

REVIEW ARTICLE

臨床応用に向けた肺癌のプロテオーム解析

平野 隆<sup>1,2</sup>・前田純一<sup>1</sup>・川上隆雄<sup>1,3</sup>・小鹿雅和<sup>1</sup>・  
垣花昌俊<sup>1</sup>・加藤靖文<sup>1</sup>・野村春将<sup>1</sup>・梶原直央<sup>1</sup>・  
内田 修<sup>1</sup>・大平達夫<sup>1</sup>・池田徳彦<sup>1</sup>・加藤治文<sup>1</sup>

Proteomic Analysis of Primary Lung Cancer Aimed at Clinical Application

Takashi Hirano<sup>1,2</sup>; Junichi Maeda<sup>1</sup>; Takao Kawakami<sup>1,3</sup>; Masakazu Kojika<sup>1</sup>;  
Masatoshi Kakihana<sup>1</sup>; Yasufumi Kato<sup>1</sup>; Masaharu Nomura<sup>1</sup>; Naohiro Kajiwara<sup>1</sup>;  
Osamu Uchida<sup>1</sup>; Tatsuo Ohira<sup>1</sup>; Norihiko Ikeda<sup>1</sup>; Harubumi Kato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>1st Department of Surgery, Tokyo Medical University, Japan; <sup>2</sup>Todachuo General Hospital, Japan; <sup>3</sup>Medical ProteoScope CO. LTD, Japan.

**ABSTRACT** — Proteomic analysis is a comprehensive analysis of proteins. Recent advances in this field enable its application to clinical samples including surgically resected specimens and body fluids. In clinical applications its main techniques consist of 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS). Using 2-DE and surgically resected lung cancer specimens we identified napsin A, which was specific for primary lung adenocarcinoma, and reticulocalbin, which was related to resistance to platinum-based adjuvant chemotherapy. Furthermore, using MS we attempted to explore biomarkers for the selection of postoperative adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur (PAC), and clarified that patients with no expression of either vimentin or myosin IIA showed a significantly better outcome, regardless of PAC. Though we hope that proteomic technology will contribute to the establishment of both a new screening method for the early detection and individualized therapy of lung cancer, several technical issues for the investigation of clinical samples have not yet been resolved. The main issues concern the dynamic range for analysis of clinical samples. It is important that the purpose of the proteomic analysis is clarified, and appropriate sample preparation suited for the purpose is essential.

(JJLC. 2009;49:427-434)

**KEY WORDS** — Proteomics, Exploration of biomarkers, Napsin A, Reticulocalbin

Reprints: Takashi Hirano, Todachuo General Hospital, 1-19-3 Honcho, Toda-city, Saitama 335-0023, Japan.

**要旨** — プロテオミクスとは蛋白質の包括的解析と解され、同分野における最近の進歩は外科切除材料や体液などの臨床検体を対象とした解析を可能にした。臨床応用に現在使われている主なプロテオーム技術は2次元電気泳動法と質量分析法である。私たちは2次元電気泳動法と外科切除材料を用いて原発性肺腺癌に特異的な napsin A を、また白金製剤による化学療法に対する薬剤耐性関連蛋白として reticulocalbin を同定した。さらに質量分析法を用い uracil-tegafur (UFT<sup>®</sup>) による術後補助化学療法を選択するためのバイオマーカー探索を試み、vimentin と myosin IIA がともに発現していない症例は

UFT<sup>®</sup>の投与なしでも非常によい予後を示すことを明らかにした。プロテオームの技術は肺癌の早期発見のための新しいスクリーニング法や個別化治療の確立に貢献することが期待されているが、臨床検体の解析にはいくつかの技術的な問題点、主としてダイナミック・レンジに関する問題点をまだ残している。解析目的を明確にし、その目的に焦点を合わせたサンプル調整が不可欠と考える。

**索引用語** — プロテオミクス、バイオマーカー探索、napsin A, reticulocalbin

<sup>1</sup>東京医科大学外科学第1講座；<sup>2</sup>戸田中央総合病院；<sup>3</sup>メディカル・プロテオスコープ。  
別刷請求先：平野 隆，戸田中央総合病院，〒335-0023 埼玉県

戸田市本町 1-19-3。  
※第48回日本肺癌学会総会シンポジウム「ゲフィチニブ」。

## はじめに

呼吸器悪性腫瘍による死亡数は癌死の中で第1位を占め、早期発見と治療戦略の抜本的な変革なくしてこの疾患群の撲滅はありえないと考えられている。検診レベルに応用可能なスクリーニング法としてCT検診の可能性が検討されているものの、いまだに胸部単純X線写真と喀痰細胞診に頼るところが大きい。また、治療法を選択では腫瘍の生物学的性格を正しく評価し、個々の症例に最も適した治療法を選択する新しい治療戦略（個別化医療）の確立が待たれている。

