

食道癌・咽頭癌のハイリスク群である習慣飲酒の新しいマーカーの探索 —プロテインチップテクノロジーによる検討—

野村文夫、曾川一幸、木村明佐子、須永雅彦、根津雅彦、朝長 毅

千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学

要 旨

ポストゲノム時代に入り、疾患プロテオミクスが注目されている。プロテインチップシステム (SELDI-TOF MS: サイファージェンバイオシステム社) は各種臨床検体を複雑な前処理なしでハイスループットに解析できる画期的な方法であり、特に従来のタンパク質 2 次元電気泳動で検出できなかった低分子量タンパク質やペプチドの検出に威力を発揮する。習慣飲酒は食道癌、咽頭癌のリスクファクターであるが、問題飲酒者を早期かつ的確に拾い上げるための満足できるマーカーはまだない。著者らはプロテインチップシステムを利用してアルコール依存症者の断酒経過中の血清タンパク質・ペプチドの網羅的発現解析を行った結果、 γ -GTP のノンリスポンダーをも検出する習慣飲酒の新しいマーカー候補を検出・精製・同定することができた。同様の手法は原発性肝細胞癌をはじめとするその他の肝疾患への応用も可能と思われる。

はじめに

ポストゲノムあるいはポストシーケンス時代に入り、トランスクリプトーム、さらにはプロテオームが盛んに論じられるようになった。DNA マイクロアレイなどによる mRNA の網羅的発現解析が現在盛んに行われているが、1) 細胞内での mRNA 発現量とタンパク産生量とは必ずしも比例しないこと、2) タンパク質の活性は細胞内局在やプロセッシング、翻訳後修飾など mRNA とは別のレベルで制御されていることなどから、最終的にはタンパクレベルの解析が必須となり、振り子は再びタンパク質に向かって大きく振れつつある。造語プロテオーム (翻訳生産されているタンパク質の全セット) とプロテオームに関わる学問分野 (プロテオーム科学) を意味するプロテオミクスも定着し、その解析技術の進歩と相俟って、近年急速な展開を見せている。

筆者らの研究室では低分子量域のディファレンシャル解析を得意とするプロテインチップシステムと高分子領域の解析に適した従来の 2 次元電気泳動 (2-DE) がさらに洗練された蛍光標識 2 次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE) を有機的にくみあわせた包括的疾患プロテオーム解析を行っている (1,2)。本稿ではプロテインチップシステムによる疾患マーカーの探索について、筆者らのデータを中心に述べる。本 C O E の対象疾患である食道癌、咽頭癌いずれにおいても習慣飲酒はそのリスク

ファクターである、一次予防の観点から、問題飲酒者を早期かつ的確に拾いあげることが肝要である。プロテインチップというと基板上に各種抗体を高密度に貼り付けた抗体チップなどを指すこともあるが (3)、ここではプロテインチップシステムにおいて用いられるプロテインチップを扱う。

1. 血清タンパク質プロファイリングの手法

血清タンパク質プロファイリングのプロトタイプは血清タンパク分析目的の電気泳動であり、セルロースアセテート膜を支持体とする電気泳動が現在でも広く用いられている。従来の血清タンパクプロファイリングでは比較的少量に存在するタンパク質の濃度比に基づく疾患特有なパターンを診断の一助としてきた。アルブミン以外の各分画においても、例えば α_1 分画では α_1 -アンチトリプシンが、 β 分画ではトランスフェリンが主たる構成タンパク質である。実際に血漿タンパクのうち、存在量が上位 22 の合計が全体の 99% をしめることが知られている (図 1) (4)。最近のプロテオーム解析技術の進歩により、残りの 1% のなかに従来の手法では検出できなかった低発現量あるいは低分子量の疾患関連タンパク質が多数含まれていることが明らかになりつつあり、血清タンパク質診断学は大きく塗り替えられようとしている。現時点で利用されている代表的な血清タンパク質の包括

的発現解析技術を表1に示した。2-DEが網羅的プロテオーム解析の基本であることは現在も変わりはないが、10kD以下の低分子量タンパク質の解析に不向きなこと、解析に長時間を要すること、検出感度に限界があることなどの問題点がある。また、分離されたタンパク質のスポットの位置や染色の強さの再現性を確保することが難しい。この問題を克服する一助として、最近タンパク質を異なる蛍光色素で標識して同一のゲル上で比較する手法が開発され2D-DIGEとして利用されている(5)。

