



1. 臨床プロテオミクスと バイオインフォマティクス

戸田年総¹⁾

はじめに

1995 年に Marc Wilkins ら¹⁻³⁾ によって始められたプロテオーム研究(プロテオミクス)は、二次元電気泳動法で分離された蛋白質を同定するための手段として、質量分析計によるペプチドマスフィンガープリント法^{4,5)}を採用しただけのものに過ぎなかった。しかしながら、蛋白質の集合を言い表す「プロテオーム」という概念が新しい研究の方向性を目指していた分子生物学者たちの心を掴んだことと、質量分析計の感度が従来のエドマン分解ペプチドシーケンサーに比べ2桁以上も高く、しかも10分の1以下という短い時間で同定ができる性能を有していたことが、多くの生化学者によって高く評価され、それ以後の蛋白質分析の方向性を大きく変えることとなった。それまでの蛋白質研究においては、たった1つの蛋白質を同定することですら大変手間の掛かる作業であり、多量のサンプルから種々のカラムクロマトグラフィーによる分離分画を繰り返して蛋白質を精製する必要があった。それに対し現在のプロテオミクスでは、たった1枚の二次元電気泳動ゲルから数百個の蛋白質スポットを切り出し、わずか2日間で同定作業を終わらせるということも決して不可能な話ではなくなっている。これは、二次元電気泳動法が蛋白質を分析する手段であると同時に精製の手段としても使えることを意味し、最近のナノテクノロジーの柱である蛋白質分析の微量化と高速化の口火を切ることとなった。

臨床プロテオミクスの潮流

プロテオミクスは、最初は細胞の分化や老化、癌化などの基礎生物学研究の領域で利用されていたが、その後、腫瘍マーカーの探索研究をはじめとする様々な疾患研究においても、臨床蛋白分析の手段として注目をされ始めている。実は、このように二次元電気泳動を使って血漿や髄液などを分析し、疾患の病態解析に利用しようという考え方は古くからあり、Argonne National Laboratory の Anderson ら^{6,7)} が提唱した“Molecular Anatomy”は、まさに現在の「臨床プロテオミクス」を先取りするものであった。1975年にO'Farrellによって二次元電気泳動法が発表された当初から、この方法があまりに分解能が高いために、得られた分離パターン上の蛋白質スポットの変化を定量的に比較分析するためには、コンピュータによる画像解析技術が不可欠であるという指摘があり、数年後にはNIHのLemkinとLipkinのグループ⁸⁻¹⁰⁾、およびArgonne National Laboratory の Anderson らのグループ¹¹⁾によって、それぞれ独立に大規模な画像解析システムが製作された。さらにこれと並行して、二次元電気泳動によって分離された蛋白質の同定結果をデータベース化しようという動きも始まっていた。このときに開発されたコンピュータ画像解析技術が、現在のプロテオミクスの発展の礎になっている。

1) TODA Tosifusa 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団東京都老人総合研究所
プロテオーム共同研究グループ・リーダー/TMIG プロテオーム共同研究センター研究統括

□ バイオインフォマティクスとの接点

臨床蛋白質分析においては、蛋白質を同定する以前に、疾患病態の指標となるマーカー蛋白質を二次元電気泳動パターン上で見つけ出すことが重要である。このときに使用する画像処理ソフトウェアには、染色のバックグラウンドを補正し個々の蛋白質スポットの発現レベルを定量的に数値化する機能と、疾患群と対照コントロール群を比較して有意差のあるスポットを検出する機能が要求される。現在これらの機能については、異なる2つの方向で大きな発展を遂げている。一つは、それぞれサンプルごとに別々のゲルで二次元電気泳動を行い、バックグラウンドの補正、スポットの検出、定量分析などを行った後で、2つ以上のゲル間でスポットをマッチングさせ、定量的に比較分析を行うというものである。従来この方法には、二次元電気泳動法の再現性の問題があったが、最近の画像解析ソフトウェア(特に Bio-Rad 社の PDQuest のバージョン7以降のもの)では、多少スポットの位置がずれていても、ほとんど人の手を借りずに正確にマッチングを行ってくれる高い技術レベルに達している。また二次元電気泳動そのものの再現性についても、われわれが行った泳動条件の最適化¹²⁾によって、問題はほとんど解決されたと考えている(われわれが行っている二次元電気泳動の条件は http://proteome.tmig.or.jp/2D/2DE_method.shtml で公開中)。もう一つの方法である 2-D DIGE 法¹³⁾は、あらかじめ2種類のサンプルから抽出された蛋白質を波長の異なる蛍光色素で標識しておき、これを混合して1枚のゲルで二次元電気泳動するというものである。この方法の最大の特長は、1枚のゲルから異なる蛍光波長で2種類のパターンを読み込み、それらを定量的に比較分析して有意差のあるスポットを見つげ出すところにある。電気泳動の再現性に左右されないという点が最大のメリットである。その反面、われわれが行っている老化機構研究のように、経時的に変化する蛋白質のスポットを多くのゲル間で比較する必要がある場合や、生活習慣病のように、同一個体から得たサンプルをコントロールに使えない場合には利用できないと