この両者の実現に向けては、スクリーニングのための血清バイオマーカーあるいは個別化医療における治療法選択の判定基準となるバイオマーカーの探索、そして確立が急務である。バイオマーカー探索においては腫瘍細胞の持つ生物学的機能を直接司る蛋白質分子の包括的解析であるプロテオーム解析が、核酸レベルの解析と比較し有利な面も多いとの考え方にに基づき、ここ数年肺癌臨床検体のプロテオーム解析が盛んに行われるようになった。それは2次元電気泳動法や質量分析法に代表される蛋白質解析の技術的な進歩によるところが大きい。ここでは大きく変わることが求められている肺癌の治療戦略に重要な役割を果たすことが期待される、バイオマーカー探索に焦点を当てた肺癌のプロテオミクス解析について私たちがこれまでに行ってきた解析を例に述べることにする。

## 臨床検体を用いた蛋白質解析の方法

現在臨床検体を用いたプロテオーム解析は2次元電気泳動法によるゲルプロテオミクスと質量分析による方法に大別できる。質量分析による方法で現在臨床検体、特に液状検体の解析に汎用されているのがSELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) TOF-MS (time-of-flight mass spectrometry) 法とLC-MS (liquid chromatography mass spectrometry) 法である。前者はチップ表面に固相化した化学官能基や分子で試料中の特定の性質を持つ蛋白質分子を捕捉・精製し、その後レーザー照射することで捕捉された分子の脱離とイオン化を行う。イオン化された分子は通常TOF-MSにより解析される。液状の臨床検体を用いた蛋白質発現プロファイリングによるバイオマーカー探索に有利とされるが、蛋白質分子そのものの同定が困難である。<sup>1</sup> 従って臨床応用にはSELDIの装置そのものを病院の検査室に持ち込む必要が出てくる。そこで私たちは基本的にゲルプロテオミクスあるいはLC-MS/MS解析により蛋白質分子の同定を行い、検証し、この蛋白質分子に対する抗体によるアッセイ系を構築するという手法でバイオマーカー探索

を進めてきた。

## 2次元電気泳動法と肺癌組織分化関連蛋白質の解析

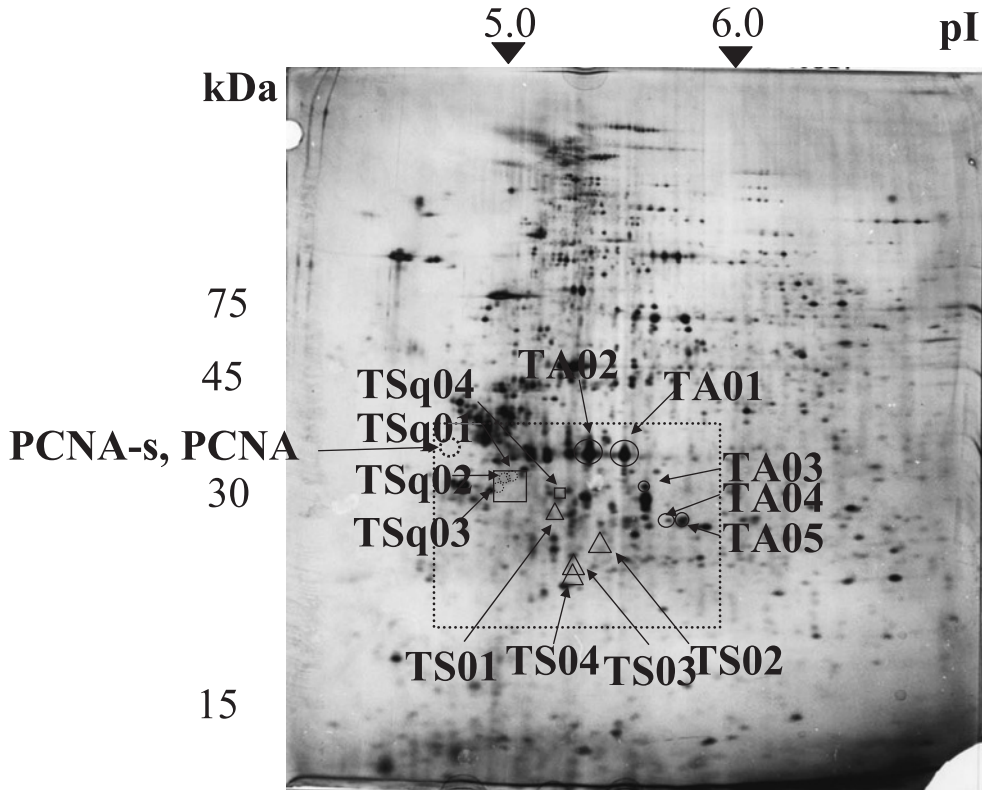
2次元電気泳動法は1次元目のゲルで蛋白質分子の持つ電荷で、2次元目のSDS-PAGEで分子量によって分離する蛋白質の解析手法であり、1970年代の半ばにその方法は確立されている。しかしながら臨床検体を用いた解析は血漿蛋白質や炎症細胞・壊死物質の混入などにより、解析に耐えるゲルを作成することはかなり困難であった。私たちは1989年よりスウェーデン王立カロリンスカ研究所病理部との共同研究で、外科切除材料を用いたゲルプロテオミクス解析を開始した。2次元電気泳動用のサンプル調整を工夫し、<sup>2</sup> 高解像度の解析が可能になったのは1991年頃からである。

