

- [13] Honda, K., Ono, M., Shitashige, M., Masuda, M., Kamita, M. et al., Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2013, 43, 103-109.
- [14] Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.C. et al., Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem. Rev.* 2013, 113, 2343-2394.
- [15] Ono, M., Shitashige, M., Honda, K., Isobe, T. et al., Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 2006, 5, 1338-1347.
- [16] Masuda, T., Tomita, M., Ishihama, Y., Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J. Proteome. Res.* 2008, 7, 731-740.
- [17] Rappsilber, J., Ishihama, Y., Mann, M., Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 2003, 75, 663-670.
- [18] Rappsilber, J., Mann, M., Ishihama, Y., Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 1896-1906.
- [19] Fusaro, V.A., Mani, D.R., Mesirov, J.P., Carr, S.A., Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 190-198.
- [20] Benjamin, M., Ralphs, J.R., The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.* 2000, 196, 85-130.
- [21] Juneja, S.C., Veillette, C., Defects in tendon, ligament, and enthesis in response to genetic alterations in key proteoglycans and glycoproteins: a review. *Arthritis* 2013, 2013:154812.
- [22] Postacchini, F., Gumina, S., Cinotti, G., Perugia, D. et al., Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. Light and electron microscopic morphology. *Spine (Phila Pa 1976)* 1994, 19, 917-922.
- [23] Misawa, H., Ohtsuka, K., Nakata, K., Kinoshita, H., Embryological study of the spinal ligaments in human fetuses. *J. Spinal. Disord.* 1994, 7, 495-498.
- [24] Nguyen, A.D., Itoh, S., Jeney, V., Yanagisawa, H. et al., Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase. *Circ. Res.* 2004, 95, 1067-1074.
- [25] Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B. et al., Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* 2004, 36, 178-182.

- [26] Cruz-Conde, R., Berjano, P., Buitron, Z., Ligamentum flavum hematoma presenting as progressive root compression in the lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995, 20, 1506-1509.
- [27] Yamada, S., Tomoeda, M., Ozawa, Y., Yoneda, S. et al., PLAP-1/asperin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 23070-23080.
- [28] Specchia, N., Pagnotta, A., Gigante, A., Logroscino, G. et al., Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spine stenosis. *J. Orthop. Res.* 2001, 19, 294-300.
- [29] Nakatani, T., Marui, T., Hitora, T., Doita, M. et al., Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor- β v. *J. Orthop. Res.* 2002, 20, 1380-1386.
- [30] Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Schlieve, CR., Ikeya, M. et al., Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressive show increased mineralization and cartilage formation. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 2013, 8, 190.
- [31] Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H. et al., Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 1729-1739.
- [32] Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiha-Takeuchi, K. et al., HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development* 2004, 131, 1041-1053.
- [33] Tiaden, A.N., Richards, P.J., The emerging roles of HTRA1 in musculoskeletal disease. *Am. J. Pathol.* 2013, 182, 1482-1488.
- [34] Chamberland, A., Wang, E., Jones, A.R., Collins-Racie, L.A. et al., Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 27352-27359.
- [35] Dewan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S.S. et al., HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 2006, 314, 989-992.
- [36] Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H. et al., Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 2005, 37, 323-336.
- [37] Grau, S., Richards, P.J., Kerr, B., Hughes, C. et al., The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 6124-6129.
- [38] Wight, T.N., Potter-Perigo, S., The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011, 301, G950-955.
- [39] Nakajima, M., Kizawa, H., Saitoh, M., Kou, I. et al., Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 32185-32192.
- [40] Kizawa, H., Kou, I., Iida, A., Sudo, A. et al., An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat. Genet.* 2005, 37, 138-144.
- [41] Deten, A., Holz, A., Leicht, M., Barth, W. et al., Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2001, 22, 1191-12-7.

Figure 1. Proteomic characterization of ligamentum flavum (LF) in lumbar spinal stenosis (LSS)

(A) Venn diagram comparing proteins identified in LF obtained from controls and patients with LSS. (B) GO term cellular component categorization of all identified proteins. (C) GO term categorization of the unique proteins detected in the LF of patients with LSS.

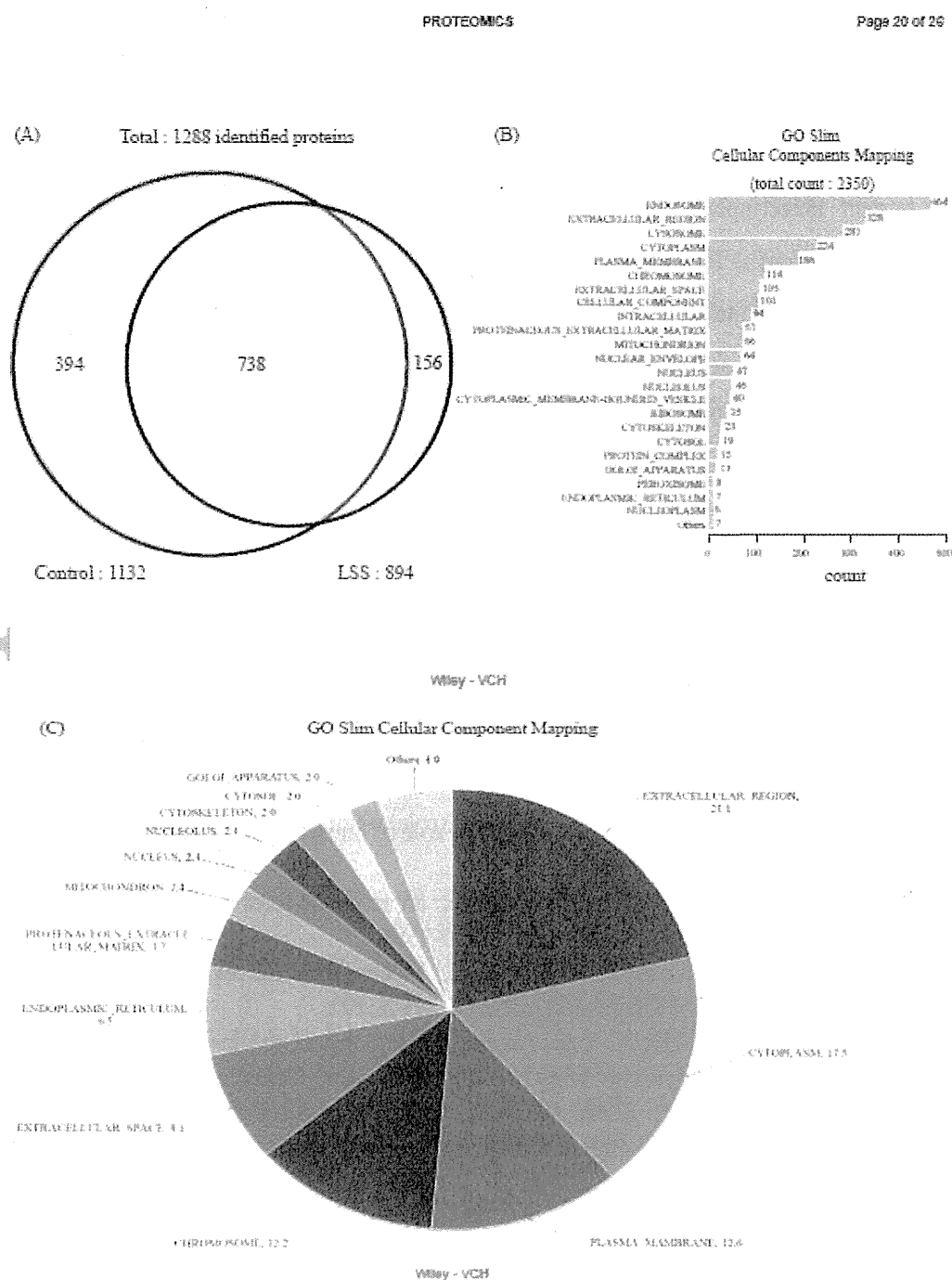


Figure 2. 2-dimensional image converted analysis of LC/MS (2DICAL) images

- (A) 2DICAL image of MS peaks detected by LC/MS. (B) Box plot of differentially expressed peptide peaks identified by 2DICAL. (C) MS peak intensity map of differentially expressed peptides for each patient with lumbar spinal stenosis (LSS).