いう欠点もある。また、蛍光色素のカップリング反応における再現性が分析の結果を左右するという問題も残されている。このため、これらの方法を疾患マーカーの探索に利用する場合には、非常に多くの患者検体を用いてデータを集めたうえで、有意性を検証するための統計処理を行うことが必要となる。また、プロテオーム解析で得られた結果を、DNA チップなどによる分析で得られた遺伝子レベルのデータや、患者の遺伝子型(SNP)などのゲノム情報と結びつけて解析することも必要となってくる。このような状況の中で囑望されている情報処理技術が「臨床プロテオミクスにおけるバイオインフォマティクス」である。

□ 臨床プロテオミクスの現状と □ インフォマティクスの展望

最近話題になっている「オーダーメイド医療」あるいは「テーラーメイド医療」では、SNP を分析することによって、様々な疾患の発症リスクや、薬物の代謝能、免疫機能などといった「患者の体質(遺伝形質)」を知ることにより最適な治療法を見つげ出そうという試みがなされている。しかし SNP 分析によって得られる情報は、あくまでも患者の遺伝形質に関する情報であって、この情報から疾患病態を把握することはできない。単一遺伝子の異常によって発症する遺伝病とは異なり、多くの遺伝子多型が背景となって発症する生活習慣病は、遺伝的なリスクという条件の下で、生活環境や生活習慣の影響が引き金となって発症し、さらに重篤な症状が現われてくる過程においては様々な代謝調節系に二次的な影響が及んでいる。したがって生活習慣病の病態をプロテオミクスで解析することの真の意義は、このような代謝調節系の乱れを「蛋白質発現プロファイルの変化」として俯瞰的に捕らえることができるところにある。

国立がんセンター研究所の近藤格博士ら¹⁴⁾は、2-D DIGE 法¹³⁾を用いて、転移癌の原発臓器を特定するための蛋白質マーカーの探索を行っている。すでに述べたように、この 2-D DIGE 法は2種類のサンプル間の発現蛋白質の違いを見つげ出す方法としては大変優れており、癌における「腫

瘍巣と周辺の正常組織」のようにコントロールが得やすいサンプルには最適な方法である。近藤らは、様々なアルゴリズムに基づいた多変量解析ソフトを用いて、複数の蛋白質に現れる量的な差異を統計学的に処理することにより、転移癌の原発臓器を特定できるようにしようと試みており、着実に成果を収めつつある。このような数理統計学的処理も、これからの「プロテオーム解析による臨床診断」には欠かすことのできない重要なインフォマティクスの一つである。

「プロテオーム解析と数理統計学的処理」を融合しようという試みは、久留米大学とプロテオーム・システムズ・ジャパンおよびイベリカが合同で始めた「トランスレーショナル・リサーチセンター」でも行われている。特にここでは、医薬品臨床開発の過程で実施されるプロテオーム解析データをバイオスタティスティクス(医学・生物統計学)で正しく処理し、米国FDA(食品医薬品局)などの評価に耐えられる臨床治験研究の情報処理基盤を整備しようという取り組みがなされている点が大変ユニークであり、「創薬プロテオミクス」を目指す製薬企業や臨床医学研究者の注目を集めている。

臨床プロテオミクスに要求される 様々なインフォマティクス

プロテオミクスを臨床医学に応用する際に必要となるもう一つの重要なインフォマティクスは、これまでのプロテオミクス以外の臨床研究で得られた研究成果とプロテオミクスで得られた結果を効果的に連結融合し、多角的な視野で病態とのかかわりを解明することのできる情報探索技術の開発である。これに対しても、最近様々な機能のバイオ情報処理ソフトウェアが市販されるようになってきており、二次元電気泳動や SELDI 法、プロテインマイクロアレイ法などによって得られた結果をこれらの解析ソフトに入力することによって、患者の病態がたちどころに診断できる日が来ることも決して夢物語ではない。もちろんこのとき、個体差の影響を排除する必要があるのも、事前に行った DNA 検査の結果や、患者の既往歴などを入力しておくことも必要になる。いずれにせよ、すべての個体の生理的な(健康時の)蛋白質の

