

200823032A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、
プロテオミクス、メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 門田 守人

平成21(2009)年4月

目次

I. 総括研究報告書

- 消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、
プロテオミクス、メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立 — 1
門田守人（大阪大学）

II. 分担研究報告

1. 消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、
プロテオミクス、メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立 — 7
松原謙一（株式会社DNAチップ研究所）
2. NBS法による大腸癌組織の蛋白質発現解析 ————— 9
西村紀（大阪大学蛋白質研究所）
3. 消化器がんに関連するバイオマーカーの探索・評価 ————— 11
山崎泰代（Phenomenome Discoveries Inc.）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、
プロテオミクス、メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

研究代表者 門田守人 大阪大学 副学長

研究要旨：我々は基盤研究（A）の補助により、消化器がんの個別化医療の確立に向け、網羅的遺伝子発現解析による生物学的特性の解明を進めてきた。今後は、基礎研究成果を臨床応用するため、大規模症例を対象とした prospective な検証による evidence を示す必要がある。そこで、本3次がんの事業では、個別化医療実用化のための体制整備と臨床応用を目的として、あらゆるサンプルソースを対象に、がん組織の遺伝子・タンパク発現解析、がん患者の末梢血のメタボライト解析によるバイオマーカーを探索と予後予測臨床試験を計画した。

分担研究者

関本貢嗣 大阪大学消化器外科 准教授
土岐祐一郎 大阪大学消化器外科 准教授
竹政伊知朗 大阪大学消化器外科 助教
松原謙一 株式会社 DNAチップ研究所 代表取締役
西村紀 大阪大学蛋白質研究所 特任教授
山崎泰代 Phenomeone Discoveries Inc. 日本総括ディレクター

A. 研究目的

2007年度に実施されるがん対策基本法では、患者本人の意向を尊重した適切な医療体制の整備を基本理念とし、革新的技術を応用したがん研究の推進と成果の臨床応用が重要な課題として挙げられている。医療資源と患者の利益という観点より、evidenceに基づいた治療の標準化は個別化とのダイナミックな循環によって進め

られるべきである。個別化医療に必要なのはまず個性の診断で、分子生物学的な特徴をあらゆるサンプルソースを用いて体系的に捉えることが有効である。そこで、本3次がんの事業では、消化器がんの大規模症例を対象に、がん組織の遺伝子・タンパク発現プロファイルによる転移・再発の予測診断系の構築と、がん患者の末梢血からメタボローム解析によるバイオマーカーを探索し、prospectiveな検証によって分子個別診断のevidenceを示すとともに、その成果を臨床応用化することを目的とする。

B. 研究方法

大阪大学の基幹関連施設による消化器がん大規模症例の集積コンソー

シウムにより、登録・集積された症例を対象に、遺伝子発現はヒト全遺伝子搭載 DNA チップ (44K) を用いて、またタンパク発現は従来の二次元電気泳動法に比べ、感度・汎用性の高い MALDI-TOF/MS と安定同位体標識試薬 NBS (2-nitrobenzenesulfonyl) 法を組合せ、定量性の高いプロテオミクス手法を確立し、それぞれの発現プロファイルを取得する。がんの転移・再発に関わる遺伝子、タンパクを絞り込むと同時に予測診断系を構築する。またパスウェイネットワーク解析で転移・再発に中心的な役割を果たすと思われる遺伝子を選択的に搭載した安価で再現性の高い臨床チップを開発し、その信頼性を多数症例の検体による validation study で検証する。

さらに、より簡便性を図るため、がん患者の末梢血から超高感度・超高分解能のフーリエ変換質量分析とハイスループット・スクリーニング法 (HTS) を用いてメタボライトを同時一斉分析し、メタボライトバイオマーカーを探索する。

(倫理面への配慮) 本研究ではゲノムは扱わないが、3省合同の「ゲノムに関する指針」に準じた情報管理を行い、大阪大学の倫理規定に従って、患者の同意が得られたサンプルを使用した。

C. 研究結果

症例集積コンソーシアムにより約

4400 例の消化器がん組織と臨床情報が集積された。昨年から継続して大腸がん 470 例、肝臓がん 170 例、胃がん 170 例、食道がん 100 例の遺伝子発現プロファイルを追加取得した。大腸がんでは根治切除後の異時性再発予測が 79%、肝臓がんでは根治切除後の残肝早期再発予測が 78%、胃がんでは根治切除後の腹膜再発予測が 75%、食道がんでは生検材料よりリンパ節転移予測が 70% 可能な遺伝子群の同定と予測判別式を構築した。本年度は、大腸がんに対する臨床チップ (第 4 世代) を新たに開発・作成し、独立した根治切除後 stage II, III 150 例の検証試験で、有意に DFS のことなる 2 群 (予後良好群、予後不良群) に判別することが可能となり、その診断能が検証された。

