

〈特集：第25回年次学術集会から〉

プロテオーム解析によるがんバイオマーカー開発

近藤 格

Cancer biomaker development by proteomics

Tadashi Kondo

Summary A biomarker is a critical tool for a better clinical outcome in cancer patients. Proteomics is a functional translation of a genome, directly regulating cancer phenotypes. Thus, proteomics can be an effective approach to biomarker development. In the early development of proteomics, two landmark papers affected the direction of cancer proteomics toward biomarker development. The first one reported the biomarker for early detection in ovarian cancer, suggesting the potential of cancer proteomics for biomarker development. The second one summarized plasma proteins as a function of their possible amount in plasma, indicating the limitation of proteomics modalities for biomarker discovery. Due to these two papers, researchers realized that cancer proteomics could have a great impact on cancer treatments by developing biomarkers, especially through technology improvement. Since then, a considerable number of biomarker studies papers have been published. However, unfortunately, there are few biomarkers discovered by proteomics that have proven beneficial for cancer patients. According to the examples of other omics studies, high-end technology does not necessarily promise the success of biomarker development, and clinical conditions such as prior probability should be considered when starting experiments. The problem-oriented approach with a practical mind will be required for successful biomarker development.

Key words: proteomics, biomarker, cancer

1. がんとプロテオーム解析

がんの早期診断や個別化医療などさまざまな局面においてバイオマーカーは有用である。早期に診断され治療が開始された症例の生存率は進行がんの症例に比べて一般に良好であり¹⁾、早期のがんを簡便に検出できるバイオマーカーは治療成績の向上に役立つことが期待される。

開発が進む分子標的薬は特定の分子背景をもつ腫瘍によく奏効することが特徴的であり、新しい薬を用いた治療法を最適化するためのバイオマーカーが求められている。治療を最適化するためには正確な診断が必要であり、そのためのバイオマーカーが求められている。

がんはゲノムに発生した異常が原因で発生する疾患である。したがって、ゲノムの機能的な

翻訳産物であるタンパク質の総体である「プロテオーム」は、治療標的やバイオマーカーなど医療シーズの宝庫かもしれない。遺伝子から翻訳されたタンパク質は、リン酸化などの翻訳後修飾を受け、プログラムされた場所に移動し、他のタンパク質や核酸と相互作用し、適度に分解されながら機能している。このようなタンパク質の状態をゲノムの情報から推定することは今のところできず、タンパク質そのものを調べなくてはタンパク質が実際にどういう状態にあるのかわからない。そして、がんにおいてはタンパク質のこのような性質が異常を来しており、異常のうちのあるものは、がんの発生や進展に大きく寄与している。「プロテオミクス」とは、このようなタンパク質の性質を多数のタンパク質において網羅的に調べ、網羅的に調べなくてはわからなかったデータを得て、生命現象を理解したり臨床に役立つ知見を得ようとする学問である。そして、「プロテオミクス」に特徴的に用いられる解析を、「プロテオーム解析」と呼称している。

「ゲノム」に対応する「プロテオーム」という言葉は1994年にイタリア・シエナ市で開催された「シエナ・ミーティング」で初めて用いられた²⁾。その当時、がん研究においてはPCRなどの分子生物学の手法が盛んに用いられ、新しい重要な遺伝子がどんどん発見されていた。核酸と違ってタンパク質は増幅できず微量なタンパク質を簡便に同定する技術が当時はなかったこともあり、がん研究においてタンパク質の網羅的な研究は明らかにマイナーな分野だった。その後、21世紀に入り、ゲノム研究の興隆によってデータベースが充実し、IT技術の環境整備により多量のデータを個人のPCで解析できるようになり、そして質量分析などの実験技術が革新的に進歩し、プロテオーム解析の技術は著しく発展し普及した。がん研究においてもプロテオーム解析の手法は盛んに用いられるようになり、現在ではごく普通の実験技術として普及している。

