosha.co.jp

HP : <http://www.yodosha.co.jp/btjournal/>

【バイオマーカー探索①】

血液試料の最適な調製法 と解析

下重美紀, 本田一文, 山田哲司

血清・血漿タンパク質には少なくとも 10^3 以上の発現量格差があるといわれており、アルブミン、イムノグロブリンなどの含有量の多いタンパク質の分離除去やゲル濾過、イオン交換などにより分子量、等電点の違いによる分画、レクチンによる糖タンパク質の精製操作が必要である。金属チップ表面を修飾したプロテインチップ (ProteinChip) は特定の血清・血漿タンパク質を定量的に捕捉・濃縮するのに威力を発揮する。

はじめに

近年の質量分析技術の進歩により、疾患の発症ならびに進行に伴う体液や組織、細胞でのタンパク質やペプチドの発現レベルの変動を高感度かつ網羅的に解析できるようになり、疾患の診断に応用する試みがなされている。われわれは肺癌などの難治性癌患者と健常対照者の血清、血漿のプロテオーム解析を行い、新しい診断マーカーを探索している。本稿では大規模な血液プロテオーム解析において必要な血液検体の要件、血液検体の調製法、質量分析方法、得られたデータの処理などについて、その意義とともに紹介する。

1. 試料調製のストラテジー

i) 試料調製

研究を始める前に、①十分な検体量や統計学的な解析が可能な症例数があり、②対照となる健常者や良性疾患患者の検体が入手可能であり、③施設の倫理審査を受け、④提供者の同意を得る方法に倫理的な問題がないこと、⑤個人情報厳密に管理されていることを充分確認することは言うまでもない。検体の処理開始までの取り扱い、可能なかぎり一定化することにより変動因子を極力取り除く必要がある。特に採血方法 (採血管のメーカー・種類)、保存条件 (温

度・期間)、凍結融解の回数などは比較する検体群間で一致していることが必須である。さらには採血前の治療の有無、比較する検体群間での年齢や性別の分布などもよく検討しておかなければ、研究そのものが無駄になってしまう可能性がある。

血清、血漿には数千種類以上のタンパク質が含まれていると考えられており、Tirumalaiらの報告によると血漿はその成分の約90%をアルブミンをはじめとする10種類の構成タンパク質で占め、さらに全体の99%までを22種類のタンパク質で構成されている¹⁾。バイオマーカー候補となりうるタンパク質群は残りのわずか1%に含まれていると考えられている。さらに、タンパク質には少なくとも 10^3 以上の発現量格差があるといわれており、試料からのアルブミン、イムノグロブリンなどの含有量の多いタンパク質の分離除去が重要である。検体の50%以上を占めるアルブミンは固定化 cibacron blue (シバクロンブルー) によってそのリガンドに静電的および、もしくは疎水的に結合させることにより除くことができる (図1, SDS-PAGE lane2)。より特異的に構成タンパク質の除去を行うには、これらを特異的に認識する抗体アフィニティーなどが有効である。最近では同時に6種類 (図1, SDS-PAGE lane3) あるいは12種類の高発現タン