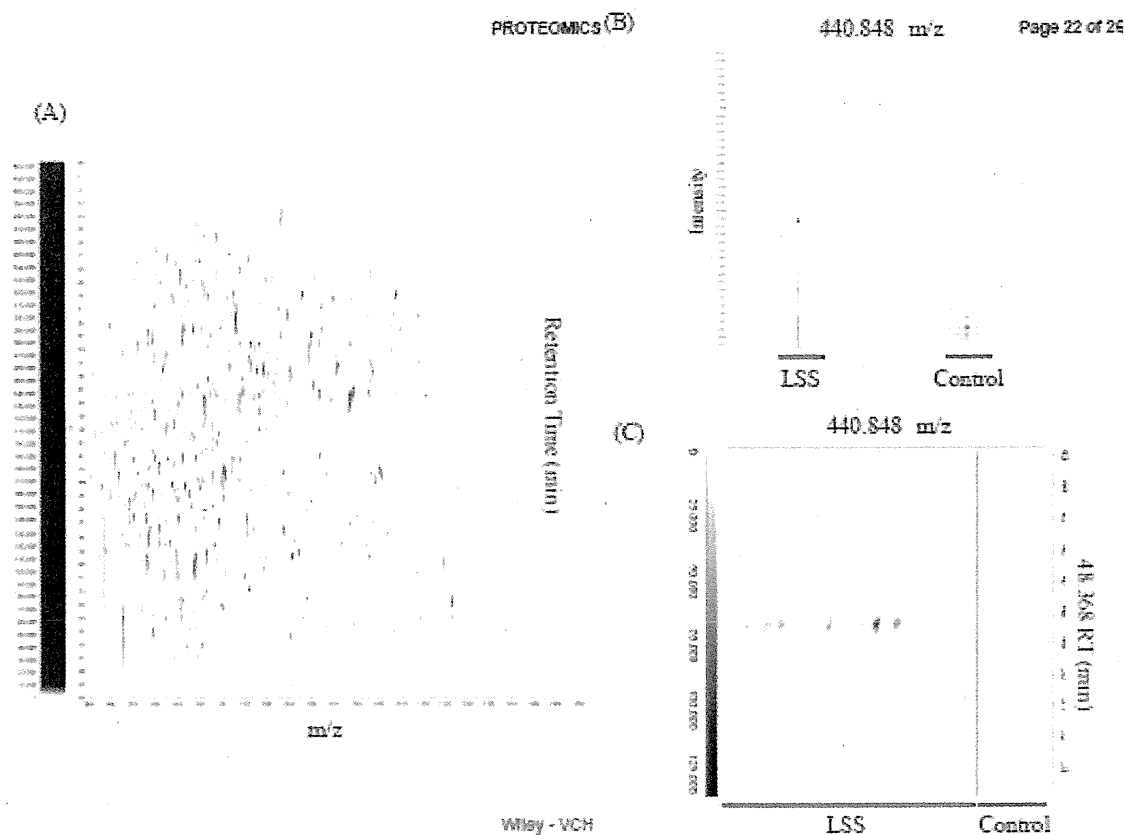


Figure 3. Heat map of differentially expressed peptides

Differentially expressed peptides that were detected at levels either two-fold higher or lower than those in control samples were visualized as a heat map constructed with R version 2.12.0. The asterisks indicate peptides that increased in controls but not patients with lumbar spinal stenosis (LSS).

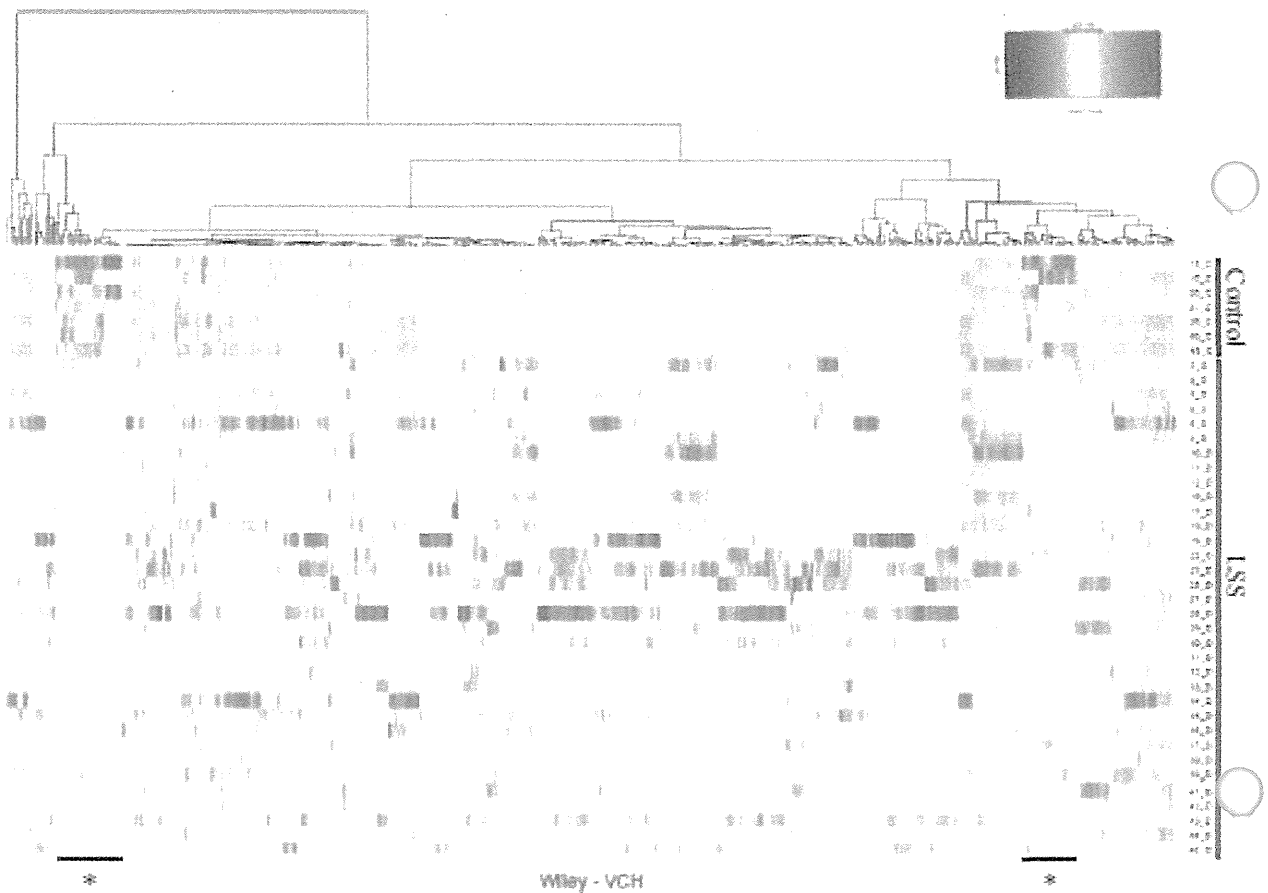
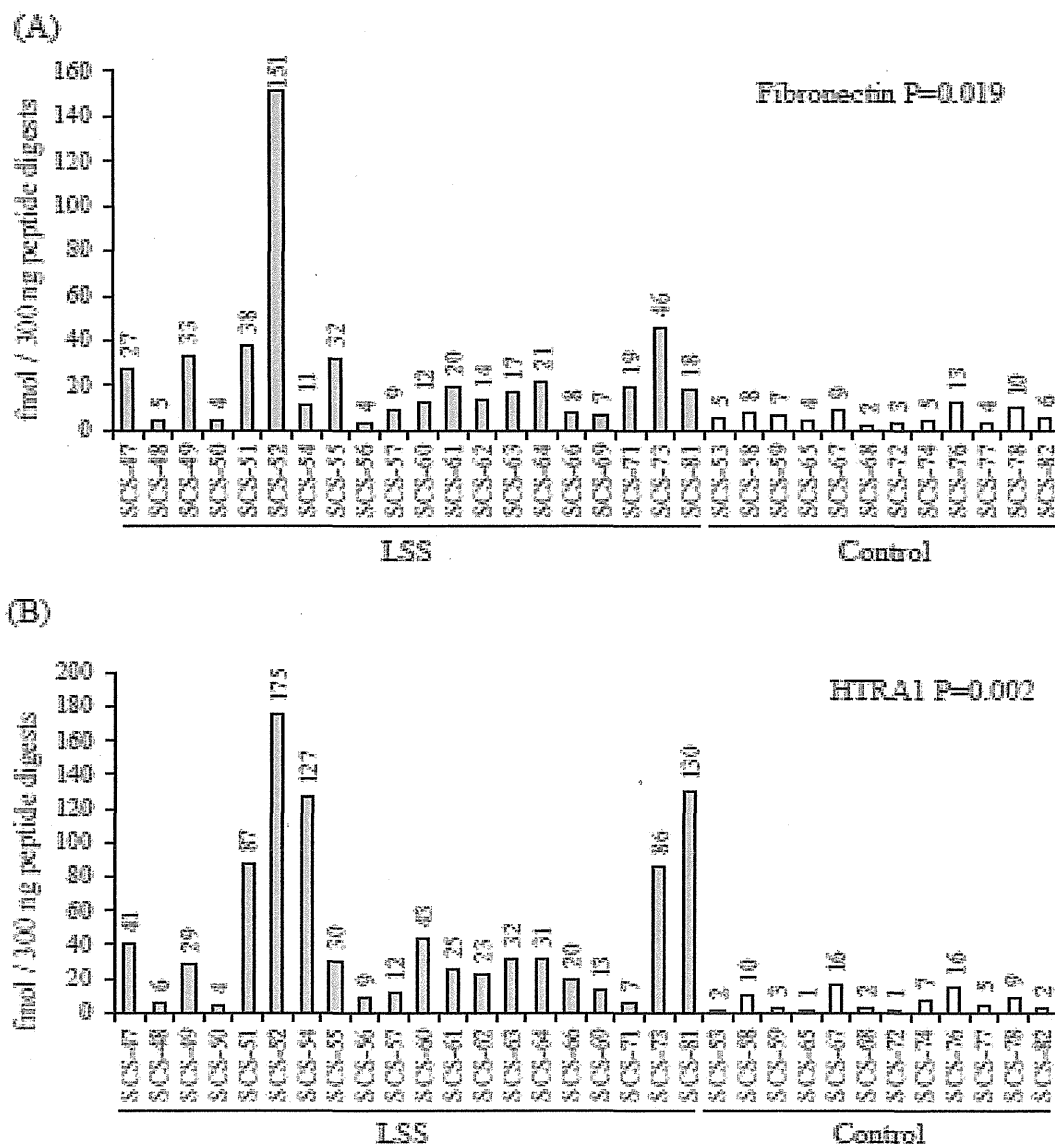


