

分子生物学の肺癌検診への応用

平野 隆¹

要旨 ヒトゲノム塩基配列の概要が明らかにされたことにより遺伝子・蛋白質の双方向から網羅的解析が行われようとしている。このような戦略に基づく解析は極めて癌特異的な分子の検出・同定を可能にし、今までの腫瘍マーカーの概念を越えた Early detection を可能にするバイオマーカーの存在を予見させる。理想的にはバイオマーカーとなりうる候補分子とは限られた正常組織に分布し、正常組織では発現量が少なく、癌組織に極めて高発現する分子で、しかも腫瘍細胞が分泌し血中・尿中などで検出可能な分子と考えられる。このような分子の探索が現在勢力的に進められようとしている。本稿では筆者らが多少関与している肺癌のプロテオーム(proteome)解析を中心に、検診に応用することを目標にした新しいバイオマーカー探索の現況について言及する。(肺癌. 2003;43:1028-1032)

索引用語 肺癌の早期発見, プロテオミクス, 新しいバイオマーカー, 肺癌検診

The application of molecular biology (proteomics) to lung cancer screening Discovery of novel biomarkers

Takashi Hirano

ABSTRACT Comprehensive analysis of both human genes and proteins has been started based upon the establishment of human genome database. Proteomics is the science by which proteins are investigated with regard to their roles as functional elements. Many researchers believe that proteomics will play a dominant role in life science in post genome age. Though we often use ' post genome ' as a technical term, it would be more precise to say that at present we are in the age of the post genome sequence, and that we now stand at the entrance to the age of functional analysis in molecular level. The clarification of the human genome sequence is one of the most critical events in life science, and sequentially the final results of the human genome sequence are accelerating overall analysis of human gene products. In this context, there is a high possibility that tumor-specific molecules could be used in the early detection of malignant neoplasms. Ideal biomarkers would be distributed to very little in normal tissues but much in a cancerous tissue. Now we attempt to investigate proteomes associated with lung cancer. In this manuscript we describe the present status of proteomic analysis concerning lung cancer and the exploration for novel tumor-specific biomarkers aiming at the early diagnosis of lung cancer. (*JJLC*. 2003;43:1028-1032)

KEY WORDS Early detection of lung cancer, Proteomics, Novel biomarkers, Lung cancer screening

プロテオミクスとは

プロテオミクス(Proteomics)という用語はまだ比較的新しく生み出された造語であり, 1995年にオーストラリアの M.R. Wilkins らにより「ゲノムからの発現蛋白質」という表現を繰り返し表記するのを簡略化するために

proteome という用語が用いられ, 論文中に繰り返し使われたことに始まる^{1,2} すなわち全蛋白質を機能的な集合体として取り扱うことを念頭に置いた蛋白質の網羅的解析を意味してこの用語が用いられた. genome に対し proteome, genomics に対し proteomics という用語が対応し, 現在では広くこの用語が用いられるようになった.

¹ 東京医科大学外科学第 1 講座.
別刷請求先: 平野 隆, 東京医科大学外科学第 1 講座, 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1.

¹Department of Surgery, Tokyo Medical University, Japan.

Reprints: Takashi Hirano, Department of Surgery, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan.

© 2003 The Japan Lung Cancer Society

しかしその概念はさらに20年ほど遡った1970年代中頃に端を発しており、ゲノム情報の最終産物としての蛋白質を網羅的に解析しようとする試みはO Farrellによる蛋白質の高解像度2次元電気泳動法による解析から実際には始まったといっよい³。そしてさまざまな技術革新の末現在の質量分析による手法へと発展してきている。