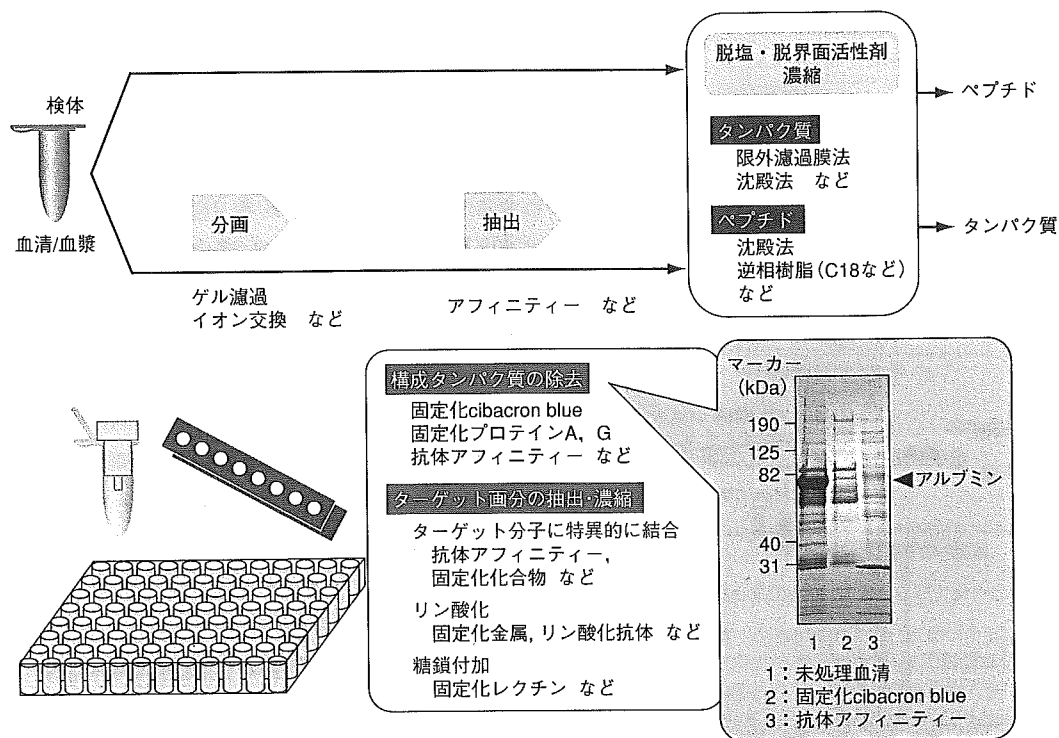


図1 ● 体液試料調製のストラテジー

検体は必要に応じて尿素などで変性後、ゲル濾過、イオン交換などにより分子量、等電点の違いにより分画を行う。さらに、親和性の高い抗体や低分子化合物によるアフィニティーなどにより構成タンパク質の除去〔SDS-PAGE；lane 1：未処理、lane 2：固定化cibacron blue、lane 3：抗体（6種）アフィニティー〕やターゲット画分の抽出・濃縮により特定タンパク質（群）の抽出を行う。質量解析に供する前には限外濾過膜法、沈殿法などで可能な限り塩および界面活性剤は除く。最近では、分画・抽出などのタンパク質精製ツールがキット化され、スピニングカラムやマルチウェルプレートなど微量検体を安定的に処理できる工夫が施されたデバイスとして市販されている

タンパク質を除くことができるカラムも市販されている。

検体は必要に応じて尿素などで変性後、ゲル濾過、イオン交換などにより分子量、等電点の違いによる分画を行い、低発現量のタンパク質の検出を可能にする。さらに、特定のタンパク質（群）を積極的に捕捉・濃縮するには、親和性の高い抗体や低分子化合物によるアフィニティーが有効である。アルブミン以外の多くの血清・血漿タンパク質は糖鎖付加による翻訳後修飾を受けていることから、特異的な糖残基と可逆的に結合する各種レクチンタンパク質を用いて濃縮・精製ができる。さらに特異性の異なる種々のレクチンを組み合わせて使うことで網羅性を上げることが可能である。

金属チップ表面に化学官能基や固定化された分子を装着し、試料中から特定の性質をもつ分子をチップ上で捕捉・精製するプロテインチップも同様の目的に使用されるものであり、質量分析と組み合わせた実験系は表面エンハンス型レーザー脱離イオン化（surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry：SELDI-TOF-MS）法と呼ばれている。

Petricoinらは診断に有用なバイオマーカー検索には、血流中に存在する癌細胞が分泌するタンパク質のみならず、癌の発症および病態の進行に伴う病変局所のプロテアーゼ活性の亢進によって産生されるペプチドの解析も重要であることを指摘している²⁾。流血中のペプチドはアルブミンなどのキャリアータンパク質と結合し、腎