これに対して、プロテインチップシステムなど田中耕一氏が開発したソフトイオン化法に基づく質量分析装置は特に分子量1万以下の低分子量タンパク質やペプチドの解析に有用である。

2. プロテインチップシステムの概要 (6,7)

プロテインチップシステムはプロテインチップ、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)およびデータ解析用コンピュータからなる。本システムにおけるプロテインチップは、アルミ板の表面上の径2mmの円内に種々の官能基を持ち、ケミカルチップとバイオロジカルチップに大別される。ケミカルチップはHPLCのカラムを輪切りにしたものをチップ上にのせたものに相当し、イオン交換チップ、逆相チップ、金属イオン固定化チップなどがある。チップ上でカラム操作に相当するタンパク質・ペプチドの分画を行ったのち、質量分析計で解析する。一方、バイオロジカルチップではチップ上に抗体やレセプターなどを固定化したもので、タンパク質相互作用解析に利用されるが、将来的には抗体チップとしてのマルチマーカー解析において威力を発揮すると思われる。プロテインチップシステムにおいては、チップ上の各種官能基により捕捉された状態のタンパク質をレーザーにより直接脱離・イオン化して検出するものである。このイオン化技術はMALDI(matrix assisted laser desorption ionization)に基づくものであるが、特にチップ上で行うので、surface enhanced laser desorption ionization(SELDI)と呼ばれ、このイオン化技術と飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を組み合わせるのがSELDI-TOF MSである。

プロテインチップシステムによる解析の流れは、1) サンプルの添加、2) チップへのタンパク質の結合、3) 洗浄、4) エネルギー吸収分子の添加、5) 質量分析計による測定、の順序で行われ、TOF-MSによる測定の結果、チップ上に捕捉されていたタンパク質の分子量と相対的存在量が得られる。臨床検査から見た場合のSELDI-TOF MSの

最大の利点は、異なる条件下の臨床検体を同一チップ上で解析することにより、疾患特異的血清タンパクプロファイリングが極めて短時間に得られる点であり、新たな疾患マーカー、疾患特異的プロファイリングが続々と見出されている。また、新たな疾患マーカーの候補が検出された場合、その後の精製のためのカラムの選択、溶出条件の決定が容易となるだけでなく、フラクションチェックにもプロテインチップを活用できることから、精製に要する労力を軽減することができる。

3. プロテインチップシステムによる新たな飲酒マーカーの探索

アルコールによる臓器障害の診療の第一歩は正確な飲酒歴の聴取であるが、飲酒家の申告量はかならずしも正確でなく、客観的なマーカーが求められる(8)。習慣飲酒により変動することが知られている検査項目は多岐にわたるが、わが国でもっとも広く利用されている γ -GTP(GGT)、近年欧米で多用されている糖鎖欠損トランスフェリン(CDT)のいずれにも、いわゆるnon-responderが存在することに加え、非アルコール性疾患でも異常値を示す場合がある。すなわち、常習飲酒家のスクリーニングにおいて感度・特異度ともに満足すべきマーカーはなく、最近報告された他施設共同研究においてもCDTの限界が示されている(9)。したがって、新たなマーカーの探索が必要である。そこでプロテインチップシステムを用いた新規アルコール関連マーカーの探索を行った(1)。まず、SAX2チップを用いた場合のタンパク質発現プロフィールでは入院当初高値を示した28kDピークが断酒に伴い減少していくことが明らかとなった。一方、WCX2チップを用いた解析では、入院時にほとんど検出されないが、断酒後に著明に増加する2つのピーク(5.9kD, 7.8kD)が検出された。図2は代表例である。計16例における28kD, 5.9kDの変化のまとめを図3に示した。16症例のうち4症例において入院時 γ -GTPが正常域であり、いわゆるnon-responderと考えられたが、5.9kDの減少はこれら4症例全例で認められた。そこで、これら3つのピークの精製・同定を行った結果、28kDはアポリポタンパクA1(アポA1)であり、5.9kDはフィブリノーゲンの α E鎖の未報告フラグメントであった(1)。血清アポA1が習慣飲酒により上昇することは良く知られており(10)、結果的に今回の解析におけるpositive controlの形となったが、アポA1については各種免疫学的測定法が確立されている。そこで当施設で用いている免疫比濁法で求めた値とプロ

