

Annual Review 呼吸器 2007

2007年1月20日発行

中外医学社

5. プロテオミクスの臨床応用への期待

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研究員 下重美紀
同 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト室長 本田一文
同 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト室長 尾野雅哉
同 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト部長 山田哲司

key words proteomics, biomarker discovery, MALDI, SELDI, mass spectrometry

動 向

ヒトゲノムプロジェクトにより約2万～2.5万の遺伝子の存在が推測されている¹⁾が、選択的スプライシングによっておそらく数十万種のmRNAが作られている。また、mRNAから遺伝子産物としてタンパク質に翻訳された後も特定のプロテアーゼなどによる切断、リン酸化、糖鎖付加をはじめとする翻訳後修飾、ユビキチン・プロテアソームシステムなどによる分解によって質的に多種多様に変化したタンパク質が量的変化を伴い発現している。さらに、タンパク質が機能し、生命現象を司るためには、細胞内の特定の部位に局在し、複数のタンパク質が複合体を形成し相互作用を必要とすると考えられている(図1)。これらのプロテオームの複雑性から、ゲノム解析によって得られた情報のみでは、悪性腫瘍をはじめとする複雑な臨床病態を呈する疾患の発症および進展メカニズムを解明するには不十分であり、タンパク質の量的および質的变化を包括的に捉える必要がある。タンパク質の発現を網羅的・体系的に解析する方法として、二次元電気泳動法がもっぱら用いられてきたが、発現量の低いタンパク質、細胞膜貫通ドメインなどの疎水性の高い部分をもつタンパク質、塩基性または酸性の強いタンパク質、分子量10万(100 kDa)以上の高分子タン

パク質などの解析は容易ではなかった。

近年、質量分析計の急速な技術革新により、従

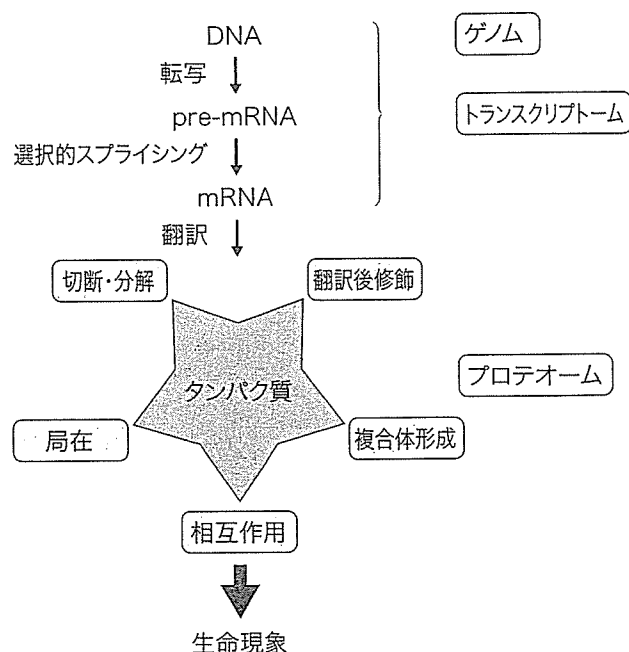


図1 プロテオームの複雑性

ヒトゲノムには約2万～2.5万の遺伝子の存在が推測されているが、選択的スプライシングによっておそらく数十万種のmRNAが作られる。mRNAからタンパク質に翻訳された後も特定のプロテアーゼによる切断、リン酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾、ユビキチン・プロテアソームシステムなどによる分解によって多種多様に変化したタンパク質が生じ、量に変化する。さらにタンパク質が機能し生命現象を司るためには、細胞内の特定の部位に局在し、複数のタンパク質が複合体を形成する必要がある。

来では考えられなかった感度でタンパク質のアミノ酸配列が決定されるようになってきている。さらに質量分析計により直接タンパク質を検出し、定量化する試みがなされている。疾患の発症ならびに進行に伴う体液や組織、細胞のプロテオームの変動を系統的にプロファイリングすることで、疾患に関連して発現レベルが変動するタンパク質、ペプチドセットを同定し、治療標的分子の同定や診断バイオマーカーの開発に結びつけようと、様々な疾患でしのぎを削ったプロテオーム研究が世界中で行われている。もちろん、呼吸器疾患分野においても例外ではなく、肺がんをはじめとし、様々な疾患を対象として精力的な研究が行われている²⁻⁹⁾。

本稿ではまず質量分析を用いたタンパク質の網

羅的な発現解析方法について紹介し、さらに非侵襲的に採取可能であり、生体内の生理的変化を反映した情報を有する血清や血漿などの血液検体を用いたバイオマーカー探索とその臨床応用について述べる。

A. 質量分析によるタンパク質発現解析方法

質量分析による網羅的なタンパク質発現解析法には大きく分けて2つの方法がある。タンパク質・ペプチドをそのまま解析する方法（トップダウン法）（図2）とトリプシンなどの基質特異性の高い酵素で物理化学的な性状がより均一なペプチドへと消化し解析するショットガン法である（図

