

## マススペクトロメトリーを応用したタンパク発現プロファイリングによる ヒト非小細胞肺癌発症の分子機構の解明

柳澤 聖<sup>1</sup>・高橋 隆<sup>1</sup>

**要旨**—— **目的**. 肺癌は日本の癌死亡の第一位を占め、年間約 55000 人以上もの生命を奪う。非小細胞肺癌は肺癌全症例の約 80~85% を占め、外科的摘出術が施行されるが、5 年生存率は 50% に満たない。これまでの研究では、術後予後を正確に予測可能な成果は得られていない。近年、急速に進歩しつつあるプロテオミクス解析技術は、生体試料からタンパク発現解析が可能とし、ポストゲノムシーケンス研究の中核として注目され、生命現象や疾患要因の理解の為に応用されてきている。本研究では、ヒト肺癌のタンパク発現プロファイルと臨床病態の関連について解析を行った。**方法**. MALDI-TOF MS を応用し、150 例以上の肺癌手術検体を用いたタンパク発現プロファイル解析を行った。バイオインフォマティクス解析により、臨床病態と関連を認めるピークプロファイルを探索した。**結果**. 総計 2600 以上のピークを検出し、それらに基づいて腫瘍・正常肺間で有意差を認めるピークプロファイルを検出した。**結論**. 質量分析器を用いた微量の組織試料からのタンパク発現プロファイル解析により、ヒト肺癌の分子病態解明のみならず、革新的な予防・診断・治療法の開発に向けた分子標的の同定にも有用である可能性を示した。(肺癌, 2006;46:231-236)

**索引用語**—— 非小細胞肺癌, プロテオミクス, 発現プロファイリング, 質量分析器, バイオインフォマティクス

## Protein Expression Profiling for Identification of Molecular Mechanism in Human NSCLC by Mass Spectrometry

Kiyoshi Yanagisawa<sup>1</sup>; Takashi Takahashi<sup>1</sup>

**ABSTRACT**—— **Objectives**. Lung cancer is the leading cause of cancer deaths in Japan with more than 55,000 lives annually. Surgical resection gives the best hope for a cure for non-small cell lung cancer (NSCLC) cases, which comprise 80-85% of lung cancers. However, their long-term survival rate remains unsatisfactory and no more than 50% of the cases that have successfully undergone potentially curative resection can survive for 5 years after operation. Although various genetic and epigenetic changes of cancer-related genes have been identified and examined in the search for clinically relevant prognosticators, no single variable evaluated so far has been proven to predict accurately a lung cancer patient's outcome. Recent rapid progress in proteomic technology has made it possible to analyze protein expression profiles using tiny amount of biological samples to search for molecular markers for cancer classification. Thus, proteomic-based approaches complement the genome initiatives and are increasingly being used to address biomedical questions. In this study, we hypothesized that a protein profile obtained from human lung tissues can accurately distinguish lung cancer tissues from those of normal lung, moreover good prognosis patients from poor prognosis ones. **Methods**. We applied a proteomic approach using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター腫瘍病態統御部門分子腫瘍学分野。

別刷請求先: 柳澤 聖, 名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター腫瘍病態統御部門分子腫瘍学分野, 〒466-8550 愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 (e-mail: kyana@med.nagoya-u.ac.jp).

<sup>1</sup>Division of Molecular Carcinogenesis, Department of Oncology, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University

Graduate School of Medicine, Japan.

Reprints: Kiyoshi Yanagisawa, Division of Molecular Carcinogenesis, Department of Oncology, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8550, Japan (e-mail: kyana@med.nagoya-u.ac.jp).

© 2006 The Japan Lung Cancer Society

flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to more than 150 surgically resected frozen tissues of human NSCLC and normal lung (NL) tissue specimens. We used sophisticated bioinformatic analyses to select peak profile related to clinical parameters. **Results.** We were able to obtain over unique 2600 peaks from histologically selected regions of single frozen sections from more than 150 resected human NSCLC and NL tissue specimens. Applying sophisticated bioinformatic methods, we selected the proteomic patterns consisting of 40 peaks that could distinguish NSCLC from NL tissue specimens. **Conclusion.** We showed that proteomic patterns obtained directly from picograms of fresh human lung tumor tissues with mass spectrometry can be used to classify and predict survival in surgically resected NSCLC patients. These results demonstrate that the proteomic analyses may lead to the identification of novel biomarkers or therapeutic targets and a better understanding of lung cancer biology. (*JJLC*. 2006;46:231-236)

