

疾患プロテオミクスからバイオマーカーの創出へ  
—抗体プロテオミクス技術の確立とがん関連マーカーの探索—

長野一也,<sup>a</sup> 今井 直,<sup>a</sup> 中川晋作,<sup>b,c</sup> 角田慎一,<sup>\*,a,b,c</sup> 堤 康央<sup>a,b,c</sup>

**From Disease Proteomics to Biomarker Development**  
—Establishment of Antibody Proteomics Technology and  
Exploration of Cancer-related Biomarkers—

Kazuya NAGANO,<sup>a</sup> Sunao IMAI,<sup>a</sup> Shinsaku NAKAGAWA,<sup>b,c</sup>  
Shin-ichi TSUNODA,<sup>\*,a,b,c</sup> and Yasuo TSUTSUMI<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmaceutical Proteomics (LPP), National Institute of Biomedical Innovation (NiBio),  
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, <sup>b</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and <sup>c</sup>The Center for  
Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University,  
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 31, 2009)

Molecular biomarkers are keys to the development of new diagnostic protocols and therapies. Recently, significant research effort has been devoted to the development of these biomarkers using various approaches. Perhaps the most promising approach is disease proteomics. This method involves analyzing and identifying changes in the expression pattern at the protein level in the diseased condition (disease-related proteins) by using two-dimensional differential gel electrophoresis analysis (2D-DIGE). In the case of disease proteomics, hundreds of candidate disease-related proteins can be identified at a time. Therefore, how to pick the really valuable proteins up from a number of candidate drug targets is the most important issue to be solved worldwide. Here, we introduce a novel approach, termed “antibody proteomics”, which addresses this issue. Using antibody proteomics it is possible to identify a variety of disease-related proteins by 2D-DIGE and simultaneously prepare monoclonal antibodies to these proteins by using a phage antibody library. The advantage of this technology is that the target proteins are identified in a high-throughput manner. Our approach relies on the fact that tissue microarray analysis can evaluate the relationship between disease-related proteins and disease progression, based on clinical and pathological information. In this review, we discussed the development and application of antibody proteomics and gave an overview of future work.

**Key words**—antibody proteomics; molecular biomarker; disease proteomics; phage antibody library

## 1. はじめに

近年のプロテオミクス関連技術の進展に伴って、がんを始めとする各種病態を的確に診断するための“疾患バイオマーカー”や“創薬ターゲットあるいは医薬品シーズ”等を探索し、医薬品開発への展開を目指す創薬プロテオミクス研究に大きな期待が寄

せられ、熾烈な国際的競争が繰り広げられている。<sup>1)</sup> 欧米各国では既に、2000年頃から大量の国家予算を投じ、メガファーマやバイオベンチャーをも巻き込んで、創薬プロテオミクス研究に大規模着手しており、本邦でも厚生労働省所管の国家プロジェクト等により現在研究が推進されているところである。しかし残念ながら、世界的にみても、創薬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いまだ乏しいのが現状である。それは、疾患の発症や悪化の際には数十から数百種類以上のタンパク質が発現変動しており、これらの中から本当に価値のある『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ』の候補となるタンパク質を絞り込む

<sup>a</sup>独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8),

<sup>b</sup>大阪大学大学院薬学研究科(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6), <sup>c</sup>大阪大学臨床医工学融合研究教育センター(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

\*e-mail: tsunoda@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS6で発表したものを中心に記述したものである。

プロセスが不可欠であるが、それを可能とする技術基盤が圧倒的に不足していることに起因している。有用な候補タンパク質を絞り込むには、数多くの発現変動タンパク質の機能・局在、及び病態との関連解析が必要であり、そのためのツールとして、個々のタンパク質に対するモノクローナル抗体を得ることが必須である。しかし、抗体作製には、わずか一種類のタンパク質に対してですら、組換えタンパク質の作製、マウス等の動物への免疫、ハイブリドーマの作製とスクリーニング等のステップが必要であり、半年から数年を要してしまうため、プロテオミクスで見い出される数十から数百種類以上もの候補タンパク質に対してモノクローナル抗体を作製することは不可能といってもよい。これは、プロテオミクス研究に限らず、ゲノミクス・トランスクリプトミクスといった創薬を志向したオミクス研究全般に当てはまることであり、オミクス創薬のスループットを大きく制限する要因となっている。また、抗体創製の課題を克服できたとしても、『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ』の候補タンパク質が絞り込まれた後には、多数の臨床検体を用いて、候補タンパク質の発現と病態との関連をバリデーションしなければならない。しかし、このバリデーションのプロセスに関しても、膨大な数の臨床検体に対して、時間と労力を消費しながら解析せざるを得ないのが現状である。したがって、上記問題を克服し、創薬バイオマーカータンパク質を効率よく絞り込み、バリデーションを行い得る基盤技術の確立は、わが国の現在及び今後の創薬研究にとって緊急の課題である。

