

- パ球的分化・生存の制御因子である. **第31回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/11 (2008).
25. 洲崎悦生, 中山啓子, 中山敬一: ノックインマウスを用いた p27 と p57 の機能的類似性と特異性の検討. **第31回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/11 (2008).
26. 弓本佳苗, 松本雅記, 中山敬一: 定量的プロテオミクスを用いた細胞周期を制御するユビキチンリガーゼ基質の網羅的同定. **第31回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/11 (2008).
27. 石田典子, 家村俊一郎, 夏目徹, 中山敬一, 中山啓子: 新規 RING-finger タンパク質は NAP1L1 のユビキチン化を介して細胞増殖を制御する. **第31回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/11 (2008).
28. 中山敬一, 弓本佳苗, 押川清孝, 松本雅記: プロテオミクスが拓く細胞周期研究の新地平: リン酸化とユビキチン化に関する網羅的解析. **第31回日本分子生物学会年会**. (シンポジウム) 神戸. 12/11 (2008).
29. 筑波隆幸, 柳川三千代, 門脇知子, 岡本美子, 岡元邦彰, 中山敬一, 山本健二: カテプシン E 欠損はオートファージの低下とそれに伴うミトコンドリア機能異常と酸化ストレスを引き起こす. **第31回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/12 (2008).
30. 白根道子, 細田将太郎, 中山敬一: Protrudin の脂質統合を介した神経機能制御への関与: Protrudin ノックアウトマウスからの知見. **第31回日本分子生物学会年会**. (シンポジウム) 神戸. 12/12 (2008).
31. 中山敬一: ユビキチン化による細胞周期のコントロールと胸腺腫瘍. **第28回日本胸腺研究会**. (特別講演) 福岡. 2/14 (2009).
32. Matsumoto, A., Susaki, E., Onoyama, I., Nakayama, K.I.: Cell cycle inhibitor p57 is essential for neural development. **3rd Global-COE International Symposium: Stem Cells and Regenerative Medicine**. (Invited speaker) Singapore. 2/16 (2009).
33. Nishiyama, M., Nakayama, K.I.: Epigenetic control of p53 function by CHD8 through recruitment of histone H1. **3rd Global-COE International Symposium: Stem Cells and Regenerative Medicine**. (Invited speaker) Singapore. 2/16 (2009).
34. 中山敬一: クロマチンリモデリングによるアポトーシスの回避機構. **平成20年度生理学研究所研究会: 細胞死研究の多面的、包括的理解に向けて**. (招待講演) 岡崎. 3/17 (2009).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
創薬バイオマーカー探索研究
研究分担者報告書
「創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用」
研究分担者 平野 久
横浜市立大学先端医科学研究センター副センター長・
大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻教授

【研究要旨】

質量分析装置(MS) 4機種を用いて iTRAQ 標識ペプチドを分析し、各機種で 1,554~1,834 種類のタンパク質を同定した。すべての装置で共通して検出されるタンパク質の数はかなり少なく、特定の装置でのみ検出されるタンパク質が多かった。4機種により全部で 3,570 種類のタンパク質を検出・同定することができた。この結果は、より網羅的にタンパク質を解析するためには複数種の MS を用いる必要があることを示している。次に、多数の微量タンパク質を MS で検出・同定するため、血漿中の高濃度タンパク質を効率的に低減する方法を検討した。その結果、中空糸膜カラムにより低減すれば、MS によって最も多数のタンパク質が同定できること、また、抗体アフィニティークラムを用いれば、最も簡便に高濃度タンパク質を低減できることがわかった。一方、iTRAQ/MS/MS 等を用いて検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のうち、アネキシン IV (ANX4) について、抗体、siRNA などを用いてバリデーションを行った結果、ANX4 を診断マーカーや創薬ターゲットとして利用できる可能性があることが明らかになった。

A. 研究目的

質量分析装置(MS)を用いて定量的なデフレーションディスプレイ分析を行うため、iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) 試薬が開発された (Ross et al. 2004)。iTRAQ 試薬は、質量の異なる低分子タグを含むペプチド標識試薬で、4種類または8種類の iTRAQ 試薬からなるキットが市販されている。異なる試料由来のタンパク質のプロテアーゼ消化物 (ペプチド) を試料ごとに異なる iTRAQ 試薬によって標識し、混合後、MS/MS により測定すれば、試料中に含まれるタンパク質の発現差異を解析することができる。iTRAQ 試薬と MS/MS を用いた方法は、疾患関連プロテオーム解析の新しい手法として注目されている。本研究では、iTRAQ 試薬で標識したペプチドを MS 4機種を用いて分析し、

どのMSが iTRAQ 試薬を用いた分析に適しているのか調べた。他方、血漿中のごく微量バイオマーカー候補タンパク質を検出するためには、アルブミンなど高濃度タンパク質の除去、低減が必要である。血漿中のタンパク質濃度のダイナミックレンジは10の9-10乗と大きい。そのため、血漿をそのままMSで分析すると高濃度タンパク質だけが検出されてしまい、微量なバイオマーカー候補タンパク質を検出することができない。高濃度タンパク質の除去が必要な理由はここにある。そこで本研究では、血漿中の高濃度タンパク質を除去するいくつかの方法を検討した。

一方、疾患プロテオーム解析では、バイオマーカー候補タンパク質のバリデーションが必要である。本研究では、抗体や siRNA 等を用いて卵巣明細胞腺癌関連タンパク質

のバリデーションを試みた。そして、検出された疾患関連タンパク質がバイオマーカーや創薬ターゲットとして利用できる可能性があるかどうか調べた。また、バイオマーカーを実用化するために解決しなくてはならない課題を明らかにしようとした。

B. 研究方法

1) 分析技術の検討

1.1) iTRAQ法を用いたタンパク質の定量的分析に適したMSの検討

MSの性能を比較するため、卵巣明細胞腺癌培養細胞のタンパク質をトリプシンで消化した後、iTRAQ試薬で標識し、ESI-Q/TOF MS (マイクロマス社、Premier およびアプライドバイオシステムズ社、QSTAR Elite)、MALDI-TOF/TOF MS (アプライドバイオシステムズ社、4800) 及びESI-Orbitrap MS (サーモ社、Orbitrap) の4機種を用いてナノLC-MS/MS解析を行った。

1.2) アルブミンなど血漿中に多量に存在するタンパク質低減方法の検討

最も効率的に血漿中の高濃度タンパク質を低減でき、かつ多数の微量タンパク質を検出・同定できる方法を明らかにするため、血漿中の高濃度タンパク質を限外濾過、抗体アフィニティー、中空糸膜カラム等によって低減した後、残存する微量タンパク質をMSによって分析した。

2) 疾患関連タンパク質のバリデーション

2.1) 卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のバリデーション

蛍光デファレンスゲル二次電気泳動とMS/MSあるいはiTRAQとMS/MSを用いて検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のうち、アネキシンIV (ANX4)のバリデーションを行った。抗ANX4抗体を用いて明細胞腺癌組織検体と培養細胞におけるANX4の発現を調べた。また、RT-PCR法によってANX4 mRNAの発現レベルを解析すると共に、発現を制御する遺伝子領域を解析した。さらに、

siRNAを用いたANX4遺伝子の発現抑制が癌細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

2.2) 血漿タンパク質中の疾患関連タンパク質の検出・同定

これまでに卵巣明細胞腺癌の組織及び培養細胞で検出されたタンパク質の発現変動を患者血漿中でもとらえることができるかどうか調べるため、血漿中の多量に存在するタンパク質を中空糸膜カラムで除去した後、マイクロボアLCによって7画分に分けた。各画分のタンパク質を還元S-カルボキシメチル化し、トリプシンで消化した。そして、得られたペプチドをナノ2D-LC-ESI-Q/TOF MSによって分析し、タンパク質の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取され、匿名化された検体を用いて研究を行った。

