

ORIGINAL ARTICLE

肺腺癌細胞の分泌蛋白質群

—外科的切除組織の培養上清に含まれる診断バイオマーカー候補の同定—

果 然<sup>1</sup>・平野 隆<sup>2</sup>・川上隆雄<sup>1,3</sup>・糞 雲波<sup>1</sup>・野村将春<sup>1</sup>・  
山口 学<sup>1</sup>・佐治 久<sup>1</sup>・垣花昌俊<sup>1</sup>・大平達夫<sup>1</sup>・池田徳彦<sup>1</sup>

Proteins Secreted by Lung Adenocarcinoma Cells  
—Identification of Candidate Diagnosis Markers from Culture Supernatants  
of Dissected Tumor Tissue—

Ran Guo<sup>1</sup>; Takashi Hirano<sup>2</sup>; Takao Kawakami<sup>1,3</sup>; Yunbo Gong<sup>1</sup>; Masaharu Nomura<sup>1</sup>;  
Gaku Yamaguchi<sup>1</sup>; Hisashi Saji<sup>1</sup>; Masatoshi Kakihana<sup>1</sup>; Tatsuo Ohira<sup>1</sup>; Norihiko Ikeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, Tokyo Medical University, Japan; <sup>2</sup>Toda Chuo General Hospital, Japan; <sup>3</sup>Research and Development Division, Medical ProteoScope Company, Japan.

**ABSTRACT** — **Objective.** There is a need to establish clinically useful serum biomarkers for effective lung cancer screening. We investigated extracellular proteins secreted or shed from surgically resected lung adenocarcinoma tissue into its primary culture medium. **Methods.** In 12 lung adenocarcinoma cases, protein specimens from both culture supernatants of adenocarcinoma tissue and the normal peripheral lung (NPL) tissue were labeled with different fluorescent dyes (CyDye™: Cy2, Cy3 and Cy5) and co-resolved in single two-dimensional (2-D) gels. Quantitative protein profiles were obtained by differential fluorescence imaging of the gels. **Results.** The twelve pairs of 2-D gel images of both adenocarcinoma and NPL specimens revealed 34 distinct protein spots, detected in at least 5 gel images and highly concentrated in the adenocarcinoma cultures, on average more than double the concentration of analysis identified all of these protein spots, including napsin A and pulmonary surfactant-associated protein A which are responsible for the development of type II pneumocytes, and are the proteins commonly upregulated in tumor cells. **Conclusion.** These results suggest the usefulness of the tissue culture method to identify potential serum biomarkers to enable the early detection of lung adenocarcinoma.

(JLJC. 2010;50:141-150)

**KEY WORDS** — Serum biomarker, Secreted protein, Early detection, Two-dimensional difference gel electrophoresis, Lung adenocarcinoma

Reprints: Takashi Hirano, Toda Chuo General Hospital, 1-19-3 Honcho, Toda-shi, Saitama 335-0023, Japan (e-mail: hirano-t@chuobyoin.or.jp).

Received December 2, 2009; accepted March 2, 2010.

**要旨** — **目的.** 肺癌の早期診断に有用なバイオマーカーの確立は治療成績向上のための重要な課題である。我々は血清マーカーを探索する目的で、肺腺癌組織から分泌あるいは漏出する一群の蛋白質を分析した。**方法.** 外科的に切除した12症例の肺腺癌組織および同じ症例の正常な末梢肺組織を各々無血清培地で短期培養した。培養上清中の癌組織および正常組織由来の蛋白質を、異なる蛍光波長を持つ色素化合物 (CyDye™: Cy2, Cy3

and Cy5)でそれぞれ標識した。標識試料を症例ごとに混合後、各々二次元電気泳動で展開した。**結果.** 二次元ゲル上で検出された蛋白質スポットのうち、34個のスポットは少なくとも5症例から検出され、かつ正常組織に対する癌組織の平均蛍光強度比が2.0以上を示した ( $p < 0.05$ )。質量分析を含む解析手順により34スポットのすべてから有意な蛋白質同定結果を得た。同定された蛋白質には、napsin Aやpulmonary surfactant-associated

<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>株式会社メディカル・プロテオスコープ研究開発部。  
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 (e-mail: hirano-t@chuobyoin.or.jp)。  
受付日：2009年12月2日，採択日：2010年3月2日。

protein A など, II 型肺胞上皮細胞への組織学的分化を示す蛋白質が含まれていた。また, 腫瘍組織全般に共通して発現の亢進することが示唆される蛋白質も同定された。結論. 組織培養からのアプローチは肺腺癌の血清

マーカーの候補蛋白質を同定するために有効である。

**索引用語**——血清マーカー, 組織分泌蛋白質, 早期診断, 二次元電気泳動法, 肺腺癌

## はじめに

最近の肺癌診療の進歩, とくに画像診断, 分子標的治療や集学的治療などの進展にもかかわらず, 肺癌は依然として世界的に癌死の主要な原因であり続けている。<sup>1,2</sup> ここ 20 年の間, 早期発見のみが肺癌による死亡を減らす唯一の方法ではないかといわれてきた。ほとんどの臨床医は, 肺癌の早期発見が治療成功に導く第一段階であり, 予後の改善に最も有効であることを認識している。

肺癌スクリーニングのために低線量 computed tomography (低線量 CT) を用いた臨床試験が試みられている。しかしながら, この方法が一般の健診に普及するには, 末梢肺野の微小病変の過剰評価の問題, 読影のための人的資源の不足, 医療経済・財政的な問題など解決すべき問題が数多く残されている。<sup>3,4</sup>

こういった状況でバイオマーカーによる血清診断は最も有望な方法論の 1 つだと考えられているが, 臨床的に有効な肺癌特異的バイオマーカーはいまだ実用化されていない。現在臨床で用いられているいわゆる腫瘍マーカーは感度・特異度ともに低いため早期診断に用いるには不適切であり, 新規バイオマーカーの開発が待たれている。

