

- microenvironment and aromatase inhibitor-resistant cancers. 3rd Seoul Breast Cancer Symposium (ソウル) 2008
10. 林 慎一 : AI 剤の耐性メカニズムの個別化-基礎からのアプローチ. 第 5 回日本乳癌学会中国四国地方会 (米子) 2008
 11. Shin-ichi Hayashi and Yuri Yamaguchi : Symposium. Estrogen signaling in breast cancer microenvironment and hormone refractory cancers. The 26th Congress of the International Association for Breast Cancer Research (倉敷) 2008
 12. Shin-ichi Hayashi and Yuri Yamaguchi : Symposia. Estrogen signaling and response to hormonal therapy. 13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック) 2008
 13. Shin-ichi Hayashi, Yuri Yamaguchi : Symposium. Basic research and hormonal therapy for Luminal-type of breast cancer. 第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2008
 14. 林 慎一、山口ゆり : ランチョンセミナー. エストロゲンレセプター転写活性のイメージングとその臨床応用. 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 (神戸) 2008
 15. 林 慎一 : 特別講演. エストロゲンシグナルの可視化とその臨床応用. 熊本乳癌カンファレンス(熊本)2009
 16. 林 慎一 : 特別講演. 乳癌の個別化とエストロゲンシグナル. 第 26 回信州内分泌談話会 (松本) 2009
 17. 神代理史、相馬佳絵、中島由佳、山口ゆり、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤 純 : ユビキチンリガーゼ CHIP は癌の悪性化を抑制する. 第 8 回関東ホルモンと癌研究会 (東京) 2008.
 18. 東 浩太郎、堀江 公仁子、大内 尉義、林 慎一、堺 隆一、井上 聡 : 乳癌における細胞膜局在エストロゲン受容体の新規核外作用の解析. 第 4 回 SERM 学術研究会学術集会 2008
 19. Motoyuki Kataoka, Yuri Yamaguchi, Noriaki Sawada, Yo-ichiro Morita, Dean B Evans, Hideyuki Yasuno, Kazushige Mori, Shin-ichi Hayashi : Antitumor activity of chemoendocrine therapy in premenopausal (Capecitabine [CAP]+Tamoxifen[TAM]) and postmenopausal (CAP+Letrozole[LET]) human breast cancer [BC] xenograft models. 31st San Antonio Breast Cancer Symposium 2008
 20. 松本 光代、清野 祐子、山口 ゆり、武井 寛幸、黒住 昌史、笹野 公伸、八重樫伸生、林 慎一 : ERE-GFP アッセイによる原発性乳癌のエストロゲン受容体転写活性の解析と臨床病理学的因子との関連. 第 16 回日本内分泌学会東北地方会 (仙台) 2008
 21. 大庭 華子、山口 ゆり、小林 康

- 人、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎二：エストロゲンシグナルに関連した乳癌間質細胞の特性の解析。第9回ホルモンと癌研究会(岐阜)2008
22. 今野 広海、白山 知子、山口 ゆり、清野 祐子、松本 光代、丹羽 俊文、林 慎一：ERの恒常的活性化を呈するホルモン療法耐性モデル乳癌細胞株の樹立。第9回ホルモンと癌研究会(岐阜)2008
23. 松本 光代、清野 祐子、山口 ゆり、武井 寛幸、黒住 昌史、八重樫 伸生、林 慎一：ERE-GFP アッセイを用いた原発性乳癌のエストロゲン受容体転写活性解析と臨床病理学的因子との関連。第9回ホルモンと癌研究会(岐阜)2008
24. 鈴木 史彦、赤平 純一、三浦 伊久美、伊藤 潔、鈴木 貴、林 慎一、笹野 公伸、八重樫 伸生：ヒト上皮性卵巢癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現とメチル化についての検討。第9回ホルモンと癌研究会(岐阜)2008
25. 松本 光代、清野 祐子、山口 ゆり、武井 寛幸、黒住 昌史、八重樫 伸生、林 慎一：ERE-GFP アッセイによる原発性乳がんのエストロゲン受容体転写解析とその臨床病理。第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008
26. 今野 広海、白山 知子、山口 ゆり、清野 祐子、松本 光代、丹羽 俊文、林 慎一：ERのリガンド非依存性活性化を呈するエストロゲン枯渇耐性乳癌細胞株の樹立。第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008
27. 山口 ゆり、清野 祐子、林 慎一：乳癌微小環境のエストロゲンシグナルに対する Chemo-endocrine 併用療法による抑制効果。第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008
28. 大庭 華子、清野 祐子、小林 康人、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎二、山口 ゆり：乳癌のエストロゲンシグナルに関わる間質線維芽細胞の特性の解析。第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008
29. Kotaro Azuma, Tomohiko Urano, Shin-ichi Hayashi, Ryuichi Sakai, Yasuyoshi Ouchi, Satoshi Inoue : Association of Estrogen Receptor α and HDAC6 causes novel nongenomic action in breast cancer cells. 第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008
30. 松本 光代、伊藤 潔、新倉 仁、笹野 公伸、八重樫 伸生、林 慎二：子宮体癌-間質細胞におけるエストロゲンを介した相互作用の解析。第13回日本産婦人科乳癌学会2008
31. 鈴木 史彦、赤平 純一、伊藤 潔、鈴木 貴、林 慎一、笹野 公伸、八重樫 伸生：ヒト上皮性卵巢癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現とメチル化についての検討。第81回日本内分泌学会(青森)2008
32. F Suzuki, J Akahira, I Miura, S Nagase, T Takano, H Niikura, T Suzuki, K Ito, S Hayashi, H Sasano,

- N Yaegashi :Expression of estrogen receptor(ER) beta isoforms and its correlation with DNA methylation in human epithelial ovarian cancer. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 2008
33. S Saji, M Hirose, H Iwase, Y Yamaguchi, M Toi, S Hayashi, K Kuroi :Rationale for salvage therapy with high-dose Selective Estrogen Receptor Modulator after treatment failure of Aromatase Inhibitors in breast cancer. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 2008
34. Yamaguchi, Y., Seino, Y., Oba, H., Takei, H., Kurosumi, M., and Hayashi, S. In vivo assessment of estrogen signal-related function of carcinoma-associated fibroblast (CAF) in human breast cancer. 13th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック) 2008
35. 山口 ゆり、松本光代、大庭 華子、清野 祐子、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎一：乳癌のエストロゲンシグナルと Cancer-Associated Fibroblast(CAF)の機能. 第16回日本ステロイドホルモン学会学術集会(福井) 2008
36. 神代理史、相馬佳絵、村山明子、仲島由佳、藤村亜紀子、大家祥平、山口ゆり、川野輪香織、木村圭志、黒住昌史、林 慎一、柳澤 純：ユビキチンリガーゼ CHIP は癌の浸潤性を抑制する. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会合同大会(神戸) 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 出願3件
- 1) 出願番号：特願 2005-160621 出願日：2005.05.31 名称：遺伝子導入細胞
- 2) 出願番号：特願 2005-160685 出願日：2005.05.31 名称：細胞分析方法
- 3) Application No./Patent No. : 06756855.0-1222 PCT/JP2006310935
Date : 08.02.08
Title : A transgenic cell and method for cell analysis

