

抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカーの探索とその評価

長野 一也

Search for Breast Cancer-related Biomarker Proteins for Drug Discovery

Kazuya NAGANO

Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation,
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received July 5, 2010)

The identification of biomarkers is a promising approach for the diagnosis and effective therapy of cancer. In particular, disease proteomics is a potentially useful method for identifying such biomarkers. However, very few biomarker proteins for drug development have been discovered using this approach. The main difficulty is to efficiently select potential biomarkers from the many candidate proteins identified by the proteomics approach. To circumvent this problem, we have developed “antibody proteomics technology” that can screen for biomarker proteins by isolating antibodies against each candidate in a rapid and comprehensive manner. Here, we applied “antibody proteomics technology” to breast cancer-related biomarker discovery and evaluated the utility of this novel technology. Cell extracts derived from breast tumor cells (SKBR3) and normal cells (184A1) were analyzed by two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) to identify proteins over-expressed in the tumor cells. Candidate proteins were extracted from the gel pieces, immobilized onto a nitrocellulose membrane using a dot blot apparatus and then used as target antigens in scFv-phage enrichment and selection. Following this *in vitro* phage selection procedure, scFvs binding to 21 different over-expressed proteins in tumor cells were successfully isolated within several weeks. The expression profiles of the identified proteins were then determined by tissue microarray analysis using the scFv-phages. Consequently, we identified three breast tumor-specific proteins. Our data demonstrates the utility of an antibody proteomics system for discovering and validating tumor-related proteins in pharmaceutical proteomics. Currently, we are analyzing the functions of these proteins to use them as diagnostic markers or therapeutic targets.

Key words—biomarker protein; antibody proteomics; phage antibody library; tissue microarray

1. はじめに

近年、医療の個別化・最適化の高まりも相まって、各種疾患治療薬の標的となり得る“創薬ターゲット”や、的確な診断を可能とする“疾患マーカー”といった創薬バイオマーカーの探索研究が、臨床や創薬研究現場において大きな注目を集めており、熾烈な国際競争が繰り広げられている。中でも、生命現象の直接の担い手である「タンパク質」に着目し、疾患状態におけるタンパク質の質的・量的・時空間的变化を網羅的に解析しようとする疾患プロテオミクスのアプローチに大きな期待が寄せられている。疾患プロテオミクスによる創薬バイオマーカータン

パク質の同定は、対照試料と比較して疾患試料で発現変動しているタンパク質を質量分析法により網羅的に同定し、その上で、見い出された候補タンパク質の機能を解析することで、その有用性をバリデーションし、絞り込むことになる。このようなプロセスの中で、候補タンパク質の同定に関しては、近年の質量分析装置の高性能化等に伴って、その数とスピードは飛躍的に進歩し、一度の解析で数十、数百といった発現変動タンパク質の同定が可能となっている。¹⁾しかし、候補タンパク質のバリデーションに関しては、同定したタンパク質を1つ1つ評価するか、各研究者の興味や経験からトライ・アンド・エラーで解析せざるを得ないのが現状であり、同定されるタンパク質の数が増えた一方で、この検証と絞り込みの過程が創薬研究における律速となっている。そのため、プロテオミクス研究から医薬品開発にまで展開できた例はほとんどないといっても過言

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト
(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8)

e-mail: knagano@nibio.go.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会近畿支部奨励賞（生物系薬学）の受賞を記念して記述したものである。

ではない。これは、タンパク質の発現分布や機能解析に必須のツールである抗体を、数多くの候補タンパク質に対して手にすることが困難であることに起因している。近年、試薬メーカー等により多種類の抗体が提供されつつあるが、興味深いタンパク質であるほど、抗体は市販されておらず、とりわけ、詳細な解析に必須となるモノクローナル抗体は、多くの場合、自ら作製する必要がある。しかし、モノクローナル抗体作製の常法であるハイブリドーマ法では、①1つの抗原に対して抗体を作製するのにさえ、数ヵ月以上もの時間と多大な労力を費やさなければならない。さらに、②プロテオミクス研究の汎用法である二次元電気泳動のゲルから直接回収できるタンパク質は概して微量（数100 ng以下）であるため、動物への免疫を必要とする本方法では、遺伝子のクローニングやリコンビナントタンパク質の発現・精製といった過程を経なければならず、数十、あるいは数百種類も同定されてくる候補タンパク質に対応することは極めて困難である。