なぜ今プロテオミクス解析なのか。2001年にヒトゲノムの塩基配列の概要が明らかにされた。しかし遺伝子情報は長らく1遺伝子、1蛋白質を基本的に想定されていた。しかしRNAのレベルで選択的スプライシングという概念が示され、最近ではヒト遺伝子の約半数でこの現象が起こっていることが示されるに至った。すなわち1遺伝子から産物としての蛋白質が複数作られる可能性があるとしなければならないことになった。従ってヒトゲノム解析の結果約35,000の遺伝子の存在が現在推測されているが、これに基づいて考えるならば翻訳後修飾も合わせると生体内の蛋白質は十万種とも三十万種ともその存在が推測されている。生命現象の場合、細胞内での生理作用が発揮される場合は複雑な高次構造を有する蛋白質の複雑なネットワークにより構築されている。従って種類も多くまた構造自体も複雑な蛋白質のレベルから病態解析を行うことは膨大な労力を要するものと考えられ、従来の癌研究ではよりシンプルでくみやすいと考えられた遺伝子レベルでの研究が先行されてきた。しかしながら選択的スプライシングや翻訳後修飾によって遺伝子と蛋白質との関係が一对一対応でないとすると否応なしに蛋白質レベルでの解析が必要になったと考える。そしてここ十年で質量分析装置などの蛋白質の網羅的解析を可能とする手法が急速に整備されたことにより、疾患の病態を蛋白質レベルから解明しようとする動きに拍車がかかるようになっている。

ヒトゲノムの塩基配列の概要が明らかにされると「Post genome」という言葉が汎用されるようになったが、正確には「Post genome sequence 時代に入ったといふべきで、遺伝子・蛋白質の機能解析という面ではその入り口に立ったに過ぎない。」とも言われている。ただし、ヒトゲノムの塩基配列が明らかにされた意義は大きく、遺伝子・蛋白質双方からの網羅的解析がこの塩基配列情報を基盤にして精力的に繰り広げられようとしているのである。

①プロテオミクスからの展開は純粹にある機能に対するキー蛋白質分子を発見・同定し、この分子の機能発現に関連する分子間相互のネットワークを探求しようとする基礎的研究と、②癌特異的なキー蛋白質分子の発見・同定から早期診断のバイオマーカーを同定する試みあるいは癌化・細胞増殖・浸潤・転移・アポトーシスといった癌

細胞の生物学的性格を規定するキー蛋白質を発見・同定し、新しい分子標的治療のターゲットとしようとする臨床に直結した研究の2面があるように思われる。ここでは主として後者について現在までに明らかにされている肺癌に関するプロテオーム研究の概要について筆者らの施設での結果も含め概論する。

肺癌におけるプロテオーム解析

文献的考察

2001年米国食品医薬品局(FDA)と米国国立がん研究所(NCI)は共同でClinical Proteomics Programを立ち上げた。早速翌2002年にはI期卵巣癌患者を含む卵巣癌患者血清のプロテオームパターンから感度100%、特異度95%で卵巣癌を検出したと報告した⁴。プロテオーム解析が早期診断に有効性を示した例としての意義は大きく、プロテオーム解析の癌早期診断への応用の推進力となっていると思われる。

2001年Michigan大学のOh JM, Hanash Sらのグループは原発性肺癌の2次元電気泳動ゲル上で認められる蛋白質をデータベース化し報告している⁵。そして同じグループのGharib TGらは原発性肺腺癌でサイトケラチンの7, 18, 19, 21の各アイソフォーム21個の内14個のアイソフォームが正常肺組織より過剰発現し、いくつかのアイソフォームは予後などの臨床データと関連していたと報告した⁶。さらに、2次元電気泳動とMALDI TOF MSによる解析で分子の同定を行い、正常肺と比較し有意に過剰発現している分子として9分子を同定したと報告している⁷。また、Vanderbilt-Ingram Cancer CenterのYanagisawa K, Carborn DPらのグループも非小細胞肺癌と正常肺組織のMALDI TOF MSを用いた検索結果でプロテオームパターンから原発性肺癌の各組織型を完全に鑑別可能であり、またリンパ節転移の有無についてもプロテオームパターンから予測可能であると報告した⁸。