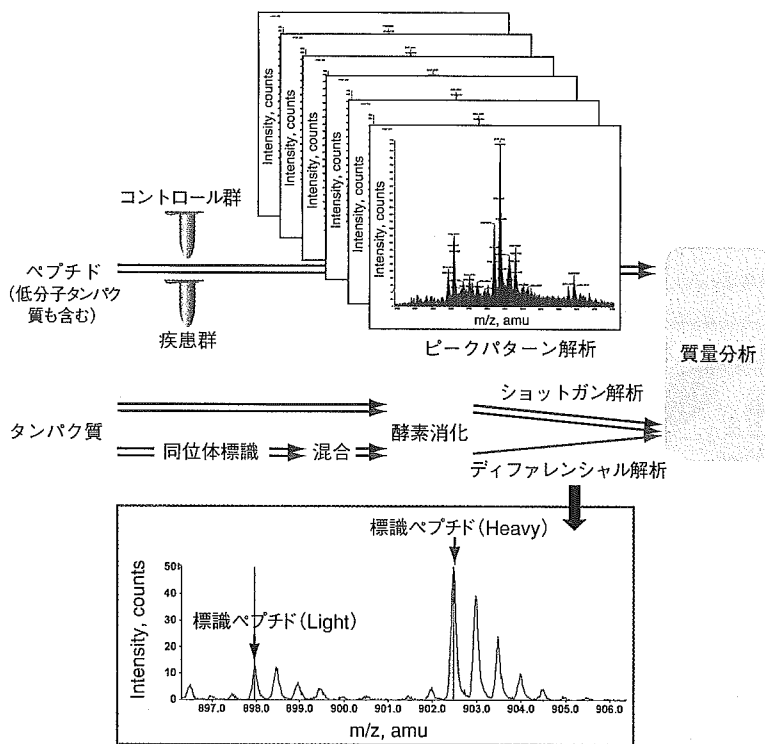


図2 ●体液試料の質量分析

質量分析による定量解析には、SELDI-TOF-MSやMALDI (matrix-assisted laser desorption ionization)-MSのように低分子タンパク質を含むペプチドをそのまま解析する方法に加えて、タンパク質をトリプシンなどの基質特異性の高い酵素で消化し、ペプチドとして物理化学的な性状を均一にして解析するショットガン法がある。ショットガン法ではICAT (isotope-coded affinity tag) などの *in vitro* での安定同位体タンパク質標識法を応用することで、ディファレンシャル解析が可能である

のクリアランスを回避していると考えられ、アルブミン結合ペプチドの検索もバイオマーカー候補を捕捉・濃縮する方法として有用であると考えられる。

ii) 血液試料の質量分析

サンプルを質量解析に供する前には可能なかぎり塩および界面活性剤は除く必要がある(図1)。最近では、分画・抽出などのタンパク質精製ツールがキット化され、スピンカラムやマルチウェルプレートなど微量検体を安定的に処理できる工夫が施されたデバイスとして市販されており便利である³⁾。

質量分析による定量解析には、SELDI-TOF-MSやMALDI (matrix-assisted laser desorption

ionization)-MSのようにタンパク質・ペプチドをそのまま解析する方法に加えて、先にトリプシンなどの基質特異性の高い酵素で消化し、ペプチドとして物理化学的な性状を均一にして解析するショットガン法がある(図2)。ショットガンはICAT (isotope-coded affinity tag), iTRAQ などの *in vitro* での安定同位体タンパク質標識法を応用することで、比較定量が可能である。ICAT法では比較したい2検体を、分子量の異なる¹³C (Heavy) もしくは¹²C (Light) の同位体を含有する試薬で標識し、酵素消化後、標識部に導入されたビオチンタグで精製することで検体の複雑性を下げ、図2に示すようにペプチドの質量スペクトルから、由来するタンパク質の発現量を比較することができる。

