

2015 年学会賞受賞者論文 総合論文

定量プロテオミクスを用いた疾患バイオマーカー探索とその医療への応用

朝 長 毅*

*E-mail: tomonaga@nibiohn.go.jp

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクト：
567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8

(受付 2016 年 4 月 23 日, 改訂 2016 年 5 月 25 日, 受理 2016 年 5 月 26 日)

本稿では、近年のプロテオミクス技術の進歩およびその進歩が新しい疾患バイオマーカーの発見などを通してどのように医療に貢献できるかについて、これまでの我々の成果の内容をもとに述べる。近年のプロテオミクスの進歩の大きなブレークスルーは、定量プロテオミクスおよび翻訳後修飾プロテオミクス技術の開発である。定量プロテオミクス技術に関しては、安定同位体標識法の登場で、検体間のタンパク質の比較定量のみならず、Selected/Multiple reaction monitoring (SRM/MRM) 法による検体中のタンパク質の絶対定量が可能になった。そのおかげで、種々の疾患について、網羅的なタンパク質バイオマーカー候補の探索と検証が可能になった。翻訳後修飾プロテオミクス技術については、特にリン酸化プロテオミクス技術の進歩により、薬剤による細胞内リン酸化シグナルへの影響を調べることができるようになり、今後薬効予測や薬剤不応性患者に対する新規治療標的タンパク質の開発に応用できると思われる。最後に質量分析計の臨床検査への応用について、技術面や行政面の課題について議論する。

1 序論

近年のプロテオミクス技術の進歩はめざましく、私がプロテオミクスの世界に入った 2000 年頃に比べると、天と地との差と言っても過言でない。当時私は、プロテオミクス解析で新しい疾患バイオマーカーの発見ができるのではないかという夢を抱いて、サイファージェン社のプロテインチップシステムを用いて種々の疾患の患者血清の解析を行っていた。確かに健康人の血清と患者血清を質量分析計 (MS) で比較すると大きさの異なるピークがいくつか見えてきて、バイオマーカー候補タンパク質だと思われたが、このピークのタンパク質の同定ができなかったため、その先に進むことができなかった。

その後、二次元電気泳動法で血清や血漿を展開し、健康人血液と患者血液の間で濃さの異なるスポットをインゲル消化して MS にかけることで、タンパク質の同定は可能になった。しかし、血液から二次元電気泳動法を用いて直接バイオマーカーを同定しようとしても、実際に MS で同定できるのはクマシーブルー染色で染まるスポットであり、その数は 100–200 個くらいであったため、今から振り返って考えると、血清中の abundant なタンパク質しか同定できていなかったことがよくわかる。

上記の二次元電気泳動法はゲルを用いてタンパク質を

分離する方法であるが、最近ではゲルを用いないいわゆるショットガン法の方がプロテオーム解析の主流となっている。ショットガン法とはタンパク質をトリプシンなどの消化酵素を用いてペプチドに断片化し、そのペプチドの配列情報を MS を用いて取得し、タンパク質のアミノ酸配列データベースの情報と比較することによってタンパク質を同定する手法である。二次元電気泳動法ではタンパク質そのものをゲルで分離するのに対し、ショットガン法では断片化したペプチドを液体クロマトグラフィー (LC) で分離し、それをエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いた MS でペプチド配列を決定する。この手法を用いることで、二次元電気泳動法の 10 倍以上のタンパク質の同定が可能となった。

ただ、この手法を用いても、血清・血漿中のタンパク質を網羅的に同定するのは到底不可能である。なぜならば、現在の MS で同定できるタンパク質濃度のダイナミックレンジはせいぜい $10^3 \sim 10^4$ 程度であり、血液に含まれるタンパク質濃度のダイナミックレンジ 10^{11} にははるかに及ばないからである¹⁾。そこで我々は、血液から直接バイオマーカーを探索するのではなく、まずバイオマーカータンパク質が濃縮されていると考えられる病変部位 (例えばがん患者の組織や神経疾患患者の髄液等) を用いてバイオマーカー候補タンパク質を探索し、それらの候補を下記に

述べるターゲットプロテオミクス法 (SRM/MRM 法) で再度病変部の検体を用いて検証し、最終的に血液や尿で検出することで診断マーカーとして臨床応用を目指した (Fig. 1).

組織を用いたバイオマーカー候補の探索の利点は、上述したようにバイオマーカータンパク質が濃縮されているために見つかりやすいという理由以外にも、見つかったバイオマーカー候補タンパク質が機能的にその疾患の発症にかかわっている可能性が高いということである。例えば、がんの組織で見出されたバイオマーカー候補タンパク質は、がん細胞のもつ特質、すなわち増殖能、遊走能、浸潤能、転移能などに関与していると考えられ、それをがんの培養細胞を用いて実験的に証明ができる。我々はこれまで、大腸がんのバイオマーカー候補タンパク質 eIF4H や FAM83H が大腸がん細胞の増殖能や遊走能の亢進に関わっていること^{2),3)}、頭頸部がんのバイオマーカー候補タンパク質 Plectin が頭頸部がん細胞の浸潤能の亢進に関わっていることを実証してきた⁴⁾。

これら組織で見つかったバイオマーカー候補タンパク質を診断マーカーとして実用化することを考えた場合、血液や尿など一般の健康診断で用いられる検体で測定できる必要がある。血液や尿などの体液中のタンパク質を測定する方法として現在一般的に行われているのは抗体を用いた ELISA 法である。しかし、抗体を用いたタンパク質定量法は、抗体の特異性が低いこと、抗体作製に時間とコストがかかることなどの欠点がある。また、最近になって、特にがん組織のゲノム解析で明らかになったように、同じ疾患でも人によって非常に個人差があるということが認識され、病気の診断にはこれまでのようなシングルマーカーに頼るのではなく、マルチマーカーを駆使して診断する必要性が叫ばれている。ところが、ELISA は一度に一つのターゲットしか測定できず、マルチマーカーの測定に対応するのは難しい。