2. プロテオーム解析とバイオマーカー開発

今世紀初頭、がんのプロテオーム解析の方向性を決定づける二つのランドマーク的な論文が

発表された。一つは、Petricoin博士によるもので、卵巣がんの早期診断のためのバイオマーカーに関する報告である³⁾。SELDI TOF MSという比較的シンプルな質量分析装置を用いて血液から同定された複数のペプチドを組み合わせることで測定することによって、卵巣がんの早期診断が可能になる、という内容の論文である。卵巣がんは早期においてはほとんど自覚症状がなくしかも悪性度がきわめて高い。しかしながら、早期に診断し治療するための有効な手段は未だに存在せず、進行した状態で診断されることが多い。Petricoin博士のバイオマーカーは卵巣がんの治療成績を向上させるツールとして当時は画期的であり、センセーショナルだった。残念なことにPetricoin博士のこの論文は後に多くの議論を生むことになるのだが、プロテオーム解析がバイオマーカー開発に役立つと基礎研究者が考えるきっかけになった。もう一つの論文は、Anderson博士によるもので、血漿タンパク質がどのくらいの発現量で血中に存在するかを網羅的に調べまとめた総説である⁴⁾。プロテオーム解析の技術は感度が低すぎて既存の血清腫瘍マーカーは観察できないことが、具体的なデータを根拠と共に示された。Anderson博士の論文は今でもプロテオームの学会で必ずと言ってよいほど引用されている。これら二つのランドマーク的な論文により、①臨床的に多大なインパクトのあるバイオマーカーの発見をプロテオーム解析で期待できる、しかし、②プロテオーム解析は技術的にまだまだ開発の余地が残されている、というコンセプトが研究者の間で共有されるようになった。

このような背景があって、バイオマーカー開発、とりわけそのための技術開発と応用ががんのプロテオーム解析において主要なテーマとなった。「血液一滴から早期診断」のスローガンはプロテオーム解析によるバイオマーカー開発において今世紀初頭から提唱され始めた。バイオマーカー開発をテーマにした学術集会は過去に国内外でたくさん開催され、今でもプロテオームの学会では必ずと言ってよいほどバイオマーカーのセッションが設けられている。PubMedで文献検索をすると2010年ころから毎年1000本以上の論文が「プロテオーム解析 (proteome, proteomics, proteomic)」 「バイオマ

カー (biomarker)」でヒットする。質量分析を開発した日本人がノーベル賞を受賞したということも励みになって、本邦でも多くの研究者がプロテオーム解析の技術を工夫しバイオマーカーの開発を試みてきた。

技術的な課題がボトルネックだということで、「バイオマーカー開発」という研究テーマは、プロテオーム解析の技術レベルの向上に大きく影響し貢献してきた。バイオマーカー開発においては、複雑な試料（臨床検体）を、網羅性高く、再現性よく、定量的に、ハイスループットに調べることが要求される。従来のタンパク質生化学の手法をバイオマーカー開発に応用するにあたっては、このような条件を満たすことができるように改良する必要があった。数100検体という臨床検体を一気に安定して解析するためには、クリアすべき数々の技術的なハードルが存在する。バイオマーカー開発を目的として新しい技術の開発が行われ、並行して従来の技術の見直しや改良が試みられてきた。バイオマーカー開発というテーマが無かりせば行われなかったかもしれない技術開発は多い。治療成績の向上につながるバイオマーカー開発に必要な投資ということで、単なる技術開発であれば許されないような巨額の公的研究費がプロテオーム解析の技術開発に使われてきた。すなわち、バイオマーカー開発とプロテオーム解析は、両輪の輪のように過去10数年間にわたって進展していった。

3. バイオマーカー開発の現状

プロテオーム解析の手法を用いて多数のバイオマーカーが同定され報告されてきた。プロテオーム解析で同定されたバイオマーカーの中には、機能解析が行われ、独立した症例群で検証実験にも成功したものも多い。この十年間、感度・特異度が90%を超える素晴らしいバイオマーカーが続々と学術雑誌だけでなく、新聞や週刊誌などの報道でも取り上げられてきた。今でも数か月に一回くらいのペースで、「血液一滴でがんの早期診断」というセンセーショナルな見出しをマスコミで目にする。しかしながら、華々しく喧伝されている割には、プロテオーム解析で同定されたバイオマーカーの中に、臨床

