

# プロテオミクスの現状と将来

—国立がんセンターにおける試み—

## Strategy of the Cancer Proteomics Project in National Cancer Center

やま だ てっ し  
山 田 哲 司  
Tesshi YAMADA

### はじめに

ヒトゲノム解読の完了が宣言され、完全にポストゲノム時代となった。ヒトゲノムの全情報が自由に誰でも机上のパーソナルコンピュータから取り出せる時代である。がんは点突然変異、遺伝子増幅、欠失などの塩基配列の変化（ジェネティックな変化）あるいは塩基配列の変化を伴わないメチル化などのエピジェネティックな変化によるいくつかのがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の機能異常が蓄積することによって起こる疾患であることは、今日ほぼ間違いないと考えられている。事実1980年代後半から1990年代にかけて、遺伝子解析技術の急速な進歩に伴い、実際のがんで蓄積している遺伝子変化が多数同定されてきた。しかしヒトゲノムプロジェクトの終了によって、自動的にがんの発生、浸潤・転移、治療抵抗性などのメカニズムが明らかになり、治療法が開発されることにはならない。ヒトが持つ遺伝子のほぼすべての塩基配列が同定されたといっても、これはすべての単語を網羅した辞典を手に入れたに過ぎない。分厚い英和辞典があればシェークスピアが解読できるとは誰も思わない。

約3万弱あると推定されているヒトの遺伝子から alternative splicing によっておそらく数十万種の mRNA が作られる。mRNA からペプチド鎖が形成された後も特定のプロテアーゼによる切断、リン酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾、ユビキチン化や SUMO 化に伴い生じる分解にて多種多様に変化したタンパク質が生じ、量が変わる（図1）。さら

にタンパク質が実際に機能するためには、細胞内の特定の部位に局在し、複数のタンパク質が複合体を形成する必要がある（図1）。例えばがん遺伝子のひとつである  $\beta$ -catenin タンパク質は細胞接着分子 cadherin と結合し、その裏打ちタンパク質として働く場合と、転写因子 T-cell factor/Lymphoid enhancer factor と結合し、核内で転写活性化因子として働く場合で機能が異なる<sup>1)</sup>。このように遺伝子の機能異常に伴いダイナミックに変化するさまざまなタンパク質の発現量、細胞内局在、翻訳後修飾、他のタンパク質との相互作用などが、がんの発生や浸潤・転移、治療抵抗性などの実際の病態を引き起こすものと考えられる。またこうしたタンパク質の特性が分子治療の標的となると考えられる。

プロテオーム (proteome) とはゲノム (genome) から派生した言葉であり<sup>2)</sup>、特定の細胞・組織・器官でゲノムに制御され、特定の条件下で発現されるタンパク質全体をさし、プロテオームを対象とする

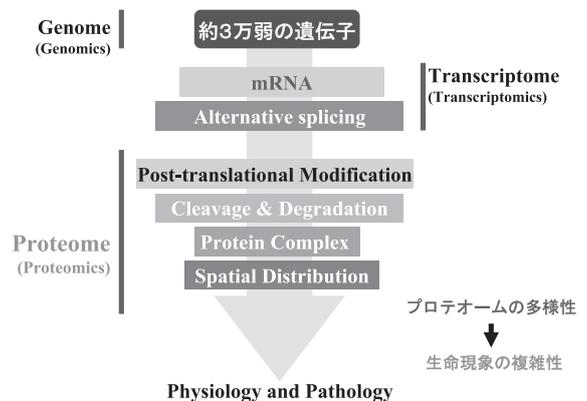


図1 プロテオームの複雑性

学問がプロテオミクス (proteomics) である。特にタンパク質の機能や疾病との関わりを明らかにするプロテオーム研究が注目を集めている。本稿では国立がんセンター研究所において行われている臨床応用を目指したプロテオーム研究について中心に紹介する。

