

良な予後、抗癌剤への耐性など)を裏付けるタンパク質群を同定しようとする試みが盛んになっている。その目的は癌のメカニズムの解明に加え、癌の個性をより正確に診断し治療方針の決定に役立つ腫瘍マーカーを開発したり、創薬のターゲットを見つけたりするところにある。本稿では特に臨床応用への指向性が強く著者が興味をもっている、オーダーメイド医療のための腫瘍マーカー開発を紹介する。

1 オーダーメイド医療のための腫瘍マーカー

個人個人に合わせた最適な医療(オーダーメイド医療)を行うためには、癌の個性を正確に診断することが最も重要である。既存の臨床病理学的な診断では同一グループに分類される癌細胞あるいは癌患者が、治療に対して異なる反応性を示すことが一般に知られており、治療方法の決定のためにより正確な診断を可能にする腫瘍マーカーの開発が期待されている。例えば乳癌ではリンパ節の転移を正確に診断できれば、的確な手術法を選択したり早期に治療を開始することが可能である。また肺癌では抗癌剤としてのEGF受容体阻害剤(ゲフェチニブ、商品名イレッサ)が大変よく効く症例がある一方で副作用が強く現れる症例もあり、両群を治療開始前に鑑別できれば治療成績は大きく向上すると考えられている。乳癌患者の予後や肺癌患者のゲフェチニブへの感受性は単一の遺伝子の異常からも予測がつくとする考え方があり、それぞれについてCyclin Eの過剰発現²⁾やEGF受容体の異常³⁾が報告されている。

しかしながら、これらの異常だけでは予測できない予後の悪い症例や副作用も数多く存在する。予後や抗癌剤への耐性は単一の分子で説明される事象ではなく、おそらく複数の分子が関与しているのだろう。また、遺伝的な背景は患者ごとに異なっているため、予後や抗癌剤の奏効性などを決定するメカニズムそのものにバリエーションがあるかもしれない。そのような観点から、多くの症例をカバーする正確な予測のために遺伝子発現の異常を網羅的に調べ、複数の分子の異常を同時に調べることで癌を多角的に調べようとする

試みがある。mRNAの網羅的な発現解析を通して、乳癌患者の予後の予測⁴⁾、肺癌患者のゲフェチニブへの感受性の予測⁵⁾のための腫瘍マーカーの開発が行われている。診断を精緻に行い癌の個性を判別することが治療上大変役立つ事例はほかの悪性腫瘍でも認められており、それぞれについて同様にmRNAの網羅的発現解析が試みられている。これからもmRNAの発現で癌の個性診断を行う研究は増えていくだろうし、その成果を商品化する例も増えるだろう。そのような現状で、プロテオミクスの技術を用いてオーダーメイド医療のための腫瘍マーカーの開発を行うメリットはどこにあるのだろうか?

2 腫瘍マーカー開発におけるプロテオミクスの有用性

網羅的発現解析の成果の一端として、mRNAとタンパク質の発現レベルには相関が乏しいことが知られるようになった。例えば、肺癌において二次元電気泳動とGeneChipを用いてタンパク質とmRNAの発現解析の結果を比較した例では、タンパク質とmRNAの発現レベルが相関していたのは調べた165個のタンパク質のうちの2割ほどだけであった⁶⁾。タンパク質発現解析ツールとしては二次元電気泳動法、抗体アレイ、ICAT(isotope coded affinity tag)、質量分析、mRNA発現解析ツールとしてはGeneChipを用いた同じような報告は数多くあり^{7)~10)}、いずれもmRNAとタンパク質の発現レベルの相関が著しく乏しいという結果に終わっている。

細胞の形質をコントロールするのはおそらく多くの場合はmRNAではなくタンパク質である。発現解析をmRNAのレベルで行うとき、mRNAとタンパク質の発現レベルにある程度の相関があることが期待されてきたのだが、その期待は裏切られつつある。しかしこれらの事実はmRNAレベルの発現解析が役に立たないことを示唆しているわけでは決してない。DNAマイクロアレイ技術(またはGeneChip)は完成度も高く、網羅性、定量性に優れた技術であり、mRNAとタンパク質の発現に相関がある遺伝子に関しては完成度の高い強力なツールである。しかし、どんなにア

レイする遺伝子を増やしてもタンパク質発現という観点からはすべての遺伝子がカバーされているわけではなく、カバーされていない遺伝子を補完するタンパク質レベルの発現解析も必要だということである。

プロテオミクスの技術を用いれば腫瘍マーカーの開発はmRNAの発現解析以上に効果的に行うことができるだろうと考えている。なぜならば、プロテオミクスでは細胞の機能をコントロールするタンパク質の量を直接調べることができるからである。また、翻訳後修飾（リン酸化、糖鎖修飾など）、体液（血清、脳脊髄液など）は癌で異常を来していることが知られており、いずれも癌の個性診断に役立つはずだが、これらはタンパク質を調べなくてはわからない異常だからである。問題は現在のプロテオミクスの技術レベルにある。プロテオミクスの分野ではDNAマイクロアレイ（またはGeneChip）に相当する、①網羅的で、②定量的であり、③再現性もよく、④多検体を並列に解析でき、⑤統合できるフォーマットで多検体からデータを出せる、という技術はまだ存在しない。プロテオミクスでは、網羅性の高い技術は定量性に乏しく、逆に定量性が高い技術は網羅性に欠ける傾向がある。それぞれに弱点を克服する努力は行われており、新しいアイデア、試薬、機械の導入によってここ数年かなり進歩したが、まだずいぶん開発の余地があるようだ。だからといって現段階でプロテオミクスが癌の研究の役に立たないというわけではない。最先端から一步下がった市販のプロテオーム解析技術を用いた研究結果からでも、プロテオーム解析を用いた腫瘍マーカー開発の明るい将来性を示唆するデータは出つつある。

③ プロテオーム解析により同定された腫瘍マーカー候補

例えば、肺癌患者の予後と強く相関するタンパク質群が二次元電気泳動や質量分析で同定されている。Hanashのグループは二次元電気泳動法を使い肺腺癌90症例の切除標本を用いてプロテオーム解析を行い、早期の肺腺癌患者の術後の生存期間を予測するタンパク質群を同定している¹¹⁾。プロテオーム解析に用いられたのは682スポットにすぎないが、結果的には予

後予測のための腫瘍マーカーとして臨床応用が可能なタンパク質が見つかった。予後の悪い症例では解糖系酵素に属する4つのタンパク質の発現が高かったが、そのうちPGK1 (phosphoglycerate kinase 1) は血中レベルも予後と相関していたことから、非侵襲的な診断法の開発につながる可能性が高い。その他、予後の悪い症例では、多くの悪性腫瘍で発現減少が報告されているミトコンドリアSODや逆に亢進している例の多いFGF 4 (fibroblast growth factor 4)、抗凝固作用のあるAnnexin VIIIの発現が高くなっていた。また、抗アポトーシス作用があるとされるGRP78 (glucose regulated protein 78)、好中球と反応するGRK4 (G protein-coupled-receptor kinase 4)、癌遺伝子産物N-mycなどの発現が高い患者の予後がよいという結果になっている。プロテオミクスの最終目標はこれらのタンパク質の異常を包括的に理解し、予後を左右するタンパク質のネットワークを解明することだろう。

