

メカニズムと治療戦略

## 転写因子を標的とした肝転移の治療戦略

大阪大学大学院医学系研究科・消化器外科

山本 浩文 竹政伊知朗 池田 正孝  
関本 貢嗣 門田 守人

TCF) 経路は大腸癌, 食道癌, 肝臓癌, 胃癌などのヒトの消化器癌でしばしば研究報告によると, TCF 経路の活性化は cyclin D1, PPAR $\delta$ , survivin などすることがわかってきた。われわれはこれまでに, これら標的遺伝子の消化器癌に特異的に発現することを見いだした。また, cyclin D1 は癌細胞の核をもつ細胞に限って発現することを見いだした。また, cyclin D1 は癌細胞の間質にも存在する血管内皮細胞の増殖にも中心的な役割を果たすことが示された。さらに, antisense cyclin D1 処理によってヌードマウスの皮下に埋め込んだ matrigel を用いた食道癌細胞の増殖を抑制し, 微小出血を来した。さらに, survivin に対する siRNA 処理により食道癌細胞は mitotic catastrophe に陥り, このことから survivin は癌細胞の生存に必須であることが示された。われわれはアデノウイルスシステムを用いて DN-TCF を細胞内に過剰発現する系を構築した。DN-TCF は内因性の TCF の DNA との結合を競合阻害する。DN-TCF は高転移株である KM12sm 大腸癌細胞の肝転移を抑制した。最後にわれわれは, DN-TCF と同程度に TCF 活性を抑制する二本鎖 DNA である TCF 抑制剤を開発した。これらの成果はヒトの肝転移に対する治療戦略の糸口となるかもしれない。

[Biotherapy 22 (2) : 96-104, March, 2008]

## A Therapeutic Strategy Against Liver Metastasis by Inhibiting Transcription Factor TCF

Hirofumi Yamamoto, Ichiro Takemasa, Masataka Ikeda, Mitsugu Sekimoto and Morito Monden

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

## Summary

Oncogenic  $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF) pathway is often activated in various types of human gastrointestinal (GI) cancer, including colorectal cancer, esophageal cancer, hepatocellular carcinoma, and gastric cancer. Recent studies have shown that activation of TCF pathway causes transcriptional induction of the downstream target genes including cyclin D1, PPAR $\delta$ , and survivin. We examined crucial roles of the target genes in GI cancers. In some instances, PPAR $\delta$  was exclusively expressed in colon cancer cells that exhibited highly malignant morphological features such as round and large nucleus. We also found that cyclin D1 was important not only to control the cell cycle and growth of cancer cells but that it also played a central role in the growth of vascular endothelial cells of the cancer stroma. Interestingly, treatment of antisense cyclin D1 caused breakdown of vascular walls and microhemorrhage in matrigel plug assay in nude mouse. Moreover, siRNA against survivin induced slow cell death and mitotic catastrophe in esophageal cancer cells, suggesting that survivin is essential to maintain cancer cell

survival. To simultaneously block induction of the cancer-related genes, we have constructed adenovirus dominant negative TCF (DN-TCF) that competitively blocks binding of endogenous TCF to the target promoter site. DN-TCF suppressed liver metastasis of highly metastatic colon cancer cells KM12sm in nude mice. Finally, we developed a TCF decoy that displayed a similar inhibitory effect of TCF activity to that of DN-TCF. Such strategy may be useful to inhibit human GI cancers.

**Key words** : Liver metastasis, TCF,  $\beta$ -catenin, Cyclin D1, TCF decoy

**Address request for reprints to** : Dr. Hirofumi Yamamoto, Department of Surgery, Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

### はじめに

消化器癌の転移のなかでも肝転移は最も多い転移の一つであり、しばしば致命的となる。分子生物学的なアプローチのなかで、われわれは  $\beta$ -catenin を中心とする癌の悪性化のメカニズムに注目し、転写因子 T-cell factor (TCF) を標的とする治療戦略を研究してきた。Heらは、癌遺伝子 c-MYC が細胞内  $\beta$ -catenin の過剰蓄積によって転写レベルで誘導されることを報告し<sup>1)</sup>、その後 cyclin D1, matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), survivin, peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (PPAR  $\delta$ ), multidrug resistance gene-1 (MDR-1) など多数の癌関連遺伝子が  $\beta$ -catenin の異常蓄積に伴って誘導されることが次々と明らかとなった。これらの遺伝子群

は、造腫瘍性の獲得、細胞増殖、癌浸潤、細胞死抵抗性や化学療法の抵抗性などにかかわり、癌の悪性性質の獲得に寄与すると考えられている。そこで、 $\beta$ -catenin 由来の転写シグナルを阻害することで下流の癌関連遺伝子の誘導を一挙に断ち切る戦略を考案した。

#### I. $\beta$ -catenin による転写活性化メカニズム

$\beta$ -catenin は元来  $\alpha$ -catenin や E-cadherin などと同じく細胞間の接着因子として働き、正常細胞では細胞膜に存在する。しかし、ヒトの癌では  $\beta$ -catenin の細胞質での蓄積や核への移行現象がみられ、正常細胞とは異なる働きをすることが示唆されていた。 $\beta$ -catenin は、通常状態では glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) によってリン酸化を受けるとユビキチン-proteasome

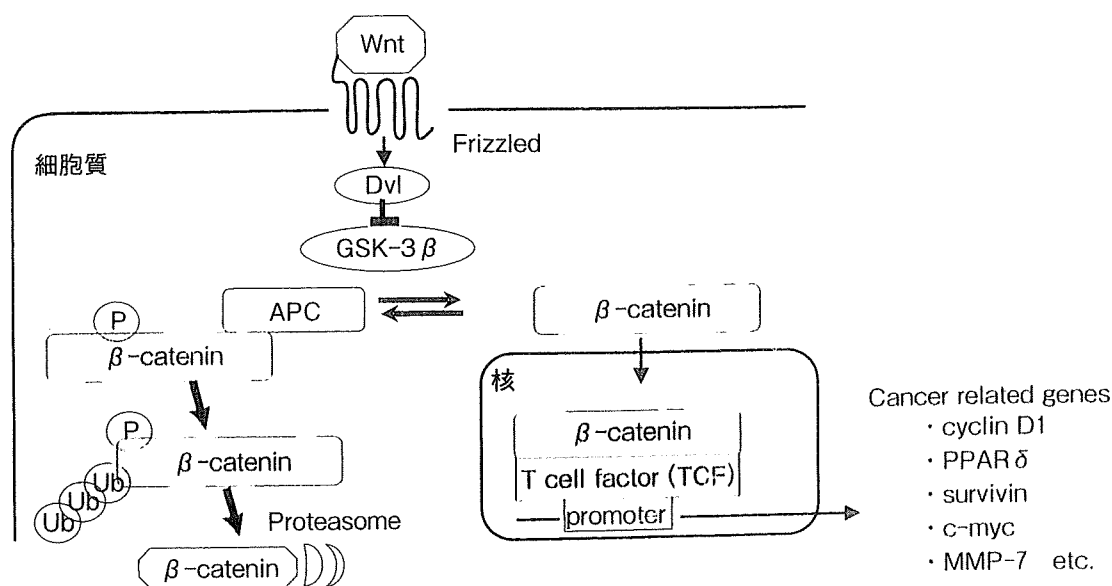


図1  $\beta$ -catenin/TCF 複合体による癌関連遺伝子の誘導  
 $\beta$ -catenin/TCF 複合体は転写レベルで様々な関連遺伝子群の発現を誘導する

表1 消化器癌組織における APC,  $\beta$ -catenin 遺伝子変異と  $\beta$ -catenin 蛋白の蓄積 (過剰発現) の頻度

	APC 変異 (%)	$\beta$ -catenin 変異 (%)	$\beta$ -catenin 蓄積 (%)
大腸癌	80	48	100
胃癌	3.8	16.3	60
肝癌	0	20	43
食道癌	0	0	50

表2 消化器癌における cyclin D1 の発現

	過剰発現 (遺伝子増幅)	臨床的相関事項
胃癌	22~47%	リンパ節転移
食道癌	25~33% (23%)	予後不良 リンパ節転移
大腸癌	16~50%, 86%	リンパ節転移 予後不良
肝癌	6~40% (11~13%)	肝内転移, 門脈浸潤 予後不良
膵癌	50~68% (25%)	予後不良

経路を介して速やかに分解されるが, adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子の変異や  $\beta$ -catenin 遺伝子に変異があると分解が阻害され細胞質内に蓄積する。そのうち一部は核に移行して転写因子 TCF に結合し, 様々な遺伝子のプロモーターの活性化を引き起こす (図1)。大腸癌では, APC 遺伝子や  $\beta$ -catenin 遺伝子の変異はそれぞれ 80%, 48% と報告されており  $\beta$ -catenin の細胞質内蓄積による TCF の活性化は高頻度に行っているが, 興味深いことに APC 遺伝子などの遺伝子異常の少ない食道癌や胃癌, 肝細胞癌などでも高頻度の  $\beta$ -catenin 過剰発現が起きていることが報告されている (表1)。これには Axin や ICAT など他分子の関与も示唆される。このように, 各種の消化器癌で TCF の活性化は高頻度に行っているため, TCF を標的とした治療対象疾患は広いと考えられる。