われわれは無標識の検体を低流速(50~200 nL/min)でかつ長時間流速が一定の液体クロマトグラフィーで分離し、質量分析器で定量し、ペプチドをその質量/価数(m/z)と量を二(ないし三)次元画像として表す2D-ICAL-MS (two dimensional Image converted analysis of nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry) 法を開発した(日本ヒトプロテオーム機構第3回大会要旨集)。

2. マーカー分子の絞り込みやバリデーション

プロテオーム解析では莫大な量の情報が発生するため、生物学的、臨床的意味のある情報を抽出するためには、バイオインフォマティクス的手段を用いる必要がある。われわれの研究室で行っている機械学習法の手順を示す(図3)。年齢、性別、採血法、採血時期に偏りが無いような疾患群とコントロール群のサンプルを学習セットとして用意する。このセットの質量解析を行い、得られたスペクトルからピーク情報を定量的に検出する。単一のピークのみから最終判別をすることは判別率が十分でないことが多いため、人工知能などに応用される機械学習アルゴリズム〔サポートベクタマシン(線形、非

線形), ニューラルネットワーク, ファジーニューラルネットワーク] を用いて, 癌と正常を区別するマルチマーカーからなるデータセット (分類器) を抽出する。

しかし, この段階では数学的に強制的に疾患群とコントロール群を分類しただけに過ぎず, 生物学的な意味のない分類をしただけの可能性はある。そこで, 学習セットにおける分類結果が正しいかどうかを, 検証セット (臨床情報が未知の全く別の検体) を用いて評価する。検証セットを盲検してはじめて, 学習セットの分類器が診断的意義のあるものであると確認できる。このような流れでマーカー分子の絞り込みやバリデーションを行うことにより, その後に臨床情報未知検体サンプルが持ち込まれたとしても高い判別率で癌か否かを判定することが可能である。

3. 応用例および課題

われわれの研究室では SELDI-TOF MS 法を用いたアプローチで微量の検体を再現性よくハイスループットに解析することによって, 有効な癌のマーカー候補があがってきているので紹介する。腎腫瘍の9割を占める腎細胞癌の早期診断マーカーを検索することを目的とした検討⁴⁾では, 解析に供した血清では構成タンパクの除去は行わず, 陰イオン交換により分画した。さらに各分画を疎水性, 金属親和性そしてイオン交換の各プロテインチップ上で特定の性質をもつ分子の捕捉, 精製を行い, サイファージェン社の飛行時間型質量分析計である PBS II c を用いて分析を行った。検出ピークは未分画では数百であったものが, 分画操作により約3,000に増加していた。これらのピークを図3に示す機械学習法により解析を行ったところ, 2つのピークを組み合わせることで, 感度, 特異度共に良好に腎細胞癌を判別できるマーカーピークを得ることができた。さらにマーカー検索の再現性, 安定性を向上させるためには, 質量分析の精度を向上させることが必要であると考えられ