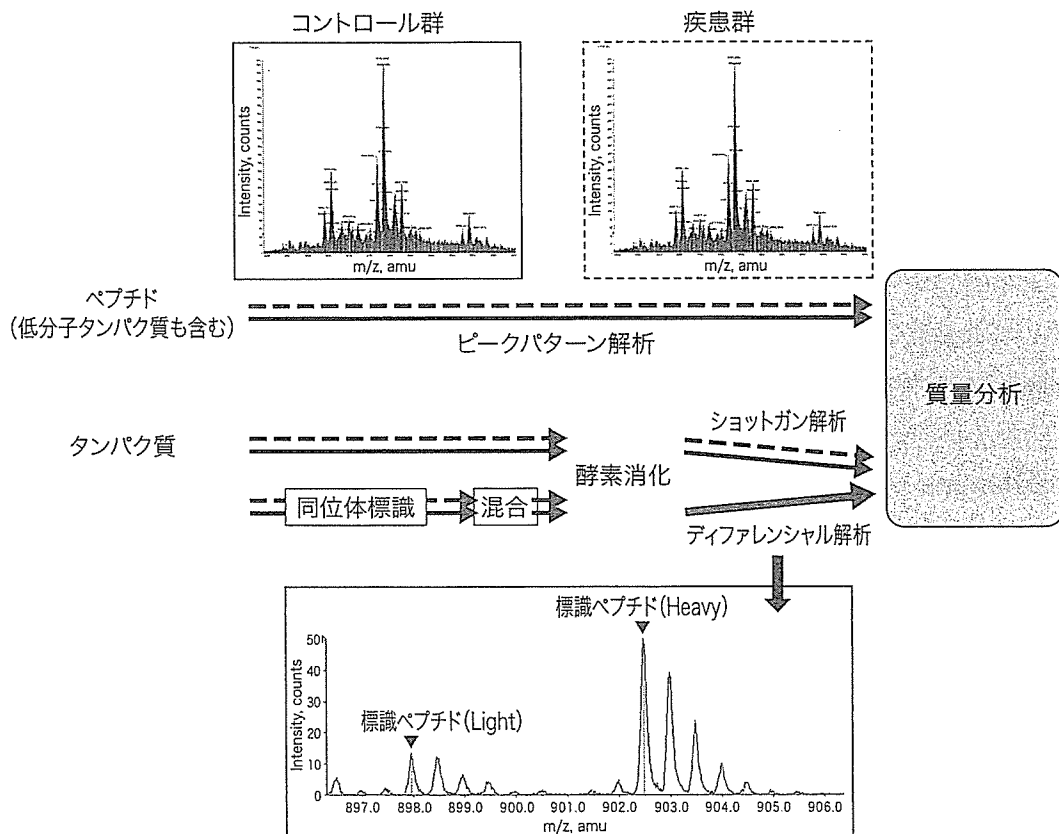


図2 質量分析によるマーカー検出

質量分析による定量解析には、SELDI-MS法やMALDI-MS法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（トップダウン法）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、ペプチドとして解析するショットガン法がある。ショットガン解析では安定同位体タンパク標識法を応用することで、定量的なディファレンシャル解析が可能である。

2).

トップダウン法では、測定可能な質量範囲の比較的広いマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry) が用いられることが多い。2003年に Yanagisawaらは肺腫瘍組織の凍結切片を用いて直接MALDI-MS法により腫瘍組織の局所に存在するタンパク質を測定し、得られたピークパターン(プロファイリング)により正確に肺がんの組織型が診断できることを報告した。さらに、肺非小細胞がん患者のリンパ節転移や予後が判定できるタンパク質を見出している⁷⁾。後に詳述する表面増強型レーザー脱離イオン化質量分析 SELDI-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry) はMALDI-MSの変法である。

一方、ショットガン法では液体クロマトグラフィー liquid chromatographyに接続されたエレクトロスプレー質量分析ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) を用いることが多い。複数の性質の異なるカラムを用いた多次元液体クロマトグラフィーは検体の複雑度を下げることができ、低発現量のタンパク質の同定に適している。肺腺がん由来のがん性胸水を2D nano-HPLC-ESI-MS/MS (two-dimensional nano-high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry) によって解析した検索では、1415種のタンパク質が同定され、胸水に特異的に存在するタンパク質があることが示されており⁸⁾、今後のさらなる解析が期待されている。

さらに、ICAT (isotope-coded affinity tag), iTRAQなどの化学反応を用いた*in vitro*または培養細胞の代謝を利用した*in vivo*安定同位体標識法を応用することで、ショットガンプロテオミクスにおいても比較定量(ディファレンシャル解析)(図2)が可能である。ICAT法では比較したい2

群の検体を、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それぞれ標識し、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。しかしながら、安定同位体標識法は反応のステップが多く、臨床研究のような多数検体の解析が必要な研究には不向きであった。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、質量分析計で定量し、ペプチドをその質量/価数(m/z)と量を2(ないし3)次元画像として表す2DICAL (two dimensional image converted analysis of nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry)法を開発した¹⁰⁾。簡便であるが、網羅性と再現性に優れ、臨床検体を用いたショットガンプロテオミクスに適した方法であると考えられる。

B. 機械学習法によるバイオマーカー検索

プロテオーム解析で得られる膨大なデータを臨床情報と関連させ、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の手段が必須である。われわれの研究室で行っている機械学習法の概要を示す(図3)。年齢、性別、採血法、採血時期を可能な限り一定にした偏りがない疾患群とコントロール群の検体を学習セットとして用意する。まずは、このセットの質量解析から得られたスペクトルのピーク情報を定量的に検出する。単一のピークのみを用いた最終判別は十分な判別率が得られ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[サポートベクターマシーン、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(線形、非線形)]を用いて、疾患群とコントロール

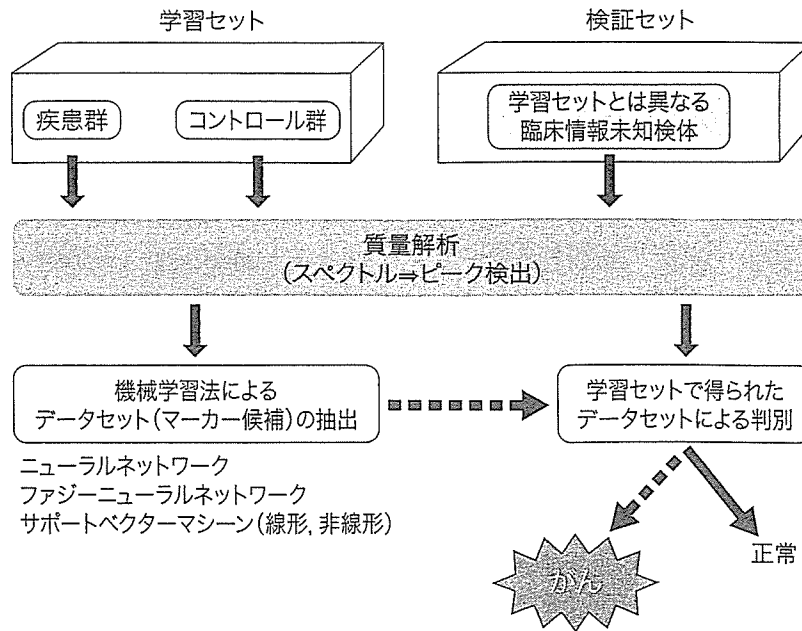


図3 マーカー分子の抽出およびその評価

厳密にその付帯情報（年齢、性別、採血法、採血時期など）が管理された疾患群とコントロール群の検体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を用いて、がん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、臨床情報が未知の全く別の検体を検証セットとして評価する。

群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。この段階では、単に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、生物学的に意味ある分類であるかどうかは不明である。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初めて、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がもち込まれたとしても高い判別率でがんか否かを判定することが可能である。

C. 血液バイオマーカー検索

高感度で高特異度を有する血液腫瘍マーカーの開発のため、血清・血漿のプロテオーム解析が注目されている。血液中にはアルブミンやイムノグロブリンなどタンパク質が大量に存在する。存在量上位22タンパク質の合計が全体の99%を占める¹¹⁾ため、腫瘍マーカーとなりえるような低発現量タンパク質やペプチドを解析するためには、何らかの前処理によってこれらを除く必要がある。

2002年に米国国立がん研究所National Cancer Institute (NCI) と米国食品医薬品局Food and Drug Administration (FDA) の研究グループが早期卵巣がんを感度100%、特異度95%の正確性で診断できる低分子量タンパク質とペプチドの発