C. 研究結果

1) 分析技術の検討

1.1) iTRAQ法を用いたタンパク質の定量的分析に適したMSの検討

ESI-Q/TOF MS (2機種)、MALDI-TOF/TOF MS 及びESI-Orbitrap MSの性能を比較した。卵巣明細胞腺癌培養細胞のタンパク質をトリプシンで消化した後、iTRAQ試薬で標識し、4機種を用いてナノ2D-LC-MS/MS解析を行った。その結果、各機種で1,554~1,834種類のタンパク質を検出・同定することができた(図1)。すべての装置で共通して検出されるタンパク質の数はかなり少なく、特定の装置でのみ検出されるタンパク質の数が多かった。4機種を用いると全部で3,570種類のタンパク質を検出・同定することができた。いずれの装置も高い性能を有するが、1機種でタンパク質を網羅的に検出することはできなかった。

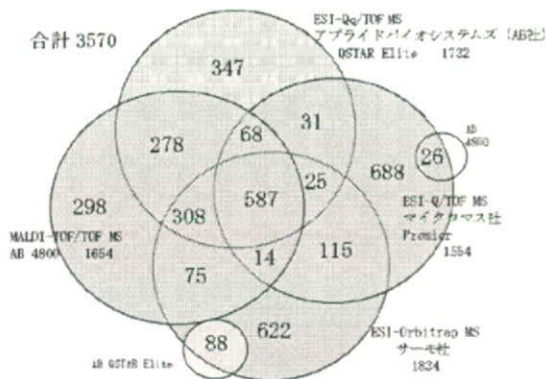


図1 MS 4機種による卵巣明細胞腺癌培養細胞タンパク質の分析結果

1.2) アルブミンなど血漿中に多量に存在するタンパク質低減方法の検討

血漿中の高濃度タンパク質を限外濾過、抗体アフィニティー、中空糸膜カラム等によって低減した後、MSによる分析を行い、最も効率的に高濃度タンパク質を低減でき、かつ多数の微量タンパク質を検出・同定できる方法を調べた。その結果、中空糸膜カラムの場合、約2,800、抗体アフィニティーカラムの場合には約2,200のタンパク質を同定することができた。また、中空糸膜カラムによる高濃度タンパク質の低減には2日、抗体アフィニティーカラムによる低減には半日かかった。限外濾過は、簡便ではあるが、MSにより同定されるタンパク質数は少なかった。

2) 疾患関連タンパク質のバリデーション

2.1) 卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のバリデーション

蛍光デファレンスゲル二次電気泳動/MS/MSやiTRAQ/MS/MSを用いて検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のうち、アネキシンIV (ANX4) のバリデーションを行った。ウエスタンブロッティングによってANX4は細胞株が異なっても明細胞腺癌であれば、多量に発現していることがわかった。また、ANX4 mRNAの発現も高まることが明らかになった(図2)。転写を制御する

遺伝子領域を特定したところ、そこにはp53結合配列が含まれていた。RNAiによりp53の発現を抑制するとANX4の転写活性が明細胞腺癌で低下した。一方、RNAiによりANX4遺伝子の発現抑制を行ったところ、明細胞腺癌細胞の増殖が顕著に阻害された。また、明細胞腺癌のタキサン系抗癌剤抵抗性が低下した。

2.2) 血漿タンパク質中の疾患関連タンパク質の検出・同定

これまでに卵巣明細胞腺癌の組織や培養細胞で40種類のタンパク質の発現変動を明らかにした。検出されたタンパク質の発現変動を患者血漿中でもとらえることができるかどうか調べた。血漿中の高濃度タンパク質を中空糸膜カラムで除去した後、マイクロボアHPLCによって7画分に分けた。そして、トリプシンで消化後、ナノ2D-LC-ESI-Q/TOF MSによって分析し、タンパク質の同定を試みた。この方法によって3,000近くの血漿タンパク質を同定することができたが、目的とするタンパク質を検出することはできなかった。

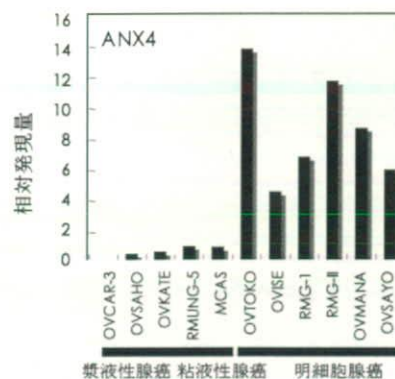


図2 卵巣癌サブタイプ各種細胞株におけるANX4 mRNAの相対発現量

D. 考察

卵巣明細胞腺癌培養細胞のタンパク質をトリプシンで消化した後、iTRAQ試薬で標識し、4機種を用いてナノLC-MS/MS解析を行った結果、すべての装置で共通して検出

されるタンパク質の数はかなり少なく、特定の装置でのみ検出されるタンパク質が多いことが明らかになった(図1)。4機種を用いると全部で3,570種類のタンパク質を検出・同定することができた。このことからタンパク質をより網羅的に検出するためには1台の装置では不十分で、複数の機種を利用することが必要であると考えられた。

本研究の結果から、中空糸膜カラムが最も効率的に、また、抗体アフィニティーカラムが最も簡便に血漿中の高濃度タンパク質を低減することができると考えられた。どちらの方法でも、低減処理後 HPLC で分画し、トリプシン消化後、ナノ 2D-LC-MS/MS で分析すれば、比較的短期間で 2,200~2,800 のタンパク質を検出・同定できることがわかった。

卵巣明細胞腺癌組織や培養細胞でアネキシンIV (ANX4) が多量に発現していることがわかった。また、ANX4 mRNA の発現も高まることが明らかになった。このタンパク質の発現は転写レベルでの制御を受けていた。転写を制御する遺伝子領域を特定したところ、そこには p53 結合配列が含まれていた。RNAi により p53 の発現を抑制すると ANX4 遺伝子の転写活性が明細胞腺癌で低下した。明細胞腺癌組織では P53 が活性化され、ANX4 遺伝子に結合して ANX4 遺伝子の転写を促進するものと推察された。一方、RNAi により ANX4 遺伝子の発現抑制を行ったところ、明細胞腺癌細胞の増殖が顕著に阻害された。明細胞腺癌は、抗癌剤に対する強い抵抗性を示す。siRNA による ANX4 遺伝子の発現抑制により明細胞腺癌のタキサン系抗癌剤抵抗性が低下した。これらの結果は、ANX4 は診断マーカーとしてだけでなく、創薬ターゲットとしても利用できる可能性があることを示している。

卵巣明細胞腺癌の組織や培養細胞で検出されたタンパク質の発現変動を患者血漿中でもとらえることができるかどうか調べた。

血漿タンパク質を 3,000 近く検出・同定できる中空糸膜カラムとナノ 2D-LC-ESI-Q/TOF MS を用いた方法によってタンパク質の検出を試みた。しかし、目的とするタンパク質を検出することはできなかった。今後、組織から漏出するごく微量の疾患関連タンパク質を濃縮する方法や、Multiple Reaction Monitoring (MRM) などを利用した新しい方法を開発する必要があると考えられる。

E. 結論

- 1) MS で検出・同定されるタンパク質は、機種が異なると必ずしもすべて同一ではない。従って、より網羅的にタンパク質を解析するためには複数の機種を用いる必要がある。
- 2) 血漿中の高濃度タンパク質を中空糸膜カラムか、抗体アフィニティーカラムによって低減すれば、多数の微量タンパク質を MS で検出・同定することができる。後者は前者より、同定されるタンパク質数は少ないが、簡便である。
- 3) iTRAQ/MS/MS 等を用いて検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のバリデーションを行った。ANX4 のようなタンパク質は、診断マーカーとして、また創薬ターゲットとして利用できる可能性がある。
- 4) 癌組織や培養細胞で見いだされたバイオマーカー候補タンパク質を血漿中で検出するのは容易でない。新しい分析技術の開発が必要である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

Itoh, A., Kurisaki, A., Yamanaka, Y., Hirano, H., Fukuda, H., Sugino, H., Asashima, M. Proteomic analysis of

