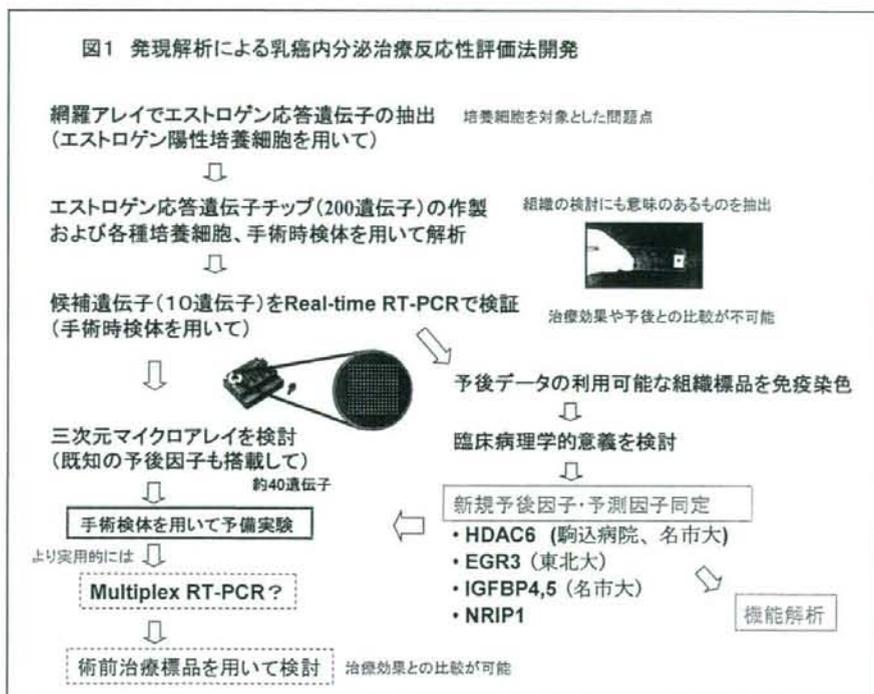


図1 発現解析による乳癌内分泌治療反応性評価法開発



発現解析を臨床に導入するには、精度と再現性の高度化、解析の迅速化と自動化による操作の簡易化が欠かせない。そこで、このような要求を満たす装置の候補としてオリンパス社が開発中であった3次元型マイクロアレイ解析装置を用いた。我々の研究から絞り込まれた候補遺伝子36個を搭載した3Dマイクロアレイチップ作成し、それを用いて原発乳癌患者27例の手術検体を解析した。その結果、クラスター解析から患者群が高発現群Aグループ

と低発現群Bグループの2群に明瞭に分けられることが明らかとなった。その2群はERの発現の有無とは有意な正の相関を示したが、完全には一致しなかった。また、Stageと有意な相関がみられ、Her2との逆相関も観察された。また、これらの患者の中から3例の再発症例が観察されたが、そのうち1例はER陽性患者で、2例がER陰性患者であったが、アレイ解析による分類では3例とも低発現群に属していた。