現パターンを報告した¹²⁾。この研究は、がんの診断マーカー開発方法としてプロテオミクスの可能性を提示した点で世界中に衝撃を与えた。ここで用いられた方法は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ProteinChipと質量分析とを組み合わせた上記のSELDI-MS法である。YangらはSELDI-MS法を用いて肺がん患者158例と健常者50例の血清プロテオーム解析を行い、11,493, 6,429, 8,245, 5,335 and 2,538 Daの5つを用いた決定木decision tree解析により、肺がん、特に非小細胞性肺がんが91.4%の高感度で検出できたことを示し、既存の腫瘍マーカー(cytokeratin-19 fragments, およびneuron-specific enolase)に比べ、感度・特異度ともに優れていたと報告している⁹⁾。

近年、われわれの研究室においても様々な改善および創意工夫を行いながら、SELDI-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、有効ながん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割を占める腎細胞がんの早期診断マーカーを検索することを目的とした検討¹³⁾では、解析に供した血清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、さらに各分画を疎水性、金属親和性、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、得られたピークを図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により、感度、特異度ともに良好に腎細胞がん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たため、高分解能型四重極飛行時間型質量分析計を用い、膵臓がんの血漿腫瘍マーカーの探索を行ったところ¹⁴⁾、

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がん患者の100%の検出が可能である、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。膵臓がん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。

バイオマーカーは、がんの診断だけでなく、個別化治療選択のための診断にも応用可能な検査法としてその有用性が注目されている。われわれは進行食道がん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)の奏効性を予測しうるマーカー分子の検索を行った¹⁵⁾。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判定マーカーとなりうる4つのピークを抽出することに成功している。

D. 臨床検査への応用

今後の課題としては、質量解析により得られたピークパターンのみを用いた臨床検査への応用を現実化するためには、検体採取から質量解析に至る一連のシステムの標準化が必要となってくる。解析技術以上に重要なこととして、検体の取り扱いおよびその付帯情報の管理を厳格に行わなければならないことはいままでのない。また、現時点では安易ではないが、ピークより得られた質量情報からアミノ酸構造を決定し、特異的抗体を作製することにより、従来行われている酵素法など生化学検査のバリエーションとして加えることができると考えている。

むすび

プロテオミクス技術が徐々に生物学分野に普及

を始めてきた2002年にMALDIおよびESI法という質量分析には欠かせぬタンパク質分子のイオン化法の開発をはじめとした功績に対してノーベル賞が授与されて以来今日に至るまで、プロテオミクスは技術面で着実な発展を遂げてきている。同時に検体量の限られた生体試料を対象とした“疾患プロテオミクス”の解析技術も短期間で飛躍的な進歩を遂げ、臨床応用をめざした、診断、薬剤奏効性判定マーカーなどが次々と報告されてきている。近い将来、これらの地道な研究成果としてのバイオマーカー情報のデータベース構築により、あらゆる疾患の診断や個々人で異なる薬剤奏効性情報などが簡易な臨床検査により享受できる日が必ず来るものと考えている。

文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004; 431: 931-45.
- 2) Ali IU, Xiao Z, Malone W, et al. Plasma proteomic profiling: search for lung cancer diagnostic and early detection markers. *Oncol Rep*. 2006; 15: 1367-72.
- 3) Granville CA, Dennis PA. An overview of lung cancer genomics and proteomics. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32: 169-76.
- 4) de Torre C, Ying SX, Munson PJ, et al. Proteomic analysis of inflammatory biomarkers in bronchoalveolar lavage. *Proteomics*. 2006; 6: 3949-57.
- 5) Kriegova E, Melle C, Kolek V, et al. Protein profiles of bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173: 1145-54.
- 6) Murphy VE, Johnson RF, Wang YC, et al. Proteomic study of plasma proteins in pregnant women with asthma. *Respirology*. 2006; 11: 41-8.
- 7) Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2003; 362: 433-9.
- 8) Tyan YC, Wu HY, Lai WW, et al. Proteomic profiling of human pleural effusion using two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005; 4: 1274-86.
- 9) Yang SY, Xiao XY, Zhang WG, et al. Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer*. 2005; 5: 83.
- 10) Ono M, Shitashige M, Honda K, et al. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2006; 5: 1338-47.
- 11) Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, et al. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2003; 2: 1096-103.
- 12) Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002; 359: 572-7.
- 13) Hara T, Honda K, Ono M, et al. Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Urol*. 2005; 174: 1213-7.
- 14) Honda K, Hayashida Y, Umaki T, et al. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res*. 2005; 65: 10613-22.
- 15) Hayashida Y, Honda K, Osaka Y, et al. Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 8042-7.

特集

がん対策・2

がん検診の新技术に関する展望②
バイオテクノロジーのがん検診への応用とその将来性

尾野 雅哉 本田 一文 山田 哲司

公 衆 衛 生

第71巻 第2号 別刷

2007年2月15日 発行

医学書院

がん検診の新技术に関する展望②

バイオテクノロジーのがん検診への 応用とその将来性

尾野 雅哉¹⁾ 本田 一文¹⁾ 山田 哲司²⁾

効率のよいがん検診は、がんを早期に発見することにより、がんを治癒せしめ、がんの死亡率を激減させることができるという議論のもとに、世界的に積極的な取り組みがなされている。日本では、国立がんセンターが中心となって、科学的根拠に基づいたがん検診のガイドライン^{1,2)}を作成している (<http://canscreen.ncc.go.jp/>)。またアメリカでは NIH が中心となって、2015 年を目標に早期の段階でがんを発見する方法を確立するためのプログラムを推進している (<http://edrn.nci.nih.gov/>)。

効率のよいがん検診を行うには、多くの人が定期的に検診を受けることが重要で、検査は受けやすく、網羅性のあるものでなければならない。大腸がんでは、便潜血という非侵襲的な検査でスクリーニングを行い、陽性群に大腸内視鏡検査を行うことでがん検診の有用性を確立している³⁾が、このように、侵襲の少ない方法で危険群を絞り込み精密検査に至る方法をすべてのがんに応用するためには、網羅的なスクリーニング法の開発が必要である。

血液検査は健常者にとって抵抗の少ない検査法であり、血液でがんを網羅的にスクリーニングし、標的臓器と危険群を絞り込むことができれば、がん検診の効率を高めることができると予測される。前述した米国におけるバイオマーカー探

索にも、血液診断が重要な位置に置かれている³⁾。本稿ではわれわれが進めているプロテオームを用いた新規血中腫瘍マーカーの開発の現状を解説し、バイオテクノロジーのがん検診へ応用される可能性を考察する。

プロテオームによる腫瘍マーカーの探索

血液腫瘍マーカーの探索に当たってのわれわれの手法は、質量分析器 (mass spectrometer: MS) を用いて多数の臨床材料を解析し、がんと正常者の間で有意に差のあるピークを拾い出し、それをさらに別の臨床材料で検証し、また、そのピークが示す物質を同定していくものである。

