

論文の内容の要旨

論文題目

Discovery of serum biomarkers for lung cancer by label-free quantitative LC-MALDI MS

(ラベルフリー定量 LC-MALDI 質量分析法による
肺癌血清バイオマーカーの同定)

氏 名 遠山 敦彦

概要

肺癌は日本及び欧米で最も死亡者数の多い癌であり、外科的、内科的治療法が発達した現在においても年間の死亡数が国内だけで 67,500 人にのぼる。肺癌による死亡数を激減させるためには、喫煙対策や新薬の開発はもちろん、各組織型別の早期診断法確立が必須である。現状で肺癌の早期発見は画像診断に依るところが大きい、50%以上の5年生存率が見込めるステージ IIB 以前に診断可能な症例は 16%である。本研究では非侵襲的、かつ安価に肺癌の早期診断が可能となる新規血清バイオマーカーを探索、開発することを目的に、血清タンパク質の網羅的な定量プロファイリングを実施した。

血清のトリプシン消化物をナノスケール逆相クロマトグラフィー (nano-HPLC) にて微細分画し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) にて測定し、そのシグナル強度からタンパク質およびペプチドを定量する、ラベルフリー定量 LC-MALDI MS 法を構築した。この実験系の至適条件を検討する中で、血清タンパク質の糖鎖修飾がトリプシン消化産物の複雑性を増し、ペプチドのイオン化を阻害することで、網羅性および定量性を損ねていることに着目した。糖鎖修飾は大多数の血清タンパク質に見られることから、あらかじめ糖鎖を酵素的に除去しておくことで、疾患特異的に変動するタンパク質をより効果的に探索することができると考えられた。この仮説を証明するため、血清タンパク質から N 型糖鎖すべてと O 型糖鎖のシアル酸を除去した群と未処理群を比較解析し、

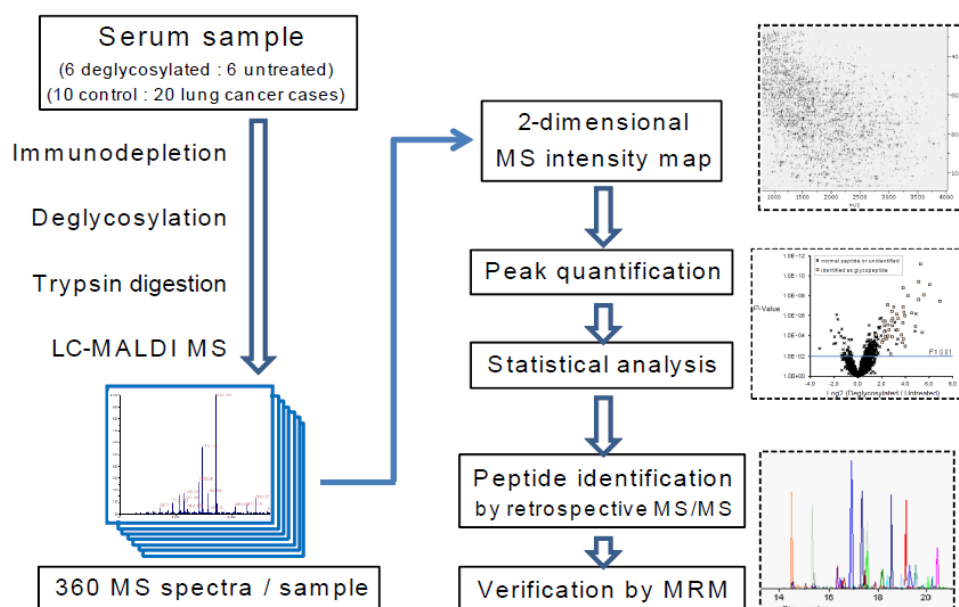
脱糖鎖処理が LC-MALDI MS 法における検出力ならびに分析間再現性の向上に寄与していることを示した。

