

って乾燥・脱水を行った。脱水したゲル片に 5  $\mu$ l のトリプシン溶液 (20  $\mu$ g/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質をトリプシン消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50  $\mu$ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50  $\mu$ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50  $\mu$ l の 100% acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収する操作を 3 回行った。得られたペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 (Millipore) を用いて精製し、サンプル溶液とした。サンプル溶液 1  $\mu$ l を MALDI-MS 用ターゲットプレート Prespotted AnchorChip for Proteomics (BRUKER DALTONICS) に滴下し、乾燥させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (AutoflexII-TOF/TOF, BRUKER DALTONICS) によりトリプシン消化ペプチドの質量分析を行った。なお、キャリブレーションは M/z: 757.39916, 1046.54180, 1296.68480, 1672.91700, 1758.93261, 2093.08620 のピークを基準物質として行った。なお、ペプチドの同定には、メチオニン残基の酸化、iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮して行った。

#### B-5. ナイーブファージ抗体ライブラリの作製

ナイーブファージ抗体ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを導入した大腸菌 TG1 株に 50  $\mu$ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地を加えて 250 rpm、37°C で OD<sub>600</sub> = 0.3~0.6 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37°C で 30 分間、250 rpm、37°C で 30 分間培養後、2,000 rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 100  $\mu$ g/ml ampicillin、50  $\mu$ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4°C、2,000 rpm で 10 分間、更に 10,000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45  $\mu$ m の Millex-HV フィル

ター (MILLIPORE) を用いてろ過し、scFv 提示ファージとして回収した。

#### B-6. Dot Blot パンニング

ドットプロット装置 (Bio-Dot Microfiltration Apparatus, BioRad) に、あらかじめ TBS に浸したニトロセルロース膜を装着し、可溶化ゲルから回収した各スポット由来の蛋白質溶液 1  $\mu$ l を TBS にて 100 倍希釈した全量を各 well に添加し、メンブレンに固相化した。blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l/well 添加して、室温で 1 時間静置してブロッキングした。scFv 提示ファージ溶液と blocking buffer とを 9 : 1 で混合し 4°C で 1 時間静置してブロッキングしたものを input とし、100  $\mu$ l/well 添加して、室温で 3 時間緩やかに振盪した。0.1% TBST で 10 回と TBS で 1 回洗浄後、100 mM triethylamine を 100  $\mu$ l 添加して、室温で 30 分間静置した。output ファージ溶液を回収し、それらに 50  $\mu$ l の Tris-HCl (pH 8.0) を加えて中和した。また、input ファージ及び output ファージの一部を用いてタイターを測定した。output ファージは大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニング output とした。

#### B-7. Dot Blot ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを大腸菌 TG1 に感染させ、生じたコロニーを 96 well プレートにピックアップした。各 well が OD<sub>600</sub> = 0.3~0.6 に達するまで培養した後、100  $\mu$ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 10 倍希釈した M13KO7 ヘルパーファージ溶液を 20  $\mu$ l/well で添加した。37°C で 1 時間静置培養した後、2000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。100  $\mu$ g/ml ampicillin、50  $\mu$ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を 200  $\mu$ l 加えて 37°C で一晩培養し、2000 rpm で 10 分間遠心し、回収した上清を以下のスクリーニング実験に用いた。一方で 2D-DIGE 解析から得られた抽出蛋白質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を使い、TBS に浸したニトロセルロース膜上に固相化した。各 well に blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200  $\mu$ l ずつ添加し、室温で 2 時間静

置してブロッキングを行った。TBS で 1 回洗浄後、blocking buffer で希釈した精製ファージを 200  $\mu$ l/well 添加し、室温で 2 時間静置した。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) と TBS で 5 回洗浄後、blocking buffer で 1,000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody を 200  $\mu$ l/well 添加した。TBST と TBS で 3 回洗浄後、メンブレンを ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で処理し、LAS-3000 を使用して検出・撮影した。

#### B-8. ファージ抗体を用いた Western Blot

肺がん細胞株 RERF-LC-MS と RERF-LC-KJ を細胞溶解液により可溶化し、2 倍濃度の Laemmli Sample Buffer を等量混合し、終濃度 5% となるように 2-mercaptoethanol を添加後、95  $^{\circ}$ C で 5 分処理した。各試料を、SDS-PAGE 用ゲルに添加し、電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを PVDF 膜に転写し、10% Block Ace にてブロッキングした。TBS で 1 回洗浄後、ファージ抗体  $10^{12}$  CFU/ml を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 3 時間反応させた。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) にて一晚洗浄した転写膜に、0.4% Block Ace で 3,000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。TBST で 4 回洗浄後、メンブレンを ECL plus Western Blotting Detection System で処理し、LAS-3000 により検出・撮影した。

#### B-9. ファージ抗体を用いた組織アレイ解析

ヒト正常肺・肺がん組織アレイ (SUPER BIO CHIPS および US Biomax 社製) をキシレン・エタノールにて脱パラフィン・親水処理を行い、DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO) に浸して、125  $^{\circ}$ C で 30 秒、90  $^{\circ}$ C で 30 秒処理することで抗原賦活化した。組織アレイ染色の一連の操作には自動染色処理装置 DAKO AutoStainer (DAKO) を使用した。内在性のペルオキシダーゼ処理のため、DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) を 5 分処理し、更に 10% BSA を 30 分 インキュベーションしてスライドのブロッキングを行った。その後  $10^{13}$  CFU/ml ファージを添加し、室温で 1 時間静置した。TBST (0.05% Tween 20 を含む

TBS) で 5 回洗浄後、mouse anti-M13 monoclonal Ab (100 倍希釈) (GE Healthcare) を添加し、30 分静置した。TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) で 3 回洗浄後、ENVISION+ Dual Link (DAKO) を添加した。TBST で 3 回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO) を用いて発色させた。組織マイクロアレイによる抗原発現のスコア化は、がん細胞での発現分布の割合を 2 段階で (がん細胞の 50% 以下の発現を 1、がん細胞の 50% 以上の発現を 2)、発現強度を 3 段階にスコア化し、その合計が 2 以下だとネガティブ、3 以上だとポジティブと判定した。臨床情報との相関解析には、統計解析ソフト (StatView) を使用して評価した。

#### C. 研究結果

最初に、同一患者由来の肺がん細胞株 RERF-LC-MS と RERF-LC-KJ の浸潤能を *in vitro* invasion assay を用いて検証した (図 1)。その結果、RERF-LC-MS は殆ど浸潤しなかったのに対し、RERF-LC-KJ は有意に多く浸潤した。このことから RERF-LC-MS は低転移性、RERF-LC-KJ は高転移性であることが示唆された。

そこで次に、リンパ節転移関連バイオマーカー蛋白質を探索するために、正常の気管上皮細胞と低リンパ節転移肺がん細胞株から調製した蛋白質を対照サンプルに、高リンパ節転移肺がん細胞株から調製した蛋白質を疾患サンプルとして 2D-DIGE 解析を試みた (図 2)。定量的解析を行った結果、正常細胞で発現が少なく、かつリンパ節低転移性肺がん細胞に比べて高転移性細胞間で有意に発現変動した 16 個の spot に対して、ゲルを切り出し、ゲルを 88 mM NaIO<sub>4</sub> により溶解することで蛋白質を抽出した。抽出した蛋白質の一部を MS 解析による蛋白質の同定に供し (Table 1)、一部をニトロセルロース膜に固相化し、Dot Blot 装置を用いたパンニングを同時に行い、抗体作製を試みた (Table 2)。Table 1 に示す同定蛋白質の中で、Cytokeratin 8、Cytokeratin 18、Glutathione S Transferase は肺がんに関連するバイオマーカーとして報告があるが、それ以外の蛋白質については肺がんとの関連は不明であった。また、Glutathione S Transferase に関しては、高転移性肺がんにおいて発現が減少するという報

告がなされており、本解析結果との差異について、さらなる検討が必要である。また、spot 3

(OSBPL5) を抗原としてパンニングを試みた結果、約 3000 倍の濃縮傾向が観察された。更に目的抗原に対するモノクローナル抗体を単離できているかを確認するため、spot 3 に対する親和性を Dot Blot ELISA により評価した (図 3)。その結果、4<sup>th</sup>パンニング後のクローンでは、多数の spot 3 に対する抗体の単離に成功していることが明らかとなった。また、得られたファージ抗体の特異性評価をするため、ランダムに 1 クローンを選択し、その spot 3 に対するファージ抗体を用いた Western Blot により評価したところ、単離したファージ抗体は spot 3 特異的に結合し、Western Blot 等のアプリケーションに使用可能な汎用性の高い抗体であることを確認している。Table 2 に 2D-DIGE 解析で見出された全ての蛋白質に対する抗体単離の結果をまとめたが、ここに示す通り、同定した 16 種類全ての spot の蛋白質に対して親和性を有する複数の抗体の取得に成功した。2D-DIGE のゲルから回収可能な微量蛋白質 (~100 ng) を用い、MS による蛋白質同定と同時に、ファージ抗体を取得するまでに要した期間はわずか 2 週間であり、ナイーブファージ抗体ライブラリを駆使した抗体創製技術を組み合わせ本技術の有用性が示された。