その問題を解決する方法として、ターゲットプロテオミクスが提唱されている。上述したように、質量分析計を用

いて、血清・血漿中のタンパク質を網羅的に同定するのは到底不可能であるが、特定のターゲットに絞ることによって、網羅的に測定する場合の 1000 倍程度の感度が出るということが明らかとなった。この手法は SRM/MRM 法と呼ばれ、2013 年の Nature Method の Method of the year に選ばれている⁵⁾。SRM/MRM 法は、特定の質量の親イオンを選択的に破壊し、生成した娘イオンの中のさらに特定イオンのみを検出するため、複雑なサンプル内から標的とするタンパク質由来のペプチドを高感度に検出することができる。また、SRM/MRM 法は抗体でしばしばみられる非特異的反応を回避できることが大きな強みである。さらに、SRM/MRM 法では一度に 100 種類くらいまでのターゲットペプチドが定量できるため、上記のマルチマーカー測定に最適である。

私がプロテオミクスに携わってきた 15 年あまりで、質量分析技術や前処理法が格段に進歩した。また、それらの技術の進歩と相まって、疾患バイオマーカー探索の新しい戦略が取り入れられ、15 年前に比べて真のバイオマーカーとなりうる微量なタンパク質の同定と定量が可能になった。これまでのバイオマーカー、特に CEA, CA19-9, AFP, PSA などの腫瘍マーカーは感度・特異度が低いものにもかかわらず、約半世紀近くルーチンに使われていたが、ようやくそれらに変わるより精度の高い有望なバイオマーカーが発見させる日が来る予感がする。

2 MS および前処理法の進歩

近年のプロテオミクス技術の進歩を語るとき、MS の進歩抜きには語る事ができない。我々は主に ESI を用いた MS を使っているが、2002 年にジョン・B・フェン氏が ESI 法の技術開発でノーベル賞を受賞した頃に比べて、現在の MS は少なくとも 3 世代くらいは新しくなっているのではないと思われる。世代が変わることに平均して 5 倍程度感度がよくなっているとして、15 年で 100 倍以上感度が向上していることになる。この感度の向上はタンパク質の同定数に反映され、2000 年頃は約 100 種類程度のタンパク質同定数が、現在では 10,000 種類を超えている⁶⁾。MS の技術的進歩については、他の総説を参照されたい。

前処理法としてまず特記すべきは、iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation), SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture), TMT (Tandem Mass Tag) 法などの定量プロテオミクス用試薬の開発である。これらはいずれもタンパク質やペプチドを安定同位体標識する方法であるが、異なった安定同位体標識を複数用いることで、比較したいサンプル間の相対定量を可能にした。これらの標識法が開発されるまでは、MS を用いたプロテオミクスはタンパク質を同定する手段であって、定量する技術ではないと考えられていたが、この手法

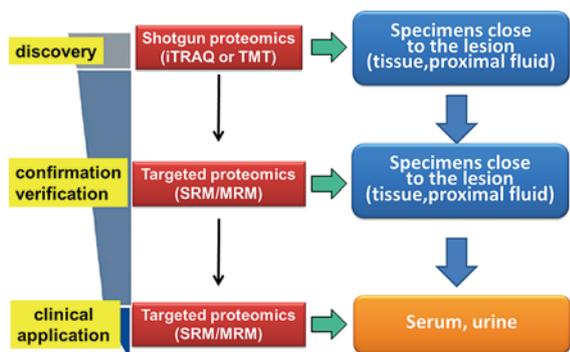


Fig. 1 Workflow for discovery and verification of biomarker candidates

の出現により、健常群と疾患群の試料中のタンパク質の比較が可能になり、疾患バイオマーカーの探索に大きく貢献したと言える。その後、上述した SRM/MRM 法を用いることにより、試料中のタンパク質の絶対定量が可能になり、これまでウエスタンブロットや ELISA など抗体を用いたタンパク質定量法に代わり、疾患バイオマーカー候補のハイスループットで正確な検証法として大きな威力を発揮することとなった。

前処理法としても一つ忘れてはならないものは、タンパク質の翻訳後修飾解析のための前処理法の進歩である。翻訳後修飾解析とえば、リン酸化、糖鎖、ユビキチン化、アセチル化、メチル化などが挙げられるが、その代表といえるリン酸化タンパク質解析のための前処理法の改良によって、リン酸化タンパク質の同定数が飛躍的に向上した。その証拠に、2000 年頃のリン酸化サイトの 1 解析あたりの同定数はせいぜい数 100 サイトであったのが、現在は 1 回の解析で 20,000 サイト以上同定できるようになった⁷⁾。これは、IMAC (immobilized metal affinity chromatography)、チタニア (TiO₂) や phostag⁸⁾ を用いたリン酸化ペプチドの効率的濃縮法やデータ解析ソフトウェアの開発によるところが大きいと思われる。また、リン酸化ペプチドの中でも、チロシンリン酸化は全体のリン酸化の 2% 以下と言われており⁹⁾、非常に同定が困難であるが、我々は最近いくつかの前処理法の改良を加えることにより、これまでの報告に比べ、3 倍以上のチロシンリン酸化サイトの同定に成功した (未発表データ)。

さらに、基本的な前処理法の開発として忘れてはならないものは、タンパク質の可溶化法ならびにペプチドの脱塩・濃縮法である。これまで、タンパク質の可溶化剤として、主に SDS や Urea が用いられてきたが、SDS は MS 解析に適さず、Urea は難溶性タンパク質の溶出力が低いことから、MS 解析に適した可溶化剤の開発が求められていた。そこで石濱らは、難溶性画分のタンパク質を効率よく可溶化するための相間移動溶解法 (Phase Transfer Surfactant : PTS 法) を開発した¹⁰⁾。PTS 法の利点は、強力な界面活性剤 (デオキシコール酸やラウロイルサルコシン酸) を用いることで膜タンパク質を効率よく可能化できること、その後の質量分析の障害となる界面活性剤を酸性条件にすることで除けるという点である。この前処理法を用いることで、膜タンパク質などの難溶性タンパク質の同定効率が飛躍的に向上した。