しかしながら現在のところ検診にすぐに応用可能とするプロテオームパターンやバイオマーカーの同定についての報告はほとんどない。肺癌患者における血清のプロテオーム解析はいまだ少なく、従って有効な血清バイオマーカーの報告がないのが現状である。唯一前述のMichigan大学のグループがprotein gene product 9.5に対する自己抗体が肺癌患者の血清バイオマーカーとして有効であると報告したが、陽性率は64分の9とかなり低率であり、もともとprotein gene product 9.5は神経内分泌マーカーであり、肺癌全体のスクリーニングには難点があるように感じられる⁹。

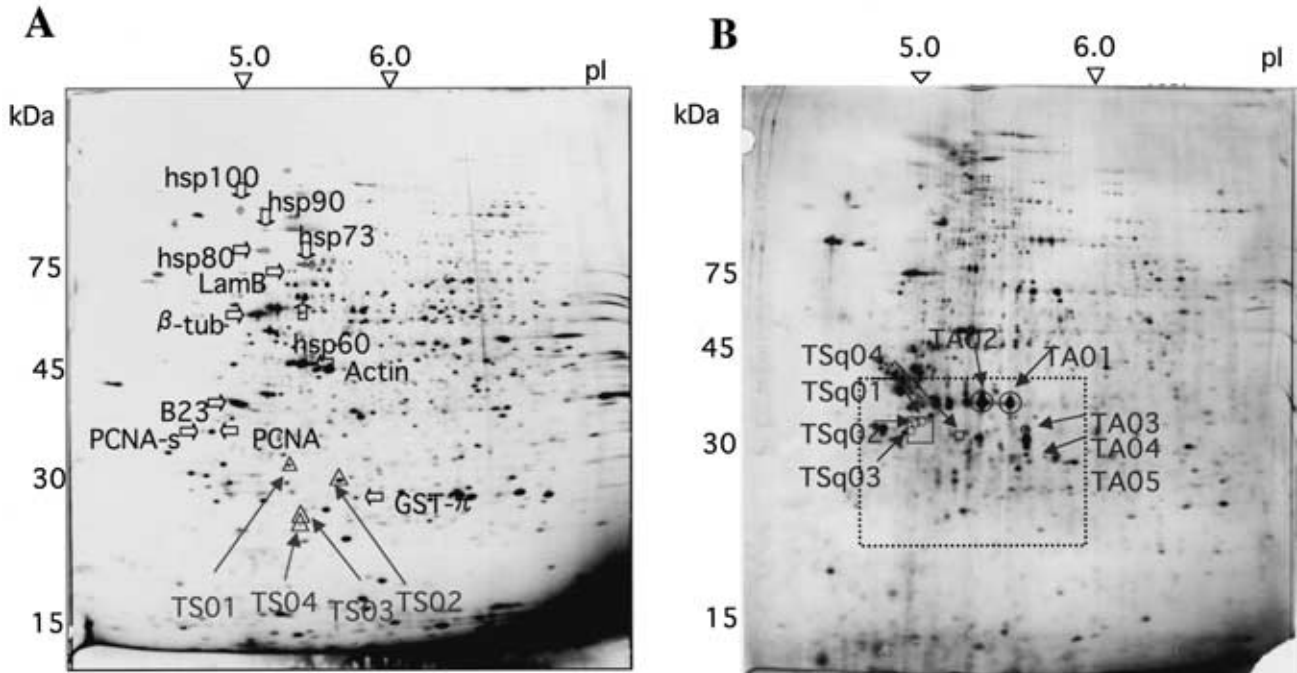


Figure 1. Overview of the 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis pattern of primary lung carcinoma. A: small cell carcinoma, B: Adenocarcinoma, hsp: heat shock protein, LamB: lamin B, β -tub: β -tubulin, B23: numatin/protein B23, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, s-PCNA: satellite spot-PCNA, GST- π : glutathione-S-transferase- π , \square : proteins associated with neuroendocrine tumor, \circ : proteins associated with squamous cell carcinoma, \triangle : proteins associated with adenocarcinoma

Table 1. Polypeptide associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma [molecular weight (kDa)/pI]