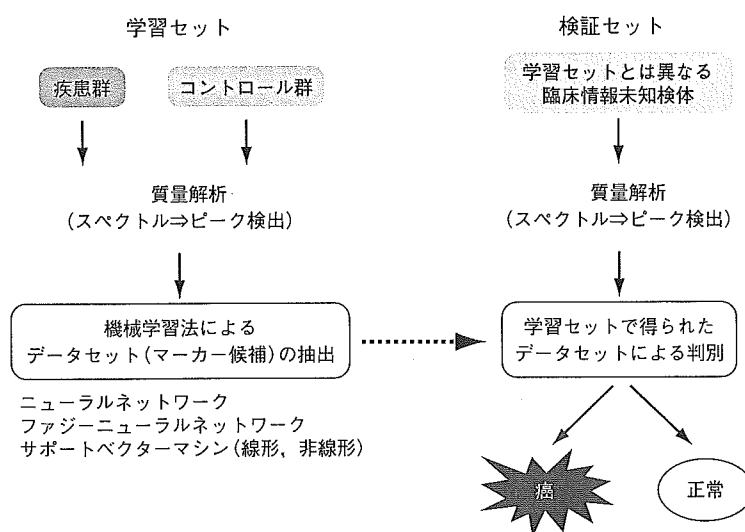


図3 ●マーカー分子の絞り込みやバリデーション

年齢, 性別, 採血法, 採血法時期に偏りがないような疾患群とコントロール群のサンプルを学習セットとして用意する。このセットの質量解析を行い, 得られたスペクトルからピーク情報を定量的に検出する。次に, 機械学習アルゴリズム [サポートベクターマシン (線形, 非線形), ニューラルネットワーク, ファジーニューラルネットワーク] を用いて, 癌と正常を区別するマルチマーカーからなるデータセット (分類器) を抽出する。そこで, 学習セットにおける分類結果が正しいかどうかを, 検証セット (臨床情報が未知の全く別の検体) を用いて評価する

たので, 高分解能型四重極飛行時間型 (quadrupole time-of flight : QTOF) 質量分析計を用い, 膵臓癌の血漿腫瘍マーカーの探索を行った⁵⁾。血漿サンプルを未分画でプロテインチップに捕捉・濃縮し, 質量分析を行い, 得られたピークを機械学習法により解析を行ったところ, 感度, 特異度ともに高い値を有する4つのピークを検出した。このマーカーピークは既存の腫瘍マーカーである CA19-9 と相補的で, 両者の組み合わせにより膵臓癌患者の100%の検出が可能であった。膵臓癌は早期診断が非常に困難であるために, この血漿腫瘍マーカー開発は多くの期待が寄せられており, 実用化を進めている。

バイオマーカー検索アプローチは, 癌の診断だけでなく, 個別化治療選択のための診断法開発にも用いられる。われわれは進行食道癌の術前化学放射線療法 (5-フルオロウラシル+シスプラチン+放射線照射) の奏効性を左右しうるマーカー分子の検索を行った⁶⁾。化学放射線療法前

に採取した血清を各種プロテインチップ上での捕捉、精製後、高分解能質量分析計にて分析を行った。得られたピークの解析結果から化学放射線療法の奏効性を予測することが可能な4つのピークを抽出することに成功している。

いたことがある。しかし最近では試料調製の重要性がさまざまな場面で認識されはじめてきている。今後、試料調製技術のさらなる進展により臨床に役立つバイオマーカー検索に役立てたいと考えている。

おわりに

質量解析によるプロテオーム解析は、機械およびアプリケーションの技術開発が先行して、実体が何年か遅れてついてきている現状がある。その要因として、生体内で発現しているタンパク質を発現量格差がある状態にもかかわらず高感度な質量分析計で網羅的という言葉とともに一網打尽に分析できるかのような幻想を抱いて

参考文献

- 1) Tirumalai, R. S. et al : Mol. Cell Proteomics, 2 : 1096-1103, 2003
- 2) Petricoin, E. F. & Liotta, L. A. : Curr. Opin. Biotechnol., 15 : 24-30, 2004
- 3) Smith, C. et al : Nature Methods, 2 : 71-77, 2005
- 4) Hara, T. et al : J. Urol, 174 : 1213-1217, 2005
- 5) Honda, K. et al : Cancer Res., 65 : 10613-10622, 2005
- 6) Hayashida, Y. et al : Clin. Cancer Res., 11 : 8042-8047, 2005



下重美紀 (Miki Shitashige)

国立がんセンター研究所 化学療法部 研究員。

1998年東京医科歯科大学大学院博士課程を修了後、タンパク質精製、分子細胞生物学を中心に研究に従事し、2002年より質量分析技術に取り組んでいる。2004年8月より現職。癌の早期診断・病態診断に有用な腫瘍マーカーの開発を見出すことを目的とした研究を行っている。