原発性肺腺癌の早期診断に有効なバイオマーカー蛋白質を探索するため, 本研究では組織培養液に注目した。すなわち, 肺葉切除によって得られた外科切除検体から腫瘍組織と正常末梢肺組織を別々に採取し, それぞれの組織の短期培養で培養上清中に分泌・漏出する一群の蛋白質を解析した。蛋白質の解析には蛍光標識ディファレンス二次元ゲル電気泳動法 (two-dimensional difference gel electrophoresis : 2-D DIGE)<sup>5,6</sup> と質量分析法 (mass spectrometry : MS) を用い, 正常末梢肺組織に比較して腫瘍組織由来の培養上清中により多く検出される蛋白質を新規バイオマーカーの候補として検討した。

## 研究材料および方法

本研究計画は東京医科大学倫理委員会による審査を経て承認された (承認番号 702)。著者らは肺癌患者に対して書面での説明を行い, 本人が署名同意した個人のみから臨床試料の提供を受けた。

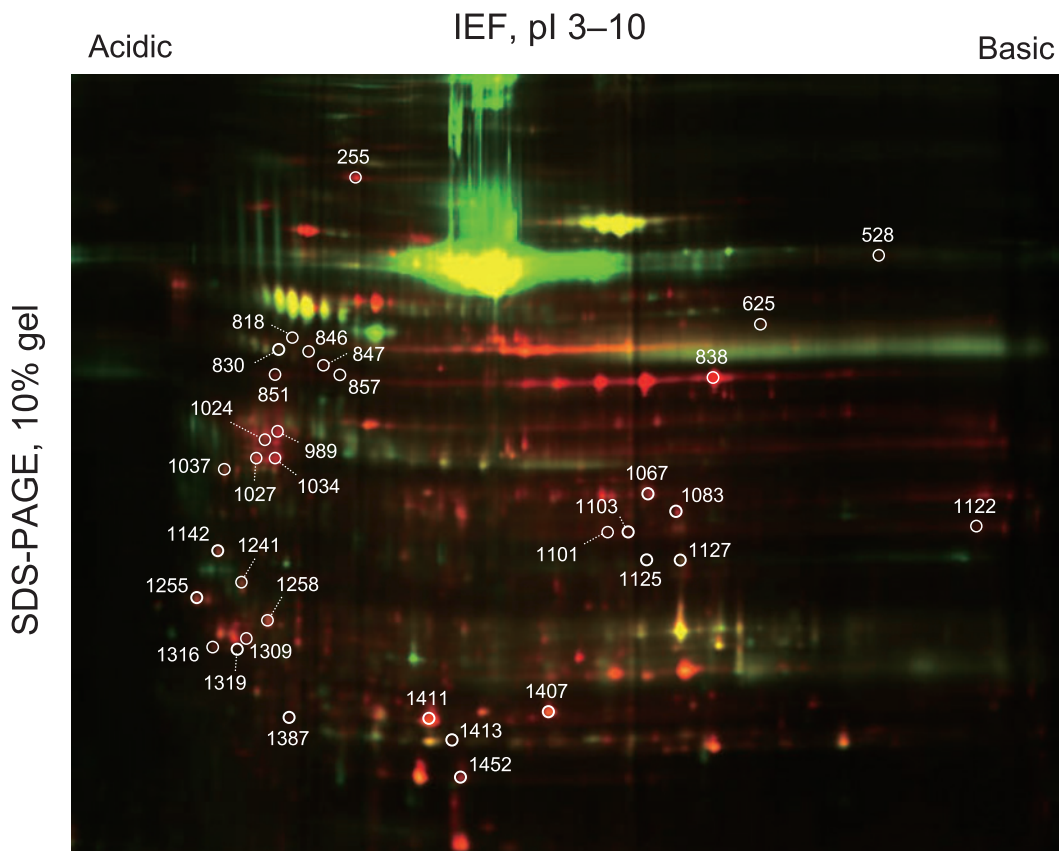
2008 年 5 月から 8 月の間に肺葉切除術を施行し, 術前

に肺腺癌の診断が得られていた 12 例の患者から腫瘍組織および正常末梢肺組織を採取した (Table 1)。正常末梢肺組織は腫瘍から極力離れた摘出肺から採取した。腫瘍組織と正常組織を別々に細切し, 各細切試料に無血清組織細胞培養用培地 TIL Media I (免疫生物学研究所, 藤岡) を加えた (組織湿重量約 50 mg あたり培地 1 ml の割合)。組織/培地の懸濁液を直径 10 cm の培養用シャーレで 5 日間培養した (37°C, 5% v/v CO<sub>2</sub> 条件下)。培養液の上清を回収, 凍結乾燥した後, 1.0 ml の試料緩衝液 (7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 4% w/v 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate (CHAPS), 30 mM Tris-HCl, pH 8.5) に溶解した。溶解液を 12000×g, 4°C で 5 分間遠心し, その上清を回収した。2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare 社, 英国) を用いて上清に含まれる蛋白質混合物を精製し, これを 2-D DIGE 用の試料とした。

2-D DIGE は Ettan™ DIGE System User Manual (GE Healthcare) にしたがって実施した。最初に, 腫瘍組織由来の蛋白質試料, 正常末梢肺由来試料, および両試料の

**Table 1.** Clinical Features of 12 Lung Adenocarcinoma Cases

Characteristics	
Age, years	
Mean	62.7
Range	49-78
Gender, n	
Men	7
Women	5
Pathological stage, n	
IA	6
IB	2
IIA	2
IIIB	2
Pathological subtype, n	
Adenocarcinoma with mixed subtypes	8
Papillary adenocarcinoma	3
Solid adenocarcinoma with mucin type	1
Histopathological differentiation, n	
Well differentiated	6
Moderately differentiated	5
Poorly differentiated	1



**Figure 1.** Representative two-dimensional difference gel electrophoresis image comparing tissue cultures of lung adenocarcinoma and normal peripheral lung (NPL). Protein specimens were prepared separately from the tissue cultures of adenocarcinoma and NPL, followed by labeling with Cy3 (red) and Cy5 (green) dyes, respectively. Equal amounts of these labeled protein specimens were mixed, added to the internal control sample labeled by Cy2, and co-resolved by 2-D electrophoresis in the single gels. The spot colors represent protein amounts as a continuum of relative expression levels on the adenocarcinoma culture, from bright red (high amount) to green (low amount). The 34 protein spots marked by circles show high amounts (on average more than double) in the 12 pairs of 2-D DIGE images of adenocarcinoma/NPL ( $p < 0.05$ ). Spot numbers correspond to those in Table 2 and Figure 2. IEF, isoelectric focusing; pI, isoelectric point; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; DIGE, difference gel electrophoresis.