1. 2 DICAL 法による腫瘍マーカーの探索

2 DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of LC/MS) 法は、がんセンター独自で開発したプロテオーム解析手法⁴⁾であり、血液中の蛋白質を網羅的に検索することができる。蛋白質をトリプシンで分解してペプチドとし、それを超低流量液体クロマトグラフィー (nanoLC) で分離したものを質量分析器で計測し (LC/MS)、検出される全ピークを図左のように 2 次元に展開し、比較群間で差のあるピークを見つけ出していく解析手法である。バイオマーカーの探索に当たっては、多数検体を比較する必要があるため、図右のように全症例のピークが同時に比較観察できる新

1) おの まさや, ほんだ かずふみ: 国立がんセンター研究所化学療法部室長
連絡先: ☎ 104-0045 東京都中央区築地 5-1-1

2) やまだ てっし: 国立がんセンター研究所化学療法部部長

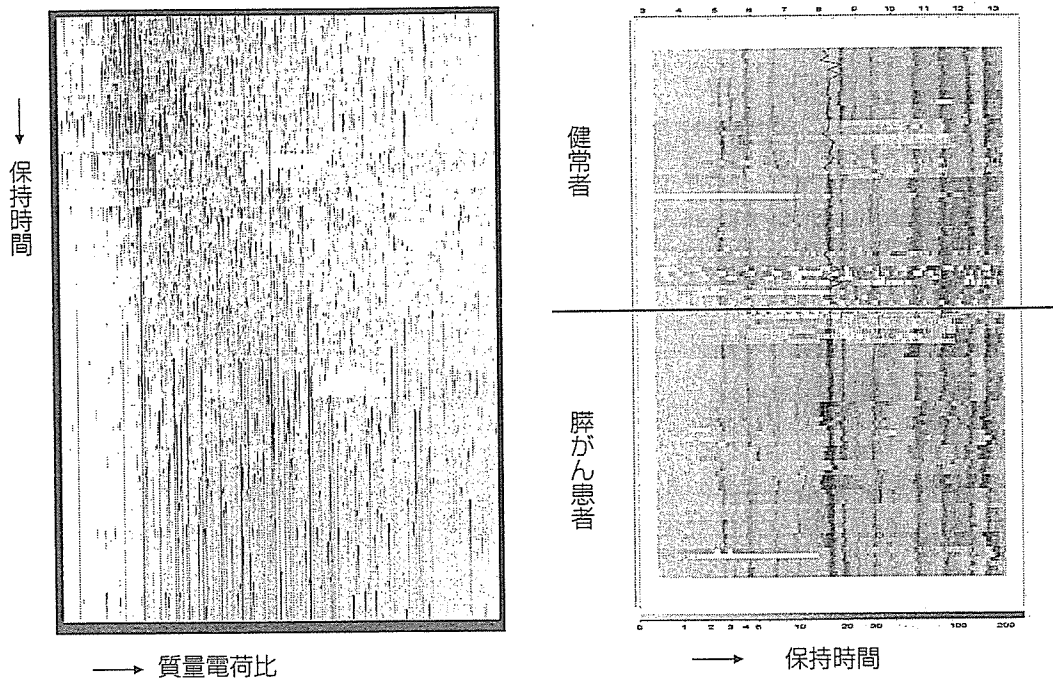


図 2DICAL(2 Dimensional Image Converted Analysis of LC/MS)
 左図は、超低流量液体クロマトグラフィーと質量分析器(LC/MS)で得られたデータを質量電荷比と保持時間を軸として、ピーク強度を2次元に展開したものである。右図は、サンプル間の同一ピークを比較するために、保持時間とサンプルを軸として展開し直した2次元画像で、上段の健常者と下段の膵がん患者の間に強度に差が見られるピークを示す(中央縦線部)。

たな2次元展開法も開発し、2DICALに組み込んだ。

このシステムを用いて膵がん腫瘍マーカーを探索するために、膵がん患者38例、健常者39例を対象として各例3回のLC/MS測定を合計231回行った。全測定から115,325のピークを拾い出し、膵がん患者、健常者間で有意な差を示すピークを抽出し、目視による確認を加え、U検定でp値が0.0005以下の差を示す6つの有用なピークを拾い出した。2DICALではペプチド同定が容易であり、これらピークのペプチド配列も同定された。これらのピークが膵がんの早期発見、他がんととの鑑別に有用であるかは、大規模な集団で研究を組み、検証していかなければならない。

2. SELDI-TOF-MS法による腫瘍マーカーの探索

われわれは米国国立がん研究所が、卵巣がんの早期発見で有用性を示したSELDI-TOF-MS法(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)に質量精度、分

解能の高い質量分析器を用い、独自に開発したソフトウェアにてマーカー探索を行っている。膵がん患者113例、健常者121例、良性膵臓疾患患者11例、計245例を検討し、組み合わせにより感度特異度が共に90%以上を示す4つのピークを同定した⁵⁾。

ゲノムによる腫瘍マーカーの探索

がん細胞由来のDNA、RNAは血中を流れており、それを利用してがんの早期診断マーカーを探索する試みがなされている。がん遺伝子の変異や増強、マイクロサテライトの変化、DNAメチル化などが検討され、可能性を示唆する所見が得られているが、バイオマーカーとして応用していくには、大規模な検証を行っていかなければならないというのが現状である⁶⁾。

おわりに

われわれが目指すプロテオームを用いた血液診断は、あらゆるがんをスクリーニングし、早期発

特集

見できる可能性がある。しかし、あらゆる人に定期的ながん検診を受けてもらうことは、行政、医療関係者、さらには、個人個人の意識の高まりが必要であり、また、バイオマーカーで微小ながんも診断できるとすれば、その存在を正確に診断する手段の開発も必要である。がんの死亡率激減を目指すがん検診を確立していくためには、最新のバイオテクノロジーによる血液診断はその一部に過ぎず、多くの分野の有機的な結合が必要であることは言うまでもない。

文献

- 1) 祖父江友孝・他：有効性評価に基づく大腸がん検診ガイドライン(普及版)。癌と化学療法 32：901-915, 2005
- 2) 深尾彰・他：有効性評価に基づく胃がん検診ガイドライン(普及版)。癌と化学療法 33：1183-1197, 2006
- 3) NCI: The Early Detection of Research Network. Third Report. <http://edrn.nci.nih.gov/docs/progress-reports/edbi6.pdf/download>. 2005
- 4) Ono M, et al: Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry. MCP 5: 1338-1347, 2006
- 5) Honda K, et al: Possible detection of pancreatic cancer by plasma profiling. Cancer Res 65: 10613-10622, 2005
- 6) Bremnes RM, et al: Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood; A tool for early detection, diagnostics, and follow-up? Lung Cancer 49:1-12, 2005