- membrane proteins expressed specifically in pluripotent stem cells. *Proteomics* 9, 126-137, 2009.
- Kato, Y., Arakawa, N., Mashuishi, Y., Kawasaki, H. and Hirano H. Mutagenesis of longer inserts by the ligation of two PCR fragments amplified with a mutation primer. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 95-97, 2009.
- Kobiyama, K., Takeshita, F., Ishii, K. J., Koyama, S., Aoshi, T., Akira, S., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yamanaka, Y., Hirano, H., Suzuki, K. and Okuda, K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J. Immunol.* 182, 1593-1601. 2009.
- Kawasaki, H., Okayama, A., Iwafune, Y., Yahagi, S., Arakawa, N. and Hirano, H. Multiplex detection and identification of proteins on a PVDF membrane blocked with a synthetic polymer-based reagent. *Electrophoresis* 29, 4377-4380, 2008.
- Nakamura, K. and Hirano, H. Japan HUPO for promotion of global collaborations in human proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 2486-2487, 2008.
- 平野 久 タンパク質のアミノ酸配列と翻訳後修飾の分析, やさしい原理からはいるタンパク質化学実験法, 長谷俊治, 高尾敏文, 高木淳一編, 化学同人, 京都, 印刷中.
- 平野 久 医学略語辞典, 橋本信也監修, 中央法規, 東京, 印刷中.
- 平野 久 分子細胞生物学辞典第2版, 村松正實編集代表, 東京化学同人, 東京, p. 1201, 2008.
- 平野 久 タンパク質の翻訳後修飾, タンパク質の事典, 猪飼 篤, 伏見 譲, ト部 格, 上野川修一, 中村春木, 浜窪隆雄編, 朝倉書店, 東京, pp. 621-627, 2008.
2. 学会発表
- 平野 久 プロテオミクスによる疾患関連タンパク質の解析 富士フィルム講演会 (2月, 小田原) 2009.
- 平野 久 プロテオミクス研究の変遷, 将来への課題 バイオテクノロジー研究開発動向に関する調査委員会講演会 (2月, 経済産業省, 東京) 2009.
- 平野 久, 倉田洋一, Islam, N., 森 司 プロテオーム解析による食品安全性評価 日本農芸化学会講演会 (3月, 福岡国際会議場, 福岡) 2009.
- Arakawa, N., Masuishi, Y., Kawasaki, H., Miyagi, E., Hirahara, F. and Hirano, H. Proteomic analysis for identification of therapeutic targets of ovarian clear cell carcinoma. The joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science and 4th Asian-Oceania Human Proteome Organization (6月, Cairns) (Cairns, Australia) 94, 2008.
- Arakawa, N., Masuishi, Y., Yamanaka, Y., Kawasaki, H., Miyagi, E., Hirahara, F. and Hirano, H. New potential therapeutic targets for ovarian clear cell carcinoma. The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (8月, 北海道大学学術交流会館, 北海道) 169, 2008.
- 古野正朗, 薮上春香, 丸山光一, 山中結子, 平野 久, 林崎良英 細胞の分化過程における転写後調節の解析 第10回RNA学会年会 (7月, 札幌コンベンションセンター, 札幌) 2008.
- 古野正朗, 薮上春香, 丸山光一, 山中結

- 子, 平野 久, 林崎良英 細胞の分化過程における転写後調節の解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 771, 2008.
- 平野 久 蛋白質の翻訳後修飾. 大阪大学蛋白質研究所セミナー (1月, ホテル阪急エキスポパーク, 吹田) 2008.
- 平野 久 nanoLC-MS/MSによるバイオマーカー, 創薬ターゲットの探索 日本薬学会第128年会 (3月, パシフィコ横浜, 横浜) 150, 2008.
- 平野 久 プロテオーム研究の動向 第8回日本蛋白質科学会年会 (6月, タワーホール船堀, 東京) 33, 2008.
- 平野 久, 荒川憲昭, 増石有佑, 田矢志織, 山中結子, 宮城悦子, 平原史樹 ゲノムからプロテオームへ 第98回総会日本病理学会 (11月, 松山) 日本病理学会誌 97(2), 20, 2008.
- 平野 久 プロテオーム研究の動向, 特に疾患プロテオミクスを中心として アステラス製薬講演会 (9月, つくば) 2008.
- 平野 久 バイオマーカー/創薬ターゲット探索のプロテオミクス メディカル・プロテオスコープ講演会 (3月, 東京) 2008.
- 平野 久 翻訳後修飾異常と疾患 アプライドバイオシステムズセミナー (11月, 東京, 大阪) 2008.
- 平野 久 蛋白質複合体の翻訳後修飾とその機能解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 2008.
- Hirano, H. Proteomic approach to discover biomarkers and therapeutic targets. The 13th Joint Biophysics Conference (5月, Nantou, Taiwan) 20, 2008.
- Hirano, H., Arakawa, N., Kawasakli, H., Masuishi, Y, Takahashi, E., Yahagi, S., Yamanaka, Y., Miyagi, E. and Hirahara, F. Identification and validation of ovarian cancer-associated proteins. The joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science and 4th Asian-Oceania Human Proteome Organization (6月, Cairns) 72, 2008.
- Hirano, H. Proteomics for co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. 2008 Taiwan-Japan Proteomics Symposium (12月, Taipei) 83, 2008.
- 石出真有美, 林 晋平, 山中結子, 村山真紀, 浅見忠男, 篠崎一雄, 平野 久, 平山隆志 新規 ABA 関連遺伝子座の探索と ABA 関連因子の機能解析の試み 第50回植物生理学会年会 (3月, 名古屋大学, 名古屋) 2009.
- 泉奈津子, 山下暁朗, 鹿島 勤, 勝畑有紀子, 村松玲子, 倉田理恵, 平野 久, 大野茂男 SMG-1:Upf1:eRF1:eRF3(SURF)複合体はナンセンス mRNA の翻訳終結複合体として mRNA 上で形成される 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 778, 2008.
- Kamita, M., Kamp, R. M. and Hirano, H. N-Terminal acetylation of ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and its function. The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (8月, 北海道大学学術交流会館, 北海道) 132, 2008.
- 加藤 悠, 川崎博史, 平野 久 Bud32p 複合体は出芽酵母二倍体において出芽マーカーの局在決定に関与している. 第8回日本蛋白質科学会 (6月, タワーホール船堀, 東京) 90, 2008.
- Kawasaki, H., Arakawa, N. and Hirano, H.

- Protein identification and quantification using a proteome database of liquid chromatography-mass spectrometric data. The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (8月, 北海道大学学術交流会館, 札幌) 119, 2008.
- 風巻玲子, 中村浩規, 山中結子, 平山隆志, 平野 久 シロイヌナズナカルス再分化におけるタンパク質リン酸化の変動. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 535, 2008.
- Kurata, Y., Mori, T., Yamanaka, Y. and Hirano, H. GH transgenic salmon proteomics. The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (8月, 北海道大学学術交流会館, 札幌) 122, 2008.
- Li, X., Chi, X., Tan, J. Z., Sun, B., Yuan, H. and Hirano, H. Differential proteome analysis of salt stress responses in mulberry by two-dimensional electrophoresis. The 6th China International Silk Conference and the 2nd International Textile Forum (9月, 蘇州) 58-62, 2007.
- 増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久 卵巣明細胞腺癌特異的なアネキシンIV遺伝子の発現に関わる転写制御因子の同定. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 300, 2008.
- 南里智洋, 小菅友里, 杉山さとみ, 小島尚, 平野 久, 犬尾千聡, 高増哲也, 栗原和幸, 板垣康治 キウイアレルギーの解析と医療への展開, 日本社会薬学会 第27年会(9月, 昭和大学薬学部, 東京) 2008.
- Nanri, T., Sugiyama, S., Kosuge, Y., Itagaki, Y. and Hirano, H. Epitope analysis of kiwi fruit allergen actinidin. The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, (8月, 北海道大学学術交流会館, 札幌) 174, 2008.
- 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 川崎博史, 平野 久 レドックスプロテオミスによる血管型NADPHオキシダーゼの標的タンパク質の探索. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 536, 2008.
- 志村直樹, 川崎博史, 成戸卓也, 今川智之, 森 雅亮, 横田俊平, 平野 久 川崎病のプロテオーム解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(12月, 神戸ポートアイランド, 神戸) 828, 2008.
- Shinya, T., Osada, T., Desaki, Y., Hatamoto, M., Yamanaka, Y., Hirano, H. and Shibuya, N. Use of biotinylated ligands for the characterization of plant receptors. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (8月, Tampere, Finland) 2008.
- 高橋枝里, 岡村匡史, 井狩高平, 平野 久, 安田和基, 鎬木康志 LEA/Sendai ラット血清のプロテオーム解析. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(5月, 東京国際フォーラム, 東京) 129, 2008.
- Takahashi, E., Okamura, T., Ikari, K., Hirano, H., Yasuda, K. and Kaburagi, Y. Proteomic analysis of serum from diabetic LEA/Sendai rats. The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis (8月, 北海道大学学術交流会館, 札幌) 173, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