## II. TCF/ $\beta$ -catenin 経路の下流遺伝子の役割

われわれは TCF/ $\beta$ -catenin が誘導する下流遺伝子のなかで, PPAR $\delta$ , cyclin D1, survivin の

役割について大腸癌に関して検討してきた。

### 1. PPAR $\delta$

PPAR $\delta$  遺伝子を knock-out すると, APC<sup>min</sup> マウスの小腸ポリープが増加するという報告と逆に減少させるという報告とがあり, PPAR $\delta$  の癌発生への関与や治療標的としての価値については hot な議論が展開されている。われわれは, ヒトの大腸癌組織を用いてどのような細胞が PPAR $\delta$  を発現しているかを詳細に検討した結果, 細胞形態と興味深い関連性のあることを見いだした。すなわち PPAR $\delta$  陽性細胞では共通して核が球形で巨大であること, また核小体が明瞭であり, 細胞配列の極性が失われていることを仮に PPAR rule と名付けると, ほとんどの大腸癌組織にこのルールが当てはまることを見いだした<sup>2)</sup>。大腸癌の核の巨大化や球状化は予後不良のサインとされており<sup>3,4)</sup>, 大腸癌組織では PPAR $\delta$  陽性所見は悪性度の高い腫瘍細胞形態との関連性が認められる。

### 2. Cyclin D1

cyclin D1 は細胞周期の G1 アクセルとして働

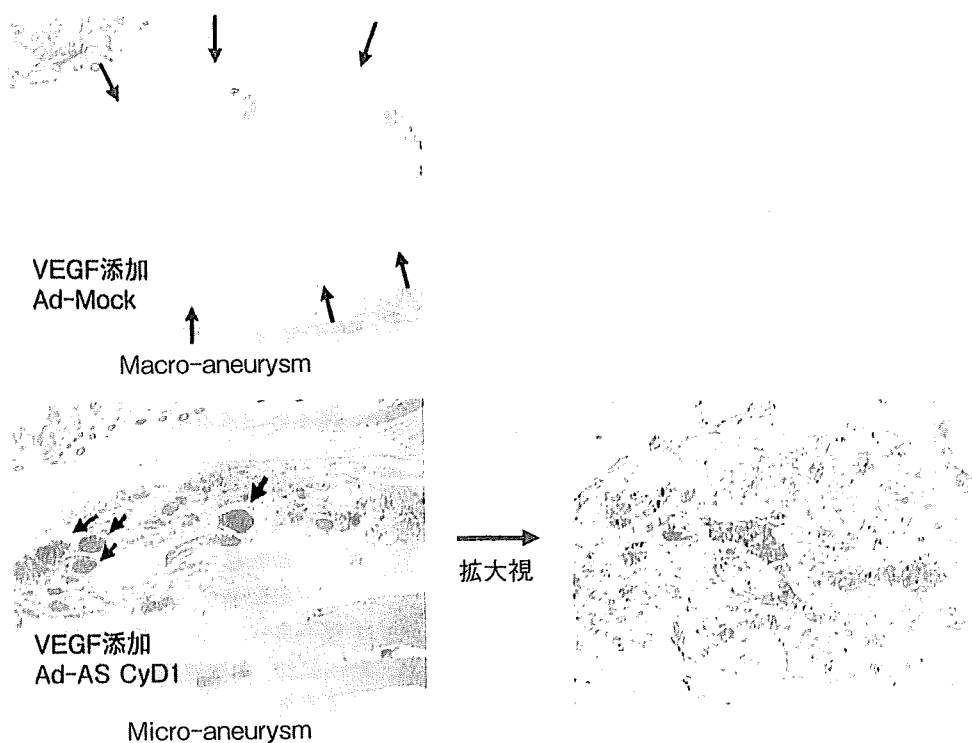


図2 Antisense cyclin D1による *in vivo* matrigel plug assay  
 VEGF 添加下に matrigel をヌードマウスの皮下組織に移植した。Mock control では、macro-aneurysm が形成された (矢印の内側が血管瘤)。一方、antisense cyclin D1 ウイルス液を投与すると micro-aneurysm (矢印) が形成され、微小出血がみられた。

き、線維芽細胞への遺伝子導入により腫瘍能を獲得させる oncogene であることが知られている。大腸癌をはじめとする多くのヒトの癌で発現亢進や遺伝子増幅がみられ、予後因子としての報告も多い (表2)。近年、腫瘍血管を標的とした癌の治療が成果を上げているが、cyclin D1 は腫瘍細胞の増殖のみならず血管内皮細胞の増殖にも中心的な役割を果たす。VEGF 添加による血管内皮細胞の増殖活性の増加は、アンチセンス cyclin D1 単独で打ち消すことができる。ヌードマウスの皮下に VEGF を浸透させた matrigel を注入すると、血管内皮細胞で裏打ちされた大きな血管様の瘤 (macroaneurysm) ができる。これに adenovirus 液として精製したアンチセンス cyclin D1 を注入すると瘤のサイズは縮小し、内皮細胞の破綻から多数の微小出血がみられた (図2)。実際に、大腸癌細胞による皮下腫瘍にアンチセンス cyclin D1 を3回注入すると、腫瘍増殖の抑制とともに血管数の減少が観察された (図3a,

b)<sup>5)</sup>。また、大腸癌細胞 DLD1 では cyclin D1 阻害による VEGF の産生抑制がみられ (図3c)、アンチセンス cyclin D1 の腫瘍血管抑制のメカニズムとして、血管内皮への直接的作用と腫瘍からの VEGF 阻害という間接的作用という両者の関与が考えられる (図4)。

### 3. Survivin

survivin は inhibitor of apoptosis protein (IAP) family に属し、アポトーシスに抵抗性に働く。また、多くのヒトの癌で過剰発現しており、抗癌剤抵抗性をもたらす予後不良と関連するとの報告も多い。また、survivin は (アポトーシス、ネクローシス、autophagy などの細胞死と並ぶ) 第四の細胞死である mitotic catastrophe の抑制にも働いており、癌治療の有望な標的と考えられている。mitotic catastrophe は M 期進行の破綻によって引き起こされ、細胞が巨大化し多核状態となり、やがて緩徐に細胞死に至る。われわれは、胃癌、大腸癌、食道癌などで白金系抗癌剤 oxaliplatin