本観点から筆者らは、上記課題を克服し、創薬バイオマーカータンパク質の探索から、バリデーション・絞り込みまでを迅速に効率よく行い得る創薬基盤技術、「抗体プロテオミクス技術」を確立した。本稿では、抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカータンパク質の探索の試みについて紹介させて頂く。

2. 抗体プロテオミクス技術の開発

まず、数多くの候補タンパク質に対してハイスループットに抗体を作製するため、筆者らは、*in vitro*でモノクローナル抗体を作製可能なナイーブファージ抗体ライブラリに着目した。ナイーブファージ抗体ライブラリは、生体が有する多様なレパートリーの抗体Fv領域を、リンカーペプチドにより一本鎖化したscFvの形でファージ表面に発現させたライブラリである。研究に取りかかった当時、有用で自由に使うことのできるナイーブファージ抗体ライブラリがなかったため、抗体V遺伝子を網羅的に増幅可能とするPCRプライマーセットを独自に設計することで、マウス由来ナイーブファージ抗体ライブラリの作製を試みた。その結果、20億種類以上ものレパートリーを有する抗体ライブラリの構築に成功し、各種タンパク質に対する特異的抗体発現ファージを約2週間で単離できること

を実証した。^{2,3)}そこで続いて、抗原としてリコンビナントタンパク質を別途作製することなく、二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)ゲルから回収されるナノグラムオーダーのタンパク質を直接用いて、抗体を取得し得る方法論の確立を試みた。筆者らは、抗原タンパク質の固相化担体として、タンパク質の吸着力に優れたニトロセルロース膜を利用し、ドットブロット装置上でファージ抗体ライブラリの選別操作を行ったところ、わずか0.5 ngの微量抗原からでも目的抗体を単離することが可能であることを明らかとした(メンブランパンニング法)。以上のプロセスにより、二次元電気泳動法によるプロテオミクス解析で同定される候補分子に対して、*in vitro*で迅速に抗体を取得し得る方法を確認することができた。本方法により抗体を取得できれば、タンパク質レベルでの様々な機能解析が可能となる。そこで筆者らは、多数の臨床サンプルで候補分子の有用性を効率よくバリデーションし、真に有用な創薬バイオマーカーを絞り込むためのツールとして、組織マイクロアレイ(TMA)に着目した。TMAは多症例の臨床組織切片が1枚のスライドガラスに搭載されたもので、目的抗原に対する抗体で免疫染色すれば、1度の解析で、多数の症例における発現プロファイルを取得でき、さらに、各症例が有している様々な臨床情報との相関も解析することが可能となる。⁴⁾種々の条件検討の結果、ファージ発現型抗体を用いて、TMAの免疫染色が可能であることを見い出しており、これらの技術を組み合わせることによって、最短1ヵ月程度で、プロテオーム解析から有用なバイオマーカータンパク質の絞り込みまでを達成することが可能となった。

以上、疾患サンプルの2D-DIGE法による発現変動タンパク質の同定から、抗体の網羅的作製、さらに多数の臨床サンプルでのバリデーションまでを迅速かつ効率よく完了できるシステムを、われわれは「抗体プロテオミクス技術」と名付けた。具体的なプロセスとしては、Fig. 1で示すように、①疾患サンプルとしてがん細胞株等を用い、健常組織由来細胞株を対照として、2D-DIGEにより発現変動タンパク質を探索する。②電気泳動後のゲルから回収される数100 ng以下のタンパク質の一部を使用して質量分析法によりタンパク質を同定する。③一方で、一部のタンパク質をニトロセルロース膜上に固