電気泳動ゲルのタンパク質を固定化し、
質量分析できる膜フィルター（申請予定）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」

分担研究者 山田哲司 国立がんセンター研究所化学療法部 部長

研究要旨

国立がんセンターで臨床検体の定量的なタンパク質発現の網羅的解析に特化して開発された 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)法はハイスループットなショットガンプロテオミクス手法である。本年度は切除不能膵がん患者血漿を用い、ゲムシタビンによる化学療法副作用マーカーを同定した。2DICAL ではタンパク質検体を同位元素で標識することなく、1 台の LC-MS で月間約 100 症例の定量解析可能であり、統計学的に十分な症例数の解析が必要な臨床プロテオーム研究に適している。プロテオームリサーチセンターにこの手法を導入することで新規バイオマーカーの開発が促進されることが期待される。

A, 研究目的

膵がんは主要な固形がんの中では最も予後が不良で、その 5 年生存率は 10%に達しない（地域がん登録共同調査）。わが国で 1 年間に 2 万人の方が膵がんのために死亡し、がんによる死亡原因の第 5 位となっており（平成 16 年度厚生労働省「人口動態統計」）、今後あらたな治療法の開発が求められている。

切除不能膵がんに対する標準的治療はゲムシタビン単剤による化学療法であるが、ゲムシタビン治療における主な毒性である好中球減少症と血小板減少症は場合によっては致命的な有害事象につながる可能性があるため、ゲムシタビンによる血液毒性を治療前に予測できるような信頼性の高いバイオマーカーが必要とされている。

われわれが開発した 2DICAL 法は、複数のスペクトラムからなる LC-MS (Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)データを、各スペクトラムの相関係数から LC の時間変動を補正して、質量

電荷比、保持時間の 2 軸を持つ平面に描出する手法であり、これにより複数サンプル間での無標識定量比較を可能にした。この技術の開発により、LC-MS の膨大なピークデータから効率よくかつ定量的に多数検体解析が可能となり、臨床応用可能性があるバイオマーカー探索が可能となった。

今回 2DICAL 法を用い、ゲムシタビン単剤による化学療法を受けた進行膵がん患者の内、血液毒性の両極端な症例群の治療前血漿プロテインプロファイルを解析し、ゲムシタビンによる血液毒性を予測するバイオマーカーを探索した。

B, 研究方法

ゲムシタビン単剤による化学療法を受けた進行膵がん患者の内、強い副作用があった 25 例と副作用のなかった 22 例の治療前血漿サンプルを用いた。

前処理法には Beckman Coulter 社（現 Sigma 社）の IgY-12 High Capacity Spin Column® を用い、

12種類の血漿アバンドントタンパクを分離除去した。その flow through として得られたそれら以外のタンパクを含む分画をトリプシン処理し、nanoLC-TOF-MSにて測定し、2DICAL法にて解析を行った。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が漏出することが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮したがん患者の血漿血清検体を用いた。

C、研究結果

2DICAL法を用い、血液毒性の両極端な症例群(強い副作用あり:25例、副作用なし:22例)の治療前血漿プロテインプロファイルを解析し、検出された60,888ピークの中で統計学的に最も高度の有意性をしめしたペプチドピークのアミノ酸配列がハプトグロビン由来であることを同定した。さらに発現量の差をWestern Blotで確認した。

治療前血液ハプトグロビン値、治療前好中球数・血小板数、体表面積を用いた血液毒性予測モデル(ノモグラム)を構築した。このモデルの臨床的有用性は3つの独立したコホート合計305症例において再現性良く確認され、切除不能膵がん患者におけるゲムシタビンによる血液毒性の予測バイオマーカーとして血中ハプトグロビン値が有用なマーカーであることを示した。

D、考察

ショットガンプロテオミクスにおいては、たんぱく質がトリプシン処理された膨大なペプチドデータとなるため、同位体標識等することにより、小数のサンプル比較を精密に行うことが解析の主体であった。一方、多数検体の処理を必要とする臨床検体の解析はショットガンプロテオミクスにおいては不得手な領域であった。

国立がんセンター研究所化学療法部で開発したLC-MSデータ解析システム2DICAL法は検体を標識する必要がなく、血漿(血清)や組織などの臨床検体の解析が可能である。1台のLCMSで月間約100症例が解析可能であり、統計学的に十分な症例数の解析が必要な臨床プロテオーム研究に適している。

またTandem mass spectrometry (MS/MS)が必要なcICAT法やiTRAQ法では、Q-Star Eliteのような最新機種を使用する必要があるが、2DICAL法はMSで検出するため、一世代古い機種であるQ-Star XLでも十分な感度が得られ、プロテオームリサーチセンターで整備された施設が活用できる。プロテオームリサーチセンターにこの手法を導入することで新規バイオマーカーの開発が促進されることが期待される。

E、結論

切除不能膵がん患者におけるゲムシタビンによる血液毒性の予測バイオマーカーとして血中ハプトグロビン値が有用なマーカーであることを示した。

F、健康危険情報

特になし

G、研究発表

1、論文発表

1: Matsubara J, Ono M, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, Furuse J, Furuta K, Sugiyama E, Saito Y, Kaniwa N, Sawada J, Honda K, Sakuma T, Chiba T, Saijo N, Hirohashi S, Yamada T. Identification of a predictive biomarker for hematological toxicities of gemcitabine. *J Clin Oncol*. In press.

2: Negishi A, Ono M, Handa Y, Kato H, Yamashita K, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Omura K, Hirohashi S, Yamada T.

Large-scale quantitative clinical proteomics by label-free liquid chromatography and mass spectrometry.

Cancer Sci. In press.

3: Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.
Regulation of Wnt signaling by the nuclear pore complex.

Gastroenterology. 2008 Jun;134(7):1961-71.

4: Yamaguchi U, Nakayama R, Honda K, Ichikawa H, Hasegawa T, Shitashige M, Ono M, Shoji A, Sakuma T, Kuwabara H, Shimada Y, Sasako M, Shimoda T, Kawai A, Hirohashi S, Yamada T.
Distinct gene-expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor.

J Clin Oncol. 2008 Sep 1;26(25):4100-8.

5: Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige K, Yamaguchi U, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T.

Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas.
Clin Cancer Res. 2008 Sep 1;14(17):5348-56.

6: Shitashige M, Hirohashi S, Yamada T.

Wnt signaling inside the nucleus.

Cancer Sci. 2008 Apr;99(4):631-7.

7: 尾野雅哉、佐藤礼子、下重美紀、本田一文、山田哲司

癌診断治療のバイオマーカー

Cancer Frontier 2008 10:14-20.

8: 佐藤礼子、下重美紀、本田一文、山田哲司

プロテオミクスによる治療標的分子の探索

鶴尾隆[編] がんの分子標的治療 南山堂
2008.