- 1) 祖父江友孝・他：有効性評価に基づく大腸がん検診ガ

お知らせ

国際シンポジウム

検証「健康格差社会」—介護予防に向けた社会疫学の可能性

2006年度から介護予防事業が見直されました。しかし「要支援・要介護状態になる恐れのある高齢者」(特定高齢者)は、目安とされた高齢者人口5%に遠く及ばず、0.2%しか把握できないことが報じられています。なぜでしょうか。戦略の見直しは必要ないのでしょうか。本シンポジウムでは、社会疫学の第一人者 Kawachi 教授と Subramanian 助教授(ハーバード大学公衆衛生大学院)をお招きし、この問題に迫ります。

午前の特別講演では、「健康を規定する社会的因子(social determinants of health)」を解明する社会疫学とは何か、いかに社会経済的環境が人々の健康にとって重要か、をお話しいたします。そこから、介護予防戦略の見直しの必要性が見えてきます。午後の報告では、AGES(Aichi Gerontological Evaluation Study, 愛知老年学的評価研究)プロジェクトの高齢者 32,891 人の大規模データを用いて、日本がどの程度「健康格差社会」なのかを検証します。シンポジウムでは、現在の介護予防政策がうまくいかない理由を、社会疫学の視点から明らかにします。そして、もう1つの介護予防戦略立案における社会疫学の可能性や戦略の方向を探ります。

日時：3月18日(日)

場所：名古屋国際会議場

プログラム：

10時開場

10:20 開会挨拶 宮田和明 日本福祉大学学長

10:30-12:00 特別講演 Kawachi Ichiro 教授

13:00-14:15 AGES プロジェクトの報告

14:30-16:00 シンポジウム(コーディネーター 近藤克則)

16:00 閉会

主催：21世紀COEプログラム 日本福祉大学プロジェクト(拠点リーダー二木立教授)

お問い合わせ：日本福祉大学COE推進室 ☎ 460-0012
名古屋市中区千代田5丁目22-35

tel:052-242-3082, fax:052-242-3076

お申し込み：お申込は、下記のCOEのHPにて
<http://www.nihonfukushi-u.jp/coe/>

特集

がんの治療——一般医が知っておきたい治療動向

コラム

腫瘍マーカー

尾野 雅哉¹⁾、本田 一文²⁾、山田 哲司³⁾

- 1) おの まさや/国立がんセンター研究所化学療法部 室長
- 2) ほんだ かずふみ/国立がんセンター研究所化学療法部 室長
- 3) やまだ てっし/国立がんセンター研究所化学療法部 部長

腫瘍マーカー

尾野 雅哉¹⁾、本田 一文²⁾、山田 哲司³⁾

1) おの まさや/国立がんセンター研究所化学療法部 室長

2) ほんだ かずふみ/国立がんセンター研究所化学療法部 室長

3) やまだ てっし/国立がんセンター研究所化学療法部 部長

理想の腫瘍マーカー

理想とする腫瘍マーカーは、日々の臨床検査レベルで癌の存在診断、進行程度、さらには最善の治療法の選択までもが分かるものである。現実には、腫瘍マーカーとして用いられているものはCEAやCa19-9など数十種類あるが、主には特定の癌の治療経過(例えば、手術後の再発予測)の補助として用いられているのが現状である。しかし、癌の発生は生体における変化であり、それから何らかの情報が発せられ、また生体は癌に対して何らかの反応を起こし、その情報も生体内に存在すると考えるのは妥当である。

腫瘍マーカーが期待される役割を果たしていないのは、その情報を検出できる技術がないか、または存在するすべての情報を網羅的に検討していないためであると考えられ、科学の進歩を利用した最新の技術による腫瘍マーカーの発見には大きな期待が寄せられている。例えば、膵臓癌のような深部組織にある癌は、非常に微小な場合、エコーなどで存在を確認しながら癌の確定診断ができない事実が存在しており、診断の補助となる腫瘍マーカーの開発が強く望まれている。

世界の傾向を見ても、米国ではNIH・NCIが中心となって、2015年を目標に早期の段階で癌を発見する方法を確立するためのプログラム〔The Early Detection Research Network (EDRN)〕を推

進しており、腫瘍マーカーの開発は、新しい画像診断機器の開発と相補して重要な扱いになっている。

新しい探索手法

このような現況下、われわれは最新のプロテオーム技術を用い、日々の臨床検査レベルで用いられる新しい血液腫瘍マーカーの開発に取り組んでいる。血液腫瘍マーカーの探索に当たって、われわれは質量分析器を用いて多数の臨床材料を解析し、癌患者と健常者の間で有意に差のあるピークを拾い出し、それをさらに別の臨床材料で検証し、また、そのピークが示す物質を同定していく手法を取っている。これには、2DICAL法とSELDI-TOF-MS法を用いている。

2DICAL(2 Dimensional Image Converted Analysis of LC/MS)法はがんセンターが独自に開発したプロテオーム解析手法であり、血液中の蛋白を網羅的に検索することができる。膵癌患者38例および健常者39例を対象として11万5,325のピークを拾い出し、膵癌患者と健常者間で有意な差を示すピークを抽出し、6つの有用なピークを同定した。SELDI-TOF-MS法(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)は、米国NCIが有用性を示した方法を改良し、われわれ独自に開発したソフトウェアを用いて、高分解能・高質量精度の質量分析器で解析するものである。膵癌患者113例、健常者121例、良性膵臓疾患患者11例の計245例で検討し、感度・特異度がともに90%以上を示す4つのピークを

【連絡先】 尾野 雅哉

〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1

国立がんセンター研究所化学療法部

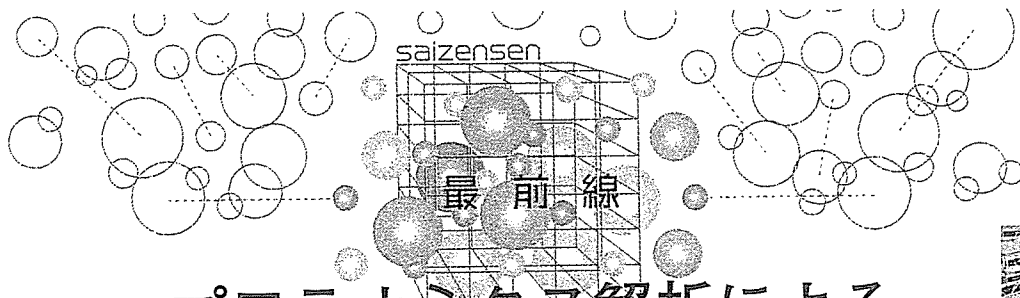
同定した。

われわれがプロテオームに取り組み始めた数年前には、現在用いられている腫瘍マーカーを質量分析器で証明しようとするには数十 mL の血液が必要と考えられていたが、ほんの数年の間に、100 μ L で解析可能な時代になった。科学技術の進歩はとどまることはなく、癌の発生とともに起こる微妙