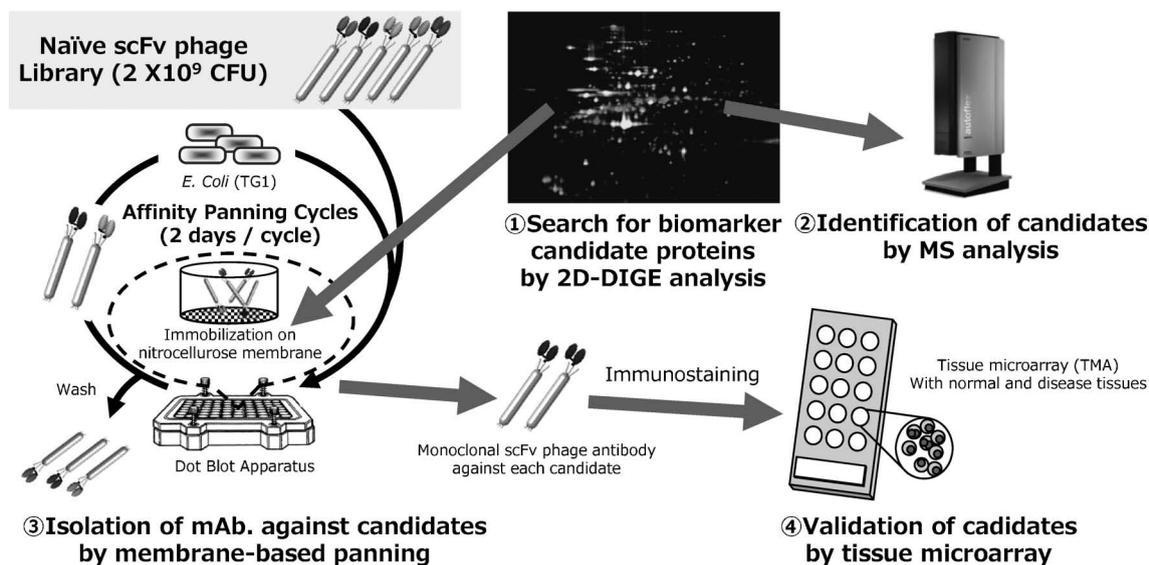


Fig. 1. Schematic Illustration of Antibody Proteomics Technology

Monoclonal antibodies against many differentially expressed proteins could be rapidly created by applying naïve phage scFv library to proteomics study, and these candidates could be effectively validated by tissue microarray.

相化し、24億種類の抗体レパートリーからなるナイーブファージ抗体ライブラリにより、目的とするタンパク質に対して高親和性抗体クローンをスクリーニングする。④得られたファージ抗体とTMAによる発現プロファイリングにより、候補タンパク質の創薬バイオマーカーとしての有用性を多数の臨床サンプルでバリデーションする。

本技術は、多数の発現変動タンパク質の中から真に価値のある『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット』の候補を、効率よくバリデーションし、絞り込むことができる唯一の方法であり、創薬研究に極めて有用な基盤技術になるものと考えられる。そこで以下では、本技術の有用性検証を目的として、乳がんの創薬ターゲットタンパク質、あるいは悪性度診断のための疾患マーカータンパク質の同定を試みた。

3. プロテオーム解析による乳がん関連タンパク質の同定と網羅的な抗体作製

不死化乳腺細胞株 184A1 から調製したタンパク質を対照サンプルに、乳がん細胞株 SKBR3 から調製したタンパク質を疾患サンプルとして2D-DIGE解析を行った。定量的解析により発現変動レベルの大きかった21個のspotについて、ゲルを切り出し、ゲルを溶解することによりタンパク質を回収した。回収したタンパク質の一部を用いて質量分析により解析 (PMF 及び MS/MS) したところ、すべてのスポットのタンパク質を同定することができた

Table 1. Identification of Differentially-expressed Proteins in Breast Cancer Cells by MALDI-TOF/MS