もう一つ前処理法に欠かせないのは、これも石濱らが開発したペプチドの脱塩・濃縮のための StageTip (stop and go extraction tip) である¹¹⁾。タンパク質を消化してできたペプチドサンプルを MS に打ち込む際に、サンプルの脱塩と濃縮が必須であるが、それまでの脱塩・濃縮法は ZipTip と呼ばれるピペットチップ型のチップを用いていた。しか

し、ピペットマンで何度も吸ったり出したりする操作が必要で煩雑であり、脱塩・濃縮可能な容量が少量で、微量なペプチドの回収率が悪かったことから、改良法が求められていた。C18-StageTip は通常実験に使うイエローチップの中に 3M 社の C18 エムポアディスクを詰めたものであるが、簡単な遠心操作ででき、容量も増やすことが可能で、しかもペプチドの回収率が非常によい。以上のような、MS や前処理法の技術の飛躍的進歩により、疾患バイオマーカーの探索も大きく進展したと言える。

3 大腸がんの新規バイオマーカーの開発

大腸がんは我が国におけるがんの死亡数の上位 (男性 3 位, 女性 1 位) のがん種である。現在健康診断や人間ドックで行われている大腸がん検査は便潜血検査であるが、感度・特異度ともに非常に低く、また、便潜血検査は大腸炎や痔核等の良性疾患でも陽性になるため、そのような症例に対して大腸内視鏡検査を行うのは患者への負担が大きい。従って、大腸がんの新しい早期診断マーカーの開発が急務である。そこで我々は、最先端のプロテオーム解析技術を用いて大腸がんの早期診断マーカーの探索を行った。

大腸がんのバイオマーカー探索の流れとして、まず初めに、大腸がん患者の組織を用いた大規模な定量ショットガンプロテオミクスによりバイオマーカーの候補となるタンパク質を探索した。ここでの定量は検体間 (大腸良性腫瘍組織 vs 転移のない大腸がん症例の組織 vs 転移のある大腸がん症例の組織) の比較定量であり、上述した iTRAQ 法を用いて行った。次いで、SRM/MRM 法を使った候補タンパク質の組織での変化の検証を行い、最終的に、組織で検証されたバイオマーカー候補タンパク質について、血液、尿中などの体液中で検出・定量が可能かどうか検討した。組織のプロテオーム解析は創薬ターゲットになりやすい膜タンパク質に焦点を絞って行った。

その結果、最初の大腸がん組織の探索で 5,566 種類のタンパク質が同定され、そのうち大腸良性腫瘍組織 vs 転移のない大腸がん症例の組織および転移のない大腸がん症例 vs 転移のある大腸がん症例の組織間で変動の見られた膜タンパク質 105 種類について、SRM/MRM 法を用いたターゲットプロテオミクスにより各組織群間での発現量の変動の検証を行った。探索で用いた同じ組織セットを用いた検証で 69 種類、別の組織セットを用いた検証で 44 種類の膜タンパク質が大腸がんバイオマーカーの最終候補として残った (Fig. 2)¹²⁾。

次に、これらのバイオマーカー候補について、血中で検出・定量ができるかどうか検討した。血液試料の測定においては、アルブミンなどの血中で存在量の多いタンパク質の影響をいかに回避し、MS で微量なタンパク質の変動を検出できるかが大きな課題となる。そこで、細胞から分

泌される細胞外小胞 (exosome) に着目して検討を行った。その一番の理由は、血中 exosome を精製する際に、アルブミンなどの存在量の多いタンパク質を除くことが可能なことである。それ以外にも、exosome は細胞から分泌されるので細胞の状態を反映している点、exosome は膜で覆われているのでタンパク質や miRNA が安定して存在する点なども exosome を解析する大きなメリットである。健常者群、転移のない大腸がん症例群及び転移のある大腸がん症例群の血清から exosome 画分を調製し、定量を試みたところ、105 種類の候補タンパク質のうち、20 種類のタンパク質が exosome 画分中で定量が可能であった。そのうち、健常者や転移のない大腸がん症例に比べて転移のある大腸がん症例で有意に高い値を示す大腸がん転移マーカー

候補と考えられるタンパク質が 3 種類見出された (Fig. 3, 未発表データ)。これらの 3 種類のうちの 1 種類 (protein A) の転移検出感度、特異度はそれぞれ 63.2% と 83.3% で従来のマーカー CEA と同程度であるが、この protein A と CEA を組み合わせることによって、感度が約 90% まで上昇することが明らかとなった。また、これらの 3 種類の大腸がん転移マーカー候補タンパク質に対応する遺伝子は、いずれも染色体 19q13 領域に存在しており、その領域は過去の報告で、進行大腸がんで増幅している部位と言われていた^{13),14)}。従って、今回の解析で見出された大腸がん転移マーカー候補タンパク質は、進行大腸がんにおけるゲノム増幅を反映していると考えられる。言い換えれば、ゲノム異常を血液で診断できるという liquid biopsy の有望なマーカーと考えられた。

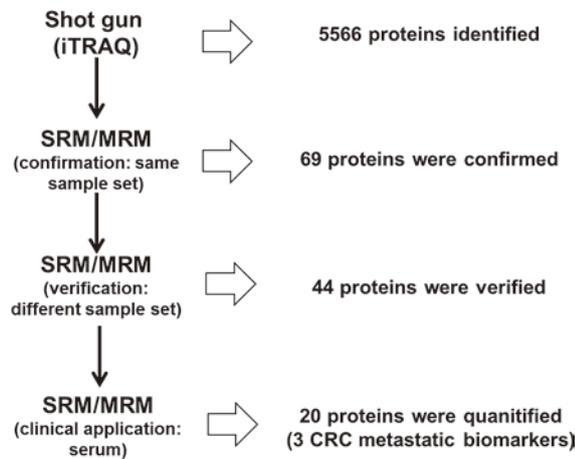


Fig. 2 Discovery, verification and clinical application of colorectal biomarker candidates