大腸がん 24 例、肝臓がん 10 例の NBS 解析では、大腸がんで特異的に発現する 128 種類のタンパクと、本年度は肝臓がんに関与する 22 種類のタンパクおよび肝臓がんで特異的に発現する 64 種類のタンパクを同定した。遺伝子発現は RT-PCR 法で、タンパク発現はウェスタンブロット法でそれぞれデータの信頼性を実証した。

大腸がん 83 例血清メタボローム分析では 6 種の特異的なメタボライトを同定し、血清存在診断で特異度 97%、感度 74% の高い正診率が得られている。本年度はあらたに膵臓がん 40 例、

胃がん 40 例の血清メタボローム分析で、それぞれ 5 種、12 種の特異的なメタボライトを同定した。

D. 考察

それぞれの OMIC 技術によって同定された分子は、他の assay 法での発現 verification でも相同性の高いデータが得られていることから、それぞれががんの存在・病勢診断マーカー、さらには治療標的となることが期待される。今後は遺伝子とタンパクの相互関係を考慮し、パスウェイネットワーク解析することで、より中心的な役割を果たす分子の絞り込みと、candidate を適正に搭載した臨床型の DNA チップを用いた正確な予測診断系が期待される。また血清レベルでもメタボライトマーカーによる早期大腸がんリスクを評価する可能性が示され、OMICS 技術の臨床応用が期待された。

E. 結論

本研究では、がんの遺伝子・タンパクの両者から得られた基礎的研究の成果と、がん患者の末梢血のメタボローム解析によって得られた特異的なメタボライト発現パターンの結果を、臨床研究デザインに合わせ prospective に解析することで、トランスレーショナルリサーチとして十分な evidence が得られることが期待され、臨床応用の基盤が整えられてきた。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komori T., Takemasa I., Yamasaki M., Motoori M., Kato T., Kikkawa N., Kawaguchi N., Ikeda M., Yamamoto H., Sekimoto M., Matsubara K., Matsuura N., Monden M.: Gene expression of colorectal cancer: Preoperative genetic diagnosis using endoscopic biopsies.: Int J Oncol. 32(2) : 367-375,2008.2.
- 2) Nakahira S., Nakamori S., Tsujie M., Takeda S., Sugimoto K., Takahashi Y., Okami J., Marubashi S., Miyamoto A., Takeda Y., Nagano H., Dono K., Umeshita K., Sakon M., Monden M.: Pretreatment with S-1, an Oral Derivative of 5-Fluorouracil, Enhances Gemcitabine Effects in Pancreatic Cancer Xenografts.: ANTICANCER RESEARCH 28 : 179-186,2008..
- 3) Kittaka N., Takemasa I., Takeda Y., Marubashi S., Nagano H., Umeshita K., Dono K., Matsubara K., Matsuura N., Monden M.: Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data.: Eur J Cancer 44 885-897,2008.
- 4) Takeno A., Takemasa I., Doki Y., Yamasaki M., Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Matsubara K., Monden

M.: Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer* 21(99) : 1307-1315, 2008.10.

5) Yamamoto H., Noura S., Okami J., Uemura M., Takemasa I., Ikeda M., Ishii H., Sekimoto M., Matsuura N., Monden M., Mori M.: Overexpression of MT1-MMP is insufficient to increase experimental liver metastasis of human colon cancer cells.: *Int J Mol Med.* 22(6) : 757-761, 2008..

6) Watanabe M., Takemasa I., Kawaguchi N., Miyake M., Nishimura N., Matsubara T., Matsuo E., Sekimoto M., Nagai K., Matsuura N., Monden M., Nishimura O.: An application of the 2-nitrobenzenesulfonyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma. A novel approach for biomarker discovery.: *Proteomics Clin Appl.* 2 925-935, 2008.

7) 山本浩文, 竹政伊知朗, 池田正孝, 関本貢嗣, 門田守人. : 転移因子を標的とした肝転移の治療戦略.: *Biotherapy* 22 (2) : 96-104. 2008. 3.

8) 竹政伊知朗, 池田正孝, 山本浩文, 関本貢嗣, 森正樹, 門田守人. : 大腸癌の個別化医療に向けて. : *Frontiers in Gastroenterology* 13 (3) : 224-231, 2008.

2. 学会発表

1) Takeno A., Motoori M., Takemasa I., Doki Y., Yamasaki M., Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Matsubara K., Monden M.: Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in ESCC(esophageal squamous cell carcinoma) using endoscopic biopsies.: 11th world congress of the international society for diseases of the esophagus, 2008.9.10-.9.13 (Budapest, Hungary)

2) Asaoka T., Marubashi S., Dono K., Hama N., Takahashi H., Kobayashi S., Takeda Y., Takemasa I., Nagano H., Umeshita K., Kato T., Ruiz P., Andreas GT., Monden M.: Gene Identification of Acute Cellular Rejection in Recipients with Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation.: The 2008 Joint International Congress of ILTS, ELITA & LICAGE, 2008.7.9-.7.12 (Paris)