に応用されているものはほとんどない。鑑別診断や再発予測診断において事業化されたものはあるが、早期診断に関しては全滅である。診断や治療に役立つことが臨床試験で証明され普及しているものも皆無である。論文的には優れたバイオマーカーが実用的に使用されないのはなぜだろうか。今までのアイデアや方法を踏襲していたのでは、バイオマーカーの候補はこれからもみつかるかもしれないが、実用化につながる成果は得られないのではないだろうか。このように考えると、プロテオーム解析によるバイオマーカー開発を今までとは違った視点でとらえなおす必要がある。

4. プロテオーム解析による バイオマーカー開発の問題点

前述の2つの論文がその後のプロテオーム解析に与えた影響は大きく、「網羅的にタンパク質を調べればいつかバイオマーカーが見つかる」あるいは「網羅性を上げてタンパク質を調べるとバイオマーカーが見つかるチャンスが著しく増える」という発想に基づく論文や発表が今でも実に多い。① (Petricoin博士の論文に影響されつつ) バイオマーカーが必要とされていてプロテオーム解析が有望なアプローチであることを述べ、② (Anderson博士の論文に影響されつつ) プロテオーム解析の網羅性が不十分であることがバイオマーカーが見つからないことの原因であると述べ、③網羅性を上げる技術的な工夫をし、④新しくバイオマーカーの候補が見つかったことを報告し、⑤若干の機能解析と検証実験を行い、⑥実用化にはさらなる検証実験が必要であると最後に断っておく（ただし検証実験が行われることはまれ）、というのが学会や論文でよくあるパターンである。網羅性を上げていけばバイオマーカーとなるタンパク質がいつの日か手元のタンパク質リストに加わることになるので、あとは手持ちのデータの中から正しいものを見つけさえすればよい、という発想なのだろう。この考え方は一見すると正しそうにみえないこともない。後にバイオマーカーであることが判明することになるタンパク質は、今行っているプロテオーム解析で観察されていなければならないからである。

現在のプロテオーム解析では、最先端の装置を用いてもたかだか1000～5000種類のタンパク質しか観察できない。アイソトープ標識などして定量的に観察しようとする、1000～2000種類程度しか観察できない。技術的なこの限界は誰がみても明らかなので、実用的なバイオマーカーができないことの原因として、網羅性の低さが真っ先にやり玉に挙げられる。別の見方をすると、技術的な限界が誰にでも明らかなので、バイオマーカー開発の本質的な問題が別にあったとしてもマスクされてしまっている危険性がある。網羅性が今より著しく向上すれば、実用的なバイオマーカーは本当にみつかるのだろうか？プロテオーム解析だけ考えていてもこの問題はわかりにくいので、網羅性という点においてプロテオーム解析のずいぶん先を行くトランスクリプトーム解析を例にこの問題を考えてみる。

プロテオーム解析よりはるかに高い網羅性をもった解析がmRNAの発現解析においてはDNAマイクロアレイを用いて行われてきた。すなわち、DNAマイクロアレイを用いれば、発現する大半の遺伝子がmRNAレベルで定量的に比較解析することが可能である。10年以上も前から、2000年代初頭には高額だったアレイも技術の普及に伴い安くなり、現在ではかなり安価にmRNAの網羅的解析が実施できる。受託解析も普及し、自分で実験をしなくてもよい。次世代シーケンサーを用いることで、網羅性に加えてスプライシングに関する詳細な解析も可能になった。プロテオーム解析もいつの日にかmRNAの解析レベルに達したいものである。バイオマーカー開発を目的としたmRNAの網羅的発現解析は数多く実施され、一流の学術雑誌に多くの論文が掲載されてきた。肺がん、乳がん、大腸がん、胃がん、肝がんなど、メジャーな悪性腫瘍から肉腫や悪性脳腫瘍などの希少がんに至るまで、ありとあらゆる悪性腫瘍がDNAマイクロアレイで調べられ、バイオマーカーの候補が発表されてきた。バイオマーカー開発から見つかった遺伝子の中には、機能的に重要であることが*in vitro*の実験で判明したものもかなり多い。しかしながら、一流誌に報告されたバイオマーカーであっても実際に商業化され臨床応用に至った例はごくわずかである。臨床応用を