このサンプル調整法を用い、肺癌組織型に特異的なゲル上のスポットを特定する試みを行った。それぞれの組織型に特徴的なスポットのパターンがあり、2次元電気泳動パターンから原発性肺癌の組織型の診断も可能であった。<sup>3</sup> 組織学的分化度の高い症例ほど典型的な組織型パターンを示すことが多いが、必ずしも形態学的診断と一致するものではなかった。<sup>4,5</sup>

この解析の中で原発性肺腺癌に特異的に発現するスポットTA02を切り出し、N末端側のアミノ酸解析を行い、このアミノ酸配列に相当する合成ペプチドを免疫源にマウスモノクローナル抗体を作成した (Figure 1)。TA02はアミノ酸解析時点では未知の蛋白質であったが、その後aspartic proteinaseの一種であるnapsin Aと相同な蛋白質であることが示された。<sup>6</sup> この抗体による解析でnapsin Aは正常上皮ではII型肺胞上皮と一部の尿細管上皮に発現していることが分かり、さらに原発性肺腺癌の約90%で発現することからサーファクタントアポ蛋白質 (SpA: pulmonary surfactant-associated protein A) よりも感度に優れ、他臓器腺癌・腺癌要素のない他組織型原発性肺癌ですべて陰性かつ神経内分泌癌にも陰性であったことから、TTF-1よりも特異度で優れた原発性肺腺癌のマーカーとなりうると考えている (Table 1)。アルコール固定の細胞診標本では低分化腺癌でもnapsin Aの発現が高率に確認され、さらに感度は上がるようである (Figure 2)。napsin Aは血中でも検出可能であるが、腫瘍性疾患や炎症性疾患に伴うII型肺胞上皮の過形成が認められる場合でも血中のnapsin A濃度は上昇し、原発性肺癌に特異的な血清腫瘍マーカーにはならなかった。

## 効果予測因子としてのバイオマーカー探索

腫瘍の生物学的特性の違いや治療 (薬物) の介入により量的・質的に変化する蛋白質分子が、効果予測因子と



**Figure 1.** Overview of the 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of primary lung adenocarcinoma (modified from reference 3). The proteins associated with histopathological differentiation of primary lung cancer are indicated. TA01-05, TSq01-04 and TS01-04 show the locations of the 13 proteins associated with adenocarcinoma (circles), squamous cell carcinoma (squares) and neuroendocrine carcinoma (triangles), respectively. Sequentially, we investigated TA02 protein using anti-TA02 monoclonal antibody, and it was proved that TA02 protein was homologous with aspartic protease, napsin A.

**Table 1.** Comparison of the Positive Rates in Surfactant Apoprotein A, Thyroid Transcription Factor 1 and TA02 (Napsin A)

	SpA	TTF-1	TA02 (napsin A)
Primary Lung Adenocarcinoma	60-70%	80-90%	80-90%
Metastatic Lung Adenocarcinoma	(-)	(+)*	(-)
Neuroendocrine Carcinoma	(-)	(+)	(-)

SpA: surfactant apoprotein A; TTF-1: thyroid transcription factor 1.