Figure 4. Verification of differentially expressed peptides using SRM/MRM with LC/MS/MS

Vertical axis indicates the amount of each peptide identified in one-shot 300 ng of peptide samples. The horizontal axis indicates the patient numbers, as shown in Supplementary Table 1. The white and gray bars represent control and lumbar spinal stenosis (LSS) samples, respectively. The amount of (A) fibronectin, (B) HTRA1, (C) tenascin, and (D) asporin found in the ligamentum flavum (LF) of each LSS patient.



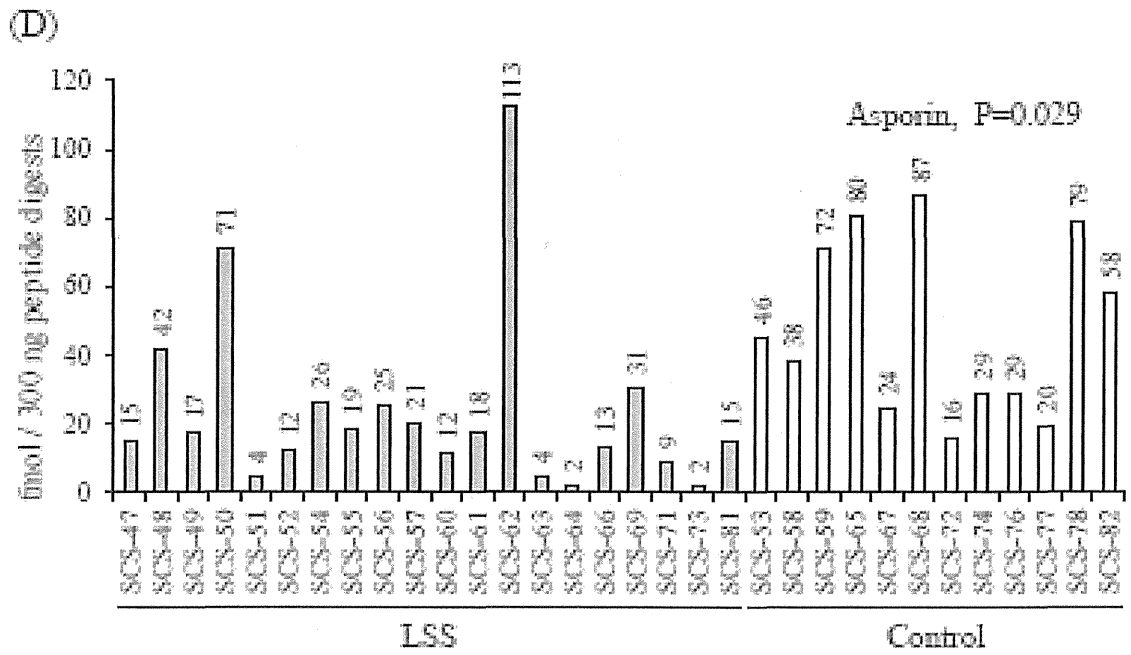
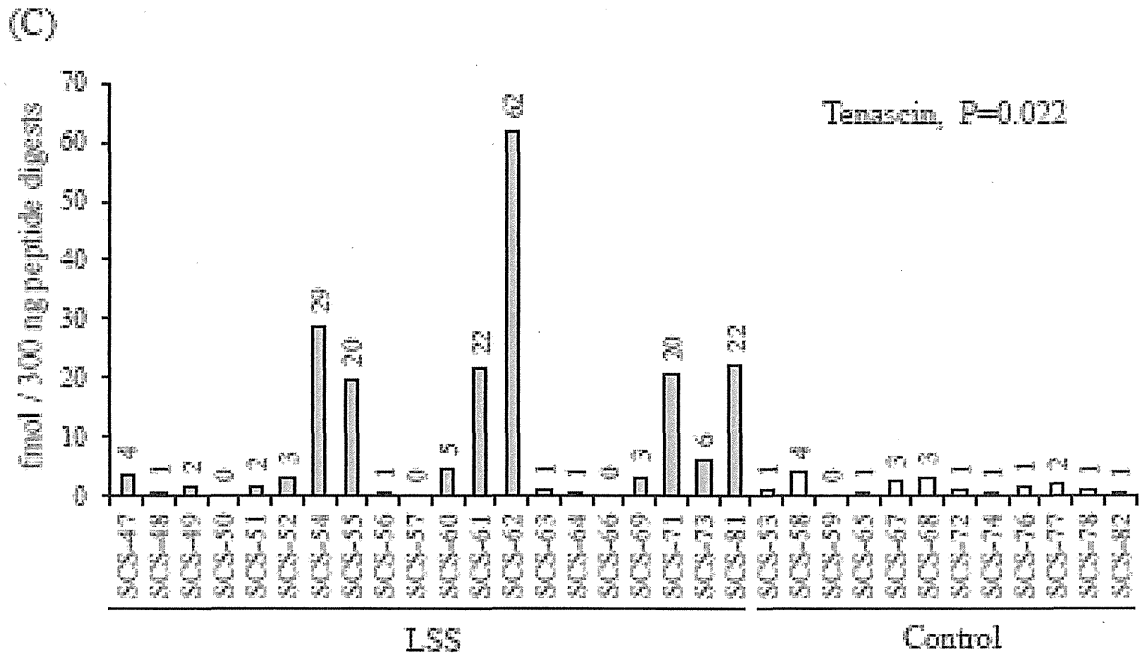
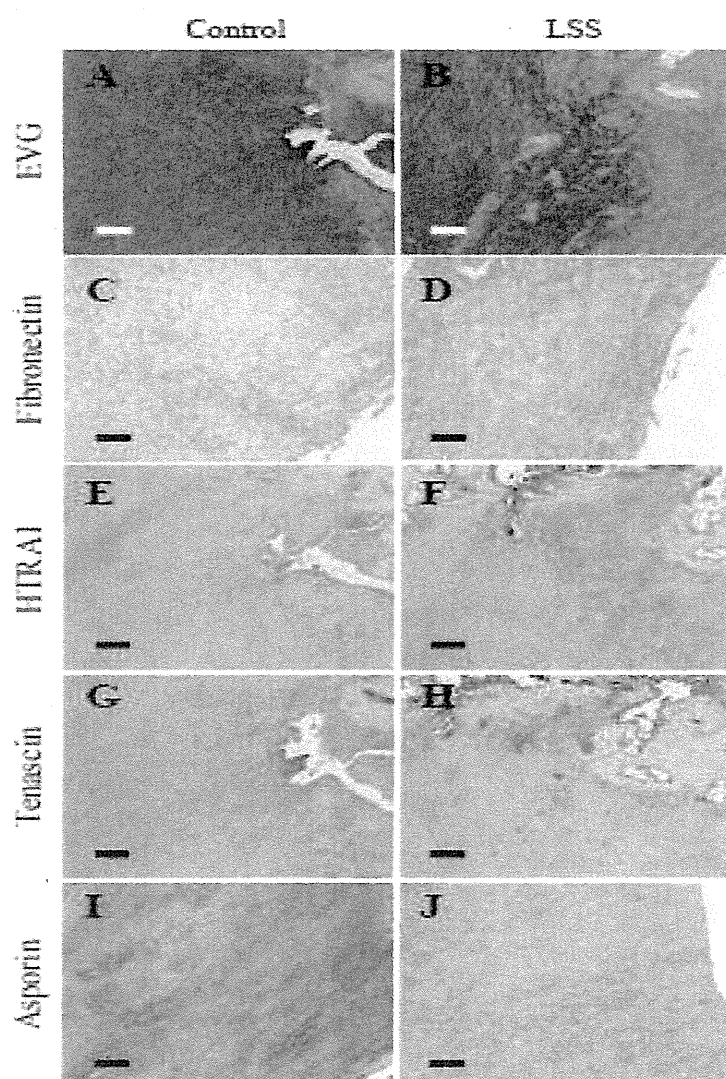