テインチップシステムにおける相対強度を比較したところ図4のように比較的良好的な相関が得られた。

本研究ではプロテインチップシステムを過量の飲酒に伴う血清タンパクマーカーの探索に応用した結果、少なくとも3つの候補タンパク質を検出することができた。このうち、7.8kD、5.9kDは大量飲酒直後の入院時にはほとんど検出されないが、断酒を続けるにしたがって発現量が正常域に戻るという興味深いパターンを示した。さらに、5.9kDの変化は γ -GTPのノンリスポンダーにおいても認められ、 γ -GTPの相補的マーカーとなる可能性がある。

以上の解析では大量飲酒者を対象としたが、以上のピークの変化が健診・人間ドック受診者で見られる程度の習慣飲酒においても検出されるかどうかを検討したところ、日本酒換算毎日3合程度の習慣飲酒者においても5.9kDの変化が γ -GTPのノンリスポンダーにおいても明らかに認められたことから (Sogawa K et al, 投稿中)、 γ -GTPに相補的な新しい飲酒マーカーとして有望と思われる。また、プロテインチップシステムでは今回注目したピーク以外にも飲酒に伴い変動するピークが多数あり、その変化をバイオインフォマティクスの手法を用いて解析することにより単一マーカー以上の診断効率が得られている (投稿準備中)。しかし、5.9kDの変化は飲酒習慣に加えて、アルコールによる肝障害の影響をどの程度受けるかなど、明らかにすべき課題はまだ多い。

4. その他の肝疾患への応用

プロテインチップシステムは悪性腫瘍の早期診断マーカーを求めて、多くの研究グループに利用されていて、すでに卵巣がん (11)、前立腺がん (12)、膵がん (13)、乳がん (14)、などにおいて報告が相次いでいる。原発性肝細胞癌 (以下肝がん) においては、従来からの腫瘍マーカーは少なくとも早期診断における役割は限られている (15)。筆者らは本学臓器制御外科学と共同で、肝

がんの切除術前後の血清をプロテインチップシステムにより比較解析した結果、複数の新規マーカー候補を見出している。図5に示した例では13例中9例で術後に同様の減少が見られた。現在その精製・同定を進めている。

Poonら (16) は肝がん患者血清を予めイオン交換のステップにより疎分画したのち、2種類のケミカルチップによるプロファイリングを行い、肝がんを伴わない慢性肝障害を高感度・高特異度で鑑別しうる腫瘍特異的な proteomic signatures を明らかにしている。さらに最近になって、フランスのグループが本テクノロジーを利用して、肝がんの新しい腫瘍マーカーとして vitronectin のフラグメントを検出・同定した (17)。

またプロテインチップシステムは血清だけでなく、肝がん組織に特異的に発現しているタンパク質の検出にも利用されている (18)。

おわりに

プロテインチップテクノロジーの概要と肝疾患における筆者らのデータを紹介した。プロテインチップシステムによる血清・尿などの臨床検体の解析が普及するに伴い、問題点、注意点も指摘されている (19)。筆者らの検討においても、プロテインチップシステムで得られる relative intensity の定量性については各ピーク毎に既存の定量法と慎重に比較して検証する必要があることが明らかである。プロテインチップシステムにより得られた血清タンパクフィンガープリンティングを疾患のスクリーニングに用いる場合、決定木モデルを作成した時点から実際の解析までに時間が経過していると、機械側のレーザー強度などが変化し、再現性に問題が生じる可能性も指摘されている (20)。いずれにしてもプロテインチップシステムは、複雑な前処理なしに臨床検体に適用が可能であると同時にハイスループットなディファレンシャル解析法として画期的な技術であることには間違いなく、新しい臨床検査法としての期待は大きい。