な変化や、それぞれの癌を特徴付ける微細な変化を、ひとつひとつの分子の変化として捉える技術が確立され、理想的な腫瘍マーカーが開発されるのは確実なことであろう。そして、その先には癌の恐怖に脅えることない日が到来することを信じている。

ファルマシア

別刷



プロテオミクス解析による 膵臓がんの血漿マーカーの開発



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

本田一文
Kazufumi HONDA

国立がんセンター研究所化学療法部室長
腫瘍プロテオミクスプロジェクトメンバー



はじめに

我が国における主要な固形腫瘍の中で、膵がん患者の予後は最も不良であり、地域がん登録共同調査によると、その5年生存率はわずか6%であるとされている。2004年度厚生労働省「人口動態統計」によると1年間に22,260人が膵がんのために死亡しており、肺、胃、大腸、肝がんに次いでがん死の原因の第5位である。さらに膵がん患者は最近20年間に約2.5倍と急増しており、肝炎ウイルスの制御が進めば、近い将来肝がんを抜いて第4位になるものと予測されている。喫煙者に約2.5倍膵がんの罹患率が高いとされているが、その原因は不明であり、予防法も確立されていない。



膵がん早期診断バイオマーカーの 必要性

膵がんが難治性である理由は、膵がん細胞の生物学的悪性度が高く、周囲に浸潤性増殖をきたし、早期にリンパ節や肝などの遠隔臓器に転移することがあげられるが、膵臓という臓器の解剖学的特性のため超音波診断や内視鏡診断が困難であり、さらに臨床症状が乏しく早期診断される例が少ないということが大きい。事実、全国膵がん登録20年間の集計によると、膵がん症例の約95%の方がステージⅢないしⅣ期の進行した状態で発見されているのが現状である。その結果、唯一の根治が望める治療方法である外科的切除の適用があったのは、膵がんと診断された症例のうち、20~40%程度といわれている。^{1,2)}

細胞診による子宮頸部がん検診、視触診とマンモ

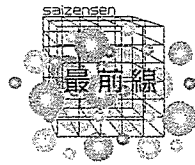
グラフィによる乳がん検診、便潜血検査による大腸がん検診、X線検査による胃がん検診、胸部X線検査と喀痰細胞診による肺がん検診などは科学的に有効性が証明された検診法であるが、膵がんでも有効性が証明された検診法は現状では存在しない。CT (computed tomography) やMRI (magnetic resonance imaging), PET (positron emission tomography) による集団検診の可能性が考えられているが、膵がん患者の発生率は10万人当たり約17.6人であり、医療経済学的には必ずしも効率的であるとはいいがたく、また集団の放射線被曝の危険性も指摘されている。³⁾ そのため新たな安全性が高く、効率のよい膵がん検診法が求められている。

治療可能な膵がんを効率的に検出できる血漿・血清診断マーカーがあれば検診に応用し、早期膵がん患者の発見率を向上させ、膵がん患者全体の予後の改善に貢献するものと思われる。我々は、厚生労働省が実施する第3次対がん総合戦略事業の「がん検診に有用な新しい腫瘍マーカーの開発」の研究班として膵がんの新規腫瘍マーカー開発に取り組んできた。



ゲノムとプロテオーム

がんはゲノムの塩基配列の変化、あるいはエピジェネティックな変化によるがん遺伝子とがん抑制遺伝子の機能異常によって起こる疾患であるが、遺伝子の異常に伴いダイナミックに変化する様々なタンパク質の発現量、リン酸化などの翻訳後修飾、他のタンパク質との相互作用などが、がんの発生や浸潤・転移などの生物学現象を直接もたらし、また分子治療の標的となる事が分かりつつある。プロテオ



ーム (proteome) とはゲノム (genome) から派生した言葉であり、特定の細胞・組織・器官でゲノムに制御され、発現されるタンパク質全体をさし、プロテオームを対象とする学問がプロテオミクス (proteomics) である。遺伝子の情報はタンパク質に比べれば静的であり、時事刻々変化する疾患の病態に伴い鋭敏に変化していくのがタンパク質である。非侵襲的に病態を診断できる血漿・血清マーカーを開発する上で、血液中に循環しているタンパク質の質的・量的な変化を直接探索する血清・血漿プロテオーム解析は、有効な戦略になると注目されている。



4 プロテオミクスによる バイオマーカー探索の要件

血漿 (血清)、手術・生検組織などの実際の臨床検体から直接タンパク質の網羅的な発現解析を行い、臨床上有用性のあるバイオマーカーを発見するには、症例間の単なる個人差を排除するため、疾患群と対照群の多数症例を比較解析する必要がある。そのためスループットに優れ、高い定量性と再現性のある発現プロテオーム解析技術が必要である。しかし従来のプロテオミクス解析技術の多くは定量性や再現性に重点が置かれておらず、多数の臨床症例のタンパク質の発現量を再現よく測定することは困難であると考えられていた。

さらに血清や血漿には数千種以上のタンパク質が含まれていると考えられているが、⁴⁾ その99%がアルブミンや免疫グロブリンなどの22種類のタンパク質に占められているため、少ない含有量のタンパク質を解析するためには、これら含有量の多いタンパク質を除いて解析する必要がある。⁵⁾



5 質量分析によるバイオマーカー探索

アルブミンなどの含有量の多い特定のタンパク質を除去し、血液中に含まれる微量なタンパク質の質量と発現量を再現性よくハイスループットに質量分析を用いて解析することが可能な技術として、SELDI-TOF-MS法 (surface enhanced laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) が

開発された。⁶⁻⁹⁾ 小面積の金属チップの表面を種々の官能基で修飾することで、特定のタンパク質を吸着できるプロテインチップに、1~数百 μ lのサンプルを直接添加し、インキュベート後、水やバッファーで表面を洗浄し、チップ表面にアフィニティーのない物質を除去する。タンパク質のイオン化を妨げる塩や界面活性剤等を取り除くことに加え、タンパク質の複雑度を下げることができる。エネルギー吸収分子 (energy absorbing molecule) を加えて乾燥させ、パルスレーザーを照射することによりタンパク質をイオン化させ、高感度の飛行時間型質量分析計 (time of flight mass spectrometry) により測定する。

この手法を用いて、米国国立がん研究所 (National Cancer Institute ; NCI) と米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration ; FDA) の研究グループから早期卵巣がんを病期I期の早期症例を含めて、100%に近い正確性で診断できる血清ペプチドプロファイルを報告した。^{6,9)}

SELDI-TOF-MS法は多検体処理を目的として開発されたツールであるため、バイオロボットによる自動化が容易であり、血清・血漿のバイオマーカー探索には理想的であると考えられてきた。



