

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010-2012

課題番号：22590545

研究課題名（和文）固形癌の早期局在診断に有用な膜タンパク質のプロテオーム解析

研究課題名（英文）Membrane proteomic analysis of cancer tissue for identification of biomarkers for early diagnosis

研究代表者

久米 秀明 (KUME HIDEAKI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：50322714

研究成果の概要（和文）：

大腸癌バイオマーカータンパク質の同定を目的として、大腸癌患者組織から調製した膜画分の大規模な網羅的定量解析とその検証をおこなった。同定された 5566 種類のタンパク質の中で、5287 個が遺伝子オントロジー解析により注釈付けされ、3087 個は膜に局在することが推定された。また、TMHMM 解析により、1567 個のタンパク質は膜貫通ドメインを有する膜タンパク質であることが推定された。同定タンパク質には、ポリープと癌組織、または転移のない癌組織と転移のある癌組織間で発現量に有意な差のあるタンパク質が、100 種類以上含まれていた。そうしたバイオマーカー候補タンパク質の中の 105 個について、SRM 法を用いて検証した結果、78 個は、SRM 法でも癌の悪性化に伴う有意な発現変化が確認された。2 つの候補タンパク質 protein-X と-Y については、ウェスタンブロット法や免疫組織染色法を用いた検証もおこなった。さらに 14 種類の癌組織を含む組織アレイ解析により、protein-X と-Y は、大腸癌だけでなく、胃癌や乳癌、前立腺癌でも高発現していることが示されたことから、大腸癌だけでなく、他の癌においても有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We performed quantitative proteomic analysis of membrane fractions from colorectal cancer tissue for biomarker discovery and extensively validated biomarker candidate proteins. A total of 5287 of 5566 identified proteins were annotated by GO cellular components analysis and 3087 were predicted to be membrane proteins. Also, 1567 proteins were predicted to have a transmembrane domain by TMHMM algorithm. Over 100 of proteins were differentially expressed between polyps and cancer or between cancer with and without metastasis. Among these biomarker candidates, 105 proteins were further quantitated by selected reaction monitoring (SRM) using synthetic stable isotope-labeled peptides as internal control and 78 were verified. The expression of two candidate proteins, protein-X and -Y, were also confirmed by Western blotting and immunostaining. Furthermore, analysis of multi-cancer tissue microarray consisting of 1150 cores from 14 cancer tissues showed that these proteins were highly expressed not only in colorectal cancer but also in several cancer tissues, suggesting that these proteins have the potential to be biomarker for stomach, breast and prostate cancer as well as colon cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：腫瘍検査学

1. 研究開始当初の背景

特定の疾患の状態や薬の効果などに応じて、血液や尿あるいは組織にみられるタンパク質は、バイオマーカータンパク質として疾患の発症・状態の予測や、病気の正確な診断とそれに基づく最適な治療法の選択、さらに治療薬の効果や副作用の判定にも役立つ。

癌においても幾つかのタンパク質がバイオマーカー（腫瘍マーカー）として報告され、癌の診断に用いられていたが、治療効果の高い早期の段階での癌の発見や局在診断に有効なバイオマーカーは明らかにされていなかった。したがって、新規の有用な癌バイオマーカーを見出すことは、癌の早期発見や正確な診断に大いに役立つことが予想された。

また、腫瘍マーカーの同定を目的としたプロテオミクス技術を用いた研究報告はあるものの、本研究と同様に、膜タンパク質に着目し、腫瘍マーカーを網羅的に解析した報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

効果的な癌治療をおこなうために、早期発見や局在診断、予後予測に有用なバイオマーカーの開発が求められている。我々は、新規の有用な大腸癌バイオマーカーを見出すことを目的として、プロテオームの手法を用いて、大腸癌組織から調製した膜タンパク質画分の網羅的な定量解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 膜タンパク質画分の調製と網羅的な定量解析

ポリープと大腸癌組織（転移なしと転移あり）、それぞれ6検体ずつ合計18検体をホモジュナイザーで破碎し、低速遠心で核や未破碎の細胞を除いた後、超高速遠心をおこない、その沈殿画分を膜タンパク質画分とした。さらに、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）を含む溶液で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加え、酸性条件にすること（相間移動溶解法 [PTS法]）で質量分析の際に悪影響となる界面活性剤を除いた。脱塩精製後得られたペプチドサンプルは、iTRAQ 試薬で同位体標識ラベル後、SCX カラムにより36分画し、LTQ-Orbitrap XL 質量分析計を用いて測定した。データベース検索および定量解析は、解析ソフト Proteome Discover を用いておこなった。