4 アルツハイマー病認知症早期診断マーカーの開発

一昔前に比べて人の寿命が著しく伸び、平成 27 年度において 65 歳以上の高齢者の割合が 26.7% と過去最高を記録した。高齢者の割合は今後も増加するのは間違いないが、5 歳寿命が延長すると認知症を発症する人の割合が 50% に達するとも言われており、認知症の発症を予測し、早期に予防的措置をとることが重要になってきた。

アルツハイマー病は β -アミロイド前駆体タンパク質 (β APP) から産生されるアミロイド β 42 ペプチド ($A\beta$ 42) の脳内異常蓄積が原因で発症すると考えられている。従って、アルツハイマー病の診断には $A\beta$ 42 の脳内蓄積量を測定することが有用であるが、診断のために脳内 $A\beta$ 42 の蓄

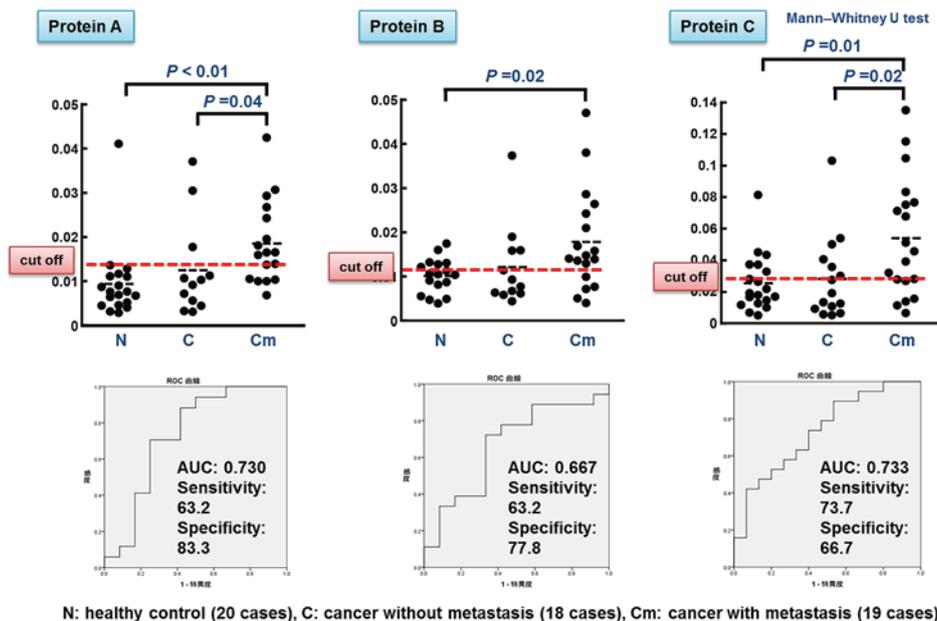


Fig. 3 Three biomarker candidates for colorectal cancer metastasis

Protein A, protein B and protein C are the three biomarker candidates of colorectal cancer metastasis. N: healthy control (20 cases), C: cancer without metastasis (18 cases), Cm: cancer with metastasis (19 cases). AUC: area under the curve.

積量を直接測定することはできないため、脳内 A β 42 の蓄積量を血液や尿など採取の際の侵襲が少ない検体で測定できるマーカーが必要となる。これまでの研究から A β 42 は脳細胞内に蓄積はするものの、それが細胞外、例えば髄液や血液中に分泌されないために、患者髄液や血液中の A β 42 量は脳内蓄積量を反映していないことが分かっている。さらに、A β 42 は全身の細胞に存在すると言われており、脳細胞特異的な分子ではない。そこで、脳内 A β 42 の蓄積量を反映したサロゲートマーカーが必要となる。

そのサロゲートマーカー候補として、大河内らは APL1 β 28 に着目した。A β 42 は β APP が β -secretase (BACE) と Presenilin/ γ -secretase で切断されて生成されるが、 β APP 類似タンパク質 APLP1 (Amyloid-like protein 1) も同じ機構で切断されて APL1 β 28 が生成し、細胞外へ分泌される。大河内らの研究により、 β APP から生成される A β 38, 40, 42 に対応して APLP1 から APL1 β 25, 27, 28 が生成されること、APL1 β は A β と異なり脳細胞外に分泌されること、また、髄液中の APL1 β 28 の量は脳細胞内の A β 42 産生量を反映することが明らかとなった¹⁵⁾。さらに、アルツハイマー病患者の髄液において APL1 β 28/total APL1 β 量比が健常者と比較して高いレベルで存在しており、新規のアルツハイマー病サロゲートマーカーとして期待された。

ただ、疾患の早期診断マーカーとして実用化する際に、人の髄液を採取して測定することは不可能であるため、APL1 β が血液中で測定できるか検討したところ、髄液中の APL1 β を測定した ELISA キットを用いても検出できなかった。その原因として、血中の APL1 β 量は髄液中に比べて極微量であることが推測された。そこで次に、MS を使った SRM/MRM 法を用いて血中の APL1 β が検出できるかどうかを試みた。

上述したように、MS で血中の超微量なタンパク質を検出することは非常に難しい。特に血中 APL1 β は ELISA でも検出できなかったペプチドであるため、MS での検出も非常にチャレンジングなテーマであり、血中の abundant なタンパク質を除いて APL1 β のみを濃縮する前処理法の開発が APL1 β の測定ができるか否かの鍵を握ると考えられた。そこで我々は最初、アルブミン吸着カラムとアセトニトリル沈殿を組み合わせ、血中の abundant なタンパク質の大部分を除くことによって APL1 β を検出・定量することに成功した¹⁶⁾。しかし、ヒト血中の APL1 β 量はこの手法での定量限界ギリギリのレベルであり、APL1 β 量の安定した定量には難があることがわかった。そこで、我々は前処理法を改良するために、抗体を用いた APL1 β の濃縮を行うことにした。血中の APL1 β を抗 APL1 β 抗体により免疫沈殿させた APL1 β を SRM/MRM 法で測定した。また、APL1 β を抗体から溶出する際に抗体そのものも一