6 SELDI-TOF-MS法を用いた 研究の問題点

しかしながら、初期のSELDI-TOF-MS法による血清・血漿ペプチドプロファイル法による診断法の報告は、統計学的に有意な結果を導くのに十分な検体数が検討されていなかったり、多変量解析で必須である診断モデルが導出された検体群 (学習セット) とは別の検体群 (検証セット) を用いた検証がなされていないなどの問題点があるものが多く見受けられた。^{*} また市販されていたプロテインチップ測定用の小型汎用質量分析機の質量精度、分解能、定量再現性に問題があることも分かってきた。

少数例のプロテオーム解析で見られるような単なる症例間の個人差に起因する再現性のないマーカー

* 多変量解析における学習セットと検証セットについての用語解説は、42頁参照。

の抽出を防ぐため、一般的に詳細な臨床情報の付随した大多数の症例の測定が必要である。そのためには長期間安定に質量分析機を稼働させ、得られた大量のスペクトラムデータを臨床情報とともに自動的に整理・保存する必要がある。さらに、日常的に計測日間の再現性の確認と日差変動の補正、質量分析装置の機械間誤差補正などを行う必要がある。

我々は、研究グループ内でデータが共用でき様々なメーカーの高分解能質量分析装置から得られたスペクトラムに対応し、臨床情報とスペクトラムを統合させて保存しスペクトラム画像の可視化、ベースライン補正、ピーク検出を行い、総強度補正されたピーク強度のデータから機械学習法を使ってマーカー候補を抽出できる統合ソフトウェア NCC-ProteoJudge を開発した。¹⁰⁾



7 プロテオミクス解析による 膵臓がんの血漿マーカーの開発

2002年8月～2003年10月までに当センター中央病院で採取された未治療の膵臓がん患者(104例)と健常者(116例)の血漿と、東京医科大学病院で2004年2月～2005年2月までに採取された未治療の膵臓がん患者(9例)、良性膵臓疾患(11例)と健常者(5例)の計245例分の血漿を用いて研究を行った。これらの血漿はすべて同一条件で採取され、解析まで-80℃で凍結保存された。血漿は融解後、変性剤

を用いてタンパク変性した後、4種類のCIPHERGEN社製のProteinChipを用いてアフィニティー精製し、分解能・定量再現性、質量精度に優れる四重極搭載高分解能質量分析計 Q-Star XL PCI 1000 を用いて質量解析を行った。¹¹⁾

血漿ペプチドプロファイルから診断モデルを構築するために、当病院で採血された検体のうち、がん患者と健常者の間に、年齢と性に統計学的に全く差がないように学習セットを選別した。選別された集団は膵臓がん患者が71例、健常者が71例分の計142例分の血漿とした(図1)。血漿ペプチドプロファイルを四重極搭載高分解能質量分析計 Q-Star XL PCI 1000 を用いて取得したのち、すべてのデータを大容量のサーバーコンピュータに保存し、膵臓がん患者と健常者を感度94.4%、特異度97.2%で判別する診断モデルを人工知能等に使われるアルゴリズムを用いて導出した。

導出された診断モデルは、CM 10 pH 4 で観察される 8,766 m/z 、17,272 m/z 、28,080 m/z 、並びに H 50 で観察される 14,776 m/z の4本のペプチドピークで構成されていた。これら4本のピーク情報から、膵臓がんと健常者を分離する分離境界面をサポートベクターマシン(support vector machine)のアルゴリズムを用いて設定し、各検体ごとの分離境界面までの距離と方向を計算した(図2)。この場合、(+)の方向は膵臓がん、(-)の方向を健常者と定義す

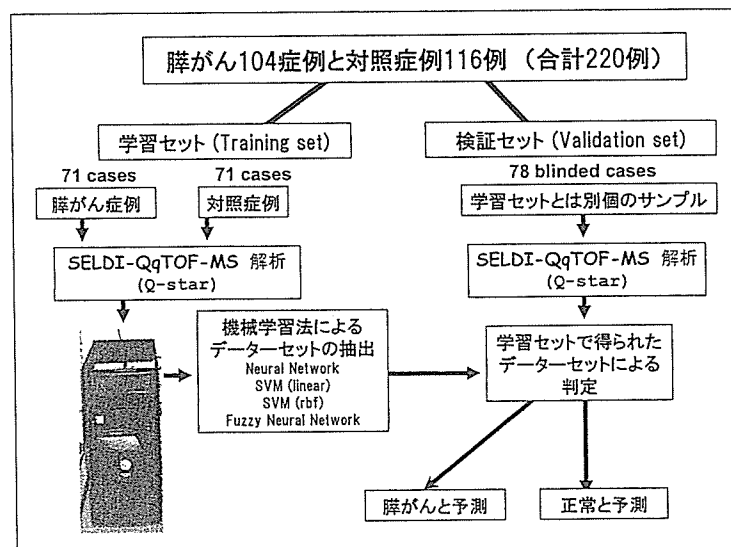


図1 機械学習を使ったマーカー探索と検証

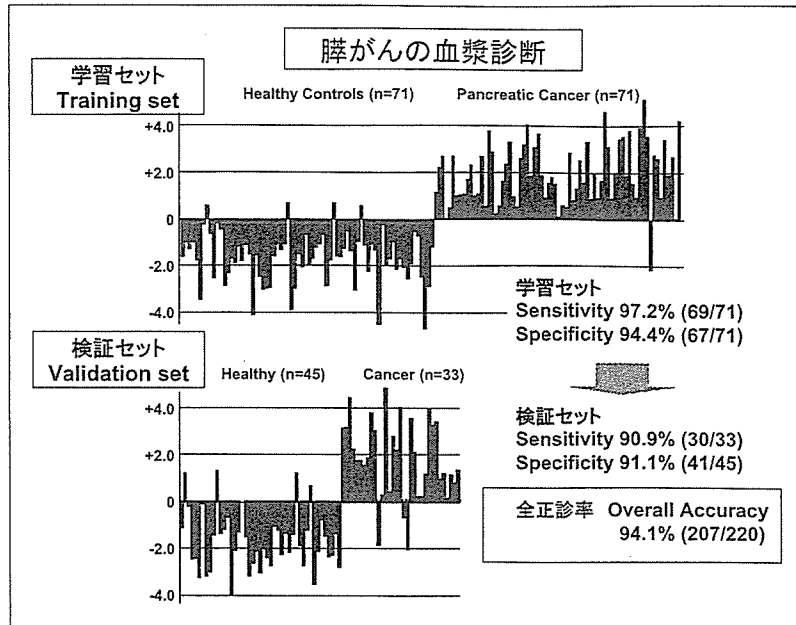


図2 機械学習法により計算された分離境界面からの各症例の距離と方向
(-)方向は健常者, (+)方向は膵がんと判定した. 文献 11 より改変.