リン酸化プロテオミクスによる乳癌の細胞内シグナル伝達ネットワークに関する研究

研究分担者 石濱 泰 慶應義塾大学先端生命科学研究所 特別研究准教授

研究要旨:酸化金属を用いたリン酸化ペプチドの特異的濃縮法とナノ LC-MS を組み合わせたリン酸化プロテオミクスプラットフォームを用い、タンパク質を細胞培養中で代謝的に安定同位体標識アミノ酸で標識する SILAC 法により、定量的リン酸化プロテオミクスによる測定系を確立した。リン酸化ペプチド濃縮法は、酸化金属カラムからの溶出条件を最適化することにより、同定数および回収率を改善した。ヒト乳癌由来の培養細胞株 MCF-7 を用いてシグナル伝達ネットワーク解析を行った。SILAC 法で通常採用される透析血清の影響を調べた結果、ホルモン等が血清から除去されることにより、シグナル分子の発現プロファイルが変わり、シグナル伝達経路がスイッチすることが示唆された。非透析血清を用いた安定同位体標識法(二重標識 SILAC 法)を新たに開発し、MCF-7 細胞に対してラパチニブ処理を行い、透析血清を使った SILAC 法による結果と比較した。EGFR/Her2 シグナル伝達経路のリン酸化については非透析血清培養細胞と透析血清培養細胞の両方でラパチニブ処理による減少が認められたが、プロゲステロン受容体をはじめとするいくつかのシグナル分子のリン酸化の増減については、全く逆の結果となるものもあった。MCF-7 細胞をエストラジオールで刺激し 20 分以内に誘起されるリン酸化反応を、非透析血清を用いた DL-SILAC 法を用いて追跡した。その結果、820 種のリン酸化タンパク質および 1674 種のリン酸化サイトのダイナミクスを測定することが可能であった。820 種のリン酸化タンパク質のうち 125 種は今までにリン酸化タンパク質として報告のない新規なリン酸化タンパク質であった。また、EGFR シグナル伝達経路やその他複数のシグナル伝達経路とのクロストークを確認した。

A. 研究目的

タンパク質の網羅的発現解析は、近年の質量分析計 (MS) の高性能化およびマイクロ化 LC とのオンライン接続により今日では比較的簡単に行えるようになった[1]。中でも翻訳後修飾は質量数変化を伴うため、MS を用いたプロテオーム解析の対象として適していると考えられる。しかしある特定の修飾をうけているタンパク質はほんの一部

であるため、MS 解析に先立ち、修飾基選択的な濃縮をかける必要がある。可逆的なタンパク質リン酸化は細胞の増殖・分化・アポトーシス等の機能制御に深く関わっており、細胞機能を理解するにはこのタンパク質リン酸化ネットワークを網羅的に計測することは非常に重要である。リン酸化修飾を受けるセリン、スレオニン、チロシン残基のうちチロシンに対しては特異性の高い抗体があるため、比較的容易に選択的な濃縮が

可能であるが、セリン・スレオニンについてはそのような抗体が存在しないため、リン酸化プロテオミクスを行う上でボトルネックとなっていた[2,3]。最近我々はチタニアおよびジルコニアを担体とする酸化金属クロマトグラフィー(MOC)を用いて、ヒドロキシ酸を競合剤とするリン酸化ペプチドの高選択的濃縮法を開発した[4]。超高精度質量分析計と組み合わせることにより、細胞抽出物のような複雑な混合物からワンステップで1000種以上のリン酸化ペプチドを同定することに成功した。本研究では、このリン酸化プロテオミクスの手法を更に発展させるとともに、安定同位体標識法と組み合わせた定量的リン酸化プロテオミクスの手法を乳癌の細胞内シグナル伝達研究に応用することを目的とし、本法を乳癌のシグナル伝達ネットワーク解析に適用した。その中で、未知のシグナル分子の同定、乳癌特有のシグナル伝達メカニズムの解明等をめざした。

B. 研究方法

B-1. 試薬・材料

アセトニトリル (LC-MS用)、酢酸 (LC-MS用)、乳酸(特級)、トリフルオロ酢酸(TFA, 特級)、25%アンモニア水、尿素、リジルエンドペプチダーゼ、ジチオスレイトール、ヨードアセトアミドは和光純薬(大阪)より購入した。トリプシンはプロメガ (Madison, WI, USA) より入手した。17 β -エストラジオールはSigma-Aldrich(St. Louis, USA)のものを用いた。チタニアはTitansphere (ジーエルサイエンス、東京)を用いた。ラパチニブは、Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada)精製水は Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA)を用いた。

B-2. 試料調製

ヒト乳癌由来MCF-7細胞およびヒト子宮ガン由来HeLa細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)より入手した。Arg、Lys抜き培地はフナコシ(東京)より入手した。透析血清及び非透析血清はInvitrogen (Carlsbad, CA, USA)より購入した。安定同位体アミノ酸 ($^{15}\text{N}_4\text{-Arg}$, $^{15}\text{N}_4^{13}\text{C}_6\text{-Arg}$, 味の素、東京、 $\text{D}_4\text{-Lys}$, $^{15}\text{N}_2^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ 大塚製薬、徳島)を用いたSILAC標識はプロトコール[5]に従って行った。二重標識SILACは、非透析血清を用いる以外はSILAC標識と全く同じ方法で行った。エストロゲン刺激実験用試料は以下のように調製した。まず細胞を14時間無血清飢餓状態にした後、安定同位体標識された細胞に対し10nMのエストラジオールによって刺激した。所定時間経過後、コントロールの安定同位体非標識細胞と混合した。その後、既報[4]に従って細胞を破碎し、タンパク質抽出、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製、還元アルキル化処理、リジルエンドペプチダーゼおよびトリプシンによる消化を行った。消化ペプチドをC18カートリッジで脱塩・濃縮後、HAMMOC法のプロトコール[6]に従い、リン酸化ペプチドを濃縮した。すなわち、1mgのチタニアを充填したビペットチップカラムを80%アセトニトリル、0.1%TFAに溶解させた300mg/mL乳酸溶液(溶液A)で前もって洗浄し、溶液Aで溶解させたペプチド試料をロードした。溶液Aで洗浄の後、乳酸を除いた溶液Aで更に洗浄した。溶出は0.5-5%のアルカリ性溶液で行い、溶出画分を直ちに酸性にした後、C18-StageTip[6]で脱塩濃縮を行った。