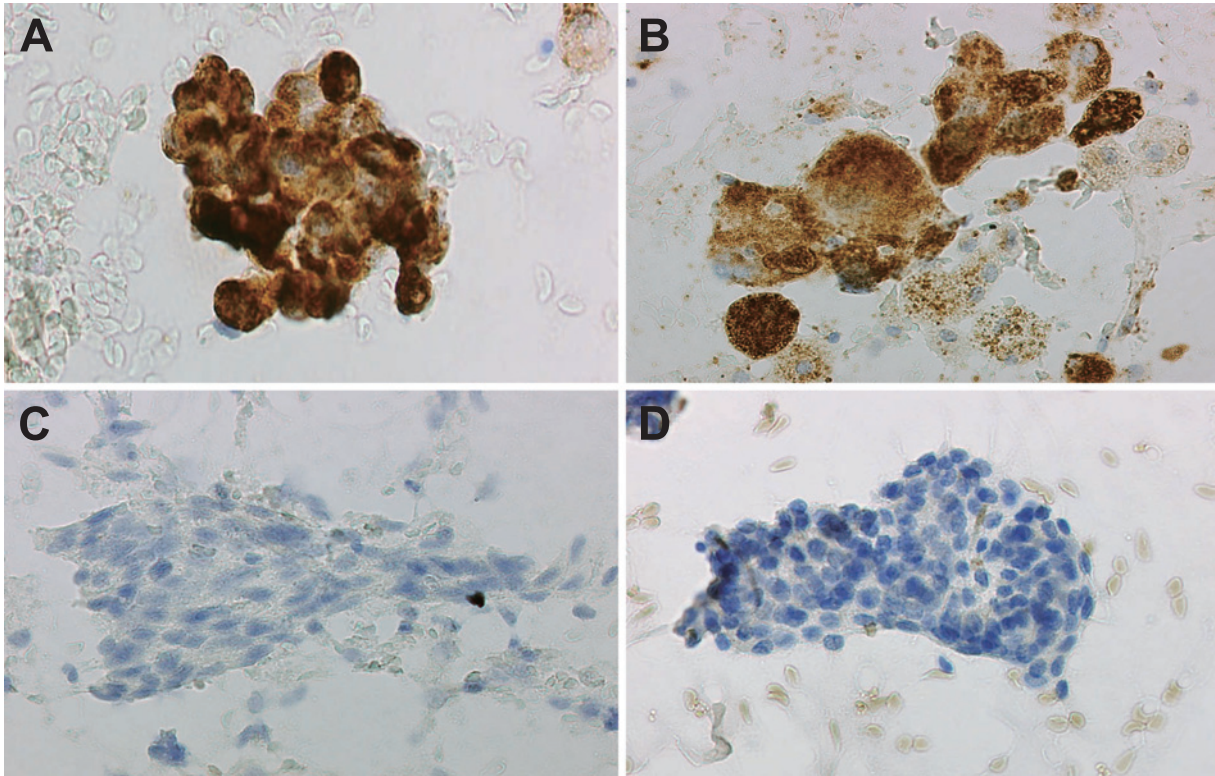
\*TTF-1 shows positive immunoreactivity in metastatic lung cancer from the thyroid.

してのバイオマーカーの候補となりうると考えられる。

私たちは肺癌の術後補助化学療法の中心的役割を果たしている白金製剤に対し、耐性化すると発現が変化する蛋白質スポットが効果予測因子になりうる可能性がある

と考え、肺癌培養細胞の CDDP 耐性株とその親株の蛋白質発現の比較を行った。その結果、発現が減少する蛋白質と過剰発現する蛋白質を 2 次元電気泳動ゲル上で検出し、この蛋白質がそれぞれ reticulocalbin (RCN) と Glutathion S transferase- $\pi$  (GST- $\pi$ ) であることを、前出の方法と同様の方法で同定し (Figure 3)、さらに抗 RCN マウスモノクローナル抗体を作成した。この抗体を用いた肺癌切除標本 (アセトン固定標本) の免疫組織化学染色で、RCN の発現と術後補助化学療法後の予後との関係の評価した。白金製剤を中心とした補助化学療法を施行しない場合、RCN の発現は予後に全く影響しないが、術後補助化学療法施行群では RCN 陽性群が陰性群と比較し有意に予後良好であった<sup>7</sup> (Figure 4)。

また、IB 期肺腺癌の術後補助化学療法では UFT<sup>®</sup> の経口投与の有用性が示されている。<sup>8</sup> I 期肺腺癌で術後の UFT<sup>®</sup> 投与の有無と再発の有無によって 4 群に分類した時、無再発群で発現の低い蛋白質 3 種類を同定し、この内の 2 種類 (vimentin, myosin IIA) が市販抗体を利用す



**Figure 2.** Immunocytochemical reactivity against TA02 (napsin A). **A:** Well differentiated adenocarcinoma of the lung. **B:** Poorly differentiated adenocarcinoma of the lung. **C:** Metastatic lung adenocarcinoma from the colon. **D:** Metastatic lung adenocarcinoma from the breast. Positive immunocytochemical reactivity was shown in **A** and **B**.

ることが可能であり、免疫組織化学染色による検証実験を行った。その結果この2種類の蛋白質が陰性の症例は術後補助化学療法の有無にかかわらず、100%の5年生存率が得られていることが分かった<sup>9</sup> (Figure 5)。従って vimentin, myosin IIA が両方とも陰性の場合 UFT<sup>®</sup>による術後補助化学療法は無用であるということが出来る。この2つの蛋白質が両方ともに陽性の場合 UFT<sup>®</sup>による術後補助化学療法によって予後の改善は得られるものの、有意な差でなかったことから術後化学療法を選択に使える直接的なバイオマーカーとはいえない。両蛋白質の発現は治療の有無に影響されていないことから単に予後因子であるとしかれない。