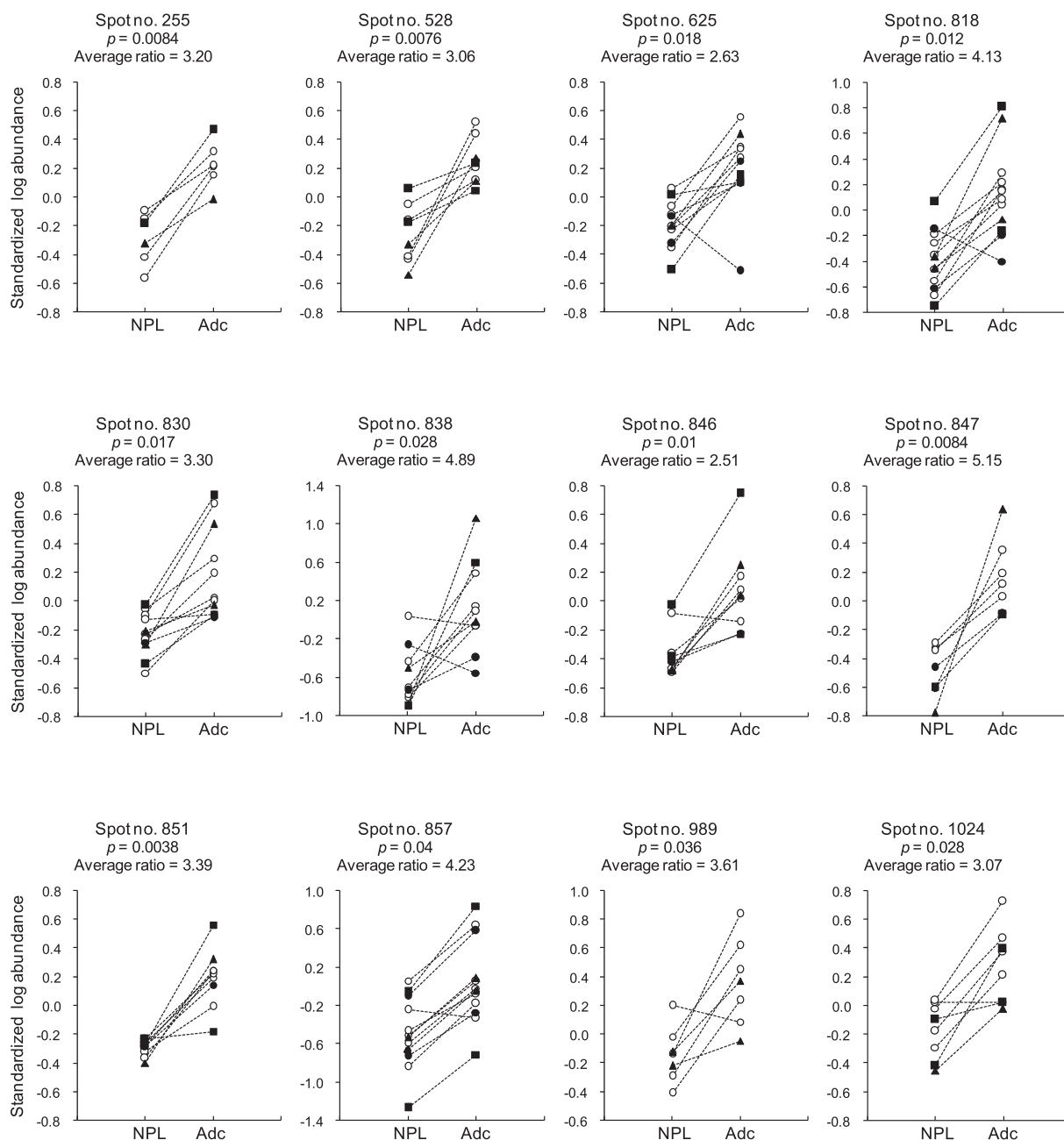
12 症例分をすべて等量混合した試料を、3 種類の蛍光試薬 Cy3、Cy5 および Cy2 minimal dye (GE Healthcare) でそれぞれ標識した。等量混合試料の Cy2 蛍光強度は、Cy3 と Cy5 の強度を正規化するために用いた。蛍光標識した 3 試料の各々 50  $\mu\text{g}$  蛋白質分を混合し、膨潤法<sup>7</sup>によって一次元目の等電点電気泳動 (isoelectric focusing: IEF) 用のポリアクリルアミドゲル (Immobiline DryStrip, pH 3-10, 長さ 24 cm: GE Healthcare) に添加した。1 回の電気泳動で用いる試料の総蛋白質量は 150  $\mu\text{g}$  であった。

膨潤ゲルに通電して IEF を行った。IEF 終了後のゲルは sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む平衡化緩衝液に浸して振とうした。SDS 平衡化後、IEF ゲルを SDS-ポリ

アクリルアミドゲル (ゲル濃度 10% w/v) の上辺に乗せ、二次元目の泳動を行った。

二次元電気泳動の終了後、二次元ゲルを直ちに画像解析にかけた。画像解析装置 Typhoon 9400 (GE Healthcare) を用いて、Cy2、Cy3 および Cy5 のそれぞれ極大蛍光波長でゲル 1 枚あたり 3 種類の蛋白質スポット画像を取得した。続いて、取得画像からの蛋白質スポットの検出、Cy3 と Cy5 の蛍光強度の正規化、およびゲル間のスポットマッチングを行った。こうして得られた 12 症例分の蛍光強度データから各蛋白質スポットについて統計解析を行った。