## I. 国立がんセンター研究所腫瘍プロテオミクスプロジェクトの開設

プロテオームを網羅的に解析する手段は cDNA マイクロアレイ技術にて画期的に進歩した遺伝子発現解析に比べれば、かなり不十分である。特に多数の遺伝子の変異が蓄積し、複雑なゲノム異常を来した進行がんのプロテオーム解析は非常に困難であることが予測される。そこで近年急速に進歩した質量分析などのプロテオーム解析技術を改良し、これまでがん克服新 10 年戦略などで蓄積されたがんのゲノムの異常に関する知見を分子創薬や診断法の開発に結びつけるため、国立がんセンター研究所では平成 13 年 4 月より厚生労働省が実施するメディカル・フロンティア戦略のうち、「タンパク質科学研究によるがん対策・創薬等推進事業」を担当し、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構 (現・独立行政法人医薬品医療機器総合機構) と共同研究を行うこととなった。腫瘍プロテオミクス・プロジェクト (Cancer Proteomics Project) はこの事業の中心

として、同研究所の地下 1 階のフロアーのほぼ全体を改修して、新たに設けられた部署である。研究所の化学療法部や病理部と密接に連携して、Amersham Biosciences 社の 2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) 法による定量性の高い 2 次元電気泳動 (図 2), CIPHERGEN 社のプロテインチップシステムを用いた低分子タンパク質とペプチドのプロファイリング (図 3), 免疫沈降法やピアコアを用いたタンパク質複合体の解明, 免疫組織染色によるスクリーニングをロボット化した独自のモノクローナル抗体作製システムなどを用いて、がんの発生, 浸潤・転移などの病態の分子機構解明, 治療標的分子の同定, がんの早期診断・病態診断に有用な腫瘍マーカーの開発などを目的に研究を行っている (<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/p03prms/p03prms.html>)。

## II. 2D-DIGE 法

検出波長の異なる蛍光色素 (Cy3 と Cy5) で標識した 2 種のタンパク質を混和し、2 次元ゲルで分離・定量するタンパク質発現解析法である。ダイナミックレンジが広く、高感度である蛍光色素の一般特性に加え、2D-DIGE 法では Cy3 で標識したタンパク質を内部コントロールに用いることで格段に 2 次元電気泳動の定量性と再現性が向上している。われわれはこの 2D-DIGE 法に改良を加え、統合的なプロ

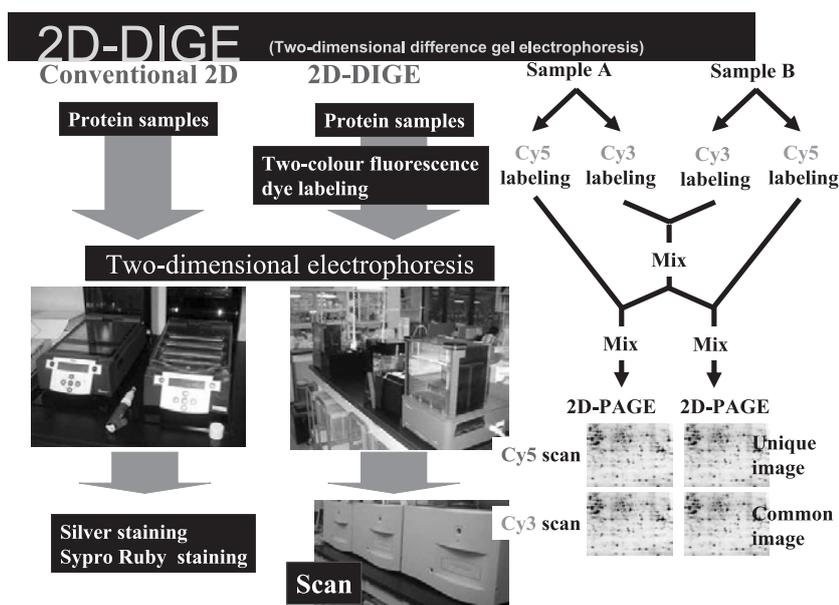


図 2 2D-DIGE 法による 2 次元電気泳動

テオーム発現解析システムを構築している。本システムの特徴は、1)上記の内部コントロールの使用により再現性と定量性に優れること、2)ゲル間の比較が半自動的に高速で行えること、3)1日24検体を処理でき、ハイスループット化に対応していることなどである。高感度な蛍光色素標識法を用いればレーザーマイクロダイゼクションにて得られたような微量のタンパク質も2D-DIGEにて解析可能である<sup>3)</sup>。