Figure 5. Immunohistochemical staining of differentially expressed proteins in ligamentum flavum (LF)

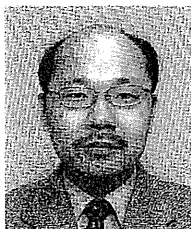
The fibers are oriented from the upper right to the bottom left of each panel. Left panels (A, C, E, G, and I) denote control LF samples; right panels (B, D, F, H, and J) denote LF samples obtained from LSS patients. (A and B) Elastica van Gieson (EVG) staining of elastic fibers. Peroxidase-mediated staining of fibronectin (panels C and D), HTRA1 (panels E and F), tenascin (panels G and H), and asporin (panels I and J). The bar inset (white in AB; black in others) represents 200 μ m.



Wiley - VCH

プロテオーム解析システム2DICALを用いた バイオマーカー開発

Biomarker discovery by proteome platform 2DICAL



尾野 雅哉

Masaya Ono

国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野

◎タンパク質は身体の大部分を構成し、代謝、増殖・分化、情報の伝達・制御といった生体反応の大半をつかさどっている。この総体であるプロテオームを解析することの重要性は周知のものであり、その解析手法の開発には大きな期待がもたれていた。著者らはプロテオーム情報を医学・生物学の分野で直接応用できるシステムとして2DICAL(2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)を開発し、膵がん患者血漿の解析から水酸化プロリン α フィブリノゲンをがん患者で上昇するバイオマーカーとして同定した。2DICALを用いたプロテオーム解析対象は、培養細胞、臨床標本(生検材料、手術材料)、ホルマリンパラフィン切片、免疫沈降(IP)産物など多岐にわたり、さまざまな医学・生物学の場面での応用が可能となっている。本稿では、2DICALを用いて開発してきた疾患バイオマーカーについて概説し、2DICALのさらなる応用を論じる。



Key word : プロテオーム、バイオマーカー、網羅的解析、2DICAL

タンパク質は身体の大部分を構成し、代謝、増殖・分化、情報の伝達・制御といった生体反応の大半をつかさどっており、この総体であるプロテオームを解析することの重要性は周知のものである。しかし、その解析の困難性・複雑性のためゲノム解析が先行されてきたが、2000年に入り技術の進歩とともにゲノム解析情報を利用したプロテオーム解析が本格的に開始された。著者らはこの黎明期に、質量分析計から産生されるプロテオーム情報を医学・生物学の分野で直接応用できるシステムとして2DICAL(2Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)を開発し、完成させた¹⁾。2DICALは質量分析計で示されるすべてのピークを解析対象とし、そのピーク強度をタンパク質量の代表値としてとらえ、多数のサンプル間での同一物質の定量比較を可能にしたものである。多数のサンプル間のタンパク質量を統計解析すること

により、サンプル間に存在するプロテオームの変動をとらえることが可能となった。著者らは2DICALを用いさまざまな疾患のバイオマーカー

サイド
メモ
1

ショットガンプロテオミクス

プロテオームの解析手法は、タンパク質をそのまま解析するトップダウンプロテオミクスと、タンパク質をタンパク質分解酵素でペプチド化し、質量分析計で解析した結果を統合してタンパク質の変化をとらえるショットガンプロテオミクスの大きく2つの方法に分かれる。タンパク質そのもので解析の方がより精度の高い結果が得られ、質量分析計の進歩によりトップダウンプロテオミクスの手法が発展しているが、現状ではショットガンプロテオミクスによる解析が主流である。また、リン酸化などの翻訳後修飾を解析するにはショットガンプロテオミクスが有用である。

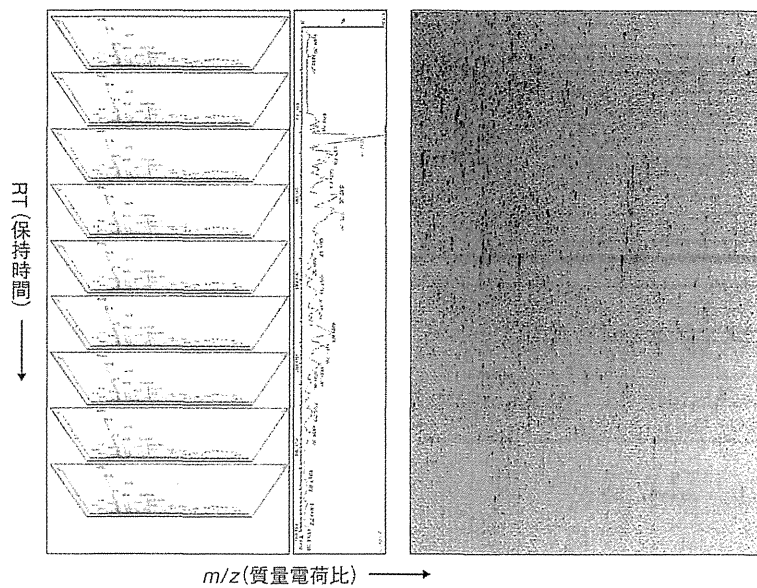


図 1 2DICALの基本画像¹⁾
各スペクトラムを結合し、質量電荷比(m/z)、保持時間(RT)をXY軸とし、ピーク強度を濃淡で表した二次元画像。

を開発してきた。

ショットガンプロテオミクス解析手法としての2DICAL

2DICALはショットガンプロテオミクスの解析手法(「サイドメモ1」参照)として開発され、質量分析計で多数サンプルを処理した際に得られるデータをさまざまな二次元画像に展開して解析するシステムである。その根幹となるのは各スペクトラムを結合し、質量電荷比(m/z)、保持時間(RT)をXY軸とし、ピーク強度を濃淡で表した二次元画像である(図1)。この処理により時間方向に分離されていた同一物質由来のピークが統合され、(m/z , RT)座標で指定されるピークとして物質を認識することが可能となった。さらに、サンプル間の質量電荷比、保持時間の再現性を確保するアルゴリズムの開発により各サンプルに存在する同一ピークの同定を可能にした。2DICALにより同定されたピークは強度としての定量値をもつため、各サンプルの同一ピークの統計学的処理を行うことにより、群分けされたサンプル間での有意なピークを選択することが可能となる。また、このピークはタンデムマス(「サイドメモ2」参照)

を行うことにより翻訳後修飾を含めたペプチド配列として同定され、由来するタンパク質が同定される。質量分析計で測定された膨大なショットガンプロテオミクスデータから選別されたピークそのものはバイオマーカーとして扱うことは可能であるが、このピークがタンパク質として認識されることによりバイオマーカーとしての応用範囲が広がっていく。

サイドメモ2

タンデムマス

MSMS(エムエスエムエス)ともよばれ、質量分析計に導入されたひとつのペプチドにエネルギーを加え破断し、その破断された分子のスペクトラムを獲得する。質量分析計で行われる作業である。この破断された分子にはそのペプチドを構成するアミノ酸の部分集団が含まれているため、その部分集団の分子量を統合的に解析することにより破断されたペプチドのアミノ酸配列が決定される。この決定されたアミノ酸配列をデータベースに照合することにより、このペプチドの由来(parent)タンパク質を決定することができる。