本田一文 (Kazufumi Honda)

国立がんセンター研究所化学療法部 室長。

山田哲司 (Tesshi Yamada)

国立がんセンター研究所 化学療法部 部長、腫瘍プロテオミクス プロジェクトリーダー併任。

実験医学別冊 注目のバイオ実験シリーズ

発行 羊土社

決定版! プロテオーム 解析マニュアル

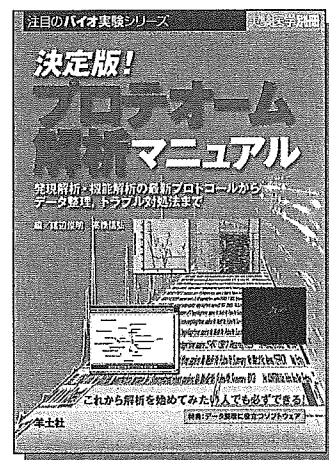
好評発売中

発現解析・機能解析の最新プロトコルから
データ整理、トラブル対処法まで

特典:データ整理に必ず
役立つソフトウェア

編集/儀辺俊明(東京都立大学大学院理学研究科化学専攻生物化学)
高橋信弘(東京農工大学農学部応用生物科学科構造生化学)

B5判 281頁 定価(本体6,200円+税) ISBN4-89706-415-5



Elsevier Editorial System(tm) for Clinica Chimica Acta

Manuscript Draft

Manuscript Number: CCA-D-05-00017R1

Title: Increased creatine kinase BB activity and CKB mRNA expression in patients with hematologic disorders: relation to methylation status of the CKB promoter

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: creatine kinase; creatine kinase BB isoenzyme; CKB gene; methylation

Corresponding Author: Masato Maekawa, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Hamamatsu University School of Medicine

First Author: Jinko Ishikawa

Order of Authors: Jinko Ishikawa; Terumi Taniguchi; Akihiro Takeshita, MD, PhD; Masato Maekawa, MD, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Background: We encountered two patients with elevated levels of the creatine kinase (CK)-BB isoenzyme in their sera. Here we examined the relation among CK-BB activity, expression of CKB mRNA in peripheral blood, and hypermethylation of the CKB.

Methods: The two patients and other 26 patients with hematologic malignancies, and some cancer cell lines were subjected to measurement of serum CK activity, CK isoenzyme analysis, CKB mRNA expression analysis by RT-PCR, and methylation analysis of the CKB promoter region.

Results: CK-BB activity and proportion of leukemia blasts were correlated in the two patients. CKB mRNA was elevated in peripheral blood during an increase in blast numbers. In contrast, none of the other 26 patients showed CK-BB activity or expression of CKB mRNA. In all of the patients with hematologic

disorders, the analyzed region of CKB promoter was mostly unmethylated. However, some of cancer cell lines showed the methylated pattern. CKB mRNA was expressed at higher levels in cells with an unmethylated CKB promoter than in cells with a methylated promoter.

Conclusions: Expression of CKB mRNA and CK-B sometimes occurred in blastic transformation of the hematopoietic system. A relation between CKB mRNA expression and methylation of the CKB promoter was suggested.

CCA AUTHOR CHECKLIST FOR FINAL MANUSCRIPTS

GENERAL:

Indicate the type of paper being submitted, and with complete corresponding author contact details i.e. full street address, telephone no., fax no., and e-mail address.

The type of the paper is original article.

Correspondence author. Dr. Masato Maekawa, Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu, 431-3192 Japan.
Tel.: +81-53-435-2721; fax: +81-53-435-2794.
E-mail address: mmaekawa@hama-med.ac.jp (M. Maekawa).

The manuscript is in MS Word, figures are in MS Word or MS PowerPoint, and tables are in MS Word or MS Excel.