(a) Potential markers for epithelial cells	TE01 (31.0/5.52)	TE02 (31.0/5.25)	TE03 (34.0/5.46)		
(b) Potential markers for neuroendocrine cells	TS01 (29.5/5.08)	TS02 (26.6/5.33)	TS03 (25.0/5.23)	TS04 (24.2/5.20)	
(c) Potential markers for adenocarcinoma of the lung	TA01 (35.0/5.45)	TA02 (35.0/5.29)	TA03 (32.8/5.54)	TA04 (30.0/5.72)	TA05 (29.8/5.67)
(d) Potential markers for squamous cell lung carcinoma	TSq01 (33.0/4.72)	TSq02 (32.7/4.69)	TSq03 (32.0/4.67)	TSq04 (31.2/5.16)	

当施設におけるプロテオミクス解析

ゲルプロテオミクス 私達は原発性肺癌の各組織型関連蛋白質の検索を通じ、2次元電気泳動ゲル上でのゲルプロテオミクスパターンの違いから組織型の評価が可能であることを示してきた。20～50 kDaの比較的低分子領域の検索で肺癌組織型関連蛋白13種類を同定し、腺癌関連蛋白 TA01～05、扁平上皮癌関連蛋白 TSq01～04、神経内分泌腫瘍関連蛋白 TS01～04)、病理組織学上の分類との相関を示した (Figure 1, Table 1)¹⁰。さらに細胞増殖能を反映する蛋白発現などを考慮することにより原発性肺腺癌を単なる形態学上の分類よりもより生物学的

腫瘍の性格を反映した分類が可能であることを示してきた。¹¹ 特にこの中で原発性肺腺癌に特異的な TA02 分子の解析を進め、この分子が aspartic proteinase の一種である Napsin A であること、原発性肺腺癌の免疫組織化学染色 (抗 napsin A モノクローナル抗体, clone TMU-Ad02, IBL, 群馬) では杯細胞型を除く約 90% の原発性肺腺癌発現し、他組織型肺癌では大細胞癌の一部で低発現しているだけで、他臓器腺癌では全く発現していないことから肺腺癌の原発・転移の鑑別に極めて有効と考えられた。¹²⁻¹⁴ この分子は血中に出ていることから assay 系を構築した。原発性肺腺癌全体で 53.7% の陽性率を、IA 期腺癌でも 40% の陽性率を示すものの、II 型肺胞上皮の

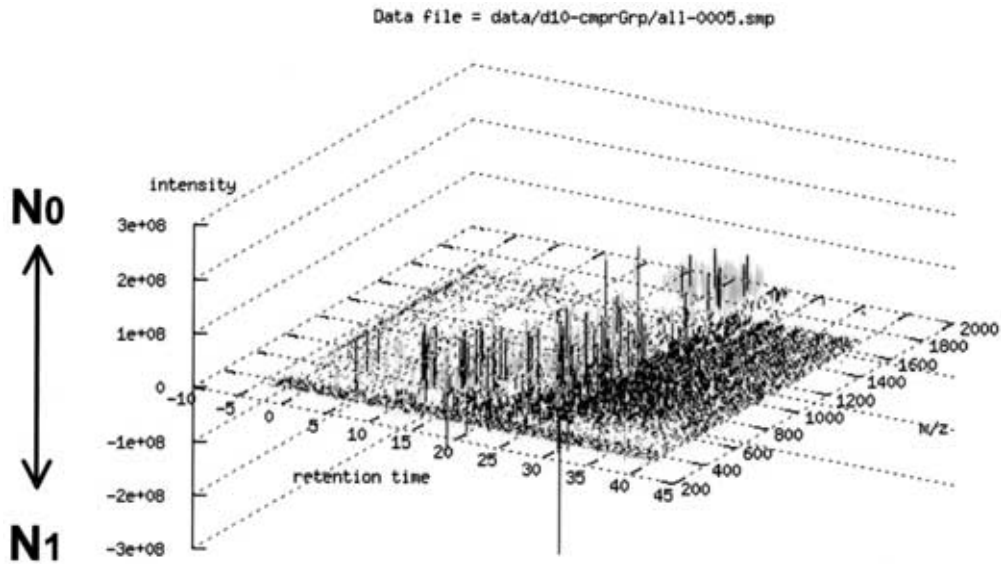


Figure 2. Analysis of the protein associated with lymph node metastases. Mass spectrometry shows the relationship between peptide-signals and lymph node metastases. Red signals are related with lymph node involvement, and blue signals are related with the suppression of lymph node metastases.