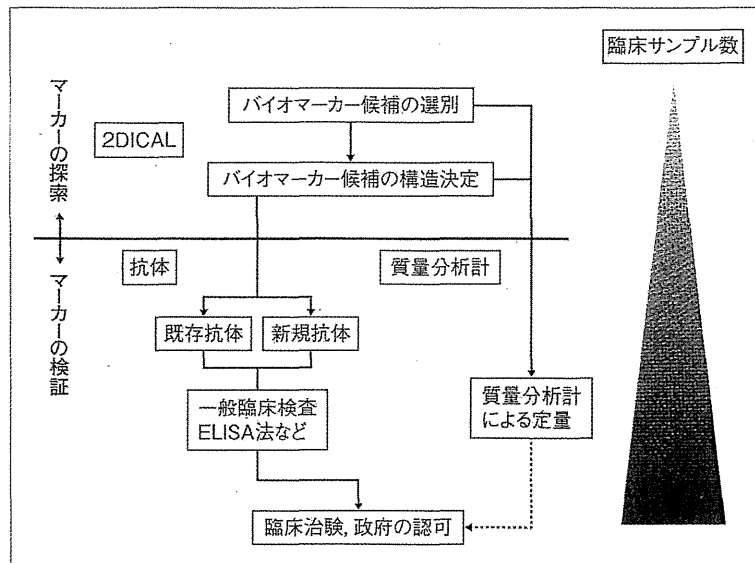


図2 バイオマーカー開発のプロトコール

探索過程では2DICALを用いてバイオマーカー候補を選別し、検証過程では多数症例が測定可能な検査法を用いてバイオマーカー候補を検証する。

● 血漿バイオマーカー

バイオマーカーの開発は無数にある生体物質から有用な物質を見つけ出す探索の過程と、みつけ出された物質が真に臨床的に有用であるか調べる検証の過程に大きく分けられるが、2DICALはバイオマーカーの探索のために用いられる。一般的には探索過程では少ないサンプルの検討から多数のバイオマーカー候補を拾いだし、検証過程において絞り込まれたバイオマーカー候補を多くのサンプルで確かめることになるが、2DICALは多数のサンプルの解析が可能であるため、探索過程においてバイオマーカー候補がかなりの程度まで絞り込めるのが特徴である³⁾(図2)。

1. 水酸化プロリン α -フィブリノゲン

膵がんに関連するバイオマーカー開発のため、膵がん患者43例と健常人43例の血漿をコンカナバリンAで処理した後に2DICALで解析したところ、膵がん患者と健常人との間で大きな有意差を有するピークを見出した。詳細な質量分析計での解析を行い、このピークはプロリン残基が4-水酸化プロリンに翻訳後修飾された α -フィブリノゲンのペプチド断片であることが判明した。この修飾ペプチドに対する抗体を新規に作成し、水酸化プロリン α -フィブリノゲンが血漿

中に存在していることと膵がん患者で健常人に比較し増加していることを、膵がん患者血漿160例と健常人血漿113例を用いて検証した³⁾。

2. ケモカインリガンド7(CXCL-7)

膵がんバイオマーカー開発のために、中空糸膜を用いて高分子タンパク質を除去した膵がん患者24例と健常人21例の血漿を2DICALで解析したところ、膵がん患者と健常人との間で差のあるタンパク質としてケモカインリガンド7(CXCL-7)が認められた。CXCL-7には既存の抗体が存在したため、Western blotで血漿中の変動を確認し、膵がん患者血漿140例と健常人血漿87例を用いて、CXCL-7が膵がん患者血漿において有意に($p=1.40 \times 10^{-16}$)低下していることを検証した⁴⁾。

3. アディポフィリン

大腸がんバイオマーカー開発のために、前記と同様の中空糸膜を用いた処理を施した大腸がん患者22例と健常人21例の血漿を2DICALで解析したところ、大腸がん患者と健常人との間で差のあるタンパク質としてアディポフィリンが認められた。アディポフィリンにも既存の抗体が存在したため、Western blotで血漿中の変動を確認し(図3)、大腸がん患者血漿127例と健常人血漿196例を用いてアディポフィリンが大腸がん患者血漿に

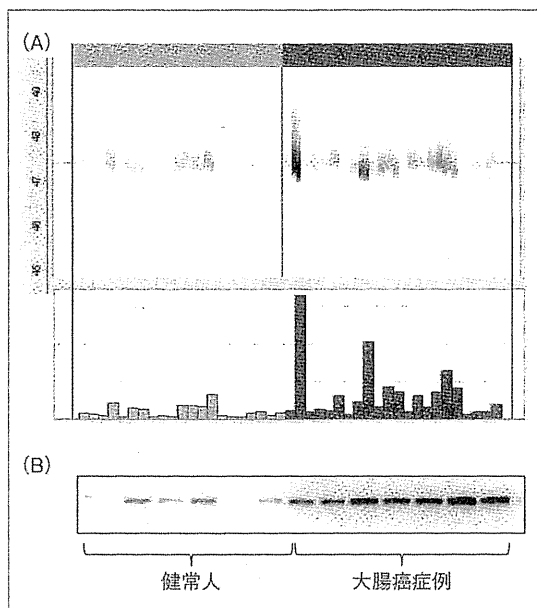


図3 アディポフィリン⁵⁾

大腸がん患者血漿の2DICALによる解析で、アディポフィリンの発現亢進が認められた(A)。アディポフィリンに対する抗体を用いたWestern blotにより、その発現亢進を確認した(B)。

において有意に($p=5.49 \times 10^{-10}$)上昇していることを検証した⁵⁾。

4. フィブロネクチン

腎がんバイオマーカー開発のために、血中に豊富に存在する、アルブミンを含めた20種類のタンパク質を除去した腎がん患者20例と健康人16例の血漿を2DICALで解析したところ、フィブロネクチンが健康人に比べ腎がん患者で有意に増加するタンパク質として認められた。腎がん患者血漿77例と健康人血漿130例、および前立腺がん患者血漿20例を用いて検証したところ、フィブロネクチンは健康人に対して($p=1.87 \times 10^{-7}$)も、前立腺がん患者に対して($p=5.33 \times 10^{-3}$)も有意に上昇していることが確認された⁶⁾。

5. ハプトグロビン

膵がんに対するゲムシタピン単剤による化学療法の血液毒性副作用を予測できるマーカーの開発のため、強い副作用のあった25症例と副作用のなかった22症例のゲムシタピン治療前血漿を2DICALで解析したところ、両者間できわめて大きな差のあるピークとしてハプトグロビンのペプ

チド断片を見出した。ゲムシタピン治療を受けた膵がん患者305症例の治療前血液検体のハプトグロビン値を臨床一般検査であるネフロメトリー法で計測したところ、ハプトグロビン値が低い症例でゲムシタピン治療による副作用が多く現れることが検証された⁷⁾。

● 組織を用いたバイオマーカーの探索

初期の質量分析計での解析は、血液などのタンパク質が溶解された状態でのサンプルに限られていた。これは、サンプルの可溶化のための界面活性剤の混入が質量分析計での測定に不都合をきたすためであるが、sodium deoxycholate(SDC)を用いることにより界面活性剤が混入することなく質量分析計による計測が可能となったため⁸⁾、現在では培養細胞、臨床標本(生検材料、手術材料)、ホルマリンパラフィン切片、免疫沈降(IP)産物など多岐にわたるサンプルが解析されている(図4)。

上記手法を用い、腎がんの手術材料を用いたプロテオーム解析を行ったところ、腎がんでは解糖系にかかわる一連の酵素群が上昇していることが認められた。また、腎がんで有意に上昇するその他の酵素活性を有するタンパク質も見出されており、がんに対する創薬標的となりうる可能性を示していた。また、脊柱管狭窄症患者と椎間板ヘルニア症患者の黄色靭帯の比較解析も行ったところ、両者間で変動するタンパク質から脊柱管狭窄症の発症、進展にかかわる可能性のあるタンパク質を同定することができた。組織のプロテオーム解析は疾患の予後や進展を予測するバイオマーカー開発に有用になっていくと推察される。

● 2DICALの応用

培養細胞やIP産物を解析できるようになり、2DICALは広く細胞生物学の分野で応用されるようになってきた。会合タンパク質の発見や変動する未知タンパク質の発見、標的タンパク質のリン酸化部位の発見など、多くの共同研究者との成果が生まれている⁹⁻¹⁴⁾。

また、2DICALを用いた多数サンプルの比較解析は薬剤投与によるプロテオーム変化を継時的・かつ網羅的に観察することにきわめて有用であ

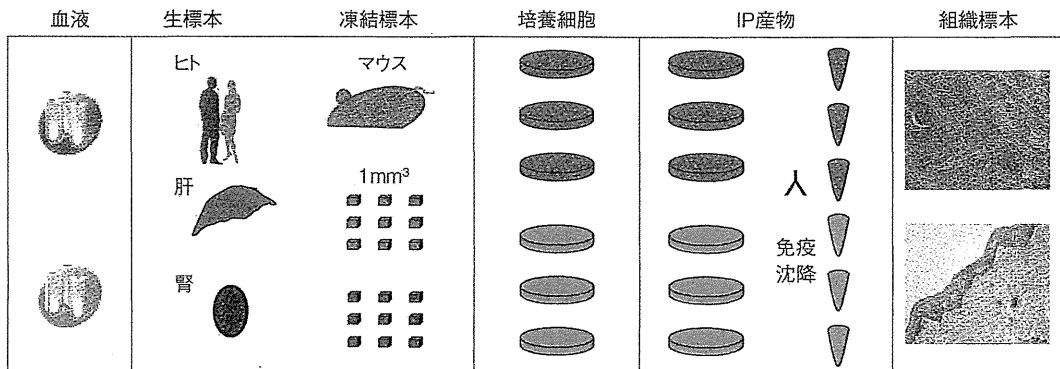


図4 解析対象となる生物試料

培養細胞、臨床標本(生検材料、手術材料)、ホルマリンパラフィン切片、IP産物など多岐にわたるサンプルが解析対象となる。

る。この手法を用いると、薬剤投与で変動するタンパク質やリン酸化部位の変化を一括にとらえることができ、より効果のある薬剤の開発や薬剤耐性のメカニズムの解明に役立つことが期待される。