B-3. LC-MSによる測定

ThermoFisher LTQ-Orbitrap、Dionex Ultimate3000、CTC analytics HTC-PALから構成されるナノLC-MSシステムを用いて測定を行った。ナノLCカラムは自家製のエレクトロスプレーニードルにReproSil C18充填剤(3 μ m径, Dr. Maisch-GmbH, Ammerbuch, Germany)を自家充填して作製した[7]。流速は500nL/minで、その他の分析条件は既報[4]の通り行った。

B-4. データ解析

ピーク抽出はMass Navigator v1.2(三井情報、東京)を用いて行った。ペプチド配列の同定およびリン酸化サイトの決定は、MASCOTソフトウェア(Matrix Sciences社、London, UK)を用いて行った。検索条件パラメータ、同定クライテリアなどは既報[4]の通り設定した。定量は、MASCOT同定結果をMass Navigatorにエクスポートし、該当ピークの抽出クロマトグラムにおけるピーク面積を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における実験材料、装置等については一般的な化学・生物実験で用いるものであり、倫理面からの特別な措置を特に行う必要はなく、当実験施設において定められた一般的な実験指針に従って行った。

C. 研究結果および考察

C-1. ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー法(HAMMOC法)の改良

我々は、チタニアをあらかじめ乳酸で被覆しておくことにより、濃縮対象のリン酸化ペプチドと主なコンタミネーションである非リン酸化酸性ペプチドの選択性が向上する

ことをすでに報告している[4]。このHAMMOC法について、より多くの種類のリン酸化ペプチドを、より高い回収率で濃縮するため、溶出条件の更なる検討を行った。従来より用いられてきた0.5%アンモニア水溶液を対照として、カゼイン、フェチン、フォスピチン混合試料のトリプシン消化物を試料とし、濃度、アミンの種類、pHなどを詳細に調べた。その結果、アンモニア濃度を5%まで高めると回収率が上昇し、それ以上濃度を上げると、回収率が低下していくことがわかった。次に各種アミン類を0.5%濃度でスクリーニングした結果、環状アミンであるピペリジン及びピロリジンが最も高い回収率を示した。これは5%アンモニア水溶液とほぼ同等であった。ピペリジン及びピロリジンについて、さらに濃度を5%まで上昇させると、興味深いことに今までと全く異なるクロマトグラムが得られ、溶出されるリン酸化ペプチドの種類が異なっていることが示唆された。より多くのリン酸化ペプチドに対してこの現象を確かめるためにHeLa細胞抽出試料を用い、0.5%と5%濃度でのアンモニア、ピペリジン、ピロリジン水溶液を溶出溶液として用い、得られたベースピーククロマトグラムおよびそれぞれの溶出条件で同定されたリン酸化ペプチドについて比較を行った(図1、表1)。その結果、5%アンモニア、5%ピペリジン、5%ピロリジン水溶液を用いた場合、全体として比較的高い回収率が得られ、それぞれの条件で同定されたリン酸化ペプチドを比較するとオーバーラップが低い(19-36%)ことがわかった。この現象を利用し、5%アンモニア、5%ピペリジン、5%ピロリジン水溶液を溶出液とし

て順々に1つのHAMMOCカラムに適用した。上述のリン酸化タンパク質3種混合試料を用いた場合、リン酸化ペプチド全体の回収率は約3.5倍に増加した。この3種の溶出溶液を順番に1本のHAMMOCカラムに適用して分画する方法を選択的連続溶出法 (Successive and Selective Release, SSR) と名づけ、次に100 µgのHeLa細胞抽出タンパク質試料に適用した。この場合は、3種の溶出液による溶出試料溶液を混合せずにそれぞれをLC-MSで測定した。その結果、リン酸化ペプチド数として1.8倍(重複なしリン酸化ペプチドとして3275種)、回収率として1.9倍の性能の向上が認められた(図2)。

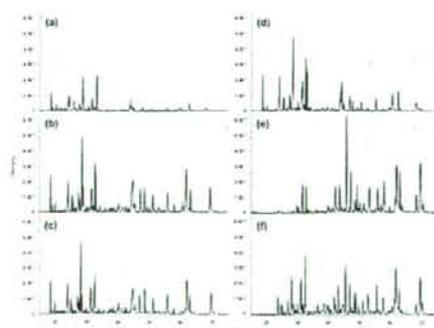


図1 HeLa細胞試料を用いたチタニアHAMMOC法の異なる溶出条件のベースピーククロマトグラム比較

- (a) 0.5% アンモニア水溶液溶出
- (b) 0.5% ピペリジン水溶液溶出
- (c) 0.5% ピロリジン水溶液溶出
- (d) 5% アンモニア水溶液溶出
- (e) 5% ピペリジン水溶液溶出
- (f) 5% ピロリジン水溶液溶出

表1 チタニアHAMMOC法における6溶出条件でのHeLa細胞から同定されたリン酸化ペプチドのオーバーラップ解析*

	0.5% ammonium hydroxide	0.5% piperazine	0.5% pyrrolidine	5% ammonium hydroxide	5% piperazine	5% pyrrolidine
0.5% ammonium hydroxide	100	38.4	39.0	43.5	10.0	21.0
0.5% piperazine	38.4	100	40.0	49.0	23.9	35.9
0.5% pyrrolidine	39.0	40.0	100	40.0	17.0	29.0
5% ammonium hydroxide	43.5	49.0	40.0	100	19.1	36.0
5% piperazine	10.0	23.9	17.0	19.1	100	38.1
5% pyrrolidine	21.0	35.9	29.0	36.0	38.1	100

*オーバーラップ(%)=(A∩B)/(A∪B)×100

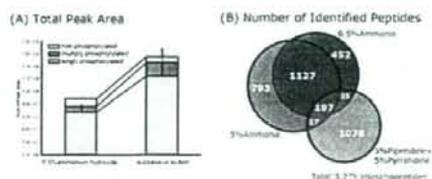


図2 従来法とSSR溶出法によるHeLa細胞から同定されたリン酸化ペプチドの比較

- (A) 回収率(ピーク面積比較)
- (B) 同定数(重複なしのリン酸化ペプチド数)

なお、今回の検討をするにあたり、一回のLC-MS測定で得られるリン酸化ペプチド同定数を最大化するため、MSデータからピーク抽出を行う際にモノアイソトープピーク以外のものが前駆体イオンとして選択された場合を補正する自家製スクリプトを作製した。このスクリプト適用により、約50%同定数が向上した。