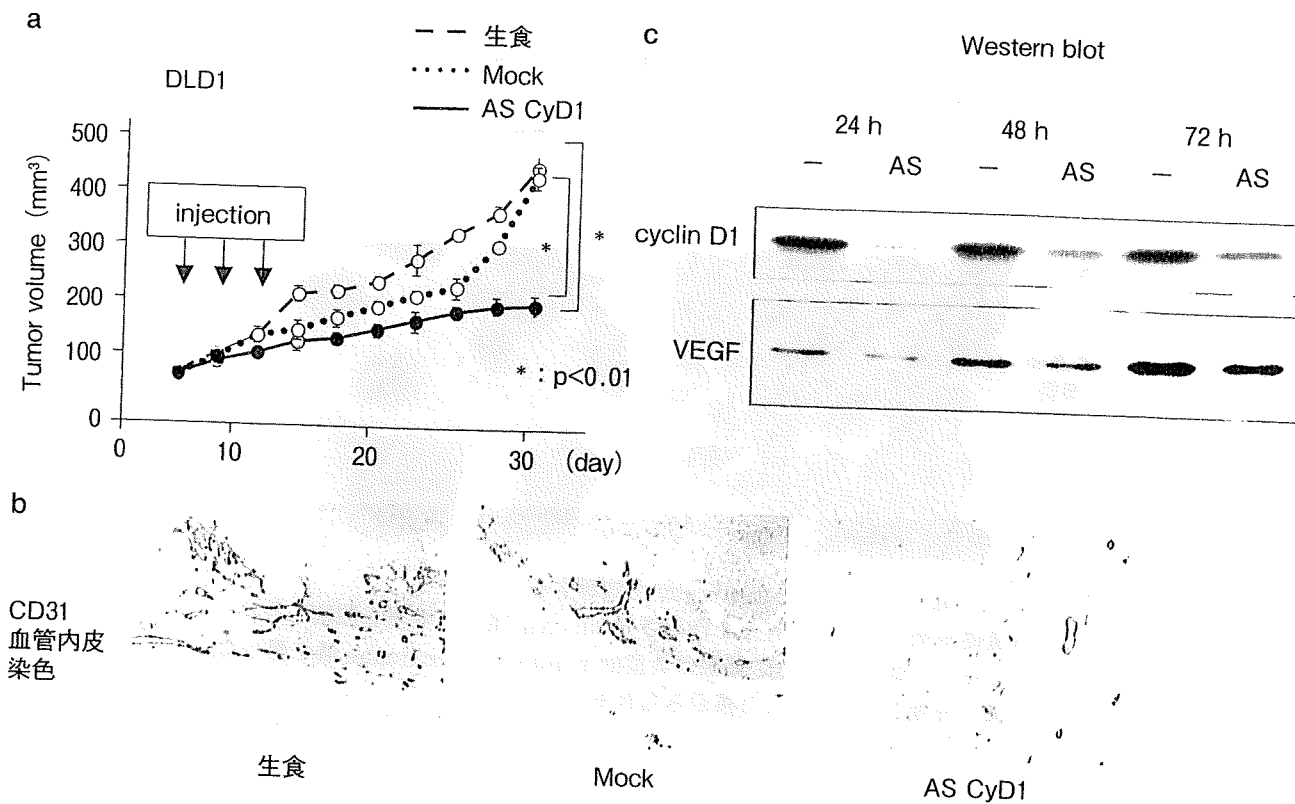


図3 Adenoviral-antisense cyclin D1 は腫瘍血管新生を抑制する

- a . 大腸癌細胞 DLD1 をヌードマウスの皮下に移植し, antisense (AS) cyclin D1 ウイルス液を 3 回腫瘍に局注した。生食, Mock control 群と比べて有意に腫瘍の成長が抑制された。
- b : 30 日目に腫瘍を切除し CD31 血管内皮染色を行った。AS cyclin D1 群では血管密度の低下がみられた。
- c : DLD1 細胞に *in vitro* で cyclin D1 に対する small interfering (si) RNA を作用させると, cyclin D1 のみならず VEGF 蛋白の発現低下がみられた。

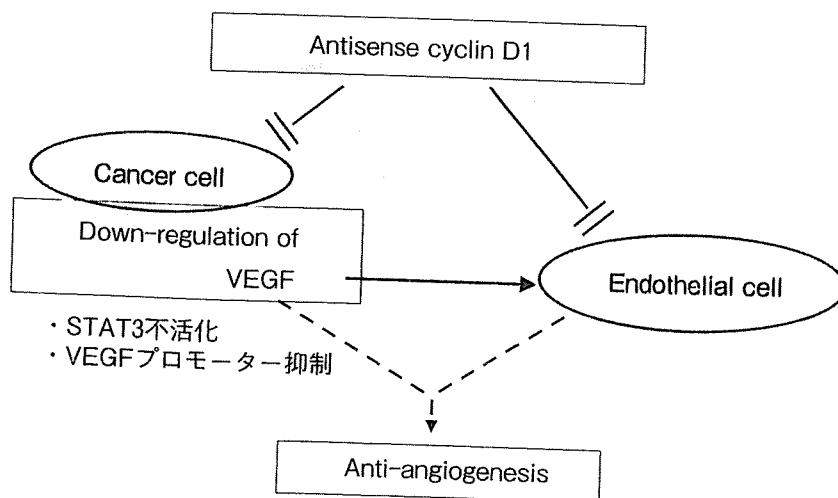


図4 Antisense cyclin D1 の腫瘍血管新生に与える働き

血管内皮細胞への直接作用と, 腫瘍 VEGF 産生阻害を通じて血管新生を阻害する作用の両方が腫瘍血管抑制につながる。VEGF の抑制には STAT3 転写因子の不活化や VEGF プロモーターの抑制が関係していた。

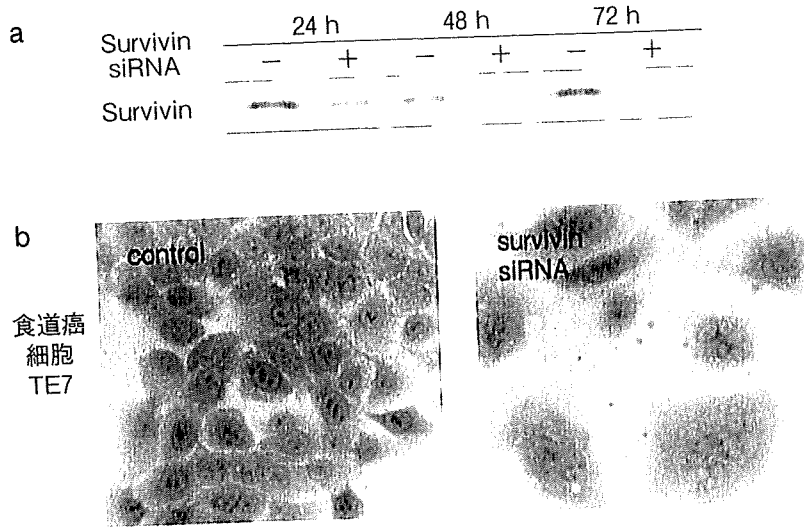


図5 Survivin の低下は mitotic catastrophe を誘導する  
 a : 食道癌細胞 TE7 に siRNA を作用させ survivin 蛋白の発現を抑制した。  
 b : survivin の低下した TE7 細胞は典型的な mitotic catastrophe 像を呈した。  
 多数に分裂し、巨大化した核がみられる。

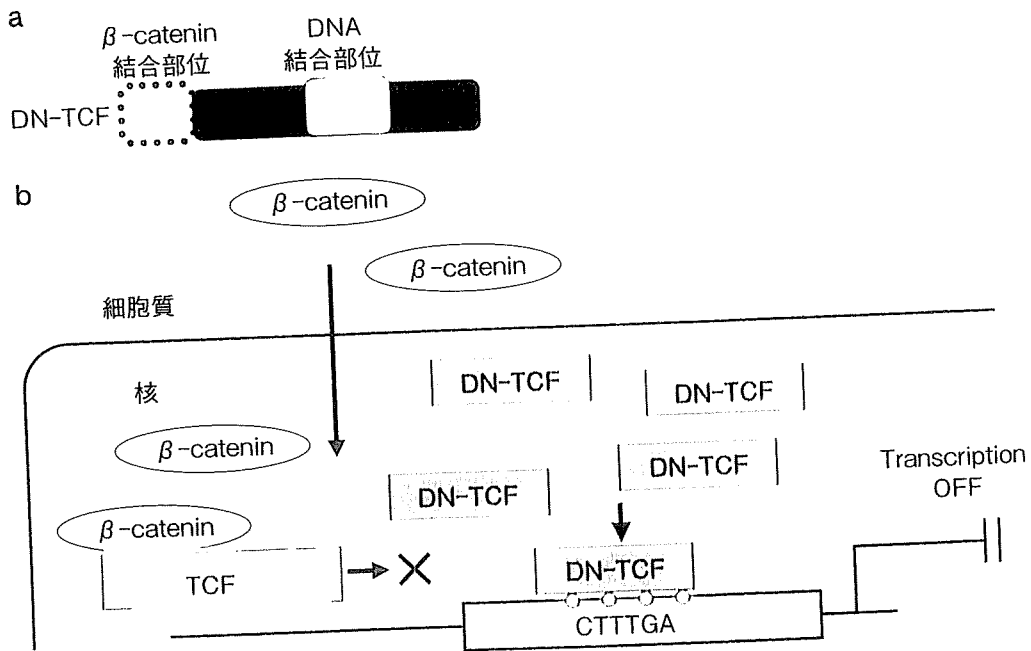


図6 Dominant negative TCF による競合的転写阻害  
 a : dominant negative TCF construct :  $\beta$ -catenin 結合部位を欠失している TCF 変異 DNA の構造を示す。これをアデノウイルスベクターに組み込んだ。  
 b : DN-TCF は内因性の  $\beta$ -catenin/TCF 複合体の下流遺伝子プロモーターへの結合を競合阻害する。

