



Title	A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples
Author(s)	鳴海, 良平
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60113
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	なる み りょう へい 鳴 海 良 平
博士の専攻分野の名称	博 士 (理学)
学 位 記 番 号	第 2 5 8 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples (ヒト乳癌組織サンプルの蛋白質リン酸化の大規模な定量比較解析と選択反応モニタリング (SRM) 質量分析法を用いたバリデーション)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高尾 敏文 (副査) 教 授 倉光 成紀 准教授 荒田 敏昭 医薬基盤プロジェクトリーダー 朝長 毅

論文内容の要旨

蛋白質のリン酸化は、細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っており、蛋白質リン酸化の異常は、癌をはじめ多くの疾患に関与している。したがって癌バイオマーカーの重要な候補となり得る。また、バイオマーカー探索の研究においては、2つの問題点がある。1点目は、バイオマーカー候補を探索する際、ほとんどの場合、ヒト癌細胞株を用いて研究するが、実際の癌組織は様々な種類の細胞や細胞外基質などから構成されており、個体差も大きい。ほぼ均質なヒト癌細胞株とは大きく異なるという点である。2点目は、探索により得られた候補に対して癌組織サンプルを用いたバリデーションを行う際には、通常 ELISA やウェスタンなどの抗体抗原反応による方法を用いるが、蛋白質リン酸化に対する抗体は多くなく、有っても特異性が低く組織サンプルのバリデーションに用いることができないことが多いという点である。

そこで、以下のような戦略により、ヒトの癌組織サンプルを用いて、蛋白質リン酸化の癌バイオマーカーを探索した(図 1)。まず、(1)多数のヒト組織サンプルに対し、タンデム質量分析法(図 2A)を用い、大規模に蛋白質リン酸化の定量解析を行うことによって、リン酸バイオマーカー候補を決定した。その次に、(2) 候補となった蛋白質リン酸化のバリデーションを行うため、抗体を必要とせず、特異性の高い検出が可能な、選択反応モニタリング(SRM: Selected Reaction Monitoring)質量分析法を用い、候補の蛋白質リン酸化の定量を行った。

今回、予後診断でハイリスク・ローリスクの2群に分類されたヒト乳癌組織を使用することによって、蛋白質リン酸化のバイオマーカー探索を試みた。ハイリスク群6サンプルとローリスク群6サンプル(計12サンプル)について、蛋白質リン酸化の大規模な定量解析を行うため、iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification)法と、IMAC (Immobilized metal affinity chromatography)によるリン酸化ペプチドの濃縮法を組み合わせ、そしてさらに、陽イオン交換クロマトグラフィによる前分画を行い、タンデム質量分析法により測定した。全12サンプルで360時間の測定を行い、8309個の

リン酸化サイト(3401タンパク)が同定され、そのうち、12サンプル中9サンプル以上で定量値を得られた3476個の蛋白質リン酸化(図2B)について、2群間で比較した。その結果、113個のリン酸化サイトについて差がみられた。そのうち、細胞周期の制御を行うCDK1/2/3、DNA修復に働くBRCA1、TOP2Aや、癌の遊走・浸潤に関わるとされるケモカインレセプターのCCR1、細胞骨格制御を行うLMO7など、19個の蛋白質リン酸化をリン酸バイオマーカーの候補とした。

次に、19個の候補についてバリデーションを行うため、ハイリスク群6サンプルとローリスク群6サンプル(計12サンプル)に対して、1サンプルあたり1時間の測定時間で、SRM質量分析を行った。12サンプルに対し、候補と同じ配列の安定同位体標識ペプチドを添加し、19種類のリン酸化ペプチドの定量を行った。その結果、19種類のうち、15種類について定量することができ、そのうち7種類のリン酸化ペプチドはハイリスク群とローリスク群との間で差が見られた(図3, $P < 0.1$)。また、ハイリスクとローリスクの個々の組織サンプルごとに7種類のリン酸化ペプチド量の合計ポイントを評価することによっても、著しい差が見られた。このことから、このSRM質量分析法は、バリデーションに十分利用できる方法であると考えられる。