おわりに

タンパク質においても網羅的解析が可能になり、ゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・メタボロームなどの他のオミックス情報との統合した解析への展開が予想され、莫大な情報を効率よく解析するシステムの開発が大きな焦点となってくる。著者らは、2DICALを基盤として他のオミックスデータを関連づけるシステムの構築が、つぎなるステップであるにとらえている。このような技術開発は生命を全分子で説明することを可能とし、より有用な診断治療法の開発につながっていくものと期待される。

文献

1) Ono, M. et al. : *Mol. Cell Proteomics*, **5** : 1338-1347,

2006.
2) Ono, M. et al. : *Int. J. Proteomics*, **2012** : 897412, 2012.
3) Ono, M. et al. : *J. Biol. Chem.*, **284** : 29041-29049, 2009.
4) Matsubara, J. et al. : *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **20** : 160-171, 2011.
5) Matsubara, J. et al. : *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **20** : 2195-2203, 2011.
6) Yokomizo, A. et al. : *Cancer Biomarkers.*, **10** : 175-183, 2012.
7) Matsubara, J. et al. : *J. Clin. Oncol.*, **27** : 2261-2268, 2009.
8) Masuda, T. et al. : *J. Proteome Res.*, **7** : 731-740, 2008.
9) Kagami, Y. et al. : *J. Cell Biology*, **205** : 781-790, 2014.
10) Taira, N. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111** : 717-722, 2014.
11) Singh, S. K. et al. : *Nat. Commun.*, **4** : 1830, 2013.
12) Takahashi, R. U. et al. : *Sci. Rep.*, **3** : 2474, 2013.
13) Miyamoto, T. et al. : *Sci. Rep.*, **2** : 379, 2012.
14) Fukawa, T. et al. : *Cancer Res.*, **72** : 5867-5877, 2012.

* * *

特

集

大腸癌のバイオマーカー

Gastrointestinal
Research

LCMS 解析手法 2DICAL を用いた 大腸癌関連マーカーの開発

尾野雅哉* 齋藤 豊** 山田康秀***

Summary

われわれは質量分析計を用いてタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスの解析手法として 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography mass spectrometry) を開発し、さまざまな医学、生物学の分野で活用してきた。本稿では、本技術を用いてこれまで開発してきた大腸癌関連バイオマーカーについて解説するとともに、本技術で解析したアデノーマ カルチノーマ シークエンスにおけるプロテオームの変化と、大腸癌遺伝子変異に伴うプロテオームの変化について概説する。

Key words

2DICAL プロテオミクス 大腸癌 バイオマーカー
アデノーマ カルチノーマ シークエンス

はじめに

大腸癌は内視鏡による肉眼診断で発見され、手術手技を用いて肉眼的に切除される症例がほとんどである。このような肉眼 (マクロ-macro) 的行為は、癌の確定診断や癌の拡がり、根治手術の判断をおこなう顕微鏡 (ミクロ-micro) 的観察の上に成り立っている。細胞、組織が織り成す複雑な形態の観察から大腸癌の病理病態を診断するが、組織、細胞はイオンなども含めた分子 (モレキュール-molecule) から構成されている。マクロ、ミクロ、モレキュールの 3つの M が一体となって正しい病態の把握と治療が可能となるが、現時点で

はモレキュールの情報は不十分であるといえる。Watson ら¹⁾による DNA の二重らせん構造の発見から DNA を中心とした分子生物学は飛躍的に発展し、医学、生物学に多大な貢献を果たしてきた。しかし、DNA は一つの細胞を動かすプログラムであり、生命の活動を実際に動かすのは DNA から作り出された物質であり、外界物質との相互作用である。そのような物質のなかで、タンパク質は身体の大部分を構成し、生体反応の大半を司っており、その知見を増大させることは古くからの課題であったが、2000年に入り、ゲノム解析情報を利用したタンパク質総体 (プロテオーム) を解析する技術が進歩し、プロテオームの解

*ONO Masaya/独立行政法人国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野、**SAITO Yutaka/独立行政法人国立がん研究センター中央病院内視鏡科、***YAMADA Yasuhide/独立行政法人国立がん研究センター中央病院消化管内科



析（プロテオミクス）が本格的に開始された。われわれ²⁾は、質量分析計（mass spectrometer: MS）から産生されるプロテオーム情報を医学・生物学の分野で直接応用できるシステムとして 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry) を開発し、さまざまな医学、生物学の分野で活用してきた。本稿では、本技術を用いてこれまで開発してきた大腸癌関連バイオマーカーについて解説するとともに、本技術で解析したアデノーマカルチノーマ シークエンスにおけるプロテオームの変化と、大腸癌遺伝子変異に伴うプロテオームの変化について概説する。

1 ■ LCMS 解析手法 2DICAL

LCMS は液体クロマトグラフィー (liquid chromatography: LC) で分離された物質を MS により測定する手法であるが、MS はさまざまな生体物質（タンパク質、脂質、糖質、代謝産物）を解析することが可能である。MS の歴史は、19 世紀前半、マイケル・ファラデー博士らの研究に源をたどることができるが、Thomson³⁾によって MS で物質がスペクトラムとしてはじめて捉えられたのは 1912 年である。その後、さまざまな技術開発がなされたが、Tanaka⁴⁾、Fenn^ら⁵⁾の研究により高分子物質の測定が MS によって可能になり、同時に、全ゲノム情報を利用して MS で得られるスペクトラムがタンパク質配列に容易に変換可能となったため、MS によるプロテオミクスが飛躍的な発展を遂げた。われわれは MS のすぐれた能力を生かすために、多数検体が扱え、膨大な情報から有用な物質を選択できる解析システム 2DICAL を開発した。

2DICAL はショットガンプロテオミクスの解析手法として開発され、MS で多数サンプルを処理した際に得られるデータを、質量電荷比 (m/z)、保持時間 (RT)、ピーク強度 (Intensity)、サンプル (Sample) の 4 つの要素からなるものとして捉

え、さまざまな 2 次元画像に展開して解析するシステムである (図 1)。その根幹となるのは各スペクトラムを結合し、 m/z 、RT を XY 軸とし、ピーク強度を濃淡で表した 2 次元画像の合成である。この処理により、時間方向に分離されていた同一物質由来のピークが統合され、(m/z , RT) 座標で指定されるピークとして物質を認識することが可能となった。さらに、サンプル間の質量電荷比、保持時間の再現性を確保するアルゴリズムを開発することにより、各サンプル間で同一物質が正確に比較できるようになり、多数サンプルのショットガンプロテオミクスの解析を容易にした。

2 ■ 大腸癌腫瘍マーカーの探索

バイオマーカーの開発は、無数にある生体物質から有用な物質を見つけ出す探索の過程と見つけ出された物質が真に臨床的に有用であるか調べる検証の過程に大きく分けられるが、2DICAL はバイオマーカーの探索のために用いられる⁷⁾。2DICAL の解析により得られた多数のピークのなかから、群分けした症例間で U-test、ROC などの統計手法を用いて有意なピークを選択し、タンデムマス測定をおこなうことによりアミノ酸配列を決定し、マーカーとしてのタンパク質を同定する⁹⁾。

1) アディポフィリン

サンプルは倫理要件を満たして採血された大腸癌患者 22 症例と健常者 21 症例の血漿を用いた。血液サンプルに存在するアルブミンなど大量のタンパク質が MS での計測の障害になるため、不要なタンパク質を除去する、または、必要なタンパク質を濃縮する前処理が必要となる。今回は中空糸膜を用いて高分子タンパク質を除去する前処理法を採用した。前処理した血漿サンプルを LCMS で計測し、2DICAL で解析したところ、大腸癌患者と健常者とのあいだで有意差のあるピークが存在した。このピークのタンデムマス解析をおこない、アミノ酸配列を決定したところアディ