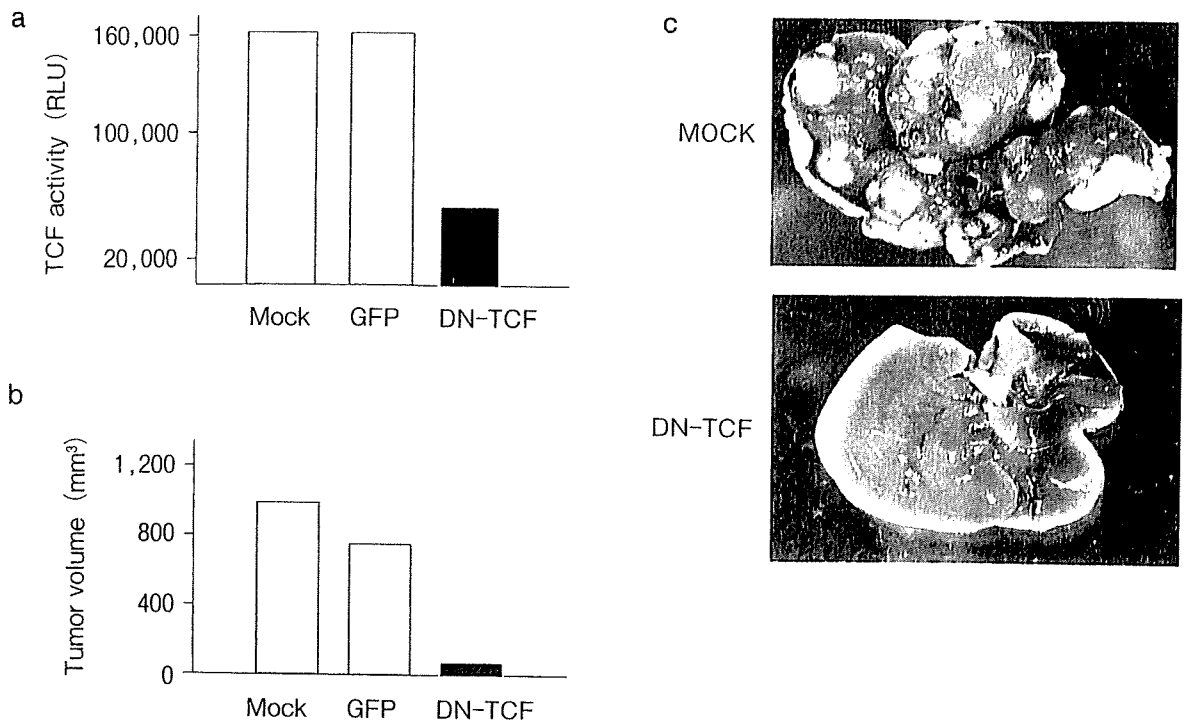


図7 DN-TCFによるヌードマウス腫瘍への影響

- a : KM12sm 大腸癌細胞に DN-TCF を作用させ、TCF 活性を測定した。Mock control, GFP 産生 adenovirus 液に比べて TCF 活性は有意に抑制された。
- b : DN-TCF を作用させた KM12sm 大腸癌細胞をヌードマウス皮下腫瘍に移植し2週間後に腫瘍サイズを計測した。
- c : DN-TCF を作用させた KM12sm 大腸癌細胞を脾臓に注入し5週間後に肝転移を評価した。MOCK control 群では激しい肝転移を起こしたが、DN-TCF 群は肝転移の形成を防止した。

tin が強力な survivin 阻害活性を有し、mitotic catastrophe を引き起こすことを観察してきた<sup>6-8)</sup>。実際、survivin を down-regulate する small interfering (si) RNA を作用させると劇的に mitotic catastrophe が誘導され癌細胞は死滅してゆく (図5)。

### Ⅲ. TCF 転写因子活性の阻害

$\beta$ -catenin/TCF 転写因子複合体が活性化する下流遺伝子のプロモーターは、共通の塩基配列として CTTTGA を core に含む TCF 結合領域を有している。われわれは、DNA 結合部位は保持しているが  $\beta$ -catenin 結合部位を欠失した dominant negative TCF (DN-TCF) を adenovirus vector に組み込みウイルス液を作製した (図6a)。この DN-TCF は、下流遺伝子のプロモーターに結合し内因性の  $\beta$ -catenin/TCF 転写因子

複合体の結合を競合阻害する (図6b)。TCF 結合配列を繰り返し内包するように設計された reporter plasmid を用いて転移能の高い大腸癌細胞株 KM12sm における TCF 活性を測定すると、DN-TCF は Mock コントロールや green fluorescence protein (GFP) 産生 adenovirus と比べて有意に TCF 活性を抑制した (図7a)。また、ヌードマウスの皮下腫瘍形成への影響をみると、DN-TCF を作用させた群では Mock, GFP 群と比べて明らかな腫瘍抑制効果がみられた (図7b)。KM12sm 大腸癌細胞を脾注すると多数の肝転移結節を形成したが、DN-TCF 投与群では転移結節の明らかな減少を認めた (図7c)。

### Ⅳ. TCF decoy の設計

われわれは、adenovirus よりも実用的な核酸医薬として *in vitro* で DN-TCF と同程度に TCF

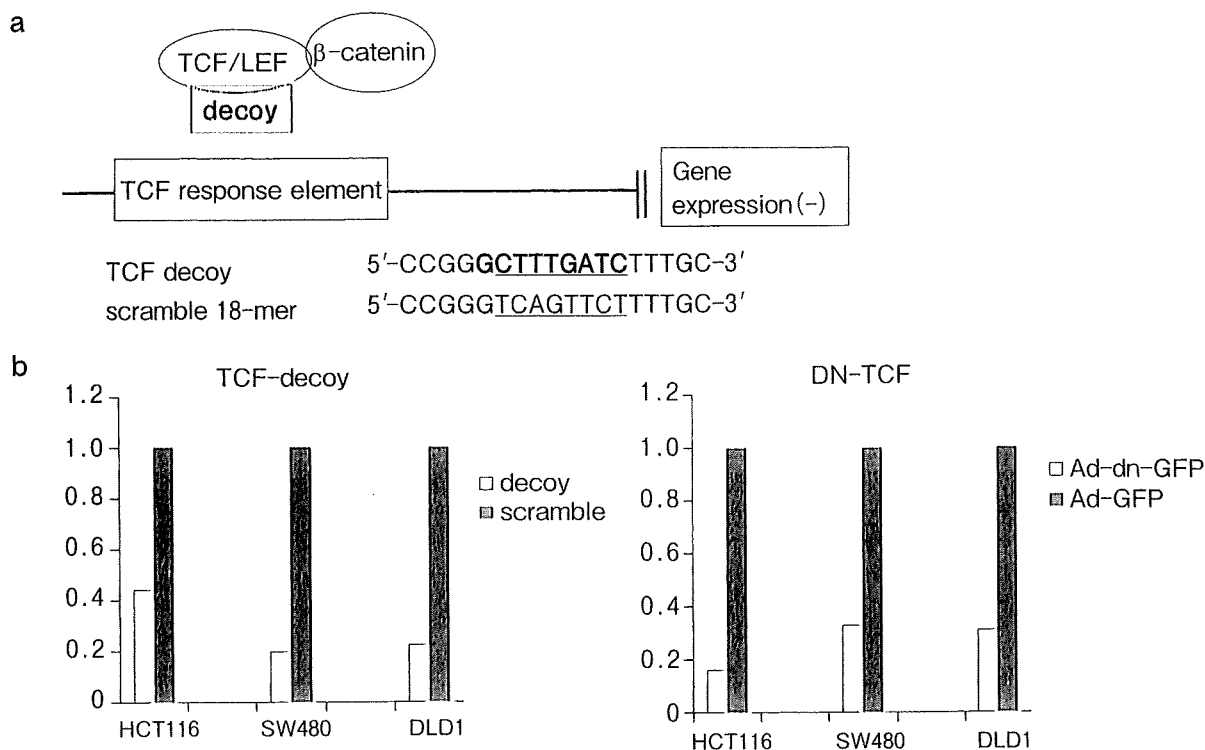


図8 TCF decoy による転写阻害の試み

- a : 内因性の TCF と結合し, TCF response element への結合を阻害する 18-mer の DNA decoy (おとり) を設計した。  
b : この decoy は dominant negative TCF と同程度に TCF 活性を抑制した。

活性を抑制する TCF decoy (二本鎖 DNA) を開発した<sup>9)</sup>。この decoy は, *in vitro* では liposome によって大腸癌細胞 HCT116 に 6 時間ではほぼすべての細胞の核内に移行する。しかし, 24~48 時間ほどでほとんど細胞核から消失する。さらに, 生体内では DNA 分解酵素によってたちまち分解を受けるため, 現時点ではまだ実用的とはいえない。

おわりに

近年 drug delivery system (DDS) の break through が到来し, 癌の臨床でミセル体や nano-liposome などが効果を示しつつある。今後は核酸そのものの修飾をさらに工夫し, 近い未来に癌の核酸医薬による遺伝子治療のカテゴリーが確立され新たな肝転移の治療法につながることを祈念して結びとしたい。

文 献

- 1) He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., *et al.*: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512, 1998.
- 2) Takayama, O., Yamamoto, H., Damdinsuren, B., *et al.*: Expression of PPARdelta in multi-stage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology. *Br. J. Cancer* 95: 889-895, 2006.
- 3) Mitmaker, B., Begin, L.R. and Gordon, P.H.: Nuclear shape as a prognostic discriminant in colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum* 34: 249-259, 1991.
- 4) Ikeguchi, M., Sakatani, T., Endo, K., *et al.*: Computerized nuclear morphometry is a useful technique for evaluating the high metastatic potential of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 86: 1944-1951, 1999.
- 5) Yasui, M., Yamamoto, H., Ngan, C.Y., *et al.*: Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization. *Clin. Cancer Res.* 12: 4720-4729, 2006.