2、学会発表

9th European Congress of Neuropathology,
Athens, Greece, 8-10 May 2008

Clinicopathologic significance of dysadherin and E-cadherin expression in meningiomas: immunohistochemical analysis of 61 cases

E. Chikui, Y. Nakanishi, Y. Narita, Y. Miyakita, S. Shibui, A. Maeshima, T. Yamada, Y. Kanail, N. Saito and S. Hirohashi

The joint 4th Asia-Oceania Human Proteome Organization (4th AOHUPO)/2nd Pacific-Rim International Conference on Protein Science (2nd PRICPS) symposium

Cairns Convention Center, June 22-26, 2008

Tesshi Yamada

Cancer Proteomics for the Identification of Biomarkers and Therapy Targets

German-Japanese Workshop in Basic Cancer Research

DKFZ, Conference Center, Heidelberg, Germany, July 10-11, 2008

Tesshi Yamada

From Cancer Genetics to Functional Proteomics

36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (ISOBM2008)

October 5-9, 2008 Inter Continental TOKYO BAY (Tokyo)

Tesshi Yamada

Proteomic Approaches to Biomarker and Therapy Target Discovery for Colorectal Cancer

2008 Taiwan-Japan Proteomics Symposium
December 3-5, 2008
International Conference Hall, Academia Sinica,
Taipei, Taiwan
Tesshi Yamada
Biomarkers of Pancreatic Cancer Identified by
Large-scale Proteomics

第4回日本臨床プロテオーム研究会

平成20年(2008年)5月10日

大阪国際交流センター

根岸 綾子、尾野 雅哉、小村健、山田哲司
ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた舌扁平上皮癌のバイオマーカーの探索

尾野 雅哉、根岸 綾子、松原淳一、村越雄介、本田一文、下重美紀、山田哲司

2DICALによる修飾タンパク質バイオマーカーの発見

本田 一文、尾野 雅哉、山田哲司
膵がん血漿診断マーカーの多施設共同検証

工藤翔二教授退官記念ならびに弦間昭彦教授就任祝賀会記念講演会

平成20年(2008年)5月24日(土)

特別講演 山田哲司

ゲノム・プロテオーム研究から臨床応用へ

第60回日本細胞生物学会大会

平成20年(2008年)6月

「がん浸潤・転移に対するアクチン結合たんぱく質アクチニン-4の生物学的機能」

本田 一文、山田 哲司

日本ヒトプロテオーム機構第6回大会

平成20年(2008年)7月29-30日

血漿早期膵がんマーカーの多施設共同検証

本田一文、尾野雅哉、山田哲司

切除不能膵がんに対するゲムシタビン単剤療法の副作用・効果・予後の各予測マーカーの開発
松原淳一、尾野雅哉、古瀬純司、上野秀樹、奥坂拓志、古田 耕、杉山永見子、斎藤嘉朗、鹿庭なほ子、澤田純一、千葉 勉、西條長宏、広橋説雄、山田哲司

2008年(平成20年)8月26日「プロテオミクスの最新技術」に関するプレカンファレンスワークショップ

招待講演 山田哲司

バイオマーカー開発を目的とした大規模臨床プロテオーム解析

2008年(平成20年)8月28日

第19回日本消化器癌発生学会総会
教育講演

山田哲司

大腸発がん機構のプロテオーム解析

2008年(平成20年)9月3日聖マリアンナ医科大学 外科グランドラウンド

山田哲司

ゲノム・プロテオームによる癌の診断と治療法の開発

2008年(平成20年)10月4日北海道大学腫瘍病理学セミナー

山田哲司

大規模プロテオーム解析とその臨床応用

2008年(平成20年)10月18日

平成20年度厚生労働省がん研究助成金によるシンポジウムと市民公開講座

山田哲司

プロテオミクス解析に基づく個別化

2008年(平成20年)10月27日
第28回日本分子腫瘍マーカー研究会
山口洋、本田一文、山田哲司
胃原発消化管間質腫瘍の予後予測マーカーの有用性検討

2008年(平成20年)10月27日
第67回日本癌学会学術総会
Kazufumi Honda, Satoru Kikuchi, Hitoshi Tsuda, Nobuyoshi Hiraoka, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Tesshi Yamada 「Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas」

Miki Shitashige, Reiko Satow, Takafumi Jigami, Kazufumi Honda, Setsuo Hirohashi, Tesshi Yamada 「Regulation of Wnt Signaling by the Nuclear Pore Complex」

Ayako Negishi, Masaya Ono, Setsuo Hirohashi, Ken Omura, and Tesshi Yamada 「Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue of squamous cell carcinoma of the tongue」

Junichi Matsubara, Masaya Ono, Junji Furuse, Hideki Ueno, Takuji Okusaka, Nahoko Kaniwa, Junichi Sawada, Tsutomu Chiba, Teruhiko Yoshida, Nagahiro Saijo, Setsuo Hirohashi, and Tesshi Yamada 「Identification of a biomarker that predicts hematological adverse events associated with gemcitabine treatment」

Tesshi Yamada 「Combined functional genomics and proteomics toward the identification of therapeutic targets for colorectal cancer」

Umio Yamaguchi, Robert Nakayama, Kazufumi Honda, Hitoshi Ichikawa, Tadashi Hasegawa, Yasuhiro Shimada, Mitsuru Sasako, Tadakazu Shimoda, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, and Tesshi Yamada 「Distinct Gene-expression-defined Classes of Gastrointestinal Stromal Tumor」

Sohei Yamamoto, Hitoshi Tsuda, Kazuhumi Honda, Masashi Takano, Tesshi Yamada, Osamu Matsubara 「The actinin-4 may be an oncogene in 19q13 region in human ovarian cancers」

Murakoshi Y, Ono M, Sasazuki S, Negishi A, Honda K, Tsuchida A, Tsugane S, Hirohashi S, Yamada T. 「Large-scale plasma proteomics of colorectal cancer」

Reiko Satow, Miki Shitashige, Kazufumi Honda, Setsuo Hirohashi, Tesshi Yamada 「Combined functional genomic survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma」

H, 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
発明の名称:「 α -アクチニン-4 遺伝子のコピー数または発現レベルを指標とした癌の診断法」

発明者: 本田一文、山田哲司、廣橋説雄、稲澤譲治、井本逸勢、津田均、山本宗平、高野政志

出願日: 2008年7月2日

出願番号: 特願2008-173469(国内出願)

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称: 「ゲムシタピン治療による副作用の出現リスク検定方法」

発明者: 山田哲司、尾野雅哉、松原淳一、上野秀樹、西條長宏、廣橋説雄

出願日: 2008年10月17日

出願番号: 特願特願2008-268592(国内出願)

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：「水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対する高親和性モノクローナル抗体」

発明者：能勢博、橋口朋代、尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

出願日：2008年10月14日（実施例追加12月25日）

出願番号：特願2008-264742（国内出願）特願2008-330745（実施例追加）

出願人：株式会社トランスジェニック、国立がんセンター総長

発明の名称：「膵臓癌の検出法」

発明者：本田一文、山田哲司、廣橋説雄

出願日：2009年1月30日

出願番号：特願特願2009-019920（国内出願）

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2、実用新案登録

なし

3、その他

なし



Megakaryocyte potentiating factor as a tumor marker of malignant pleural mesothelioma: Evaluation in comparison with mesothelin

Kota Iwahori^{a,b}, Tadashi Osaki^{a,*}, Satoshi Serada^b, Minoru Fujimoto^b, Hidekazu Suzuki^c, Yoshiro Kishi^d, Akihito Yokoyama^e, Hironobu Hamada^f, Yoshihiro Fujii^d, Kentaro Yamaguchi^g, Tomonori Hirashima^c, Kaoru Matsui^c, Isao Tachibana^a, Yusuke Nakamura^h, Ichiro Kawase^a, Tetsuji Naka^b

^a Department of Respiratory Medicine, Allergy, and Rheumatic Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Laboratory for Immune Signal, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

^c Department of Thoracic Malignancy, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, 3-7-1 Habikino, Habikino, Osaka 583-8588, Japan

^d Department of Research and Development, Ina Institute, Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd., 1063-103 Terasawaoka, Ina, Nagano 396-0002, Japan

^e Department of Hematology and Respiratory Medicine, Kochi University, 185-1, Okohchou-kohatu, Nanngoku, Kochi 783-8505, Japan

^f Department of Integrated Medicine and Informatics, Ehime University Graduate School of Medicine, Sizukawa, Ohonn, Ehime 791-0295, Japan

^g Department of Product Development, Ina Institute, Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd., 1063-103 Terasawaoka, Ina, Nagano 396-0002, Japan

^h Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Received 30 October 2007; received in revised form 30 January 2008; accepted 14 February 2008

KEYWORDS

Mesothelioma;
Megakaryocyte
potentiating factor;
Mesothelin;
Tumor markers

Summary

Purpose: An early and reliable blood test is one deficiency in diagnosis of malignant pleural mesothelioma (MPM). Megakaryocyte potentiating factor (MPF) and mesothelin variants (MSLN), members of the mesothelin gene family, have been studied as candidate serum markers for MPM. We developed a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system to compare the diagnostic efficacy of MPF and MSLN in MPM and control groups.