**KEY WORDS** — NSCLC, Proteomics, Expression profiling, Mass spectrometry, Bioinformatics

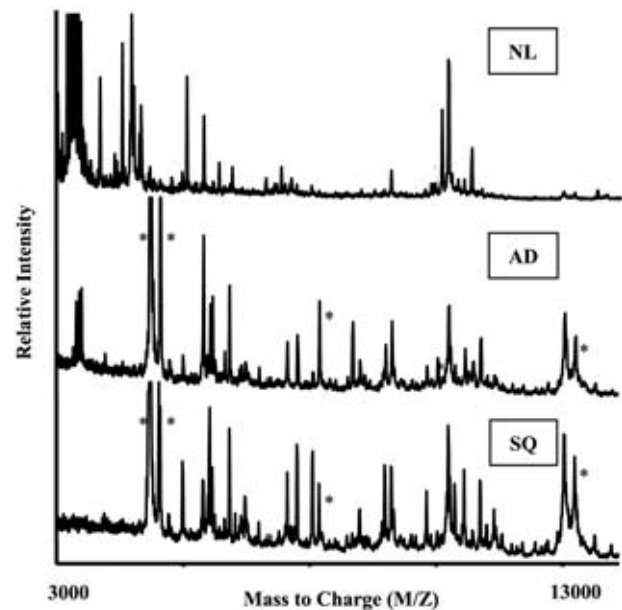
## はじめに

肺癌は、従来早期発見、治療および予防の努力がなされてきているにもかかわらず、日本における癌死亡原因の第一位を占め、年間約 55000 人以上もの尊い生命を奪っている。世界的に見ても、同様に癌死亡原因の第一位を占め、死亡率も約 90% と高く、典型的な難治癌の一つである。非小細胞肺癌 (NSCLC) は肺癌症例全体の約 80~85% を占め、その根治的治療として外科的摘出術が施行されているが、根治術が行われた症例においても 5 年生存率は 50% に満たず、新たな治療、診断戦略の開発が急務と言える状況である。これまでの分子生物学的解析により、肺癌の発生は、正常気道上皮細胞における複数の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異・発現異常などの蓄積が原因である事が明らかとなり、さらには、個々の癌関連遺伝子の正常細胞における役割や各遺伝子の異常が肺癌の発生・進展を誘導するメカニズムも解明されつつあるが、この様な肺癌の生物学的・疫学的特徴に関する先進的な解析と、それらから得られてきた膨大な知見によっても、未だ難治癌である肺癌の予後の改善は得られていない。<sup>1</sup> 現在では、腫瘍毎の特徴を単一あるいは少数の遺伝子・分子を解析する事によって説明する事は困難であるとの認識が一般的であり、同時に数千もの遺伝子の発現量 (mRNA level) が解析できるマイクロアレイが腫瘍分子生物学に応用され、これらの解析から腫瘍の生物学的活性と相関する遺伝子の発現様式が同定されてきている。<sup>2,5</sup> 然しながら、mRNA の発現量は、生命活動の実践的な担体であるタンパクの発現量を反映していない場合もあり、また、mRNA level での発現解析では、タンパクの重要な機能調節機構である翻訳後修飾 (タンパク分解・リン酸化・グルコシル化など) を解析する事は不可能である。<sup>6-8</sup>

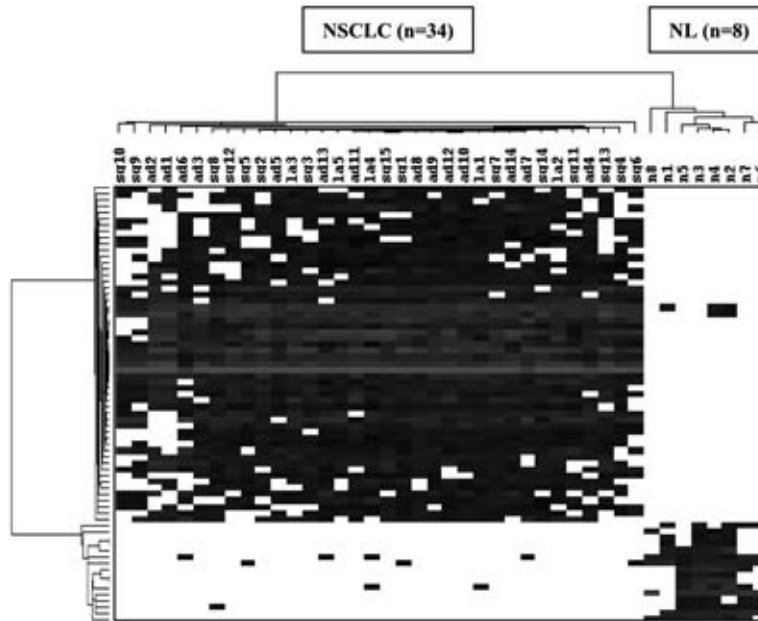
以上の様な背景のもと、包括的なタンパク発現解析を、臨床試料 (組織片・血清・分泌物など) を用いて行う事

