基礎と臨床の連携による疾患バイオマーカーの開発

野村 文夫^{1,2,*}

¹ 千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学

² 千葉大学医学部附属病院検査部・遺伝子診療部・疾患プロテオミクスセンター

(受付 2014 年 5 月 1 日, 受理 2014 年 8 月 27 日)

SUMMARY

Proteomics is the systematic study of a proteome, the complete set of proteins found in a given cell type or in body fluids. Although technological advances have made proteomics useful for discovery of markers in various fields of medicine, it is not an easy task to bring the biomarker candidates from bench to bedside.

By comprehensive serum proteome analyses, we previously identified a 5.9 kDa peptide fragment of fibrinogen α C-chain (FIC 5.9) as a novel biomarker candidate for heavy drinking. More recently, using a sandwich ELISA to specifically detect this peptide, FIC 5.9 was found to be a sensitive marker to detect hepatic fibrosis at an early stage.

Mortality due to hepatocellular carcinoma (HCC) is still high because of the late diagnosis of HCC. There is a need for sensitive serum markers for HCC to improve its early detection. We previously performed comparative proteome analyses of surgically resected HCC tissues and their adjacent non-tumor tissues using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, and identified a number of proteins overexpressed in HCC tissues. We then tested diagnostic values of autoantibodies to these overexpressed proteins and found that serum anti-Ku86 shows high sensitivity for the early detection of HCC in patients with HCV-related liver cirrhosis.

Collaborative works of basic scientists, clinicians and diagnostic industries are necessary to discover novel biomarkers and bring them to clinical fields, which eventually will lead to effective patient cares.

Key words: proteomics, hepatic fibrosis, fibrinogen, hepatocellular carcinoma, Ku86

はじめに

静的な情報であるゲノム情報に対して、プロテオームは生体が置かれた環境、病態などに応じて刻々と変化する動的な情報である。したがって、疾患の診断、病態の解析、治療標的の探索などにおいて網羅的プロテオーム解析は有用な情報をもたらす。本稿では、プロテオーム解析による疾患バイオマーカー探索の現状と実用化への道のりについて、自験例も含めて述べる。

1. プロテオーム解析とその対象

網羅的解析では cDNA マイクロアレイなどを用いる mRNA 発現量のトランスクリプトーム解析が先に普及した

が、mRNA レベルと蛋白質レベルは必ずしも 1 対 1 ではないので¹⁾、表現型の違いの最終的な確認はプロテオームレベルで行う必要がある。

また、多くの蛋白質は翻訳後修飾を受けてはじめて成熟した機能を持ち、細胞内局在などが定まるので、翻訳後修飾産物の網羅的解析も重要であり、リン酸化に関する phosphoproteomics²⁾、糖鎖修飾を扱う glycoproteomics³⁾ などが注目されている。

血清・血漿はバイオマーカー探索において最も広く利用されているが、存在する蛋白質・ペプチド各成分の存在量の違いがきわめて大きいことが特徴である。存在量が最も多いアルブミン (約 4 g/dl) ときわめて少ないサイトカイン (例えば IL-6 は ~ 4 pg/ml) の間には実に 10^{10} 倍の違い

Collaborative contributions of basic scientists and clinicians to disease biomarker discovery
Fumio Nomura^{1,2}

¹ Department of Molecular Diagnosis, Graduate School of Medicine, Chiba University; and ² Divisions of Laboratory Medicine, Clinical Genetics and Proteomics, Chiba University Hospital

* Corresponding author: Fumio Nomura; Department of Molecular Diagnosis, Graduate School of Medicine, Chiba University, Divisions of Laboratory Medicine, Clinical Genetics and Proteomics, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chiba City, Chiba 260-8670, Japan

E-mail: fnomura@faculty.chiba-u.jp

第64回日本電気泳動学会総会・特別講演

がある。事実、血漿中の存在量が上位 22 に含まれ、存在量が多いことから abundant proteins と呼ばれる蛋白質の合計が全体の 99% を占める⁴⁾。残り 1% に相当し、より低濃度域のいわゆる deep proteome を解析するためにはアルブミン、グロブリン、トランスフェリン、ハプトグロビンなどの abundant proteins をほぼ完全に除去する必要があるが、容易ではない⁵⁾。一方で、その除去に伴って abundant proteins と結合しているペプチド類も同時に失われてしまうので、結合ペプチドを選択的に回収する試みもなされている⁶⁾。一方、直接血清、血漿を解析する代わりに、①病変部により近い体液を意味する proximal fluids, たとえば神経疾患における脳脊髄液⁷⁾ など、②細胞培養上清に分泌された蛋白質・ペプチドの secretome 解析⁸⁾、③生体内の細胞から分泌される膜小胞 exosome を用いた解析⁹⁾、などが有望視されている。