2次元電気泳動では高分子・疎水性のタンパク質や発現量の低いタンパク質の発現解析は困難であるが(図4)、遺伝子発現解析では得られなかったような鳥瞰的な所見が得られることがあきらかになった<sup>4)</sup>。また高分子タンパク質の検出を向上させるために1次元目の泳動にアガロースゲルを使用した報告もある<sup>5)</sup>。2次元電気泳動で観察されるスポット

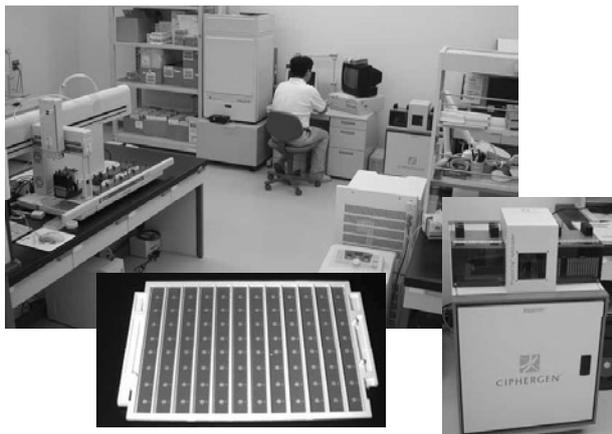


図3 CIPHERGEN社のプロテインチップシステムを用いた低分子タンパク質とペプチドのプロファイリング

に含まれるタンパク質の同定のためのゲルの切り出しはほぼ自動化している(図5)。ゲルからタンパク質そのままを抽出することは困難であるが、トリプシンなどの酵素を用いゲル内でタンパク質を断片化し、ペプチドとしてならゲルから容易に回収できる。得られた複数のペプチドの質量を主としてMALDI-TOF型の質量分析機(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)にて測定し(図6)、ゲノム情報などに基づいて作製されたタンパク質データベースと照合し、同定する方法をPMF(peptide mass fingerprinting)法と呼ぶ<sup>6)</sup>。

### Ⅲ. 液体クロマトグラフィーと質量分析(liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS))によるプロテオーム

図4にあるような2次元電気泳動法の問題点のうち、特に従来解析が困難であった細胞膜受容体などの疎水性部分を持つタンパク質、高分子タンパク質を解析でき、またタンパク質の同定までの全過程をほぼ自動化できる技術がLC-MSである。今後のプロテオーム解析の中心技術になっていくものと思われる。この方法ではトリプシンなどの消化酵素で粗精製のタンパク質混合物を断片化し、生じたペプチドフラグメントを通常複数種類のカラムを用いた多次元のクロマトグラフィーで分離し、直接ESI型の質量分析機(electrospray ionization mass spectrometry)にて解析する。酵素消化にてさまざまなタン

#### 2D-DIGEの問題点

##### 実験の面では

1. 2Dで解析できない(適さない)タンパク質
  1. 等電点が極端にアルカリ側(>10)または酸性側(<3)のタンパク質
  2. 疎水性のタンパク質(膜タンパク質)
  3. 高分子タンパク質(>100kD) APC、BRCA1/2はだめ。
  4. 微量なタンパク質(転写因子など)
2. 極端に特定のタンパク質に偏っている検体  
血清タンパク質(アルブミン)
3. スポットの同定  
微量なタンパク質の場合、ゲルからの抽出効率はかなり悪い。

##### 実用面では

1. 自動化ができない  
→多検体を泳動するためにはかなり時間がかかる  
専任オペレーターが必要
2. 解析ソフトの問題点  
ランドマークの設定、解析結果のチェックなどに膨大な時間がかかる
3. 高額なランニングコスト  
蛍光色素、人件費