は、複雑な癌発症の分子機構解明とその臨床応用に大きく貢献する事が期待されている。近年の急速な質量分析器の進歩により、微量な生体試料からのタンパク発現解析が可能となり、これまでに様々な腫瘍において、腫瘍—正常組織 (血清) を用いた解析に関する報告がなされている。<sup>9-13</sup> 我々も、肺癌組織検体を用いた解析に関する検討を行っており、腫瘍組織—正常肺組織間のタンパク発現差、さらには、術後予後を判別する発現パターンを検出し報告している。<sup>14</sup>

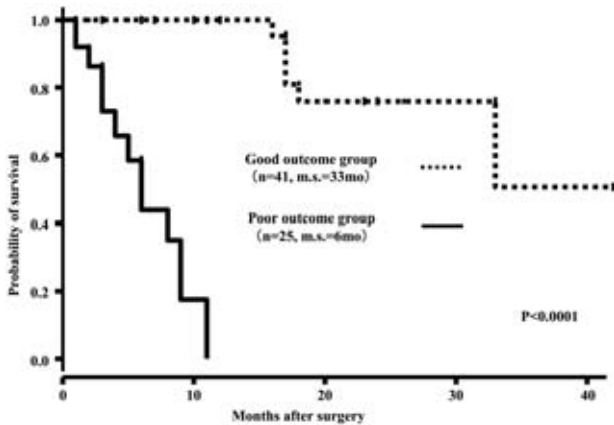
本稿においては、これまでに検討の行われたタンパク発現解析について肺癌を中心に概説するとともに、我々



**Figure 1.** Representative spectra obtained from human lung tissue. Representative MALDI-TOF MS spectra obtained from human NSCLC and normal lung tissue specimens are shown with the molecular weight calculation (M/Z values).



**Figure 2.** Hierarchical cluster analysis of human lung tissue specimens according to MS profile. Hierarchical cluster analysis of 34 human NSCLC and eight NL tissue specimens according to the protein expression patterns of 91 peaks are shown. Each row represents an individual proteomic signal and each column represents an individual specimen. The dendrogram at the top shows the similarity in protein expression profiles of the specimens. Substantially raised expression of the proteins is noted in individual primary NSCLC and NL tissue specimens.  
ad: adenocarcinoma, sq: squamous cell carcinoma, la: large cell carcinoma, nl: normal lung.

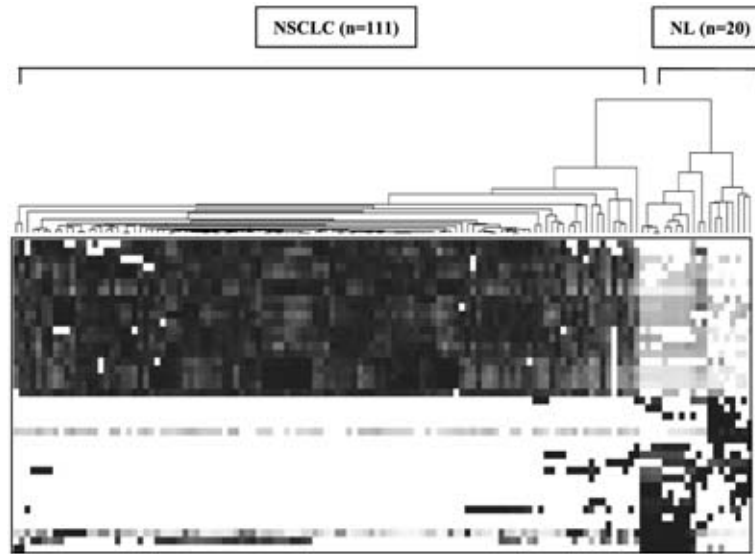


**Figure 3.** Kaplan-Meier survival curves for groups with poor and good prognosis according to peak profile comprised of 15 distinct peaks.  
 $p < 0.0001$  according to the Log-rank test.  
m.s.: median survival.

