

蛍光二次元電気泳動法を用いた骨軟部肉腫の個別化医療のための バイオマーカー開発

窪田大介^{#1}, 末原義之^{#1, #2}, 菊田一貴^{#1}, 金子和夫^{#2}, 川井章^{#3}, 近藤格^{#1}

^{#1} 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, ^{#2} 順天堂大学医学部 整形外科教室,

^{#3} 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が、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、研究対象として非常に重要な疾患群である。

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、このような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、凍結手術検体を 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。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。本講演ではこれらのアプローチの成果として同定された骨軟部肉腫のバイオマーカーや検証実験の結果について紹介させて頂く。

骨肉腫と Ewing 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。治療法の発達に伴い徐々に予後は改善されてきているが、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な疾患である。現段階では治療効果予測や予後予測に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である。そこで我々は治療前に治療効果を予測できるような個別化医療のためのバイオマーカーの探索を行った。切開生検により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、Ewing 肉腫では予後の異なる 2 群間のタンパク質発現を比較し、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。

一方、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。この 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 群間のタンパク質発現を比較し 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、複数施設での大規模検証試験を行い、発現検証に成功している。

これらの研究で得られた結果は多施設の検証実験を継続しつつ、民間企業と共同で実用化を目指している。また、様々な骨軟部肉腫についてその病態解明や新規治療法開発への発展を目指し、細胞株を用いた研究も進行している。我々の研究のさらなる発展が骨軟部肉腫の今後の治療成績向上の一助になるよう、臨床現場での実用化を目指し、研究を進めていきたい。

(参考文献)

1. Kondo et al. Nat Protoc. 2006;1(6):2940-56.
2. Kikuta et al. Clin Cancer Res. 2009 Apr 15;15(8):2885-94.
3. Suehara et al. Clin Cancer Res. 2008 Mar 15;14(6):1707-17.
4. Kubota et al. Jpn J Clin Oncol. 2011 Sep 8.