C-2. 透析血清の影響と二重標識SILAC法の開発

安定同位体標識SILAC法では、細胞培養

の過程で通常の血清を使用すると血清中に含まれる非標識アミノ酸がタンパク質に取り込まれ標識効率が落ちることから、透析血清の使用がプロトコール化されている。しかし透析血清は、その透析の過程でアミノ酸だけではなくホルモン等の低分子も同時に除去されるため、乳癌細胞のホルモンによるシグナル伝達研究を行う上でこの影響がどのくらいあるのかをプロテオームワイドに調べることにした。透析血清を用いて SILAC 標識した試料および非透析血清を用いた通常培地（含非標識アミノ酸）で調製した試料を 1 : 1 で混合し、プロテオーム解析およびリン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、図 3 に示すように、2 つの試料は、プロテオーム発現量およびリン酸化プロテオーム発現量の両方のレベルで大きく変化しており、特にリン酸化プロテオームの変化は大きかった。プロテオームレベルで変化しているものにはホルモン受容体関連分子、シグナル関連分子(キナーゼやホスファターゼなど)も含まれており、透析血清を用いることでシグナル伝達経路がスイッチしていることが示唆された。

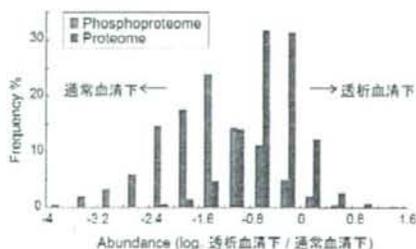


図 3 透析血清と通常血清を用いた培養の発現プロテオームおよびリン酸化プロテオームへの影響
試料：MCF-7

透析血清の影響が無視できないことがわかったため、次に非透析血清を用いた安定同位体標識法の検討を行い、二重標識 SILAC 法を開発した。これは、従来法では非標識体と標識体の比較を行っていたところを、2種類の安定同位体を用い、「軽」標識体と「重」標識体の比較を行うものである(図 4)。マススペクトル中には通常血清中の非標識アミノ酸に由来するピーク (Arg⁰) が検出されるが、これらのピークは比較すべき標識ピーク (Arg⁴ と Arg¹⁰) に比べて十分小さいため、ペプチドの同定効率を妨げることなく、二つの標識ピークを比較することで二つの細胞群の定量解析が可能となる。

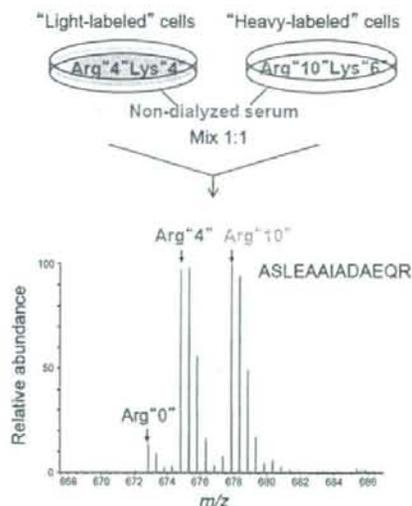


図 4 二重標識 SILAC 法の概要

従来の透析血清-SILAC 法と、通常血清-二重標識 SILAC 法を比較するため、MCF-7 に対するラバチニブの効果を両法で評価し

た。ラパチニブの阻害標的分子であるEGFR/Her2の下流のシグナル伝達経路に属するERKなどの分子については非透析血清培養細胞と透析血清培養細胞の両方でラパチニブ処理によるリン酸化の減少が認められたが、プロゲステロン受容体をはじめとするいくつかのシグナル分子のリン酸化の増減については、全く逆の結果となるものもあった(図5)。

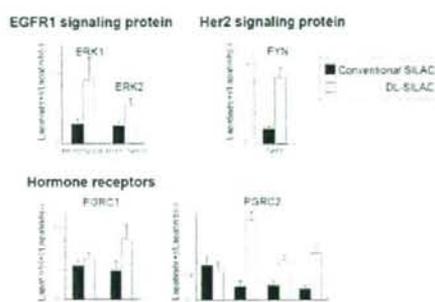


図5 透析血清-従来法(SILAC法)と通常血清-二重標識SILAC法によるラパチニブ処理MCF-7細胞のリン酸化量の変動

これらの結果は、透析血清と通常血清の異なる条件下では異なるシグナル伝達経路が機能しており、より本来の細胞の状態に近い通常血清を用いた条件での評価の必要性を示唆している。

C-4. エストラジオール刺激による細胞膜由来エストロゲンシグナリング

乳癌細胞において、エストラジオール(E2)は核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)に作用し、関連遺伝子の活性化を誘

起することは良く知られているが、この核内に対する比較的ゆっくりとした作用(通常は数時間から数日かかる)とは別に数十分で誘起される作用があることが最近わかってきた。これは細胞膜もしくは細胞質に局在する少量のERにE2が作用するもので、核内受容体に作用するnuclear-initiated steroid signaling(NISS)と区別してmembrane-initiated steroid signaling(MISS)と呼ばれている[8]。

E2誘起MISSの結果として、MAPK1/3活性化、AKT1活性化やERのmembrane translocationなどが報告されているが、いまだ不明な点も多い。このネットワークはホルモン療法との関連も深く、E2の作用機構を解明し治療効果を予想できれば臨床上の意義も大きい[9]。そこで今回、HAMMOC法を用いた定量的リン酸化プロテオミクスを適用してE2誘起MISSにおけるリン酸化ネットワークの全容解明を試みた。二重標識SILAC法を用いて一方の標識MCF-7細胞をE2で刺激し、5分、10分、20分後にそれぞれ細胞を破碎し、対照試料であるもう一方の標識細胞と混合してリン酸化量の変化を定量した。対照試料を内部標準試料とすることにより、それぞれの時間におけるリン酸化量の時間変化を算出した。実験の結果、重複なしで1674個のリン酸化サイトが同定でき、その経時変化を測定することが可能であった。同定された820個のリン酸化タンパク質のうち、最新のUniprotで報告されていないものが125種含まれており、本法の性能の高さを示している。E2刺激で1.5倍以上リン酸化量が増えたものは全体の約20%であった。またEGFR1シグナル伝達経路やインシュリン様受容体Iシグナル伝達経路等への既知クロストークのみならず、今回新たにWnt/β