3) Asaoka T., Marubashi S., Dono K., Hama N., Takahashi H., Kobayashi S., Takeda Y., Takemasa I., Nagano H., Umeshita K., Ruiz P., Matsubara K., Monden M., Doki Y., Mori M.: Gene Identification of Acute Cellular Rejection in Recipients with Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation.: The Transplantation Society, 2008.8.10-.8.16 (Sydney)

4) 竹野淳, 竹政伊知朗, 土岐祐一郎, 山崎誠, 宮田博志, 瀧口修司, 藤原義

之，松原謙一，門田守人：網羅的遺伝子発現解析とネットワーク解析にもとづく新規胃癌関連分子の探索：第 80 回日本胃癌学会総会，2008. 2. 27-. 2. 29 (横浜)

5) 橋高信義，竹政伊知朗，三宅正和，竹野淳，池田正孝，山本浩文，関本貢嗣，松原謙一，門田守人：臨床型 custom-made microarray を用いた大腸癌異時性再発予測に関する検討：第 108 回日本外科学会定期学術集会，2008. 5. 15-. 5. 17 (長崎)

6) 竹野淳，竹政伊知朗，土岐祐一郎，山崎誠，木村豊，三木宏文，高地耕，藤谷和正，今村博司，本告正明，藤田淳也，飯島正平，丸山憲太郎，宮田博志，瀧口修司，藤原義之，松原謙一，門田守人：網羅的遺伝子発現解析に基づく胃癌根治切除後異時性腹膜播種の予測診断と臨床応用への可能性：第 108 回日本外科学会定期学術集会，2008. 5. 15-. 5. 17 (長崎)

7) 土岐祐一郎，竹野淳，山崎誠，竹政伊知朗，藤原義之，瀧口修司，宮田博志，牧野知紀，西田俊朗，松原謙一，門田守人：胃癌におけるチロシンキナーゼ包括的解析と予後再発形式との関連についての検討：第 108 回日本外科学会定期学術集会，2008. 5. 15-. 5. 17 (長崎)

8) 竹野淳，土岐祐一郎，竹政伊知朗，山崎誠，宮田博志，瀧口修司，藤原義之，門田守人：胃癌原発巣の遺伝子

発現プロファイルから見た転移再発形式の特徴とチロシンキナーゼの関連について：第 17 回日本がん転移学会総会，2008. 7. 24-. 7. 25 (鹿児島)

9) 徳岡優佳，竹政伊知朗，渡辺真，三宅正和，人羅俊，野村昌哉，池田正孝，山本浩文，関本貢嗣，西村紀，門田守人：NBS 法による大腸癌組織を用いた新規転移関連蛋白の検討：第 108 回日本外科学会定期学術集会，2008. 5. 15-. 5. 17 (長崎)

10) 野田剛広，永野浩昭，竹政伊知朗，吉岡慎一，和田浩志，村上昌裕，小林省吾，丸橋繁，宮本敦史，武田裕，堂野恵三，梅下浩司，松原謙一，門田守人：IFN レセプター陽性肝細胞癌に対する IFN 併用化学療法感受性に関する遺伝子発現解析：第 108 回日本外科学会定期学術集会，2008. 5. 15-. 5. 17 (長崎)

11) 三宅正和，竹政伊知朗，池田正孝，山本浩文，関本貢嗣，松原謙一，門田守人：大腸癌網羅的遺伝子解析を用いた新規マーカーを探索：高発現遺伝子とタンパク発現との比較：第 108 回日本外科学会定期学術集会，2008. 5. 15-. 5. 17 (長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクス、プロテオミクス、
メタボロミクスの臨床応用と治療体制の確立

研究分担者 松原謙一 株式会社DNAチップ研究所 代表取締役社長

研究要旨：消化器がん個別化医療におけるファンクショナルゲノミクスの確立

A. 研究目的

大腸がんを対象に用いてファンクショナルゲノミクスを行う。

B. 研究方法

切除大腸がん試料からRNAを抽出し発現プロファイルを解析することにより術後の予後予測を可能とする。

C. 研究結果

Stage II手術試料 300例を用いてDNAチップによりRNA発現解析を行い、76%の精度で予後予測が行えることを実証した。

D. 考察

本解析を進めることにより、がん切除患者の予後予測が行えることが証明された。さらに解析例数を増やすことにより精度の一層の向上が図れる

だろう。

E. 結論

大腸がん切除試料のRNAを解析しそのプロファイルの特徴から、少なくとも Stage II の患者に対しては 76% の確度で予後予測判別に進むことができた。解析例数の増大による確度向上と、臨床への成果応用を考える時期に到達した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