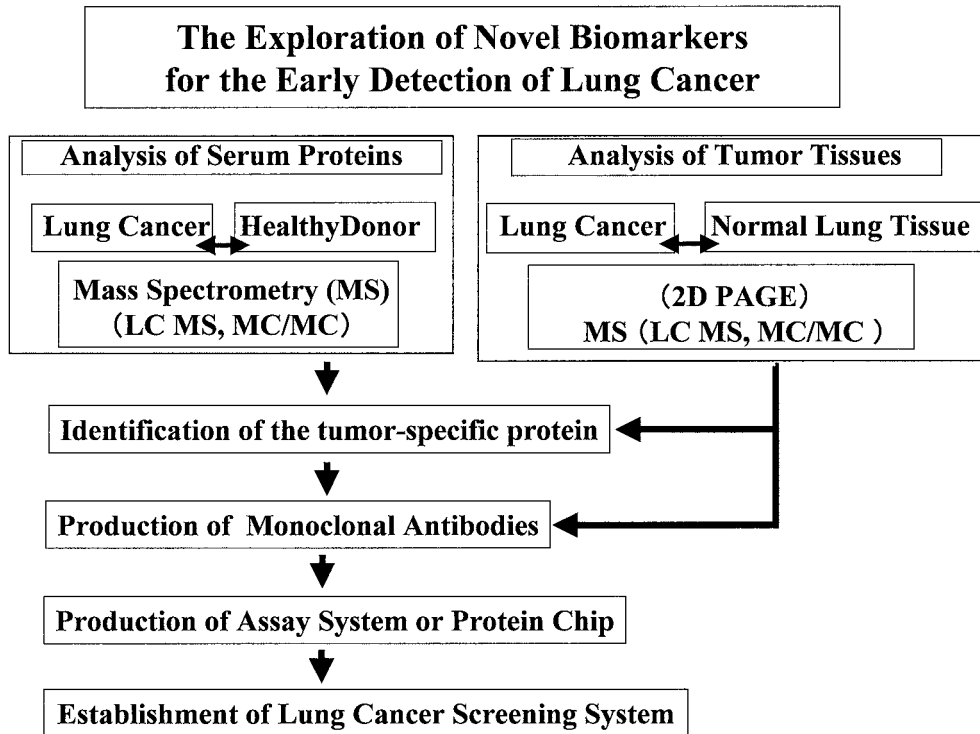


Figure 3. Our strategy of the exploration of novel biomarker for early detection.

過形成を伴う肺病変全てで血中 napsin A 値が高率に上昇することから単独での原発性肺腺癌特異マーカーとはならなかった。また、最近の報告によると napsin A は

surfactant apoprotein B を活性型にするための酵素であることが示され、その機能の解析も進んでいる¹⁵。さらに抗癌剤に対する感受性を反映する蛋白質の解析では

CDDP 耐性細胞で発現が低下するカルシウム結合性蛋白 reticulocalbin-1 を同定し、白金製剤を中心とした術後化学療法適応の判断に有効である可能性を示した。¹⁶すでに CDDP 耐性細胞で過剰発現が知られている glutathion-S-transferase π の発現と合わせて評価することにより、より術後化学療法有効症例を選択することができると考えられた。

質量分析による解析 東京医科大学では 2003 年 4 月に臨床プロテオームセンターが開設され 9 月から施設が稼働し始めている。現在、原発性肺癌の Preliminary study を開始しており、解析の途中ではあるがその一部を示す。