次に、上記検討で見出した蛋白質の肺がん臨床サンプルでの発現を確認するため、肺がん組織と正常の肺組織切片が 1 枚のスライドガラス上に搭載された組織マイクロアレイを、取得したファージ抗体にて免疫染色することで評価した (Table 3)。なお、組織マイクロアレイの染色には、各ファージ抗体の中で Dot Blot ELISA により親和性が最も高いと考えられたクローンをを用いた。スコアリングの結果、Glucosidase II、Unnamed protein product、Glycyl-tRNA synthetase、Chaperonin containing TCP1 subunit 8、Eukaryotic initiation factor 4AII に関しては正常肺組織、肺がん組織において全く発現が認められなかったことから、これら抗原は使用した細胞株に特徴的な蛋白質であるものと考えられる。また、Actinin alpha I、Downstream of tyrosine kinase 7、Keratin 7、Acyl CoA Dehydrogenase、Pulmonary surfactant apoprotein (PSA) は正常肺組織、肺がん組織において共に発現している

一方で、Aldehyde dehydrogenase は約 20%、Oxysterol-binding protein-like 5 (OSBPL5)、Calumenin (CALU)、Glutathione S Transferase は約 40%、Cytokeratin 18 は約 60%、Cytokeratin 8 は約 80%の肺がんで特異的な発現が確認された。

これらの分子について、OSBPL5 は膵がんの浸潤に関わる分子として報告はあるものの、肺がん患者のリンパ節転移に関係する既存の報告はない。CALU の肺がんでの発現も知られていない。組織マイクロアレイには各組織中に患者の病期や転移の有無、予後等の様々な臨床情報がリンクしており、それらの情報と抗原発現の情報を照らし合わせて評価することで、創薬バイオマーカー蛋白質としてのバリデーションが可能となる。今後、各種臨床情報との相関解析を行うことで、見出した肺がん関連分子の機能が解明可能になるものと考えられる。

以上、抗体プロテオミクス技術により肺がん関連蛋白質の探索を試み、肺がんで高発現する候補分子の絞り込みに成功した。よって、本技術が有用な創薬バイオマーカー蛋白質の迅速・効率的な絞り込み技術として有用であることが明らかとなった。

## D. 考察

### C. 結果の項に記載。

## E. 結論

本年度、最適化を試みた抗体プロテオミクス技術により、新規肺がんバイオマーカー候補の同定と同時に、見出した全ての候補蛋白質に対する抗体 (ファージ発現型抗体) を僅か 2 週間という短時間で作製しうることを明らかとした。これにより、多数の臨床サンプルにおける候補分子のバリデーションを大きく加速することが可能である。本方法は、次世代の創薬基盤技術として有用な方法論になるものと期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S.,

Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie.*, 64(4):238-41, 2009.

2. 角田慎一：癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究., *Pharma VISION NEWS*, 13: 32-37, 2009.
3. 堤 康央：蛋白療法最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価., *Drug Delivery System*, 24(5):514-521, 2009.
4. 長野一也, 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央, プロテオーム解析とタンパク質の DDS の設計・評価, *PharmTech Japan* 24: 24-30, 2009.

## G-2. 学会発表

1. Nagano K., Okamura T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Antibody proteomics technology for efficient screening of tumor-related proteins using phage antibody library. Biomarker World Congress 2009, Philadelphia (U.S.A.), 27-29, 2009.
2. Okamura T., Nagano K., Yamashita T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Identification of candidate proteins related to lymph node metastasis by antibody proteomics technology. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Toronto, 2009.
3. Nagano K., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Search for tumor-related biomarker proteins by antibody proteomics technology. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Toronto, 2009.
4. Nagano K., Yamashita T., Okamura T., Watanabe T., Kanasaki S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Frequent expression of TRAIL-R2 in human breast tumors revealed by antibody proteomics technology. 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon, 2009.
5. 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央: 創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬. *CphI Japan 2009*, 東京, 2009 年.
6. 角田慎一: 創薬ターゲット探索基盤としての抗体プロテオミクス. 第 46 回薬剤学懇談会研究討論会, 神戸, 2009 年.
7. 堤 康央: 蛋白療法最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価. 第 25 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2009 年.
8. 角田慎一, 堤 康央: 創薬バイオマーカー探索のための抗体プロテオミクス技術. 日本プロテオーム機構 (JHUPPO) 第 7 回大会, 東京, 2009 年.
9. 堤 康央, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による疾患マーカー・治療ターゲットの効率的探索. 彩都バイオサイエンスセミナー, 大阪, 2010 年.
10. 長野一也, 岡村賢孝, 中川晋作, 小泉桂一, 済木育夫, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術による肺がんリンパ節転移関連蛋白質の探索 1. 第 18 回日本がん転移学会学術集会旭川, 2009.
11. 岡村賢孝, 長野一也, 小泉桂一, 済木育夫, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術による肺がんリンパ節転移関連蛋白質の探索 2. 第 18 回日本がん転移学会学術集会, (北海道), 2009 年.
12. 長野一也, 今井 直, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカーの探索とその評価. 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009 年.
13. 岡村賢孝, 長野一也, 山下琢矢, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術によるリンパ節転移関連蛋白質の探索. 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009 年.
14. 山下琢矢, 長野一也, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 今井 直, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術による乳がん関連蛋白質の同定と機能評価. ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋, 2009 年.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当なし

H-2. 実用新案登録

該当なし

H-3. その他

該当なし

I. 研究協力者

角田 慎一	医薬基盤研究所 スプロジェクト	創薬プロテオミク
鎌田春彦	医薬基盤研究所 スプロジェクト	創薬プロテオミク
阿部康弘	医薬基盤研究所 スプロジェクト	創薬プロテオミク
長野一也	医薬基盤研究所 スプロジェクト	創薬プロテオミク

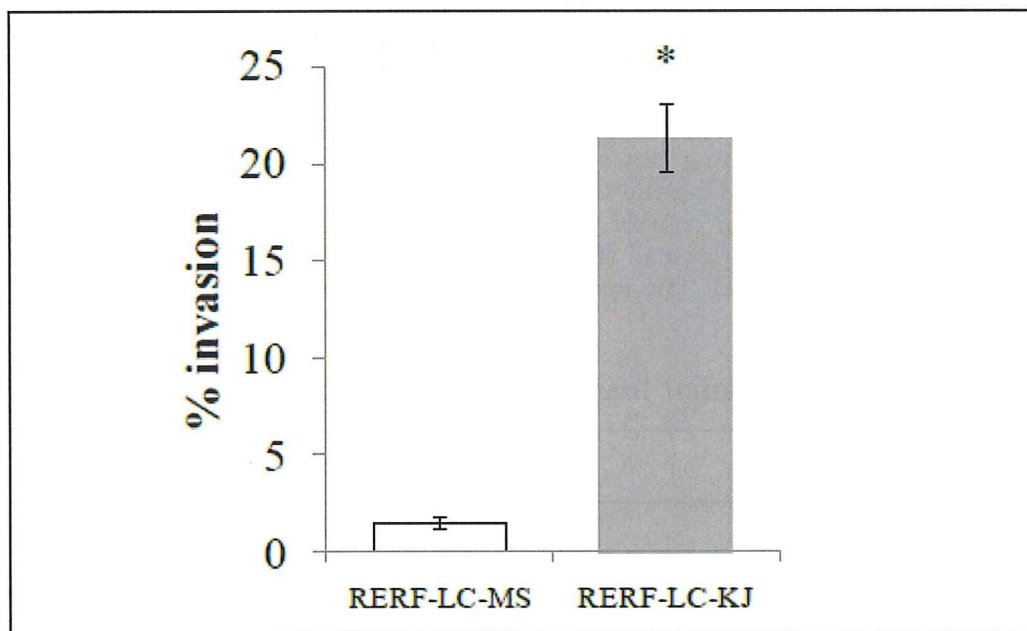


Fig. 1 Invasive capacity of low (RERF-LC-MS) and high (RERF-LC-KJ) metastatic lung cancer cells. Invasive capacity of lung cancer cell lines was analyzed using 96 well BME cell invasion assay Kit (CULTREX). Error bar means SD (\* P < 0.01)