以上のように最適化した条件により、健常人 10 例、肺癌患者 Stage I, II 10 例、Stage III, IV 10 例の血清を用いた定量プロテオーム解析を実施し、本邦で最も罹患率の高い肺癌である腺癌を対象にバイオマーカー探索を行った。その結果、健常人と肺癌患者間で $P < 0.01$ の有意差を示す 25 種類のバイオマーカー候補タンパク質の同定に成功した。さらに追加症例 88 例を用いて、最も肺腺癌の早期診断に有効と考えられた Complement C3dg fragment について半定量的 Western blotting による検証試験を行い、追加症例においても健常人と早期肺腺癌患者の間で $P < 0.05$ の有意差を確認した。

1. ラベルフリー定量的 LC-MALDI 質量分析法の構築

本研究のワークフローを図 1 に示した。血清試料の前処理として、抗体カラム (Multiple-Affinity Removal Column, MARS Hu-14) を用いて血中タンパク質の約 95% を占める 14 種類のタンパク質を除去し、血清中の微量成分を濃縮した。さらに、N-グリコシダーゼおよびシアリダーゼ処理により N 型糖鎖すべてと O 型糖鎖のシアル酸を除去し、SDS-PAGE による精製を経てゲル内トリプシン消化に供した。回収した消化ペプチドをナノフロー逆相 HPLC により分離し、溶出液をステンレスプレートへ直接スポットティングすることでペプチドを細分画した。各スポットを MALDI-TOF MS により測定し、質量分析データを、横軸に質量 (m/z)、縦軸に溶出時間から成る二次元マップに展開した (図 1、右上)。複数のサンプルより得られた二次元マップを重ね合わせ、同一座標のピークをマッチングし、ラベルフリー定量解析および統計解析に供した。

【図 1】 ラベルフリー定量的 LC-MALDI 質量分析法による比較解析ワークフロー



2. 脱糖鎖処理は LC-MALDI MS によるプロテオーム解析の精度を向上する

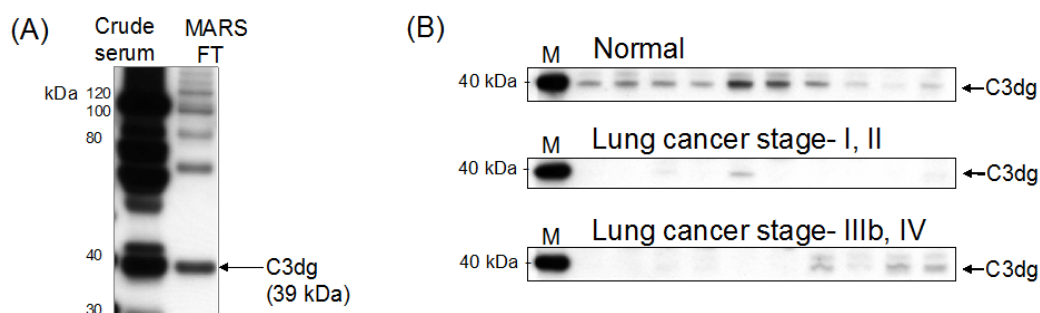
標準血清試料を、脱糖鎖処理を行った群と未処理の対照群(各 $n = 6$)に分け、上述の解析プラットフォームにより定量プロテオーム解析および統計解析を行った。その結果、全体で 4,444 本のペプチドを解析対象とし、このうち 6 回の繰り返し実験すべてにおいて検出された再現性の高いピークの本数は、未処理群で 2,610 本に対して脱糖鎖処理群では 2,984 本であった。脱糖鎖処理が再現性よく検出可能なペプチドの増加(+14%)に寄与することを示した。さらに、脱糖鎖処理群と未処理群に共通して検出されたペプチドについて、信号強度の比と t 検定による P 値を求めたところ、221 本のペプチドにおいて有意な差($P < 0.05$)が見られ、このうち 188 本が脱糖鎖群にて強度が増していることがわかった。脱糖鎖群のみにおいて検出される 157 本とあわせて、345 本(全体の 11%)が脱糖鎖処理により検出感度が向上していることを volcano plot により示した。興味深いことに、この 345 本のうち、糖鎖が脱離した形で検出されたペプチド(元々糖ペプチドだったもの)は 97 本しかなく、脱糖鎖による改善効果が全般に及んでいることから、糖ペプチドの存在が共存している試料全体に対してイオン化を抑制している可能性が示唆された。