しかしそのような大目標達成の前にこれらのタンパク質を腫瘍マーカーとして使用することによって治療成績の向上が見込まれるし、これらを分子標的とした治療法の開発によって予後は大きく改善される可能性がある。柳沢ら（現名古屋大学）も同様に肺の非小細胞癌79症例を対象にMALDI TOF MSを用いたタンパク質の発現解析を報告している。1,600本以上のイオンピークの定量的シグナルを対象に解析を行い、肺癌患者のきわめて悪い予後を予測しうる15本のイオンピークを同定している¹²⁾。また、岩立ら（千葉大学）も二次元電気泳動を用いて75症例の脳腫瘍を調べ、257個のタンパク質スポットから悪性度に相関する37個のスポットを同定している¹³⁾。DNAマイクロアレイ（またはGeneChip）と比べるまでもなく網羅性は低いのだが、定量的にプロテオーム解析を行うことでオーダーメイド医療のための腫瘍マーカー候補が発見されつつある点は注目に値する。別の言い方をすると、今すでにある技術を改良して定量性を保ったまま網羅性を向上させさえすれば、癌のプロテオーム研究は臨床応用、特にオーダーメイド医療のための腫瘍マーカーの開発に向けて大きく進歩できるだろう。

二次元電気泳動に関しては既存の技術の応用で観察できるタンパク質の数を10倍増やすことは容易であ

り、実際にKloseらは10,000個近い数のスポットを解析に用いたプロテオーム解析を数多く報告している¹⁴⁾。腫瘍マーカーの開発においてプロテオミクス側からのアプローチはトランスクリプトーム側からより本当に有効なのかが今後の研究によって明らかにされていくだろう。また、「オーダーメイド医療のための腫瘍マーカー開発」という早期に実現可能かつ社会的にインパクトの高い研究テーマが提示されたことで、この方面の技術開発がいつそう進むことを期待している。具体的には、定量性を最も重視しつつ網羅性とスループット性を高めたタンパク質発現解析技術の開発である。

国立がんセンターでも肝癌や肺癌患者の術後再発の予測、肺癌や骨肉腫の抗癌剤への感受性の予測、食道癌や肺癌の微小なリンパ節転移の検出、骨軟部腫瘍の鑑別診断などをめざし、実際の手術検体を多数用いて腫瘍マーカーの開発を行っている。次にそのために使われている定量的プロテオーム解析技術について述べる。

4 腫瘍マーカー開発ツールとしての 二次元電気泳動の可能性

二次元電気泳動法はプロテオーム解析の手段として最も普及している技術である。分離されたタンパク質の量を定量的に測定できるというメリットがある。さらに分子量と等電点という、すべてのタンパク質が普遍的かつ固有にもつ物理特性をもとに分離を行うことで、二次元電気泳動法はほかのプロテオーム解析系にはない高い分離能を示している。現在までにさまざまなバックグラウンドや目的をもつ研究者によって二次元電気泳動法は使用され、あらゆる角度からその特性や限界が検証されてきた。二次元電気泳動で解析が困難な膜タンパク質や微量タンパク質のために、そしてさらに定量性、分離能、再現性を高めるためにさまざまな工夫が行われてきた。工夫の結果は主にElectrophoresis誌に論文として発表されており、新しいアプリケーションを考案する際に大変貴重なデータベースとなっている。もったいないことに単に技術開発として報告されただけで実際に生物学のテーマに応用されていない例が多い。それはスポットに対応するタンパク質が従来のアミノ酸シークエンサーでは効

率よく同定することができなかつたためなのだが、最近では質量分析によってすべてのスポットの同定が可能になっている。そのため、過去に報告されたアプリケーションはまさにアイデアの宝庫である。一方で昔からある技術の典型例として二次元電気泳動は新しい技術が登場する都度ベンチマークとして使用され、ときとして弱点を誇張する表現とともに取り上げられてきた。限界のない技術はないのだが、本邦では二次元電気泳動の限界は誤って低く理解されているように思われる。

国立がんセンターではオーダーメイド医療のための腫瘍マーカーの開発が二次元電気泳動法を用いて行われている。腫瘍マーカー開発のためにDNAマイクロアレイの前述の5つの性能を目標としてこの数年間工夫を加え続けた結果、二次元電気泳動法の再現性、定量性、スループット性などは飛躍的に向上した¹⁵⁾。鍵となるのは泳動前にタンパク質を蛍光色素で標識する技術で、すべてのスポットに内部標準をもたせることがポイントである。また、市販の泳動装置(24 cm × 20 cmゲル)でも通常は少なくとも1,500スポットがかなり再現性よく描出されるが、網羅性を向上させるために40 cm × 30 cmという巨大ゲルをハイスループット型の自作電気泳動装置で泳動するようになった。試算では1枚のゲルでSWISS-PROTデータベースの半分以上を定量性を保ってカバーできると考えている。同定感度が上がった結果、最近ではオーファンレセプター、Grb2 (growth factor binding protein 2)、DNA修復酵素、転写因子または腫瘍抑制遺伝子産物に結合するタンパク質など、微量すぎて従来は二次元電気泳動で観察できないと考えられていたタンパク質がスポットとして次々と同定されている。網羅性を高める工夫はさらに進行中であるが、その傍らでは肝癌の早期再発を予測できるタンパク質群をすでに同定しており、実用化をめざした研究を開始している。

■ おわりに

この4年間のプロテオーム解析技術の進歩は目覚ましく、市販されている技術を工夫することで医学生物学の研究テーマにあった新しい方法をつくることがで

きる段階にわれわれは到達している。癌研究の分野では、腫瘍マーカーの開発だけでなくメカニズムの解明、予防、早期発見、治療法の開発など、臨床応用をにらんだ実にさまざまな研究テーマがある。癌の悪性形質を裏付けるタンパク質群を網羅的に同定し、最終的にはそれらのネットワークを解明することで、既存のタンパク質研究にはなかったプロテオミクスならではの癌研究を行いたいと考えている。

文献

- 1) Lilley, K. S. : Exp. Rev. Proteomics, 1 : 401-409, 2004
- 2) Keyomarsi, K., Tucker, S. L., Buchholz, T. A., Callister, M., Ding, Y., Hortobagyi, G. N., Bedrosian, L., Knickerbocker, C., Toyofuku, W., Lowe, M., Herliczek, T. W. & Bacus, S. S. : N. Eng. J. Med., 347 : 1566-1575, 2002
- 3) Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J. & Haber, D. A. : N. Engl. J. Med., 350 : 2129-2139, 2004
- 4) van't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. & Friend, S. H. : Nature, 415 : 530-536, 2002
- 5) Kakiuchi, S., Daigo, Y., Ishikawa, N., Furukawa, C., Tsunoda, T., Yano, S., Nakagawa, K., Tsuruo, T., Kohno, N., Fukuoka, M., Sone, S. & Nakamura, Y. : Hum. Mol. Genet., 13 : 3029-3043, 2003
- 6) Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J. M., Misek, D. E., Kardina, S. L., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M. & Beer, D. G. : Mol. Cell. Proteomics, 1 : 304-313, 2002
- 7) Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. : Mol. Cell. Biol., 19, 1720-1730, 1999
- 8) Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J. A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J. K., Bumgarner, R., Goodlett, D. R., Aebersold, R. & Hood, L. : Science, 292 : 929-934, 2001