る. これら4本のペプチドピークを使った場合のROC(receiver operation characteristics)曲線を図3に示す. 4本のピークを使った診断モデルによる曲線下面積値(area under the curve value)は0.978と非常に高い値を示していた. 学習セットでは, 7例の臨床病期IあるいはII期の早期膵がんのうち6例を膵がんとして診断することが可能であった.

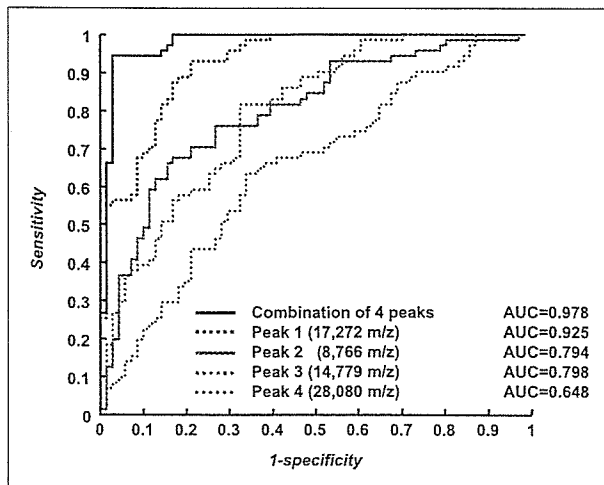


図3 学習セットから抽出された4ピーク並びに組み合わせた場合のROC(receiver operation characteristics)曲線とAUC値(area under the curve value)
文献 11 より改変.



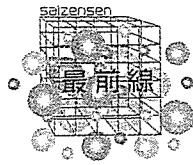
検証セットを用いた診断モデルの検証

学習セットによって構築された診断モデルの再現性を, 検証セット(当病院で採取された血漿検体のうち, 診断モデルの構築に使用しなかった検体)を使って検証した. 検証セットには, 膵がん患者血漿33例, 健常者45例分を使用した. 先に述べた4本のピークを使って学習セットから定義された分離境界面を固定し, その分離境界面に対する検証セットの各検体の距離と方向を計算した. 計算結果を図2に示す. 33例の膵がん患者のうち膵がんとして判定された症例は30例(感度90.9%), 健常者45例のうち健常者と判定された症例は41例(特異度91.1%)であった. 当病院の検証セットのうち, 臨床病期IあるいはII期の早期膵がんが5例含まれていたが, 4例を膵がんとして診断することが可能だった.



他施設検体による診断モデルの検証

上記のように診断モデルの再現性について, 単施設で採取された78検体を用いて検証したところ, 90%以上の判別率を持って診断できたわけだが, モ



デル検証に使われた検体はあくまで当センター中央病院で採取された検体であるため、採血条件や保存方法による施設間差についても検討する必要がある。さらに、当病院という特殊性から検体に良性膵疾患が含まれていなかった。そこで他施設から採取された検体でも正確に診断できるかどうかと、膵がんと良性膵臓疾患の鑑別への有効性について、東京医科大学病院で採取された血漿を用いて検証を試みた。その結果、膵がん患者9例中8例を膵がんと診断することが可能であり、健常者5例中の4例を正確に診断することができた。良性膵疾患については、良性膵腫瘍の6例中4例、慢性膵炎5例中1例を膵がんと判定した。



CA 19-9 と SELDI 診断モデルとの コンビネーションによる膵がん検出

膵がん腫瘍マーカーとして CA 19-9 が臨床に用いられている。CA 19-9 と SELDI 診断モデルのコンビネーションによる感度の向上を試みた。CA 19-9 値を 37 U/ml をカットオフとし、CA 19-9 もしくは SELDI 診断モデルのいずれかが陽性であった場合を膵がんと判定した。コンビネーションの判定法の検証には、CA 19-9 が測定可能であり、検証セットとして使用された 78 例のうち、健常者 39 例、膵がん患者 29 例の計 68 例の血漿を使用した。CA 19-9 単独による膵がん患者の感度は 86.2% (25/29) で偽陽性率は 7.7% (3/39) であったのに対して、SELDI 診断モデルの感度は 89.7% (26/29) で、偽陽性率は 10.3% (4/39) であった。この 2 つのコンビネーション診断法では、CA 19-9 と SELDI 判定法は相補的であり、臨床病期 I あるいは II 期の膵がんを含めて感度 100% (39/39) で検出することが可能だったが、その偽陽性率は 15.4% (6/39) に上昇した。



実用化に向けた試み

検体の採取・保存方法によってプロテオミクスの解析結果は大きく影響を受けると考えられている。

本法を、精密検診を行うべき症例を効率よく絞るプレスクリーニングに使用できる診断法に発展させるためには、検体の収集や輸送方法についても整備が必要である。我々は 2006 年度より遠隔地を含めた多施設からも同一の方法で検体を収集し、輸送できる体制を確立し、施設間で再現性についても検討を行う計画である。

また定量プロテオミクスを用いた診断法の実用化のためには、質量分析機の改良が必要である。我々が用いた質量分析計は研究用に開発された非常に高価で高性能な四重極搭載直型質量分析計であり、安定した測定には多くのパラメータを調整しなければならず、複数台の質量分析計で同等のプロファイルを取得できるように調整するのは簡単ではない。また測定が自動化されておらず、臨床検査室でルーチンに行うようなハイスループットな解析は困難である。今後操作性に優れ、機械間・測定日間の再現性に優れ、高い分解能と質量精度を持つ臨床プロテオームに特化した安価な質量分析計の開発が必要である。¹²⁾

さらに現在使用している試薬、ProteinChip 等すべて研究用のものであり、薬事法に対応した体外診断法用のものではない。臨床治験を行うための試薬、装置、プロトコール作成などを研究者と複数の企業が一体となって取り組んでいく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Yamamoto M. *et al.*, *Pancreas*, 16, 238-242 (1998).
- 2) Shimamura T. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 21, 659-657 (2003).
- 3) Berrington de Gonzalez A., Darby S., *Lancet*, 363, 345-351 (2004).
- 4) Omenn G. S. *et al.*, *Proteomics*, 5, 3326-3345 (2005).
- 5) Anderson N. L., Anderson N. G., *Mol. Cell. Proteomics*, 1, 845-867 (2002).
- 6) Petricoin E. F. *et al.*, *Lancet*, 359, 572-577 (2002).
- 7) Adam B. L. *et al.*, *Cancer Res.*, 62, 3609-3614 (2002).
- 8) Zhang Z. *et al.*, *Cancer Res.*, 64, 5882-5890 (2004).
- 9) Petricoin E. F., Liotta L. A., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 24-30 (2004).
- 10) Hayashida Y. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11, 8042-8047 (2005).
- 11) Honda K. *et al.*, *Cancer Res.*, 65, 10613-10622 (2005).
- 12) 本田一文ほか, *日本臨床*, 64, 1745-1755 (2006).