Experimental design: MPF and MSLN were assayed with ELISA in 27 consecutive MPM patients and 129 controls including patients with lung cancer and asymptomatic asbestos-exposed subjects.

Abbreviations: MPM, malignant pleural mesothelioma; MPF, megakaryocyte potentiating factor; MSLN, mesothelin variants 1 and 3; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3833; fax: +81 6 6879 3839.

E-mail address: osaki@imed3.med.osaka-u.ac.jp (T. Osaki).

Results: Statistically significant elevation of serum MPF and MSLN levels was noted in MPM patients in comparison with every control group. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) was calculated for differentiation of MPM and lung cancer, healthy asbestos-exposed subjects, and healthy adults. While the AUC for serum MPF was 0.879, cut-off = 19.1 ng/ml (sensitivity = 74.1%, specificity = 90.4%), the AUC for serum MSLN was 0.713, cut-off = 93.5 ng/ml (sensitivity = 59.3%, specificity = 86.2%). Comparison between AUC for MPF and MSLN values shows that MPF is significantly superior to MSLN ($p = 0.025$). Finally, there was a significant correlation between MPF and MSLN values for MPM (Pearson's correlation coefficient = 0.77; $p < 0.001$).

Conclusions: These findings suggest that diagnostic value of MPF for MPM was better than that of MSLN although both markers showed almost equal specificity for MPM.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive tumor arising from mesothelial cells of serosal cavities. MPM may be asymptomatic at an early stage and is sometimes discovered by routine chest radiography. Common symptoms include chest pain and dyspnea, which are caused by tumor invasion of the chest wall or pleural effusion, and occur late during the disease progression. Although pemetrexed improves survival of unresectable MPM patients, overall median survival is only 12.1 months [1]. MPM is thought to be curable by early radical resection in combination with adjuvant chemoradiotherapy [2]. Even if surgical resection is not applicable, the early use of chemotherapy offers a prolonged period of symptom control and survival. MPM is often associated with past exposure to asbestos. There is a long latency period, often exceeding 20 years, between first exposure to asbestos and diagnosis of MPM [3]. The number of deaths from MPM is expected to increase in the next 20 years in Europe, Japan and Australia, where heavy use of asbestos has occurred [3–6]. There is thus a growing need for sensitive markers that can detect MPM in people at risk for this disease.

A 40-kDa membrane-bound mesothelin and a 31-kDa soluble megakaryocyte potentiating factor (MPF) originate from the same 69-kDa glycosyl-phosphatidylinositol-linked (GPI) glycoprotein precursor [7]. Mesothelin comprises three soluble forms of variants (MSLN). Variant 1 is a predominant mRNA expressed by both normal and tumor cells and its product is detectable in the ascites from ovarian cancer patients. It is thought to be proteolytically cleaved from the cell surface. Soluble variant 3 was detected as a small percentage of total mesothelin products from cell lines and tissues [8,9].

Scholler et al. prepared a monoclonal antibody, OV569, by immunizing mice with ovarian carcinoma cells. OV569 identified a 42- to 45-kDa protein with an N-terminal amino acid sequence identical to that of the membrane-bound portion of mesothelin and MPF, which was designated as soluble mesothelin related proteins (SMRP) [10]. A study utilizing OV569 showed an increase in SMRP concentrations in 37 of 44 patients (84%) with MPM [11]. The commercial assay kit for SMRP is designed to recognize the sequence within membrane-bound mesothelin and thus to measure mesothe-

lin variants 1 and 3 [9]. SMRP is, therefore, identical to MSLN [11].

Later, Shiomi et al. showed that MPF is also secreted into the blood of mesothelioma patients and that the median levels of MPF in those patients were substantially elevated than in those in controls [12]. Onda et al. reported that serum MPF was elevated in 91% (51 of 56) of patients with mesothelioma and that measuring MPF may be useful for monitoring the response of mesothelioma to treatment [13]. Mesothelin variants and MPF thus appear to be promising targets for MPM diagnosis.

However, it has not yet been established whether MPF or MSLN is a more effective marker for differential diagnosis of MPM. To this end, we generated monoclonal antibodies (mAb) and prepared two enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) systems that each recognizes MPF or MSLN. In this paper we report the results of our studies comparing the discriminatory potency of MPF with that of MSLN for diagnosis of MPM.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

Serum samples were collected from 27 consecutive patients with non-resectable MPM, whose diagnosis was confirmed by cytological or histopathological examination by pathologists skilled in diagnosis of this disease. The patient population included 13 with epithelial type MPM, three with sarcomatoid type, 5 with mixed type and 6 with unclassified type (diagnosed by cytological analysis). For control, we used 47 patients with lung cancer, 35 with other cancers (18 ovarian, 8 stomach and 9 colon cancers), 9 asbestos-exposed asymptomatic subjects and 38 healthy adults without a history of asbestos exposure. We obtained written and oral informed consent from all participants. This study was approved by our institutional review board.

2.2. Antigen preparation

Recombinant MPF protein was produced by amplifying the part coding for amino acids 1–288 from the cDNA encoding the transcript variant 1 for human mesothelin (Genbank accession no. NM_005823) with DNA polymerase