- 9) Nishizuka, S., Charboneau, L., Young, L., Major, S., Reinhold, W. C., Waltham, M., Kouros-Mehr, H., Bussey, K. J., Lee, J. K., Espina, V., Munson, P. J., Petricoin, E. 3rd, Liotta, L. A. & Weinstein, J. N. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 14229-14234, 2003
- 10) Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J. P., Gunter, B., Linseley, P. S., Stoughton, R. B., Aebersold, R., Collins, S. J., Hanlon, W. A. & Hood, L. E. : Mol. Cell. Proteomics, 3 : 960-969, 2004
- 11) Chen, G., Gharib, T. G., Wang, H., Huang, C. C., Kuick, R., Thomas, D. G., Shedden, K. A., Misek, D. E., Taylor, J. M., Giordano, T. J., Kardina, S. L., Iannettoni, M. D., Yee, J., Hogg, P. J., Orringer, M. B., Hanash, S. M. & Beer, D. G. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 : 13537-13542, 2003
- 12) Yanagisawa, K., Shyr, Y., Xu, B. J., Massion, P. P., Larsen, P. H., White, B. C., Roberts, J. R., Edgerton, M., Gonzalez, A., Nadaf, S., Moore, J. H., Caprioli, R. M. & Carbone, D. P. : Lancet, 362, 433-439, 2003
- 13) Iwadate, Y., Sakaida, T., Hiwasa, T., Nagai, Y., Ishikura, H., Takiguchi, M. & Yamaura, A. : Cancer Res., 1 : 2496-2501, 2004
- 14) Klose, J., Nock, C., Herrmann, M., Stuhler, K., Marcus, K., Bluggel, M., Krause, E., Schalkwyk, L. C., Rastan, S., Brown, S. D., Bussow, K., Himmelbauer, H. & Lehrach, H. : Nature Genet., 30 : 385-393, 2002
- 15) 近藤 格：二次元電気泳動法による発現解析，“プロテオーム解析マニュアル”（磯辺俊明，高橋信弘／編），pp26-43，羊土社，2003

Profile

著者プロフィール

近藤 格：1992年岡山大学医学部卒業。'96年岡山大学医学部医学研究科（博士課程）修了（細胞生物学，難波正義教授）。同年分子細胞医学研究施設細胞生物学部門助手。'98年ミシガン大学博士研究員（小児血液腫瘍学部，Samir Hanash教授）。2001年国立がんセンター生物学部分子生物学室長。腫瘍プロテオミクスプロジェクト併任。二次元電気泳動法，多次元液体クロマトグラフィー，質量分析，抗体，バイオインフォマティクスなどを基盤としたプロテオミクスの手法を開発しつつ，オーダーメイド医療のための腫瘍マーカーを探している。

水は実験結果を左右する!

近刊!

超純水 超入門

データでなっとく，水の基本と使用のルール

日本ミリポア株式会社ラボラトリーウォーター事業部／編著

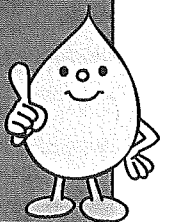
◆B5判2色刷り ◆約100ページ

◆定価2,625円(本体2,500円+税5%) ◆ISBN4-89706-480-5

4月中旬
発行予定

失敗の原因は
水だった?!

意外と知らない
水の基礎知識と
正しい結果を出すための
使いかたが
豊富な実証データでわかる!



羊土社

5章 バイオインフォマティクス

コラム

バイオインフォマティクスを用いた疾患
Omicによる疾患マーカーの開発

近藤 格

臨 床 検 査

第49巻 第12号 別刷

2005年11月30日 発行

医学書院

コラム

バイオインフォマティクスを用いた疾患 Omics による疾患マーカーの開発

近藤 格¹⁾

〔KEYWORDS〕 バイオインフォマティクス、疾患 Omics、疾患マーカー

1. はじめに

様々な生命現象の背景にある分子の有り様を DNA, mRNA そして蛋白質のレベルで網羅的に調べる研究が盛んに行われており、それぞれゲノミクス (genomics), トランスクリプトミクス (transcriptomics), プロテオミクス (proteomics) と呼ばれている。本稿では疾患に関連した異常を分子レベルで網羅的に調べる研究を「疾患 Omics」としてまとめて扱い、筆者の考える「疾患 Omics」の目ざすところ、バイオインフォマティクスの位置づけと期待される成果の臨床検査への応用の展望について述べる。

2. 「疾患 Omics」の現状

「疾患 Omics」はわが国では基礎医学の分野ではかなり普及している。ヒトゲノムプロジェクトによって網羅的なゲノム情報が利用できるようになったことに加え、個々の実験にかかわる技術が著しく発展したことがその背景として挙げられる。例えば DNA のコピー数の異常は従来 DNA プロブを用いてサザンブロッティングや FISH などで一つ一つ調べられていた。しかし現在ゲノミクスの分野では、DNA プロブが高密度にアレイされたスライドガラスに検体の DNA を反応させて一度に数千か所の DNA のコピー数を調べることが可能になっている。また、mRNA のコピー数の場合も同様で、従来はノーザンブロッティングや RT-PCR で限られた数の遺伝子についてだけ調べていたのだが、トランスクリプトミク

スの分野では今では GeneChip などを用いて一度に数万種類の遺伝子の発現が調べられている。蛋白質レベルの研究では、今まで特異抗体を用いてウェスタンブロッティングや ELISA, あるいは比較的小さいゲルを用いた低感度の二次元電気泳動で少数の蛋白質の発現が調べられていたのが、プロテオミクスでは蛍光二次元電気泳動法、質量分析装置、抗体アレイなどを用いることで一度に数百から数千種類の蛋白質の発現を一度に定量的に調べることができるようになった。このような技術を利用して疾患に伴う変化が多くの研究室で調べられている。

しかし誤解のないように付け加えると、「疾患 Omics」の本質は「調べる分子の数が多きこと」ではない。DNA, mRNA, 蛋白質の異常を広範囲に調べることは「疾患 Omics」の特徴ではあるが、それだけでは発想として従来の研究と何ら変わりはなく、わざわざ「疾患 Omics」という言葉を持ち出す必要はない。例えば、サザンブロッティング, RT-PCR, ウェスタンブロッティングを並列に独立して1,000回したのでは「Omics」にはならない。それでは「疾患 Omics」の本質は何なのか？ 癌の発生の過程においては DNA に生じた異常は mRNA, 蛋白質の異常へと波及し、最終的に細胞の形質に大きな変化を与えている。その場合、一つの遺伝子の変異は染色体の安定性, DNA 修復, 細胞周期など細胞を正常に複製しようとする様々な機能に影響を及ぼし、結果的に多くの遺伝子・蛋白質の異常を引き起こす。実際、癌においては DNA, mRNA, 蛋白質それぞれのレベルで膨大な異常

1) KONDO Tadashi 国立がんセンター研究所 プロテオームバイオインフォマティクスプロジェクト

が発生しているのだが、その異常はお互いに関わりのかたちで関連していると考えられる。その関連性は網羅的に(Omics的に)異常を調べることによって初めて発見されるものである。「疾患 Omics」の本質は、網羅的に分子の異常を調べ異常の全体像を包括的に理解することによって、網羅的に調べることでしかわからなかった「分子の異常の相互関係」あるいは「分子の機能的なつながり」を発見することにある。さらには「疾患 Omics」によって発見される分子の異常のパターンに基づく、疾患の新しい分類あるいは新しい疾患概念の構築も期待される。別の言い方をすると、調べる分子の種類を飛躍的に増やすことで「量から質への変換」を行うのが「疾患 Omics」の本質である。その意味ではいくら前述の最新の技術を使って広範囲に異常を調べていても、網羅的な理解を目指す視点がなければ「疾患 Omics」とは言い難い。逆に、比較的小規模な発現解析であっても「疾患 Omics」的なアプローチをとることは可能である。

