〔シンポジウム 1 : 臨床プロテオミクスの現状と将来像—網羅的から選択的解析へ/定性から定量的解析へ—〕

プロテオーム解析によるバイオマーカー探索と臨床応用

下重美紀・佐藤礼子・本田一文・尾野雅哉・山田哲司

SUMMARY

β -Catenin is a downstream effector of the Wnt signalling pathway and exerts its oncogenic activity by transactivating the target genes of TCF4 (T-cell factor-4). The aberrant transactivation of these TCF4-regulated genes by β -catenin plays a crucial role in early colorectal carcinogenesis. Recently, we identified that splicing factor-1 (SF1) was one of the proteins whose expression is regulated by the β -catenin/TCF4 complex using quantitative differential proteomics analysis (isotope-coded affinity tagging and mass spectrometry). SF1 negatively regulates β -catenin-evoked gene transactivation and cell proliferation. In addition, we found that SF1 was essential for the induction of alternative splicing by the β -catenin/TCF4 complex, and induced known cancer-related alternative by spliced variants, such as Wnt-induced secreted protein-1v and fibroblast growth factor receptor-3-ATII. In intestinal tissues, the expression of SF1 was found to be correlated with the differentiation status of intestinal epithelial cells and inversely correlated with tumorigenesis. To analyze the biological involvement of SF1 in the process of carcinogenesis *in vivo*, we developed SF1-deficient mice by gene trapping. Azoxymethane (AOM), a known carcinogen organotropic to the colon, was administered into SF1^{+/+} and SF1^{+/-} mice. The average number and volume of colon tumors per mouse were significantly greater in SF1^{+/-} than in SF1^{+/+} mice. The enhanced susceptibility of SF1 haploinsufficiency to AOM-induced colon tumorigenesis may be attributable to the suppressive role of SF1 in the Wnt signalling pathway.

Key words: proteomics, ICAT, β -catenin, TCF4, SF1.

はじめに：バイオマーカー探索ツールとしての
プロテオーム解析

近年、時代のニーズに迫られ質量分析技術が多様な目的に応じ革新を遂げている。質量情報を高感度かつ網羅的に解析することができる質量解析の特徴を利用し、疾患の発症メカニズムの解析、診断、治療標的として応用可能な生体からの質量情報であるバイオマーカーの探索が多くのグループによって多様なアプローチで試みられている。われわれの研究室では蛋白質・ペプチドをトリプシンなどで酵素消化することなく生体情報をより温存した解析方法である surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) 法を用いたアプロ

チで微量の血液検体から再現性よくハイスループットに解析することによって、消化器がんにおいて有効なマーカー候補の抽出に成功している。膵がんにおいては、既存の腫瘍マーカーである CA19-9 と相補的で、両者の組み合わせにより膵がん患者の 100% の検出が可能な 4 ピークの腫瘍マーカーを報告している¹⁾。さらに、食道がんにおいてはテーラーメイド医療の実現に一躍を担う可能性をもつ、術前化学放射線療法 (5-フルオロウラシル+シスプラチン+放射線照射) の奏効性を左右しうるマーカー分子を報告している²⁾。また、われわれは酵素消化し、ペプチドとして物理化学的な性状を均一にして解析するアプローチであるショットガン法を用いたバイオマーカーの探索とその応用を進めている。これまで難しいとされてきた無標識での多

Discovery and clinical application of cancer biomarkers using proteomics technology.

Miki Shitashige, Reiko Satow, Kazufumi Honda, Masaya Ono, Tesshi Yamada; 国立がんセンター研究所 化学療法部・腫瘍プロテオミクスプロジェクト

Correspondence address: Miki Shitashige; Chemotherapy Division and Cancer Proteomics Project, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuoh-ku, Tokyo 104-0045, Japan.

第 58 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2008 年 2 月 20 日, 受理 2008 年 4 月 3 日, 刊行 2008 年 6 月 15 日)

検体比較を可能とする方法として検体を低流速 (50–200 nL/min) の液体クロマトグラフィーで分離し、質量分析にて定量し、ペプチドをその質量/価数 (m/z) と量を 2 (ないし 3) 次元画像として表す Two Dimensional Image Converted Analysis of nano-flow Liquid chromatography and Mass Spectrometry (2D-ICAL-MS) 法³⁾ の開発を行い、改良を行っている。従来より用いられている isotope-coded affinity tag (ICAT)⁴⁾, iTRAQ などの安定同位体蛋白標識法を用いたマーカー検索にも取り組み、これらのアプローチを研究の対象、目的に合わせて使い分けている。本稿では、大腸がんの治療標的検索を目的として大腸がん細胞において β -カテニン/TCF4 複合体に焦点をあて、ICAT 法にて β -カテニンと TCF4 の結合の有無により細胞内で発現変動する蛋白質の網羅的検索による疾患関連蛋白の同定および、細胞レベルから個体レベルに至る標的蛋白質の機能解析について紹介する^{5,6)}。