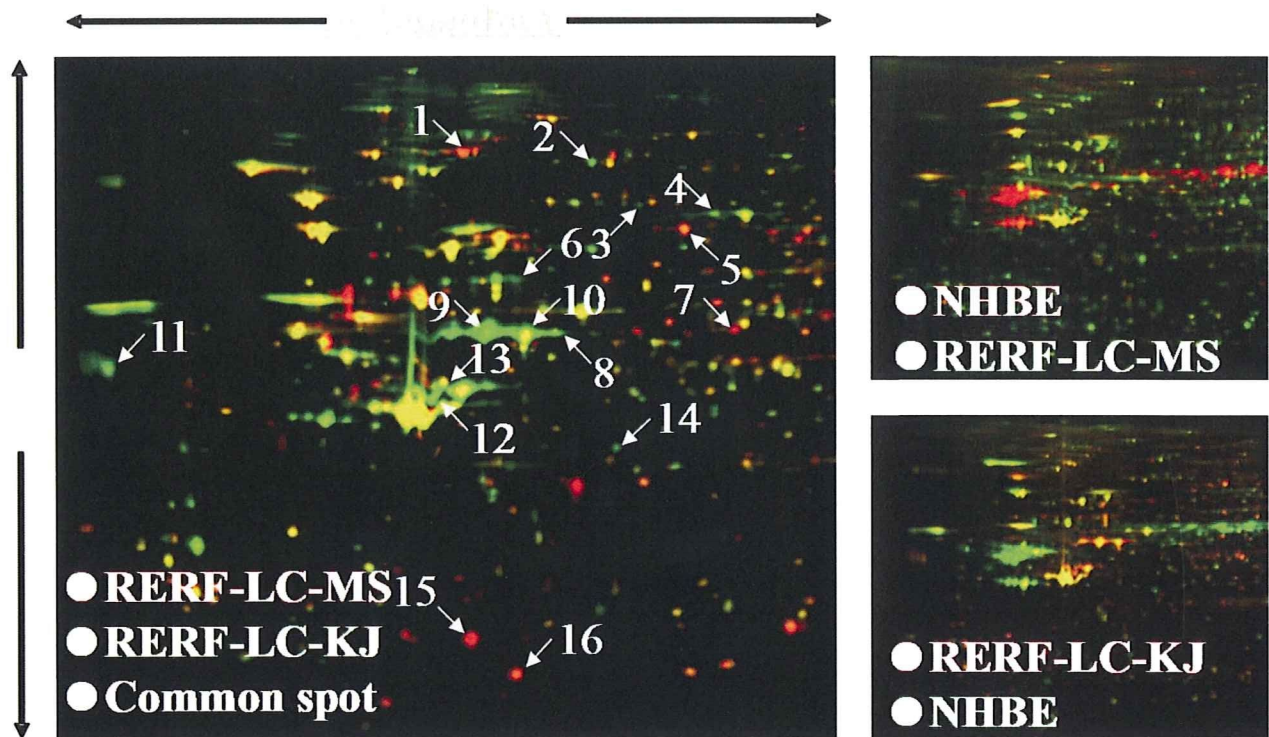


Fig. 2 Representative overlapping 2D-DIGE expression map of normal human bronchial epithelial cells (NHBE) and human lung cancer cells (RERF-LC-MS, RERF-LC-KJ) proteins labelled with fluorescent dyes (Cy2, Cy3 and Cy5). For 2D-DIGE experiments, control (NHBE) and test cell (RERF-LC-MS, RERF-LC-KJ) lysates were labelled with 200 pmol of either Cy3 or Cy5 fluorescent dyes (GE Healthcare) for comparison on the same gel. The spots indicated by arrows are the proteins identified by MALDI-TOF/MS.

**Table 1. Identification of tumor lung cancer related proteins by MALDI-TOF/MS**

spot	protein name	MW	pI	protein volume	high metastasis /low metastasis	cancer / normal
#1	Actinin alpha I	102993	5.25	406 ng	2.1-fold ↓	2.6-fold ↑
#2	Glucosidase II	106833	5.71	523 ng	3.2-fold ↑	3.1-fold ↑
#3	OSBP-related protein 5 (OSBPL5)	64285	5.85	582 ng	2.2-fold ↑	2.5-fold ↑
#4	Unnamed protein product	69356	5.94	494 ng	2.4-fold ↑	3.8-fold ↑
#5	Glycyl-tRNA synthetase	77463	5.88	582 ng	2.6-fold ↓	4.3-fold ↑
#6	T-complex protein 1 subunit theta	59440	5.54	242 ng	3.1-fold ↑	2.3-fold ↑
#7	Downstream of tyrosine kinase 7	53160	6.43	523 ng	2.5-fold ↓	3.7-fold ↑
#8	Aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	50511	5.83	494 ng	2.7-fold ↑	3.0-fold ↑
#9	Keratin 7	51354	5.4	494 ng	3.9-fold ↑	2.0-fold ↑
#10	Cytokeratin 8	53529	5.52	787 ng	6.6-fold ↑	3.9-fold ↑
#11	Calumenin (CALU)	38143	4.47	582 ng	2.6-fold ↑	2.3-fold ↑
#12	Eukaryotic initiation factor 4AII	46597	5.33	376 ng	2.4-fold ↑	2.3-fold ↑
#13	Cytokeratin 18	47305	5.27	699 ng	5.8-fold ↑	3.7-fold ↑
#14	Acyl CoA Dehydrogenase	42349	5.86	406 ng	2.1-fold ↑	2.8-fold ↑
#15	Pulmonary surfactant apoprotein (PSA)	26339	5.17	494 ng	2.8-fold ↓	12-fold ↑
#16	Glutathione S Transferase	23442	5.44	523 ng	2.8-fold ↓	2.6-fold ↑

**Table 2. Enrichment ratio and isolation number of antibodies related lung cancer**

spot	protein name	Output/Input Ratio ( $\times 10^{-8}$ ) / round				Positive phage done / pick-up done
		1st	2nd	3rd	4th	
#1	Actinin alpha I	3	130	400	11000	23 /30 done
#2	Glucosidase II	3	65	500	350	15 /30 done
#3	OSBPL5	4	13	2500	2800	8 /30 done
#4	Unnamed protein product	3	6	130	6000	14 /30 done
#5	Glycyl-tRNA synthetase	9	16	170	4350	4 /30 done
#6	T-complex protein 1 subunit theta	8	24	210	2750	8 /30 done
#7	Downstream of tyrosine kinase 7	12	40	150	2150	7 /30 done
#8	NAD+	15	12	100	2300	6 /30 done
#9	Keratin 7	5	12	70	1450	10 /30 done
#10	Cytokeratin 8	9	140	150	21000	9 /30 done
#11	CALU	16	240	60	2000	9 /30 done
#12	Eukaryotic initiation factor 4AII	23	21	77	3500	22 /30 done
#13	Cytokeratin 18	7	2	170	350	6 /30 done
#14	Acyl CoA Dehydrogenase	35	6	37	4500	9 /30 done
#15	PSA	60	44	47	110	4 /30 done
#16	Glutathione S Transferase	14	14	110	2200	9 /30 done

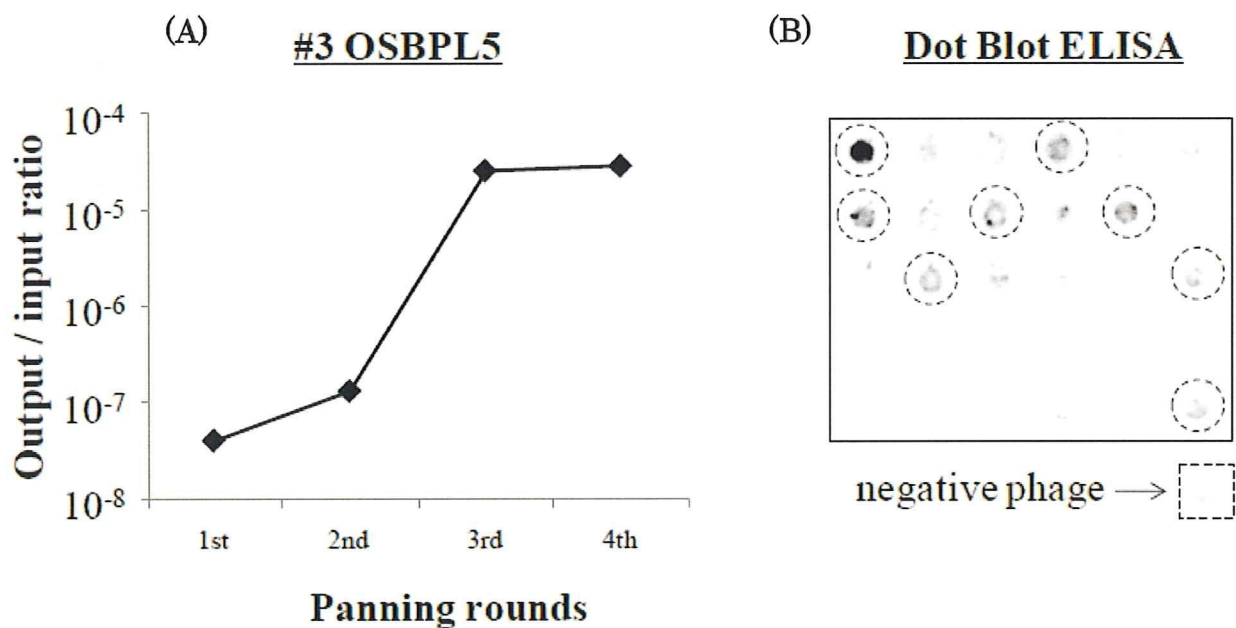


Fig. 3 Isolation of antibodies to spot #3 protein from naïve scFv phage library by Dot Blot panning. Affinity panning was performed on a membrane blotted protein derived from spot #3. Protein was blotted on membrane and affinity panning was performed. After binding step, the membrane was washed ten times with 0.1 % TBS. Reacted phage clones binding to protein spot #3 were collected from the membrane by elution using triethylamine. (A) Increase of output/ input ratio. (B) Binding properties of selected scFV phage clones. Dot-line circles represent positive clones.