「疾患 Omics」では技術的にかなりの発展が見られており、得られる成果をどのように臨床応用していくかということが次の重要な課題である。その場合よく挙げられるのが疾患マーカーの開発である。「疾患 Omics」で発見された異常な DNA, mRNA, 蛋白質の状態を、特定の病態の指標としようという試みである。「疾患 Omics」では従来は測定するのに数年かかっていたような量のデータが数日で発生する。したがって「疾患 Omics」で疾患マーカーを開発する際、膨大なデータを臨床情報と結びつけ、そこにある種の法則性を見いだしていくことが求められる。膨大な情報量の中から最も重要な変化を発見しようとする場合、経験や直感だけを頼りに研究を行うのは非科学的である。ゲノムミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスの各分野では、腫瘍マーカーの開発を目指して機械学習法、多変量解析などいわゆるバイオインフォマティクスの手法を用いて分子の異常を臨床情報に関連づける研究が盛んに行われており、有望な結果が報告されている(文献 1~15)。

3. 「疾患 Omics」の成果の臨床検査への応用

首尾よく研究室レベルで疾患マーカーができた

として、それを実際に臨床検査で使用するに際しては克服しなければいけない問題が存在する。具体的には、臨床検査室で使えるような簡便で安定した安価な測定系が使えるかどうかである。DNA マイクロアレイ、質量分析、二次元電気泳動などは研究開発には優れたツールだが、検査センターに導入して誰でもどこでも安定した結果が出るようにすることは現状ではかなり難しい。使用される機械もまだ高額だし、実験質レベルでは1検体当たりのコストも安くない。しかしこれらの技術の臨床検査系への応用は技術的には不可能な話ではないし、生命予後や治療方針の決定を左右する診断が行えるのであれば、新たに機械を開発する価値は十分ある。また、仮に高額な検査になったとしても、そのことで治療成績が大きく向上するのであれば臨床の現場では受け入れられるだろう。研究室レベルではかなり確かな成果が得られているものもあり、実用化へ向けた試みが次の課題として挙げられている(文献 16)。

4. 文献

いずれも臨床応用を目指した網羅的発現解析の代表的あるいは最新の論文である。

mRNA の網羅的発現解析

1. Beer DG, Kardina SL, Huang CC, et al : Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nature Med* 8 : 816-824, 2002
2. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al : A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347 : 1999-2009, 2002
3. Miller LD, Smeds J, George J, et al : An expression signature for p 53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 13550-13555, 2005

血清ペプチドの網羅的発現解析

4. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al : Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359 : 572-577, 2002
5. Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, et al : SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 41 :

634-642, 2005

6. Poon TC, Hui AY, Chan HL, et al : Prediction of liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B infection by serum proteomic fingerprinting : a pilot study. Clin Chem 51 : 328-335, 2005

血清蛋白質の網羅的発現解析

7. Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al : Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. Proc Natl Acad Sci USA 102 : 779-784, 2005
8. Wang X, Yu J, Sreekumar A, et al : Autoantibody signatures in prostate cancer. N Engl J Med 353 : 1224-1235, 2005

腫瘍組織内ペプチドの網羅的発現解析

9. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, et al : Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. Lancet 362 : 433-439, 2003
10. Schwartz SA, Weil RJ, Thompson RC, et al : Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Cancer Res 65 : 7674-7681, 2005

腫瘍組織内蛋白質の網羅的発現解析

11. Chen G, Gharib TG, Wang H, et al : Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 100 : 13537-13542, 2003
12. Iwadate Y, Sakaida T, Saegusa T, et al : Proteome-based identification of molecular markers predicting chemosensitivity to each category of anticancer agents in human gliomas. Int J Oncol 26 : 993-998, 2005
13. Jacquemier J, Ginestier C, Rougemont J, et al : Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. Cancer Res 65 : 767-779, 2005
14. Chen R, Yi EC, Donohoe S, et al : Pancreatic cancer proteome : the proteins that underlie invasion, metastasis, and immunologic escape. Gastroenterology 129 : 1187-1197, 2005
15. Uhlen M, Bjorling E, Agaton C, et al : A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. Mol Cell Proteomics 2005
- 疾患 Omics の臨床検査への応用の現状
16. Branca MA : 'Omic diagnostics trip up on way to clinic. Nat Biotechnol 23 : 769, 2005

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

学生のためのカレントメディカルイングリッシュ 第3版

飯田恭子

●A5 頁224 2005年
定価2,520円(本体2,400円+税5%)
[ISBN4-260-00117-5]

著者のユニークな解説によって、読者は医療にも英語にも興味を抱くはず。英文読解問題をはじめ、単語をはめこむ問題や図表を使った問題など、練習問題も豊富。自習学習者の利便性を考慮して練習問題の解答を巻末に収載。さらに教師用資料の内容を充実させ、教科書としての使い勝手も向上した。

THE LUNG

perspectives

VOL.13 NO.4 2005 別刷

株式会社 メディカルレビュー社

臨床応用を目指した肺がんの プロテオミクス

Lung cancer proteomics for clinical utility

国立がんセンター研究所プロテオーム・バイオインフォマティクス・
プロジェクト プロジェクトリーダー

国立がんセンター研究所所長

近藤 格 *Tadashi Kondo*

廣橋 説雄 *Setsuo Hirohashi*

Key words

オーダーメイド医療, 診断マーカー, 二次元電気泳動, バイオインフォマティクス, レーザーマイクロダイセクション

Summary

発現しているタンパク質の全体像を理解しようとする
試み(プロテオミクス)が盛んに行われている。現在のプ
ロテオミクスの背景には、タンパク質の全体像を捉える
ことの重要性に対する認識と、タンパク質・ペプチドの
質量を精度よく測定して同定する技術がある。細胞の形
質を直接コントロールするタンパク質を調べる試みは、
がん研究において有効である。プロテオミクスは肺がん

の研究においてもメカニズムの解明から診断マーカーの
開発まで幅広く応用されている。国立がんセンターでも
抗がん剤の奏効性や転移に関わるタンパク質をプロテオ
ミクスの手法で同定している。タンパク質の全体像を捉
えるという新しい思想に基づくアプローチで、肺がんの
研究はいつそう発展するであろう。

I プロテオミクスとは

プロテオーム (proteome) とは、発
現しているタンパク質の全体像を表す
概念であり、プロテオームを研究対象
とする学問がプロテオミクス (pro-
teomics) である。タンパク質の発現量、
翻訳後修飾、細胞内局在、分解、そし
てそれらの発生、老化、疾患などに伴
う変化など、タンパク質に関わる事象
をすべて網羅的に調べ、網羅的に調べ

ることではわからなかった知見を得
ることがプロテオミクスの目標であ
る。

2つの要因からプロテオミクスはこ
こ数年注目を浴びるようになった。1
つは、ヒトゲノムプロジェクトが一段
落したという時代背景である。「全体
をみることが重要である」という新し
い概念から出発したビッグサイエンス
が成功を収め、ゲノムの情報を利用し
て mRNA そしてタンパク質について

網羅的な解析を行うことが次の目標
として設定されるようになった。
mRNA の発現を網羅的に調べるトラ
ンスクリプトーム解析の分野ではマイ
クロアレイが普及し、サンプル間で発
現差のある遺伝子の探索については、
一昔前には想像もしなかったほど多
くのデータが一度の実験で得られるよ
うになった。今まで何年もかけて発現差
のある遺伝子を探索していたことを考
えると、驚異的な進歩である。当初は