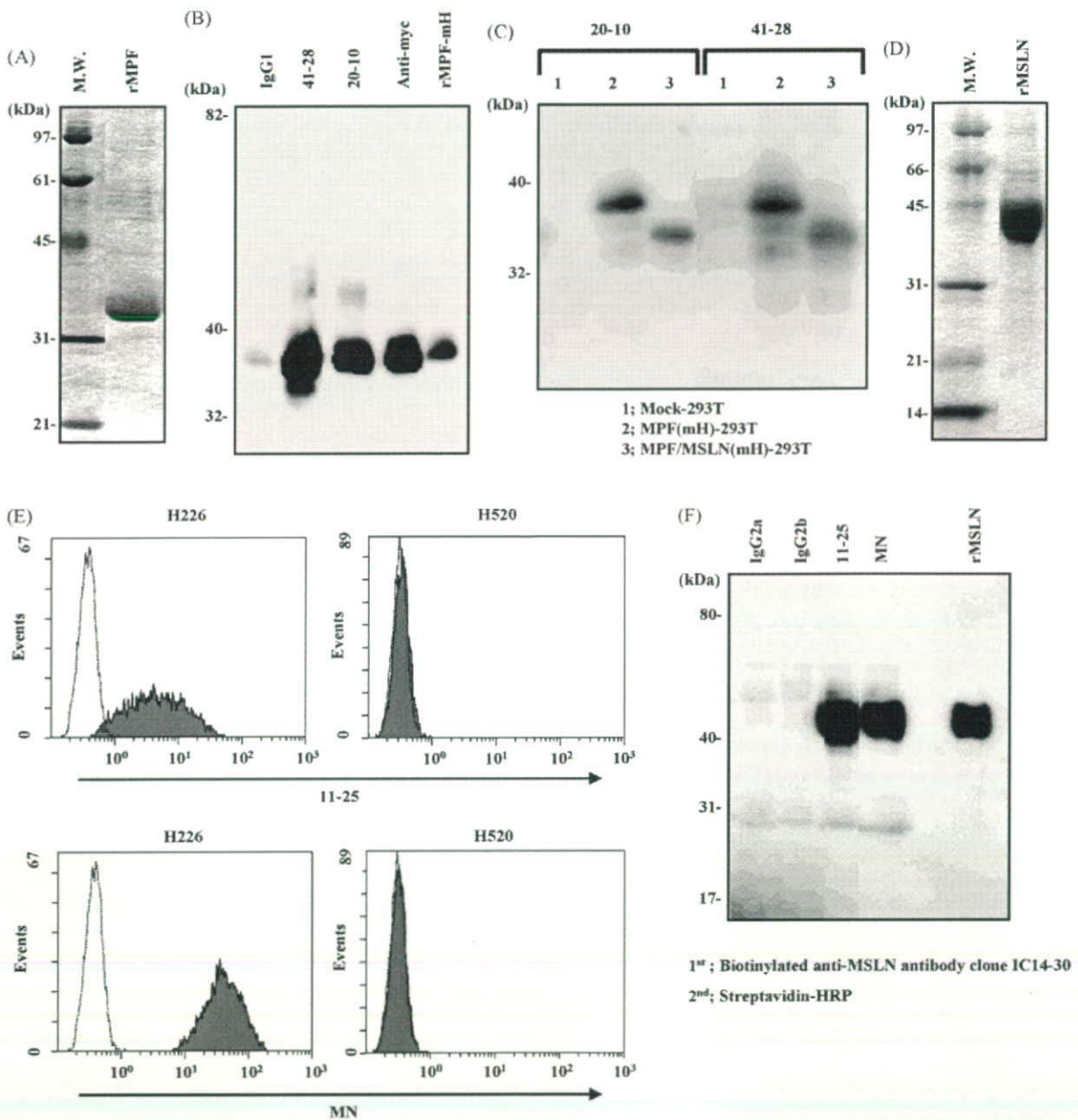


Fig. 1 Characterization of anti-Megakaryocyte potentiating factor (MPF) and anti-mesothelin variants (MSLN) antibodies. (A and D) Purity of the prepared recombinant MPF (A) and MSLN (D) proteins for immunization. Proteins were electrophoresed under reduced condition and stained with Coomassie Brilliant Blue. (B and F) Reactivity of anti-MPF antibodies to recombinant MPF protein (B) or anti-MSLN antibodies to MSLN in the culture supernatant of NCI-H226 cells (F). Anti-MPF antibodies (B, lanes 41–28 and 20–10) or anti-MSLN antibodies (F, lanes 11–25 and MN) were used for immunoprecipitation. Recovered proteins were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were probed with anti-myc antibody for myc-His tagged MPF or anti-MSLN antibody clone IC14–30 for MSLN, respectively, and followed by development. Recombinant MPF protein (B, lane rMPF-mH) or recombinant MSLN protein (F, lane rMSLN) were applied for positive controls. (C), western blot analysis of anti-MPF antibodies. Supernatants of the HEK 293T transfectants with myc-His tagged MPF, full length of mesothelin variant 1 or mock vectors were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to a PVDF membrane. The membrane was probed with anti-MPF antibodies (20–10 and 41–28), incubated with HRP-labeled anti-mouse IgG antibody and followed by chemiluminescence. Lane 1, Mock-transfected 293T; lane 2, myc-His tagged MPF-transfected 293T; lane 3, full length of mesothelin variant 1-transfected 293T. (E), expression of mesothelin on the surface of lung cancer cell lines. NCI-H226 and NCI-H520 were incubated with anti-MSLN antibodies (11–25 and MN) or an isotype-matched control antibody and followed by PE-conjugate anti mouse IgG. Antigen expression was detected by flow cytometry.

(recombinant Taq polymerase; Takara Bio Inc., Shiga, Japan) and using the primers 5'-CGGAATTCGCCGCCACC-ATGGCCTTGCCAACGGCTCGACCCCTGTTG-3' and 5'-GCTCT-AGAGATGGTCCGTTCCAGGCTGCCGCCAGGATGG-3'. The amplified DNA was inserted into the EcoRI/XbaI site of mammalian expression plasmid pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen, Carlsbad, CA) and transfected into HEK 293T cells by lipofection (Lipofectamine2000; Invitrogen). The culture supernatant was applied to a TALON resin according to the manufacturer's instructions (Clontech, Mountain View, CA). The purified MPF protein thus obtained was dialyzed with 4.0 liter of PBS twice and kept frozen at -80°C until use as an immunogen or as a standard polypeptide for sandwich ELISA. Purity of the recombinant MPF was confirmed by Coomassie Brilliant Blue staining after electrophoresis under reduced condition (Fig. 1A).

MSLN was produced by amplifying the part coding for amino acids 297–580 of the same cDNA and using the primers 5'-AAATTTCCCAAGCTTGTGGAGAAGACAGCCTGTCCTTCAG-GCAAG-3' and 5'-AAGGAAAAAAGCGCCGCGCCCTGTAGCC-CCAGCCCCAGCGTGTCCAG-3'. The amplified DNA was inserted into the HindIII/NotI site of expression vector pSecTag2B (Invitrogen). It should be noted that variants 1 and 3 of mesothelin share amino acids 297–580 of clone NM_005823 as a common sequence. The plasmid DNA was transfected into HEK 293T cells, and recombinant MSLN produced in the culture supernatant was purified and stored as above (Fig. 1D).

2.3. Antibody generation

To generate mAbs against MPF and against MSLN, 4- to 6-week old BALB/c mice were immunized with the respective purified protein i.p. on days 0, 7, 14, and 16 (10 μg /shot). Following the last immunization, lymphocytes of the spleen were collected and fused with P3U1 myeloma cells in a 50% polyethylene glycol 4000 solution (Wako, Osaka, Japan) on day 18. The fused cells were plated on 96-well plates with RPMI-1640 medium containing 15% fetal calf serum (FCS; Equitech-Bio Inc., Kerrville, TX), penicillin/streptomycin (Invitrogen) and HAT solution (Invitrogen). After 10 days incubation at 37°C with 5% CO_2 in a humidified environment, culture supernatants were collected and screened for their ability to bind to the immunizing antigen by means of an indirect ELISA using recombinant MPF or soluble mesothelin, respectively. Selected positive hybridoma colonies were expanded and subcloned by limiting dilution. An isostrip kit (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) was used for antibody isotype determination according to the manufacturer's instructions. Antibody purification was carried out with protein A affinity chromatography (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Following a competition assay for the immunogens among the clones thus obtained (data not shown), clone 20–10 (IgG1 κ) and clone 41–28 (IgG1 κ) were selected to construct a sandwich ELISA for the detection of MPF, while MN (IgG2a κ) and 11–25 (IgG2b κ) were chosen for construction of an MSLN ELISA as described elsewhere. Clone MN was previously obtained by Dr. Ira Pastan's laboratory as a specific monoclonal antibody against mesothelin [14] and used in this study under a licensing agreement with NIH. Clones 41–28 and 11–25

were biotinylated using ECL Protein Biotination Module (GE Healthcare).

2.4. Flow cytometry

Lung cancer cell lines NCI-H226 and NCI-H520 were cultured in RPMI medium (SIGMA) supplemented with 10% fetal bovine serum. The former cell line expresses both MPF and MSLN but the latter does neither [14]. After a treatment with PBS containing 5 mM EDTA for 3 min, detached cells were washed with PBS twice and incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-MSLN Abs or isotype-matched controls for 30 min at 4°C in PBS containing 0.5% BSA and 2 mM EDTA. Following twice wash with the above buffer, PE-conjugate anti-mouse IgG was added and further incubated for 30 min at 4°C . All flow cytometry was performed on Cytomics FC500 (Beckman Coulter).