(2) SRM 法を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検証

網羅的な定量解析により得られたバイオマーカー候補タンパク質は、SRM 法を用いて検証した。候補タンパク質のアミノ酸配列情報を基に、SRM 法で特異的に検出されるペプチド（トリプシン消化断片）を1または2種類ずつ選択し、それぞれに対する安定同位体標識ペプチド(SI ペプチド)を合成し、内部標準ペプチドとして用いた。組織検体サンプルから膜画分を調製し、トリプシン消化後、内部標準ペプチドを混合し、TSQ Vantage 質量分析計を用いた SRM 法により相対定量解析を行った。

(3) ウェスタンブロット法と免疫組織染色法を用いた大腸癌組織での候補タンパク質の発現確認

ポリープおよび大腸癌組織の全抽出サンプルを5-20%ポリアクリルアミドゲルで SDS 電気泳動後、PVDF 膜に転写し、ウェスタンブロットティングに用いた。候補タンパク質に対する一次抗体とその抗体に対する二次抗体（抗ウサギ HRP 抗体）で反応後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

凍結保存した大腸癌組織サンプルをクライオスタットで薄切し、免疫組織染色に用いた。4%パラホルムアルデヒドで固定後、候補タンパク質に対する一次抗体、および二次抗体で反応後、DAB 法で検出した。

(4) 組織アレイを用いた多検体および他臓器癌組織での候補タンパク質の発現確認

14種類の癌組織（肺癌（腺癌）、肺癌（扁平上皮癌）、乳癌、腎臓癌、胆道癌、甲状腺癌、肝臓癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌、膵臓癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮癌）を50または100検体ずつ含む癌組織アレイとそれぞれの癌組織に対応する正常組織を20検体ずつ含む正常組織アレイを用いて、候補タンパク質の多検体での発現と様々な癌組織での発現を調べた。候補タンパク質に対する一次抗体、および二次抗体で反応後、DAB 法で検出した。

4. 研究成果

iTRAQ 法を用いた網羅的な定量解析の結果、5566種類のタンパク質が同定され、その中の1567種類(28.2%)のタンパク質は膜貫通ドメインを有する膜タンパク質であることが推定された(表1)。また、遺伝子オンロジー解析の結果、5566種類のタンパク質のうち5287種類のタンパク質が注釈付けされ、その中の3087種類(58.4%)のタンパク質は生体膜(membrane)に局在し、652種類(12.3%)のタ

ンパク質は細胞外 (extracellular) に局在するタンパク質であることが推定された。

表 1. 膜タンパク質として予測されるタンパク質数

種類	割合 (%)
膜貫通ドメインを有するタンパク質数	28.2
GO-アノテーションされたタンパク質	100
Membrane	58.4 ^a
Extracellular	12.3 ^a

^aTMHMM(膜貫通領域予測プログラム)により膜貫通ドメインをもつことが予想されたタンパク質数
^bGene Ontology (GO) 解析により注釈されたタンパク質に対する生体膜 (Membrane) または細胞外 (Extracellular) に局在するタンパク質として推定されたタンパク質の割合

網羅的な定量解析の結果、ポリープと転移のない癌、転移のない癌と転移のある癌、ポリープと転移のある癌組織間で、発現量の異なる (2 倍以上または 0.5 倍以下、P 値 0.1 以下) タンパク質が 100 種類以上見いだされた (表 2)。

表 2. 発現量に有意な差のみられたタンパク質数

比率	P 値	C / P		Cm / C		Cm / P	
		TM + mem	Extra	TM + mem	Extra	TM + mem	Extra
> 2.0	< 0.1	108	34	21	8	79	21
> 0.5	< 0.1	51	21	11	9	20	16

C / P: ポリープと転移のない大腸癌組織間の比較, Cm / C: 転移のない大腸癌と転移のある大腸癌組織間の比較, Cm / P: ポリープと転移のある大腸癌組織間の比較, TM + mem: TMHMM 解析により膜貫通ドメインを有する, 又は GO 解析により生体膜に局在することが予想されたタンパク質の総数, Extra: GO 解析により細胞外に局在することが予想されたタンパク質数

こうした大腸癌の悪性化に伴い発現量の変化するバイオマーカー候補タンパク質の中で、診断や創薬のターゲットとなりやすい膜タンパク質や細胞外分泌タンパク質 105 個に着目し、SRM 法を用いた検証をおこなった。その結果、78 個の候補タンパク質は、SRM 法でも癌の悪性化に伴う発現変化が確認された。その中には、ポリープに比べて、転移のない癌組織での発現上昇がみられたもの (図 1 A)、転移のない癌組織に比べて、転移のある癌組織での高発現が見られたもの (図 1 B)、ポリープよりも転移のない癌組織、さらに転移のない癌組織よりも転移のある癌組織と悪性度が高い癌組織でより高発現しているもの (図 1 C)、ポリープに比べて転移のない癌組織での発現の低下が示されたもの (図 1 D) が含まれていた。検証された候補タンパク質 78 個のうち、66 個はポリープと癌組織の間で発現変化し、17 個は転移ありとなしの癌組織間で発現変化がみられた。