- 6) Gu, J., Yamamoto, H., Lu, X., *et al.*: Low-dose oxaliplatin enhances the antitumor efficacy of paclitaxel in human gastric cancer cell lines. *Digestion* 74: 19-27, 2006.
- 7) Fujie, Y., Yamamoto, H., Ngan, C.Y., *et al.*: Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35: 453-463, 2005.
- 8) Ngan, C.Y., Yamamoto, H., Takagi A., *et al.*: Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Sci.* 99(1): 129-139, 2007.
- 9) Seki, Y., Yamamoto, H., Ngan, C.Y., *et al.*: Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic beta-catenin/T-cell factor pathway. *Mol. Cancer Ther.* 5: 985-994, 2006.

---

0914-2223/08/¥500/論文/JCLS



# 大腸癌の個別化医療に向けて

竹政 伊知朗<sup>\*1</sup>(Takemasa, Ichiro), 池田 正孝<sup>\*1</sup>(Ikeda, Masataka),  
山本 浩文<sup>\*1</sup>(Yamamoto, Hirofumi), 関本 貢嗣<sup>\*2</sup>(Sekimoto, Mitsugu),  
森 正樹<sup>\*3</sup>(Mori, Masaki), 門田 守人<sup>\*4</sup>(Monden, Morito)

<sup>\*1</sup>大阪大学大学院外科学講座消化器外科学助教, <sup>\*2</sup>同准教授, <sup>\*3</sup>同教授, <sup>\*4</sup>同副学長

## はじめに

大腸癌は罹患率, 死亡率とも増加しており, 現状の画一的医療から脱却し個別化医療を実践するための新しい診断・治療体系の確立が必要である。

個別化医療とは, 患者個人の生物学的な特徴に基づいた診断(予後予測: prognostic factorと治療応答性予測: predictive factor)によって, 最大の治療効果と最小の副作用が得られるような治療を実践することである。ヒトゲノムの完全解読に伴

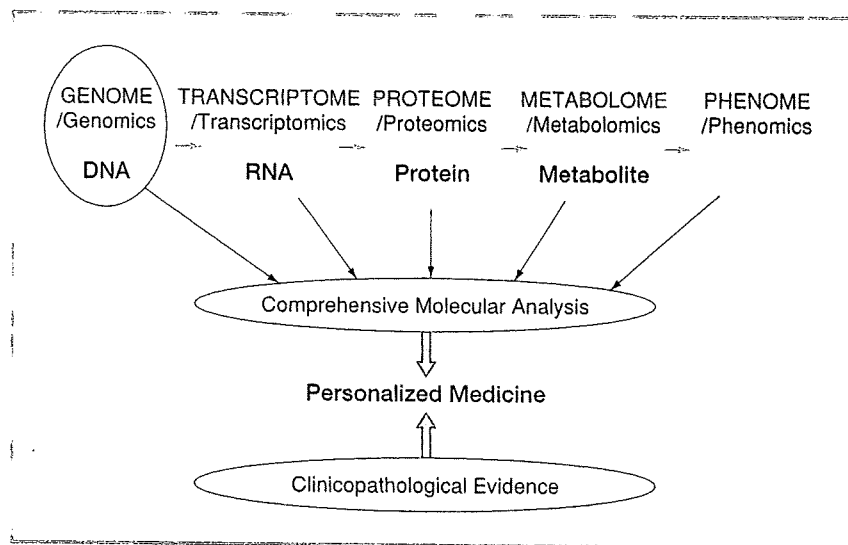


図1 OMICSとこれまでに蓄積された臨床病理学的エビデンスによる個別化医療の構築。

い各種の公共データベースが整理され、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスなど OMICS 技術が急速に発展したことにより、癌医療は個別化医療に向けこれまでの生命科学の集大成を土台に大きな革新を迎えている(図 1)。なかでも DNA チップ技術の開発によりヒト全遺

伝子の網羅的解析が可能となり、遺伝子発現プロファイルによる数多くの成果が報告された。原発腫瘍には再発・転移など悪性度や、薬剤・放射線の感受性に関する特有の遺伝子発現パターンが内在しているという理論が提唱され(図 2)、基礎的成果の応用として遺伝子発現プロファイル解析による癌の特性診断の可能性がさかんに議論されている。また網羅的発現解析の成果の一端として、mRNA と翻訳蛋白の相関が乏しいことが知られるようになり、プロテオミクスの重要性も認識されるようになった。

一方、薬物動態に関連する蛋白の遺伝子多型が患者個々の薬剤 ADME (吸収: Absorption, 分布: Distribution, 代謝: Metabolism, 排出: Excretion) に影響し、薬剤応答性に関与することも明らかになった。米国では画一的 (one size fits all) な薬剤投与の副作用によって年間の死亡者数が年間 10 万人を越え、200 万人が入院加療を必要としている。適正な薬剤を感受性のある患者に適正量投与することで副作用を最小限に抑え、患者を毒性から解放するとともに、医療経済の健全化を図ることが可能となる(図 3)。また医薬品開発に必要な膨大な動物実験と、繰り返し行われる臨床試験の数を大幅に減らすことも期待される。

本稿では、大腸癌の個別化医療に向けたこれまでの基礎研究成果の紹介と、その臨床応用における現況と問題点についてわれわれの取り組みを含め概説する。

### 大腸癌個別化医療の実例

CPT-11 の副作用発現予測診断法「Invader UGT1A1 Molecular Assay」の承認

CPT-11 は肝臓で加水分解され高い抗腫瘍活性を発揮する SN-38 に転換される。その後、SN-38 は主に肝臓で UGT1A1 (uridine diphosphate glucuronosyl tranferase 1A1) によってグルクロン酸抱合を受けて解毒され、胆汁を介して

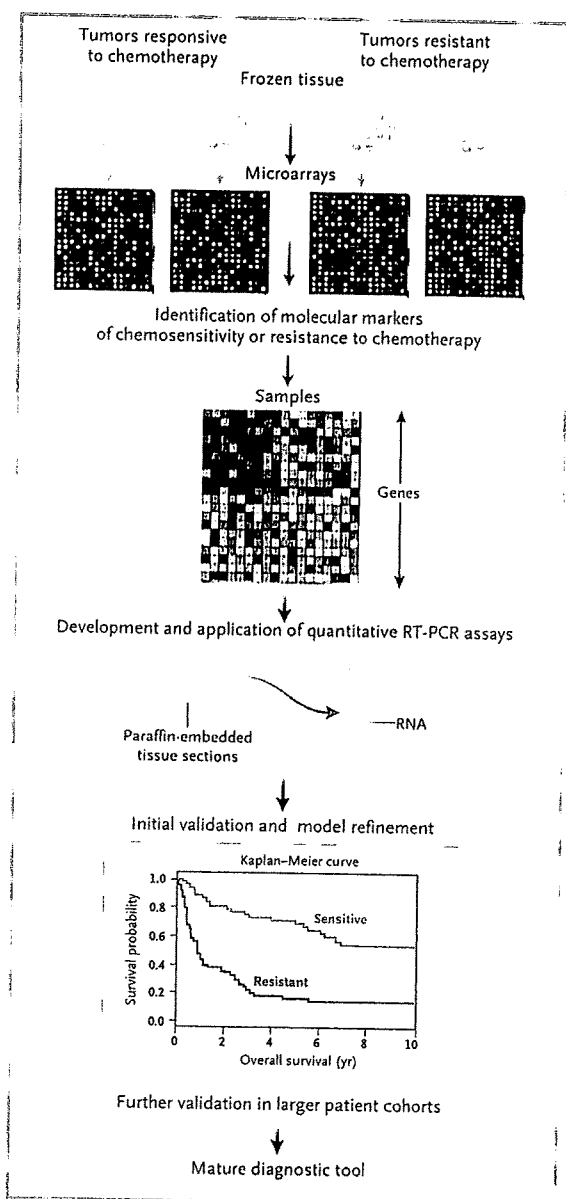


図 2 癌診断・治療における DNA チップ技術の応用 (文献 3 より引用)

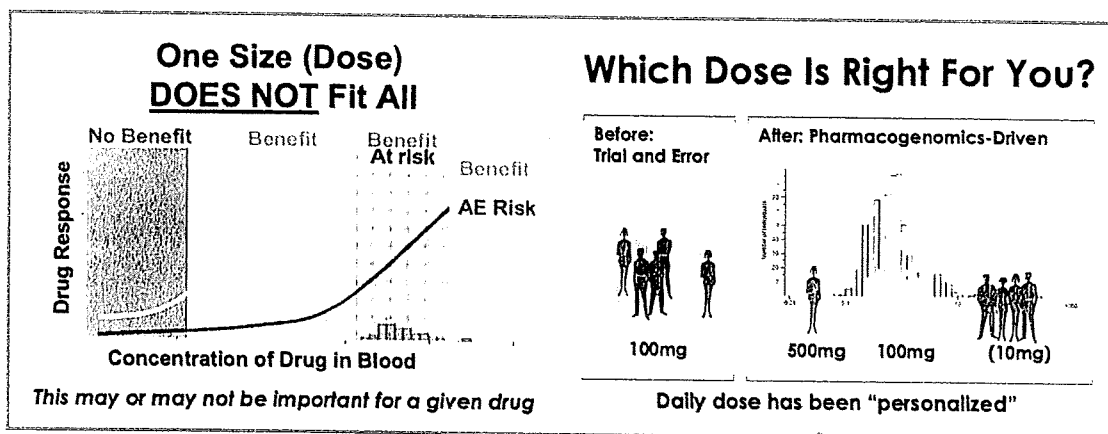


図3 FDAによる個別化医療の推進

(www.fda.gov/cder/genomics/scienceForum 2005.pdf より引用)