緒に溶出されてくるので、アセトニトリル沈殿で抗体を除くこととした。その結果、従来の前処理法に比べ 10 ~ 20 倍低い S/N 比となり、血中の APL1 β を安定して定量できるようになった。ちなみに、血中の APL1 β の濃度は約 0.3 fmol/mL であり、この測定感度は世界最高レベルである。

以上の前処理法を用いて、認知症患者血漿 0.8 mL 中の APL1 β を定量した。まず、患者髄液と血中の APL1 β 28/total APL1 β 量比を比較したところ、その比はよく相関することがわかった (Fig. 4)。また、非アルツハイマー病認知症患者とアルツハイマー病認知症患者の血中の APL1 β 28/total APL1 β 量比を測定したところ、測定した検体数は少ないものの、アルツハイマー病認知症患者群で有意に高値を示した。現在、さらに検体数を増やして検討中である。

このアルツハイマー病認知症マーカーのように、SRM/MRM 法でしか測定できないマーカーを実用化に結びつける場合はいくつかのハードルがある。まず、LC-MS によるタンパク質定量法は現在臨床検査には用いられていない。そもそも MS が細菌の同定検査として保険適応されたのはつい最近のことであり、それもマトリックス支援レーザー脱イオン化法 (MALDI-TOF MS) を用いたものである。以前から新生児マススクリーニング法として代謝産物を測定するのに LC-MS が用いられているが、保険適応にはまだなっていないのが現状である。現在タンパク質の定量法として主流である ELISA 法に比べ、MS を用いた方法は、感度・特異度に優れ、一度に多くのバイオマーカーの定量が可能であり、抗体を用いないため低コストであるといういくつかの大きなメリットがあるが、将来的に LC-MS によるタンパク質定量法を実用化しようと考えたとき、前処理法の簡略化や検体処理時間の短縮などクリアしなければならない問題がある。上記の APL1 β の定量は nanoLC を使ってペプチドを分離しているが、1 検体の測定に約 1 時間を要してしまい、スループット性に劣る。そこで我々は、よりハイスループットな検体処理を可能にするため、LC を nanoflow から microflow に変えて、APL1 β が定量でき

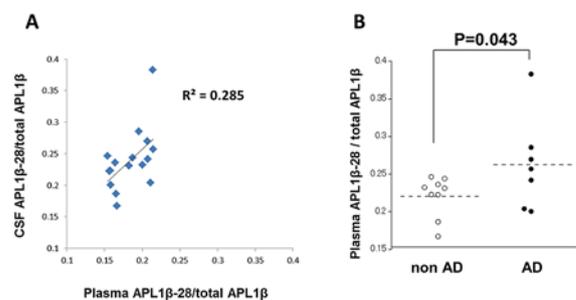


Fig. 4 Biomarker candidates for Alzheimer disease (APL1 β)

A: Comparison of APL1 β -28/total APL1 β ratio between CSF and Plasma B: APL1 β -28/total APL1 β ratio in non AD dementia and AD dementia patient plasmas.

るかどうかが検討した。その結果、microflow では nanoflow に比べて多少バックグラウンドが上がり S/N 比は落ちるものの、高精度の MS を用いれば十分定量可能であることが明らかとなった (Fig. 5)。

最後に血中 APL1β はアルツハイマー病認知症の早期診断マーカーとして有用であると考えられるが、上述したように APL1β の生成メカニズムが Aβ42 の生成メカニズムと同じであるため、血中 APL1β 量は β-secretase (BACE) と Presenilin/γ-secretase の活性の指標にもなりうる。現在世界中でアルツハイマー病認知症の治療薬が開発されているが、β-secretase (BACE) や Presenilin/γ-secretase がその治療薬の標的の有望な候補となっていることから、血中 APL1β 量はそれらの治療薬の効果判定の指標としても使える可能性がある。従って、血中 APL1β 定量法の開発のニーズは高いと考えられる。

5 リン酸化プロテオミクスの個別化医療への応用

近年、特にがんの治療薬として分子標的薬が次々と開発され、がん患者の予後が非常によくなってきている。しかし、分子標的薬はこれまでがんの治療薬として用いられてきた化学療法剤に比べ、効果のある症例とない症例がはっきり分かれる傾向にあるため、効果のある症例を選別して使う必要がある。また、最近の分子標的薬である抗 PD-1

や抗 PD-L1 抗体薬などは、年間数千万円の費用がかかるため、すべてのがん患者に用いると国家財政が破綻してしまう恐れがある。

現在分子標的薬（主にキナーゼ阻害剤）の薬効予測は、患者組織のゲノム解析により一般的に行われている。例えば、非小細胞性肺癌に対する EGFR 阻害剤は EGFR 変異を有する症例が対象となり、ALK 阻害剤は EML4-ALK 融合遺伝子を持つ症例が対象となる。また、進行大腸がんの EGFR 抗体薬は KRAS 遺伝子の変異のない症例が対象となっている。しかし、特定の遺伝子変異だけで薬効予測をすることには限界があることが明らかになってきており¹⁷⁾、多角的かつ包括的なコンパニオン診断薬（薬効予測診断薬）の開発が必須である。また、上記の遺伝子解析で分子標的薬の対象とならない症例に対しては、従来用いられてきた化学療法剤が使われているのが現状である¹⁸⁾ (Fig. 6)。そのため、より精度の高いコンパニオン診断や新たな分子標的の開発に対して、次世代シーケンサーを使った大規模なゲノム解析が行われているが、技術的、コスト的にまだ問題が多いうえ、遺伝子変異と薬剤感受性との関連性が不明なケースが多く、今のところ際立った成果が出ていないのが現状である。