目的 原発性肺腺癌のリンパ節転移に關与する蛋白質を同定し、転移抑制につながる分子標的を探索する。

材料と方法 臨床材料：東京医科大学病院外科で切除された原発性肺腺癌の内、葉切除術および縦隔リンパ節郭清術が施行され、術後病理組織診断が確定している症例の内、切除術後直ちに -80℃ で保存されていた原発性肺腺癌腫瘍径 2 cm 以下でリンパ節転移陽性症例 15 例と T1 あるいは T2 症例でリンパ節転移陰性症例 21 症例の原発巣を用いた。

解析法：東京医科大学臨床プロテオームセンターで独自に開発された LC/MS システムにてシグナル (m/z) を検出し、両群間で統計的に有意にシグナル強度差があるシグナルを拾い出し、MS/MS 解析により蛋白質の同定をデータベースと照合することで行った。

結果

現在のところまだ解析途中の結果ではあるが、リンパ節転移と有意な関係があるペプチドシグナルを 5646 個検出している。このうち、蛋白質データベースの情報を基に 4521 個のペプチドシグナルは 1408 個の既知の蛋白への対応付け可能であった。リンパ節転移陽性症例に關連して過剰発現している蛋白質が 739 個、リンパ節陰性症例と關連し過剰発現しているのが 669 個認められている。個々の蛋白質分子を検証し、リンパ節転移の機構解明、転移抑制の分子標的の同定につなげたいと考える (Figure 2)。

肺癌検診にプロテオミクス技術を応用するためには血液中に検出される蛋白であることが理想と考える。従って肺癌患者血漿と正常者血漿のプロテオーム解析を行い、両群間比較・データベースとの照合で有望分子の検出・同定へとつなげていく strategy は同様である。現在準備を整えている段階であり、約半年程度の期間での解析終了を目標としている (Figure 3)。

結語

プロテオミクス技術による肺癌研究の現況につき概説

するとともに、検診に応用することを目標とした新規バイオマーカー探索についても言及した。

REFERENCES

1. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al. From proteins to proteomics: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*. 1994;14:61-65.
2. Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL, et al. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*. 1996;17:830-838.
3. O Farrel PH. High resolutional two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250:4007-4021.
4. Petricoin EF, Ardekant AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002;359:527-577.
5. Oh JM, Brichory F, Puravs E, et al. A database of protein expression in lung cancer. *Proteomics*. 2001;1:1303-1319.
6. Gharib TG, Chen G, Wang H, et al. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers associated with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2002;4:440-448.
7. Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Proteomics analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:2298-2305.
8. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2003;362:433-439.
9. Brichory F, Beer D, Le Naour F, et al. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res*. 2001;61:7908-7912.
10. Hirano T, Franzen B, Uryu K, et al. Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br J Cancer*. 1995;72:840-848.
11. Hirano T, Fujioka K, Franzen B, et al. Relationship between TA01 and TA02 polypeptides associated with lung adenocarcinoma and histocytological features. *Br J Cancer*. 1997;75:978-985.
12. 平野 隆, 竹川広三, 日吉利光, 他. 2 次元電気泳動法による肺癌蛋白解析結果に基づく原発性肺腺癌の生物学的悪性度評価. *肺癌*. 2000;40:195-200.
13. Hirano T, Auer G, Maeda M, et al. Human tissue distribution of TA02, which is homologous with a new type of aspartic proteinase, napsin A. *Jpn J Cancer Res*. 2000;91: 1015-1021.
14. Hirano T, Gong Y, Yoshida K, et al. Usefulness of TA02 (napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2003;41:155-162.
15. Brasch F, Ochs M, Kahne T, et al. Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II-pneumocytes of the human lung. *J Biol Chem*. 2003, in press.
16. 竹川広三, 平野 隆, 日吉利光, 他. 2 次元電気泳動法による肺癌蛋白解析で検出される蛋白 Reticulocalbin-1 と CDDP を中心とした化学療法との関係. *肺癌*. 2002;42: 113-118.