同位体標識法を用いた網羅的蛋白質発現変動解析

Wnt シグナル経路の伝達因子である β -カテニンは APC の変異による不活化により細胞内に蓄積し、転写因子である T-cell factor 4 (TCF4) と結合し、その標的遺伝子の転写を活性化することで大腸がんの前駆病変である腺腫形成に至ると考えられている。そこで、われわれはこの初期大腸発がん過程に着目し、 β -カテニンと TCF4 転写複合体形成により細胞内で発現が変動する蛋白質群を網羅的に同定定量を行った。検索にあたり、テトラサイクリン調節性プロモーターによる発現誘導システムを用い、 β -カテニンとの結合部位を欠きドミナントネガティブに TCF4 の転写活性を抑制する TCF4 Δ N30 を発現誘導できる大腸がん細胞 DLD1 Tet-off TCF4 Δ N30 を樹立した⁵⁾。この DLD1 Tet-off TCF4 Δ N30 を用い、ドキシサイクリン誘導前後 (Fig. 1A) での細胞内での蛋白質の発現変化を、より発現レベルの低い蛋白質の発現変動も検出するために常法に従い遠心分離法にて細胞を 5 分画 (Fig. 1B) し、ICAT 法により解析した。この方法では、比較したい 2 群の蛋白質試料を、それぞれ分子量の異なる ^{13}C (Heavy) もしくは ^{12}C (Light) の同位体試薬で標識し、混合後に、酵素消化を行って同位体標識ペプチドを調製し、低流速液体クロマトグラフィーを用いて分離濃縮し、直接四重極 TOF 型質量分析計に導入して分析を行った (Fig. 1C)。蛋白質の発現量の定量および同定は ProICAT ソフトウェアを用い、発現量は Fig. 1C に示すように同位体試薬 Heavy と Light の 9 質量差 (TOF MS スペクトル) により定量し、MS/MS スペクトルよりアミノ酸配列のシーケンシングを行い蛋白質の同定を行った。2 回の繰り返し実験の結果、4000 を超えるペプチドを検出し、そのうちドミナントネガティブ TCF4 を発現することにより 2 倍以上発現が変動する 70 を超える蛋白質の抽出

に成功している (Table 1)。この発現レベルが、2 倍以上変動した蛋白質の機能として Oxidoreductases, Cytoskeletal proteins が大きな割合を占めており⁵⁾、二次元電気泳動を用いて同様の細胞内変化を捉えたときに得られた変動蛋白質の機能分類⁷⁾ と一致していたことから、本検索において Wnt シグナル経路のシグナル伝達に参与する分子を捉えることができたと考えている。

治療標的の機能解析—*in vitro*—

われわれは、大腸がん細胞において β -カテニンを強制発現させることにより、がん特異的な選択的スプライシング

Fig. 1. Quantitative profiling of differentially expressed proteins of human colon carcinoma in response to dominant-negative TCF4 using isotope-coded affinity tags (ICAT) and mass spectrometry.

(A) DLD1 Tet-off TCF4 Δ N30 were cultured with Dox (Dox(+)) or without Dox (Dox(-)). Nuclear extracts were separated and blotted with anti-TCF3/4 antibody. Phase-contrast microscopy of TCF4 Δ N30-expressed (right) and control (left) cells. (B) The cells were fractionated into fractions 1–5 by sequential differential centrifugation. (C) The fractions were differentially labeled with the isotopically light ($^{12}\text{C}_0$) or heavy ($^{13}\text{C}_9$) acid-cleavable isotope-coded affinity tagging (ICAT) reagent, and then the $^{12}\text{C}_0$ - and $^{13}\text{C}_9$ -labelled samples were combined, digested with trypsin. The ICAT-labeled peptides were analyzed by LC/MS/MS spectrometry.