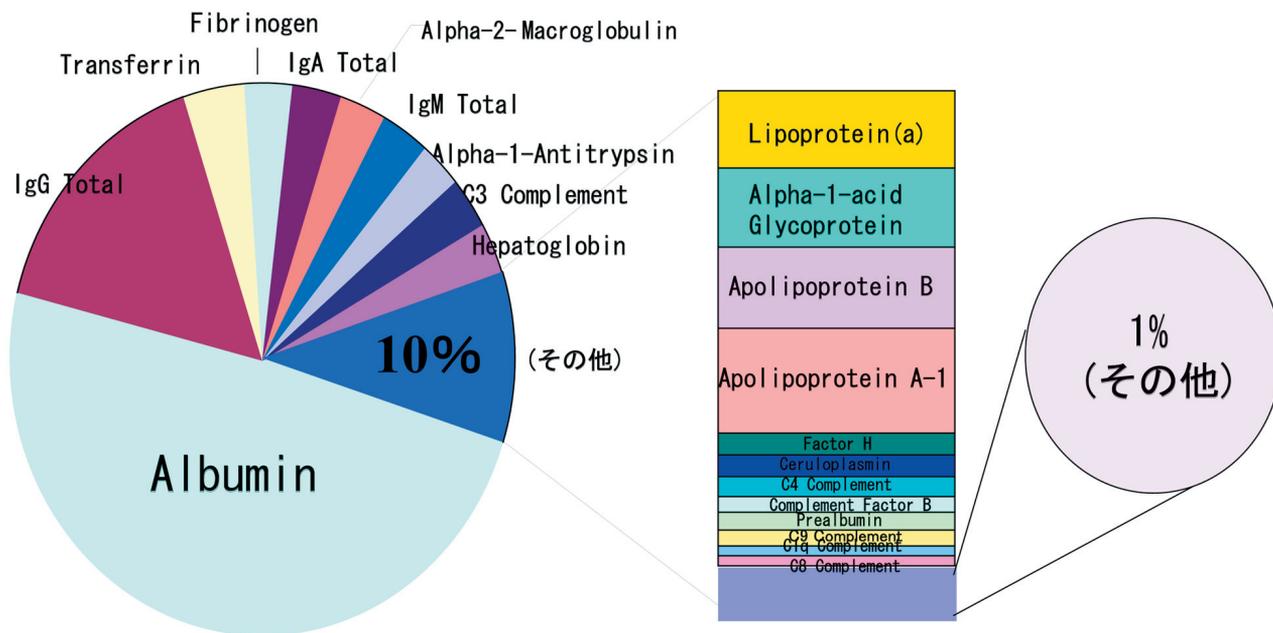


図1. 主要22タンパクが血清タンパク質の99%を占める（文献4を一部改変）

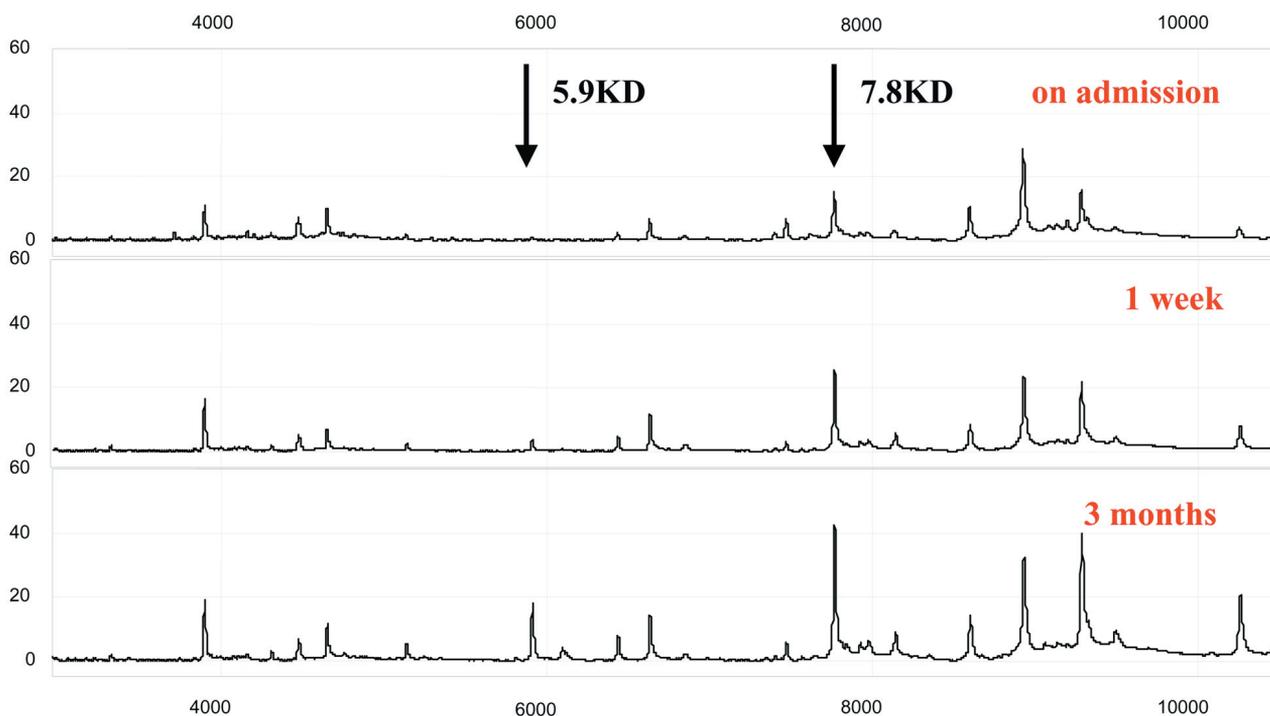


図2. 陽イオン交換チップによるアルコール依存症患者の血清蛋白プロファイリング。5.9kD, 7.8kD ピークは入院時（飲酒の影響下）にはほとんど検出されないが、断酒後上昇する。