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を効率よく絞り込み、バリデーションを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、疾患マーカーや創薬ターゲットタンパク質の探索を進めている。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する。

## 2. 抗体プロテオミクス技術

プロテオミクスによる発現変動タンパク質の網羅的探索には、2次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析が汎用されている。そこで、2D-DIGE解析から同定・回収される微量で多種類の発現変動タンパク質に対して、網羅的なモノクローナ

ル抗体の創製を実現するため、*in vitro*で抗体を作製可能なファージ抗体ライブラリに着目した。筆者らは、これまで独自にノウハウを確立してきたファージ表面提示法を駆使することにより、<sup>2,3)</sup>理論上あらゆる抗原に対する抗体を含んだナイーブファージ抗体ライブラリを独自に開発し、様々な抗原タンパク質に対して、最短2週間でモノクローナル抗体を作製することに成功している。<sup>4)</sup>また、微量抗原からでも抗体を単離できるように、抗原タンパク質の固相担体として、タンパク質の吸着能に優れるニトロセルロース膜を用いたファージ抗体ライブラリの濃縮法(メンブランパンニング法)を開発した。本方法を用いることで、わずか0.5 ngのタンパク質を得ることができれば、目的のファージ抗体を単離可能となった。一方で筆者らは、もう一つの課題であった候補タンパク質のバリデーション法に対して、組織マイクロアレイを用いた発現プロファイリングに着目した。組織マイクロアレイとは、多数の臨床組織切片を1枚のスライドガラス上に搭載したものであり、抗体を用いて免疫染色を行うことにより、目的タンパク質の発現プロファイルを一挙に取得でき、さらに各症例にリンクした種々の臨床情報との相関解析が可能である。

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、抗体作製と多数の臨床サンプルでのバリデーションまでのプロセスを、迅速かつ効率よく完了できるシステムを「抗体プロテオミクス技術」と称している。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組織マイクロアレイによる発現プロファイリングにより、多数の臨床サンプルでのバリデーションを行う。本技術は、多数の発現変動タンパク質の中から本当に価値のある『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット』の候補を、効率

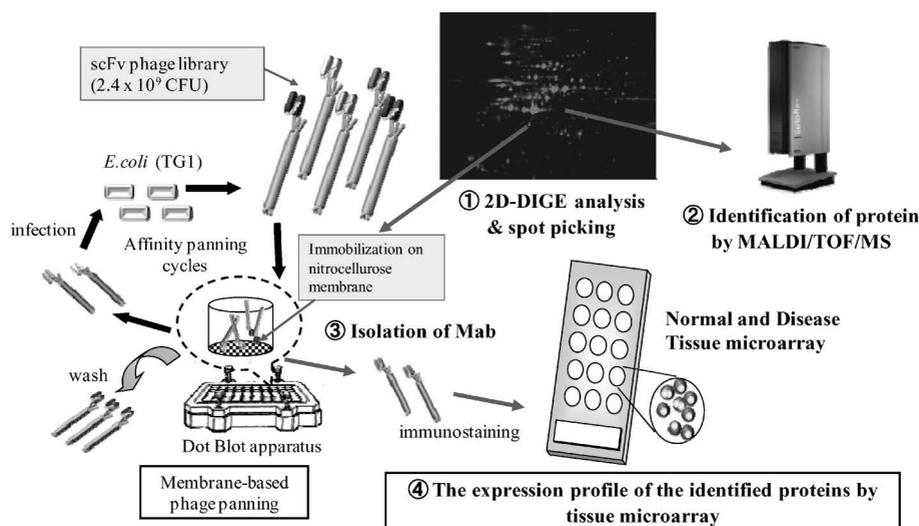


Fig. 1. Schematic Illustration of Antibody Proteomics Technology

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

よく絞り込み・バリデーションできる唯一の方法であり、創薬プロテオミクス研究に極めて有用な基盤技術になるものと考えられる。

そこで以下に、本技術の有用性評価を目的として、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 2次元ディファレンシャル電気泳動 (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 (MS) 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)。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、21 種類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時間は約 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