特定の遺伝子を見つけることだけが目的であったが、ここ数年は発現レベルの全体像に基づくがんの新しい分類も試みられており、臨床医や病理医が経験的に知っていた事象の分子生物学的裏付けがとられつつある。ゲノム情報に基づきRNAレベルで全体を俯瞰することの重要性が提示されたので、同じことをタンパク質レベルで行おうという気運が高まってきたのは当然の流れである。さらに、後述するように、タンパク質レベルでの研究でしか得ることができない重要な現象ががん研究において存在することが従来から知られていたもので、なおさらタンパク質の網羅的解析の可能性が注目されるようになった。

2つ目は、タンパク質の網羅的解析を可能にする技術革新があったことである。タンパク質研究のボトルネックは、実験に必要とされるタンパク質の量にあった。しかし、現在では発現解析の実験やタンパク質の同定は、従来の1,000倍の感度で行うことが可能になっている。鍵となったのは質量分析装置とゲノムデータベースである。現在では、①質量分析装置によってタンパク質・ペプチドおよびその分解産物の質量をきわめて正確に測定し、②測定された質量はどのようなアミノ酸配列に由来するかということゲノムデータベースで検索する、という方法が普及している。このような時代の流れと技術革新が現代のプロテオミクスの背景にある。

II がん研究とプロテオミクス

発がんやがんの進展の主要な原因は

ゲノムの異常の蓄積である。しかし、ゲノムの異常の最終的なアウトプットは、分子レベルでは多くの場合タンパク質の異常であって、タンパク質を直接調べなくてはわからないことが多い。たとえば、mRNAの発現解析を行う場合、mRNAの発現が高ければその翻訳産物であるタンパク質も多く存在しているだろうという考えが背景にある。確かに、mRNAとタンパク質の発現に相関がある遺伝子も多い。しかし、最近の網羅的な発現解析から、mRNAとタンパク質の発現の間には全体としては相関が乏しく、mRNAの発現量の測定でもってタンパク質の発現測定を代用することはできないことが示唆されている¹⁾²⁾。

タンパク質について、DNAやmRNAからわからないことは発現量だけではない。たとえば、タンパク質はmRNAから翻訳されたままの形では機能しないことが多い。タンパク質は翻訳後に適切な部位(膜、核、細胞質)に運ばれたり、リン酸化、糖鎖修飾、切断などを受けたりして初めて本来の働きをしている。しかしながら、タンパク質がどこに局在しどのように翻訳後修飾を受けているのかはDNAの配列やmRNAの量からは今のところほとんど予測することができない。また、タンパク質同士の相互作用やタンパク質の寿命については、配列情報からそれらを予測することは困難である。一方で、腫瘍細胞の形質を直接制御するのはいうまでもなくDNAやmRNAではなくタンパク質である。したがって、タンパク質を直接調べることで「がんの個性」を裏付ける分子機構を新しく提唱できる可能性が高い

と考えられる。どのようにすればタンパク質の様子を詳細かつ網羅的に調べて臨床情報や生物学実験の結果と結び付けることができるか、というのがこのアイデアを具体化する上での問題点である。

III 肺がんのプロテオミクスの現状

数ある悪性腫瘍の中で、肺がんは最もプロテオミクスが応用されている腫瘍であり、論文も多い。本稿では肺がんのプロテオミクスの分野での最近のトピックスを2つ紹介する。

1. オーダーメイド医療のための腫瘍マーカー開発

トピックスの1つ目は、個別化医療のための腫瘍マーカー開発である。遺伝子の発現をmRNAのレベルで網羅的に調べて、がん患者の予後や抗がん剤奏効性を推定しようとする試みが盛んに行われている。種々のデータマイニングの手法を用いることで、複数のmRNAの「発現パターン」を腫瘍マーカーとして使用しようとする試みである。タンパク質レベルで同様のことをしようとする試みを紹介する。

Hanashらのグループ(現・Fred Hutchinson Cancer Research Center)は二次元電気泳動法を用いて肺がんのプロテオーム解析を行っている。二次元電気泳動法は古くからあるタンパク質分離技術であり、タンパク質を定量性よく翻訳後修飾まで含めて解析できるというメリットがある³⁾⁴⁾。この方法は1975年に発表され、盛んに用いられていた時期もあったと聞か

1990年代にはすっかり廃れかけていた。その理由の1つは、二次元電気泳動で観察されるタンパク質が大変微量であり、その構造解析がきわめて困難であったためである。しかし、上述の質量分析装置とゲノムデータベースとによりその問題はほぼ完全に解決され、今ではゲル上で観察されるタンパク質は100%近く同定が可能になった。Hanashらは、肺がんの手術検体のタンパク質発現プロファイルを二次元電気泳動法で作成し、それらをバイオインフォマティクス的手法で解析することにより、肺がん患者の予後の予測に最も役立つタンパク質を20種類同定した⁵⁾。さらに、そのうちPGK-1に関しては、予後の悪い症例において血中発現レベルも増加していることを報告している。

2. 診断や治療のためのプローブ開発

2つ目のトピックは、画像診断や治療のためのプローブ開発である。がん細胞にターゲットを絞った分子標的治療を行ったり、微小ながんを画像で検出したりするためには、がん細胞に特有の分子を見つけ、その分子に特異的に結合するプローブを作製することが重要である。プロテオミクスからのアプローチとしては、狙った細胞のみ特異的に発現するタンパク質を網羅的に同定して、それぞれに対応するプローブとして抗体などを作製することになる。腫瘍細胞特異的なタンパク質であっても細胞内タンパク質の場合は、それらに対する抗体を作製しても細胞内にまで到達しないことが十分考えられる。したがって、分子標的としてはプローブがアクセスしやすいタン

パク質が好ましいであろう。それでは、どのようにしてそのようなタンパク質をプロテオミクスの手法で同定できるのだろうか。

Ohらは、肺がん組織に含まれる血管の内皮細胞の膜タンパク質に注目した⁶⁾。血管内皮細胞は組織ごとに性格が異なるだけでなく、同じ臓器でも正常組織と腫瘍組織では含まれる血管内皮細胞の性格が異なる。彼らは、特定の組織の血管内皮細胞の細胞膜だけを回収する技術を開発し、回収された細胞膜のプロテオミクスを行った。このように特定の臓器や細胞内小器官を対象を絞ったプロテオーム解析は、「フォーカスド・プロテオミクス (focused proteomics)」と呼ばれている。発現しているタンパク質全部を一度の解析でカバーすることは、プロテオミクスのどのような技術をもってしても不可能である。研究対象を絞り、プロテオームの特定の分画だけを回収してから解析を行うことで、サンプルの複雑度を下げ、結果的に研究対象の事象に関わるタンパク質を多く観察できるようになる。彼らは正常肺組織と肺がん組織の血管の内皮細胞の膜タンパク質を比較し、後者に特有のタンパク質がいくつか存在することを発見した。同定されたタンパク質であるannexin I に対する抗体を担がんマウスに静注してみると、腫瘍は縮小し生存時間は著しく改善された。本方法は、腫瘍細胞にターゲットを絞った治療法の開発や、通常の画像診断では発見が困難な微小な腫瘍の早期診断や転移の発見に役立つであろう。

IV

国立がんセンターにおける取り組み

1. がんのプロテオーム解析を支える技術基盤

国立がんセンター研究所プロテオーム・バイオインフォマティクス・プロジェクトでは、多くの臨床検体を用いた大規模な肺がんのプロテオーム解析を行っている。技術基盤になっているのは蛍光二次元電気泳動(2D-DIGE)法である。2D-DIGE法ではタンパク質を蛍光色素で標識してから泳動するが、実験サンプルとは異なる蛍光色素で標識した内部標準を泳動することで電気泳動によるばらつきを解消することが可能になっている。筆者らは、ここにさらにさまざまな工夫を凝らすことで、他では例をみないプロテオーム解析を行っている。その一端を紹介する。