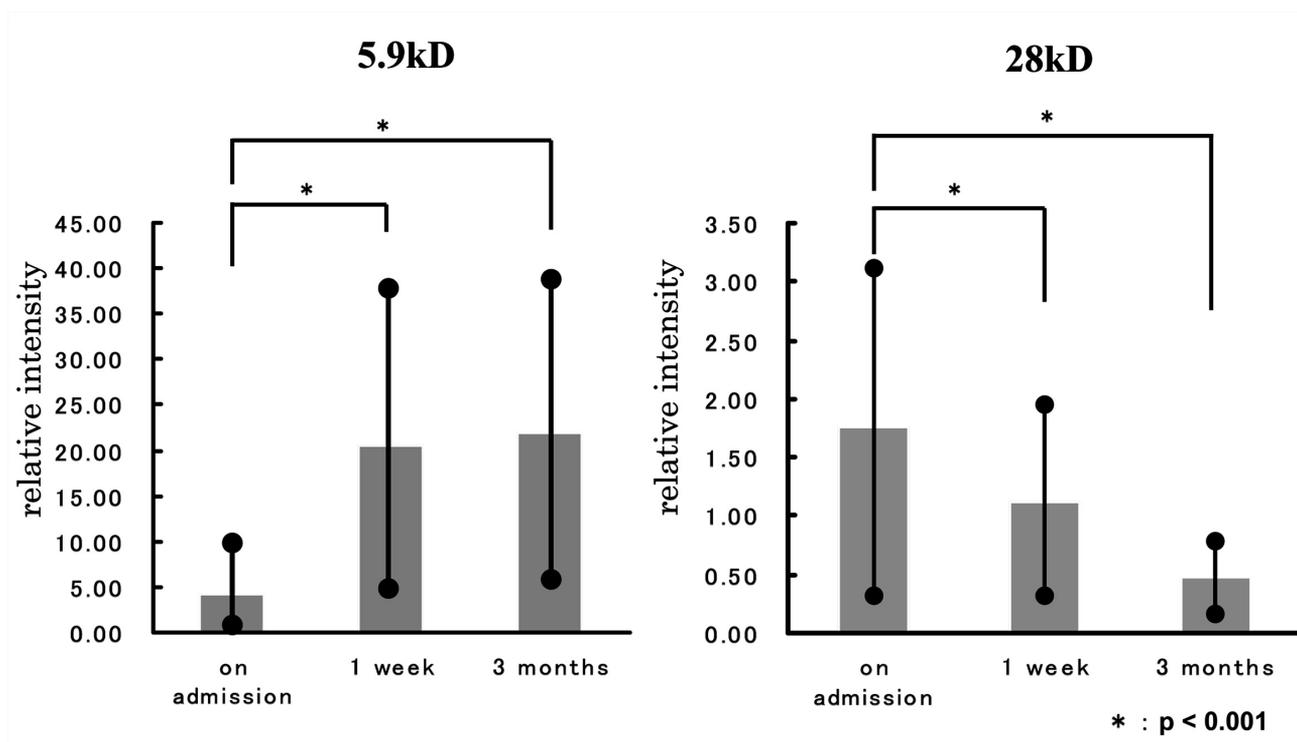


図 3. アルコール依存症計 16 症例における 5.9kD および 28kD タンパクの相対強度の断酒に伴う経時的変化

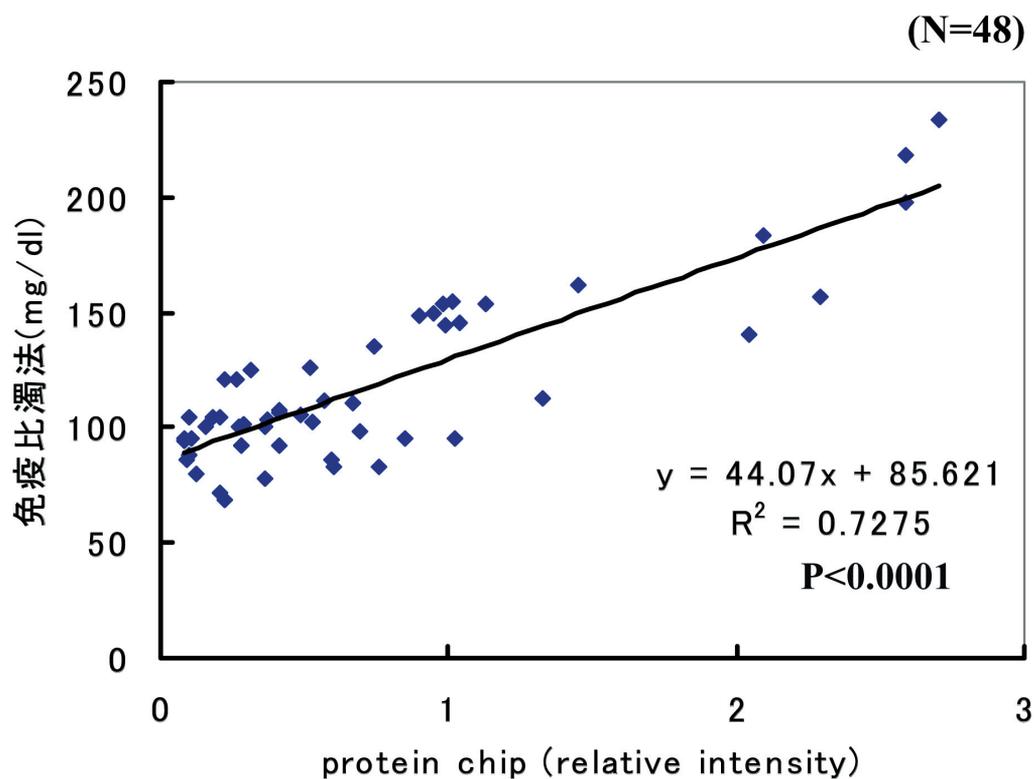


図 4. 28kD タンパク (アポ A1) の免疫比濁法による測定値と SELDI-TOF MS における相対強度との相関

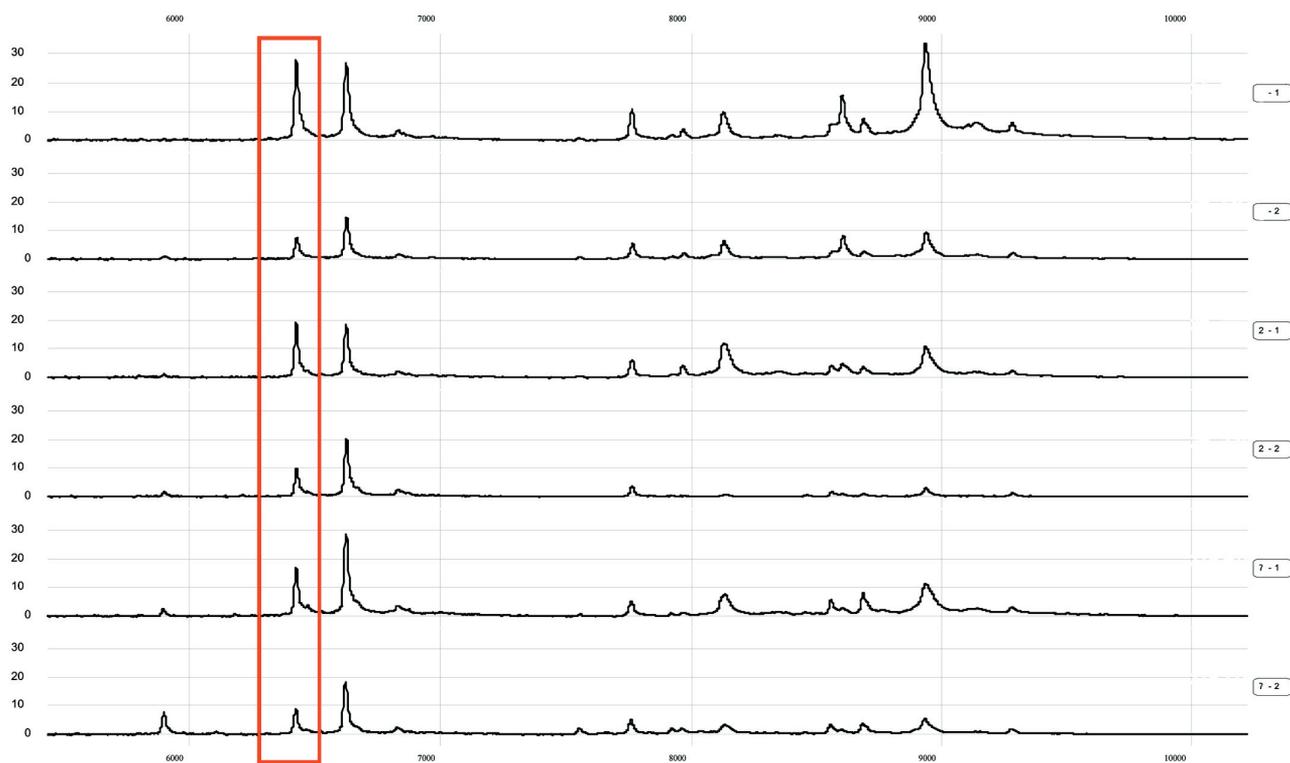


図 5. 原発性肝細胞癌 3 症例における切除前後の血清プロテオームパターン

表 1. 血清蛋白質のプロファイリング手法

- ◆ 二次元電気泳動
 - 蛍光標識二次元ディファレンス電気泳動 (2D-DIGE)
- ◆ 同位体ラベル法
 - 代謝ラベル法
 - 化学修飾法 (CAT など)
- ◆ 多次元液体クロマトグラフィー
- ◆ MALDI-TOF MS
- ◆ SELDI-TOF MS (プロテインチップシステム)

文 献

1. Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K et al. Identification of novel and down-regulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics*. 4:1187-1194, 2004
2. Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S et al. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res*. 10:2007-2014, 2004
3. 綱澤 進. プロテインチップ開発の現状と展望 医学のあゆみ 202:313-317, 2002
4. Anderson NL, Polanski M, Pieper R et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*. 3:311-326, 2004
5. Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 18:2071-2077, 1997