バイオマーカー開発の成功の定義とするのであれば、mRNAの網羅的発現解析において成功した事例というのは全体からすると例外的であり、報告されたバイオマーカー候補の数からすると成功率は0に近く低い。したがって、mRNAの網羅的発現解析の事例について言えば、高い網羅性でもって解析をしさえすれば実用的なバイオマーカーが見つかるというのは幻想に過ぎないことがわかる。

網羅的な解析の一般的な問題として、調べる分子の数に対して臨床検体が少なすぎる、ということが挙げられる。具体的には、何1000という遺伝子あるいはタンパク質を対象にわずか数10検体を調べると、偶然の、すなわち偽陽性の結果を得ることになる。網羅性は技術的に解決される課題だが、臨床検体を研究用に準備することは一研究者の努力ではなかなか難しい。また、一サンプルあたりの実験のコストを考えると、仮に臨床検体が何100とあったとしても、その全てを網羅的な実験に使うことは限られた研究費ではできない。そして、がんばって網羅性を上げればあげるほどこの問題は顕著になる。観察する分子の数に対して臨床検体が少なすぎるという問題は、検定の多重性として認識され、統計解析としていくつかの多重検定補正法が用いられている。しかしながら、どんなに数字を補正したところでこの問題は容易には解決できない。補正を厳密にすれば統計的に有意に発現差のある遺伝子・タンパク質はなくなってしまうので、なくならない程度に厳密な閾値を選ぶという、いわば「結果ありき」の方針を取るようになってしまうからである。過去の論文の数と今までの成果を鑑みると、この方針を続けて実用化につながる成果が得られるかどうか、はなはだ疑わしい。

網羅的解析で見出されたバイオマーカー候補が本物なのかどうかを見極めるためには、徹底的な検証実験を行うしかない。学術誌に論文がアクセプトされるためには必須の事項なのでバイオマーカー分子に対して機能解析が行われるのだが、機能的に重要かどうかはバイオマーカーとしての性能には本質的には関係ない。がんのプロテオーム解析によるバイオマーカー開発では、発表された後に異なる研究者が独立した症例群で検証実験を行ったという事例はかな

りまれである。技術的な課題を克服して網羅性を向上させることは一研究者でも可能なのだが、臨床検体を収集して実験に用いることは通常は難しいということから、このような事態になっていると考えられる。

実験デザインが現実を反映しているかどうか重要なポイントである。がん患者と健常者の血液を比較するという実験デザインの背景には、健常者を含む集団に対する検診に使えるバイオマーカーを同定しようという考えがあると推定される。がんのプロテオーム解析では、ほぼ同数のがん患者と健常者あるいは非がん患者の臨床検体が比較されてきた⁵⁾。高い感度・特異度は、その条件であれば実用的な意味があるかもしれない。しかし、実際の検診では同数のがん患者と健常者あるいは非がん患者が集まることはなく、全国の罹患率（および有病率）からすると検診を受ける方々のほとんどががん患者ではないと推定される⁶⁾。この条件下では、感度や特異度が少々高くても、検査で陽性と判定された方のほとんどが実はがんを患っていないということになる。大腸がんの便潜血検査のようにすでに実用化されている早期診断のための検査ではこの問題は周知の事実であり、検査陽性の方の数%しか実は大腸がんを患っていないことが知られている。したがって、集団レベルでは大腸がんの死亡を抑制するために便潜血検査は有効であるものの、偽陽性による不必要な検査が精神的・肉体的・経済的な負担を受診者に発生させる可能性がある。したがって、陽性の結果を個々の患者さんの診療にどのように役立てるかが検討されてきた。この事は大腸がんに限らずすべてのがんの早期診断についてあてはまり、数の少ないがんでは偽陽性の問題はより顕著になる。これは、がん検診の一般的な課題であり、プロテオーム解析の技術のレベルを上げてでも解決できない。同数のがん患者と非がん者の血液を比較すれば何かしら発現差のあるタンパク質が高い感度と特異度で見つかるし、今の学術レベルではそれらをバイオマーカー候補と呼称することもできる。そして、新聞や週刊誌ではあたかもがんの早期診断が解決したかのように喧伝される。しかし、その段階から実用化に向けては次元の異なる問題が存在する。このようなこともあって、プロテオーム

