

蛍光二次元電気泳動法に基づくプロテオーム解析を用いた骨軟部腫瘍の個別化医療のためのバイオマーカー開発

窪田大介

国立がん研究センター研究所創薬プロテオーム研究分野、順天堂大学医学部整形外科外科学教室、国立がん研究センター中央病院整形外科

骨軟部肉腫は骨や筋肉などの間質に発生する悪性腫瘍である。骨軟部肉腫の発生頻度は全悪性腫瘍の1%以下と極めて稀少性の疾患である。小児や若年成人に発症する組織型が多く、また高頻度に転移や再発を引き起こし予後不良な転帰をたどるため、その予後改善を目指した研究は臨床的に重要である。

近年、骨軟部肉腫の診断においては遺伝子技術の進歩により組織型特異的融合遺伝子が発見され、病理組織分類の補助診断マーカーとして大きく臨床に貢献することとなった。現在の骨軟部肉腫研究の中心は網羅的発現解析であり、組織学的診断、予後予測因子、治療効果予測因子などを対象としたDNA, RNA, タンパク質レベルでの発現解析研究が進められている。疾患の稀少性ゆえに大規模臨床試験による新規治療法の確立が困難であり、予後改善のためには、個別化医療のためのバイオマーカーの開発が急務である。

我々が国立がん研究センターで行っている骨軟部肉腫研究の解析手法はプロテオーム解析である。プロテオーム解析を行う最大の利点は悪性腫瘍などの発現型であるタンパク質を直接、網羅的に発現解析できることにある。また近年タンパク質発現解析の研究が進むにつれて mRNA の発現は必ずしもタンパク質発現に相関しないという報告が散見されるようになった。これは選択的スプライシングやタンパク質の修飾・分解などの過程で起こると考えられる。従ってプロテオーム解析はゲノム解析では把握しきれない情報を解析することが可能である。我々が主に用いているプロテオーム解析は、凍結臨床検体を用いた 2D-DIGE 法 (fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis, 蛍光二次元電気泳動法) を用いてタンパク質発現プロファイリングを獲得する方法である。

2D-DIGE 法では、近年の電気泳動法の技術の発達により約 5000 個のタンパク質スポットを網羅することが可能となった。2D-DIGE 法で獲得したタンパク質発現プロファイルは画像解析ソフトを使用し、各タンパク質の発現量としてテキストファイルに変換する。そのデータを cDNA マイクロアレイのデータ解析と同様に、多変量解析、機械学習法の手法で解析する。各解析方法で重要と判断されたタンパク質については、質量分析計にて対応するタンパク質の同定を行っている。同定されたタンパク質は特異抗体を使用し、ウェスタンブロット法、免疫染色法にて発現を検証する。免疫染色で発現差を確認できたタンパク質については、新たなパラフィンブロックを使用した検証セットを構築し、バイオマーカーとしての有効性を確認する。このような一連の手法を用い腫瘍マーカー開発のための解析・検証を行っている。

骨肉腫は骨軟部肉腫の中でも代表的な原発性悪性骨腫瘍である。化学療法の発達に伴い予後は劇的に改善されてきたが、その一方で化学療法抵抗性の症例や診断時に遠隔転移を認める症例については未だに予後不良である。また、現段階で治療効果を予測できる有用なバイオマーカーがないため、画一的な治療を施行せざるを得ない事が臨床的に大きな問題点となっている。そこで我々は治療前に治療効果を予測できるようなバイオマーカーの探索を行った。切開生検によって得られた腫瘍組織を用いて 2D-DIGE 法を行い、骨肉腫では化学療法奏効性が異なる 2 群間のタンパク質プロファイルを比較し、差のあるタンパク質をバイオマーカー候補として同定した。同定したバイオマーカー候補に対しては細胞株を用いた機能解析を行い、同定したバイオマーカーが化学療法抵抗性に関与することを明らかにした。

消化管間質腫瘍(GIST)は胃・小腸に発生する肉腫の一型である。近年 GIST が特徴的な遺伝子異常を来し、分子標的治療薬イマチニブが予後不良の GIST に対して一定の効果を示す事が証明され注目されている。GIST においては病理組織学的因子以外に疾患の予後を予測する手段はなく、分子標的治療薬の適応については今なお多くの議論がなされている。そこで我々は 2D-DIGE 法により予後の異なる 2 群間のタンパク質プロファイルを比較し GIST の再発・転移を予測するバイオマーカーを同定した。その後、国内 4 施設における大規模検証試験を行い、発現検証に成功した。

このようにわれわれは蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析により骨軟部腫瘍の個別化医療のためのバイオマーカーを同定した。現在は同定したバイオマーカーの検証実験を継続し民間企業と共同で実用化を目指している。

Reference

Kubota D, Mukaiharu K, Yoshida A, Tsuda H, Kawai A, Kondo T. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. *J Proteomics*. 2013 Oct;91C:393-404. doi: 10.1016/j.jprot.2013.07.022. Epub 2013 Aug 2. [[PubMed](#)]

Kubota D, Mukaiharu K, Yoshida A, Suehara Y, Saito T, Okubo T, Gotoh M, Orita H, Tsuda H, Kaneko K, Kawai A, Kondo T, Sato K, Yao T. The prognostic value of pfetin: a validation study in gastrointestinal stromal tumors using a commercially available antibody. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Jun;43(6):669-75. doi: 10.1093/jjco/hyt057. Epub 2013 Apr 25. PubMed PMID: 23619989. [[PubMed](#)]

Kubota D, Orita H, Yoshida A, Gotoh M, Kanda T, Tsuda H, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Pfetin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol*. 2011 Oct;41(10):1194-202. doi: 10.1093/jjco/hyr121. Epub 2011 Sep 8. PubMed PMID: 21903705. [[PubMed](#)]