3. 脱糖鎖血清プロテオーム解析による肺癌バイオマーカー候補のスクリーニング

次に、健常人 10 例と肺癌患者 20 症例の血清を用いた脱糖鎖定量プロテオーム解析を行い、肺腺癌のバイオマーカー探索を実施した。合計 30 症例から 6,186 本のペプチドピークを集計し、その中から $P < 0.01$ で肺癌患者に特異的なペプチドを対象に MS/MS 測定を行った。その結果、40 本のペプチド(25 種類のタンパク質)を、バイオマーカー候補として同定した。この結果を別の測定系にて検証するため、トリプル四重極型質量分析計を用いた定量性および特異性に特化した測定方法であるマルチプルリアクションモニタリング(MRM)法にて、30 症例の再測定を行った。MRM による分析が成立し、かつ MRM による定量値が LC-MALDI による定量と相関する($P < 0.05$)ペプチドを選定した結果、Ceruloplasmin, Complement C3, Complment component C9, Inter-alpha trypsin inhibitor H3, Inter-alpha trypsin inhibitor H4,ならびに Kininogen-1 に由来する 10 本のペプチドを信頼性の高いバイオマーカー候補とした。

このうち Complement C3 のペプチド 4 種類は、すべて C3dg と呼ばれる 39kDa のサブユニットに由来していることがわかった。Complement C3 は、補体結合反応の過程でサブユニット単位へ断片化されることが知られているが、Complement C3dg がタンパク質レベルで変動していることを Western blotting により確認した(図 2)。

【図 2】(A)粗血清ならびに MARS Hu-14 カラムのフロースルー画分の、抗 C3 ポリクローナル抗体による Western blotting 像。(B)同じ抗体を用いてスクリーニングに用いた 30 症例の粗血清から Western blotting にて C3dg を半定量的に検出した。図 2 に示されたパターンと同じく、早期肺腺癌症例において有意に減少している。(P < 0.05, t 検定)



4. 追加症例 88 例による Complement C3dg の半定量的検証試験

今回の肺癌バイオマーカーのスクリーニングにおいて、早期肺腺癌患者を区別するうえで最も効果的と見込まれた Complement C3dg について、追加症例(健常人 19 例、非癌肺疾患 22 症例、早期肺癌 15 症例、進行期肺癌 32 症例)を用いて、図 3B 同様に半定量的 Western blotting による検証試験を行った。その結果、健常人と比べて早期肺腺癌症例において C3dg が有意に減少する結果が、独立した追加症例においても確認された(P < 0.05, t 検定)。このバイオマーカー候補は健常人と早期肺腺癌患者を有効に区別しうる一方、非癌肺疾患(慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎、突発性肺線維症)においても、早期肺腺癌症例同様に C3dg の有意な減少が見られたため(P = 0.001, t 検定)、この現象が癌特異的ではないことが示唆された。

総論

本研究により構築されたラベルフリー定量的 LC-MALDI 質量分析法により、脱糖鎖処理が、血清などの糖タンパク質に富んだ試料のプロテオーム解析において、精度を底上げする有効な手段であることが示された。今回同定し、検証した肺癌バイオマーカー候補 Complement C3dg については、早期肺癌の検出力が高く、他のバイオマーカーとの組み合わせによっては有効な診断マーカーとなる可能性がある。他の候補とともに今後も検証試験を進め、臨床応用可能なバイオマーカーの確立をめざす。