NBS 法による大腸癌組織の蛋白質発現解析

研究分担者 西村紀 大阪大学蛋白質研究所 特任教授

研究要旨：NBS 法による大腸癌組織のプロテオーム解析により、我々はこれまでに 98 種類の新規大腸癌関連蛋白質を同定している。

そこで、これらのうち 35 種類について ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 測定系の構築を検討し、診断マーカーとしての有効性を評価した。測定系が構築できたもの (20 種類) について、大腸癌患者、および健常者血漿中における癌関連蛋白質の濃度を測定し、診断マーカーとしての有効性を評価した。結果として、2 種類の蛋白質については癌患者と健常者の間で有意な差が認められ、新規診断マーカーとしての可能性が示唆された。さらには、CEA, CA19-9 などの既存マーカーと併用することによって大腸癌患者検出率の向上を図れたことから、マルチマーカーとしての応用性も示唆された。

A. 研究目的

新規大腸癌関連蛋白質を同定し、バイオマーカー (診断、予後予測、治療ターゲットなど) への応用を目的とする。

B. 研究方法

大腸癌組織のプロテオーム解析で同定された新規癌関連蛋白質のうち、癌組織で発現が亢進するもの (35 種類) について ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 測定系の構築検討を行った。血漿を用いた添加回収率実験により測定系の評価を行った。測定系が構築できたものについては、大腸癌患者 (100 人分)、および健常者 (100 症例分) 血漿を用いて血中濃度測

定を行った。

(倫理面への配慮) 大阪大学医学部の倫理規定に従って患者の同意が得られたサンプルを使用した。

C. 研究結果

35 種類の癌関連蛋白質のうち、20 種類について ELISA 測定系の構築を完了した。

測定系を構築したものについて、血中濃度測定を行い、2 種類の癌関連蛋白質については癌患者と健常者との間で有意な差が認められた。

更には、これら 2 種類の蛋白質と既存の癌マーカー (CEA, CA19-9) とを組み合わせることにより、大腸癌患者検出率の向上を図ることができた。

D. 考察

ELISA による血中濃度測定により各癌関連蛋白質の診断マーカーへの応用性を評価することができた。2種類の蛋白質については癌患者と健常者の間で有意な差が認められたことから、今後、診断マーカーへの応用が期待される。

更には、これらの蛋白質と既存の癌マーカー (CEA, CA19-9) とを併用することにより、マルチマーカーとしての応用も期待される。

E. 結論

大腸癌組織で同定した癌関連蛋白質のうち、2種類については新規診断マーカーへの応用が今後期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe M., Takemasa I., Kawaguchi N., Miyake M., Nishimura N., Matsubara T., Matsuo E., Sekimoto M., Nagai K., Matsuura N., Monden M., and Nishimura O., An Application of the 2-Nitrobenzenesulfonyl (NBS) Method to Proteomic Profiling of Human Colorectal Carcinoma: A Novel Approach for Biomarker

Discovery, *Proteomics Clin. Appl.*, 2008, 2, 925-935.

2. 学会発表

- 1) 渡辺真, 竹政伊知朗, 河口直正, 三宅正和, 西村典子, 松原稔哉, 永井克也, 関本貢嗣, 松浦成昭, 門田守人, 森正樹, 西村紀. : NBS 法による大腸がん組織蛋白質発現解析. : JHUP0 Conference 2008 2008年7月(大阪)
- 2) 渡辺真, 西村紀. : 新規バイオマーカー探索システムを用いた疾患プロテオミクスーその現状と展望ー医用マススペクトル学会年会 2008年9月(東京)
- 3) 渡辺真, 竹政伊知朗, 河口直正, 三宅正和, 西村典子, 松原稔哉, 永井克也, 関本貢嗣, 松浦成昭, 門田守人, 森正樹, 西村紀. : 大腸癌における新規バイオマーカー探索のためのタンパク質プロファイリング BMB2008 2008年12月(兵庫)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

消化器がんに関連するバイオマーカーの探索・評価

研究分担者 山崎泰代 Phenomenome Discoveries Inc. (PDI) ディレクター

研究要旨：消化器がん患者の末梢血からメタボローム解析によりバイオマーカーを探索し、臨床応用化するために評価を行う。

A. 研究目的

消化器がん患者の末梢血からメタボローム解析によりバイオマーカーを探索し、臨床応用化することを目的とする。

B. 研究方法

がん患者の末梢血から、PDI 独自のフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計を用いたメタボロミクス技術を用いて、独自のデータ解析を行い、メタボライトバイオマーカーを探索した。

40 症例（ステージ I～IVa, IVb）のすい臓がん患者、50 例の正常対照群の末梢血検体が、メタボローム解析のために提供された。

（倫理面への配慮）大学の倫理規定に従って患者の同意が得られた検体を使用した。

C. 研究結果

計 90 例の末梢血のメタボローム解析により、すい臓がん関連メタボライト群を発見した。検出されたすい臓がん関連メタボライト群のうち、絞り込んだメタボライトに対して、ROC 解析を行うと、ROC 曲線下面積（AUC）が 0.93 から 0.97 など、メタボライトの組み合わせにより非常に高い予測能・診断能が得られることが判った。

D. 考察

すい臓がんは早期発見が難しく、進行してからでない見つからないため、治りにくいといわれている。今回の研究による発見が、すい臓がんのバイオマーカーとして臨床応用ができれば、バイオマーカー陽性の場合、無症状でもさらに精密検査を受けることにより、早期発見に繋がるものと期待できる。