自動スポット回収装置 Ettan<sup>TM</sup> Spot Picker (GE Healthcare) を用いて二次元ゲルから蛋白質スポットを



**Figure 2.** Distribution of protein amounts in 2-D DIGE spots. For each of the selected 34 protein spots (Figure 1), protein amounts are shown as Cy5 and Cy3 fluorescence intensities from the tissue cultures of both NPL and adenocarcinoma (Adc), respectively. Standardized log abundance is a logarithmic representation of the fluorescence intensity standardized with co-measured Cy2 intensity. Dots indicate the adenocarcinoma cases of stages IA (○), IB (●), IIB (▲) and IIIB (■) (Table 1), connected by a broken line for each of the individual cases. The scatter plot graphs also indicate the p-value between NPL and Adc, and the ratio of the averaged fluorescence intensities of Adc to NPL (average ratio).

切り出した。回収した各ゲル片に対してトリプシン (Promega 社, 米国) による加水分解処理を施した。<sup>8</sup> 加水分解によって生じたペプチド混合物をゲル片から抽出し、減圧乾燥後に -80°C で保存した。ペプチド混合物の質量分析には全自動の液体クロマト

グラフィー-タンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry : LC-MS/MS) システムを用いた。<sup>9</sup> 以前に報告した手順と装置設定<sup>9</sup> で試料ごとに測定を実施したが、MS/MSには Finnigan™ LTQ™ イオントラップ質量分析計<sup>10</sup> (Thermo Fisher Scientific 社,

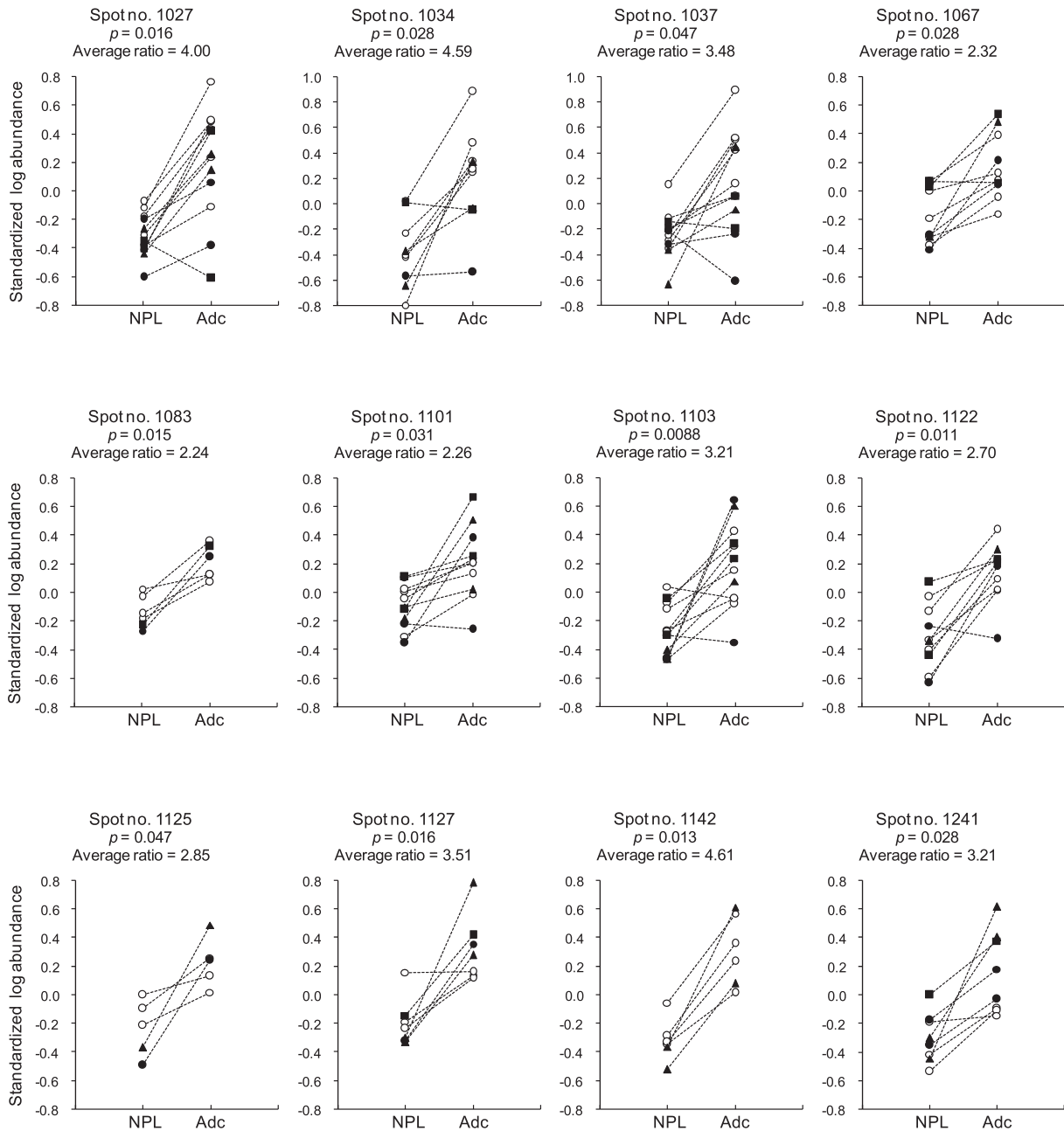


Figure 2. (Continued)