Shitashige M *et al.*, 2007⁵⁾ より許可を得て改変引用。

が数多く報告されているエストロゲンレセプター β において、これまでに報告のないタイプのドミナントネガティブ様作用を示すスプライシングバリエーションの形成を報告している⁸⁾。しかしながら、この β -カテニンによるスプライシング反応が β -カテニンによる直接的な反応であるか、間接的な反応であるかについては検討課題であった。そこで、本解析で得られた発現変動蛋白質リストの中から、この現象の解明に繋がる可能性が考えられる分子として、ドミナントネガティブ TCF4 が発現することにより、核分画においてその発現が亢進した Splicing factor1 (SF1) に着目した。SF1 は mRNA 前駆体から蛋白質をコードしないイントロンを取り除く pre-mRNA スプライシングにおいてイントロン上のブランチポイントを U2AF と共に認識・結合し、スプライシング反応を駆動することが報告されている分子である⁹⁾ことから Wnt シグナル経路における pre-mRNA スプライシング反応を介して発がんを制御しているのではないかと仮説をたてた。まずは、SF1 が腸上皮において β -カテニン/TCF4 複合体とどのように発がん制御を行っているかを明らかにするために、安定型 β -カテニンと SF1 を共発現させ、 β -カテニン/TCF4 転写活性への影響について検討を行ったところ、Fig. 2A に示すように、SF1 は安定型 β -カテニンにより亢進した TCF4 の転写活性を抑制し、さらには細胞増殖も抑制した (Fig. 2B)。次に、SF1 が実際に細胞内でスプライシング反応を制御しているかどうか検討を行った。Fig. 2C に示すように、ドミナントネガティブ TCF4 の発現誘導にともなう SF1 の発現亢進および SF1 の強制発現により、 β -カテニンの強制発現によって生じたドミナントネガティブ様作用を示すエストロゲンレセプター β のスプライシングバリエーション (エキソン $\Delta 5-6$) が誘導された。さらに、その他にも、既に報告されている Wnt-induced secreted proteins (WISP) ¹⁰⁾ や Fibroblast growth factor

receptor (FGFR) ³¹⁾ のがん特異的選択的スプライシングについても SF1 の関与を明らかにした (Fig. 2D)。これまでに多くのがん特異的な選択的スプライシングの研究がなされているが¹²⁾、発がん過程におけるその意義については全く不明であるといっても過言ではない。最近では網羅的に各遺伝子のエキソン毎の発現を解析するエキソンアレイが報告され¹³⁾、その研究の発展が期待される。本研究は Wnt シグナル経路におけるスプライシング制御という新しい概念を提示し、発がん過程における多様な細胞内変化を示すものである。

治療標的の臨床的意義の検証—*in vivo*—

家族性大腸腺腫症 (FAP) モデルマウスである Min (*Apc^{Min/+}*) マウスの腸管組織において SF1 の発現を検討したところ、腺腫及び未分化な陰窩上皮において発現は認め

Fig. 2. Functional involvement of SF1 in β -catenin/TCF4-mediated carcinogenesis.

(A) HEK293 cells were cotransfected with canonical (TOP-FLASH, *solid columns*) or mutant (FOP-FLASH, *open columns*) TCF/LEF luciferase reporters, pFLAG- β -catenin Δ N134 (+) or its relevant empty plasmid (pFLAG-CMV4) (–), and pcDNA3.1-His-SF1 (+) or its relevant empty plasmid (pcDNA3.1-His) (–). Luciferase activity was measured. *Bars*, SD. (B) Colony formation of HEK293 cells transfected with pFLAG- β -catenin Δ N134 (+) or its relevant empty plasmid (pFLAG-CMV4) (–) and pcDNA3.1-His-SF1 (+) or its relevant empty plasmid (pcDNA3.1-His) (–). Transfectants were cultured in the presence of G418 for 8 days and stained. (C) DLD1 Tet-off TCF4BAN30 cells were cultured for 7 days in the presence or absence of Dox (*left*). HeLa cells were transfected with pcDNA3.1 (control) or pcDNA3.1-His-SF1 (*right*). ER β and GAPDH (control) mRNA expression were analyzed by RT-PCR. (D) HCT-116 cells were transfected with empty pFLAG-CMV4(Cont) or pFLAG-TCF4 Δ N30 (TCF4 Δ N) (*left*) and empty pcDNA3.1-His (Cont) or pcDNA3.1-His-SF1(SF1) (*right*), the expression pattern of WISP1, FGFR3 and GAPDH mRNA were analyzed by RT-PCR.

Shitashige M *et al.*, 2007⁵⁾ より許可を得て改変引用。

Table 1. Numbers of proteins (peptides) detected and differentially expressed in two experiments (Exps. 1 and 2).

	Peptides detected		Up- and down-regulated proteins (peptides)			
			H: L < 0.5		H: L > 2	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Fraction 1	912	1024	4 (8)	5 (9)	8 (15)	7 (15)
Fraction 2	787	813	7 (13)	8 (15)	11 (16)	7 (15)
Fraction 3	828	791	11 (22)	9 (23)	10 (19)	10 (20)
Fraction 4	1089	1192	7 (12)	7 (14)	15 (30)	12 (25)
Fraction 5	499	621	2 (2)	1 (1)	6 (11)	6 (14)
Total	4115	4441	31 (57)	30 (62)	50 (91)	42 (89)

Exp(s), experiment(s).

Peptides detected, numbers of peptides and sequenced by tandem mass spectrometry (MS/MS).