腸管に排泄される。しかし UGT1A1 に遺伝子多型があると、UGT1A1 の発現が減弱し CPT-11 の解毒が進まず重篤な下痢や骨髄抑制などの副作用が引き起こされることが知られている。2005 年 8 月、米国食品医薬品局 (FDA) は UGT1A1 プロモーター領域の遺伝子多型「UGT1A1\*28」をインベーター法で判定するキットを体外診断用薬として承認した。これにより個々の患者の血液から遺伝子の違いを判定して副作用発現を予測し、危険性が高い患者群には投与量を減らすといった対応が薬剤投与前に取れるようになり、副作用回避の個別化医療が初めて実現した。2007 年には国内でも、「UGT1A1\*28」に加えアジア人で CPT-11 の代謝に関与する重要性が高いエクソン 1 の遺伝子多型「UGT1A1\*6」「UGT1A1\*27」も対象とした体外診断用薬が承認申請されている。

2. 大腸癌に対する分子標的治療薬 cetuximab の適応

cetuximab はキメラ化 IgG1 モノクローナル抗体であり、EGFR (epidermal growth factor receptor) の細胞外ドメインに結合して抗腫瘍効果を発揮する。EGFR を発現する結腸・直腸癌に有効であり、すでに分子標的薬として FDA から承認を

受けている。2007 年には、大規模臨床試験 OPUS で FOLFOX に cetuximab を上乗せした効果が、また CRYSTAL で FOLFIRI に cetuximab を上乗せした効果が、無増悪生存期間と奏効率の改善によって検証された。CPT-11, L-OHP, fluoropyrimidine 治療に奏効が得られなかった患者を対象とする多施設第 III 相試験でも、BSC (best supportive care) 群に比べ cetuximab 群で全生存率が有意に高いことも示され、cetuximab の有用性が検証された。しかし、2008 年の米国臨床腫瘍学会 (ASCO) で、直腸癌患者の約 40% に認められる k-ras 突然変異症例には cetuximab の効果が認められないという CRYSTAL と OPUS のサブグループ解析が報告された。k-ras 野生型患者群では、cetuximab 投与により無増悪生存期間の中央値、奏効率とも有意に改善するが、k-ras の変異型患者群では、cetuximab 投与により治療成績、奏効率とも有意差はないものの逆に下回っていたというものであり、今後、標的蛋白である EGFR の癌組織での発現を投与前に確認し、個々の患者に応じて適応を決定する必要性が指摘されている。

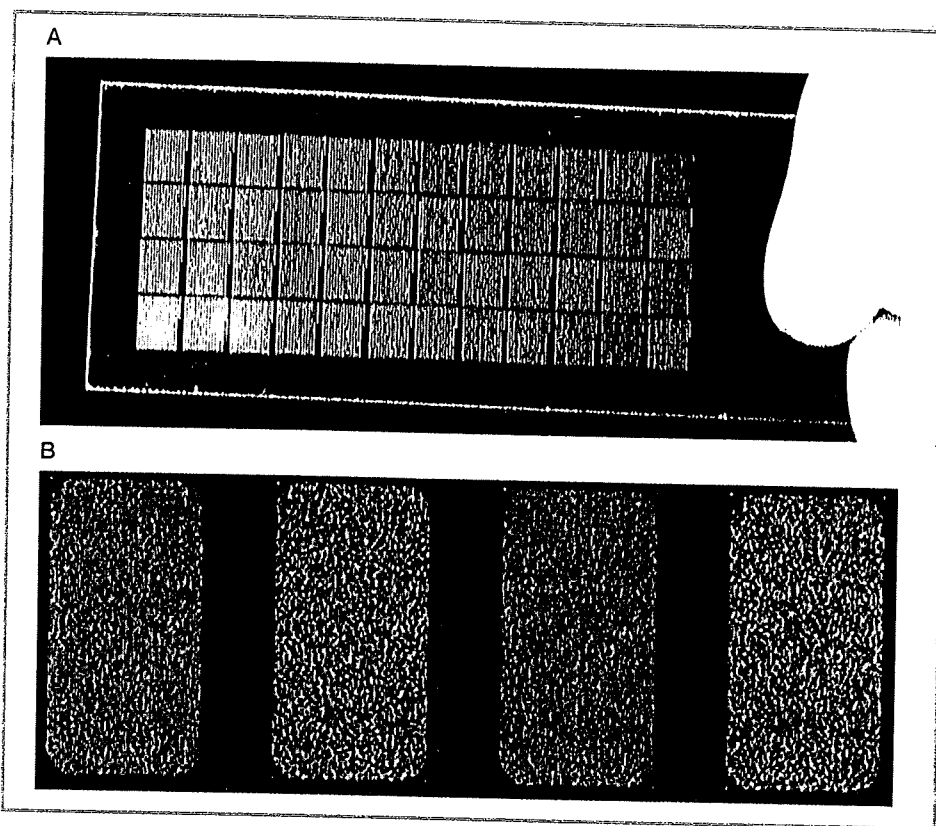


図4 DNAチップ

- A ヒト全遺伝子型 30 K DNA チップ(AceGene DNA チップ研究所)  
50-mer のオリゴヌクレオチド 30,000 種余りが搭載された DNA チップ。  
B 最大 244,000 個のスポットを搭載した DNA チップ(Agilent Technologies 社)  
60-mer のオリゴヌクレオチドが搭載された DNA チップ。

### 遺伝子発現プロファイル 解析研究と臨床応用

遺伝子発現プロファイル解析とは、網羅的な遺伝子発現情報と生物学的な特徴の関係を比較検討し、有意義な情報を検索することである<sup>2)</sup>。現在では、ヒト全遺伝子の発現情報が1 assay で解析可能となり、最大で1×3 インチ(25 mm×75 mm)のガラススライド1枚に最大 244 K の遺伝子を搭載した DNA チップも登場した。さらに S/N 比, intensity の改善による感度向上と、高い収束性と再現性を実現した高品質の DNA チップが作製されるようになり、癌領域の遺伝子発現プロファイル研究に拍車がかかってきている(図

4)。

乳癌ではすでに予後予測システムに代表される成功例も報告され、個別化医療の実現への期待はますます大きくなってきた。「Oncotype DX」<sup>9)</sup>は 21 種類の遺伝子発現を RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) 法を用いて測定し、再発スコアにより乳癌患者の遠隔再発、補助療法の効果を予測する方法で<sup>4)5)</sup>、ASCO、米国包括癌センターネットワーク(NCCN)が術後治療方針決定に推奨している<sup>6)7)</sup>。「MammaPrint」<sup>8)</sup>は 70 遺伝子を搭載した DNA チップを用いて乳癌患者の予後を予測する方法で<sup>9)10)</sup>、FDA により体外診断多変数指標測定 (IVDMIA : in vitro diagnostic multivariate index assay) 装置として

承認された<sup>11)</sup>。さらに欧米では診断法と治療法を大規模な臨床試験によって同時開発する枠組みも開始され、EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer : 欧州癌研究治療機構) は、「MammaPrint」を使用した遺伝子リスク診断で、初期乳癌患者 6,000 人を 4 群に分類し、術後化学療法の必要性の基準を設定する MINDACT trial (Microarray In Node negative Disease may Avoid Chemo Therapy) を開始した<sup>12)</sup>。一方、米国では NCI (米国国立癌研究所) が<sup>13)</sup> 出資し、ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group : 米国東海岸癌臨床試験グループ) が中心となって、早期乳癌患者 10,000 人以上を対象として「Oncotype DX」による再発リスク診断によって、遺伝的要因が最適な術後治療方針決定に寄与できるかどうかを調査する TAILORx (Trial Assigning Individualized Options for Treatment (Rx)) が開始されている<sup>13)</sup>。いずれも最少の副作用で最大の効果が得られるようにするための診断と治療の個別化を検討する最初の臨床試験であり、遺伝子発現に基づく個別化医療の実用化の時代が到来したことが強く印象付けられた。