**Table 3. Normal & lung cancer tissue microarray analysis using phage antibody**

protein name	positive rate of various antigens	
	normal tissue	lung cancer tissue
Actinin alpha I	2 / 9 (22.2 %)	8 / 50 (16 %)
Glucosidase II	0 / 9 (0 %)	0 / 50 (0 %)
OSBPL5	0 / 19 (0 %)	75 / 221 (33.9 %)
Unnamed protein product	0 / 9 (0 %)	0 / 50 (0 %)
Glycyl-tRNA synthetase	0 / 9 (0 %)	0 / 50 (0 %)
T-complex protein 1 subunit theta	0 / 9 (0 %)	0 / 50 (0 %)
Downstream of tyrosine kinase 7	3 / 9 (33.3 %)	30 / 50 (60 %)
NAD+	0 / 9 (0 %)	12 / 50 (24 %)
Keratin 7	2 / 9 (22.2 %)	24 / 50 (48 %)
Cytokeratin 8	0 / 9 (0 %)	40 / 50 (80 %)
CALU	0 / 19 (0 %)	123 / 221 (55.7 %)
Eukaryotic initiation factor 4AII	0 / 9 (0 %)	0 / 50 (0 %)
Cytokeratin 18	0 / 9 (0 %)	28 / 50 (56 %)
Acyl CoA Dehydrogenase	1 / 9 (11.1 %)	14 / 50 (28 %)
PSA	2 / 19 (10.5 %)	88 / 221 (39.8 %)
Glutathione S Transferase	0 / 9 (0 %)	21 / 50 (42 %)



プロテオミクス手法による卵巣明細胞腺癌の抗癌剤抵抗性分子の同定と機序の解明に関する研究

研究分担者 仲 哲治 医薬基盤研究所 基盤的研究部

免疫シグナルプロジェクト プロジェクトリーダー

## 研究要旨

我々の研究室では、プロテオミクス手法を基盤技術として癌、自己免疫疾患などの難病に対し有効な診断法・治療法の開発に値する有用なバイオマーカー探索を目的に疾患関連蛋白質の解析を行っている。本研究では抗癌剤抵抗性として知られる卵巣明細胞腺癌と抗癌剤感受性として知られる卵巣漿液性腺癌の間で発現差を示すタンパク質を蛍光 2 次元ディファレンシャル電気泳動法(2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis: 2D-DIGE 法)を用いて抗癌剤耐性分子の探索を試みた。その結果、卵巣明細胞腺癌に高発現する分子の一つとして Annexin A4 を同定した。Annexin A4 は漿液性腺癌と比較し、卵巣明細胞腺癌において有意に高発現を示す事が免疫組織化学染色法及びウェスタンブロット法により明らかになった。さらに、Annexin A4 は漿液性腺癌に強制発現させることでカルボプラチンに対して抵抗性を誘導し、その機序として Annexin A4 がカルボプラチンの細胞内取り込み抑制と排出を促進することが細胞内カルボプラチンの定量解析により明らかになった。本研究結果から、Annexin A4 が抗癌剤耐性を克服する上で創薬標的となることが示唆された。

### A. 研究目的

卵巣明細胞腺癌は上皮性卵巣癌組織型の中でも比較的早期に発見される率が高い一方で再発率が高く、化学療法に極めて高く抵抗性を示す予後不良な癌である。従って、再発性の卵巣明細胞腺癌において有効な治療法を開発するためには抗癌剤耐性に関係する分子を同定し、その機序を明らかにすることが重要である。本研究では卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性分子を同定し、機序の解明を目的とした。

### B. 研究方法

#### B-1. 疾患関連タンパク質の解析

卵巣明細胞腺癌薬剤耐性分子の同定と抗癌剤耐性機序の解析

##### 1) 試料

卵巣明細胞腺癌(clear cell carcinoma: CCC)、卵巣漿液性腺癌(serous adenocarcinoma: SAC) 卵巣類内膜癌 (endometrioid adenocarcinoma)、卵巣粘液性腺癌 (mucinous cystadenocarcinoma) 患者組織は大阪大学医学部附属病院にてインフォームドコンセントについて同意を得た

患者より提供していただいた。卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO, OVKATE)は JCRB より入手した。

##### 2) 2D-DIGE 用のタンパク質抽出

抗癌剤耐性として知られる卵巣明細胞腺癌より樹立された卵巣明細胞腺癌細胞株 OVISE、抗癌剤感受性として知られる卵巣漿液性腺癌より樹立された卵巣漿液性腺癌細胞株 OVSAHO を RPMI1640 培地(10% FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有)を用いて増殖させた。増殖した OVISE, OVSAHO を PBS(-)で洗浄後、cell scraper ではがし、遠心分離により細胞を回収した。タンパク質はタンパク質抽出用キット (complete mammalian proteome extraction kit(Calbiochem 社)を用いて抽出した。抽出したタンパク質は、タンパク質定量キット (RC-DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories 社)を用いてウシ血清アルブミン(BSA)をスタンダードとして定量した。

### 3) 2D-DIGE

OVISE および OVSAHO より抽出したタンパク質各 75 µg をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 Cy3、Cy5 (GE healthcare) と混合し、氷上で 30 分間反応させ、その後 10 mM lysine を加え、氷上で 10 分間静置し、反応を停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.0002% BPB, 1.0% Bio-lyte 3-10, 1.2% destreak で 450 µl にメスアップした。2 次元電気泳動後に蛋白質を回収するために、ラベル化しない蛋白質サンプルも同様に混合調製し、等電点電気泳動(IEF)を行った。IEF には 24 cm のストリップゲル(ReadyStrip™ IPG strips pH3-10NL)を用いた。タンパク質を含む膨潤溶液で 12 時間、50V の電圧をかけてストリップゲルを膨潤させ、タンパク質をゲルに取り込ませた。膨潤後、2 時間で 250V、その後 1 時間で 10,000V まで上昇させ、99,000Vh 通電した。IEF 後のストリップゲルを以下の手順で還元アルキル化した。最初に 20 mg/ml DTT を含む平衡化緩

Spectrometry) 銀染キット(和光純薬)により染色した。

### 4) トリプシンを用いたゲル内消化法

2D-DIGE 法にて発現差を示したタンパク質のスポットについて、銀染色したゲルより対応するスポットを切り出した。MS 銀染キットに付属の脱色液を用いて切り出したゲル片の脱色操作を行った後、以下の論文に従ってゲル内消化を行った(Shevchenko A et al., Anal Chem 68:850-8, 1996)。トリプシン消化ペプチドは、5%トリフルオロ酢酸(TFA)、45%蒸留水(DW)、50% CH<sub>3</sub>CN により抽出し、凍結乾燥した。その後、0.1% TFA, 2% CH<sub>3</sub>CN, 98% DW で溶解し、質量分析のサンプルとした。

### 5) 質量分析

質量分析は、液体クロマトグラフィー(LC)と質量分析計(MS)を組み合わせた LC/MS 解析システムにより行った。LC は、逆相 HPLC システムにより、Magic 2002 capillary HPLC (Michrom BioResources 社)を用い、カラムは C-18 RP column (length 15 cm, i.d. 200 µm; GL Sciences Inc 社)を用いた。ペプチドは以下の溶媒 A、溶媒 B を 30 分 5~65% にグラジェントをかけることでカラムから溶出した(溶媒 A: 0.1%ギ酸を含む 2:98 のアセトニトリル/蒸留水; 溶媒 B: 0.1%ギ酸を含む 95:5 のアセトニトリル/蒸留水)。ナノスプレーイオン源を介してイオン化したペプチドは LCQ イオントラップ型質量分析機(Thermo Electron 社)で解析した。データは、MS スキャンとそれに続いて最も強いピークを MS/MS スキャンにより得た。MS/MS スペクトルは MASCOT 検索プログラム(Matrix Science 社)を用い、ヒトタンパク質 SwissProt database (human protein SwissProt database)に対してデータベースサーチをした。

### 6) AnnexinA4 のリアルタイム PCR 法による発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO,

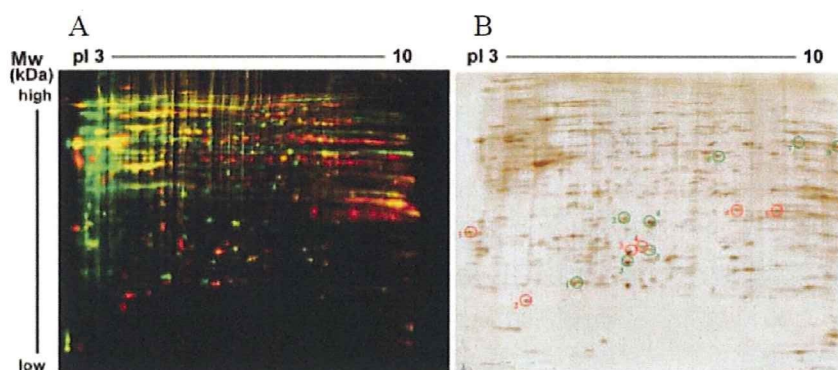


図1 2D-DIGE法による卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE)と卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO)の間のタンパク質発現差解析

A: 緑色のspotはOVISE, 赤色のspotはOVSAHO, 黄色のspotは両者で等量発現しているタンパク質を示す

衝液(50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 20%v/v グリセロール, 2%SDS, pH8.8)で 40 分間振とうし、その後、25 mg/ml ヨードアセトアミドを含む平衡化緩衝液で 30 分間遮光して振とうした。2 次元目泳動には、後のステップでゲルの溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル(10%) に IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、電気泳動槽 Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE healthcare) を用いて、2 次元目の電気泳動を行った。定量解析用ゲルはそのまま蛍光スキャンを行い、質量分析解析用ゲルは染色には MS (Mass