米国) を使用した。

各蛋白質スポットから取得したMS/MSデータをSwiss-Prot配列データベース (<http://www.uniprot.org/>) と照合し、スポットに含まれる蛋白質を同定した。<sup>11</sup> 照合用のソフトウェアとして Mascot (Matrix Science 社, 英国) を用いた。<sup>12</sup> 各照合結果については、当該アミノ酸配列に与えられる同定閾値 (identity threshold) を超えるイオンスコアを示すペプチド同定を有意とみなした。有意スコアかつユニークなアミノ酸配列を持つペプチド同定を配列エントリーごとに数え上げた。各

蛋白質スポットで最多のペプチド同定数が与えられた配列エントリー、およびその最多同定数の少なくとも半分の数のペプチド同定が与えられたエントリーまでを有意な蛋白質同定として考慮した。ただし、ケラチンの同定は人為的な汚染による可能性が高いため、上記の考慮から除外した。

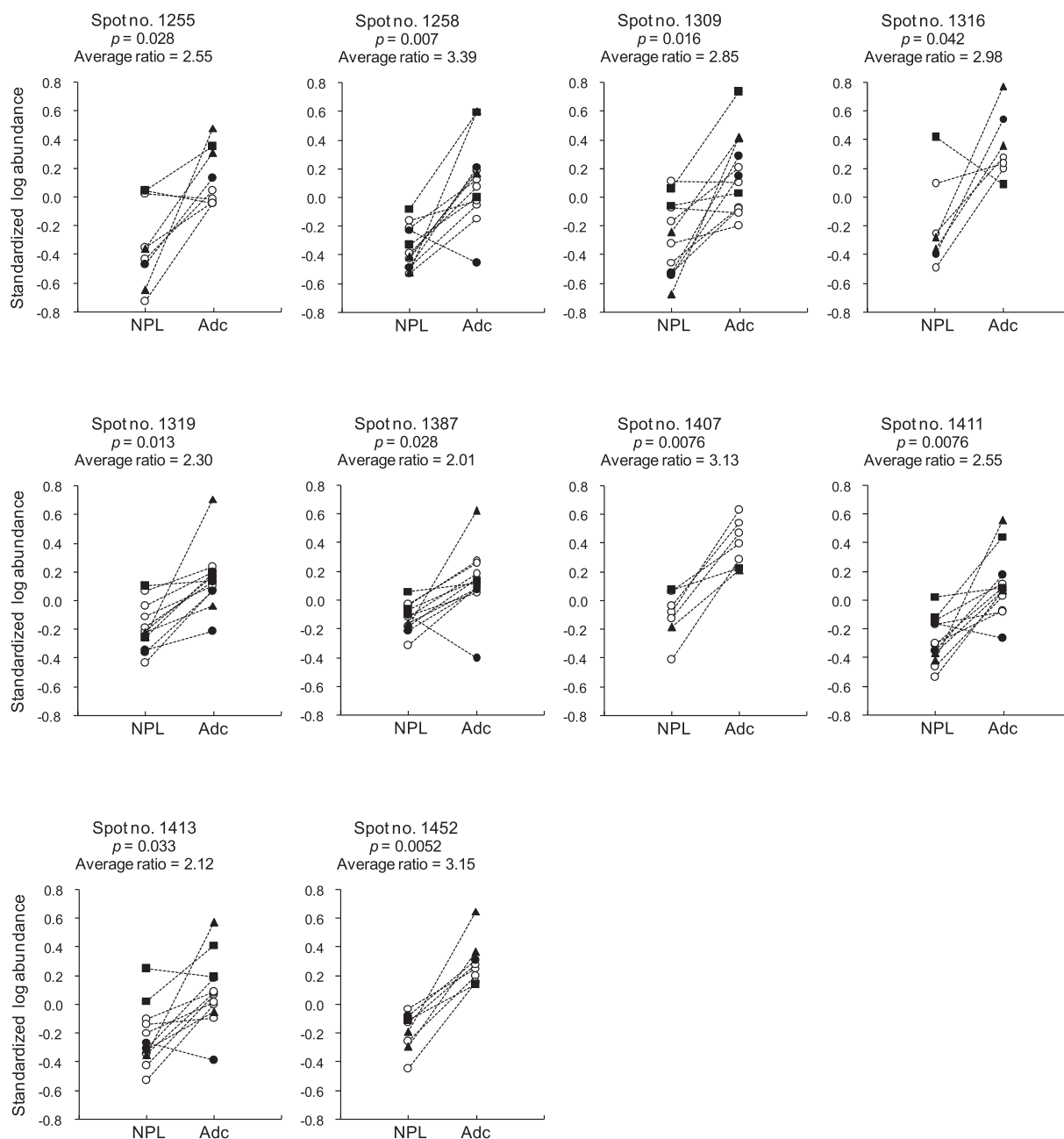


Figure 2. (Continued)

## 結果

### 1) 二次元ゲル上における蛋白質スポットの検出と蛍光強度測定

肺腺癌組織および正常末梢肺組織の無血清培養から回収した培地の上清を各々濃縮し、2-D DIGE によるプロテオーム比較解析を行った。蛍光色素の反応量が蛋白質量と比例しているため、比較群間の蛋白質の相対量は蛍光色素の強度比として表わされる。<sup>5</sup>

二次元ゲル上に検出された計 1413 個の蛋白質スポッ

トに対して統計処理を施した。その結果、以下の条件をすべて満たす蛋白質スポットを合計 34 個選択した。① 12 症例における、正常末梢肺組織 (Cy5) に対する肺腺癌組織 (Cy3) の平均蛍光強度比 (平均 Cy3 強度/平均 Cy5 強度) が 2.0 以上、② 両群間の蛍光強度比の有意水準 ( $p$  値) が 0.05 未満 (Student の  $t$  検定)、③ 当該スポットが検出された症例数が 5 以上。

34 スポットの二次元ゲル上の位置を Figure 1 に示す。また、Figure 2 には各蛋白質スポットにおける蛍光強度の散布図を示す。いずれのスポットにおいても、正