従って、より正確な薬効予測や新しい分子標的の発見のためには、薬剤の直接のターゲットであるタンパク質発現の変化を調べるのが重要である。その中でもキナーゼは、代表的な薬剤ターゲットであり、そのキナーゼの活性化状態を調べることで、細胞内のどのシグナル経路が薬剤感受性に重要かが推測でき、薬効予測や新たな分子標的の発見に有用であると考えられる。言い換えれば、特定のキナーゼ活性が亢進したがんにおいては、対応するキナーゼ阻害剤が有効であると予想できる。そのため、標的となるキナーゼの活性定量解析が重要となる。

キナーゼは複数の基質（タンパク質）をリン酸化すると考えられており、それらの基質のリン酸化状態がわかれば、責任キナーゼの活性が推測できる。従って、キナーゼの活

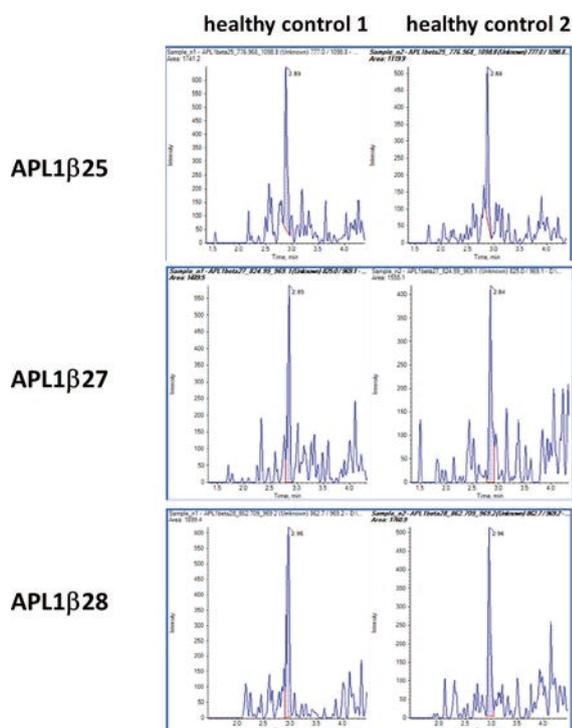


Fig. 5 Quantitation of APL1β peptides by microflow LC-MS
 APL1β25, 27 and 28 peptides in two healthy control plasmas were quantitated by microflow LC-MS at flow rate of 20 μl/min. LC: EksigentNanoLC 400, MS: AB SCIEX QTRAP® 6500.



Fig. 6 Molecular target therapy for non-small cell lung cancer

EGFR inhibitors are prescribed for EGFR mutant non-small cell lung cancer patients and tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are prescribed for patients with EML4-ALK fusion gene, whereas other patients are not applicable for molecular target therapy and ordinary chemotherapy is administered.

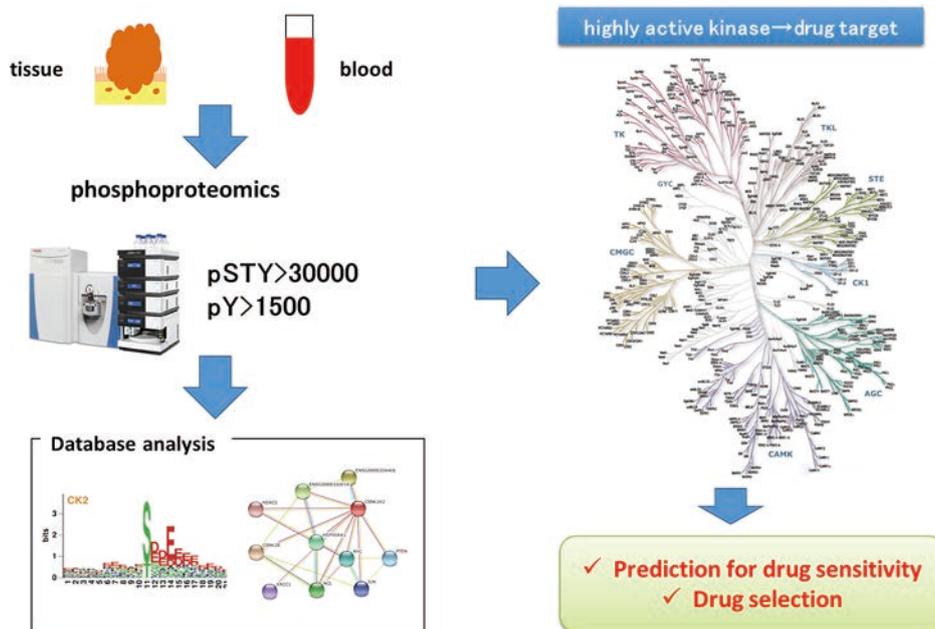


Fig. 7 Precision medicine using phosphoproteomics

Phosphoproteomic data obtained by patient tissues or blood are analyzed by bioinformatics using phosphoproteomic database, which predicts highly active kinases. These kinases will be companion markers for molecular targeted drug and/or appropriate drug targets for patients.

性を網羅的に調べるためには、その基質であるタンパク質のリン酸化を網羅的に調べる必要がある。前項で述べたように、リン酸化プロテオミクスの技術革新は凄まじく、1解析あたりのリン酸化サイトの同定数は15年前に比べて200倍にもなり、現在は1回の解析で20,000サイト以上同定できるようになった⁷⁾。そこで我々は、大規模なリン酸化プロテオミクス技術を用いて、薬効予測及び新たな薬剤標的探索に有用なキナーゼの網羅的解析を進めている。

これまで培養細胞を用いたリン酸化プロテオーム解析により、2 mgのタンパク質から1回の解析で約22,000のリン酸化サイトを同定することができた(未発表データ)。通常のリン酸化プロテオーム解析では、同定されるリン酸化サイトのほとんどがセリン・スレオニンであり、がんの増殖シグナルに重要なチロシンリン酸化の同定率は全リン酸化サイトの1%未満(< 200サイト)である。そこで我々は、前処理法に改良を加えることにより、約1,500のチロシンリン酸化サイトの同定に成功している(未発表データ)。このチロシンリン酸化サイトの同定数はこれまでの先行研究の中で、細胞内のチロシンリン酸化シグナルを人為的に活性化しない状態のチロシンリン酸化の最高の同定数である600サイト¹⁹⁾を大きく上回っている。これらの解析手法の改良により、リン酸化チロシンを含む多くのリン酸化ペプチドの定量解析できるようになり、その定量値から独自のバイオインフォマティクスを用いてキナーゼ活性を予測できるようになった(Fig. 7)。