質の高いプロテオーム解析への第一歩は、正確なサンプリングである。腫瘍組織の中には腫瘍細胞以外に実にさまざまな細胞が含まれている。プロテオーム解析をどんなに正確に行うことができたとしても、腫瘍組織をまとめてすり潰していたのでは何のプロテオームをみているのかわからなくなってしまう。腫瘍組織に含まれる間質もがんの生物学においては重要であり、ゆえに腫瘍組織をまるごと扱うべきだとの意見もある。腫瘍細胞の周囲の間質ががんの進展に重要な役割を果たしていることは確かであり、間質のプロテオミクスは大変興味深いテーマである。しかし、それならば間質細胞のみレーザーマイクロダイセクションで回収して比較するべきである。筆者は、

レーザーマイクロダイセクションで得られる腫瘍細胞のプロテオーム解析を、超高感度の蛍光色素を使って行っている⁷⁾。従来はレーザーマイクロダイセクションには膨大な時間がかかっていたが、通常の染色法の100倍もの感度をもつ蛍光色素を応用することで、レーザーマイクロダイセクションにかかる時間は大幅に短縮された。筆者のラボでは、手術検体を使う場合は、保存状態の許す限りレーザーマイクロダイセクションで凍結切片から細胞を回収している。肺がんに関しては、組織型⁸⁾や転移能に関係するタンパク質の同定を行っている。この方法は最近では普及し、胃がん⁹⁾や膵がん¹⁰⁾のプロテオミクスにも使用されている。

次に、二次元電気泳動の網羅性を高めるために、通常よりかなり大きなゲルを用いて二次元電気泳動を行っている。市販の泳動装置ではEttan Dalt II (アマシャムバイオサイエンス株式会社)が最大であるが、Ettan Dalt IIでは約2,000個以下のスポットしか観察できない。しかしゲルのサイズを大きくして解像度を上げると8,000個ものスポットを観察できることが報告されている¹¹⁾。大きなゲルで網羅性を高めるといふ方法の限界は、染色できるゲルのサイズが限られていることである。あまりに大きなゲルは、ゲルの強度の問題で染色が困難である。2D-DIGE法においては、タンパク質サンプルは蛍光色素で標識されてから二次元電気泳動で分離され、ゲルをレーザースキャナーでスキャンして画像を取得する。そのときゲルはガラス板に挟まったままの状態でレーザースキャナーに乗せられるので、ゲルの強

度は全く問題にならない。2D-DIGE法では、ゲルの強度についてだけいえば、理論的にはゲルはいくらでも大きくできる。この方法の限界はスキャナーの面積である。筆者のラボでは、市販されている中では最大サイズのスキャナーに合わせた大きさのゲルが12枚同時に泳動できる泳動装置を作成し、泳動を行っている。

プロテオームのデータ解析にはDNAマイクロアレイの解析と同様のバイオインフォマティクスの手法を用いている。臨床検体を用いたプロテオミクスでは、二次元電気泳動から得られる膨大なデータを臨床情報と結び付け重要な事象(転移、予後、抗がん剤耐性など)の背後にあるタンパク質のあり方を調べるのが要求される。二次元電気泳動を用いたプロテオミクスといっても、スポットを1つ1つ見比べていたのではウエスタンブロットを違う抗体で何100回もしたのと同じことであり、その発想は30年前に二次元電気泳動が初めて世に出た頃と比べて本質的に進歩がない。タンパク質同士の発現の相互関係を調べ、発現の背後にある関係性をみつけることが全体像を理解することにつながるものであり、また近年の二次元電気泳動ではそのような解析を可能にするほどに性能が高くなっている。筆者のラボではDNAマイクロアレイ用に関与されたソフトや一般的なデータマイニングのソフトを使用して、二次元電気泳動から得られるデータを臨床情報と関連させて解析を行っている。発現レベルだけでなく翻訳後修飾や細胞内局在の情報をどれだけ活用できるかが今後の課題であると考えている。

最後に、質量分析装置によるタンパク質の同定の工夫である。前述したように、二次元電気泳動の最大の弱点はスポットに対応するタンパク質の同定が著しく困難ということであった。昔は対応するタンパク質が何かわからないので、スポットそのものを腫瘍マーカーとして使用するという論文も数多くあった。しかし、そのような考えは電気泳動を専門とする狭いコミュニティの中でしか通用せず、やがて二次元電気泳動は廃れていったわけである。今ではタンパク質の抽出効率を高めると同時に、よく整備された高性能の質量分析装置を使用することで、ほぼ100%の成功率でタンパク質の同定が可能である。

2. 肺がんの治療成績の向上を目指した取り組み

筆者のプロジェクトでは、肺がんのプロテオミクスとして、ゲフィチニブの奏効性に関連するタンパク質の発現を調べている。奏効性がある患者群をあらかじめ識別することで治療成績を向上させることができるし、同定されたタンパク質を調べることで耐性のメカニズムを調べたり、創薬のきっかけになるのではないかと考えている。ゲフィチニブの奏効性とEGFR (epidermal growth factor receptor)の変異が関係するとの報告がいくつも発表されているが、奏効性・耐性・副作用のメカニズムを理解するためにはさらなる研究が必要である。その他にも、肺腺がんの病理分類を裏付けるタンパク質発現パターンや、リンパ節転移に関連するタンパク質発現パターンなどを調べている。筆者のプロジェクトで

は、同じようなプロテオミクスの試みは他の悪性腫瘍(肝がん, 骨軟部腫瘍)でも行われており, それらでは既により結果が得られていることから, 肺がんでも成果を期待している。

V これからの展望

プロテオミクスは, タンパク質の全体像を研究対象とする今までになかった新しい学問である。ここ数年のプロテオミクス関連技術の発展は目覚ましく, 新しい技術をがん研究に応用することで今まで予想していなかった現象を発見できる時代にわれわれはいる。一方で, プロテオミクスの技術の応用の仕方は多くの場合は依然として従来の学問の延長線上にあることから, これからはプロテオミクスならではの発想に基づく研究がブレークスルーのきっかけになるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, et al : Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19 : 1720-1730, 1999
- 2) Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al :

- Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1 : 304-313, 2002
- 3) O'Farrell PH : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250 : 4007-4021, 1975
- 4) Klose J : Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26 : 231-243, 1975
- 5) Chen G, Gharib TG, Wang H, et al : Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 13537-13542, 2003
- 6) Oh P, Li Y, Yu J, et al : Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 429 : 629-635, 2004
- 7) Kondo T, Seike M, Mori Y, et al : Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics* 3 : 1758-1766, 2003
- 8) Seike M, Kondo T, Fujii K, et al : Proteomic signatures for histologi-

cal types of lung cancer. *Proteomics* 5 : 2939-2948, 2005

- 9) Greengauz-Roberts O, Stoppler H, Nomura S, et al : Saturation labeling with cysteine-reactive cyanine fluorescent dyes provides increased sensitivity for protein expression profiling of laser-microdissected clinical specimens. *Proteomics* 5 : 1746-1757, 2005
- 10) Sitek B, Luttgies J, Marcus K, et al : Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 5 : 2665-2679, 2005
- 11) Klose J, Nock C, Herrmann M, et al : Genetic analysis of the mouse brain proteome. *Nat Genet* 30 : 385-393, 2002