発現動態は遺伝子で規定され、生活環境や生活習慣で微調整され、疾患において大きく崩れるわけであるから、生物学的基盤情報としての遺伝子情報を DNA 検査によって得ておき、遺伝子の型に基づいた正常な状態からのずれをプロテオーム解析で把握するというのが、今後の臨床蛋白検査の方向性であることは間違いない。この特集では、それにいたる道筋にある新しい分析技術や応用研究の一端が紹介された。今後はさらに、これらの新しい分析技術によって得られる膨大な情報を高速で処理し、臨床の現場にリアルタイムでフィードバックできるバイオ情報処理技術の開発が進むものと予想されており、これによって 21 世紀の新しい臨床蛋白質検査への方向性が見えてくるものと期待されている。

おわりに

さらに将来の臨床蛋白質検査において忘れてはならない、もう一つ重要なインフォマティクスは、患者自身や家族に対し、検査の目的や方法を説明し、理解を求めるとともに、検査結果を正確に理解してもらうための情報開示システムの構築である。検査結果の説明と、それに基づいた治療方法の選択の説明については、担当した医師自身が行うべきものであることはいうまでもないが、検査方法の技術的な説明や検査の目的、検査結果の読み方といった基礎的な情報については、患者や家族によって知りたいと思う情報の深さや内容が異なるので、すべてのケースにおいて医師が個別に対応することにはおのずと限界がある。将来は、このような専門的情報についても、インターネットなどのメディア上で、患者自身や家族がいつでも自由に検索し、必要な情報を随時閲覧できるようにしておく必要がある。さらに、患者個人のバイオ情報、すなわち DNA 検査の結果やプロテオーム検査の結果といった個人情報については、検査のたびごとに新たに直すことは無駄が多い。また、以前の検査結果と今回の検査結果を見比べる必要が生じる場合もあるので、将来は IC カードなどに情報を収めておいて患者自身が病院間を持ち歩けるようになっていくことが望ましい。そのための情報管理技術の開発も、今後の

臨床プロテオミクスにおけるバイオインフォマティクスの重要な研究課題である。

文 献

- 1) Cordwell SJ, Wilkins MR, Cerpa-Poljak A, et al : Cross-species identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption ionisation/time-of-flight mass spectrometry and amino acid composition. *Electrophoresis* 16 : 438-443, 1995
- 2) Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al : Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16 : 1090-1094, 1995
- 3) Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al : Progress with proteome projects : why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13 : 19-50 1996
- 4) Pucci P, Carestia C, Fioretti G, et al : Protein fingerprint by fast atom bombardment mass spectrometry ; characterization of normal and variant human haemoglobins. *Biochem Biophys Res Commun* 130 : 84-90, 1985
- 5) Cottrell JS : Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res* 7 : 115-124, 1994
- 6) Anderson L, Anderson NG : High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5421-5425, 1977
- 7) Giometti CS, Barany M, Danon MJ, et al : Muscle protein analysis. II. Two-dimensional electrophoresis of normal and diseased human skeletal muscle. *Clin Chem* 26 : 1152-1155, 1989
- 8) Lemkin P, Merrill C, Lipkin L, et al : Software aids for the analysis of 2D gel electrophoresis images. *Comput Biomed Res* 12 : 517-544, 1979
- 9) Lipkin LE, Lemkin PF : Data-base techniques for multiple two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analyses. *Clin Chem* 26 : 1403-1412, 1980
- 10) Lemkin PF, Lipkin LE : GELLAB : A computer system for 2D gel electrophoresis analysis I. Segmentation of spots and system preliminaries. *Comput Biomed Res* 14 : 272-297, 1981
- 11) Anderson NL, Taylor J, Scandora AE, et al : The TYCHO system for computer analysis of two-dimensional gel electrophoresis patterns. *Clin Chem* 27 : 1807-1820, 1981
- 12) Toda T, Kimura N : Standardization of protocol for immobilized 2-D : PAGE and construction of 2-D PAGE protein database on World Wide Web home page. *Jpn J Electroph* 41 : 13-19, 1997
- 13) Von Eggeling F, Gawriljuk A, Fiedler W, et al : Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein pattern with standard image analysis software. *Int J Mol Med* 8 : 373-377, 2001
- 14) Kondo T, Seike M, Mori Y, et al : Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics* 3 : 1758-1766, 2003

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

あなたの患者になりたい

患者の視点で語る医療コミュニケーション

佐伯晴子

●四六判 頁128 2003年
定価1,260円(本体1,200円+税5%)
[ISBN4-260-12711-X]

「患者中心の医療」がいわれて久しいが、世の中には「医療不信」が蔓延している。信頼できる医療とは何か？ 患者が「この医師にかかりたい」と思うのはどんな時か？ 模擬患者団体の活動を通して医療・医学教育にかかわる著者が、自らの経験をもとに綴ったユニークな医療エッセイ集。あなた(医療者)は患者にこう見られている。