このリン酸化プロテオミクス技術を用いて肺がんの培養細胞の解析を行った。上述したように、非小細胞性肺がんはEGFR遺伝子変異のある症例に対してのみEGFR阻害剤が有効であると言われている。実際、EGFRの変異のない肺がん培養細胞4種類に対してEGFR阻害剤であるErlotinib処理をしたところ、薬剤の濃度を上げててもviabilityに変化がないことが確かめられた(Fig. 8)。それらの細胞を用いてリン酸化プロテオーム解析を行ったところ、いくつかのキナーゼが活性化していることが推測された。そこで、それらのキナーゼに対する阻害剤を単独あるいはErlotinibと一緒に処理したところ、いずれの細胞も薬剤の濃度依存的にviabilityが劇的に下がった(Fig. 8)。この結果より、非小細胞性肺がんでEGFR阻害剤の適応にならない症例の中には、この細胞株のように別のキナーゼ阻害剤が有効である可能性が示唆された。今後、患者の手術切除組織やバイオプシーの組織を用いて同様の解析を行うことにより、分子標的薬の対象から漏れた症例にも新たな分子標的薬の提案ができることが期待される。

6 LC-MSを用いたバイオマーカー検査の実用化に向けた課題

これまで述べてきたように、最新のプロテオミクス技術を用いることにより、ヒト生体試料中に微量に存在するバイオマーカー候補タンパク質が検出できるようになってきた。しかし、バイオマーカータンパク質が見つかることとそれを診断薬として実用化するということは全く別の問題

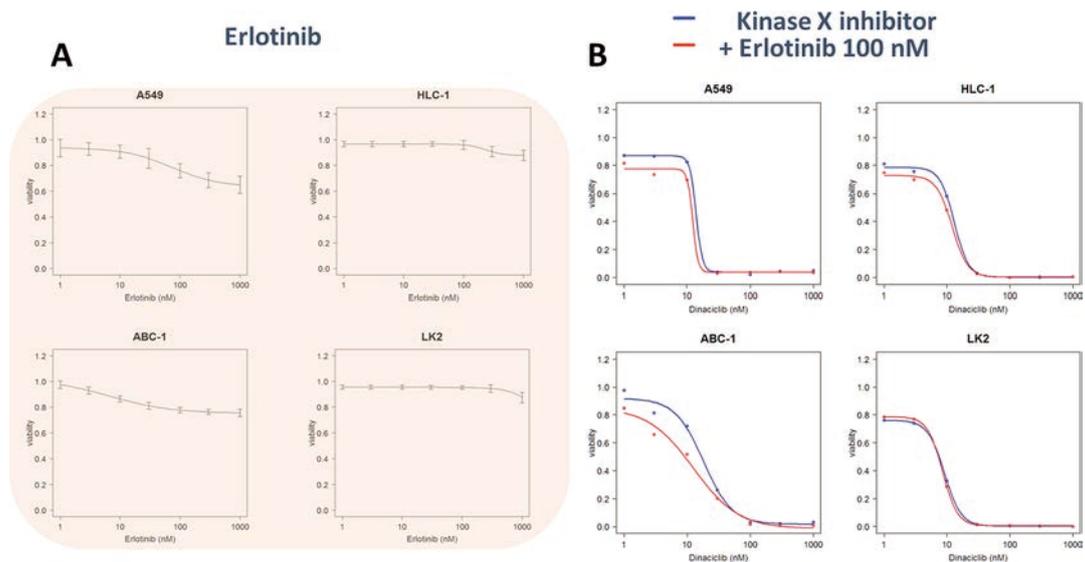


Fig. 8 An example of application of phosphoproteomic analysis for identification of drug target
 A: Viability of four lung cancer cell lines treated with an EGFR inhibitor, Erlotinib. All cell lines have no EGFR mutation and are resistant to Erlotinib. B: Viability of the lung cancer cell lines resistant to Erlotinib treated with kinase X inhibitor or Erlotinib and kinase X inhibitor. All cell lines are sensitive to kinase X inhibitor.

であり、多くの課題が残されている。

一つは、LC-MS でしか検出できないバイオマーカーをどのように実用化していくかという点である。アルツハイマー病認知症のバイオマーカーの項で述べたように、LC-MS の実用化のためには前処理法の簡略化や検体処理時間の短縮はもちろんであるが、その先に LC-MS を検査機器として PMDA や厚生労働省に承認される必要がある。実際、細菌検査で用いる MALDI-TOF MS は 2011 年にクラス I の一般医療機器として PMDA から認可された。一般医療機器とは、不具合が生じた場合でも、人体への影響が軽微である機器のことを指し、クラス II や III などの不具合が生じた場合に人体への影響がある管理医療機器と区別される。また、クラス II や III は厚生労働省の承認が必要なのに対し、クラス I の医療機器はその承認が必要ないために、すぐに実用化できる利点がある。LC-MS がクラス I の医療機器として認められるのか、それとも医療機器薬事承認が必要な新医療機器などに該当するのかは今後 PMDA や厚生労働省に相談する必要があるが、質量分析機器メーカーには将来の実用化も視野に入れて、機器の開発と同時に薬事承認も進めていただきたい。

もう一つのハードルはマルチマーカーの測定をいかに承認してもらおうかということである。現在のタンパク質検査の主流である ELISA 法はシングルマーカーの測定法であるため、新しいバイオマーカーが見つかったときに、シングルマーカーとしての ELISA キットの開発は比較的ハードルが低い。しかし、マルチマーカーの測定キットというのはこれまで前例がないために、なかなか国の承認がおりないのではないかと危惧される。ただ、最近では国の主導で