近藤 格

平成 8 年 岡山大学医学部医学研究科

(博士課程)修了(細胞生物学)

現在, 国立がんセンター研究所プロテオーム・バイオインフォマティクス・プロジェクト プロジェクトリーダー

専門分野 : がんのプロテオミクス

E-mail : takondo@gan2.res.ncc.go.jp

G.I. Research

別刷

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 浜町花長ビル

膵癌マーカー

佐々木一樹*

血中低分子量蛋白質・ペプチドの発現解析にもとづく腫瘍マーカーの探索が、プロテインチップシステムとよばれる質量分析計の普及にともない現実味を帯びはじめている。本特集で紹介されているように、本法は、さまざまな化学表面をもつプレートを用いるのが特徴的であり、血液や臨床材料など、従来の質量分析法では不得手とされてきた試料の分析を可能とした。早期発見に有効なマーカーが存在しない膵癌の領域でも、実際の血液検体を用いてのマーカー探索が盛んに実施されている。本稿ではその現状と展望について言及する。

はじめに

膵腫瘍のおよそ9割を占め、最も予後不良な浸潤性膵管癌について本稿では記載する。膵管癌で広く使用されてきた腫瘍マーカーのCA 19-9は、糖鎖抗原の一種で、ヒト腫瘍を移植した担癌動物の免疫系で認識される物質として同定されている分子である。CA 19-9は、Stage II以上では80%以上の症例で陽性になるものの、良好な治療成績が得られる可能性の高いStage Iでは陰性であることが多い。また、ほかの消化管の腺癌でも陽性になり、肝・胆・膵の良性疾患でも陽性になる割合が無視できない点などから、現在のところ早期発見に有用な腫瘍マーカーとはいえない。また、CA 19-9の検査で検出されているのはシアリルLe^aとよばれる糖鎖であり、これはLewis式血液

型物質の関連しているため、日本人の10%程度は膵癌になってもCA 19-9が陽性にならないといった問題も抱えている。現在、腫瘍マーカー開発の領域では、蛋白質・ペプチドの発現解析の流行に先立ち、SAGE(serial analysis of gene expression)法や、オリゴマイクロアレイ・cDNAマイクロアレイにより膵癌で高発現を示す遺伝子が同定され、その蛋白質レベルでの評価が徐々に報告されはじめているが^{1)~4)}、本稿では割愛する。

1. SELDI法による癌診断の試み

1993年に表面改良型レーザー脱離イオン化質量分析法(Surface enhanced laser desorption ionization: SELDI)が発表された⁵⁾。当初はほとんど注目を受けなかったが、2001年の米国癌学会で、血清を用い、大腸癌、卵巣癌などについて早期を含め9割を超える感度と特異性を達成したという発表がされた。これは、血清をそのままSELDIプロテインチップに1 μ lほど塗布し、分子量10 kDa以下の領域のマスペクトルを取得し、その質量数とピーク強度をもとに、機械学習

【キーワード】

SELDI
膵癌
質量分析
血液検体

* Kazuki SASAKI/国立循環器病センター研究所薬理部

法でデータ解析をおこなう方法であった。手技の簡便さも相まって、類似手法が多数報告され、米国を中心に大きな反響をよんだ。翌年の2002年春に *Lancet* 誌に卵巣癌を対象として最初の論文発表をしたグループの解析データはウェブ上に公開されたこともあったが、データは改変されており再現不能であるという指摘もなされていた⁶⁾。また、癌と正常を識別しうるピークとして質量/電荷比 (m/z) 900 以下のピークが計上されていたが、SELDI のイオン化法は基本的に MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization: マトリックス支援レーザー脱離イオン化) 法と同じであり、そのような低分子域に出るピークをマトリックスと識別するのは、量的な観点からも事実上不可能であることから、質量分析の分野からも疑問がなげかけられていた。

2. 昨今の解析

SELDI のプロテインチップは、試料添加表面がさまざまに加工されており、異なる種類のチップを用いることで、同一試料から異なるスペクトルパターンが得られる。膀胱癌のマーカー探索では、膀胱液、培養細胞の上清の分析が当初実施され、目的ピークを同定していく作業が一般的であった^{7,8)}。現在は、膀胱癌を含めほぼすべての癌で、100 μ l 以下の血清または血漿を用いて、試料をあらかじめイオン交換担体を用いて段階的に複数に分画し、異なる種類のプロテインチップを用いてスペクトルを取得し、さまざまな機械学習法で、癌と正常を明瞭に識別しうるピークセットを選択する手法が主流となっている⁹⁾。実際には2~5個のピークセットにもとづいて、癌症例と健常者との検討で、特異性と感度が9割以上であると報告している論文が多い。その質量値はほとんどの場合2~15 kDa 程度までに集中しているが、この領域の分子量のポリペプチドの構造決定は煩雑な操作を要することもあり、同定されている事例は少ない。しかしながら、同定されている事例では、ほ

とんど全部が血漿蛋白質の断片ペプチドである。これらが実際の病態生理上どのような意味合いをもっているかは現状では不明である。腫瘍塊の大きさと検出感度などから見積もると、癌細胞自身が産生分泌している物質であるとは考えにくい。一方で、癌細胞そのもの、あるいは宿主側との相互作用の結果として活性化されたプロテアーゼのカスケードの最終産物とみなすことを積極的に否定することは難しい。血液のようなきわめて複雑度の高い試料を解析する場合、段階的分画とプロテインチップの組み合わせで再現性よく検出できるピークの数に限定されており、質量分析計の感度を考慮すると、同定されたペプチドは存在量が多い(少なくとも10 μ g/ml 以上)蛋白質の断片に由来するのは妥当である。分画しているとはいえ、血液のような混合度の高い試料を質量分析している点にかわりはないため、健常群と疾患群で相対強度が2,3倍異なって呈示されてくるピークについて、実際に定量した場合の量的な差異がどの程度であるかについても不明な点が多い。

また、SELDI 法で用いられた当初の質量分析計は、感度を最優先する目的でリニア型の短い飛行管を搭載していたために、質量精度と分解能が犠牲になりやすい傾向があった。現在では SELDI プロテインチップは、通常四重極-飛行時間型質量分析計でも測定可能になっており、この装置によってマススペクトルを取得する試みもはじまっている¹⁰⁾。また、特定の操作で選択をかけた血液分画についてエレクトロスプレーイオン化法の質量分析計でその包括的なマススペクトルを取得し、SELDI と同様に機械学習法で診断マーカーを開発しようとする試みもあるが、実態は不明である。

3. 実際的な問題点

SELDI による分析では、チップ表面での試料調製が可能であり、いったん試料が準備できるとマトリックスを添加しての測定のみであるため、非常に簡単なものと考えられがちであるが、実際は

盲点が多数あることに留意する必要がある。データ解析の際には、質量と相対強度の数値のみに依存することになるため、アーチファクトを極力排除し、信頼性のあるデータを取得するうえで最も重要なのが採血直後からの検体の取り扱いである。実際に留意すべき点を列挙する。

1) 血清検体

最も容易に試料を集めやすいのは血清であり、米国から発表される SELDI の論文は大半が血清を対象としている。しかし、膀胱癌をはじめとする多くの症例では、血液凝固・線溶系に異常をきたしている場合が多い。凝固促進剤を加えた真空採血管で回収された場合でも、凝固しない場合もある。血清は、採血後に凝固まで放置されることが多く、保管状況が不明になっている検体が多い。筆者の検討では、血清中には凝固過程で生じる多量のフィブリノペプチドの断片が放出されている。診断における高感度と特異性をうたっている論文でも、検体の取り扱い法について明確に記載している事例は少なく、施設間で再現性が確保されない要因の一つであると考えられる。