This manuscript was prepared following conditions.

TEXT:

1. Manuscript title page including: manuscript no., full title of the article, all authors names/affiliations, full postal address for correspondence, tel./fax/e-mail details.
2. Structured abstract
3. Keywords
4. References are in journal format. References in text and reference list correspond exactly.
5. Quantities and units conform to international practice

Increased creatine kinase BB activity and CKB mRNA expression in patients with hematologic disorders: relation to methylation status of the *CKB* promoter

Jinko Ishikawa, Terumi Taniguchi, Akihiro Takeshita, Masato Maekawa*

Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu
431-3192, Japan

Correspondence author. Dr. Masato Maekawa, Department of Laboratory Medicine,
Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu, 431-3192 Japan.

Tel.: + 81-53-435-2721; fax: +81-53-435-2794. *E-mail address:* mmackawa@hama-med.ac.jp

(M. Maekawa).

Abstract

Background: We encountered 2 patients with increased activities of the creatine kinase (CK)-BB isoenzyme in their sera. Here we examined the relation among CK-BB activity, expression of CKB mRNA in peripheral blood, and hypermethylation of the CKB. *Methods:* The 2 patients and other 26 patients with hematologic malignancies, and some cancer cell lines were subjected to measurement of serum CK activity, CK isoenzyme analysis, CKB mRNA expression analysis by RT-PCR, and methylation analysis of the *CKB* promoter region. *Results:* CK-BB activity and proportion of leukemia blasts were correlated in the 2 patients. CKB mRNA was increased in peripheral blood during an increase in leukemia blast numbers. In contrast, none of the other 26 patients showed CK-BB activity or expression of *CKB* mRNA. In all of the patients with hematologic disorders, the analyzed region of *CKB* promoter was mostly unmethylated. However, some of cancer cell lines showed the methylated pattern. CKB mRNA was expressed at higher levels in cells with an unmethylated CKB promoter than in cells with a methylated promoter. *Conclusions:* Expression of CKB mRNA and CK-B sometimes occurred in blastic transformation of the hematopoietic system. A relation between CKB mRNA expression and methylation of the CKB promoter was suggested.

Key words: creatine kinase; creatine kinase BB isoenzyme; *CKB* gene; methylation

1. Introduction

Creatine kinase (CK; EC 2.7.3.2) is involved in the maintenance of ATP at sites of cellular work [1]. Three cytoplasmic isoenzymes of CK have been identified in humans. These isoenzymes are dimeric molecules with 2 subunits designated M and B and are encoded by distinct genes [2]. Each CK isoenzyme has a distinct intracellular or tissue-specific pattern of the localization. The CK-BB isoenzyme is reported to be increased in patients with various malignancies, primarily solid tumors [3]. However, the CK-BB isoenzyme has also been detected in patients with various hematologic disorders [4]. Recently, we encountered 2 patients with increased activities of the CK-BB isoenzyme in their sera. Both suffered from hematological disorders. Chen et al. [5] recently reported that the CK-B subunit is a marker for monitoring minimal residual disease (MRD) in acute lymphoblastic leukemia. However, there are no reports of the correlation of CK-BB activity in serum with peripheral white blood cell counts or of expression of CKB mRNA in leukemic cells. There are also no reports that CKB mRNA is useful for monitoring of MRD in myeloid leukemia. Therefore, we examined CK-BB activity and expression of CKB mRNA in peripheral blood from patients with several types of hematologic disorders. We also examined the effect of hypermethylation of the *CKB* gene on expression of *CKB*.

2. Materials and methods

2.1. Patients and subjects

Routine laboratory examination identified high serum CK activity (1632 IU/l) in a 64-year-old man (Patient 1). The reference interval was from 55 to 204 IU/l for men. Isoenzyme analysis by electrophoresis showed a very high proportion (55%) of the CK-BB band. This patient had been observed for 5 years due to chronic anemia and was diagnosed with myelodysplastic syndrome (MDS). At the time of the recent visit to our hospital he complained of high fever (39°C) and showed hyperplasia of erythroid cells in the bone marrow and

increased leukemia blasts (28%) in peripheral blood. He was diagnosed with acute myeloid leukemia.