IB期肺腺癌ではUFT<sup>®</sup>補助化学療法施行群で約11.4%の5年生存率の上積みがあることが知られており、理想的な効果予測因子はこの11.4%に入る population を正確に予測可能であることが求められる (Figure 6)。治療の副作用によって予後の短縮する群がないと仮定すれば、この11.4%が術後補助化学療法によって予後に影響が出る唯一の population である。従って現在標準的とされ基本的に全例に施行する化学療法でも、実はこの11.4%にのみ術後補助化学療法を施行されれば全体では同様の効果があがると考えられる。今回の結果は

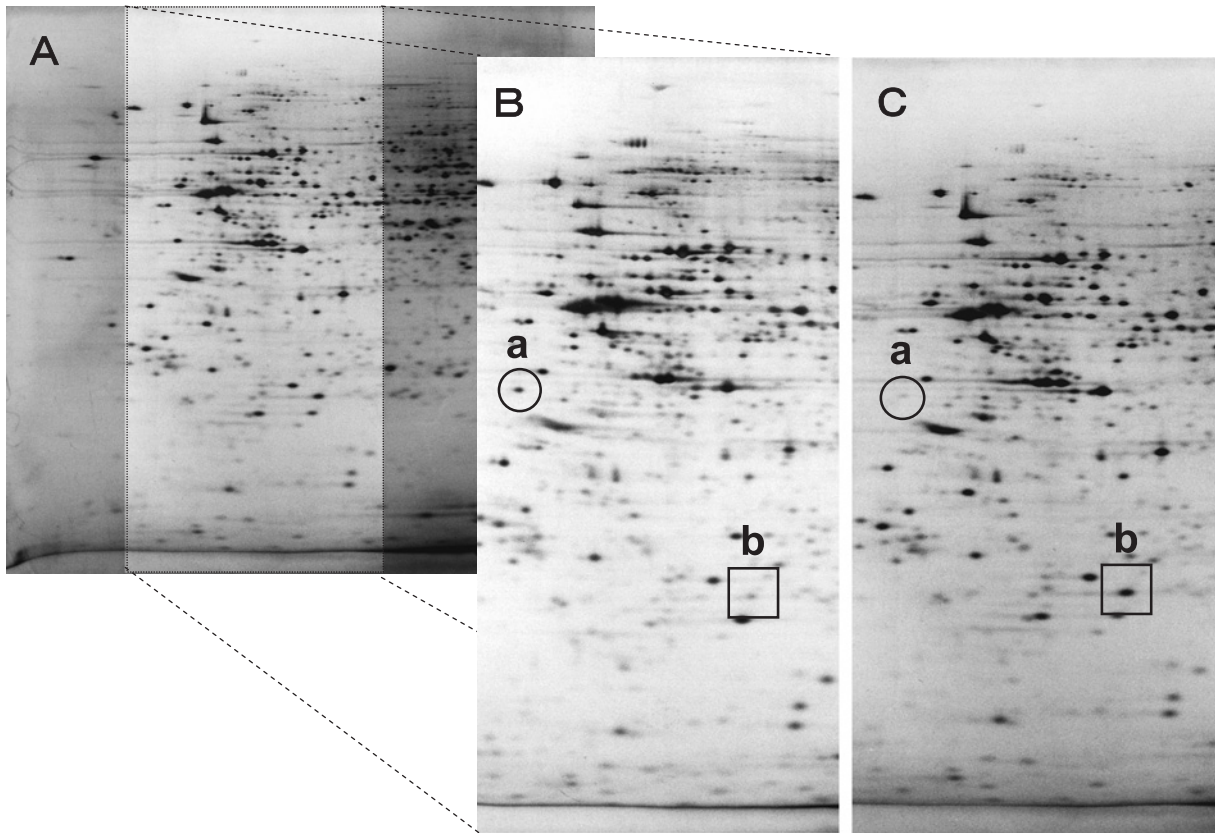
このようなプロテオーム解析によりIB期肺腺癌の術後補助化学療法としてのUFT<sup>®</sup>投与を必要としない群 (Figure 6中のC群)の約10%を検出することを可能にした意義は大きいと考えている。

### 臨床応用を目指すプロテオーム解析の今後

蛋白質の解析は遺伝子レベルの解析に比べ煩雑であるために癌研究において敬遠されがちであった。蛋白質の包括的解析 (プロテオーム解析) は特に質量分析法の技術的な進歩により、臨床検体の測定が可能になったと考えられ、数年前から盛んに行われるようになった。

当初、体液であろうと組織標本であろうと単純に癌患者由来の検体と正常者由来の検体の比較、あるいは癌部・非癌部の比較によって両者を決定的に区別する蛋白質分子が検出され、すぐに臨床応用が可能であるバイオマーカーや分子標的治療の新規標的蛋白質分子が同定されるかのように思われた。しかしながら、このような考え方に基づいた解析方法を繰り返しても実際に使えるバイオマーカーや新規標的蛋白質を検出することは極めて困難なようである。このような考え方に基づいた解析では確かに解析した検体間では発現に有意な差があると判断された蛋白質分子でも、設定された検体間の“ちがひ”





**Figure 3.** **A:** Overview of the 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) of H69 lung cancer-cultured cells. **B:** Central area in 2-DE gel in parent strain of H69. **C:** Central area in 2-DE gel in CDDP-resistant strain of H69. The intensity of spot **a** (circle) decreased remarkably in CDDP-resistant strain. On the other hand, the intensity of spot **b** (square) increased in CDDP-resistant strain. We investigated N-terminal of amino-acid sequence of these proteins, spots **a** and **b** were identified as reticulocalbin and glutathion-S-transferase- $\pi$ , respectively. Modified from reference 7.