Shitashige M *et al.*, 2007⁵⁾ より許可を得て改変引用。

られず正常絨毛上皮において発現の亢進が認められ⁵⁾, 細胞レベルにおける検討と同様にSF1が発がんを抑制的に制御している可能性が示唆された. これらの現象を個体レベルで検証するためにトラップ法によりSF1のノックアウトマウスの作製を試みた. しかしながら, 着床後8.5日の段階で既にホモ(SF1^{-/-})個体の存在が認められずホモ致死であった⁶⁾. さらに得られたヘテロ(SF1^{+/-})個体には野生型(SF1^{+/+})と比べ有意な表現型の違いは認められなかったことから, このヘテロマウスの大腸発がん誘導剤であるアゾキシメタンに対する感受性を検討することとした. Fig. 3Aに示すように, ヘテロおよび野生型マウスにアゾキシメタン(10 mg/kg body weight)を週1回, 6週間腹腔内投与し, 23週間後に屠殺し, 腸管の発がん状態を詳細に観察した. ヘテロにおいては雌性, 雄性マウスともに野生型に比べ, 腫瘍の頻度およびその大きさが有意に亢進していた(Fig. 3B and C). この発がん亢進はSF1の発がん抑制作用がヘテロマウスにおいて減弱したことに起因すると考えられた. このように, プロテオーム解析により抽出した治

療標的の大腸発がんにおける役割が検証できたことから, この分子を創薬標的とした発がん制御薬剤(化合物)の開発が次なる課題である.

おわりに

がんをはじめとするあらゆる健康不全の診断, 治療, 原因解析から予防対策に至るまで, 生体が発する信号である“バイオマーカー”を早期に検出することは, 人類が健康に生活する上で有用であると考えられている. 現在, さまざまなプロジェクトによりバイオマーカー探索は精力的に進められている. 個々の疾患毎のバイオマーカーの重要性はいうまでもなく, その検出過程での技術革新が, 近い将来にバイオマーカーの臨床応用にあたり, 非常に重要な役割を果たすものと考えている.

文 献

- 1) Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* 2005;65:10613-10622.
- 2) Hayashida Y, Honda K, Osaka Y, Hara T, Umaki T, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling. *Clin Cancer Res* 2005;11:8042-8047.
- 3) Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, Matsuzaki H, Hirohashi S, Yamada T. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1338-1347.
- 4) Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999;17: 994-999.
- 5) Shitashige M, Naishiro Y, Idogawa M, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Involvement of splicing factor-1 in beta-catenin/T-cell factor-4-mediated gene transactivation and pre-mRNA splicing. *Gastroenterology* 2007;132: 1039-1054.
- 6) Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T. Increased susceptibility of Sf1(+/-) mice to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Cancer Sci* 2007;98:1862-1867.
- 7) Seike M, Kondo T, Mori Y, Gemma A, Kudoh S, Sakamoto M, Yamada T, Hirohashi S. Proteomic analysis of intestinal epithelial cells expressing stabilized beta-catenin. *Cancer Res* 2003;63:4641-4647.
- 8) Sato S, Idogawa M, Honda K, Fujii G, Kawashima H, Takekuma K, Hoshika A, Hirohashi S, Yamada T. Beta-catenin interacts with the FUS proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing. *Gastroenterology* 2005;129:1225-1236.
- 9) Liu Z, Luyten I, Bottomley MJ, Messias AC, Houngrinlou-Molango S, Sprangers R, Zanier K, Kramer A, Sattler M.

Fig. 3. Enhanced colon tumorigenesis of SF1^{+/-} mice treated with azoxymethane.

(A) Sf1^{+/-}, Sf1^{+/+}, and C57BL/6J (Sf1^{+/+}) mice received intraperitoneal injections of 10 mg azoxymethane (AOM)/kg body weight once a week for 6 weeks. Twenty-three weeks after the first injection, the mice were killed. (B) The numbers (left) and volumes (right) of tumors that developed in Sf1^{+/-}, Sf1^{+/+}, and C57BL/6J mice were determined. (C) Histology of colon tumors that developed in AOM-treated Sf1^{+/+} and Sf1^{+/-} mice (hematoxylin-eosin staining). Original magnification: ×40
Shitashige M et al., 2007⁶⁾ より許可を得て改変引用.

- Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science* 2001;294:1098–1102.
- 10) Tanaka S, Sugimachi K, Saeki H, Kinoshita J, Ohga T, Shimada M, Maehara Y. A novel variant of WISP1 lacking a Von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous gastric carcinoma. *Oncogene* 2001;20:5525–5532.
 - 11) Jang JH, Shin KH, Park YJ, Lee RJ, McKeegan WL, Park JG. Novel transcripts of fibroblast growth factor receptor 3 reveal aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60:4049–4052.
 - 12) Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007;8:349–357.
 - 13) 佐藤礼子, 山田哲司. エキソンアレイを用いた癌特異的スプライシングバリエーションの検索. *バイオテクノロジージャーナル* 2007;7:302–306.