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

spot	protein name	MW	pI	cancer/normal
# 1	splicing factor YT521-B isoform 1	84649	5.9	Up 6-fold
# 2	IkappaBR	62872	5.5	Up 6-fold
# 3	SPATA5 protein	75580	5.6	Up 7-fold
# 4	skin aspartic protease	36938	5.3	Down 11-fold
# 5	beta actin variant	41694	5.3	Up 15-fold
# 6	TRAIL-R2	47820	5.4	Up 18-fold
# 7	cytokeratin 18	47305	5.3	Up 12-fold
# 8	TRAIL-R2 (Death receptor 5)	47820	5.4	Up 16-fold
# 9	RREB1 protein	51563	5.3	Up 10-fold
# 10	keratin K7 type II epithelial	51333	5.4	Up 23-fold
# 11	keratin 18	48029	5.3	Up 13-fold
# 12	keratin K7 type II epithelial	51333	5.4	Up 24-fold
# 13	FLJ31438 protein	52992	5.5	Up 35-fold
# 14	Keratin type II cytokeletal 7	51312	5.5	Up 36-fold
# 15	hPAK65	54880	5.7	Up 8-fold
# 16	Cytokeratin 8	53529	5.5	Up 32-fold
# 17	Keratin type II cytokeletal 8	53540	5.5	Up 72-fold
# 18	XRN1 protein	53784	5.8	Up 8-fold
# 19	Jerky protein homolog-like	50678	6.0	Up 22-fold
# 20	EPH receptor A10	32130	5.7	Up 9-fold
# 21	glutathione transferase	23159	5.4	Down 53-fold

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を用いた乳がん関連マーカータンパク質の探索

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

たファージ抗体を用いて、がん組織アレイの免疫染色を行い、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組織マイクロアレイを用いて、ファージ抗体にて染色した。その結果、SPATA5 protein, Beta actin variant, FLJ31438 protein, HPAK65, XRN1 protein 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、EPH receptor A10 (EPHA10) は約 50%, TRAIL-R2 は約 60%, Cytokeratin 8 は約 70% の症例で高発現しており、一方で正常乳房組織での発現は認められなかった (Table 2)。現在、乳がんマーカーとして臨床で汎用されている 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、両者の発現を合わせると約 87% の症例で発現していた。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、Trastuzumab (Her-2 を標的とした抗体医薬) が乳がんに対する画期的な抗体医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、Trastuzumab が無効な症例に対する新規治療標的になり得るものと期待される。また、Her-2 陽性症例においても、Trastuzumab 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、<sup>5-7)</sup> そのような患者に対しても有効な治療標的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病期との相関を解析したところ、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、<sup>8-10)</sup> また Cytokeratin 8 はがんの悪性に係わることが報告されている。<sup>11-13)</sup> 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、われわれが確立した『抗体プロテオミクス技術』によって、迅速に創薬バイオマーカータンパク質の候補として、TRAIL-R2, Cytokeratin 8, EPHA10 を絞り込むことができた。中でも TRAIL-R2, EPHA10 は、既存の乳がんマーカータンパク質 Her-2 に替わる新たな創薬ターゲットタンパク質になり得ることが示唆された。現在、これら分子に対するより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て研究を行っている。今後、抗体プロテオミクス技術が、世界に遅れをとるわが国の抗体医薬等の創薬研究に貢献することを願っている。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、組織マイクロアレイ解析の御指導を賜りました富山大学医学部附属病院・福岡順也博士に感謝の意を表します。なお本研究では、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 (No. 20015052)、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B 一般 (No. 21390046)、厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業 (No. H19-医薬一般

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

protein name	positive rate of various antigens	
	normal tissue	breast cancer tissue
Her-2	0/15 (0%)	53/189 (28.0%)
IkappaBR	3/15 (20.0%)	22/189 (11.6%)
SPATA5 protein	0/15 (0%)	0/189 (0%)
Beta actin variant	0/15 (0%)	0/189 (0%)
TRAIL-R2	0/15 (0%)	119/189 (63.0%)
RREB-1	1/15 (6.7%)	83/189 (43.9%)
FLJ31438 protein	0/15 (0%)	0/189 (0%)
HPAK65	0/15 (0%)	0/189 (0%)
Cytokeratin 8	0/15 (0%)	137/189 (72.5%)
XRN1 protein	0/15 (0%)	0/189 (0%)
Jerky protein homolog-like	0/15 (0%)	0/189 (0%)
EPHA10	0/15 (0%)	93/189 (49.2%)