が展開しつつある質量分析器 (Mass Spectrometry; MS) を用いた組織試料からのタンパク発現解析について報告する。

### 1. ヒト肺癌における2次元電気泳動法によるタンパク発現解析

生体試料を用いた網羅的タンパク発現解析において最も応用された技術は2次元電気泳動法である。2次元電気泳動法は、比較的高分子量である数百~千種類程度のタンパクを分離し、その存在量を描出する事が可能であり、現在でもプロテオミクス解析の基盤であると言える。これまでに、2次元電気泳動法を応用した、肺癌のタンパク発現プロファイル解析については、複数の報告があり、それぞれ、肺癌の分子マーカー同定について述べられている。<sup>15-20</sup> これらの中には、マイクロアレーと2次元電気泳動法を組み合わせた、より先進的な解析も認められるが、<sup>8</sup> 再現性・解析に要する時間などの問題点が存在する事も事実であり、<sup>21,22</sup> 非常に有用な技術であると考えられるが、数百もの試料間におけるタンパク発現パ



**Figure 4.** Hierarchical cluster analysis of human lung tissue specimens according to MS profile. Hierarchical cluster analysis of 111 human NSCLC and 20 NL tissue specimens according to the protein expression patterns of 40 distinct peaks are shown. Each row represents an individual proteomic signal and each column represents an individual specimen. The dendrogram at the top shows the similarity in protein expression profiles of the specimens. Substantially raised expression of the proteins is noted in individual primary NSCLC and NL tissue specimens.

ターンを取得する必要がある臨床の現場に应用される状況からはまだほど遠いと考えられる。従って、革新的で再現性の高い技術の応用が、癌の発症・進展の分子機構を探索するためのタンパク発現プロファイリング解析において必要とされていると言える。

## II. 質量分析器を用いたヒト癌におけるタンパク発現プロファイリング

近年、2次元電気泳動法に代わるタンパク質の発現プロファイリング技術として質量分析器 (Mass Spectrometry; MS) を応用した解析が行われる様になり、その感度・精度・再現性などの点で優位性を有するという事で注目されている。現在、腫瘍の分子標的探索に応用されている MSは SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization) と MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) の2種類に大別される。これらを用いた報告の一部を以下に紹介する。

SELDIでは、液性のタンパク質試料が、種々の特徴を有した (電荷・疎水性・抗体など) チップ表面上に添加され、洗浄後にチップ表面に結合しているタンパクをイオン化しその分子量と存在量を測定する。これまでに、この SELDI を応用した腫瘍におけるタンパク発現プロファイル解析では、担癌患者由来の血清を試料として用

い、健常者由来の血清との比較検討を行う事により、卵巣癌・前立腺癌・乳癌・肝細胞癌などにおいて、担癌患者を認識しうる特有のタンパク発現パターンを認めたという報告がなされている。<sup>9-11,23,24</sup> 然しながら、SELDIを用いた検討は、液性試料の解析が比較的簡便に行えるという利点を持つが、腫瘍自体からの直接的なタンパク発現プロファイルの抽出には適していない。

MALDIを応用した研究も複数の施設から報告されているが、<sup>12-14</sup> 我々のグループは、腫瘍組織の示すタンパク発現プロファイルの直接的な採取を、MALDIを用いて進めている。我々の解析の利点としては、組織を直接解析する事により、タンパク可溶化が不要などの試料の調整過程が最小限であり、微量試料からの解析が可能で、標的分子の存在部位が可視化できるなどをあげる事ができる。<sup>25,26</sup> 以下に、我々が取り組んでいる解析の結果について述べる。対象としたのは、治癒切除が施行された66例のNSCLCであり、全症例からMALDIによりタンパク発現プロファイルが得られている。<sup>14</sup> 検出された総ピーク数は1600以上であり、これらの発現情報と詳細な臨床情報を基に、バイオインフォマティクス解析を施行する事によって、肺癌の病態と関連の深いタンパク発現パターンの検出を行った。まず、腫瘍組織 (n=34) を正常末梢肺上皮 (NL; n=8) から区別可能なピークプロファ