2. プロテオーム解析技術

プロテオーム解析の手法は電気泳動法と質量分析法に大別される。プロテオーム解析の原点ともいえる 2 次元電気泳動法は進化して、最近では蛍光標識 2 次元ディフュレンス電気泳動 (two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis; 2D-DIGE) 法が普及している¹⁰⁾。また、最近では電気泳動ベースの方法でスタートし、質量分析につなげる GeLC-MS¹¹⁾ も登場している。

質量分析法は当初は電気泳動法によるプロテオーム解析において、蛋白質同定法として用いられていた。しかし、この 10 年来でその感度、スキャンスピードが飛躍的に向上し、さらに定量解析技術も進歩している¹²⁾。質量分析計を用いた定量解析は比較定量解析と絶対定量に分けられる。比較定量解析には安定同位体試薬を用いる方法と label-free の方法¹³⁾ とがある。安定同位体試薬を用いる場合は安定同位体標識タグとして iTRAQ¹⁴⁾、TMT¹⁵⁾ などを用いる in-vitro labeling と in-vivo labeling 法として培養細胞の比較解析において有用な SILAC 法¹⁶⁾ がある。

一方、絶対定量法としては Selected Reaction Monitoring (SRM) 測定 (MRM と呼ばれる) の重要性が高まっている¹²⁾。疾患バイオマーカー探索で見出されたマーカー候補がペプチドやその修飾物の場合は特異抗体の獲得が容易でなく、大規模バリデーションにつながらずにマーカー候補のままで終わってしまっている場合も少なくない。その点、SRM 測定により抗体に依存することなく、多項目の同時測定を実施できればマーカー候補のバリデーションを進める際にきわめて有用である。

3. プロテオーム解析によるバイオマーカー探索と実用化への道のり

プロテオーム解析により疾患バイオマーカーを探索し、

有望なマーカー候補を開発し、実用化するためには基礎・臨床・企業の 3 者の連携が不可欠であると筆者は考える。その理由として考えられることを表 1 に示した。

A. 肝線維化マーカー候補

我々は 2004 年に血清のプロテオーム解析により見出された 5.9 kDa のペプチド (精製・同定の結果、フィブリノーゲン α C-chain の near C-terminal fragment と判明し FIC5.9 と略) を新規飲酒マーカーとして報告した¹⁷⁾。しかし、FIC5.9 を簡便かつ再現性よく定量する方法がなかったため、その診断学的意義は不明のままであった。当初、FIC5.9 に対する抗体の作成が困難であったので、まず安定同位体標識 FIC5.9 を内部標準とする MALDI-TOF MS による定量系を構築してゴールドスタンダードとした¹⁸⁾。しかしこの方法では LDT (Laboratory developed test) の域を出ないため、IVD (in vitro Diagnostics) とするために産学連携体制により FIC5.9 の ELISA 系を確立した¹⁹⁾。それにより多疾患・多検体の解析が可能となり、多施設による臨床性能試験により、FIC5.9 は慢性肝障害の早期線維化の評価に有効であることが見出された²⁰⁾。現在、体外診断薬としての承認申請中である。

B. 原発性肝細胞癌の腫瘍マーカー候補

プロテオーム解析による固型癌の新規バイオマーカー探索の対象として血清・血漿が長らく用いられ、多くのマーカー候補が提唱されてきたが、早期診断目的で広く実用化されているものはまだない。バイオマーカー候補の腫瘍特異性、臓器特異性は 100% ではない場合が多く、仮に腫瘍・臓器特異性、腫瘍からの放出速度、体内での異化速度など全てが理想的であったとしても、腫瘍径数ミリの微小癌を血清腫瘍マーカーの変化のみで診断するのは容易でない²¹⁾。むしろ“腫瘍組織やがん細胞培養上清を先ず探索して見いだされた蛋白質あるいはその断片が血中でも存在するか否

表 1. プロテオミクスによる疾患バイオマーカー探索と実用化において基礎・臨床・企業の連携が必要な理由

1. マーカーの探索対象に関して、診療上あらたなバイオマーカーが必要な領域・疾患に焦点をあてることができること。
2. 診断が確実で臨床情報も付された良質の臨床検体を共通のプロトコールで保存する必要があること。
3. 先進化、複雑化するプロテオーム解析技術を利用するにあたり、手法の特徴、限界などについての正確な理解が必要であること。
4. バイオマーカー候補を実用化するに際しては、知的財産の確保とその維持が求められること。
5. 多施設臨床性能試験の結果に基づく、体外診断薬としての承認申請、保険収載に際しては良き企業パートナーが必要であること。
6. 臨床検査として広く利用されるためには検査試薬の精度管理と安定供給が不可欠であること。