**Table 2.** Protein Identifications Included in the 34 Protein Spots\*

Spot number	Fluorescence intensity ratio <sup>†</sup>	<i>p</i> -value	Protein name	Number of unique peptides identified <sup>‡</sup>	Sequence coverage (%) <sup>§</sup>	Swiss-Prot accession number <sup>  </sup>
847	5.15	0.008	alpha-Enolase	17	50.5	P06733
838	4.89	0.028	alpha-Enolase	42	75.8	P06733
1142	4.61	0.013	Tropomyosin alpha-4 chain	3	14.1	P67936
			Heat shock cognate 71 kDa protein	3	4.3	P11142
			Pulmonary surfactant-associated protein A1 <sup>¶</sup>	2	11.3	Q8IWL2
			Pulmonary surfactant-associated protein A2 <sup>¶</sup>			Q8IWL1
			78 kDa glucose-regulated protein	2	3.8	P11021
1034	4.59	0.028	Vimentin	10	22.5	P08670
			Hepatoma-derived growth factor	5	34.2	P51858
857	4.23	0.040	Cathepsin D	18	53.2	P07339
818	4.13	0.012	Protein disulfide-isomerase A6	16	44.1	Q15084
1027	4.00	0.016	alpha-1-Antitrypsin	2	6.9	P01009
989	3.61	0.036	Cathepsin D	2	7.5	P07339
1127	3.51	0.016	L-Lactate dehydrogenase A chain	6	25.6	P00338
			Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6	25.1	P40925
			Annexin A2	5	17.1	P07355
			L-Lactate dehydrogenase B chain	3	15.9	P07195
1037	3.48	0.047	Desmin	3	8.3	P17661
851	3.39	0.004	alpha-Enolase	13	50.9	P06733
1258	3.39	0.007	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	6	42.6	P52565
			14-3-3 protein zeta/delta	4	22.9	P63104
			Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	3	23.0	Q2TAA2
			alpha-Enolase	3	9.0	P06733
			Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	3	5.4	Q9Y4E8
830	3.30	0.017	alpha-Enolase	10	36.6	P06733
			ATP synthase subunit beta, mitochondrial	6	15.9	P06576
1103	3.21	0.009	L-Lactate dehydrogenase B chain	24	70.4	P07195
1241	3.21	0.028	78 kDa glucose-regulated protein	5	13.0	P11021
			Pulmonary surfactant-associated protein A1 <sup>¶</sup>	3	16.9	Q8IWL2
			Pulmonary surfactant-associated protein A2 <sup>¶</sup>			Q8IWL1
			Complement C1s subcomponent	3	7.3	P09871
255	3.20	0.008	alpha-Actinin-4	10	14.8	O43707
			Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	6	36.5	P04179
1452	3.15	0.005	Peroxiredoxin-2	2	14.1	P32119
			Protein DJ-1	2	13.8	Q99497
1407	3.13	0.008	Glutathione S-transferase P	10	60.0	P09211
			Peroxiredoxin-6	8	45.5	P30041
			Peroxiredoxin-2	7	30.3	P32119
1024	3.07	0.028	alpha-1-Antitrypsin	3	12.4	P01009
528	3.06	0.008	Transketolase	10	29.5	P29401
1316	2.98	0.042	Ig kappa chain C region	4	63.2	P01834
			Tumor protein D52	3	19.6	P55327
			14-3-3 protein zeta/delta	2	10.6	P63104
			mu-Crystallin homolog	2	9.9	Q14894
			Serum amyloid P-component	2	9.0	P02743
			Napsin A	2	7.4	O96009
			alpha-Enolase	2	5.8	P06733
1125	2.85	0.047	Thiosulfate sulfurtransferase	13	57.6	Q16762
1309	2.85	0.016	Protein disulfide-isomerase	7	14.6	P07237
			14-3-3 protein beta/alpha	5	23.2	P31946
			Tumor protein D52	4	25.0	P55327

Table 2. (Continued)

1122	2.70	0.011	L-Lactate dehydrogenase A chain	14	63.6	P00338
			L-Lactate dehydrogenase B chain	8	33.8	P07195
625	2.63	0.018	Transketolase	9	28.4	P29401
1255	2.55	0.028	14-3-3 protein zeta/delta	12	51.4	P63104
			14-3-3 protein gamma	7	49.8	P61981
1411	2.55	0.008	Protein DJ-1	30	88.4	Q99497
846	2.51	0.010	alpha-Enolase	19	56.0	P06733
1067	2.32	0.028	Ester hydrolase C11 or f54	7	41.0	Q9H0W9
			Transaldolase	6	20.2	P37837
			Annexin A1	5	16.5	P04083
1319	2.30	0.013	Proteasome subunit alpha type-5	11	62.2	P28066
1101	2.26	0.031	Putative quinone oxidoreductase	9	41.0	Q53FA7
			L-Lactate dehydrogenase B chain	7	23.4	P07195
			Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6	21.0	P40925
1083	2.24	0.015	L-Lactate dehydrogenase B chain	7	28.7	P07195
			Putative quinone oxidoreductase	4	16.9	Q53FA7
1413	2.12	0.033	Protein DJ-1	8	63.5	Q99497
1387	2.01	0.028	Proteasome subunit alpha type-5	5	19.5	P28066
			Translationally-controlled tumor protein	4	44.2	P13693

\*Protein identification was accepted if it contained the maximum number of unique peptides in each spot or at least half of the number.

†The ratio of lung adenocarcinoma to normal peripheral lung (NPL) on the fluorescence intensity value averaged in each group. ‡Peptide identification was accepted if Mascot ion score given to a product ion spectrum was greater than the associated identity threshold. §The ratio of identified peptides to protein on the number of amino acid residues contained. ¶<http://www.uniprot.org/>. ¶¶These proteins contain the identical identified peptides and could not be differentiated based on MS/MS alone.