解析で発見されたバイオマーカーで早期診断に実用化され死亡率の減少をもたらしたものは、かつてない。プロテオーム解析がわるいのではなく、研究テーマが難しすぎるのである。

プロテオーム解析で見出されたバイオマーカーの中には病院で使われるようになったものもある。たとえば、2009年にFDAに承認されたOval1である（Vermillion社）。Oval1は鑑別診断のためのバイオマーカーである。すなわち、卵巣に画像診断で腫瘍が見つかったときに、それが良性の腫瘍なのか卵巣がんなのかを鑑別するためにOval1は用いられる⁷⁻⁹⁾。良悪性の判定は卵巣がんでは重要である。卵巣がんと良性腫瘍との鑑別は時として困難であり、バイオプシーでは腫瘍細胞が播種する危険性もあるため、開腹手術をしなければ鑑別できないことも多い。Oval1を開発した研究者が後に述懐しているところでは、早期診断のためのバイオマーカーとなると、有病数が著しく低い卵巣がんにおいては実用化につながるものは開発できないのではないかと考えたとのことである¹⁰⁾。さらに、偽陽性が不必要な手術につながりうることも、彼らは懸念していた¹⁰⁾。一方、画像診断で骨盤腔に腫瘍が見つかったときにそれが卵巣がんかどうかを鑑別するニーズがあることを知り、それなら開発可能だと考えたのだとのことである¹⁰⁾。卵巣に腫瘍がある場合、その約1割が卵巣がんと言われる。少ない確率のように思われるかもしれないが、卵巣がん自体の有病率は10万人あたり10人以下に過ぎないことを考えると、かなり高い確率である。いろいろな原因で卵巣がんの検診には今でも賛否両論があり、さらに、早期診断に有効なバイオマーカーはまだ見つかっていない^{11), 12)}。誤解して頂きたいのだが、がん検診が不要だということを私は述べたいのではない。ここで述べたいのは、早期診断という研究テーマがいかに難しいかということである。血液サンプルをちょっと比較解析して差が見つかったくらいで実用化にたどり着く可能性は0に近いということである。ところで、Oval1を構成する5種類のタンパク質というのは、apolipoprotein A1、beta 2 macroglobin、CA-125II、prealbumin、そしてtransferrinである。CA-125IIを除き、意外にもかなり量の多いタンパク質である。これらのタンパク質の同定に使わ

れたのは最先端のプロテオーム解析の技術ではなく、今となっては時代遅れの感のあるSELDI TOF MSという装置である。また、卵巣がんの発生や進展とこれらのタンパク質は、おそらく機能的な関係はない。Ova1の事例からわかることは、成功するバイオマーカー開発において重要なのは技術ではなくバイオマーカーの機能でもなく、対象とする事象の検査前の確率（検査前確率）かもしれないということである。