6. Weinberger SR, Dalmaso EA, Fung ET. Current achievements using ProteinChip Array technology. *Curr Opin Chem Biol*. 6:86-91, 2001
7. 斉藤賢治: プロテインチップシステムによるタンパク質の発現・相互作用解析. *Molecular Medicine*. 39(suppl):176-186, 2002
8. 野村文夫: 飲酒の生化学的マーカー 日本医事新報 3857, 85, 1998
9. Anton RF, Lieber CS, Tabakoff JB. Carbohydrate-deficient transferrin and γ -glutamyltransferase for detection and monitoring of alcohol use. Results from a multisite study. *Alcoholism Clin Exp Res*. 26:1215-1222, 2002
10. Duhamel G, Nalpas B et al. Plasma lipoprotein and apolipoprotein profile in alcoholic patients with and without liver disease. *Hepatology*. 4, 577-585, 1984
11. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 359:572-577, 2002
12. Adam BL, Qu Y, Davis JW et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res*. 62:3609-3614, 2002
13. Rosty C, Christa L, et al. Identification of hepatocarcinoma intestine pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res*. 62:1868-1875, 2002.
14. Li J, Zhang Z et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*. 48, 1296-1304, 2002.
15. Nomura F, Ishijima M, Kuwa K et al. Serum des-gamma-carboxy prothrombin levels determined by a new generation of sensitive immunoassays in patients with small sized hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 94:650-654, 1999
16. Poon TCW, Yip TT et al. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem*, 49, 752-760, 2003
17. Paradis V, Degos F, Dargere D et al. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology*. 41:40-47, 2005.
18. Melle C, Kaufmann R, Hommann M et al. Proteomic profiling in microdissected hepatocellular carcinoma tissue using ProteinChip technology. *Int J Oncol*. 24:885-891, 2004
19. Diamandis EP. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool. Opportunities and potential limitations. *Mol Cell Proteomics*. 3:367-378, 2004
20. Rogers MA, Clarke P et al. Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionization and neural-network analysis. *Cancer Res*. 63, 6971-6983, 2003.