に由来しない“ちがい”に基づいていたりする可能性が否定できない。検証実験で検証できないことが多く、また検出される多くの蛋白質分子は生体内で比較的少量に存在する蛋白質であった。このような手法で解析している限り、解析のダイナミック・レンジの不足などの技術的な問題が残ることは否めず、今後の技術革新に委ねられている部分が大いと考えられる。

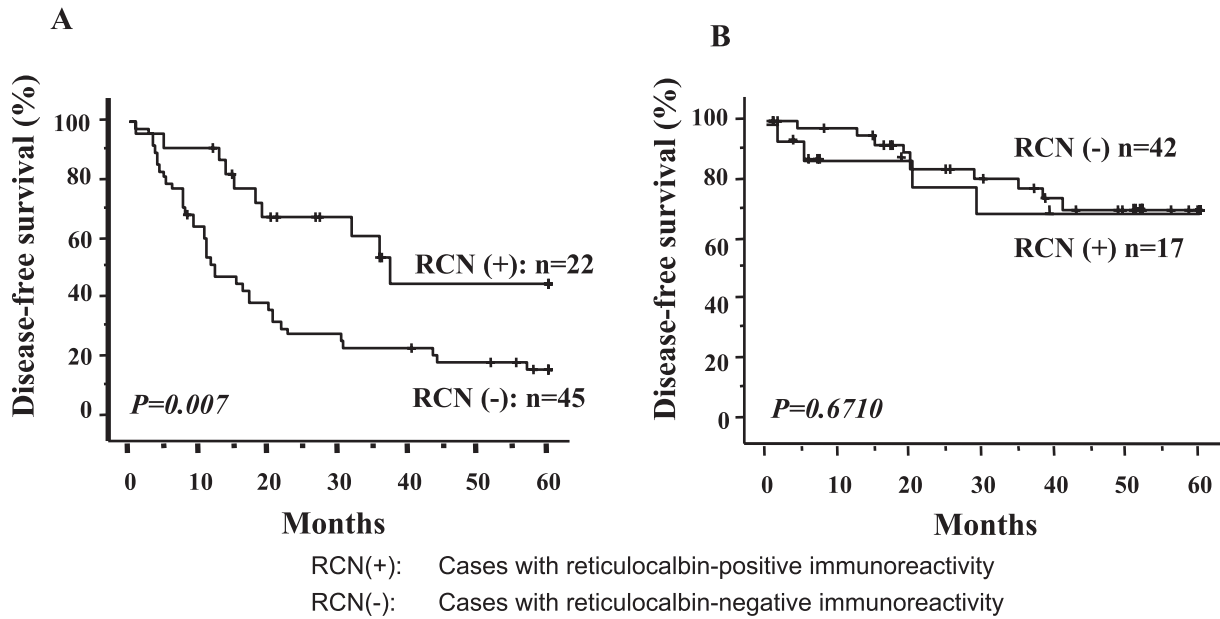
現状の解析技術を使つての探索では圧倒的に少量に存在する蛋白質（たとえば古典的な血漿蛋白質）の depletion や目的とする蛋白質の濃縮といったことでターゲットとなる蛋白質を絞り込み、その後プロテオーム解析を適応することが重要と考えられる。目的とする蛋白質はどんな性質を持つ分子か、それによって選択された方法で前処理された検体は目的蛋白質が enrich され、現状の解析技術でも目的蛋白質検出の可能性が高まる。解析目的に応じてフォーカスを絞り、前処理をした臨床検体を用いたプロテオーム解析が必要と考えている。