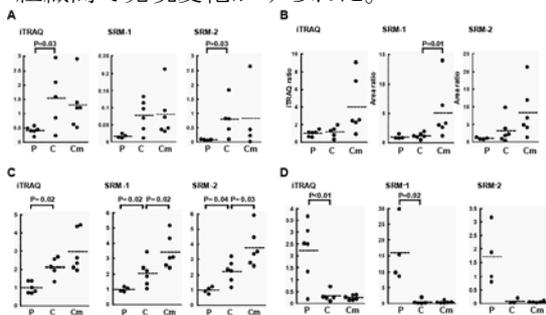


図 1. 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質の検証例

A: ポリープに比べて、転移のない癌組織での発現上昇がみられたタンパク質
 B: 転移のない癌組織に比べて、転移のある癌組織での高発現が見られたタンパク質
 C: ポリープから転移のない癌組織、さらに転移のある癌組織と段階的に発現上昇がみられたタンパク質
 D: ポリープに比べて転移のない癌組織での発現の低下が示されたタンパク質

同定されたバイオマーカー候補タンパク質の protein-X と Y については、さらに解析を進めた。protein-X は、N 端部分にシグナル配列または膜貫通ドメインと予想される配列を持つ機能未知のタンパク質で、SRM の検証結果から、癌の悪性化に伴う発現上昇が示された (図 2A)。抗 protein-X 抗体を用いたウェスタンブロットでも癌組織での発現の上昇が確認され (図 2B)、大腸癌組織の免疫組織染色では、protein-X は正常細胞や間質での発現がほとんど認められず、癌細胞で高発現していることが示された (図 2C)。

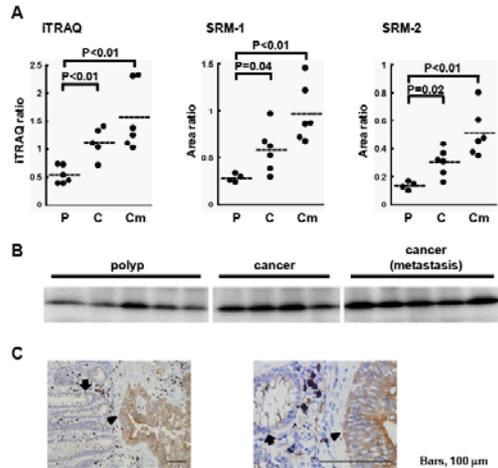


図 2. バイオマーカー候補 protein-X の検証

A. ITRAQ および SRM 法の解析結果
 B. 抗 protein-X 抗体を用いたウェスタンブロット
 C. 抗 protein-X 抗体を用いた癌組織の免疫組織染色

また、protein-Y は、細胞内膜のトラフィッキングへの関与が示唆され、その遺伝子多型と大腸癌発症との関連性も報告されていた。SRM やウェスタンブロットの結果から、protein-Y は、転移のない癌組織に比べて転移のある癌組織で高発現し (図 3A、3B)、免疫組織染色の結果から、REEP6 は癌細胞に高発現していることが示された (図 3C)。

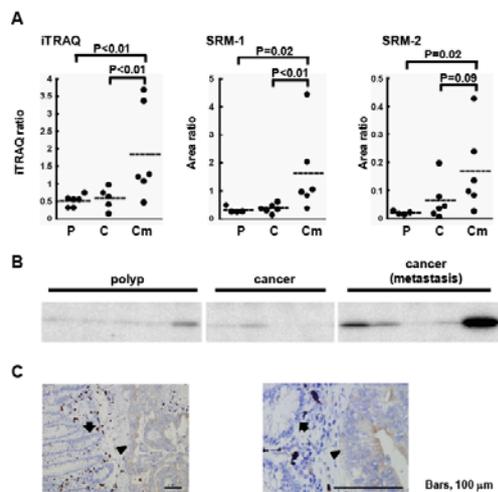


図 3. バイオマーカー候補 protein-Y の検証

A. ITRAQ および SRM 法の解析結果
 B. 抗 protein-Y 抗体を用いたウェスタンブロット
 C. 抗 protein-Y 抗体を用いた癌組織の免疫組織染色

さらに、14 種類の癌組織それぞれ 50 または 100 検体分含む癌組織アレイの解析により、大腸癌における protein-X の高発現が多検体で確認されただけでなく、胃癌や乳癌でも protein-X の発現が増加していることが示された(図 4A)。また、protein-Y は大腸癌だけでなく、前立腺癌、乳癌でも高発現していることも示された(図 4B)。