今後の課題として、①多検体分析を可能にするためにスクリーニング法

を開発し、②多施設検体、盲検体などを用いた、バイオマーカーとしての臨床評価がその実用性に不可欠である。

E. 結論

メタボロミクスという生体内低分子化合物の研究を網羅的に行うことにより、バイオマーカーとしての利用のみならず、生物学的に疾病のシステムを理解することまで可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) Komori T, et.al	Gene expression of colorectal cancer: Preoperative genetic diagnosis using endoscopic biopsies	Int J Oncol	32(2)	367-375	2008
2) Nakahira S, et.al	Pretreatment with S-1, an Oral Derivative of 5-Fluorouracil, Enhances Gemcitabine Effects in Pancreatic Cancer Xenografts	ANTICANCER RESEARCH	28	179-186	2008
3) Kittaka N, et.al	Molecular mapping of human hepatocellular carcinoma provides deeper biological insight from genomic data	Eur J Cancer	44	885-897	2008
4) Takeno A, et.al	Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis	Br J Cancer	21(99)	1307-1315	2008
5) Yamamoto H, et.al	Overexpression of MT1-MMP is insufficient to increase experimental liver metastasis of human colon cancer cells	Int J Mol Med	22(6)	757-761	2008
6) 山本浩文, 他	転移因子を標的とした肝転移の治療戦略	Biotherapy	22(2)	96-104	2008
7) 竹政伊知朗, 他	大腸癌の個別化医療に向けて	Frontiers in Gastroenterology	13(3)	224-231	2008
8) Watanabe M, et.al	An Application of the 2-Nitrobenzenesulfonyl (NBS) Method to Proteomic Profiling of Human Colorectal Carcinoma: A Novel Approach for Biomarker Discovery.	Proteomics - Clinical Applications	2	925-935	2008
9) Kuyama H, et.al	Sensitive Detection of Phosphopeptides by MALDI MS: Use of Alkylphosphonic Acid as Matrix Additives.	Rapid Communication in Mass Spectrometry	22	1109-1116	2008
10) Ou K, et.al	Novel Breast Cancer Biomarkers Identified by Integrative Proteomic and Gene Expression Mapping.	Journal of Proteome Research	7	1518-1528	2008
11) Kuyama H, et.al	A Method for N-terminal de novo Sequence Analysis of Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.	Analytical Biochemistry	380	291-296	2008
12) Kuyama H, et.al	An Improved Method for de novo Sequencing of Arginine-containing, N α -tris (2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium-acetylated Peptides.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	22	2063-2072	2008
13) Okamura N, et.al	Quantitative Proteomic Analysis to Discover Potential Diagnostic Markers and Therapeutic Targets in Human Renal Cell Carcinoma.	Proteomics	8	3194-3203	2008
14) Yamaguchi M, et.al	Selective isolation of N-terminal peptides from proteins and their de novo sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry without regard to unblocking or blocking of N-terminal amino acids.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	22	3313-3319	2008

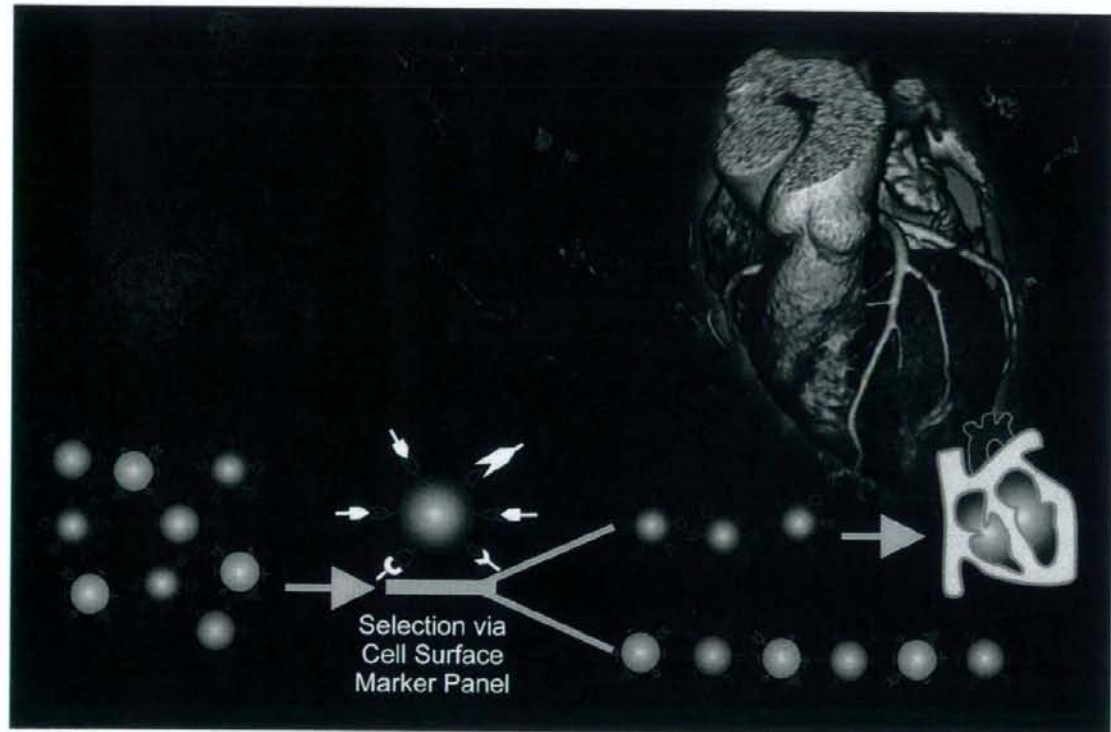
15) Nakazawa T, et.al	Terminal proteomics: N- and C-terminal analysis for high-fidelity identification of proteins using MS.	Proteomics	8	673-685	2008
16) Kuyama H, et.al	C-terminal sequence analysis of protein by MS - Efficient isolation and de novo sequencing.	BIOforum Europe	12	14-16	2008
17) Sonomura K, et.al	The specific isolation of C-terminal peptides of proteins through a transamination reaction and its advantage for introducing functional groups into the peptide.	Rapid Communications in Mass Spectrometry	23	611-618	2008