Spot#	Protein name	MW (kDa)	pI	Expression ratio (folds) [cancer/normal]
1	Splicing factor YT521-B	85	5.9	6
2	IkappaBR	63	5.5	6
3	SPATA5	76	5.6	7
4	Skin aspartic protease	37	5.3	0.1
5	Beta actin variant	42	5.3	15
6	TRAIL-R2	48	5.4	18
7	Cytokeratin 18	48	5.3	12
8	TRAIL-R2	48	5.4	16
9	RREB1	52	5.3	10
10	Cytokeratin 7	51	5.4	23
11	Cytokeratin 18	48	5.3	13
12	Cytokeratin 7	51	5.4	24
13	FLJ31438	53	5.5	35
14	Cytokeratin 7	51	5.4	36
15	PAK65	55	5.7	8
16	Cytokeratin 8	54	5.5	32
17	Cytokeratin 8	54	5.5	72
18	XRN1	54	5.8	8
19	Jerky protein homolog-like	51	6.0	22
20	EPH receptor A10	32	5.7	9
21	Glutathione S transferase	23	5.4	0.02

(Table 1). また、回収したタンパク質の一部を用いて、メンブランパンニング法によりファージ抗体の単離を試みた。その結果、すべてのタンパク質に対して親和性を有するファージ抗体を単離すること

ができた。ファージ抗体の単離に要した期間は約2週間であり、2D-DIGEによるプロテオーム解析から同定・回収される微量で多種類のタンパク質を直接抗原として使用し、それらに対する抗体を迅速に取得可能な方法論であることが確認できた。

4. 組織マイクロアレイ解析による乳がん関連マーカータンパク質の絞り込み

候補タンパク質に対する抗体を手にすることができれば、様々な機能解析が可能となる。そこで、得られたファージ発現型抗体を用いて、がん組織マイクロアレイを免疫染色し、同定されたタンパク質の発現プロファイリングを試みた。189症例の乳がん組織と15症例の正常の乳腺組織が搭載されたTMAを用いて、ファージ発現型抗体にて染色した。その結果、SPATA5, Beta actin variant, FLJ31438, PAK65, XRN1に関しては正常乳腺組織においても、がん組織においてもほとんど発現は認められなかった。一方、カスパーゼカスケードの活性化を介したアポトーシス誘導性の受容体であるTNF-related apoptosis-inducing receptor 2 (TRAIL-R2)は約60%、細胞骨格を構成する中間径フィラメント構成タンパク質であるCytokeratin 8は約70%、機能がほとんど知られていないチロシンキナーゼ型受容体であるEPH receptor A10 (EPHA10)は約50%の症例で共通して発現していたが、正常乳房組織での発現は認められなかった (Table 2)。現在、乳がんでは汎用されている抗体医薬トラスツズマブの標的分子Her-2が約30%の陽性率であることを考慮すると、これら3種類のタンパク質は、乳がんの優れた創薬ターゲットになり得るものと期待される。また、Her-2陽性あるいは陰性症例において、これら候補タンパク質の発現を調べたところ、Her-2陽性患者のうち、TRAIL-R2あるいはEPHA10は、約77%あるいは62%の割合で発現しており、これら分子のうち、いずれかが発現している割合は約87%の症例であった。一方、Her-2陰性の症例においても、約70%の症例がTRAIL-R2あるいはEPHA10いずれかに陽性であった [Fig. 2(A)]。現在臨床で、抗Her-2抗体が乳がんに対する画期的な治療薬として汎用されているが、TRAIL-R2とEPHA10も細胞膜タンパク質であることから、抗Her-2抗体が適用されないHer-2陰性症例に対する新規創薬ターゲットになり得るものと期待される。また、

Table 2. Validation of Biomarker Candidates by Tissue Microarray with Breast Cancer and Normal Tissues

Protein name	Positive rate of identified proteins	
	Normal breast tissues	Breast cancer tissues
Her-2	0/15 cases (0%)	53/189 cases (28%)
IkappaBR	3/15 cases (20%)	22/189 cases (12%)
SPATA5	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
Beta actin variant	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
TRAIL-R2	0/15 cases (0%)	119/189 cases (63%)
RREB1	1/15 cases (7%)	83/189 cases (44%)
FLJ31438	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
PAK65	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
Cytokeratin 8	0/15 cases (0%)	137/189 cases (73%)
XRN1	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
Jerky protein homolog-like	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
EPH receptor A10	0/15 cases (0%)	93/189 cases (49%)