大腸癌でも遺伝子プロファイルによるリンパ節転移、遠隔転移、再発の予測診断の可能性について多数報告されている。Kwon らはリンパ節転移に関与する遺伝子群を同定し、その発現プロファイルによる転移予測の可能性を報告した<sup>14)</sup>。Croner らはリンパ節転移の予測判断には従来の臨床病理因子より遺伝子発現プロファイルが優れているとした<sup>15)</sup>。Wang らは 23 種の遺伝子発現パターンによって、Dukes' B 大腸癌の術後 3 年以内の再発が 13 倍もの高危険度となる群を予測できるとし<sup>16)</sup>、Eschrich らは 43 遺伝子の発現プロファイルによる分子 staging が Dukes' 病期より予測に優れていると報告した<sup>17)</sup>。Barrier らは、Stage II 大腸癌の異時性転移の予測診断の可能性について再発予測が可能であることを示した<sup>18)</sup>。Stage II 結腸癌は一般的に予後良好で、

術後補助療法の有用性は検証されていないが、個々の症例の分子生物学的特性を反映した予後予測診断が可能となれば、一部の高リスク症例群に対して効率的な補助化学療法など個別化医療の実践が期待できる点で臨床的意義が大きいと考えられる<sup>19)</sup>。また Arango らは Dukes' C 大腸癌の予後予測に従来の分子マーカーである TP-53 や K-RAS の遺伝子変異、18q 染色体のゲノム不安定性よりも遺伝子プロファイルが優れていたと報告した<sup>20)</sup>。

われわれの教室では大腸癌解析用の cDNA マクロアレイ<sup>21)</sup>やヒト全遺伝子型 DNA チップを用いて大腸癌の転移・再発予測診断に取り組んでいる。肝転移を起こした原発巣は肝転移を伴わない原発巣よりも肝転移巣の発現プロファイルに近いことがわかり、大腸癌原発巣には転移に関与する遺伝子 signature が内在することが示唆され、この signature の違いによって予後が有意に異なることを示した<sup>22)</sup>。現在コンテンツを厳選し、低コストの大腸癌用臨床型 DNA チップの開発に取り組んでいる。

## 大腸癌のプロテオミクス

近年、生体の機能分子である蛋白質の網羅的解析によってゲノム情報に機能情報を付加することを目的としたプロテオミクスが注目され、質量分析法の技術革新により今まで困難とされていた生体内微量蛋白質の情報をかなりの感度で定量的、かつハイスループットに得られるようになった。疾患プロテオミクスでは、各種の疾患に対して患者の臨床情報や病理学的所見、遺伝的バックグラウンドなどの情報をもとに各疾患での組織、細胞、血液等における蛋白質レベルの詳細な分子情報を加え、個々の疾患発症メカニズムや各患者に最適な治療ターゲット・臨床マーカーなどを明らかにすることを主眼としている。

二次元電気泳動 (2-DE)<sup>23)</sup> は定量的ディファレ

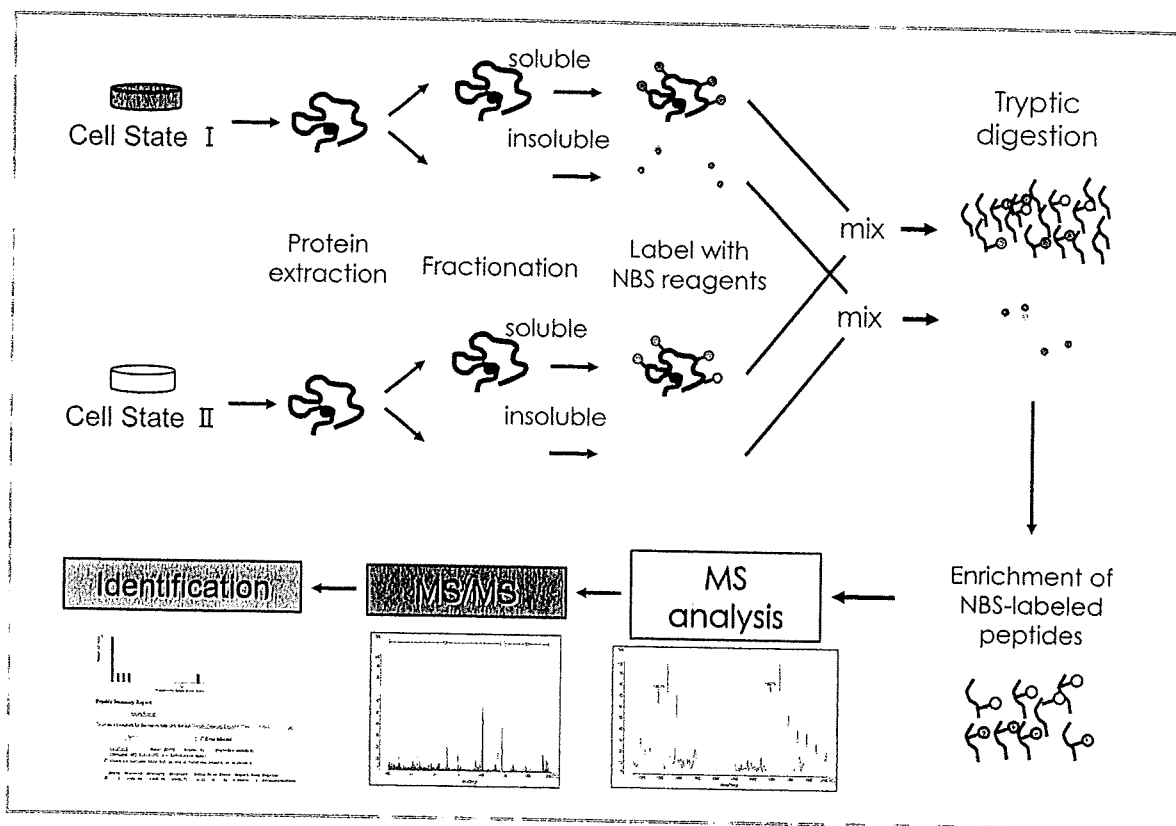


図 NBS法のmethodology

ンシャル解析や翻訳後修飾解析に向いていることから汎用されているが、蛋白分離およびゲル染色の再現性や膜蛋白に対しての低分離能などの問題点も抱えている。SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 法<sup>24)</sup>はプロテインチップと質量分析装置をベースとして、解析対象サンプルとプロテインチップを反応させ、チップと結合した蛋白をイオン化することによって蛋白を検出する手法である。この方法は蛋白発現プロファイリングを迅速に行うことが可能だが、チップに結合した蛋白のみを解析対象としていることから網羅的解析には適していない。安定同位体標識法は蛋白中のある特定のアミノ酸残基に対して<sup>15</sup>N同位体標識された試薬でラベル化、酵素消化、ラベル化ペプチドを精製しMSで測定することにより蛋白の相対定量および同定を行う手法である。

この手法では他の手法に比べて、蛋白の高精度な相対定量や高感度検出が可能である。

大腸癌のプロテオミクス関連論文は2000年頃より散見され、2004年にChenらは55名の大腸癌患者と92名の健常者の血清よりSELDI法で90%以上の感度と特異度で大腸癌を判別できることを示した<sup>25)</sup>。報告の多くは大腸癌の発育・進展や薬剤の代謝活性に関わる新規バイオマーカーを検索・同定するもので、遺伝子発現のように蛋白発現プロファイルと大腸癌の生物学的特性を対比するような研究はまだこれからである。

当科ではMALDI-TOF/MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) と、安定同位体 *in vitro* 標識法であるNBS (2-nitrobenzenesulfonyl chloride) 法<sup>26)</sup>を組み合わせ、大腸癌組織におけるプロテオーム

解析を行っている(図5)。本法は、アミノ酸残基中で蛋白中の含有率が最も低く、かつ90%以上の蛋白中に含まれているトリプトファン残基をラベル化のターゲットとしており、大腸癌で特異的に発現する6種類の蛋白を同定することに成功した<sup>27)</sup>。

## 大腸癌個別化医療の今後の展開

今後の消化器癌の特性診断はDNAチップ技術による遺伝子発現プロファイルをはじめ、OMICS各種の解析手段を組み合わせることでDNA, RNA, 蛋白での相互作用を包括的に解析する方向へ発展すると思われる。しかし実際の臨床に応用するためにはまだ多くの課題と改善点が残されている。臨床予後情報には曖昧さが含まれるうえ、解析では少数症例での多重検定となるために偶然性を完全に排除できないこと、また遺伝子ネットワークの情報整理が不十分で選択遺伝子の合理性や、機能的意義に疑問点があることが指摘されている<sup>28)</sup>。今後は、多数症例の解析によるvalidationと再現性の確保とprospectiveな臨床試験によって、evidenceを証明することが必要である<sup>29)</sup>。

## おわりに

大腸癌の個別化医療に向けた遺伝子解析の臨床応用の現状と問題点について概要した。今後、網羅的な分子生物学的研究により、どのような癌細胞集団が、転移・再発に関わり、また治療因子に関係するのか、そのメカニズムの解明がさらに進むと考えられる<sup>30)</sup>。近い将来、従来困難であった個々の患者の予後や治療応答性を正確に予測することが可能になり、大腸癌の個別化医療の実践が期待される。