これらの結果から、ヒト組織サンプルの大規模な蛋白質リン酸化の定量解析と、SRM解析を用いたバリデーションを組み合わせた方法は、バイオマーカー探索の有効なツールになることが示された。また今回発見された7つのリン酸化サイトは、より簡便な検査の開発に繋がることが期待される。

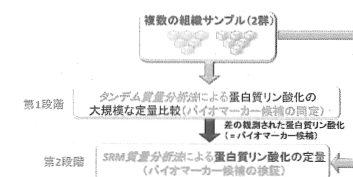


図 1. 蛋白質リン酸化の癌バイオマーカー探索のための戦略

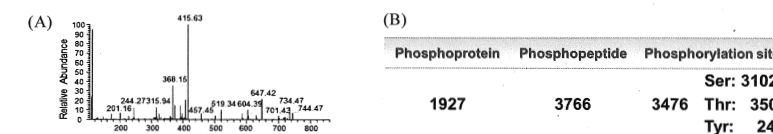


図 2. (A)タンデム質量分析スペクトルと(B)12個の乳癌組織サンプル間で定量比較された蛋白質リン酸化の数

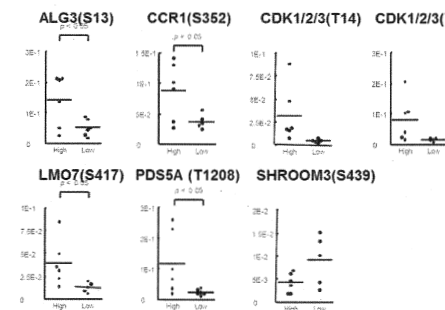


図 3. SRM 解析によりハイリスク・ローリスクの乳癌組織サンプル間で差のあった蛋白質リン酸化

蛋白質のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達経路において重要な役割を担っていることから、癌などのシグナル伝達経路の異常が関与している疾患のバイオマーカーになることが期待される。そこで、本論文では、定量リン酸プロテオミクスと、選択反応モニタリング (SRM: Selected Reaction Monitoring) 質量分析法をうまく利用することによって、これら技術のバイオマーカー探索への有用性を示すと同時に、乳癌の予後診断のリン酸バイオマーカー候補を見出すことに成功している。

本論文では、予後診断の行われた 12 検体のヒト乳癌組織（ハイリスク 6 検体、ローリスク 6 検体）に対して、iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification) 法と、IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) を組み合わせ、大規模な定量リン酸プロテオーム解析を行っている。このように、サンプルとしてヒト癌細胞株ではなく、より実際に即したヒト乳癌組織を用い、さらに組織サンプルの個体差があるために多検体に対してリン酸プロテオミクスの研究を行ったという研究は、過去にほとんど例がなく、12 個の検体間で 3476 個の蛋白質リン酸化を比較したこと、133 個のリン酸バイオマーカー候補を見出すことができたことは、特筆に価する。

さらに、本論文では、探索により得られた候補のうち、19 個のリン酸化を検証する目的で、12 検体のヒト乳癌組織（ハイリスク 6 検体、ローリスク 6 検体）に対し、SRM 質量分析法を用いた定量を行っている。その結果、15 個のリン酸バイオマーカー候補の定量に成功し、そのうち 11 個について iTRAQ 解析との相関があり、7 個のリン酸化についてハイリスクとローリスクの間で差を見出すことができた。このことは、SRM 質量分析法が、網羅的な定量リン酸プロテオーム解析により見つかった多数のリン酸化のバイオマーカー候補に対する検証法として有効であること示しており、今後のバイオマーカー探索の研究においてインパクトを与える結果であると考えられる。このことから本論文の成果は、有用なバイオマーカーとして乳がんの予後診断等に役立つものと期待され、大変意義あるものといえる。

以上により、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。