図4 2D-DIGE法による2次元電気泳動の問題点

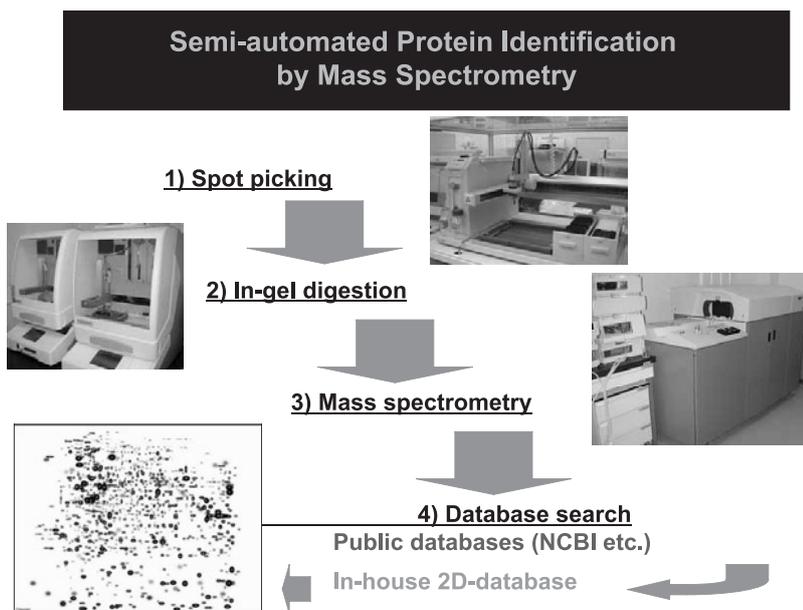


図5 ロボット化したゲル内消化システムとPMF法によるタンパク質同定



図6 MALDI-TOF型の質量分析機

パク質の物理化学的な性状をすべて均一にして網羅的に解析することから、ショットガン法とも呼ばれている。特に微小なカラムを用い、nl/minレベルの低流速で液体クロマトグラフィーから直接質量分析機に資料を導入することで、高感度が得られる<sup>7)</sup>。

従来LC-MS法は定量性に問題があったが、安定同位体による代謝標識<sup>8)</sup>やICAT (isotope-coded affinity tag) 法による化学標識<sup>9)</sup>を行うことで、定量的な解析も可能となった。

#### IV. プロテインチップ法による腫瘍マーカー開発

進行がんの治療は現在利用可能な医療技術では困難な場合が多く、高感度な検出方法を用いて微量のがんを発見し、早期に治療を開始することが患者の

Quality of life や予後の改善に必須であることは論を待たない。そのため多数の被験者からがん罹患者を効率よくスクリーニングできるがん検診技術の開発と整備が国民から強く要望されている。国立がんセンターでは平成16年2月よりがん予防・検診研究センターを開設し、既存のがん検診方法の検証と新しいがん検診技術の開発を行っている。がん予防・検診研究センターでは従来の放射線やエコー、内視鏡などに加えて、PET (positron emission tomography) によるがん検診を行っている。しかし施設と機器に膨大な経費がかかるため、がん検診の目的でPETが全国的に普及するかどうかは現時点では不明である。一方、血液中の腫瘍マーカーは、どこの病院や診療所でも容易に検体が採取できることから、大多数の被験者のスクリーニングに有利である。自己採血などによるがん診断キットも市販されるようになってきたが、その有用性は不明である。

現在腫瘍プロテオミクスプロジェクトはがんの早期診断のための腫瘍マーカー開発に特に力を入れている。腫瘍マーカーといえば、CEA (carcinoembryonic antigen) やCA19-9のように治療効果の判定や、再発の発見など限られた範囲で臨床に有用であるが、がんの早期発見には、前立腺がんにおけるPSA (prostatic specific antigen)<sup>10)</sup>以外に有用なマーカーはないというのが今までの常識であった。しかしこの医学常識が最近崩れつつある。米国のCIPHERGEN社のプロテインチップシステム (図3)

と Correlogic 社が開発したアルゴリズムを用いた多変量解析を用い、米国 NCI と FDA の共同で行われている Clinical Proteomics Project は治療可能性の高い Stage I の早期症例を含め、100%に近い正診率で卵巣癌が診断できたと報告している<sup>11)</sup>。この成果は米国のマスコミに大きく取り上げられ(図7)、注目を浴びているが、チップの消耗品が高価であり、またピークの解析ソフトが市販されていないため、国内では少数例を用いた散発的な研究しか行われていなかった。われわれはピーク同定の独自のアルゴリズムを開発し、またロボットシステムによる分画法を改良し、わずか20 $\mu$ lほどの血漿(血清)から約1,000の低分子タンパク質とペプチドを検出することができるようになっている。