Patient 2 was a 60-y-old man with thromboangitis obliterans (TAO) and hepatocellular carcinoma. During treatment for TAO, leukocytosis and thrombocytosis were observed, and he was diagnosed with chronic myeloid leukemia (CML). Recently he was admitted for acute lymphoblastic transformation of CML. Total CK activity and the proportion of CK-BB in his serum were 113 IU/l and 36.5%, respectively, and leukemia blast counts (21100/ μ l) were 6% of white blood cell counts.

Twenty-six other patients with hematologic malignancies (8 with acute myeloid leukemia, 2 with CML, 2 with acute promyelocytic leukemia, 6 with acute lymphoblastic leukemia, 1 with chronic lymphoblastic leukemia, 3 with MDS, and 4 with malignant lymphoma) (Table 1) were subjected to measurement of serum CK activity, CK isoenzyme analysis, CKB mRNA expression analysis by RT-PCR, and analysis of methylation of the *CKB* promoter region. Six hematologic cancer cell lines (HL-60, NB4, K562, Raji, Daudi, U937), 11 solid tumor cell lines (MKN1, MKN7, MKN28, MKN45, MKN74, KATO III, NEDATE, PSN1, SW1116, C-1, Lu65), and 6 brain tumor cell lines (Daoy, ONS-76, UW228, TE671, D283, PFSK) were also subjected to *CKB* mRNA expression analysis by RT-PCR and methylation analysis of the *CKB* promoter region. The procedures in this study were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 and the subsequent 1996 amendments.

2.2. Activity measurement and isoenzyme analysis

Serum CK activity was measured by enzymatic assay with a Hitachi 7350 analyzer (Hitachi High Technologies). Assay conditions were based on the method recommended by the Japanese Society of Clinical Chemistry [6]. CK isoenzymes in serum were separated electrophoretically with Titan III supporting media (Helena Laboratory). The reference interval of CK-BB is 0.1 to 2.6%.

2.3. RNA preparation and RT-PCR

Total RNA was extracted from peripheral whole blood with Isogene (Nippon Gene). Reverse transcription (20- μ l reaction mixture) was carried out with approximately 0.5 to 1.0 μ g total RNA as template with ReverTraAce- α kit (TOYOBO). One-twentieth of the resulting cDNA was amplified with primers specific for *CKB* and β -actin (Table 2). PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining and UV transillumination. Stained bands were analyzed densitometrically with Cool Saver imaging software (ATTO Corp.).

2.4. DNA preparation and methylation analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood with a DNA Extractor WB Kit (sodium iodide method) (Nippon Gene). For methylation analysis, we used sodium bisulfite treatment and PCR-single-strand DNA conformation polymorphism (SSCP) (BiPS) [7] and DNA sequencing analysis. Sequences of primers for the BiPS analysis are shown in Supplemental Table 2. The promoter sequence of *CKB* was taken from GenBank X15334 and is shown in Figure 1. The region selected for amplification contained non-coding exon 1 and is reported to be related to promoter activity [8]. The PCR product was expected to contain 299 base pairs and 48 CpG sites. BiPS analysis was performed with 12% non-denaturing polyacrylamide gels and silver-staining detection (Daiichi Pure Chemicals). DNA sequencing analysis was performed with BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit and a PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3. Results

On the basis of the timecourse of the laboratory data for patients 1 and 2, CK-BB activity and proportion of leukemia blasts in peripheral blood were correlated (correlation coefficients for patients 1 and 2 were 0.869 and 0.952, respectively) (Fig. 2A, B). *CKB* mRNA