Letter to the Editor

The 54th ASMS Conference レポート

iTRAQ™ 試薬と QqTOF テクノロジーを用いた 転移性乳癌の早期バイオマーカー探索

青島理人
Masato AOSHIMA

アプライドバイオシステムズジャパン株式会社 *Applied Biosystems Japan Ltd., TOKYO, JAPAN*

編集長殿

我々は The 54th ASMS Conference において下記の演題を発表した.

Discovery of Early Stage Protein Biomarkers for Metastatic Breast Cancer Using iTRAQ™ Reagents and QqTOF Technology (ThP640)

Christie L HUNTER,¹ Kenneth CHISHOLM,² Yingjie XU,³ Moulay ALAOUJ-JAMALI,³ and Devanand PINTO²

¹ *Applied Biosystems, Foster City, CA,* ² *NRC, Halifax, Canada,* and ³ *McGill University, Montreal, Canada*

現在プロテオミクス分野では、臨床研究をバックグラウンドにもつ研究者をはじめ、多くの研究者によって疾病の早期発見や予後の経過観察を目的としたバイオマーカー研究が盛んに行われている。臨床検査をゴールとしたバイオマーカー研究は、バイオマーカーとなるタンパク質の候補を探索する“discovery”，そのタンパク質が擬陽性でないことを確認する“verification”，多検体での検証作業を意味する“validation”，臨床での診断を目的とした“clinical”のステージに分類することができる。

今回の発表では、死亡率の高さ、処置の困難さで知られる乳癌のバイオマーカーを探索(discovery)するために、正常細胞と転移型モデル細胞の2種類の細胞を転移因子として知られるフィブロネクチン存在、非存在下の2種類の環境でそれぞれ培養し、発現差異解析用の安定同位体試薬である iTRAQ™ 試薬でそれぞれをラベルした後、Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC/MS/MS) を行うことで、この4条件での比較定量解析を行った。その結果、複数種類のバイオマーカーとなりうる候補タンパク質を同定することができ、また、同定された候補タンパク質が擬陽性でないことを確認(verification)するため、MIDAS™ Workflow Designer を用いた MRM (Multiple Reaction Monitoring) チャンネルの作製、ならびに MRM 測定を行ったので併せて報告する。

材料と方法

- 1) サンプルの調製: コントロール細胞として Lewis lung cancer cells (LLC-AP2) を用いた。また、転移型モデル細胞として ErbB2 を過剰発現する転移型のバリエーション LLC-ErbB2-M4 を作製した。LLC-AP2 と LLC-ErbB2-M4 をフィブロネクチン存在、非存在下でそれぞれ培養し、回収した細胞から抽出したタンパク質のうち 100 µg をトリプシンで酵素消化後、付属のプロトコルに従い安定同位体試薬である iTRAQ™ 試薬によるラベル化反応を行った。
- 2) クロマトグラフィー: iTRAQ™ ラベルされたサンプルを強カチオン交換クロマトグラフィー (2.1 × 100 mm, 5 µm, 200 Å, Polysulfoethyl A column, 200 µL/min, 10–500 mM ammonium formate, pH 3) により 40 画分に分離し、LC System には Tempo LC システム、カラムには C18 カラム (75 µm × 15 cm, LC Packings; 5–30% acetonitrile over 30 min) を用いてそれぞれの画分を LC-MS/MS 分析した。
- 3) 質量分析装置: イオン源に NanoSpray® source, 装置は QSTAR® Elite システムを用いて測定を行った。また、データ依存的にリアルタイムで MS, MS/MS を自動的に切り替えながら測定する Smart Information Dependent Acquisition (IDA) 機能 (Analyst® QS ソフトウェア 2.0) を利用した測定によりデータを取得した。
- 4) データ解析: タンパク質の同定と定量解析には Protein Pilot™ ソフトウェア中の Paragon™ Database Search アルゴリズムと Pro Group™ アルゴリズムを用いた。
- 5) 発現タンパク質の検証: 上記実験で発現に有意な差が見られた複数種のタンパク質において、その発現を別手法で

Fig. 1. Verification of Putative Biomarkers using *in vivo* studies and MRM Analysis. Confocal microscopy indicates that candidate 1 is highly enriched in pseudopodium of metastatic cells (top). MRM initiated detection and sequencing using the MIDAS™ Workflow to develop MRM based assays on the 4000 Q TRAP® System. Verification assays will be performed on additional cell lines and eventually clinical samples to verify whether these putative biomarkers are indicative of metastasis.

確認した。ある候補タンパク質 (candidate 1) については蛍光抗体法によりその局在を確認した。また、別の候補タンパク質 (candidate 2) については、配列情報を基に MRM チャンネルを作製するソフトウェア (MIDAS™ Workflow designer) を用いて、消化されたペプチドの MRM チャンネルを *in silico* で作製し、4000 Q TRAP® LC/MS/MS システムで MRM 測定することによりその存在を確認した。

結 果

強カチオンクロマトグラフィーの 40 画分から 30,481 のプロダクトイオンマスを取得し、23,622 種のペプチドが決定された。1,561 種のタンパク質を 95% の確からしさと同定・定量することができた。その際 85% のタンパク質が 2 本以上のペプチドから帰属された。また、デコイデータベースを用いた擬陽性タンパク質の検討の結果、擬陽性は 22 (1.4%) であることがわかった。

同定されたタンパク質のうち、574 種のタンパク質に発現差が見られることがわかった。また、フィブロネクチン存在下において LLC-AP2 に対して LLC-ErbB2-M4 で 2 倍以上の発現が見られたタンパク質は 23 種、1/2 以下の発現であったタンパク質は 20 種含まれていた。

LLC-AP2 と LLC-ErbB2-M4 において、iTRAQ™ 試薬の定量結果から、ErbB2 の発現差が有意であることがわかった。また、その結果はウェスタンブロッティングの結果とも一致した。

蛍光抗体法の結果から、発現差が見られた candidate 1 は LLC-ErbB2-M4 の仮足に局在していることがわかった。4000 Q TRAP® LC/MS/MS システムにおける MRM 測定の結果、candidate 2 の存在を確認することができた (Fig. 1 参照)。

感 想

現在のバイオマーカー研究は、候補タンパク質の探索 (discovery) が主流となっているが、候補タンパク質が発見されるにつれ、その検証作業 (verification, validation) が重要になってくるという認識を多くの研究者の方々がもっていると感じた。バイオマーカー探索におけるタンパク質同定の技術は質量分析装置、nano-LC システム、検索アルゴリズムの性能向上により、今以上のパフォーマンスを発揮していくものと考えられ、関連の報告は今回の口頭・ポスター発表にも多数含まれていた。また、比較定量用のツールはラベル・ノンラベルにかかわらず多数紹介されており、バイオマーカー探索の環境は整備されてきているという印象をもった。しかし、一方でデコイデータベースによる擬陽性含有率の検討などからも示されるように、完全に擬陽性をなくすことは難しく、特に低スコアでヒットしたタンパク質については、同定に関する検証作業が今後ますます必要になっていくのではないかという感想をもった。