## References

- 1) Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al : Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357 : 2040-2048, 2007
- 2) 竹政伊知朗, 門田守人: ヒト癌の遺伝子発現プロファイル解析の現況と展望. 松原謙一(編): ゲノム機能, 発現プロファイルとトランスクリプトーム. 中山書店, 東京, pp.83-101, 2000
- 3) [http : //www.genomichealth.com/oncotype/default.aspx](http://www.genomichealth.com/oncotype/default.aspx)
- 4) Paik S, Shak S, Tang G, et al : A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351 : 2817-2826, 2004
- 5) Paik S, Tang G, Shak S, et al : Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24 : 3726-3734, 2006
- 6) Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al : American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25 : 5287-5312, 2007
- 7) [http : //www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf)
- 8) [http : //www.agendia.com/us/index.php?option=com\\_content&task=view&id=13&Itemid=39](http://www.agendia.com/us/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=39)
- 9) van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al : Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 : 530-536, 2002
- 10) 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
- 11) [http : //www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01555.html](http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2007/NEW01555.html)
- 12) [http : //www.eortc.be/services/unit/mindact/MINDACT\\_websiteii.asp](http://www.eortc.be/services/unit/mindact/MINDACT_websiteii.asp)
- 13) [http : //www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/TAILORx](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/TAILORx)
- 14) Kwon HC, Kim SH, Roh MS, et al : Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 47 : 141-152, 2004
- 15) Croner RS, Peters A, Brueckl WM, et al : Microarray versus conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *Cancer* 104 : 395-404, 2005
- 16) Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, et al : Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 22 :



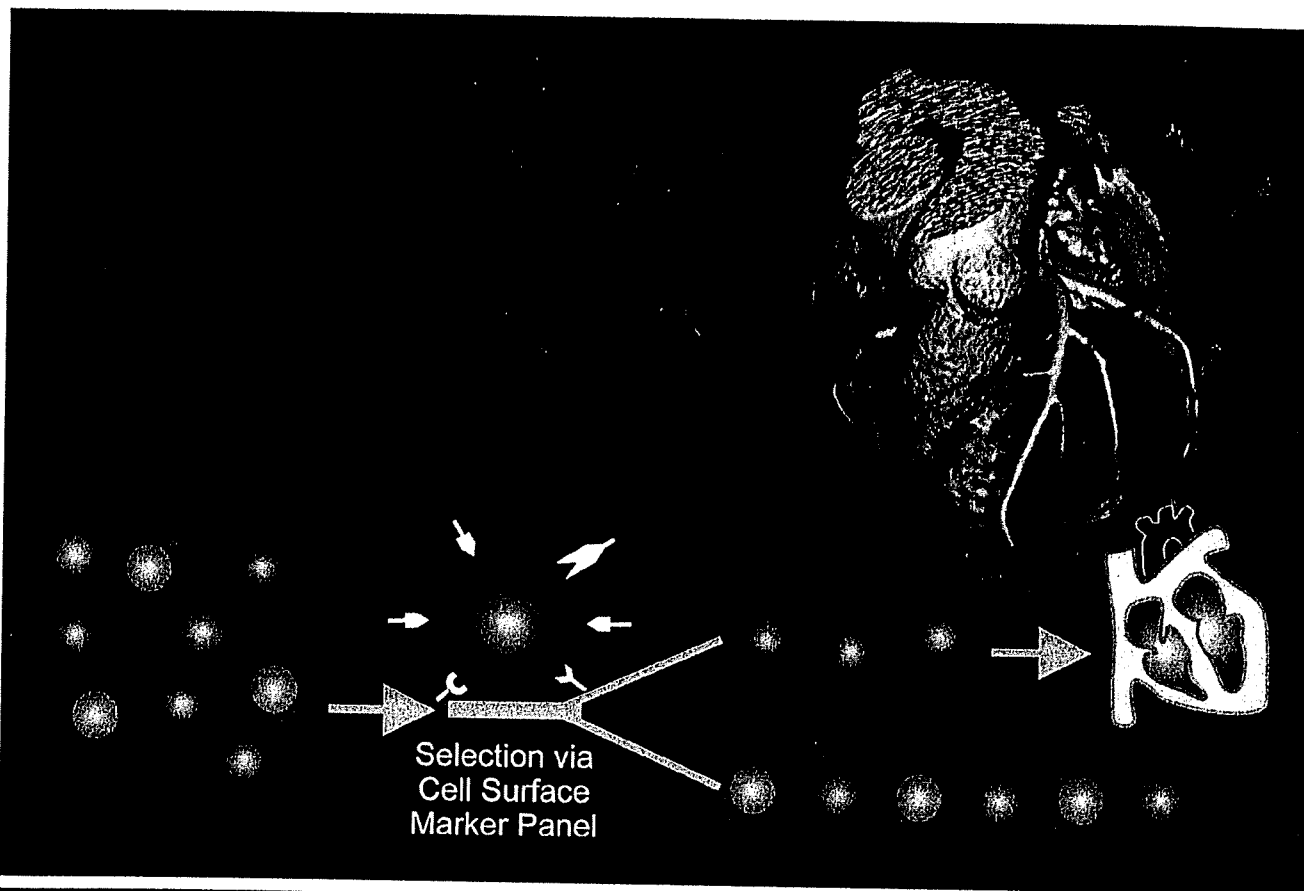
- 1564-1571, 2004
- 17) Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al : Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients.* *J Clin Oncol* 23 : 3526-3535, 2005
  - 18) Barrier A, Boelle PY, Roser F, et al : Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling. *J Clin Oncol* 24 : 4685-4691, 2006
  - 19) 竹政伊知朗, 池田正孝, 山本浩文, 他 : 遺伝子発現プロフィールによる消化器癌転移推測の可能性を探る. *分子消化器病* 4 : 35-40, 2007
  - 20) Arango D, Laiho P, Kokko A, et al : Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. *Gastroenterology* 129 : 874-884, 2005
  - 21) Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, et al : Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma : molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 285 : 1244-1249, 2001
  - 22) Yamasaki M, Takemasa I, Komori T, et al : The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Oncol* 30 : 129-138, 2007
  - 23) O'Farrell PH : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250 : 4007-4021, 1975
  - 24) Hutchens TW, Yip TT : New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 7 : 576-580, 1993
  - 25) Chen YD, Zheng S, Yu JK, et al : Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res* 10 : 8380-8385, 2004
  - 26) Matsuo E, Toda C, Watanabe M, et al : Selective detection of 2-nitrobenzenesulfonyl-labeled peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry using a novel matrix. *Proteomics* 6 : 2042-2049, 2006
  - 27) Watanabe M, Takemasa I, Kawaguchi M, et al : An application of 2-Nitrobenzenesulfonyl (NBS) method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma : A novel approach for biomarker discovery. *Proteomics Clin* 2 : 925-935, 2008
  - 28) Simon R : Development and validation of therapeutically relevant multi-gene biomarker classifiers. *J Natl Cancer Inst* 97 : 866-867, 2005
  - 29) 竹政伊知朗, 池田正孝, 山本浩文, 他 : 網羅的遺伝子・タンパク解析, DNA マイクロアレイ. 門田守人, 松浦成昭(編) : 癌転移もメカニズムがよくわかる, 肝転移のすべて. 永井書店, 東京, pp.139-146, 2006
  - 30) 竹政伊知朗, 山崎 誠, 門田守人 : DNA チップを用いた癌研究の現状と展望. *Molecular Medicine (臨時増刊号 癌ゲノム学)* 39 : 54-65, 2002
  - 31) Ramaswamy S : Translating cancer genomics into clinical oncology. *N Engl J Med* 350 : 1814-1816, 2004

# PROTEOMICS

**Clinical Applications**

**REPRINT**

[www.clinical.proteomics-journal.com](http://www.clinical.proteomics-journal.com)



**Focus on  
Cardiovascular Proteomics**

**Editors:**

**Manuel Mayr and Jennifer E. Van Eyk**

Endorsed as an  
Official Journal of

**HUPO**

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<sup>1,2</sup>, Ichiro Takemasa<sup>3</sup>, Naomasa Kawaguchi<sup>4</sup>, Masakazu Miyake<sup>3</sup>, Noriko Nishimura<sup>1,2</sup>, Toshiya Matsubara<sup>1,2</sup>, Ei-ichi Matsuo<sup>2</sup>, Mitsugu Sekimoto<sup>3</sup>, Katsuya Nagai<sup>5</sup>, Nariaki Matsuura<sup>4</sup>, Morito Monden<sup>3</sup> and Osamu Nishimura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Division of Disease Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>2</sup> Life Science Laboratory, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

<sup>3</sup> Department of Surgery, Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>4</sup> Department of Pathology, School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>5</sup> 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 (ZYG, 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; ZYG, 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 ( $^{13}\text{C}$ NBS stable isotope labeling kit-N; Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan). Normal and tumor tissue samples (100  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{HPLC}$  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 1.1.1.2 (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