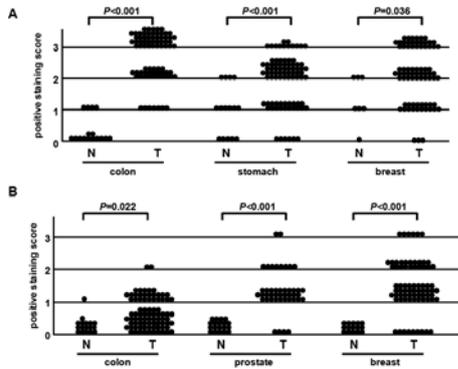


図 4. 癌組織アレイを用いた検証
protein X (図 5A), protein Y (図 5B) について癌組織アレイおよび正常組織アレイ解析をおこなった結果、protein X は、大腸癌だけでなく、胃癌や乳癌で、また、protein Y は、前立腺癌や乳癌でも高発現していることが示された。

本研究により、大腸癌バイオマーカー候補となる膜タンパク質や細胞外分泌タンパク質が多数見出された。その中には、これまでに報告のない新規のバイオマーカー候補タンパク質も多く含まれており、protein X と Y は、正常組織に比べて、癌組織で高発現していることが、ウェスタンブロット法や免疫染色法でも示された。また、組織アレイの結果から、大腸癌だけでなく、他の癌でも高発現していることから、大腸癌以外の癌においても有用なバイオマーカーとなる可能性も示唆された。得られた候補タンパク質については、さらに多検体での大規模な検証作業を進めるとともに、患者血液サンプルでの検出と定量法について検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Muraoka S, Kume H, Adachi J, Shiromizu T, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Tomonaga T, In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. (2012) J Proteome Res., 12(1), 208-13

DOI: 10.1021/pr300824m

②Narumi R, Murakami T, Kuga T, Adachi J, Shiromizu T, Muraoka S, Kume H, Kodera Y, Matsumoto M, Nakayama K, Miyamoto Y, Ishitobi M, Inaji H, Kato K, Tomonaga T, A strategy for large-scale

phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. (2012) J Proteome Res, 11(11), 5311-22

DOI: 10.1021/pr3005474

③Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Adachi J, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Kodera Y, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Tomonaga T, Strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. (2012) J Proteome Res., 11(8), 4201-10

DOI: 10.1021/pr300322q

[学会発表] (計 8 件)

①久米秀明、村岡賢、小寺義男、松下一之、松原久裕、朝長毅、大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索とその検証、第 71 回日本癌学会、2012. 9. 21、札幌

②久米秀明、渡邊史生、村岡賢、石濱泰、小寺義男、松下一之、松原久裕、朝長毅、大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索とその検証、第 10 回日本プロテオーム学会、2012. 7. 26、東京

③久米秀明、鳴海良平、渡邊史生、石濱泰、松原久裕、小寺義男、福岡順也、朝長毅、大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索と SRM/MRM 法を用いた定量法の確立および診断への応用、第 34 回分子生物学会、2011. 12. 14、横浜

④久米秀明、松原久裕、小寺義男、朝長毅、膜タンパク質の大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索と SRM 法を用いた検証、第 70 回日本癌学会、2011. 10. 4、名古屋

⑤久米秀明、鳴海良平、渡邊史生、石濱泰、松原久裕、小寺義男、朝長毅、大腸癌バイオマーカーとなる膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM による検証、第 9 回日本プロテオーム学会、2011. 7. 28、新潟

⑥久米秀明、鳴海良平、石濱泰、松原久裕、松下一之、野村文夫、朝長毅、大腸癌の新たなバイオマーカーとなる膜タンパク質の探索、第 33 回分子生物学会、2010. 12. 4、神戸

⑦久米秀明、松原久裕、松下一之、野村文夫、朝長毅、大腸癌組織膜タンパク質のプロテオーム解析、第 69 回日本癌学会、2010. 9. 24、大阪

⑧久米秀明、鳴海良平、石濱泰、松原久裕、松下一之、野村文夫、朝長毅、大腸癌組織膜タンパク質のプロテオーム解析、第 8 回日本プロテオーム学会、2010. 7. 27、舞浜

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：大腸がんの判定方法

発明者：朝長毅、久米秀明

権利者：独立行政法人医薬基盤研究所

種類：特許

番号：

出願年月日：平成24年12月17日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 秀明 (KUME HIDEAKI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：50322714

(2) 研究分担者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：80227644

松原 久裕 (MATSUBARA HISAHIRO)

千葉大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20282486

石濱 泰 (ISHIHAMA YASUSHI)

京都大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30439244