図2 3次元マイクロアレイで解析した原発乳癌におけるエストロゲン応答性遺伝子発現プロファイル

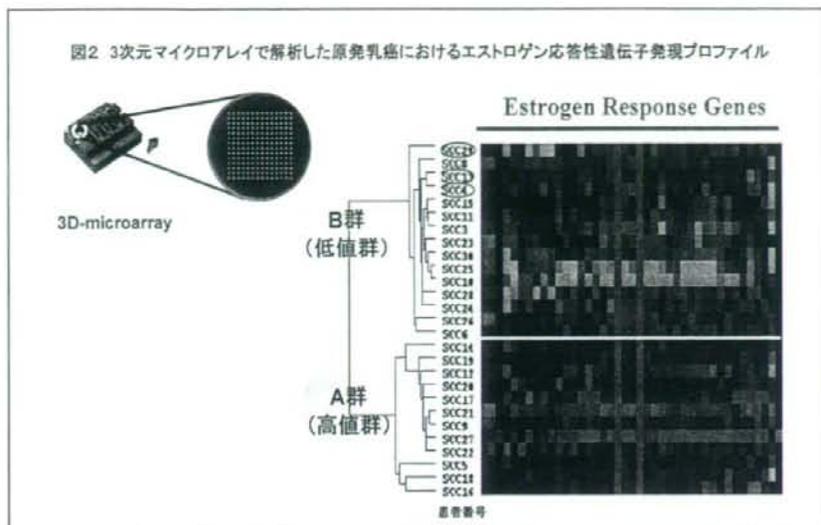
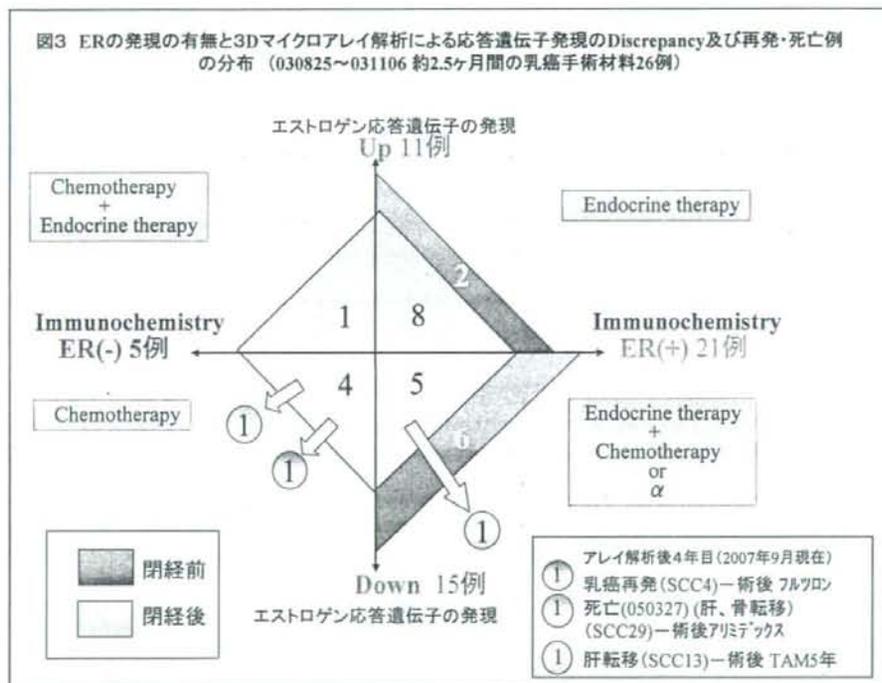


図3 ERの発現の有無と3Dマイクロアレイ解析による応答遺伝子発現のDiscrepancy及び再発・死亡例の分布 (030825~031106 約2.5ヶ月間の乳癌手術材料26例)



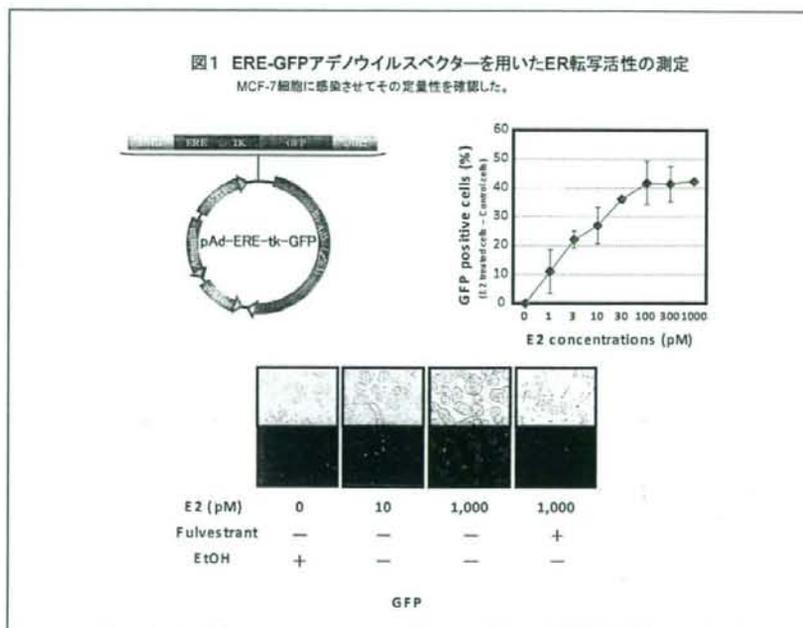
一方、3次元マイクロアレイは、精度、再現性、迅速性、操作性に優れているが、高価で特殊な装置を必要とし、また、サンプルの前処理も煩雑であり、このまま臨床へ導入するには多くの困難があることも明らかとな