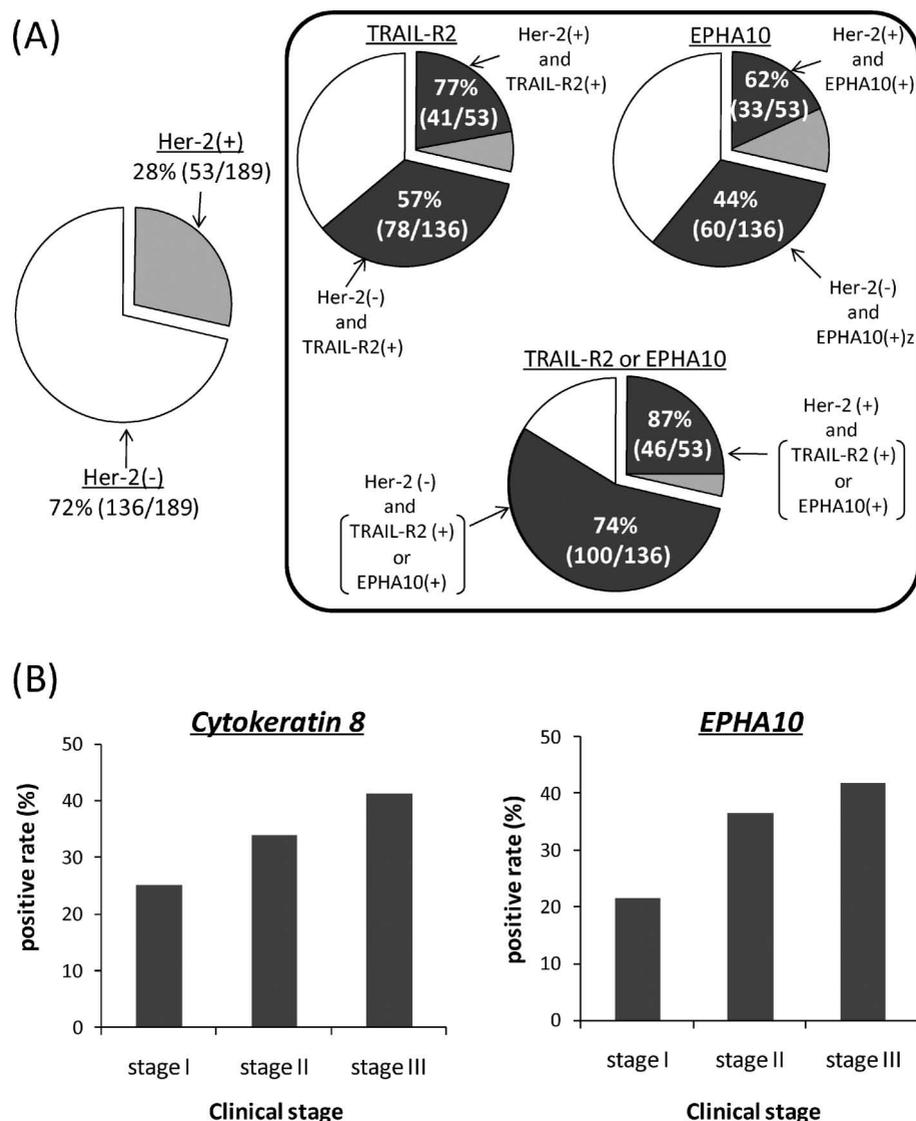


Fig. 2. Correlation Analysis between the Expression Profile of Biomarker Candidates and Clinical Information

(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, Cytokeratin8 and EPHA10, in each clinical stage.

-010), 厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究 (HS) 事業 (No.KHC1017), 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業: 創薬バイオマーカー探索研究事業 (No.H21-バイオ-指定-005), 及び財団法人永井記念薬学国際交流財団の支援を受けて実施されたものです。ここに深謝申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Hanash S., *Nature*, **422**, 226–232 (2003).
- 2) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546–552 (2003).
- 3) Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandenabeele P., Aggarwal B. B., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y., *J. Biol. Chem.*, **283**, 998–1007, (2008).
- 4) 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).
- 5) Nahta R., Esteva F. J., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **53**, 186–190 (2004).
- 6) Nahta R., Yu D., Hung M. C., Hortobagyi G. N., Esteva F. J., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 269–280 (2006).
- 7) Amar S., Moreno-Aspitia A., Perez E. A., *Breast Cancer Res. Treat.*, **109**, 1–7 (2008).
- 8) Vannucchi S., Chiantore M. V., Fiorucci G., Percario Z. A., Leone S., Affabris E., Romeo G., *Oncogene*, **24**, 2536–2546 (2005).
- 9) 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).
- 10) Tolcher A. W., Mita M., Meropol N. J., von Mehren M., Patnaik A., Padavic K., Hill M., Mays T., McCoy T., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Cohen R. B., *J. Clin. Oncol.*, **25**, 1390–1395 (2007).
- 11) 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).
- 12) Wolff J. M., Borchers H., Brehmer B. Jr., Brauers A., Jakse G., *Urol. Int.*, **60**, 152–155 (1998).
- 13) Ditzel H. J., Strik M. C. M., Larsen M. K., Willis A. C., Waseem A., Kejling K, Jensenius J. C., *J. Biol. Chem.*, **277**, 21712–21722 (2002).