FDAで承認こそはされていないものの、プロテオーム解析で同定されて事業化されたり、その後の臨床試験で効果が実証されたりしたバイオマーカーはOav1以外にもいくつか存在する。それらは皆、手術を受けたあとのがん患者の再発や転移の予測、すなわち検査前確率が十分に高い集団の特定に使われるものである。検査前確率が高い研究テーマを選ぶこと、あるいは検査前確率を高めるような検査と組み合わせるバイオマーカーを目指すことが、（プロテオーム解析に限らず）バイオマーカー開発の成功の鍵ではないだろうか。もちろん検査前確率が高ければよいというものではない。たとえば、近年開発が進む分子標的薬を用いた治療では、さまざまな悪性腫瘍の臨床試験においてバイオマーカーの有効性が実証されている¹³⁾。つまり、薬効をあらかじめ予測できるバイオマーカーは治療成績の向上に貢献しうる、ということである。分子標的薬の奏効率はさまざまであり一般的な検査前確率を算出し難いのだが、それでも早期診断ほどには低くない。ただ、有効性が確認されたバイオマーカーはゲノムレベルの研究からみいだされたものであり、タンパク質のバイオマーカーの有用性はゲノム異常から固定されたバイオマーカーより低くなかったとのことである¹³⁾。分子標的薬の場合、標的とする分子そのものの状態が何よりも重要であり、変異など配列レベルの情報がバイオマーカーとして有用なかもしれない。どのようなバイオマーカーがプロテオーム解析に即しているかを、対象とする事象の分子背景や臨床的な観察事実に基づいて考えていく必要があるだろう。

5. おわりに：プロテオーム解析による バイオマーカー開発の展望

バイオマーカー開発においてプロテオーム解析が有望なアプローチであることは自明のように思われる。がんの機能を直接制御するのはタンパク質であり、タンパク質バイオマーカーはすでに臨床検査でよく用いられているからである。ただ、自明に思われるこの仮説は未だ実証されていない。「技術レベルを上げさえすれば実用的なバイオマーカーが見つかる」という今までの仮説から脱却し、バイオマーカーに適した研究テーマかつ臨床に即した研究テーマに取り組むことで、プロテオーム解析がバイオマーカー開発において本当に有用かどうかを検証されるだろう。

参考文献

- 1) 全がん協生存率調査: 全国がん (成人病) センター協議会. Available from: <http://www.zengankyo.ncc.go.jp/etc/>.
- 2) *2D Electrophoresis: From Protein Maps to Genomes. Proceedings of the International Meeting, Siena, Italy, September 5-7, 1994.* Electrophoresis, 1995. 16(7): p. 1077-322.
- 3) Petricoin, E.F., et al., *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer.* Lancet, 2002. 359(9306): p. 572-7.
- 4) Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects.* Mol Cell Proteomics, 2002. 1(11): p. 845-67.
- 5) Hirales Casillas, C.E., et al., *Current status of circulating protein biomarkers to aid the early detection of lung cancer.* Future Oncol, 2014. 10(8): p. 1501-13.
- 6) *がんの統計'14.*
- 7) Bristow, R.E., et al., *Impact of a multivariate index assay on referral patterns for surgical management of an adnexal mass.* Am J Obstet Gynecol, 2013. 209(6): p. 581 e1-8.
- 8) Forde, G.K., et al., *Cost-effectiveness analysis of a multivariate index assay compared to modified American College of Obstetricians and Gynecologists criteria and CA-125 in the triage of women with adnexal masses.* Curr Med Res Opin, 2016. 32(2): p. 321-9.
- 9) Goodrich, S.T., et al., *The effect of ovarian imaging*

- on the clinical interpretation of a multivariate index assay.* Am J Obstet Gynecol, 2014. 211(1): p. 65 e1-65 e11.
- 10) Fung, E.T., *A recipe for proteomics diagnostic test development: the OVA1 test, from biomarker discovery to FDA clearance.* Clin Chem, 2010. 56(2): p. 327-9.
- 11) Kobayashi, H., et al., *A randomized study of screening for ovarian cancer: a multicenter study in Japan.* Int J Gynecol Cancer, 2008. 18(3): p. 414-20.
- 12) Buys, S.S., et al., *Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial.* JAMA, 2011. 305(22): p. 2295-303.
- 13) Schwaederle, M., et al., *Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials.* J Clin Oncol, 2015. 33(32): p. 3817-25.