イルの探索を行い、91種類ピークからなるプロファイル抽出した。代表的なスペクトラを Figure 1 に示し、同時に腫瘍に特徴的なピークの一部についても図中に\*で示す。この NSCLC-NL 判別プロファイルを用いたクラスター解析の結果、NSCLC と NL はすべて正しく判別され、このプロファイルと病理組織学的特徴との間に有意な関連性が認められると考えた (Figure 2)。さらなる検討として、病理組織学的検討では正確に予測する事の困難な NSCLC 患者の術後予後に関して、その判別モデル構築が可能か否かについても検討を加え、予後不良群(術後平均生存期間 6 ヶ月、症例数 25 例)と良好群(術後平均生存期間 33 ヶ月、症例数 41 例)を判別可能な、二群間で有意に発現差を認める 15 種類のピークの存在を明らかとした (Figure 3)<sup>14</sup>。然しながら、この検討では、症例数が比較的少なく、さらには症例観察期間が短いため、training-test model を用いた汎用性の検討、或いは、長期予後 (5 年生存) の推定を行う事が不可能であった。これらの問題点を改善し、さらに精度の高い予後予測モデル構築を目指し、我々は、詳細な臨床情報の付随する十分な観察期間を経た 150 例を超える NSCLC 症例の発現プロファイルデータの集積を進め、その取得を完了した。本研究では、全症例を 2 群に分け、training-test model を用いて、抽出するピークプロファイルの汎用性について検討を行う事としている。まず、腫瘍組織と正常肺組織 (20 検体) とを判別するピークプロファイル抽出を試み、40 種類のピークからなるプロファイルを得た。このプロファイルを用いたクラスター解析の結果、NSCLC と NL は 100% の精度をもって判別可能であり、この事は、ピークプロファイルと病理組織分類の有意な関連性を示していると考えた (Figure 4)。現在、詳細な臨床情報に基づいた肺癌病態 (5 年生存、再発など) と有意な関連を認めるピークプロファイルのさらなる抽出を行いつつある。また、training コホートで検出されたプロファイルの、test コホートから得られたピークデータセットを用いた検証に関しても遂行中である。これらのプロファイルを構成する分子群は、肺癌発症機構を知る上で非常に有用であると考えられ、さらには臨床経過の予測にも応用可能と考えられるため、さらなる検討として、有意なピークプロファイル構成分子の同定を行い、それらの肺癌発生・進展に関する分子機構の解明を目指し、詳細な分子生物学的検討に関しても、現在進めつつある。

## まとめ

本稿では、我々が現在進めている MALDI を用いた肺癌腫瘍検体からの直接的なタンパク発現プロファイリングについて、これまでのプロテオミクス解析技術と比較を行いながら述べてきた。この系の最大の利点としては、

ピコグラムレベルの腫瘍検体からわずか数分のうちに直接的にタンパク発現プロファイルが得られる点があげられる。この様な微量試料が解析可能である事は、針生検試料や組織内の細胞レベルでのタンパク発現プロファイルの取得などにも応用可能であると考ええる。したがって、大規模コホートを用い MS を応用した癌におけるタンパク発現プロファイル解析は、緻密なバイオフィーマティクス解析と組み合わせられる事によって、癌の早期発見のための分子マーカー、あるいは分子標的薬のターゲットの発見に貢献する事が大いに期待できる。一方で、解析対象となるタンパクの分子量が 2 kDa から 20 kDa までと比較的小さいものに限られる、未固定の試料に限られる、スペクトラ中の有意なピークに対応するタンパクの同定作業が引き続き必要とされるなどの問題点・改善点も存在し、今後のさらなる技術革新が待たれるところである。また、本稿では、触れ得なかったがマイクロアレー法による mRNA レベルの遺伝子発現プロファイル解析などから得られる情報と合わせて、それらを互いに相補的な情報として統合的に詳細な解析を加えていく事により、腫瘍発生・増悪の分子機構の全体像を把握し、種々の臨床応用が可能となるものと考ええる。

## REFERENCES

1. Minna JD. Neoplasms of the lung. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill; 2001: 562-571.
2. Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene*. 2004; 23:5360-5370.
3. Beer DG, Kardina SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002;8:816-824.
4. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13790-13795.
5. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13784-13789.
6. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997;18:533-537.
7. 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.
8. Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:304-313.
9. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of pro-

- teomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002;359:572-577.
10. Petricoin EF, 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP, et al. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1576-1578.
  11. Adam BL, Qu Y, Davis JW, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res*. 2002;62:3609-3614.
  12. Sidransky D, Irizarry R, Califano JA, et al. Serum protein MALDI profiling to distinguish upper aerodigestive tract cancer patients from control subjects. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1711-1717.
  13. Campa MJ, Wang MZ, Howard B, et al. Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2003;63:1652-1656.
  14. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2003;362:433-439.
  15. Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2298-2305.
  16. 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.
  17. Bergman AC, Benjamin T, Alaiya A, et al. Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2000;21:679-686.
  18. 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.
  19. Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, et al. Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1994;15:382-390.
  20. Gharib TG, Chen G, Wang H, et al. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2002;4:440-448.
  21. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405:837-846.
  22. Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*. 2000;356:1749-1756.
  23. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*. 2002;48:1296-1304.
  24. Poon TC, Yip TT, Chan AT, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem*. 2003;49:752-760.
  25. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*. 1997;69:4751-4760.
  26. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, et al. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med*. 2001;7:493-496.