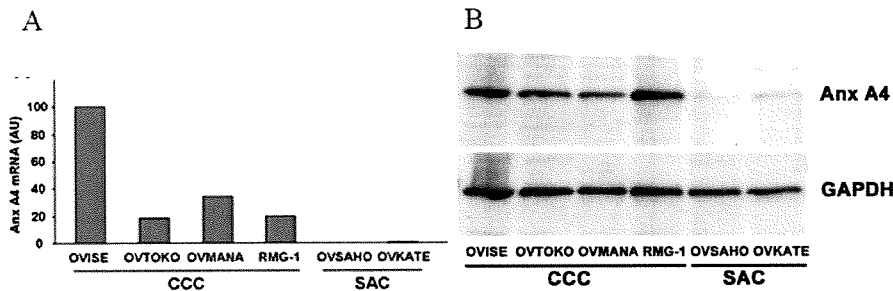


図2 リアルタイムPCR法、及びウェスタンブロット法による卵巣明細胞腺癌細胞株と卵巣漿液性腺癌細胞株におけるAnnexin A4の発現解析

A:リアルタイムPCR法、B:ウェスタンブロット法

RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株 (OVSAHO, OVKATE)より RNeasy mini kit (Qiagen)にて RNA を抽出した。mRNA は SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)により cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR 法は SYBR green premix (Invitrogen)を用いた。検量線として Annexin A4 をコードするプラスミド(pcDNA3.1 AnxA4)を段階希釈した。プライマーは以下の配列を用いた。Forward primer, 5'-ggaggtactgtcaaagctgc-3', Reverse primer, 5'-gccactcagttctgacttcag-3'。PCR 条件は以下の通りである。1 cycle at 95°C for 1 min and 42 cycles of 95°C for 20 sec, 50°C for 20 sec and 72°C for 30 sec。PCR 産物は My IQ™ Single-Color Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories)にて検出した。

#### 7) Annexin A4 のウェスタンブロット法による発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株 (OVSAHO, OVKATE)より PBS(-)で洗浄後、cell scraper ではがし、遠心分離により細胞を回収した。細胞は RIPA buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 x protease inhibitor cocktail (ナカライテスク))により溶解し、遠心分離(13,200rpm, 4°C, 15min)により上清をタンパク質流出液として回収した。卵巣癌凍結組織は液体窒素にて凍結し、マルチビ

ーズショッカー(安井器械)にて粉末状に粉砕し、RIPA buffer を加えることで溶解し、遠心分離(13,200rpm, 4°C, 15min)により上清をタンパク質流出液として回収した。タンパク質濃度はタンパク質定量キット (DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories 社))を用いてウシ血清アルブミン (BSA)をスタンダードとして定量した。

SDS-PAGE(5-20%グラジェントゲル(和光純薬))には、各細胞 10µg のタンパク質をアプライした。40mA で 50min 泳動し、PVDF 膜に 120mA、1 時間転写した。転写後、1% スキムミルク/PBST(PBS+ 0.1% Tween20)にて室温で 1 時間ブロッキングし、300 倍希釈した抗 Annexin A4 ポリクローナル抗体(sc-1930; Santa Cruz Biotechnology)で、室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、PBST で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ヤギ抗体(Santa Cruz 社)を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を PBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、蛍光反応システム(PerkinElmer 社)により、反応したタンパク質を検出した。ローディングコントロールとして、抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を用いた。

#### 8) Annexin A4 の免疫組織化学染色

卵巣癌患者組織(パラフィンブロック)中の Annexin A4 の発現は ABC Kit (Vector Laboratories)で検出した。計 126 検体の組織切片(43 CCC, 13 endometrioid, 8 mucinous, 62 SAC) について 3µm にて切片を作成し、脱パラフィン処理を行い、脱水処理をした。抗原の賦活化は 98°C で 40 分間、target retrieval solution (DAKO) にて処理する事で行った。内在性のペルオキシダーゼ活性は 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールにて 20 分間行った。BlockAce (大日本住友製薬) で室温にて 30 分間ブロッキングした後、300 倍希釈した抗 AnnexinA4 ポリクローナル抗体で 4°Cにて一晚インキュベートした。続いて、biotinylated anti-goat IgG antibody(Vector)にて室温で 1 時間

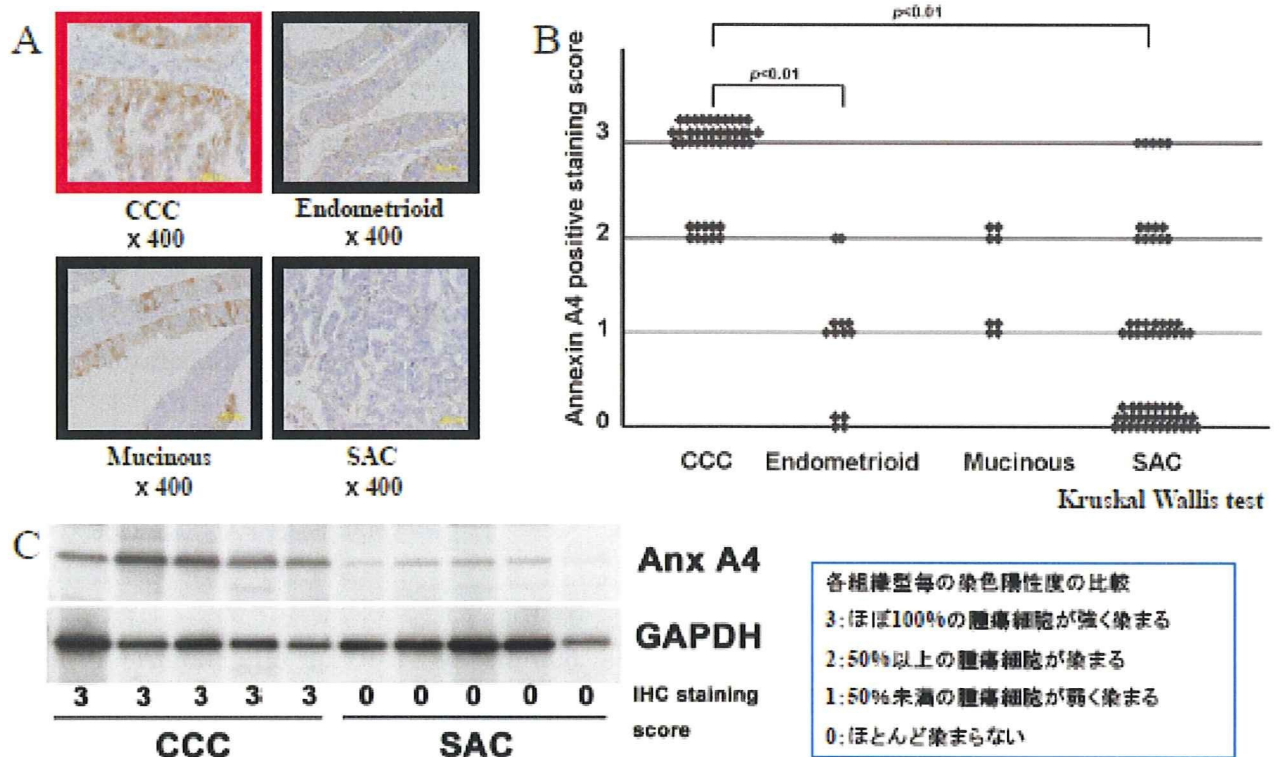


図3 免疫組織化学染色法によるAnnexin A4の発現解析

A: Annexin A4染色、B: 免疫組織化学染色の結果をスコア化したグラフ、C: ウェスタンブロット法による患者組織でのAnnexin A4の発現解析

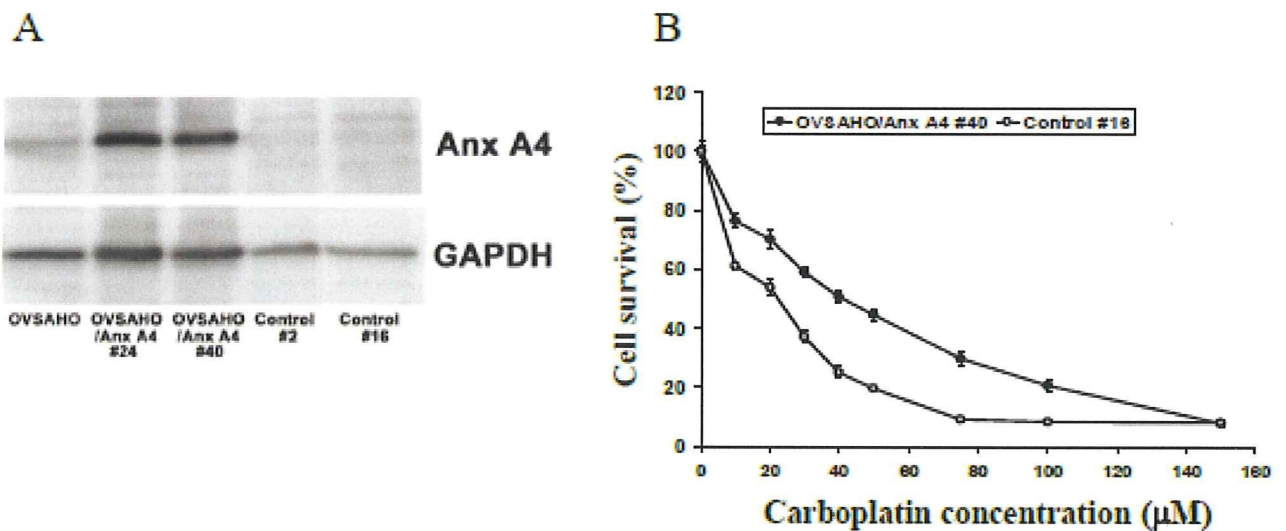


図4 Annexin A4安定発現株の樹立と、カルボプラチンに対する $\text{IC}_{50}$ 値の測定

A: ウェスタンブロット法による樹立したAnnexin A4安定発現株の確認

B: カルボプラチンに対する細胞生存率のアッセイ( $\text{IC}_{50}$ の測定)