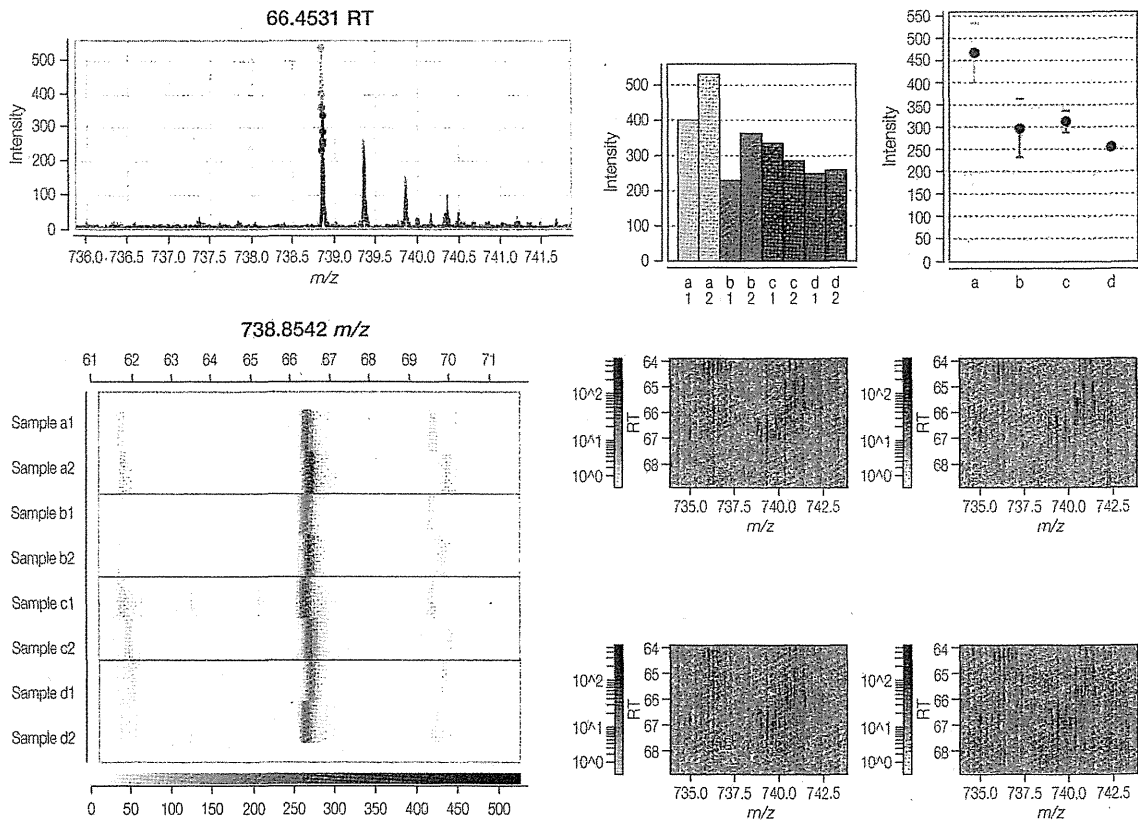


図 1. さまざまな 2 次元画像に展開された 2DICAL データ
質量電荷比 (m/z), 保持時間 (RT), ピーク強度 (Intensity), サンプル (Sample) の 4 つの要素を組み合わせた座標軸で展開したさまざまな 2 次元画像.

(1 頁カラー図譜参照)

ポフィリン由来のペプチドがあることが同定された。アディポフィリンに対する既存の抗体が存在したため、ウエスタンブロットで血漿中の変動を確認し、大腸癌患者血漿 127 例と健常者血漿 196 例を用いて、アディポフィリンが大腸癌患者血漿において有意に ($p=5.49 \times 10^{-10}$) 上昇していることを検証した。さらに、大腸癌切除標本をアディポフィリンで免疫染色したところ、大腸癌で発現していることが確認された (図 2)¹¹⁾。

2) 補体 C9

サンプルは特定の地域で前向きに採取された大腸癌患者 31 症例と、年齢・性を一致させた健常者

59 症例の血漿を用いた。血液中に大量に存在する 12 種類のタンパク質を除去するカラムを用いて血漿の前処理をおこない、LCMS 測定をおこなった。2DICAL で解析したところ、大腸癌患者と健常者とのあいだで有意差のあるピークを見出すことができた (図 3)。このピークに対してタンデムマスの測定をおこない構造決定すると、このピークは補体 C9 のペプチド断片であることが判明した。補体 C9 に対する抗体を用いた検査法で 345 症例の血漿検体を解析したところ、健常者に比較し、大腸癌患者で補体 C9 が上昇していることが検証された¹²⁾。

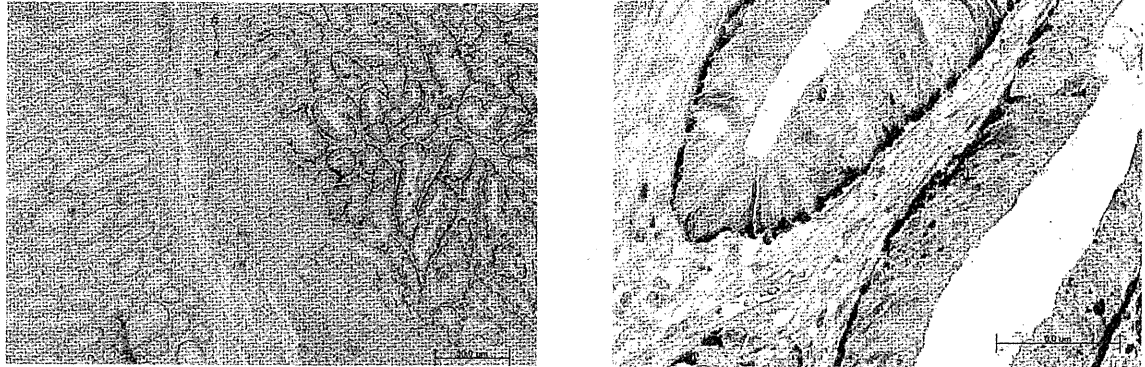
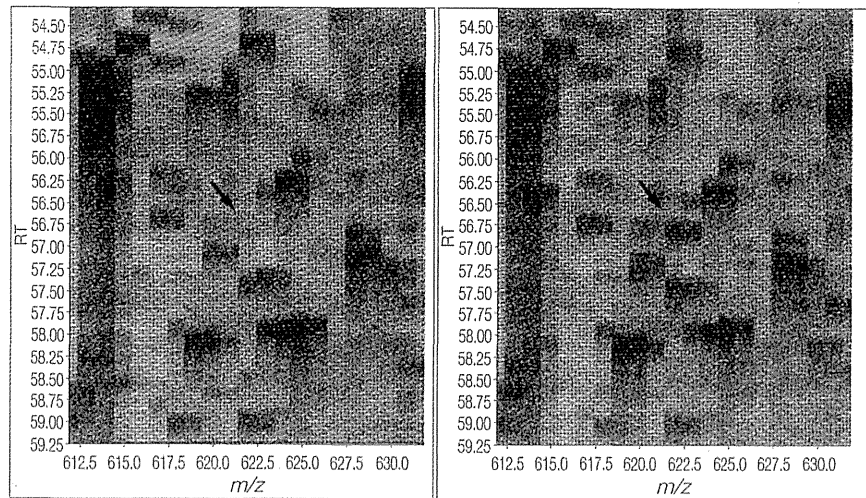


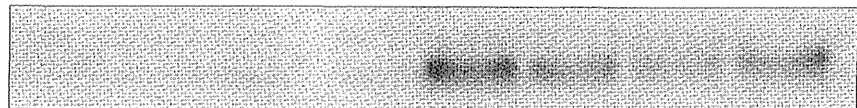
図 2. アディポフィリンによる大腸癌組織免疫染色
アディポフィリンは正常大腸腺管には発現せず、大腸癌で発現を認めた。
(Matsubara J *et al.* 2011¹¹⁾より引用)(1 頁カラー図譜参照)



健常者

大腸癌患者

補体C9



α 2-マクログロブリン

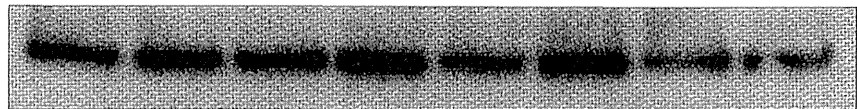


図 3. 大腸癌患者、健常者間で有意差を示すピーク
2DICAL の 2 次元画像上の矢印で示されたピークが、健常者と大腸癌患者で差を示した。補体 C9 が健常者と大腸癌患者で発現に差があること抗体を用いて確認した。

(Murakoshi Y *et al.* 2011¹²⁾より引用)