-catenin 経路とのクロストークを示唆する結果を得た(図6)。

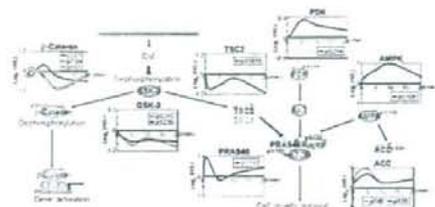


図6 HAMMOC-二重標識SILAC法によるエストラジオール刺激MCF7細胞のWnt/β-catenin 経路におけるリン酸化動態

また、乳癌細胞においてエストロゲン受容体と並ぶ重要なホルモン受容体であるプロゲステロン受容体(PGRC)のリン酸化がエストロゲンによって制御されていることが示唆された。これはエストロゲンが直接的もしくは間接的にプロゲステロン受容体を介したシグナル伝達を制御していることを意味しており、興味深い。これについては更なる検討が必要である。

以上より、二重標識 SILAC 法を用いたリン酸化プロテオーム解析により、E2 誘起 MISS として既知である MAPK signaling および IGF1R-PI3K-Akt signaling に加え、Wnt/β-catenin signaling やプロゲステロン受容体 signaling の亢進も示唆する結果が得られた。

D. 結論

HAMMOC 法と二重標識 SILAC 法を用いた定量的リン酸化プロテオミクスプラットフォームを確立し、乳癌のシグナル伝達ネットワークダイナミクスへ応用した。細胞膜付近に局在している ER に注目し、E2 刺

激によって 20 分以内に誘起されるシグナル伝達ネットワークに本法を適用したところ、820 種のリン酸化タンパク質および 1674 種のリン酸化サイトのダイナミクスを測定することが可能であった。リン酸化の亢進が見られた分子の中から Wnt/β-catenin signaling やプロゲステロン受容体 signaling の亢進も示唆する結果が得られた。

また、本法はラパチニブ等の分子標的薬のシグナルネットワークへの作用を評価することも可能であった。

E. 健康危険情報

特に無し。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Ravichandran A, Sugiyama N, Tomita M, Swarup S*, Ishihama Y*: Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic pseudomonas species. *Proteomics*, in press.
- [2] Yachie N, Saito R*, Sugahara J, Tomita M, Ishihama Y: In silico analysis of phosphoproteome data suggests a rich-get-richer process of phosphosite accumulation over evolution. *Mol. Cell. Proteomics* 2009 Jan 9. [Epub ahead of print].
- [3] Ishihama, Y*. Development of solid phase extraction mini-columns for proteome analysis. *BUNSEKI KAGAKU* 57(12): 1011-18, 2008.

- [4] Sagane K*, **Ishihama Y**, Sugimoto H: LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int J Biol Sci.* 4(6):387-96, 2008.
- [5] Miyamoto K, Hara T, Kobayashi H, Morisaka H, Tokuda D, Horie K, Koduki K, Makino S, Núñez O, Yang C, Kawabe T, Ikegami T, Takubo H, **Ishihama Y**, Tanaka N*: High-Efficiency Liquid Chromatographic Separation Utilizing Long Monolithic Silica Capillary Columns. *Anal Chem.* 80(22): 8741-50, 2008.
- [6] Kyono Y, Sugiyama N, Imami K, Tomita M, **Ishihama Y***: Successive and Selective Release of Phosphorylated Peptides Captured by Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography. *J. Proteome Res.* 7 (10): 4585-93, 2008.
- [7] Shinoda K, Tomita M, **Ishihama Y***: Aligning LC Peaks by Converting Gradient Retention Times to Retention Index of Peptides in Proteomic Experiments. *Bioinformatics.* 24(14):1590-5, 2008.
- [8] Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K*, **Ishihama Y***: Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol. Syst. Biol.* 4: 193, 2008.
- [9] Imami K*, **Ishihama Y**, Terabe S: On-line selective enrichment and ion-pair reaction for structural determination of sulfated glycopeptides by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1194(2): 237-42, 2008.
- [10] **Ishihama, Y***. Molecular dynamics in cellular signal transduction systems. *J. Jpn. Soc. Mechanical Engineers.* 111(7) 578-81, 2008.
- [11] **Ishihama, Y***. NanoLC-MS systems in proteomics. *Chromatography.* 29: 25-31.2008.
- [12] 石濱泰、杉山直幸、シグナル伝達プロテオームの最前線、Pharma VISION NEWS 12: 29-34, 2008.
2. 学会発表
- [1] K. Imami, N. Sugiyama, Y. Kyono, M. Tomita, Y. Ishihama, in HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam, Netherland, 2008.
- [2] K. Imami, N. Sugiyama, Y. Kyono, M. Tomita, Y. Ishihama, in The 33rd International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2008 Kyoto), Kyoto University (Kyoto, Japan), 2008.
- [3] Y. Ishihama, in 8th Asian-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, Kaohsiung, Taiwan, 2008.
- [4] Y. Ishihama, in DBS Seminar 2008 (Department of Biological Sciences, National University of Singapore) Singapore, 2008.
- [5] Y. Ishihama, in NAIST Global COE International Symposium 2008 Cell Signaling, Nara, Japan, 2008.

- [6] Y. Ishihama, in 2008 Taiwan-Japan Proteomics Symposium 'Frontier in Protein PTMomics', Taipei, Taiwan, 2008.
- [7] Y. Ishihama, N. Sugiyama, Y. Kyono, K. Imami, T. Masuda, M. Tomita, in 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, Hokkaido University Conference Hall, 2008.
- [8] M. Iwasaki, T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama, in The 2nd Taiwan-Japan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology, Computational Biology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Odaiba, Tokyo, Japan, 2008.
- [9] Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, Y. Ishihama, in 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics Denver, CO, USA, 2008, p. ThP420.
- [10] Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, Y. Ishihama, in HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam, Netherland, 2008, p. O.
- [11] Y. Kyono, N. Sugiyama, M. Tomita, Y. Ishihama, in The 33rd International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2008 Kyoto), Kyoto University (Kyoto, Japan), 2008, p. L27.
- [12] T. Masuda, Y. Igarashi, H. Esumi, T. Soga, M. Tomita, Y. Ishihama, in HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam, Netherland, 2008.
- [13] T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama, in 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, Colorado, USA, 2008, p. MP363.
- [14] K. Shinoda, N. Sugiyama, M. Tomita, Y. Ishihama, in HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam, Netherland, 2008.
- [15] [18] N. Sugiyama, H. Nakagami, S. Ohnuma, K. Mochida, A. Daudi, M. Tomita, K. Shirasu, Y. Ishihama, in HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam, Netherland, 2008.
- [16] N. Sugiyama, S. Ohnuma, Y. Kyono, M. Tomita, Y. Ishihama, in 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics Denver, CO, USA, 2008, p. WP425.
- [17] 阿久澤毅史, 今見考志, 杉山直幸, 京野完, 富田勝, 石濱泰, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008.
- [18] 岩崎未央, 増田豪, 石濱泰, 富田勝, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008.
- [19] 京野完, 杉山直幸, 今見考志, 富田勝, 石濱泰, in 第4回日本臨床プロテオーム研究会, 大阪国際交流センター (大阪), 2008.
- [20] 京野完, 杉山直幸, 今見考志, 富田勝, 石濱泰, in 第56回質量分析総合討論会, つくば国際会議場エポカル (茨城県つくば市) 2008.
- [21] 京野完, 杉山直幸, 富田勝, 石濱泰, in 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会 ホテル阪急エキスポパーク, 大阪,