PROTEOMICS

Clinical Applications

REPRINT

www.clinical.proteomics-journal.com



**Focus on
Cardiovascular Proteomics**

Editors:
Manuel Mayr and Jennifer E. Van Eyk

Endorsed as an
Official Journal of

HU

Human Proteome Organisation

 WILEY-BLACKWELL

RESEARCH ARTICLE

An application of the 2-nitrobenzenesulfonyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery

Makoto Watanabe^{1,2}, Ichiro Takemasa³, Naomasa Kawaguchi⁴, Masakazu Miyake³, Noriko Nishimura^{1,2}, Toshiya Matsubara^{1,2}, Ei-ichi Matsuo², Mitsugu Sekimoto³, Katsuya Nagai⁵, Nariaki Matsuura⁴, Morito Monden³ and Osamu Nishimura^{1,2}

¹ Division of Disease Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

² Life Science Laboratory, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

³ Department of Surgery, Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

⁴ Department of Pathology, School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

⁵ Laboratory of Proteins Involved in Homeostatic Integration, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

In the development of novel biomarkers, the proteomic approach is advantageous because using it the cancer-associated proteins can be directly identified. We previously developed a 2-nitrobenzenesulfonyl (NBS) method to improve quantitative proteome analysis. Here, we applied this method to proteomic profiling of colorectal carcinoma (CRC) to identify novel proteins with altered expression in CRC. Each pair of tumor and normal tissue specimens from 12 CRC patients was analyzed, and approximately 5000 NBS-labeled paired peaks were quantified. Peaks with altered signal intensities (>1.5-fold) and occurring frequently in the samples (>70%) were selected, and 128 proteins were identified by MS/MS analyses as differentially expressed proteins in CRC tissues. Many proteins were newly revealed to be CRC related; 30 were reported in earlier studies of CRC. Six proteins that were up-regulated in CRC (ZYX, RAN, RCN1, AHCY, LGALS1, and VIM) were further characterized and validated by Western blot and immunohistochemistry. All six were found to be CRC-localized, either in cancer cells or in stroma cells near the cancer cells. These results indicate that the proteins identified in this study are novel candidates for CRC markers, and that the NBS method is useful in proteome mining to discover novel biomarkers.

Received: November 7, 2007

Revised: January 21, 2008

Accepted: January 31, 2008

**Keywords:**

Biomarkers / Cancer / Colorectal carcinoma / NBS method

Correspondence: Professor Osamu Nishimura, Division of Disease Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

E-mail: osamu_nishimura@protein.osaka-u.ac.jp

Fax: +81-6-6879-4320

Abbreviations: AHCY, S-adenosylhomocysteine hydrolase; CEA, carcinoembryonic antigen; CF, cytosolic fraction; CRC, colorectal carcinoma; CSF, CHAPS-soluble fraction; IHC, immunohistochemistry; LGALS1, galectin1; NBS, 2-nitrobenzenesulfonyl; RAN, Ras-related nuclear protein; RCN1, reticulocalbin1; VIM, vimentin; WB, Western blot; ZYX, zyxin

1 Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is the third most common type of cancer and the second leading cause of cancer death in developed countries. Over the past two decades, the clinical test for CRC has utilized carcinoembryonic antigen (CEA) as a marker protein. However, most positive cases are found in patients with advanced cancers or even metastases. For example, the positive detection ratio of CEA in patients with metastatic cancer generally ranges from 70 to 80%, whereas it decreases in patients with both locally recurrent and early

cancers [1–3]. CEA has not been proven effective as a screening marker for early-stage cancers, and its applications have been limited to the detection of advanced cancers. This supports the need of development of novel CRC biomarkers to improve the accuracy of diagnosing CRC. Recently, various approaches involving transcriptome analysis have been extensively applied in an effort to identify novel diagnostic markers for CRC [4, 5]. However, mRNA expression levels do not necessarily correlate with protein expression. Hence, direct analysis of proteins is indispensable for the discovery of novel biomarkers.