また、臨床検体のプロテオーム解析は組織検体では生

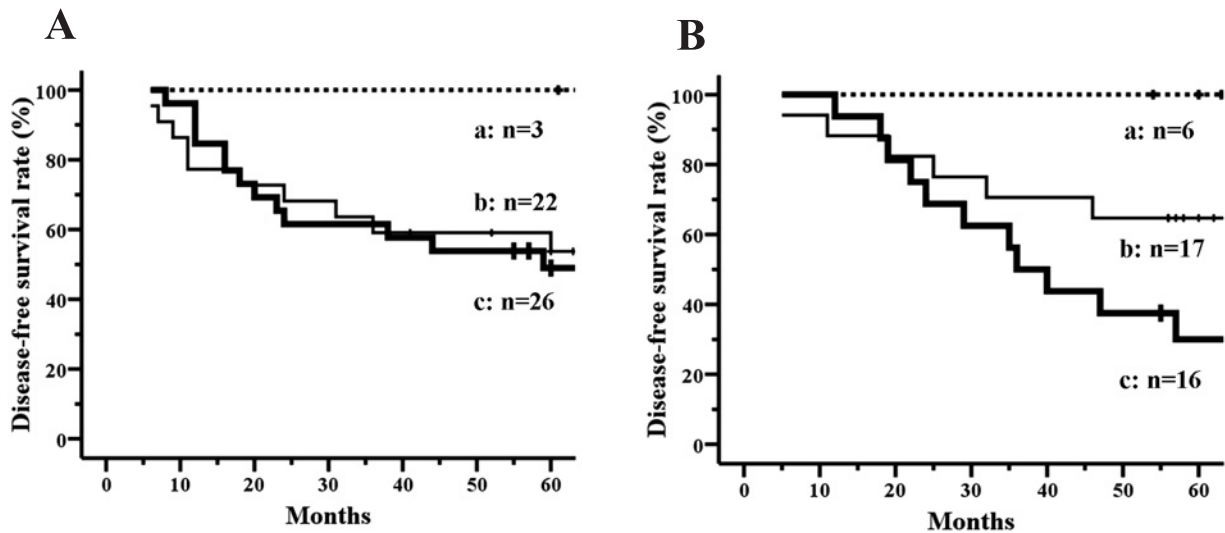
標本に限られていた。従つて微小検体や希少症例ではプロテオーム解析用の検体を確保することが困難なことが多かった。最近ホルマリン固定された標本を用い目的部位をレーザー・マイクロダイセクトした後タンパク質可溶性緩衝液 (Liquid Tissue™) で可溶化し、質量分析器で解析する方法が開発されている。マイクロダイセクトにおいても熱変性の少ない細胞採取によって約 30000 細胞を集めることで質量分析が可能になり、生検体から得られる解析とほぼ同等の解析が行えるという。ホルマリン固定で保存される日常の病理組織診断に供された残りの標本が質量分析に応用可能となれば、質量分析による蛋白質の包括的解析の応用範囲が飛躍的に広がるのが期待できる。

#### おわりに

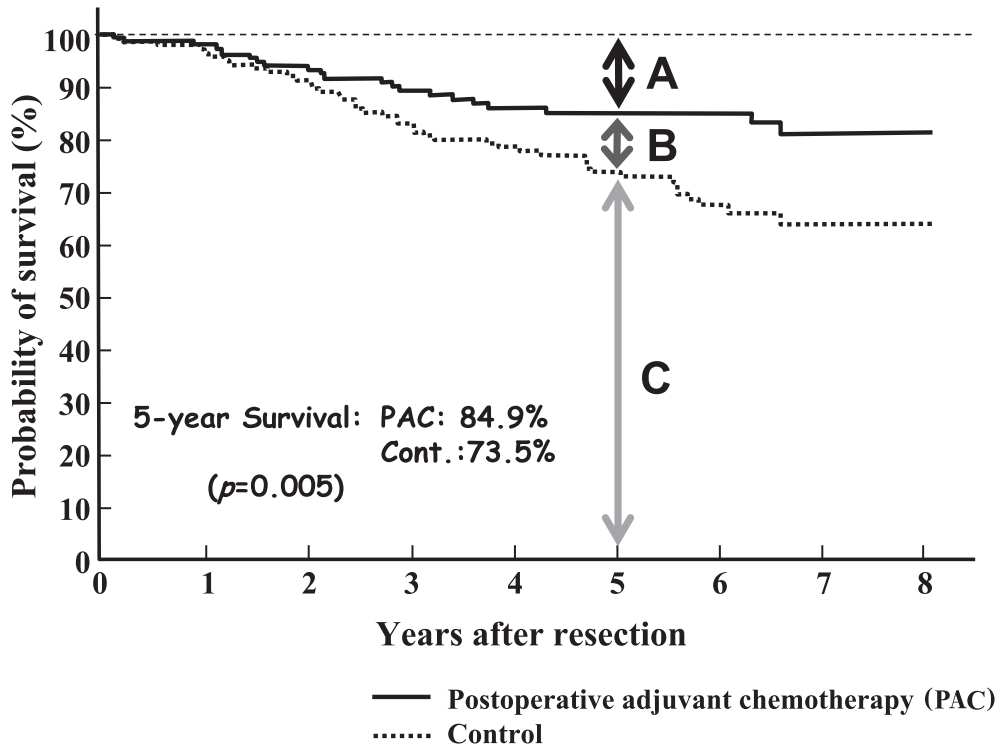
肺癌診療は気管支鏡や CT の進歩、分子標的治療薬を含めた薬物療法の選択肢が増えたものの、基本的な治療戦略決定の指標が TNM の各因子の評価による病期