- 2008.
- [22] 京野完, 杉山直幸, 富田勝, 石濱泰, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008.
- [23] 今見考志, 杉山直幸, 京野完, 富田勝, 石濱泰, in みちのく分析科学シンポジウム 2008, 東北大学青葉記念会館, 2008.
- [24] 今見考志, 杉山直幸, 京野完, 富田勝, 石濱泰, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008.
- [25] 今村春菜, 谷内江望, 斎藤輪太郎, 石濱泰, 富田勝, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008.
- [26] 杉山直幸, 京野完, 今見考志, 大沼澄子, 塚原麻伊, 富田勝, 石濱泰, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008, p. 4T25.
- [27] 石濱泰, in MPSA2008 プレカンファレンス, 北海道大学学術交流会会館, 2008.
- [28] 石濱泰, in 東北支部分析化学若手交流会, 秋保クレセント, 2008.
- [29] 石濱泰, 杉山直幸, 京野完, 今見考志, 増田豪, 富田勝, in 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会 ホテル阪急エクスポパーク、大阪, 2008, p. S2.
- [30] 増田豪, 五十嵐康行, 岩崎未央, 富田勝, 石濱泰, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008, p. 4T25.
- [31] 増田豪, 五十嵐康行, 江角浩安, 曾我朋義, 富田勝, 石濱泰, in 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会 ホテル阪急エクスポパーク、大阪, 2008, p. S9.
- [32] 谷内江望, 斎藤輪太郎, 菅原潤一, 富田勝, 石濱泰, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008, p. 4T23.
- [33] 中村浩之, 谷内江望, 斎藤輪太郎, 今見考志, 石濱泰, 富田勝, in 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, 神戸ポートアイランド, 2008.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- 参考文献
- [1] Y. Ishihama, *J Chromatogr A* 1067 (2005) 73.
 - [2] Y. Ishihama, F.Y. Wei, K. Aoshima, T. Sato, J. Kuromitsu, Y. Oda, *J Proteome Res* 6 (2007) 1139.
 - [3] M. Kokubu, Y. Ishihama, T. Sato, T. Nagasu, Y. Oda, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5144.
 - [4] N. Sugiyama, T. Masuda, K. Shinoda, A. Nakamura, M. Tomita, Y. Ishihama, *Mol Cell Proteomics* 6 (2007) 1103.

- [5] S.E. Ong, M. Mann, Nat Protoc 1 (2006) 2650.
- [6] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, Nat Protoc 2 (2007) 1896.
- [7] Y. Ishihama, J. Rappsilber, J.S. Andersen, M. Mann, J. Chromatogr. A 979 (2002) 233.
- [8] R.X. Song, R.J. Santen, Biol Reprod 75 (2006) 9.
- [9] M. Toi, Y. Iino, Breast Cancer 13 (2006) 117.

原発性乳癌治療アルゴリズムの経済性に関する研究

分担研究者 近藤 正英 筑波大学大学院准教授

研究要旨

原発性乳癌の治療戦略（アルゴリズム）の経済的効率化を通じて「医療費適正化」という厚生労働行政の課題に応えるために、ふたつの研究を行った。研究1「予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法の経済評価」では、原発性乳癌の術後補助化学療法で予防的 G-CSF を使いつつ第三世代レジメンを施行することは、費用対効果に優れ、G-CSF の使い方を工夫すれば、費用節約的および医療財政支出節減的になる可能性があることを示した。研究2「乳癌高リスク者によるホルモン療法剤予防内服のバジェット・インパクト分析」では、前癌病変である異型過形成（AH）および非浸潤性小葉癌（LCIS）既往者にホルモン療法剤内服療法を推奨することは医療財政支出として社会的に受け入れられようと示唆された。こうした経済的エビデンスの提示は、より効率的な治療戦略の構築に大きく貢献するだろう。

A. 研究目的

近年の急速な医学の発展を背景にした医療技術の開発と、そうした技術の恩恵に対する国民の欲求が高まってきている。一方で、高度で先進的な医療に伴う費用をいかにして国民経済が負担していくかという、いわゆる「医療費適正化」の問題も大きな社会問題となっている。このため、医療の効率的な提供の実現が、厚生労働行政の大きな課題のひとつとなっている。

がん医療においては、がんの病態における遺伝子や分子の寄与の理解の発展に基づき、腫瘍の遺伝的特性や分子的特性を評価するバイオマーカーに基づいた治療技術が、いわゆる「テーラーメイド医療」として開発されてきており、国民やがん患者から新

たな治療戦略（アルゴリズム）へ大きな期待を寄せられている。しかし、こうした治療戦略の革新が医療費としての国民負担に及ぼす影響については明らかではない。

このような問題意識から本分担研究は、「バイオマーカーを導入した原発性乳癌の集学的治療アルゴリズムの構築と意思決定過程の定式化に関する研究」の一環として、乳癌治療の経済性を評価することを目的としている。

3年計画3年目の平成20年度には、原発性乳癌の治療戦略の中で大きな位置を占める術後化学療法の第二世代から第三世代への革新に関する経済評価研究として、「予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法の経済評価」を分担研究1として行った。

さらに、平成19年度までに行ってきた乳癌高リスク者による tamoxifen 及び raloxifene 内服による原発性乳癌予防の経済評価の発展として財政分析としての「乳癌高リスク者によるホルモン療法剤予防内服のバジェット・インパクト分析」を行った。これは原発性乳癌の治療戦略に前癌病変への対応の組み込み方の検討である。

B. 研究方法

研究1

予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法の経済評価

Breast Cancer International Research Group 001、Intergroup Trial C9471/Cancer and Leukaemia Group B Trial 94741、乳癌標準治療費のモデル推計、東京都立駒込病院乳癌患者医療費調査、乳癌の病期別効用値などを用いたマルコフ・モデリングによる費用効果分析。

研究2

乳癌高リスク者によるホルモン療法剤予防内服のバジェット・インパクト分析

本研究班の昨年度の研究成果である Kondo *et al* (2009) Economic evaluation of chemoprevention of breast cancer with tamoxifen and raloxifene among high-risk women in Japan. *British Journal of Cancer* 100(2): 281-290 の経済モデル、異型過形成 (AH) および非浸潤性小葉癌 (LCIS) の罹患数、専門医から予防内服を勧められた場合に内服開始する割合などを用いたバジェット・インパクト分析。