ゲノム医療の推進が叫ばれる時代であり、ゲノム解析による診断は複数の遺伝子検査の組み合わせが必須となると考えられるため、マルチマーカーの必要性は近い将来 PMDA や厚生労働省の理解が得られるものと期待される。LC-MS を用いるメリットは、感度・特異度に優れており、一度に多くのバイオマーカーの定量が可能で、設備投資分の減価償却を除けば低コストで済むことなので、国がマルチマーカーの実用化に関して柔軟に規制緩和することを切望する。

最後に、新しいバイオマーカーの開発に最も重要なのは、いかにそのマーカーが真のマーカーであるかを検証することである。そのために、バイオマーカー候補となったタンパク質の機能解析は欠かせないが、それと同時に複数の施設で収集した多検体を用いた検証が必須であり、国内のバイオバンクの整備が重要な課題である。現在バイオバンクジャパンをはじめとして、国内に大きなバイオバンクがいくつか存在するが、検体の背景にある患者情報の収集や検体そのものの品質管理については十分とは言えない。特に、基盤技術開発に携わる研究施設ではカルテ情報の入手は極めて困難である。バイオマーカーの実用化達成に向けては、基盤技術の進歩だけでなく、基礎と臨床の連携、患者情報を効率よく収集・入手できる環境整備についても、国が積極的に進めていくことが必要と思われる。

謝 辞

私が 2009 年に医薬基盤研究所に赴任したときには、ショットガン解析すらやった経験がなく、この先どうなることやらと頭を悩ませていた。しかしそれからわずか 6 年

でショットガンプロテオミクスやターゲットプロテオミクスを人前で語れるようになり、2015年には日本プロテオーム学会の学会賞までいただけるようになった。これらは、ひとえに沢山の先生方のご支援のおかげだと考えている。この場をお借りして、千葉大学野村文夫先生、北里大学前田忠計先生、小寺義男先生、大石正道先生、横浜市立大学平野久先生、九州大学中山敬一先生、松本雅記先生、京都大学石濱泰先生、熊本大学荒木令江先生、そして医薬基盤研究所で私とともに研究に切磋琢磨してくれた研究員と技術補助員の方々、最後に日本プロテオーム学会会員の皆様に深く感謝いたします。

著者に開示すべき利益相反状態は無い。

文 献

- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:845–867.
- Wu D, Matsushita K, Matsubara H, *et al*. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis *in vivo* and is a potential therapeutic target for human cancer. *Int J Cancer*. 2011;128:1018–1030.
- Kuga T, Kume H, Kawasaki N, *et al*. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I alpha and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci*. 2013;126:4721–4731.
- Katada K, Tomonaga T, Satoh M, *et al*. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J Proteomics*. 2012;75:1803–1815.
- Gillette MA, Carr SA. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat Methods*. 2013;10:28–34.
- Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, *et al*. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:789–801.
- Humphrey SJ, Azimifar SB, Mann M. High-throughput phosphoproteomics reveals *in vivo* insulin signaling dynamics. *Nat Biotechnol*. 2015;33:990–995.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Sugiyama Y, *et al*. Highly sensitive detection of protein phosphorylation by using improved Phos-tag Biotin. *Proteomics*. 2012;12:932–37.
- Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*. 2001;101:269–295.
- Masuda T, Tomita M, Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res*. 2008;7:731–740.
- Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional peptide fractionation in proteomics. *J Proteome Res*. 2006;5:988–994.
- Kume H, Muraoka S, Kuga T, *et al*. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13:1471–1484.
- Knösel T, Petersen S, Schwabe H, *et al*. Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases. *Virchows Arch*. 2002;440:187–194.
- Knösel T, Meisel H, Borgmann A, *et al*. Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer. *Neoplasia*. 2004;6:23–28.
- Yanagida K, Okochi M, Tagami S, *et al*. The 28-amino acid form of an APLP1-derived Abeta-like peptide is a surrogate marker for Abeta42 production in the central nervous system. *EMBO Mol Med*. 2009;1:223–235.
- Sano S, Tagami S, Hashimoto Y, *et al*. Absolute quantitation of low abundance plasma APLP1 β peptides at sub fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J Proteome Res*. 2014;13:1012–1020.
- Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, *et al*. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science*. 2014;346:1480–1486.
- Mitsudomi T, Suda K, Yatabe Y. Surgery for NSCLC in the era of personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:235–244.
- Johannes C, Mijnders VD, Labots M, *et al*. Evaluation of different phospho-tyrosine antibodies for label-free phosphoproteomics. *J Proteomics*. 2015;127:259–263.

Discovery of Disease Biomarkers by Quantitative Proteomics and Their Clinical Application

Takeshi Tomonaga*

*E-mail: tomonaga@nibiohn.go.jp

Laboratory of Proteome Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition,
7-6-8, Saitoasagi Ibarakishi, Osaka 567-0085, Japan

(Received: April 23, 2016; Revised: May 25, 2016; Accepted: May 26, 2016)

In this article, recent advances in proteomic technology and how they can contribute to medical care by enabling the discovery of disease biomarkers are discussed. The recent breakthroughs in proteomic technology are progress in quantitative proteomics and post-translational proteomics. First, the development of a stable isotope labeling technology enabled both the relative protein quantitation between samples and absolute quantitation of proteins in each sample by selected/multiple reaction monitoring (SRM/MRM). These technologies enabled the achievement of comprehensive biomarker discovery and the validation of various disease biomarker candidates. Second, progress in post-translational proteomics, particularly phosphoproteomics, enabled the identification of the effects of drugs on cellular phosphorylation signaling, which could be applied to predict drug efficacy and develop novel drug targets for patients who are unresponsive to existing drugs. Finally, the current technical and administrative problems that impede the application of mass spectrometry to clinical examination are discussed.

Keywords: biomarker; companion diagnostics; precision medicine; quantitative proteomics; targeted proteomics.