Her-2陽性症例においても、抗Her-2抗体による治療を続けるうちに耐性が生じることが問題になっていることから、^{5,6)} そのような患者に対しても有用な創薬ターゲットになり得るものと期待される。

続いて、上記候補分子の発現と臨床情報との相関解析を試みた。その結果、Cytokeratin 8とEPHA10の発現は、乳がんの病期の進行と有意な相関が認められた [Fig. 2(B)]。したがって、Cytokeratin 8やEPHA10は乳がんの進行に関連するタンパク質であり、悪性度を客観的に予測・評価し得る診断マーカーになり得るものと考えられる。近年、TRAIL-R2は、がんの新たな分子標的として抗体医薬の開発が進んでおり、^{7,8)} またCytokeratin 8はがんの悪性度に係わることが報告されている。^{9,10)} 以上の結果は、抗体プロテオミクス技術が、多種類の発現変動タンパク質の中から、有用なマーカータンパク質を迅速かつ効率的に絞り込むことが可能な極めて有用な創薬基盤技術であることを示すものである。

5. おわりに

本稿では、筆者らが確立した「抗体プロテオミクス技術」と、その応用例について紹介した。本技術

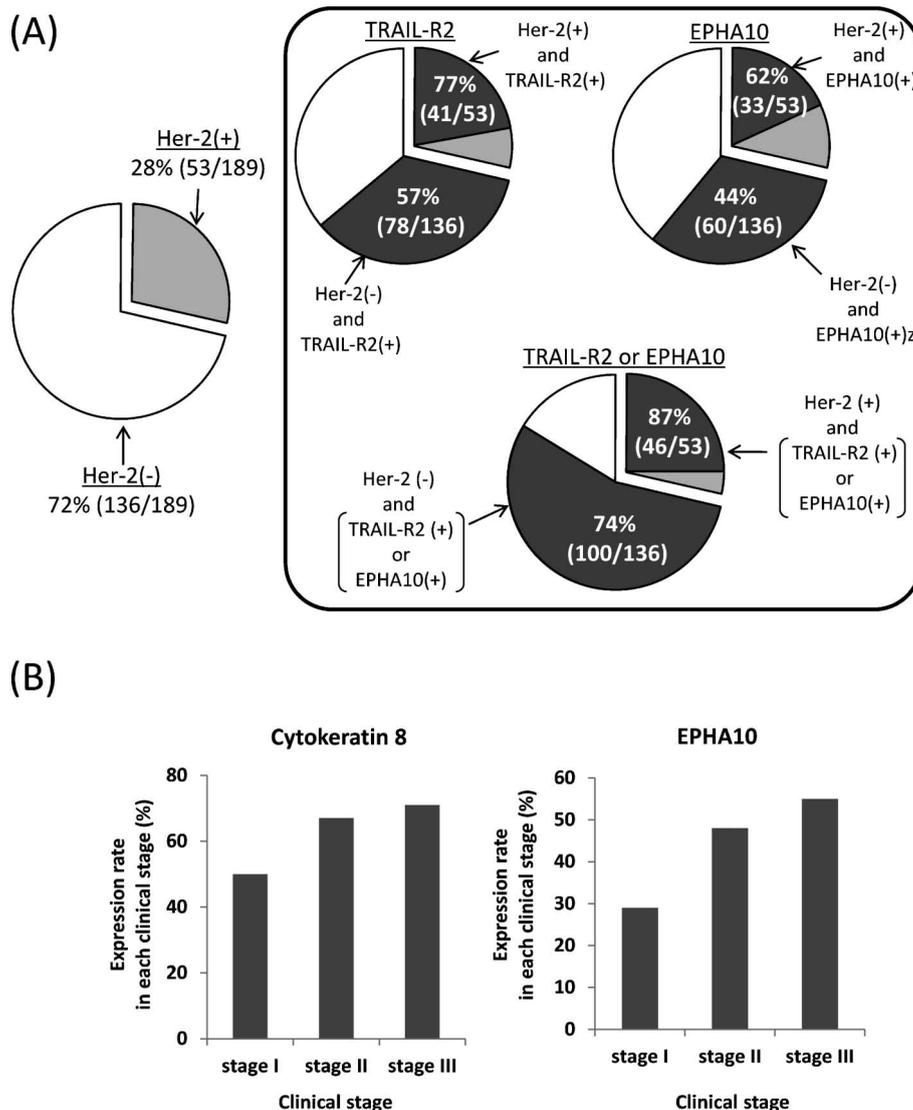


Fig. 2. Correlation Analysis between the Expression Profile of Biomarker Candidates and Clinical Information
 (A) The expression rate of drug target candidates, TRAIL-R2 and EPHA10, in Her-2 positive and negative cases. The expression of Her-2 in 28% of breast tumor cases describes gray. The expression of each candidate in Her-2 positive and negative cases describes black. (B) The expression rate of diagnosis marker candidates, Cytokeratin 8 and EPHA10, in each clinical stage (stage I; n=14, stage II; n=87, stage III; n=86).

により乳がんの創薬バイオマーカータンパク質の探索を試みた結果、有望な候補分子として、TRAIL-R2, Cytokeratin 8, EPHA10 を絞り込むことができた。中でも TRAIL-R2, EPHA10 は、乳がんに対する新たな治療薬のターゲットになり得ることが期待される。現在、これら分子の詳細な機能解析を進めるとともに、抗体医薬の開発を目指した研究を進めている。今後、抗体プロテオミクス技術が、わが国の創薬研究に貢献することを願っている。

謝辞 本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトチーフリーダー・大阪大学

薬学研究科毒性学分野教授堤 康央先生、独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトリーダー角田慎一先生を始めとする、研究室のメンバー諸氏の多大な協力を得て成されたものであり、この場をお借りして御礼を申し上げます。また本研究の遂行にあたり、ご指導ご助言を賜りました富山大学医学部附属病院外科病理学講座教授福岡順也先生、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授中川晋作先生、同助教向 洋平先生、に感謝の意を表します。なお本研究は、文部科学省科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究事業の