**Figure 4.** Disease-free survival curves after surgical treatment in pathological stage IA-IIIb non-small cell lung cancer cases with postoperative adjuvant chemotherapy based upon platinum (A) or without any adjuvant chemotherapy (B) (modified from reference 7). When cases with platinum-based adjuvant chemotherapy were evaluated, reticulocalbin-positive cases revealed a statistically significant higher survival than reticulocalbin-negative cases ( $p=0.007$ ). On the other hand, we could not detect any statistically significant difference in survival between cases with or without expression of reticulocalbin.



**Figure 5.** Disease-free survival curves after surgical treatment in pathological stage I lung adenocarcinoma cases with postoperative adjuvant chemotherapy using uracil-tegafur (A) or without any adjuvant chemotherapy (B) (modified from reference 9). **a:** Cases lacking both myosin IIA and vimentin expression, **b:** Cases negative for myosin IIA expression and positive for vimentin expression, or positive for myosin IIA and negative for vimentin expression, **c:** Cases positive for both myosin IIA and vimentin expression. Disease free survival rate at 5 years in cases lacking both myosin IIA and vimentin expression was 100% in both A and B. When the cases showing positive expression of both proteins were evaluated, there was a 5-year-survival rate benefit of approximately 19% in patients who had undergone postoperative adjuvant chemotherapy using uracil-tegafur, but there was no statistically significant difference between patients who had and who had not received postoperative adjuvant chemotherapy using uracil-tegafur.



**Figure 6.** Overall survival curves after surgical treatment in pathological stage IB lung adenocarcinoma cases with postoperative adjuvant chemotherapy using uracil-tegafur (A) or with surgery alone (B) (modified from reference 8). If we can postulate that the possibility that death due to adverse effects of adjuvant chemotherapy approaches zero, the patients who belong to area A can be considered non-responders for adjuvant chemotherapy. Therefore, only the patients contained in area B would seem to benefit from chemotherapy, and it is this group that we must identify before treatment. Our final aim is that patients who belong to area B are accurately identified using new biomarkers and that only responders undergo adjuvant chemotherapy.

(stage) 分類に基づいて構築されることに大きな変化はない。TNM 分類は定期的に微調整がされているが、2010 年改定される TNM 分類による staging にしても画像診断を中心とした基準で判断される腫瘍の進行状況の現状把握である。現在の肺癌治療戦略は最初に小細胞癌と非小細胞癌に大きく 2 分されるが、それ以外に腫瘍の生物学的性格を反映する因子がないままに肺癌治療の標準治療は規定されている。個別化治療の実現のためには現状の病期分類を基礎に各種バイオマーカーを判断基準に治療法選択・手術術式選択・治療薬選択が行われることが求められよう。肺癌診療において早期発見と新しい治療戦略としての個別化治療に貢献するバイオマーカー探索のために、プロテオーム解析に期待されるものは大きい。しかしながら従来の臨床検体を用いた発現プロテオミクスの解析手法でバイオマーカーを拾い上げるにはさらなる革新的技術革新がなければ限界がみえている。現状のプロテオミクスの技術水準を見据えた上で、基礎医学の研究者と臨床家が主導で探索目的にかなった臨床検体処

理をデザインし、プロテオミクスによるバイオマーカー探索がさらに展開されていくことを期待したい。

#### REFERENCES

1. Chen R, Pan S, Brentnall TA, Aebersold R. Proteomic profiling of pancreatic cancer for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:523-533.
2. Franzèn B, Linder S, Okuzawa K, Kato H, Auer G. Nonenzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1993; 14:1045-1053.
3. Hirano T, Franzèn B, Uryu K, Okuzawa K, Alaiya AA, Vanky F, et al. Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br J Cancer*. 1995;72:840-848.
4. Hirano T, Fujioka K, Franzèn B, Okuzawa K, Uryu K, Shibamura H, et al. Relationship between TA01 and TA02 polypeptides associated with lung adenocarcinoma and histocytological features. *Br J Cancer*. 1997;75: 978-985.
5. 平野 隆, 竹川広三, 日吉利光, 田口史子, 大平達夫, 池

- 田徳彦, 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.
6. Hirano T, Auer G, Maeda M, Hagiwara Y, Okada S, Ohira T, 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.
  7. Hirano T, Kato H, Maeda M, Gong Y, Shou Y, Nakamura M, et al. Identification of postoperative adjuvant chemotherapy responders in non-small cell lung cancer by novel biomarker. *Int J Cancer*. 2005;117:460-468.
  8. Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 2004;350:1713-1721.
  9. Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of post-operative therapy. *Br J Cancer*. 2008;98:596-603.