常末梢肺組織に比べて肺腺癌組織の培養上清の蛍光強度がより高い症例を多く含んでいた。また、少なくとも4個のスポット(1125, 1127, 1241, および1255)の癌組織上清では、IA期に比べてより進行している病期(IIA, IIB, およびIIIB期)で高い蛍光強度が検出された。これらのスポットからはそれぞれ異なる蛋白質が同定された(後述)。

## 2) LC-MS/MSと配列データベース検索による蛋白質スポットの同定

トリプシン処理によって各蛋白質スポットから得られたペプチド混合物をLC-MS/MSにかけた。取得したペプチドMS/MSデータをSwiss-Prot配列データベースと照合した。「研究材料および方法」の項で記述したとおり、スポットあたり2種類以上の蛋白質同定もそれぞれ有意と認めた。34個のスポットの分析で合計44種類の有意な蛋白質同定結果を得た(Table 2)。34スポットのうち、半数の17個からは単一の蛋白質が同定された。その他の17スポットからは2種類から7種類の蛋白質が同定された。後者については、スポットに含まれる2種類以上の蛋白質の増減の結果がスポット蛍光強度の正味の増加に反映されている可能性がある。また、44種類の蛋白質同定のうち、28種類は単一スポットからの同定であった。残りの16種類は複数のスポットから同定された。たとえば、alpha-enolaseの同定は7つのスポットか

ら得られた(スポット番号830, 838, 846, 847, 851, 1258 および1316)(Figure 1, Table 2)。これらの繰り返し同定の理由としては、異なる翻訳後修飾またはプロセッシングによって成熟蛋白質の等電点と分子量に違いが生じたことなどを推定した。

同定された蛋白質の中には、alpha-enolase, napsin A や pulmonary surfactant-associated protein A1/A2 (SP-A)など、すでに腫瘍マーカーとして汎用されている分子が含まれていた。

## 考察

肺腺癌は肺末梢に発症する代表的な原発性肺癌であり、多くの先進国で肺癌全体の半数以上を占めるに至っている。<sup>13</sup>しかし、現在臨床的に肺腺癌のために用いられる、いわゆる血清腫瘍マーカーには肺腺癌に特異的なものはなく、治療効果の判定や、治療後の経過観察中の再発予測あるいは診断に用いられているに過ぎない。肺腺癌は早期に発見して外科的に切除すれば治療率が高い。このため、早期診断のスクリーニングにも応用可能なバイオマーカーの必要性が求められて久しい。<sup>14,15</sup>

血清中には、悪性新生物組織を含むすべてのヒト組織の生理学的および病理学的変化を反映する蛋白質情報が含まれると予想されている。近年のMSの発達に伴う血清プロテオミクス研究の新展開に際しては、この方法論



によって肺腺癌に特異的なバイオマーカーの同定を含め、臨床的にもすぐに応用可能な有益な情報が容易に得られるのではないかと大いに期待が集まった。<sup>16</sup> しかしながら、血清アルブミンや免疫グロブリンをはじめとする高濃度の血清蛋白質と、実際にバイオマーカーの候補となりうる腫瘍細胞分泌・漏出蛋白質との間には膨大なダイナミックレンジが存在する。<sup>17</sup> この問題は現在のMS技術でも克服されるまでには至っていない。血清アルブミンや免疫グロブリンを除去したとしても、残るダイナミックレンジへの対応は依然として困難である。

ところで、腫瘍組織を無血清培地で短期間培養すると、たとえ一部の癌細胞が培養中に壊れるとしても、生きた癌細胞が無血清培地中に蛋白質を分泌し続けることが予測される。著者らは、この無血清培地中に分泌・漏出する腫瘍由来蛋白質は癌患者血清でも検出される可能性が高いのではないかと考えた。このアプローチにはすでに癌組織由来の培養細胞を用いた報告がある。<sup>18,19</sup> 著者らが以前に行った予備実験では、検討した数種の肺腺癌培養細胞で napsin A が二次元ゲル上で検出されなかった(未発表データ)。napsin A は II 型肺胞上皮細胞に高発現し、粘液産生性の細気管支肺胞上皮癌を除く原発性肺腺癌の約 90% に発現している。<sup>20</sup> この経験から培養細胞を用いた解析ではバイオマーカーの候補となる組織分化関連蛋白質のいくつかは同定されない可能性が高いと考えた。そこで本研究では、切除標本から得られた癌組織の初代培養を試み、その培養上清を解析する方法を採った。また、腺癌組織の培養上清中で存在量が有意に低下する蛋白質も検出されたが、発現低下蛋白質は血清バイオマーカーとしての臨床応用にはなじみにくいと考えた。そこで、今回の解析では正常組織に比べて腺癌の培養上清で存在量が高い蛋白質分子の解析に焦点を絞った。

今回の解析で、腺癌の培養上清で存在量が有意に増加した蛋白質分子は 2 種類に分類される。つまり、悪性腫瘍組織で共通に高発現していることが多い蛋白質分子と、肺組織特異的な組織分化抗原である。前者は正常細胞が悪性の生物学的特性を獲得すること (malignant transformation) で発現増加する蛋白質分子であり、肺腺癌に限らずヒト悪性腫瘍細胞に共通して発現増加していると考えられる。また、肺は実質臓器でありながら、末梢肺組織は肺胞隔壁に少数の肺胞上皮細胞が散在する構造をとっている。肺末梢に存在する細胞を母細胞として発生した腫瘍細胞が腫瘍性に増殖することで、生理的状态と比べて細胞数が増加し、結果的に末梢肺組織固有の蛋白質が量的に増加することが考えられる。これらの蛋白質には末梢肺組織への分化と関係した組織分化抗原が含まれている。

今回の研究で同定されている 44 種類の蛋白質のうち SP-A と napsin A の 2 種類のみが後者の組織分化抗原に属し、<sup>20,21</sup> 他は細胞の悪性腫瘍への形質転換に伴い発現が増加した蛋白質と考えられる。組織分化抗原は悪性腫瘍に限らず肺胞上皮由来の細胞の過形成が発生する病態では過剰発現の可能性があり、炎症性疾患 (上皮性の肺炎、間質性肺炎) でもその現象は確認できる。<sup>22</sup> 現在までの多くの探索的研究によっても肺腺癌の診断に臨床的に有効な単一バイオマーカーはいまだ開発されていない。このため、悪性形質の獲得により増加するバイオマーカーと肺末梢の肺胞上皮細胞への分化を診断するバイオマーカーとの組み合わせによる臨床的有効性の検討・評価が必要である。

