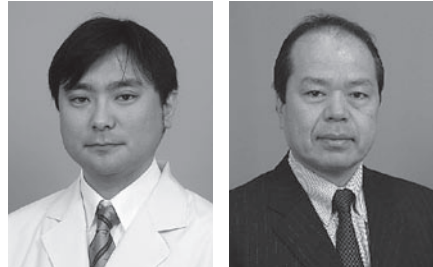


Review Articles

蛋白定量解析の 癌病態解明における役割

岩手医科大学 医学部外科 西塚 哲、若林 剛



恐らくこの20年間で最も癌病態の解明に貢献したグループの1つである Vogelstein らは、1998年 に出版された *The Genetic Basis of Cancer* (第1版) の冒頭で、“*As late as the 1970s, human cancers remained a black box … . 中略 … This has changed dramatically as a result of the revolution in cancer research that has occurred in the last decade* (1970年代にはまったく未知のものであったがんという病気が、最近10年のがん研究における革命的变化が、(病態の理解に) 劇的な変化をもたらした)” と記している。ここでいう「劇的な変化」は、従来形態学的な分類に基づいた手法が中心であったがん研究に、分子生物学や遺伝学の手法を用いることで病態を物質レベルで解明できるようになったことである。例えば、網膜芽細胞腫では *RB*、家族性大腸腺腫症では *APC* などがんの発症に密接に関与する責任遺伝子の同定は、これらの手法を応用したことによる成果である。1980年から1990年代はがんの発症機序に分子レベルで迫った最初の時代であり、それ以前と比較してそのアプローチは劇的であると評されるほどの変化をもたらした。

がんの基礎研究の成果が予防や診断に一定の貢献を果たすのは明らかであるが、同時期のがん治療に関しても同様の著しい進歩があったことも認識されるべきである。スコープ(内視鏡、胸腔鏡、腹腔鏡など)を用いた低侵襲手術は今や標準的となり、従来の抗癌剤に加え分子標的薬というカテゴリーも登場した。国内においては各種がんの治療標準化が推

し進められ、すでに確立されたものもある。このようながん治療に対する進歩に対応して、がん研究も基礎・臨床を問わず遺伝子・転写レベルでの解析から、蛋白質レベル、機能解析へのシフトが始まっている。遺伝子検索によって明らかになってきたがんの多様性に対応した治療を目指した研究が、今後は重要になると思われる。Vogelstein らが評した劇的な変化を経て、今がん研究は新しい局面を迎えつつある。

基礎的がん研究によってもたらされた膨大な遺伝子に関する情報を患者ごとに解析すると、同じ臓器から発生したがんでもその性格が異なるであろうことが予想される。これらの情報からも予後や化学療法の効果予測はある程度可能であるが、がん細胞の中で何が起きているのかを理解するには蛋白質レベルでの機能に直接関係した分子を観察し評価することが必要である。特に薬剤に関しては、投与方法は主として安全性をもとに決められており、多くの場合薬剤の治療効果の機序の詳細は不明である。また、明らかになっている分子作用は全体像の中の一部に過ぎず、分子作用の予測からは効果が期待できる場合でも臨床的に思ったほどの効果が見られないことや、予想されない副作用が起こることは珍しいことではない。

薬剤のがん細胞に対する作用機序の中で最も重要な役割を果たしているのは細胞を構成する主要な要素である蛋白質と考えられている。ヒトゲノムの全塩基配列が決定され、そのうち約2万から3万の遺伝子が蛋白質をコードしているといわれている

が、翻訳後の蛋白質分子は細胞内の状態に応じてリン酸化などの化学的修飾が加えられる。さらにこれらの蛋白質が複合体を形成し機能を発揮することも多い。したがって、生体内では遺伝子の数より遙かに多くの機能単位が形成されていることになる。これら蛋白質は10万から100万倍ものダイナミックレンジ（細胞内総分画蛋白質に存在しうる最低から最高濃度の蛋白質の濃度の範囲）を持つと考えられている。これは静的状態の細胞に存在すると考えられる各蛋白質モル数の差や同一細胞内のそれぞれの蛋白質が細胞のおかれた状態により変化しうるモル数の差を指している（図1）。前者では絶対量の少ない種類の蛋白質を検出するのに大量のサンプルが必要であり、後者では細胞が刺激やストレスを受けた後に起こる時間依存性の変化を追跡するのに細かいインターバルでのデータの収集が必要である。したがって、解析する蛋白質の対象によっていずれも labor intensive（労働集約的）なサンプル収集が求められる。2次元泳動ゲルを用いた腫瘍マーカースクリーニングでは主に前者のサンプルが用いられており、報告も多い。一方、時間などの変数依存性に変化する蛋白質の量から既知のネットワークを検証あるいは対応した理論式の確立を目的に大量のサンプルを用いて検討することは比較的新しい概念で、蛋白質の特性である状況に応じた量的・質的变化に注目したこの種の情報は非常に貴重である。この後者のような数の多いサンプルをできるだけ同一条件下でかつ定量的に解析するにはサンプルを高度集積すなわちチップ化する必要がある。しかしながら、蛋白質は温度や湿度などの外部環境にその状態が影響されやすく、またどのような組成のバッファーでサンプルを調製するかで化学的に影響を受ける。したがって細胞内のすべての分画の蛋白質を含んだ細胞ライセートは、高度集積チップの作成には不都合の多い材料であり、その目的を達成できるシステムの開発が切望されていた。