2) 血漿検体

血漿としては、抗凝固剤としてヘパリンやエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) が一般的だが、目的により使い分ける必要がある。プロテアーゼ阻害薬として採血管で用いられるトラジロールを用いると、これは分子量約 6.5 kDa のペプチドであり、解析にあたって障害となるため、使用は不适当である。血漿は凝固反応が抑制されているはずであるが、実際に健常者の血漿中のペプチドを網羅的に分析してみると、フィブリノペプチドの関連ピークがかなりの頻度で見出される場合もあり、採血ごとにばらつきが生じるのは事実である。よって、分画した試料を解析する場合も、これらのピークの影響を受けにくい状態で測定可能な条件を各実験者が設定する必要がある。膀胱癌の検体

では、血漿でもフィブリン塊などが生成しているものも少なからずみうけられる。

また血球成分との分離は遠心分離でおこなうが、その温度は一定にしておく必要がある。低温で遠心すると、血小板や白血球より脱顆粒した内容物が血漿中に多量に放出されることにも注意が必要である。

3) その他

血液は体内ではプロテアーゼとインヒビターのバランスが保たれているが、一度体外に取り出されると、凝固系・線溶系の活性化に付随してさまざまなプロテアーゼが活性化されるのは周知である。いったん凍結した後に解凍すると、さらに分解が進行することにも留意する必要がある。

SELDI での分析で低分子量蛋白質をターゲットにする場合、アルブミンなどの蛋白質との非共有結合を抑制するために、尿素などを添加することが多いが、尿素入りの試料を希釈すると、プロテアーゼによっては活性化するものがあり、調製試料を希釈する際にも温度変化などに留意が必要である。

4. スペクトル解釈上の留意点

二次元電気泳動法 (2-DE) で一つのスポットに複数種類の蛋白質が含まれていることはよく知られているが、質量分析においても、分解能が低い場合には、s/n が大きく、裾野をひくピークの下に、ピークが複数隠れてしまっている点にも注意する必要がある。四重極-飛行時間型質量分析計は高分解能のため、また異なる注意が必要となってくる。例えば、生体試料のような複雑な試料を測定する場合、分画したとしても、同一分画内に、1 Da 違いの別種のペプチドが同時に存在することがある。これは同位体分布に注意することで回避しうる。また、前述のように、マルチマーカー解析で重要なものと位置づけられたペプチド断片で、スペクトル上で相対強度が高いピークの場合、

同一分子由来の関連ピークが随伴してスペクトル上に出現する場合があります（例えば、メチオニン残基の酸化に伴う 16 Da シフト，ナトリウム付加に伴う 22 Da シフト），違うペプチドと誤認しないよう注意が必要である。また，試料を液体状態で長期保存するとアスパラギン，グルタミンの脱アミドが生じることもある。

5. 膵癌の診断への応用

多くの癌で，特定の質量値の組み合わせからなるピークセットがマーカーとして有効であるとして多数の論文で報告されているが，膵癌の領域で実用化するまでには検討すべき多数の事項を抱えている。まず，そのマーカーに臓器特異性があるか否かが問題になる。仮に，切除可能の膵癌の 9 割で陽性になる特定のピークセットが存在するとしても，それが他臓器の癌でも高い頻度で陽性になる場合は，確定診断に要する時間とコストの削減にはなり難い。しかし，膵臓という臓器を強く特徴づけるピークセットならば，例えば，良性の膵管内乳頭腫瘍で陽性になったとしても，膵臓の精査に進めるので臨床的な意義は認められる。慢性膵炎と膵癌を明瞭に識別できるマーカーは遺伝子レベルを含め，これまでに見出されていないことを考えると，SELDI にもとづく解析においても慢性膵炎との鑑別診断には期待できない可能性もある。膵癌組織では炎症性病変が随伴していることを考慮すると，慢性膵炎に限らず，炎症性の膵疾患と，悪性腫瘍をマーカーのみで識別するのは相当な困難が予想される。いずれにせよ，Stage I で見つかる膵癌症例はきわめて少ないため，画像診断の進歩とあわせて治癒可能な膵癌症例が増えるようになれば，非常に有意義である。

イオン交換などで分画した試料について，SELDI プロテインチップを四重-極飛行時間型質量分析計で解析する現在のアプローチは，相応の設備を必要とし，再現性を含めた多施設間での大規模研究が，実用化までに必須である。検体採取

に関して現場の理解と協力を得ることは重要であり，採血後の取り扱いについてどの程度の条件まで許容されるのかについて明らかにする作業も重要である。

また，仮に早期診断に有効であることが確立した際にも，血液検体の分画操作が必須である点は今後も不変であると予想される。分画を回避して，目的ペプチド断片のみを検体から検出するためには，よい抗体が必要であり，その抗体を SELDI プロテインチップ上に固定化し，抗体に補捉されたペプチドを質量分析する手法が望ましい。それによって，従来の免疫学的測定法単独では不可能であった「特定の大きさの分子そのもの」を検出することが可能となる。「一本釣り」の手法で同定されているマーカーについてもその事情は同様であり，従来の腫瘍マーカーと同様に複数のマーカーの同時評価が実施されていくと予想される。今のところは米国 NCI を中心とした Early Detection Research Network¹¹⁾では膵癌に力点が置かれているとは言い難い。

おわりに

膵癌の臨床の現場で，究極的に望まれるのはハイリスク群を絞り込めるマーカーである。癌関連遺伝子に胚細胞性変異を起こしている（リー-フラウメニ癌症候群）家系やポイツ-ジェガーズ症候群の家系は膵癌発症のリスクが高いが，大多数の膵癌症例ではこのような遺伝的素因は不明であり，疫学的な研究による危険因子の同定もなされておらず，一般集団の中からハイリスク群を絞り込めるようになる見通しは現在のところはない。この 1~2 年で，腫瘍マーカー探索の分野は急速に進歩することが予想されるが，多くの問題を克服したうえで SELDI で見出されたピークが膵癌の診療に供されるようになることを期待したい。

謝辞：

本稿の執筆に際し中森正二先生（国立病院機構大阪医

療センター外科) から貴重なコメントを賜った。

文 献

- 1) Argani P, Rosty C, Reiter RE *et al* : Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression : prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **61** : 4320-4324, 2001
- 2) Hustinx SR, Cao D, Maitra A *et al* : Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther* **3** (Epub ahead of print) : 2004
- 3) Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA *et al* : Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers. *Clin Cancer Res* **10** : 2386-2392, 2004
- 4) Missiaglia E, Blaveri E, Terris B *et al* : Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidatemarkers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer* **112** : 100-112, 2004
- 5) Hutchens TW, Yip TT : New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7** : 576-580, 1993
- 6) Sorace JM, Zhan M : A data review and re-assessment of ovarian cancer serum proteomic profiling. *BMC Bioinformatics* **4** : 24, 2003
- 7) Rosty C, Christa L, Kuzdzal S *et al* : Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* **62** : 1868-1875, 2002
- 8) Sasaki K, Sato K, Akiyama Y *et al* : Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT 1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **62** : 4894-4898, 2002
- 9) 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* **10** : 860-868, 2004
- 10) Conrads T, Zhou M, Petricoin E *et al* : Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev Mol Diagn* **3** : 411-420, 2003
- 11) <http://www3.cancer.gov/prevention/cbrg/edrn/publications.html>