支援を受けて実施したものです。

REFERENCES

- 1) Yates J. R., Ruse C. I., Nakorchevsky A., *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **11**, 49–79 (2009).
- 2) Imai S., Mukai Y., Nagano K., Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nomura T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1325–1330 (2006).
- 3) Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Pharmazie*, **64**, 238–241 (2009).
- 4) Camp R. L., Neumeister V., Rimm D. L., *J. Clin. Oncol.*, **26**, 5630–5637 (2008).
- 5) Nahta R., Yu D., Hung M. C., Hortobagyi G. N., Esteva F. J., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 269–280 (2006).
- 6) Mehta K., Osipo C., *TheScientificWorldJournal*, **9**, 1438–1448 (2009).
- 7) Plummer R., Attard G., Pacey S., Li L., Razak A., Perrett R., Barrett M., Judson I., Kaye S., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Calvert H., de Bono J., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 6187–6194 (2007).
- 8) Camidge D. R., Herbst R. S., Gordon M. S., Eckhardt S. G., Kurzrock R., Durbin B., Ing J., Tohny T. M., Sager J., Ashkenazi A., Bray G., Mendelson D., *Clin. Cancer Res.*, **16**, 1256–1263 (2010).
- 9) Wolff J. M., Borchers H., Brehmer B. Jr., Brauers A., Jakse G., *Urol. Int.*, **60**, 152–155 (1998).
- 10) Fukunaga Y., Bandoh S., Fujita J., Yang Y., Ueda Y., Hojo S., Dohmoto K., Tojo Y., Takahara J., Ishida T., *Lung Cancer*, **38**, 31–38 (2002).