研究1、研究2とも「厚生労働科学研究

に関する指針」に示される倫理面への配慮を要するものには該当しない。

C. 研究結果

研究1

予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法の経済評価

第三世代術後化学療法は、原発性乳癌患者の予後の改善に有効であることが示されてきているが、その施行には骨髄抑制に伴う感染症に対して予防的 G-CSF 投与を行うことが必要であるとされている。しかし、我が国の社会保険診療では、この予防的 G-CSF 投与が認められておらず、第三世代術後化学療法が普及していない。

この予防的 G-CSF 投与が認められない背景のひとつには、G-CSF の費用がかさむことに対する懸念があると考えられる。そこで本研究では、予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法を普及させた場合の費用対効果とそれに伴うバジェット・インパクトを明らかにすることを目的とした。

Breast Cancer International Research Group 001 による FAC (第二世代レジメン) から TAC (第三世代レジメン) への変更と Intergroup Trial C9471/Cancer and Leukaemia Group B Trial 94741 による AC-T q3w (第二世代レジメン) から DD AC-T q2w (第三世代レジメン) への変更をマルコフ・モデル化した。モデルの概要は図1の通りである。

それぞれ35歳、45歳、55歳に治療開始した結果を推定した結果を表1に示す。効果は、質調整生存年 (QALYs) でみると、0.619QALY から 1.280QALY までいずれも延長が見られた。対して費用も同時に、65

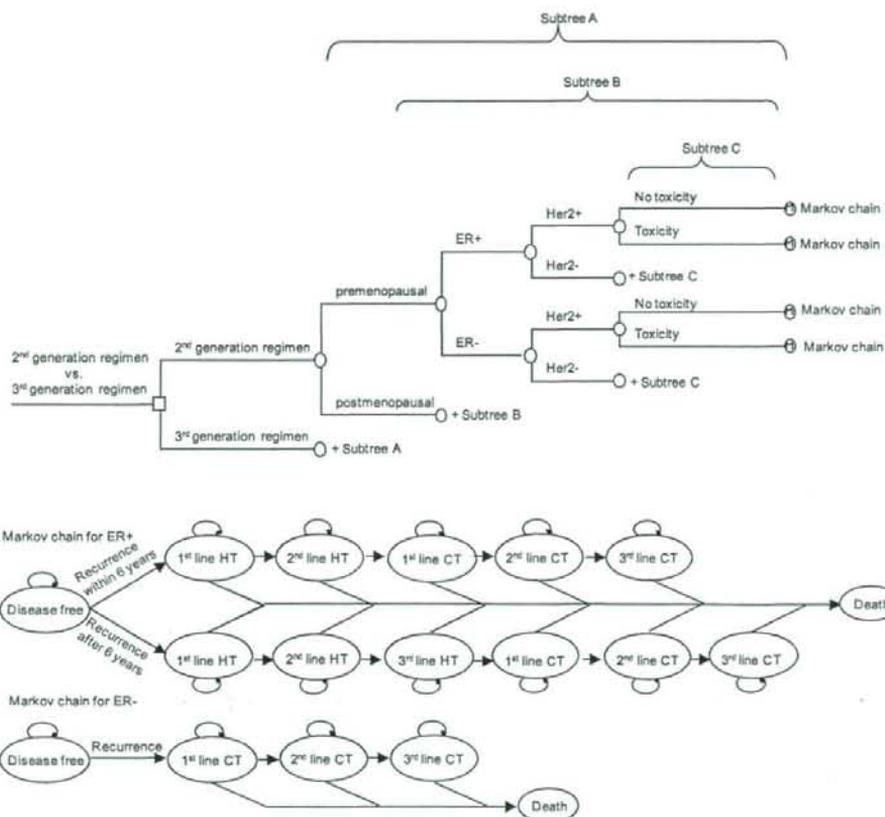


図1 マルコフ・モデル

表1 費用効果分析の結果

	増分費用	増分効果	増分費用効果比
FAC vs. TAC			
35 years	72 万円	0.787QALY	92 万円/QALY
45 years	77 万円	0.718 QALY	108 万円/QALY
55 years	76 万円	0.619 QALY	122 万円/QALY
AC-T q3w vs. DD AC-T q2w			
35 years	65 万円	1.280 QALY	51 万円/QALY
45 years	70 万円	1.165 QALY	60 万円/QALY
55 years	66 万円	1.021QALY	65 万円/QALY

万円から 77 万円増加した。これらの増加は予想どおり主に予防的 G-CSF の薬剤費によるものであり、それは、FAC から TAC 予想どおり主に予防的 G-CSF の薬剤費によるものであり、それは、FAC から TAC では 155 万円、AC-T q3w から DD AC-T q2w では 207 万円であった。しかし、増分費用効果比はすべて目安となる 600 万円/QALY を下回り、予防的 G-CSF 投与を行いつつ第三世代術後化学療法を行うことは費用対効果に優れることが明らかとなった。

また、年間 44,000 あまりの原発性乳癌罹患患者のうち 25% の患者が再発リスクが高く術後化学療法を受けると仮定し、その年齢分布やレジメンの選択を京都大学附属病院での症例に基づいて調整すると、バジェット・インパクト（総直接医療費の 70%）は年間 150-160 億円と推定された。

研究 2

乳癌高リスク者によるホルモン療法剤予防内服のバジェット・インパクト分析

Kondo *et al* (2009) の経済モデルでは、AH 及び LCIS の既往をもつ女性に、閉経前ではタモキシフェンを閉経後ではラロキシフェンを予防内服してもらうことは、費用対効果に優れていることが明らかにされた。

AH の罹患数は、マンモグラフィ検診受診者数 2,757,254 人(平成 18 年度地域保健・老人保健事業報告及び 2007 年人間ドックの現況)、要精検率 8.9%(平成 18 年度地域保健・老人保健事業報告)、異型過形成診断率 6.0%(日本放射線技術学会東北支部誌 2003 12:65-7)ただしこれは石灰化によるものに関するデータであり要精検のうち石灰化は 25%(日本乳癌検診学会誌 1997

6(1):43-50)を鑑みると、約 4,211-14,724 例と推定される。

LCIS の罹患数は、年間乳がん罹患数 40,675(がんの統計'08)、上皮内小葉癌診断率 0.3%(全国乳がん患者登録調査報告・確定版・第 34 号)から、122 例と推定される。

Kondo *et al* (2009) の経済モデルから各年齢コホートでの薬剤別症例当たり年間医療費を推計した結果を図 2 に示す。

症例の年齢分布を 40 歳まで 8%、40 歳から 55 歳で閉経前 26%、40 歳から 55 歳で閉経後 10%、55 歳以上は 56%(全国乳がん患者登録調査報告・確定版・第 34 号)と仮定する。これに、予防内服率を 43.0%(日本医事新報 1998No. 3865:43-7)を当てはめ、直接医療費の 70% をバジェット・インパクトとして推定した結果を図 3 に示す。