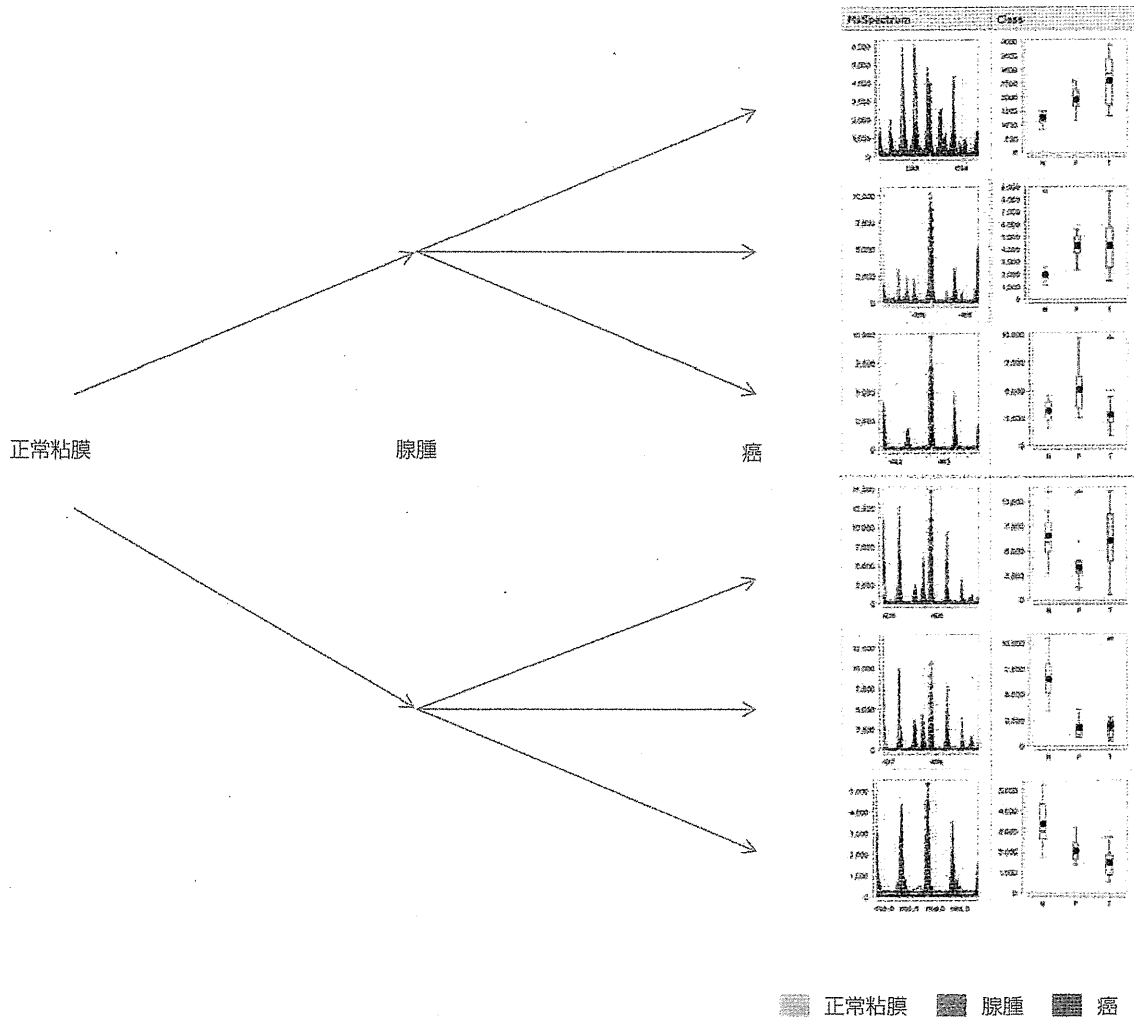


図 4. 正常粘膜, 腺腫, 癌におけるタンパク量の変化パターン

タンパク量の変化の概念図と 2DICAL で測定されたタンパク量の変化を示す。

(2 頁カラー図譜参照)

3 2DICAL を用いた大腸癌関連マーカー開発の展望

1) アデノーマ カルチノーマ シークエンスにおけるプロテオームの変化

Muto ら¹³⁾によって提唱された大腸癌は腺腫を基盤として癌に進展 (evolution) していくアデノーマ カルチノーマ シークエンス (adenoma-carcinoma sequence) の概念は、遺伝子変異の蓄

積による多段階発癌の研究へと発展した¹⁴⁾。このプロセスにおいてプロテオームはどのように変化するかを明らかにするために、生検にて採取された大腸正常粘膜 17 例, 腺腫 17 例, 癌 15 例の組織標本を 2DICAL で解析した。正常粘膜から腺腫への段階で変化し、腺腫から癌への段階では変化がない、または、変化の方向性が違うものが腺腫に特徴的なものであり、正常粘膜から腺腫、腺腫から癌への変化が同一方向にあるもの、または、



癌ではじめて変化してくるものを癌に特徴的なものであると捉え、正常粘膜、腺腫、癌のタンパク量を変化するパターンで分類した(図4)。2DICALにより5,043のタンパク質が検出され、腺腫の段階で発現が上昇しているタンパク質は553あり、そのなかで癌になると減少する。または、変動のないタンパク質は144あった。腺腫の段階で発現が減少しているタンパク質は200あり、そのなかで癌になると上昇する。または、変動のないタンパク質は105あった。腺腫の段階で上昇するタンパク質はRNA合成や代謝にかかわるものが多く含まれていた。

2) 遺伝子変異に伴うプロテオームの変化

大腸癌においてはさまざまな遺伝子変異が認められ、それらの変異に応じた治療法が選択されてきている¹⁵⁾。遺伝子変異がもたらすプロテオームの変化を明らかにするためにPIK3CA遺伝子変異について大腸癌組織を用いて解析した。Stage III大腸癌の遺伝子変異を検討し、PIK3CA遺伝子変異のあった19例に対し、KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CAすべての遺伝子で変異のなかった17症例を対照として、プロテオームの変化を2DICALで解析した。2,770のタンパク質が検出され、PI3K-AKTシグナル経路、核酸代謝にかかわるタンパク質がPIK3CA遺伝子変異のある大腸癌で発現が亢進していることが確認された。

おわりに

分子レベルの癌関連マーカーを探索するのは、正確な癌の診断と有効な治療をおこなうためである¹⁶⁾。癌は遺伝子の異常で起こり、それに起因するさまざまな分子変化が生じ、制御不可能な状態が生体内で起こる病態である。車に例えるなら、運転手が何らかの障害を起こし、車が暴走している状態である。この場合、暴走を止めるためには運転手を治療するより、暴走する車の機能を停止させて止めるほうが効果的である。それは、癌の

遺伝子治療を臨床応用できない現況と類似する。車の暴走を止めるために、エンジンを壊す、タイヤを破壊するなど、走ることに直接かかわる機関を攻撃するように、プロテオミクスは細胞の暴走を担う一連のタンパク質を突き止め、その暴走を止める方法を発見できる可能性がある。

生命を担う分子の動きを知り、病気における分子やその動態の変化を症例ごとに解析することが可能になることで、正確な癌診断と確実な癌治療がおこなえる時代が到来することを期待する。

文献

- 1) Watson JD, Crick FH: Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738, 1953
- 2) Ono M, Shitashige M, Honda K *et al*: Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 5: 1338-1347, 2006
- 3) Thomson JJ: Rays of positive electricity and their application to chemical analyses. Longmans, Green and Co., London, 1913
- 4) Tanaka K, Waki H, Ido Y *et al*: Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2: 151-153, 1988
- 5) Yamashita M, Fenn JB: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* 88: 4451-4459, 1984
- 6) Fenn JB, Mann M, Meng CK *et al*: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71, 1989
- 7) 尾野雅哉, 山田哲司: プロテオーム・糖鎖を利用した診断. 実験医学増刊 分子レベルから迫る癌診断研究~臨床応用への挑戦~, 中村祐輔監, 羊土社, 東京, 2007, pp. 2714-2722
- 8) 尾野雅哉, 佐藤礼子, 下重美紀ほか: 癌診断治療のバイオマーカー. *Cancer Fronti* 10: 14-20, 2008
- 9) 尾野雅哉, 紙田正博, 松原淳一ほか: プロテオーム解析によるがん診断と治療への道. 分子消化器病 9: 365-370, 2012

- 10) Ono M, Kamita M, Murakoshi Y *et al* : Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL : 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Int J Proteomics* **2012** : 897412, 2012
- 11) Matsubara J, Honda K, Ono M *et al* : Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20** : 2195-2203, 2011
- 12) Murakoshi Y, Honda K, Sasazuki S *et al* : Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci* **102** : 630-638, 2011
- 13) Muto T, Bussey HJ, Morson BC : The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **36** : 2251-2270, 1975
- 14) Pino MS, Chung DC : The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138** : 2059-2072, 2010
- 15) 日本臨床腫瘍学会 *KRAS* 遺伝子変異検討小委員会 : 大腸がん患者における *KRAS* 遺伝子変異の測定に関するガイドンス 第1版. 医のあゆみ **228** : 1242-1247, 2009
- 16) 尾野雅哉 : 腫瘍マーカー温故知新. がん転移 臨床と研究の羅針盤. 丸義朗監, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2010, pp.22-26