反応させ抗原抗体複合体は avidin-biotin-peroxidase complex solution (Vector Lab) で検出し、DAB(MERCK, Darmstadt, Germany)にて発色させた。組織切片は hematoxylin でカウンター染色した。90%以上の腫瘍細胞が染色されている検体はスコア 3、50%から 90%の腫瘍細胞が染色されている場合はスコア 2、50%未満の腫瘍細胞が陽性の時はスコア 1、全く染まっていないか、染まりが弱いときはスコア 0 とした。

### 9) Annexin A4 安定発現 OVSAHO の樹立

Annexin A4 の遺伝子は、OVISE の cDNA ライブラリーに対し、Annexin A4 に特異的なプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 産物をほ乳類発現ベクターである pcDNA3.1V5/HisTOPO ベクターに TA クローニングし、DNA シーケンス解析により遺伝子配列が正しいことを確認した。pcDNA3.1-AnxA4 を lipofectamine 2000 (invitrogen)を用いて AnnexinA4 の発現が低い漿液性腺癌細胞株 OVSAHO に導入し、0.5 mg/ml G418 で selection した。

### 10) カルボプラチンに対する IC<sub>50</sub> 測定

Annexin A4 ベクターあるいは空ベクターの安定発現株は 96-well plates に 3,000 cells/well ずつまいた。翌日、カルボプラチン(Sigma)(0-150 M)にて 72 時間処理し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を加えることで発色させ、microplate reader (Bio-Rad Model 680)にて 450nm の吸光度を測定した。

### 11) 細胞内カルボプラチンの定量

細胞内に取り込まれたカルボプラチンの量は細胞内プラチナ量を定量する事で測定した。Annexin A4 ベクターあるいは空ベクターの安定発現株を 60mm plate にまき、24 時間後、1 時間、37°C で 2 mM カルボプラチンで処理し、PBS で洗浄、あるいはカルボプラチンを含まない培地にて 6 時間インキュベートした。細胞溶解物は偏光ゼーマン原子吸光光度計(model Z-8000; 日立)にて測定する事で、プラチナ量を定量した。プラチナの絶対量はプラチナ標準溶液を用いて検量線を作成することで定量した。

### 12) 統計解析

免疫組織化学染色の解析は Kruskal Wallis test を用いた。その他の統計解析は Student's *t* tests を用いた。P 値が 0.05 未満のときに有意な差があるとみなした。

#### (倫理面への配慮)

#### インフォームドコンセント

対象患者(卵巣癌)に対し、大阪大学医学部附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得る。

#### 個人情報保護

大阪大学医学部附属病院において、呼吸器・免疫アレルギー内科、立花功助教を個人情報管理者とし個人情報の管理を行った。基盤研には大阪大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供し、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

#### 試料

凍結組織(10 g)を提供していただいた。試料は、基盤研、免疫プロジェクトの鍵のかかる冷凍庫内に保管する。研究終了後、全て医療廃棄物として廃棄する。

#### C,D 研究結果及び考察

考察は C 項にまとめて記載した。

#### C,D-1. 2D-DIGE 法による卵巣明細胞腺癌と卵巣漿液性腺癌細胞間のタンパク質発現解析

2D-DIGE 法を用いて卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE)と卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO)の間におけるタンパク質発現差を解析した(図 1A)。OVISE にて高発現を示したタンパク質(8 spots)、及び、OVSAHO にて高発現を示すタンパク質(6 spots)について、それぞれ対応するスポットを銀染色を行ったゲル(図 1B)より切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化法を行い、ペプチドを抽出した。得られたペプチドサンプルを質量分析計(LC-MS/MS(LCQ))にて解析を行い、MASCOT サーチャエンジンにてデータベースサーチを試みた。その結果、卵巣明細胞腺癌において、グルタチオン S トランスフェラーゼなど解毒に関するタンパク質も発現上昇が認められたが、卵巣明細胞腺癌に高発現するタンパク質として Annexin A4 が同定された(表 1)。Annexin A4 はカルシウムイオン依存的にリン脂質二重膜に結合する細胞内タンパ

ク質であり、細胞膜の透過性やエンドサイトーシス、エクソサイトーシスに関係することが報告されており、抗癌剤の細胞内取り込みなどに関係していることが考えられた。

樹立した (図 4A)。Annexin A4 安定発現株と空ベクターのクローンについて、細胞増殖アッセイキット(Cell Counting Kit-8 (Dojindo))を用いてカルボプラチンに対する IC<sub>50</sub> 値を用いてアッセイした結果、コントロール株では 23 μM であるのに対し、Annexin A4 安定発現株では 42 μM と、Annexin A4 を強制発現させると抗癌剤に対して耐性を誘導することが明らかになった(図 4B)。

### C,D-2. Annexin A4 の発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株 (OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株 (OVSAHO, OVKATE) に対して Annexin A4 の発現をリアルタイム PCR 法及び、ウェスタンブロット法にて解析した結果、Annexin A4 は mRNA レベル、タンパク質レベル共に卵巣漿液性腺癌に (図 2A, B) 比べ、卵巣明細胞腺癌にて特異的に高発現を示した。

### C,D-3. 卵巣癌患者組織における Annexin A4 の発現解析

卵巣明細胞腺癌(CCC)、卵巣漿液性腺癌(SAC)、卵巣類内膜癌(endometrioid adenocarcinoma)、卵巣粘液性腺癌(mucinous cystadenocarcinoma)患者組織 126 検体(表 2)について免疫組織化学染色にて Annexin A4 の発現を解析した結果(図 3A,B)。

免疫組織化学染色の結果、Annexin A4 の発現が卵巣漿液性腺癌に比べ卵巣明細胞腺癌にて高発現していた。この結果を確認するため、凍結手術組織よりタンパク質を抽出し、Annexin A4 の発現をウェスタンブロット法にて解析した結果、Annexin A4 の発現は確かに卵巣漿液性腺癌に比べ、卵巣明細胞腺癌で特異的に高発現を示していた(図 3C)。

### C,D-4. Annexin A4 安定発現株の作成とカルボプラチンの IC<sub>50</sub> 測定

卵巣明細胞腺癌にて高発現している Annexin A4 が抗癌剤耐性と関係することを明らかにするため、抗癌剤感受性である卵巣漿液性腺癌に

Annexin A4 遺伝子発現ベクター、及びコントロールとして空ベクターを導入し、安定発現株を樹立した(図 4A)。Annexin A4 安定発現株と空ベクターのクローンについて、細胞増殖アッセイキット(Cell Counting Kit-8 (Dojindo))を用いてカルボプラチンに対する IC<sub>50</sub> 値を用いてアッセイした結果、コントロール株では 23 μM であるのに対し、Annexin A4 安定発現株では 42 μM と、Annexin A4 を強制発現させると抗癌剤に対して耐性を誘導することが明らかになった(図 4B)。

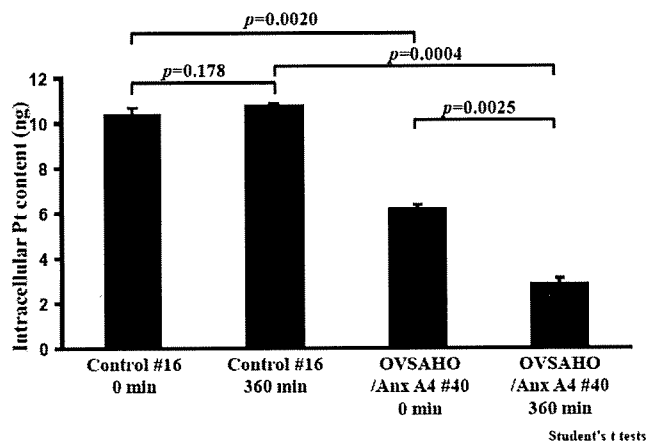


図5 プラチナ定量によるカルボプラチンの細胞内取り込みと細胞外排出アッセイ

### C,D-5. Annexin A4 安定発現株における抗癌剤の細胞内取り込み、細胞外排出に関する実験

Annexin A4 安定発現株が誘導するカルボプラチン耐性機序を明らかにするため、Annexin A4 が細胞膜の透過性を制御する分子であることから、カルボプラチンの細胞内取り込み、及び細胞外への排出に関する実験を行った。細胞内カルボプラチン量はプラチナを測定することで定量した。Annexin A4 安定発現株、及び、コントロール細胞について 2 mM のカルボプラチンで 1 時間処理した後、細胞内プラチナ量を定量した結果、細胞内に蓄積したプラチナ量はコントロール細胞株と比べ Annexin A4 安定発現株にて有意に低下を示した(図 5)。このことから Annexin A4 の強制発現は細胞内への抗癌剤取り込みを抑制することが示唆された。さらに、Annexin A4 安定発現株、及び、コントロール細胞について 2 mM のカルボプラチンで 1 時間処理した後、抗癌剤を含まない培地で 6 時間培養した後、細胞内に残存したカルボプラチン量を測定した結果、コントロール細胞群では 6 時間の培養で細胞内の抗癌剤の排