今回の検討で挙げたバイオマーカー候補蛋白質の多くは、すでにヒト固形癌細胞において発現が亢進することが報告されている。しかし、血清バイオマーカーとして診断への可能性に関する検討が行われている蛋白質分子は少ない。<sup>23-25</sup> 特異抗体をはじめとしたより汎用性の高い方法を用いて、個々の蛋白質の有効性が実際の患者血清において検証されなければならない。そして患者血清で有効性の検証された蛋白質についてアッセイ系を作成し、複数のバイオマーカーの組み合わせによって従来の腫瘍マーカーを超える高感度のアッセイ・システムを確立することが次の目標となる。このような血清スクリーニングシステムでは偽陰性を極力抑える必要がある。将来的には、このシステムで陽性と判定された集団に対して CT や気管支鏡検査を行う手順を採ることによって、確定診断に至る一連の肺癌スクリーニングシステムを構築することが重要である。

## 結 論

外科的切除組織を短期培養する方法で、肺腺癌組織からより多く分泌・漏出する蛋白質を同定した。同定結果には、腫瘍細胞に共通して発現が亢進することが知られている蛋白質とともに、肺組織特異的な組織分化抗原も含まれていた。この結果は、組織培養からのアプローチが血清マーカーの候補蛋白質を同定するために有効であることを示している。同定された候補蛋白質は、複数の特異抗体による高感度のアッセイ系を作成するうえで有力な抗原である。

謝辞：二次元電気泳動とその画像解析に多大な貢献をした蜂須賀みづほ氏(東京医科大学外科学第 1 講座)に感謝申し上げます。本研究は日本学術振興会科学研究費の助成を受けて行われた(研究課題名「呼吸器悪性腫瘍(肺癌および中皮腫)の生物学的性格に基づく新規診断・治療戦略の構築」, 課題番号 18390382, 研究代表者 平野隆)。

## REFERENCES

1. Kabir Z, Connolly GN, Clancy L, Jemal A, Koh HK. Reduced lung cancer deaths attributable to decreased tobacco use in Massachusetts. *Cancer Causes Control*. 2007;18:833-838.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:225-249.
3. Jett JR. Limitations of screening for lung cancer with low-dose spiral computed tomography. *Clin Cancer Res*. 2005;11:4988s-4992s.
4. Toyoda Y, Nakayama T, Kusunoki Y, Iso H, Suzuki T. Sensitivity and specificity of lung cancer screening using chest low-dose computed tomography. *Br J Cancer*. 2008;98:1602-1607.
5. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 1997;18:2071-2077.
6. Malm C, Hadrevi J, Bergström SA, Pedrosa-Domellöf F, Antti H, Svensson M, et al. Evaluation of 2-D DIGE for skeletal muscle: protocol and repeatability. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68:793-800.
7. Sanchez JC, Rouge V, Pisteur M, Ravier F, Tonella L, Moosmayer M, et al. Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1997;18:324-327.
8. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996;68:850-858.
9. Kawakami T, Tateishi K, Yamano Y, Ishikawa T, Kuroki K, Nishimura T. Protein identification from product ion spectra of peptides validated by correlation between measured and predicted elution times in liquid chromatography/mass spectrometry. *Proteomics*. 2005;5:856-864.
10. Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002;13:659-669.
11. Kawakami T, Ozaki J, Kondo K, Sato S, Yunokawa H. Amino acid sequence database suitable for the protein and proteome analysis. *Curr Proteomics*. 2008;5:267-275.
12. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20:3551-3567.
13. Charloux A, Quoix E, Wolkove N, Small D, Pauli G, Kreisman H. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. *Int J Epidemiol*. 1997;26:14-23.
14. Greenberg AK, Lee MS. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med*. 2007;13:249-255.
15. Cordero OJ, De Chiara L, Lemos-González Y, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ. How the measurements of a few serum markers can be combined to enhance their clinical values in the management of cancer. *Anticancer Res*. 2008;28:2333-2341.
16. Fujii K, Nakano T, Kanazawa M, Akimoto S, Hirano T, Kato H, et al. Clinical-scale high-throughput human plasma proteome analysis: lung adenocarcinoma. *Proteomics*. 2005;5:1150-1159.
17. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:845-867.
18. Planque C, Kulasingam V, Smith CR, Reckamp K, Goodglick L, Diamandis EP. Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8:2746-2758.
19. Gunawardana CG, Kuk C, Smith CR, Batruch I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Comprehensive analysis of conditioned media from ovarian cancer cell lines identifies novel candidate markers of epithelial ovarian cancer. *J Proteome Res*. 2009;8:4705-4713.
20. Mori M, Tezuka F, Chiba R, Funae Y, Watanabe M, Nukiwa T, et al. Atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human lung: their heterology in form and analogy in immunohistochemical characteristics. *Cancer*. 1996;77:665-674.
21. 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.
22. Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, Hakoda M, Kobuke K, Yamakido M. Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 1988;18:203-216.
23. Berendsen CL, Mulder TP, Peters WH. Plasma glutathione S-transferase pi 1-1 and alpha 1-1 levels in patients with bladder cancer. *J Urol*. 2000;164:2126-2128.
24. Pereira-Faca SR, Kuick R, Puravs E, Zhang Q, Krasnoselsky AL, Phanstiel D, et al. Identification of 14-3-3 theta as an antigen that induces a humoral response in lung cancer. *Cancer Res*. 2007;67:12000-12006.
25. Maurizi M, Almadori G, Cadoni G, Scambia G, Ottaviani F, Ferrandina G, et al. Cathepsin D concentration in primary laryngeal cancer: correlation with clinicopathological parameters, EGFR status and prognosis. *Int J Cancer*. 1996;69:105-109.