2.5. Immunoprecipitation

The reactivity of anti-MPF Abs to recombinant MPF protein, or anti-MSLN Abs to recombinant MSLN protein in the culture supernatant of NCI-H226 was confirmed by immunoprecipitation. 15 μl of Protein G sepharose suspended in PBS containing 0.01% BSA (SIGMA) was incubated with 5 μg of anti-MPF Abs 20–10 and 41–28, or anti-MSLN Abs 11–25 and MN, for 2 h at 4°C with gently rocking. During this step, 250 ng of the recombinant myc-His tagged MPF protein or 5 times concentrated culture supernatant of NCI-H226 and NCI-H520 were incubated with Protein G beads for 30 min at 4°C with shaking to preclear the samples. The Protein G sepharose incubated with the antibodies were centrifuged at $1000 \times g$ for 2 min and washed with PBS 3 times. Then the precleared samples were added to the tube containing the washed Protein G sepharose and rotated for over night at 4°C . After the incubation, the beads were washed with PBS 3 times and boiled in 25 μl of $2 \times$ Laemmli's SDS sample buffer for 5 min. Proteins (20 μl of sample per lane) were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12.5% polyacrylamide gel and electrotransferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The membrane blocked with 5% nonfat milk in PBS containing 0.05% Tween-20 (blocking buffer) was incubated with 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mouse anti-myc mAb (MBL) for detecting myc-His tagged MPF, or 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinylated anti-MSLN antibody clone IC14–30 (MBL) for detecting MSLN for 1 h at room temperature. After 4 times wash with PBS containing 0.05% Tween-20, the membrane was incubated with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (MBL) for MPF diluted 1:5000 with the blocking buffer or HRP-streptavidin (GE Amersham) for MSLN diluted 1:5000 with the blocking buffer. The chemiluminescence was developed by according to manufacture's procedure (ECL; GE Amersham). 50 ng of recombinant MPF protein or 250 ng of recombinant MSLN protein was applied as a positive control for Western blotting.

2.6. Western blot

HEK 293T cells were transfected by lipofection with expression vectors coding myc-His tagged MPF, full length of

mesothelin variant 1, or a mock vector as a negative control, and the culture media were collected after 72 h-incubation in a CO₂ incubator at 37 °C. Supernatants of the media were recovered by a centrifugation at 3000 × *g* for 10 min at room temperature, and then boiled with an equal volume of 2 × SDS sample buffer for 5 min. 20 μl of samples per lane were loaded on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and separated by SDS-PAGE. After electrotransfer to a PVDF membrane, the membrane was treated with the blocking buffer containing 5% nonfat milk and incubated with 2.0 μg/ml anti-MPF Abs (20–10 and 41–28) for 1 h at room temperature. After 4 times wash with PBS containing 0.05% Tween-20, the membrane was incubated with HRP-labeled anti-mouse IgG (MBL) diluted 1:5000 with the blocking buffer. The chemiluminescence was done by according to manufacture's procedure (ECL; GE Amersham).

2.7. Sandwich ELISA

The serum concentrations of MPF and of the soluble form of mesothelin were measured by each specific sandwich ELISA constructed as follows: 96-well microtiter plates (Maxisorp; Nalgen Nunc International Corp., Rochester, NY) were coated with the capturing antibody, clone 20–10 for MPF or clone MN for MSLN, and adjusted to 5 μg/ml with 100 mM carbonate buffer (pH 9.6) at 4 °C overnight. The plates were blocked with 200 μl PBS (pH 7.4) containing 1.0% BSA, 5.0% sucrose, and 0.1% NaN₃ for 2 h and then incubated for 1 h with serum samples diluted to 1:40 with PBS (pH 7.4) containing 1.0% BSA, 0.1% Tween20, 50 μg/ml MAK33 (Roche), and 0.1% NaN₃. After washing with PBS (pH 6.7) containing 0.13% Tween-20, the wells were incubated for 1 h with 2.0 μg/ml biotinylated mAb 41–28 for detecting MPF, or incubated with 0.7 μg/ml biotinylated mAb 11–25 for detecting soluble mesothelin, and reacted with streptavidin-conjugated peroxidase (GE Healthcare) diluted to 1:60,000 for MPF or avidin-conjugated peroxidase (DAKO, Glostrup, Denmark) diluted to 1:10,000 for soluble mesothelin, respectively, with 20 mM HEPES (pH 6.5) containing 1.0% BSA, 0.135 M NaCl, 0.1% *p*-hydroxy phenyl acetic acid (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan), and 0.15% ProClin150 (Supelco, St. Louis, MO). Followed by four washes with PBS, 50 μl/well TMB (Moss Inc., Pasadena, MD) was added and the plates were incubated for 30 min. The color development was stopped by the addition of 0.36N H₂SO₄. Color intensity was determined with a microplate reader Model 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 620 nm. Analyte concentrations were calculated by referring to the standard curve using serial diluted recombinant MPF or MSLN, respectively (Fig. 2A for MPF and Fig. 2B for MSLN).

2.8. Statistical analyses

Nonparametric Mann Whitney's U test was used for comparison of the data. *p* < 0.05 was considered statistically significant. For drawing of receiver operating characteristic (ROC) curves and estimation of the area under the ROC curve (AUC) statistics software SPBS (Comworks, Saitama, Japan) was used to quantify the ability to differentiate

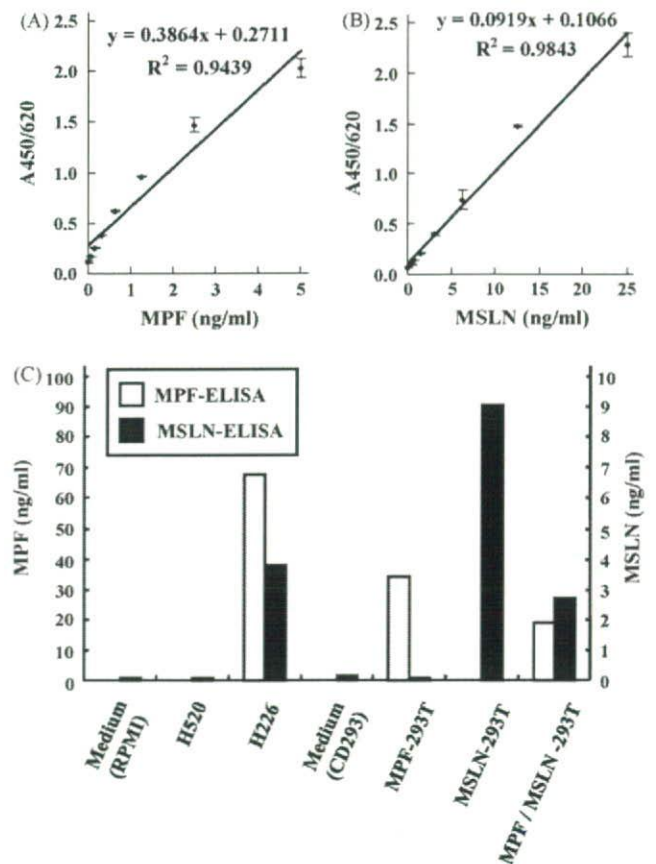


Fig. 2 Sandwich ELISA. Standard curves for MPF (A) and MSLN (B). ELISAs displaying the mean absorbance values from indicated concentrations of recombinant proteins. Points, mean; bars, S.D. (C), MPF and MSLN levels in the supernatants of cell lines and 293 transfectants measured by specific ELISA systems. The levels in the supernatants of 293 transfectants are indicated as those of 500 times diluted solution. Open bars, MPF; closed bars, MSLN.

between healthy volunteers and patients with indicated diseases. Pearson's correlation coefficient was calculated to determine the correlation between MPF and MSLN.

3. Results

3.1. Generation of sandwich ELISA specific for MPF and soluble mesothelin (MSLN)

To generate mAbs that specifically react with MPF, recombinant MPF protein corresponding to the amino acids 1–288 from the transcript variant 1 of human mesothelin was produced by 293T transfectants (Fig. 1A) and immunized to BALB/c mice. Supernatants of obtained hybridomas were tested for the binding activity to the microplate coated with immunizing antigen and further examined by a competition assay for the immunogen (data not shown). The specific reactivities of selected clone 20–10 and clone 41–28 to MPF were checked by immunoprecipitation using myc-His tagged recombinant MPF (Fig. 1B), and also performed by Western blot using the supernatants of 293T cells transfected with