出に有意な差は見られなかったが、Annexin A4 安定発現株では抗癌剤を含まない培地で6時間培養することで細胞内に残存したカルボプラチン量が有意に低下した(図 5B)。このことから、Annexin A4 は細胞内に取り込まれたカルボプラチンの細胞外排出にも関与する事が示唆された。

## E. 結論

本研究の結果、卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性分子として Annexin A4 を同定した。Annexin A4 の強制発現は漿液性腺癌細胞株 OVSAHO に対してカルボプラチンの耐性を誘導したが、その機序として Annexin A4 がカルボプラチンの細胞内取り込みを抑制し、細胞外への排出を促進することが明らかになった。以上の結果から、Annexin A4 は抗癌剤耐性を克服するための標的分子となり得ると考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Kim A., Enomoto T., Serada A., Ueda Y., Takahashi T., Ripley B., Miyatake T., Fujita M., Lee CM., Morimoto K., Fujimoto M., Kimura T., Naka T. Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. *Int J Cancer* 125:2316-22, 2009.
2. Serada S., Fujimoto M., Ogata A., Terabe F., Hirano T., Iijima H., Shinzaki S., Nishikawa T., Ohkawara T., Iwahori K., Ohguro N., Kishimoto T., Naka T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*, In Press, 2009.

### G-2. 学会発表

1. Serada S., Fujimoto M., Terabe F., Nishikawa T., Kishimoto T., Naka T. : Proteomics-based identification of leucine

rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel biomarker associated with disease activity of inflammatory auto-immune disorders. 第39回日本免疫学会総会, 大阪, 2009年12月.

2. Kim A., Serada S., Takahashi T., Ripley B., Souma Y., Fujimoto M., Naka T. : Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. ECCO 15 · 34th ESMO Multidisciplinary Congress, Internationale Congress Centrum Berlin (ICC Berlin), Berlin, Germany from Sunday 20 to Thursday 24 September 2009.

## H. 知的財産権の出願・登録情報

### H-1. 特許

1. 発明の名称：血管新生誘導分子  
出願番号：特願 2009-275254  
出願日：2009年12月3日  
出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
発明者：仲 哲治, 世良田聡
2. 発明の名称：自己免疫疾患検査用バイオマーカー及び検査方法  
出願番号：特願 2009-138408  
出願日：2009年6月9日  
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所, 国立大学法人大阪大学  
発明者：仲哲治, 世良田聡, 岸本忠三

### H-2. 実用新案登録

なし.

### H-3. その他

#### 1. 報道発表

- ・日本経済新聞 夕刊 2009年10月28日  
「炎症判断の物質特定」
- ・日本経済新聞 2009年7月15日  
「抗癌剤の「敵」発見」

## I. 研究協力者

世良田 聡、藤本 穰、金 雅子、岩堀幸太、高橋剛、寺部文隆、西川哲平、相馬大人、宮寄安晃、松崎慎哉、寿 順久、大河原知治、嶋田和貴、緒方 篤、平野 亨、大黒伸行、飯島英樹、新崎信一郎、榎 隆之、上田 豊、宮武 崇

Spot no.	Access. no.	Identified protein	M <sub>w</sub> (Da)	pI	Coverage (%)
<i>Proteins upregulated in OVISe cells compared with OVSAHO cells</i>					
1	P09211	Glutathione S-transferase P	23,438	5.44	38
2	P09525	Annexin A4 (Annexin IV)	35,957	5.85	49
3	P04792	Heat-shock protein beta-1	22,826	5.98	39
4	Q13011	Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	36,136	8.16	28
5	P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	29,032	6.77	15
6	O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46,915	6.53	39
7	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50,451	9.1	14
8	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	50,451	9.1	19
<i>Proteins upregulated in OVSAHO cells compared with OVISe cells</i>					
1	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor	31,742	4.74	14
2	O75947	ATP synthase D chain, mitochondrial	18,405	5.22	41
3	P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	31,823	8.34	27
4	P42126	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	33,080	8.8	10
5	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	38,639	6.32	25
6	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	38,639	6.32	25

表1 質量分析により同定された卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISe)及び卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO)にて高発現を示すタンパク質

histology	mean age (range)	FIGO stage				total
		I	II	III	IV	
CCC	53 (36-66)	27	5	9	2	43
Endometrioid	53 (28-66)	2	7	4	0	13
Mucinous	53 (28-90)	6	1	1	0	8
SAC	55 (33-81)	9	13	35	5	62

表2 免疫組織化学染色に用いた卵巣癌患者組織の臨床背景

126



ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用

研究分担者 中山敬一 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

研究要旨

有用なバイオマーカーの探索は、検体試料からいかに多くのタンパク質を同定・定量できる技術を開発するかという点にかかっているとんでも過言ではない。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いて網羅的・高感度にタンパク質を定量するストリームラインの開発を目指して基礎研究を行った。その結果、種々の新規技術を組み合わせて、非常に微量のタンパク質を絶対定量することに成功した。この技術は将来的に大深度プロテオミクス（ディープ・プロテオミクス）による網羅的バイオマーカー探索の道を拓くものである。

A. 研究目的

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結び付くタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用や翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。ところがこの中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他に比べて極端に発展途上であり、これを可能にする画期的な技術の開発が渴望されている。

LC-MS/MS 解析によるショットガン定量プロテオミクスは基本的にデータ依存的な自動 MS/MS 解析によっているため、何か意味のあるものが偶然“見つかる”ことを期待しつつ兎に角たくさんのタンパク質を同定し比較する方法である。確かにこの方法である程度の網羅性を得ることが可能であるが、ショットガン法の技術的な問題点は、網羅性を上げるためには試料の分画を必要とするため、網羅性とスループットが完全にトレードオフの関係にあることである。また、偶

然に任せている以上、検出されなかったものが、本当は発現しているのにたまたま同定できなかったのか、検出感度以下しか発現していないのかわからないという問題点を内包する。つまりショットガン解析では定量情報はあくまで同定結果に付随して得られるものであり、同定できなければ変動していたのかを知ることはできない。

そこでわれわれは、従来のディスカバリーアプローチから、ターゲットアプローチとして最近注目を集めている MRM (Multiple reaction monitoring)[あるいは SRM (Selected reaction monitoring)とも呼ばれる]への転換を考えた。MRM は三連四重極型質量分析計の定量用測定モードであり、少数の検体のバリデーションには適するが、多くのタンパク質を網羅的に同定・定量することは本質的に難しいとされてきた。われわれの研究はこの障壁を乗り越えて、抜本的に MRM を改良し、将来的に大深度プロテオミクス（ディープ・プロテオミクス）を達成することによって、新たなバイオマーカー探索の時代を築くことを目的とする。

B. 研究方法

MRM 法は Q1 にてプリカーサーイオンの選択、Q2 にて CID による開裂、Q3 にてプロダクトイオンを選択・検出する(このとき設定した Q1/Q3 の組み合わせを transition と呼ぶ)。したがって、

MRM 法では測定したいペプチドの質量とその部分質量を前もって知っておく必要がある。これにはショットガン解析において得られる MS/MS スペクトルが利用される。つまり、代表的な試料でショットガン解析を行うことで候補ペプチドを同定し、このペプチドに対する transition を設定することで様々な試料中のペプチドの定量を行うことになる。MRM 法は感度が高いことと、三連四重極型の質量分析計を用いるためダイナミックレンジが広いことが最大の利点であるが、近年では高感度化に伴い一つの transition の取得時間が短縮されたことで一度の LC で解析できる transition 数が数千まで増えているおり、大規模な解析にも利用可能な新技術として注目されている。

そこで平成 21 年度は、MRM 法の諸条件を徹底的に検討し、微量タンパク質を 100 種類まとめて計測することを目標とした。具体的な検討項目とその方法は下記の通りである。

1. ノイズの除去方法に対する検討： 複雑な試料では Q1/Q3 のフィルターを通過するものが多数存在し、これらは本来のペプチド以外のノイズとして認識される。これを除外する方法論を見出せない限り、MRM はディスクバリーベースのプロテオミクスとしては機能しない。そこでわれわれは安定同位体標識を施した内部標準をスパイクすることで、このノイズの識別と除去を行うことを検討した。
2. イオンサプレッションの抑制方法に対する検討： 試料の複雑性をなるべく簡便な方法で低下させるため、種々の分離方法を検討した。最終的に液相等電点電気泳動 (OFFGEL システム) を導入することにより、この問題を回避した。
3. 装置汚染の回避： MRM 法は一般に非常に複雑な試料をハイスループットに解析することを目的としているため、装置の汚染が生じやすい。また、複数試料の連続測定ではキャリーオーバーの問題が深刻である。この点を回避するため、種々の検討を行った。