Most proteomic approaches involving CRC tissues have been performed by 2-DE in combination with MS, and some successful results have been obtained [6–10]. However, it is still difficult to perform comprehensive proteome analysis, as this method has several technical limitations [11]. Therefore, we previously developed and improved the 2-nitrobenzenesulfonyl (NBS) method, which is based on stable isotope labeling of tryptophan residues by NBS reagents [12–14] for global quantitative proteome analysis. In this method, labeled peptides after enzymatic digestion are subjected to HPLC separation, while intact proteins are analyzed directly using the 2-DE method. These two different methodologies can detect different sets of proteins, so the NBS method can complement other methods such as 2-DE.

The primary advantage of this new method is that it reduces the number of peptides by selecting NBS-labeled tryptophan-containing peptides from bulk tryptic digests. This is advantageous because tryptophan residues are the least abundant amino acid in proteins, yet they occur in a large proportion of proteins [15]. Another advantage of this method is the special matrix used for MALDI-TOF MS measurement, which can detect the NBS-labeled peptides with high sensitivity [14]. For these reasons, we believe that this method can improve proteome mining by increasing the dynamic range of detection, and that it is advantageous for quantitative proteome analysis [16–18]. Here, we applied the NBS method to analysis of clinical samples from CRC patients in order to discover novel biomarker candidates.

2 Materials and methods

2.1 Tissue samples

Twelve primary colorectal cancer specimens and corresponding normal colonic mucosal specimens were obtained from surgical resections from March 2003 to November 2004. All patients with tumors were diagnosed at advanced stages, and none of the adenomas was contained in a cancerous component. All normal tissues were histopathologically confirmed as cancer-free. None of the patients was treated with preoperative chemotherapy or radiotherapy. The samples were stored in RNAlater (Qiagen, Valencia, CA) at -20°C after sampling. This study was

approved by the Institutional Review Board of Osaka University and informed consent was obtained from each patient.

2.2 Sample preparation

Frozen tissue samples were homogenized in 500 μL of lysis buffer A (50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin) on ice using a Sample Grinding Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Homogenates were centrifuged at $100\,000 \times g$ for 60 min and supernatants were obtained as the cytosolic fraction (CF). Pellets were washed twice with lysis buffer A and homogenized in 500 μL of lysis buffer B (2% CHAPS, 9 M urea, 50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin); homogenates were centrifuged at $100\,000 \times g$ for 60 min. Supernatants were obtained as the 2% CHAPS-soluble fraction (CSF). These fractionated samples were precipitated using the 2D-Clean-Up Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) and resuspended in 8 M urea and 5 mM EDTA. After centrifugation at $10\,000 \times g$ for 5 min, supernatants were recovered and subjected to NBS reagent labeling. Protein concentration was determined by BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL) using BSA as a standard.

2.3 NBS reagent labeling, peptide fractionation and MS measurement

NBS reagent labeling was performed according to the manufacturer's protocol (^{13}C NBS stable isotope labeling kit-N; Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan). Normal and tumor tissue samples (100 μg each) were labeled with isotopically light and heavy NBS reagent, respectively. NBS-labeled samples were then mixed, reduced, alkylated and digested by trypsin. NBS-labeled peptides were enriched from tryptic digests and fractionated using Phenyl Sepharose, as described previously [13]. The resulting seven fractions were combined into three fractions and subjected to RP-LC (LC-10ADvp μHPLC System; Shimadzu), as described previously [16]. Eluates were automatically deposited onto MALDI target plates by the LC spotting system (AccuSpot; Shimadzu). These samples were automatically analyzed by MALDI-TOF MS (AXIMA-CFR Plus; Shimadzu/Kratos, Manchester, UK) [16].

2.4 Relative quantification and identification of differentially expressed proteins in CRC

Relative quantification of each NBS-labeled peptide pair was performed using TWIP Version 1.0 (DynaCom, Kobe, Japan), referring to a monoisotopic mass list from MASCOT Distiller Version 1.1.2 (Matrix Science), as described previously [16]. We previously demonstrated that quantification errors (%) using a model protein mixture were less than 4% [16]. Thus, peptide pair ratios larger than 1.5-fold, or smaller than

0.66, were set as threshold values for significant differences. A threshold value for the occurrence was set to 70% of all the CRC patient samples in which peptide pairs were detected. In this manner, candidate peptides were selected and further subjected to MS/MS analysis (AXIMA-QIT-TOF; Shimadzu/Kratos) [16]. Proteins were identified by the MASCOT MS/MS Ion Search algorithm (Version 2.0; Matrix Science) using mass lists generated by MASCOT Distiller. The MASCOT search parameters were as follows: trypsin digestion allowing up to two missed cleavages, fixed modifications of 12CNBS (or 13CNBS) and carbamidomethyl (C), variable modifications of oxidation (M), peptide tolerance 0.3 Da and MS/MS tolerance of 0.5 Da. Search results having *p*-values less than 0.05 were judged as positive identifications.