### V. ロボット化したモノクローナル抗体作製システムとタンパク質アレイ

96穴マイクロタイタープレート内でアレイ化した小さな組織切片に対し、免疫染色を迅速に行えるロボットシステムを独自に開発した。がんの浸潤部や患者血清と反応する多数の抗体を分離し、病態の診断やスクリーニングへの応用を検討している。わ

れわれは膀胱がん細胞株を免疫源として、本システムを用いた大規模なスクリーニングで、膀胱がん患者血清と高率に反応する新しい8種の新規モノクローナル抗体を選択した。これらの抗体パネルを用いた血漿のタンパク質アレイで膀胱がん患者の98例中73例(74.4%)が陽性を示したが、健常人においても9.7%が陽性を示した(第62回日本癌学会総会記事)。膀胱がんは進行して発見された場合著しく予後が不良であり、早期発見の効果的な戦略が重要である。治療率を向上させるためには、現時点ではある程度の偽陽性があっても検出率を向上させる必要がある。本方法は偽陽性が高く、現状ではそのままではがん検診には使えないが、膀胱がん患者の高い検出率を示し、今後重要な診断法の1つになる可能性がある。

### VI. その他のプロテオーム解析技術

組織の凍結切片に直接レーザーをあて、レーザーが照射された局所にあるタンパク質の質量をMALDI-TOF MSで測定する方法が行われている。プロテオームの結果で肺癌の組織型や予後を判定できたと報告されている<sup>12)</sup>。



図7 プロテインチップに関する米国マスコミの報道

## おわりに

バイオテクノロジーの基礎研究の領域では近年急速な技術革新が行われ、cDNA マイクロアレイ法などのトランスクリプトーム技術や本稿で述べたプロテインチップ法、質量分析法、抗体・タンパク質マイクロアレイ法などのプロテオーム技術の臨床応用が期待されている。またバイオインフォマティクスの技術が進歩し、一見特異性のないように思われる数値データからも、診断に有用な情報が引き出せる可能性がでてきている。われわれはこれらの新技术を単なる基礎研究に終わらせないことが責務であると感じている。邦人がノーベル賞をとったことを機会に、日本独自の画期的なプロテオーム解析によるがん診断法を開発したいと思う。モダンメディア読者であられる全国の病院臨床検査部の皆様からの協力で、この目標を達成できればと願う。

## 文 献

- 1) Hirohashi S., and Kanai Y.: Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* **94**(7): 575-581. 2003 Jul.
- 2) Wasinger V.C., et al.: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* **16**(7): 1090-1094. 1995 Jul.
- 3) Kondo T., et al.: Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics.* **3**(9): 1758-1766. 2003 Sep.
- 4) Seike M., et al.: Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized  $\beta$ -catenin. *Cancer Res.* **63**(15): 4641-4647. 2003 Sep.
- 5) Oh-Ishi M., et al.: Preparative two-dimensional gel electrophoresis with agarose gels in the first dimension for high molecular mass proteins. *Electrophoresis.* **21**(9): 1653-1669. 2000 May.
- 6) Henzel W.J., et al.: Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom.* **14**(9): 931-942. 2003 Sep.
- 7) Kaji H., et al.: Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 2003 Jun; **21**(6): 667-672. Epub 2003 May 18.
- 8) Oda Y., et al.: Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(12): 6591-6596. 1999 Jun 8.
- 9) Gygi S.P., et al.: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* **17**(10): 994-999. 1999 Oct.
- 10) Soderdahl D.W., and Hernandez J.: Prostate cancer screening at an equal access tertiary care center: its impact 10 years after the introduction of PSA. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **5**(1): 32-35. 2002 Mar.
- 11) Petricoin E.F., et al.: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* **359**(9306): 572-577. 2002 Feb 16.
- 12) Yanagisawa K., et al.: Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet.* **362**(9382): 433-439. 2003 Aug 9.