### C. 研究結果

1. ノイズの除去方法に対する検討： 実際に複雑な試料 (例えば未分画の細胞抽出液等) を MRM

で解析すると、単一の Q1/Q3 のフィルターを通過するものが多数存在した。MRM 法では通常一つの Q1 に対して複数の Q3 を設定し、そのクロマトグラムのパターンが一致することを根拠に目的のペプチドとして認定するが、われわれの検討では、そうならないことがほとんどであった。例えば一つの Q1 に 5 つの Q3 を設定してクロマトグラム上にこの 5 種類の transition によるピークがただ一か所だけ存在するかどうかを検討したところ、実際は 5 つがすべて重なるピークが検出できることはまれであり、5 種類のうち 3-4 種類が重なったピークが複数検出された。これは本来のペプチドの複雑さに加えて、多価イオンによる見かけ上の成分数の増加、酵素消化における切れ残りや翻訳後修飾による多様化などゲノム配列からの予想以上の複雑さが存在することを示している。さらに、四重極型の装置を使っている限りそのフィルターはある程度の幅を持っていることになり、質量が設定値から外れていても、強度が著しく大きい場合はピークの裾がフィルターの幅の中に入ってくる。MRM では厳密にはマススペクトルを取得しているわけではなく、ある程度の幅を持ったフィルターを通過してきたイオンをまとめて検出することになるので、そこに微妙に異なる (四重極フィルターの分解能で区別できない) 複数のイオンが入ってきても一つのシグナルとして計上してしまう。この問題の解決法として最も簡単なことは、リテンションタイムを事前に取得しておき、Q1/Q3 の情報に加えてリテンションタイムもピーク識別の情報として利用することである。しかしながら、リテンションタイムが近接した領域に二つのピークが出現することや、複雑な試料の中では MS/MS スペクトルの質が悪くなり同定不可能であることが多いなどの問題があり、現実的には安定同位体標識を施した内部標準をスパイクすることが現時点でできる最も有効な対策である。われわれはこの認識に基づき、安定同位体標識を施した内部標準 (リテンションタイムマーカーと称する) を作成し、このマーカーのリテンションタイムから個々の試料中のピークの移動度を相対的に割り出し、補正を加えることによって、全てのペプチドに対して事前情報を与えることに成功した (特許出願

中)。

2. イオンサプレッションの抑制方法に対する検討: MRM 法では目的ペプチドを選択的に検出するため、試料の分画をすることなくダイレクトに LC に打ち込んで定量できることが利点であり、このためスループットが高いと考えられている。しかしながら、分画しない試料は数十万成分を含む超複雑系のマトリックスであり、実際に MRM 法で評品試料を測定した場合は数十 amol のペプチドでも容易に検出できる感度を持っている場合でも、これが実試料中に含まれると 1 桁以上感度低下が起きた。一桁の感度低下と考えると、10 amol で検出されていたペプチドはその 10 倍量装置に導入しないと検出されなくなるはずであるが、ところが導入量を 10 倍上げても検出できることは少なく、場合によってはさらなるイオン化抑制が起き、少ない導入量で検出できていたペプチドすら検出できなくなる場合もあった。このように、MRM 法では目的ペプチドの導入量が検出感度の下限を超えており、かつイオン化抑制が極力少なくなるような導入量を見出さないと実試料中での微量成分の検出は不可能である。そこでわれわれは種々の分画法を検討した結果、液相等電点電気泳動 (OFFGEL システム) が最も効率的にペプチドの分離に向いていることを発見した。さらに OFFGEL システムにおける投与サンプル量、分離時間、電圧勾配、分画数等を検討し、最適な条件を設定した。これによって劇的にサンプルの複雑性を減らすことができ、その結果、ノイズの低減と感度上昇という大きな収穫を同時に得ることができた。

3. 装置汚染の回避: われわれがテストした限りでは、フル感度の条件で評品ペプチド 10 fmol を測定すると、その後 20 回以上ブランクの測定をしても完全に評品ペプチドのシグナルが消失することはなかった。さらに厄介なことに、20 回洗浄後、数時間放置し、さらに再度ブランクを測定すると、再度強いシグナルが検出されたこともあり、バルブや配管・カラムへの残留が予想以上に大きいことが判っている。実際は複雑な試料を測定する場合はこのような残留程度のペプチドが残っていたとしても、上述したイオン抑制によって実質検出されることはないが、実試料のサン

ル間にブランクを 20 回以上挟むことも非現実的であるので、常にある程度のキャリーオーバーの影響を考慮しながら分析を行う必要があることが判明した。

4. 実際の試料中に存在する微量タンパク質の絶対定量: われわれは存在量が非常に少ないと思われているヒト p27、Rab7、EGR レセプターに対して、大腸菌内でリコンビナントタンパク質を作製し、次にこれを液相等電点電気泳動 (OFFGEL システム) で分画した後、リテンションタイムマーカと共に逆相クロマトグラフィーにかけて、各タンパク質に対する PTP (Proteotypic Peptide) を LC-MS/MS によって決定した。この事前情報に基づき、試料とリコンビナントタンパク質を mTRAQ ラベルして MRM の transition を組み、MRM で得られたクロマトグラムを基に各タンパク質の絶対定量を行った。

#### D. 考察

MRM 法は上述したように多数の問題点を抱えている。しかしながら、現時点で MRM 以外に複雑な試料中のタンパク質を直接的に検出できる方法は存在しない (もちろんウェスタンブロットなど抗体を用いた方法は別であるが)。MRM 法は本来低分子の定量解析のための手段として用いられてきたものであり、ペプチド解析へのアプリケーションは始まったばかりである。さらに、装置に関してもプロテオームの解析に MRM を利用することを想定して開発されておらず、現行の装置でのペプチド MRM の実行はかなり挑戦的な取り組みである。今後、複雑な試料へ対応を想定した装置の開発やアプリケーションの開発によって MRM 法が実用レベル (現時点でもある意味実用レベルではあるが、プロテオーム解析での真の実用化を意味する) に到達した際には、基礎生命科学はもとより臨床医学における診断や予後判定等に利用され、タンパク質に関する研究法にパラダイムシフトが起きることは必至であろう。われわれは、プロテオーム解析における MRM 法を実用化するために、前処理法の開発やイオン源の改良などを日々行っており、必ず近い将来 MRM 法をベースとしたディープ・プロテオーム解析が可能になると信じている。

## E. 結論

ターゲットプロテオミクスの一方法であるMRM法を用いて種々の条件検討を行い、その問題点である特異性やイオンサプレッション等の問題に対する解決策を模索した。その結果、いくつかの有効な対策が発見され、最終的に高度に複雑な試料から非常に微量のタンパク質を検出・定量することに成功した。この成果を応用して、次年度以降は多数の検体から同時に多くの定量情報を得るための実用的な検討に入る予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Matsumoto M., Oyamada K., Takahashi H., Sato T., Hatakeyama S., Nakayama K.I. Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways. *Proteomics* 9: 3549-63, 2009.
2. Lin H.K., Wang G., Chen Z., Teruya-Feldstein J., Liu Y., Chan C.H., Yang W.L., Erdjument-Bromage H., Nakayama K.I., Nimer S., Tempst P., Pandolfi P.P. Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biol* 11: 420-32, 2009.
3. Mitra P., Ghule P.N., van der Deen M., Medina R., Xie R.L., Holmes W.F., Ye X., Nakayama K.I., Harper J.W., Stein J.L., Stein G.S., van Wijnen A.J. CDK inhibitors selectively diminish cell cycle controlled activation of the histone H4 gene promoter by p220<sup>NPAT</sup> and HiNF-P. *J. Cell Physiol* 219: 438-48, 2009.
4. Yokobori T., Mimori K., Iwatsuki M., Ishii H., Onoyama I., Fukagawa T., Kuwano H., Nakayama K.I., Mori M. p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res* 69: 3788-94, 2009.
5. Saiga T., Fukuda T., Matsumoto M., Tada H., Okano H.J., Okano H., Nakayama K.I. Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development. *Mol Cell Biol* 29: 3529-43, 2009.
6. Jiang X., Austin P.F., Niederhoff R.A., Manson S.R., Riehm J.J., Cook B.L., Pengue G., Chitaley K., Nakayama K., Nakayama K.I., Weintraub S.J. Mechanoregulation of proliferation. *Mol Cell Biol* 29: 5104-14, 2009.
7. Ranchal I., Gonzalez R., Bello R.I., Ferrin G., Hidalgo A.B., Linares C.I. Aguilar-Melero, P., Gonzalez-Rubio, S., Barrera, P., Marchal, T., Nakayama, K.I., de la Mata, M., Muntane, J.: The reduction of cell death and proliferation by p27<sup>Kip1</sup> minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity. *Int J Cancer* 125: 2270-80, 2009.
8. Wu Y.J., Sala-Newby G.B., Shu K.T., Yeh H.I., Nakayama K.I., Nakayama K., Newby A.C., Bond M. S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2) promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in vivo. *J Vasc Surg* 50: 1135-42, 2009.
9. Zhang J., Hung A.C., Ng P.Y., Nakayama K., Hu Y., Li B., Porter A.G., Dhakshinamoorthy S. PKC $\delta$  mediates Nrf2-dependent protection of neuronal cells from NO-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 750-6, 2009.
10. Oyamada A., Ikebe H., Itsumi M., Saiwai H., Okada S., Shimoda K., Iwakura Y., Nakayama K.I., Iwamoto Y., Yoshikai Y., Yamada H.: Tyrosine kinase 2 plays critical roles in the pathogenic CD4 T cell responses for the development of