バジェット・インパクトは 1 年目から徐々に増大し、6 年目に年間 2.4-33 億円と最大になる。その後、徐々に減少し 20 年目に負となる。しかし、バジェットの減少はそれまでの増加と比較すると小さい。25 年目まで観察しても明らかに、累積バジェット・インパクトは負にならない。

D. 考察

研究 1

予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法の経済評価

費用効果分析の結果としては、費用対効果に優れるものの、費用がかさむというものであった。ただし、これらは国際臨床試験での結果、つまり、1 サイクル当たり 300 μ g8 回の filgrastim という用量をそのままモデル化したものである。一方で、感度分析を行ったところ、filgrastim の費用が

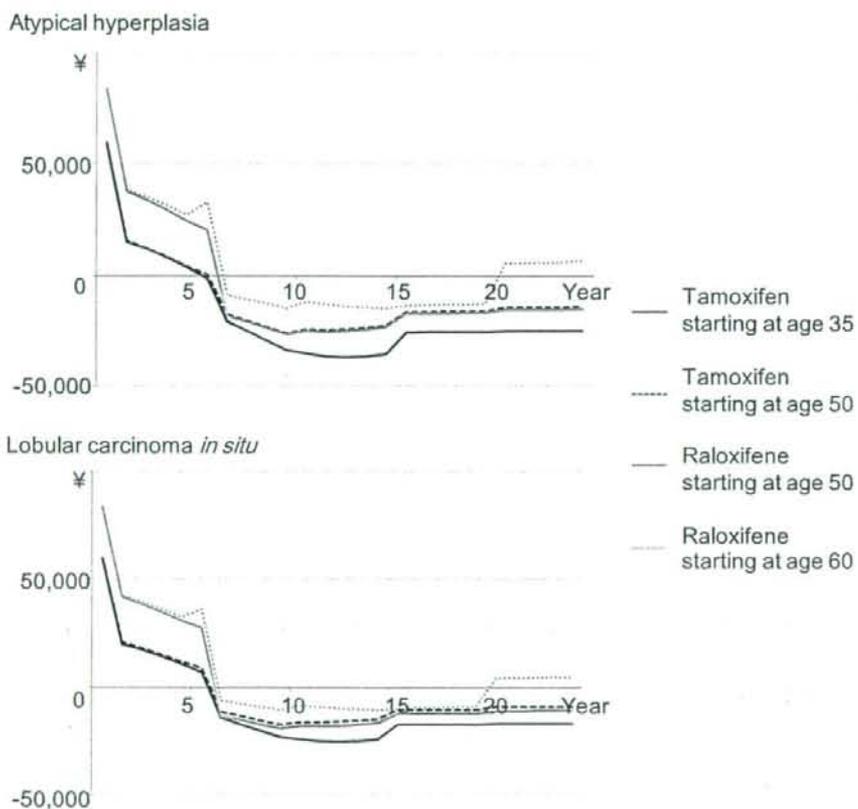


図3 症例当たり年間医療費

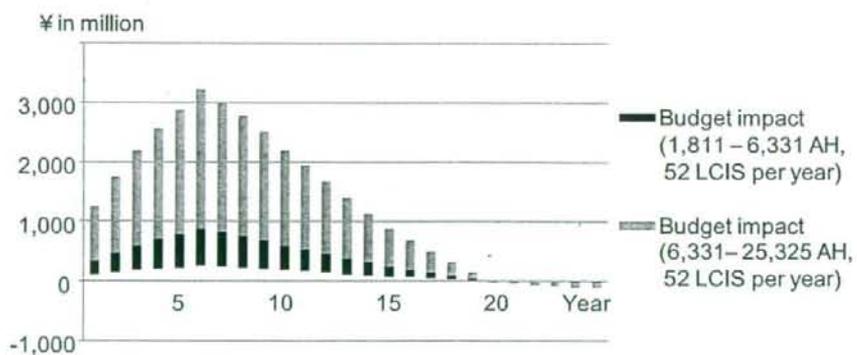


図4 乳癌化学予防のバジェット・インパクト

30-50%小さくなれば、費用効果分析の結果が費用節約的になることが示された。

日本人女性の予防的 G-CSF の用量については、1 サイクル当たり 300 μ g 8 回の filgrastim よりも少なくともよいことが示唆されており (Ishiguro *et al.* *Annals of Oncology* 2008;19:1019)、事実、我が国の他臓器のがん治療ですでに認められている予防的 G-CSF の用量 (50 μ g/m²) を想定すると、今回のモデルでの費用対効果としては費用節約的となった。また、用量を減ぜずとも薬価の最も安い nartograstim を使用することを想定しても、結果は費用節約的となった。

これにともなって、バジェット・インパクトも当初の推定である年間 150-160 億円を大きく下回るものになると思われる。バジェット・インパクトの水準が社会的に支払い可能か否かを客観的に判断できる基準はないが、近年社会保険適応となった術後補助療法でのトラスツズマブの使用のバジェット・インパクトが 160-320 億円であったことと比較すると、原発性乳癌治療への支払いとしては必ずしも受け入れられないものではないと思われる。

研究 2

乳癌高リスク者によるホルモン療法剤予防内服のバジェット・インパクト分析

バジェット・インパクトは 6 年目に年間 2.4-33 億円と最大になることが明らかとなった。このバジェット・インパクトも、必ずしも受け入れられないものではないと思われる。

E. 結論

3 年計画 3 年目として、原発性乳癌の治療戦略の中で大きな位置を占める術後化学療法の世界から第三世代への革新に関する経済評価研究「予防的 G-CSF を用いた第三世代術後化学療法の経済評価」を行った。結果この革新を普及させるという政策判断は限りある医療資源の使い方としても正当化可能であることが示された。また、「乳癌高リスク者によるホルモン療法剤予防内服のバジェット・インパクト分析」では、AH や LCIS といった前癌病変への対応を原発性乳癌の治療戦略へ組み込むことが財政的にも可能であることが示された。

これらの知見は、臨床的なエビデンスに加えて、経済的なエビデンスに基づいた、原発性乳癌の治療アルゴリズム構築の基礎となり、乳癌治療の効率化を通じて、「医療費適正化」という厚生労働行政の課題への対応にも寄与するだろう。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo M, Hoshi SL, Ishiguro H, Yoshibayashi H, Toi M. Economic evaluation of 21-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer in Japan. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;112(1):175-87.

Kondo M, Hoshi SL, Toi M.