2.5 Western blot analysis

Total protein extracts (20 µg; CF or CSF) from the tumor and corresponding normal tissue samples of each patient were separated on 10 or 15% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were then transferred to a NC membrane and prestained SDS-PAGE standards (Bio-Rad) were used to estimate their molecular weights. The following primary antibodies were used: mouse anti-human Zyxin (ZYG), polyclonal (Abnova, Taipei, Taiwan), mouse anti-human RAN, monoclonal (Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-human S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY), polyclonal (Abnova), rabbit anti-human reticulocalbin 1 (RCN1), monoclonal (Abnova), rabbit anti-human galectin1 (LGALS1), polyclonal (Abcam), and rabbit anti-human Vimentin (VIM), polyclonal (Abcam). NC membranes were incubated with diluted antibody solution for 2 h at room temperature. After washing in PBS, the membranes were incubated at room temperature for 1 h with HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (GE Healthcare) for ZYG, RAN and AHCY, or HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (GE Healthcare) for RCN1, LGALS1 and VIM. Primary antibody dilutions were anti-ZYG (1:500); anti-RAN (1:1000); anti-AHCY (1:1000); anti-RCN1 (1:1000); anti-LGALS1 (1:1000); and anti-VIM (1: 1000). Secondary antibody dilutions were anti-mouse IgG (1:4000) and anti-rabbit IgG (1:10000). Proteins were then visualized by ECL Plus detection reagents (GE Healthcare), exposed to X-ray film (Kodak, US), and the protein band densities were quantified using "CS Analyzer v3.0" software (ATTO, Tokyo). Used membranes were stained with 0.2% CBB R-250 in 40% MeOH, 10% AcOH for 5 min and destained with 90% MeOH, 2% AcOH for 15 min to confirm equal protein loading and blotting (data not shown).

2.6 Immunohistochemical staining

Ten percent buffered formalin-fixed paraffin-embedded sections were prepared from ten surgically resected cancers. Tissue specimens from the same cancers were also used for proteomics analyses. The streptavidin-biotin immunoperox-

idase complex method was used for immunohistochemical analysis. Briefly, 4-µm slices of tissue section were deparaffinized and incubated with 0.03 mol/L citrate buffer (pH 6.0) and heated to 98°C for 40 min for antigen retrieval. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide and 0.1% sodium azide in distilled water for 15 min. After three rinses in PBS pH 7.2, 10% bovine serum (Wako, Osaka, Japan) was applied for 10 min to block nonspecific reactions. Sections were incubated with the primary antibody for 60 min at room temperature. Primary antibodies for immunohistochemical staining were the same as those used in the Western blot (WB) analyses. After washing in PBS, the sections were treated with biotinylated sheep anti-mouse IgG (Amersham, London, UK) for ZYG, RAN and AHCY or biotinylated anti-rabbit IgG (Nichirei, Tokyo, Japan) for RCN1, LGALS1 and VIM for 15 min. After washing in PBS, the sections were reacted with streptavidin-biotin peroxidase complex (Dako, Copenhagen, Denmark) at 1:300 dilution for 15 min. The peroxidase reaction was visualized by incubating the sections with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in 0.05 M Tris buffer (pH 7.6) with 0.01% hydrogen peroxide for 3 min. Sections were then counterstained with hematoxylin. Negative control sections were tested using normal mouse or rabbit serum instead of the primary antibody. Tissue sections of normal liver (for AHCY), skin (for VIM), lymph node (for LGALS1) and testis (for RAN, RCN1, and ZYG) were prepared as positive controls according to the manufacturers' recommendations or previous publications. All slides were evaluated by a blinded pathologist. For each immunohistochemical analysis, the mean intensity of the tumor cells or stromal cells was evaluated in comparison with the positive controls as follows: weak, 1+; moderate, 2+; strong, 3+.

3 Results

3.1 Proteomic profiling and identification of differentially expressed proteins in CRC tissues

Differential proteome analysis between CRC and normal tissues from each patient was performed using the NBS method (Fig. 1A). This analysis was performed using CF and CSF samples from each of the 12 patients. After a series of experiments, including NBS labeling, peptide fractionation and MS measurement, 2600–3000 paired peaks were observed per analysis. In this method, the relative ratio of expression for each protein is calculated from the relative ratio of peak intensity (or area) in each pair-peak (NBS-labeled peptides) [12]. Following this relative quantification, pair-peak lists were evaluated (see Section 2) and 320 pairs were judged to have significant differences in protein expression and to occur with significant frequency in patients. After these peaks were subjected to MS/MS analysis, 226 decent MS/MS spectra were obtained, and 156 search results (138 identical peptides) were judged as