マーカー候補発見から保険適用までの流れ

図 1. マーカー候補発見から保険適用までの流れ

か”，をみるいわゆる tissue to serum strategy や exosome を対象とする方が有効と思われる。筆者らも原発性肝細胞癌（HCC）患者の切除組織の癌部、非癌部を 2D-DIGE により解析して癌部・非癌部間で発現量がことなる蛋白質を 83 種類同定し、免疫組織染色として病理補助診断に有用な蛋白質として clathrin heavy chain（CHC）を同定した²²⁾。その後高発現している蛋白質に対する血中自己抗体を検索した結果、Ku86 に対する自己抗体が C 型肝炎ウイルスによる HCC 患者で有意に上昇していることを見出した²³⁾。抗 Ku86 抗体の HCC における診断的意義についてはその後 Xu らが B 型肝炎ウイルスによる HCC においても確認している²⁴⁾。

おわりに

マーカー候補の発見から実用化までの道のりは長い（図 1）。有望なマーカー候補が見つかったとしても、測定の簡便性と経済性が最高レベルに達している従来の検査法に取って代わるのは容易でない。しかし、マーカー探索を通して得られた知見に基づき、蛋白質の新たな機能に行き当たる可能性もある。筆者らも膵がんの血清マーカー探索を通して apoC1 の新たな機能を見出している²⁵⁾。このように疾患プロテオミクス研究は単にマーカー探索だけでなく、病態解明、さらには新たな治療標的の発見につながる可能性もあり、その魅力ははかり知れない。

文 献

- 1) Chen G, Gharib TG, Huang CC, *et al.* Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:304–313.
- 2) Narumi R, Murakami T, Kuga T, *et al.* A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J Proteome Res*. 2012;11:5311–5322.
- 3) Narimatsu H, Sawaki H, Kuno A, *et al.* A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS J*.

2010;277:95–105.

- 4) Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, *et al.* Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2003;2:1096–1103.
- 5) Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, *et al.* Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J Proteome Res*. 2010;9:4982–4991.
- 6) Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, *et al.* High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res*. 2010;9:1694–1705.
- 7) Roche S, Gabelle A, Lehmann S. Clinical proteomics of the cerebrospinal fluid: Towards the discovery of new biomarkers. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2:428–436.
- 8) Schaaïj-Visser TB, de Wit M, Lam SW, *et al.* The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834:2242–2258.
- 9) Kalra H, Adda CG, Liem M, *et al.* Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*. 2013;13:3354–3364.
- 10) 近藤 格. DIGE 道場. 東京：GE ヘルスケア・ジャパン；2013.
- 11) Paulo JA, Kadiyala V, Lee LS, *et al.* Proteomic analysis (GeLC-MS/MS) of ePFT-collected pancreatic fluid in chronic pancreatitis. *J Proteome Res*. 2012;11:1897–1912.
- 12) 佐藤 守, 曾川一幸, 野村文夫. 定量的質量分析法の最近の進歩. *日本臨床検査自動化学会会誌*. 2012;37:175–181.
- 13) Ono M, Shitashige M, Honda K, *et al.* Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5:1338–1347.
- 14) Evans C, Noirel J, Ow SY, *et al.* An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal Bioanal Chem*. 2012; 404:1011–1027.
- 15) Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y, *et al.* Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease. *Proteomics*. 2013;13:2339–2350.
- 16) Zhang G, Neubert TA. Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for phosphotyrosine protein identification and quantitation. *Methods Mol Biol*. 2009;527: 79–92.
- 17) Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K, *et al.* Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics*. 2004;4:1187–1194.
- 18) Sogawa K, Koda Y, Noda K, *et al.* The measurement of a fibrinogen α C-chain 5.9 kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution. *Clin Chim Acta*. 2011;412:1094–1099.
- 19) Noda K, Sogawa K, Kikuchi W, *et al.* Development of a sandwich ELISA for the 5.9-kDa fibrinogen alpha C chain fragment detected by serum proteome analysis. *Proteomics Clin Appl*. 2011;5:141–146.
- 20) Sogawa K, Noda K, Umemura H, *et al.* Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomics*

- Clin Appl. 2013;7:424–431.
- 21) Hori SS, Gambhir SS. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. Sci Transl Med. 2011;3:109–116.
- 22) Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, *et al.* Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. Hepatology. 2008;48: 519–530.
- 23) Nomura F, Sogawa K, Noda K, *et al.* Serum anti-Ku86 is a potential biomarker for early detection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2012;421:837–843.
- 24) Xu Y, Liu AJ, Gao YX, *et al.* Expression of Ku86 and presence of Ku86 antibody as biomarkers of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. Dig Dis Sci. 2014;59:614–622.
- 25) Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, *et al.* Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. Oncogene. 2008;27:2810–2822.