筆者らは米国国立がん研究所在籍中に蛋白質検出

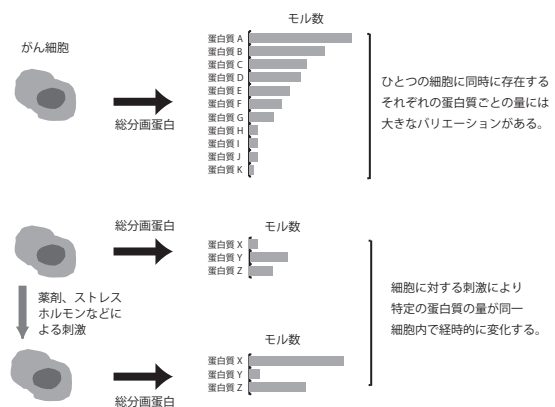


図1 がん細胞中の蛋白質のダイナミックレンジの概念図

系の高度集積化を目指し、米国のベンチャー企業であるオーションバイオシステムズと共同で Aushon 2470マイクロアレイヤー（自動微点印刷装置）を開発した（図2）。この装置は1検体あたりの量を数百ピコリッター（ピコは十の千億分の一）までスケールダウンすることで、ごく小さな面積に大量のサンプルを集積できる（図3）。サンプルをプリントするピンの形状や内部環境のコントロール法などに違いがあるが、いわゆるマイクロアレイ技術はDNAやRNAといった遺伝情報を検出するには長らく用いられてきた。一方細胞ライセートなどのサンプルをプリントするにはピンの目詰まりなどのトラブルが避けられなかったため、本装置の登場で蛋白レベルでの応用が現実的となった意義は大きい。現在まで、筆者らが開発・導入した米国国立がん研究所の第1号機を始め、北米を中心に世界で約15台が稼働している。昨年2月に当講座に導入された同装置は、日本はもとよりアジア地域初であり、われわれの研究室では日本の医療需要に則した応用を目指して研究を進めている。

Aushon2470により作製可能な超高密度逆相蛋白ライセートアレイは、マイクロスケールのドットウェスタンプロットで、総分画蛋白質を含む細胞ライセートを直径100 μm 程度の点としてスライドガラス上にプリントする。数 cm^2 の面積の中にドットを

1万以上集積可能で、その集積されたライセートに対して特異的抗体を用いた免疫染色を行い、定量的に解析する。定量的な解析は情報を客観的に解釈することと大量の情報を自動化されたプロセスで処理することに優れ、現在までわれわれをはじめとしていくつかのグループが、(a) 細胞株パネルを用いた蛋白レベルでの分子プロファイル、(b) 蛋白分子腫瘍マーカーの同定、(c) レーザーマイクロダイセクションを用いた生体材料の分子プロファイル、(d) 細胞ストレス後の反応蛋白変動モニタリング、および (e) 微分方程式で表される細胞内シグナル伝達の実験的検証、などを報告している。また、米国では新規抗癌剤の第I相臨床試験において分子標的の反応性評価法としてすでに応用が試みられている。定量解析に用いる1次抗体の特異性の確認が必要ではあるが、実験当たりの要求サンプル量が少なく定量データを少ない実験回数で大量に提供できることから、今後も幅広い応用が期待されている技術である。われわれの研究室でも細胞生物学ベースで行う従来の抗癌剤感受性試験に、分子レベルでの根拠を加えることでより鋭敏な判定ができるよう開発を進めている。

がんの病態を把握するためには、遺伝的背景、環境因子、治療に対する反応性などに対する深い理解が必要である。すでに細胞生物学あるいは分子遺伝学的手法でがん関連遺伝子が同定され、遺伝子ノックアウト・ノックダウンによりモデル系での機能的検証も行われてきた。これらのがんの発生機構の研究によって蓄積された膨大な知識を背景に、最近では理論的・数学的アプローチによる研究の発展も目覚ましい。Tratsumabに代表される分子標的薬のように、がんの増殖に関与する分子を阻害するようにデザインされた合成低分子や抗ヒトモノクローナル抗体などによる治療も現実となった。今後は健康人からハイリスク群を抽出するスクリーニングはもとより、高度進行・再発・転移症例を対象とした治療にも精力が注がれると思われる。スクリーニン



図2 米国 Aushon BioSystems 社製「2470」プロテインマイクロアレイヤー
幅×奥行き×高さ 93×88×181cm。30枚の384穴マイクロプレートおよび100枚のプリント用スライドガラスが一度に搭載可能。マイクロアレイ作製に必須の温度や湿度といった内部環境もコンピュータで制御されている。

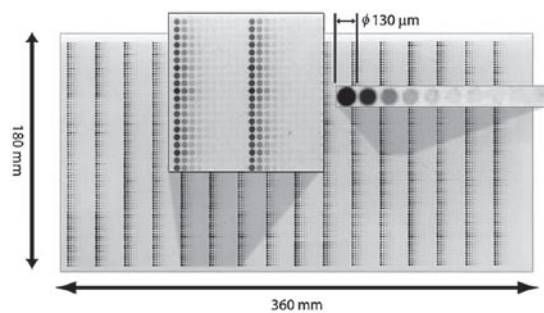


図3 超高密度逆相蛋白ライセートアレイ
ガラススライド上のニトロセルロース膜上に、がん細胞溶解液から得られた総分画蛋白を直径約130ミクロンのドット(点)として印刷している。ドットの総数は約10000で、印刷されたすべてのサンプルについて特異的蛋白の検出を一度に行うことができる。

グマーカーとして、また薬剤反応の機能的指標として蛋白質を測定することは最も効果的な方法の一つである。われわれの開発した高密度逆相蛋白質ライセートアレイを従来の優れた診断・治療法と組み合わせることで、遠くない将来、より鋭敏にがんの病態に迫ることができると思われる。

本稿について貴重なご意見を賜った岩手医科大学外科、岩谷岳先生に深謝いたします。