った。そこで、より近い臨床応用のためには、候補遺伝子の数をより絞り込んで、RT-PCRベースの解析手法に乗せていった方がより現実的と思われた。

そこで、HDAC6、EGR3、IGFBP4、IGFBP5、Efp、

PgR などのエストロゲン応答遺伝子と既知の予後因子、MIB-1、Her2、Bcl-2、ER を Real-time PCR 法を用いて定量的解析を試みた。また、臨床で入手しやすい手術検体のパラフィン包埋切片よりなるべく状態の良い RNA の抽出を試みた。その結果、十分定量的 PCR 解析に耐えうる精度の RNA が得られることが確認された。また、エストロゲン応答遺伝子の発現は

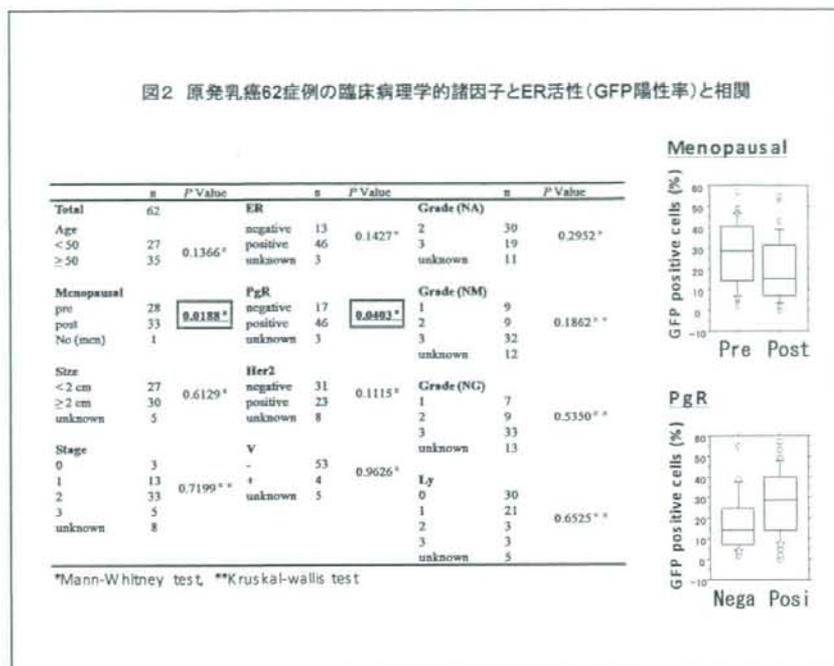
後述のアデノウイルス ERE-GFP アッセイで測定した ER の活性と相関を示し、中には免疫染色において ER 陰性と判定された症例において発現が見られるものも観察された。ER 陽性群は ER 応答遺伝子によってやはり 2 群に分類され、これらの予後との関係が興味深い。今後、厳密なバリデーション研究を行なう必要がある。



また、新規診断法として ER の発現を見るのではなく、ER の活性を個々の症例ごとに評価する方法の開発を試みた。すなわちアデノウイルスに ERE-GFP レポーター遺伝子を構築し、そのウイルスを検体に感染させることによって、個々の症例の癌細胞中の ER 活性を GFP の蛍光により可視化してアッセイする方法を開発した。本システムを用いて 67 例の原発乳癌症例に導入して ER の転写活性を解析したところ、ER の免疫染色による発現の解析結果と

傾向は示すものの統計的に有意な相関ではなく、むしろ PgR の発現と相関することが明らかとなった。このことから臨床検体の ER の活性を評価することは新たなホルモン療法の反応性の指標となる可能性が考えられる。現在、これら 62 例の ER 応答遺伝子群の発現を解析中であり、乳癌臨床検体における ER タンパクの発現と ER 転写活性と ER 標的遺伝子の発現の関係を明らかにしたい。

図2 原発乳癌62症例の臨床病理学的諸因子とER活性(GFP陽性率)と相関



#### D. 考察

乳癌の治療の中でホルモン療法の占める位置はきわめて重要であり、乳癌の集学的治療アルゴリズムを構築するためには、このホルモン療法の適応をどのように規定していくかは重要な柱の一つと考えられる。そのためにはホルモン療法に対する個々の患者の反応性を正確に予測し、評価する指標、バイオマーカーの存在は必須である。

我々はこれまで、癌の発生進展におけるエストロゲンシグナルの役割、その作用の分子機序を解明することを目的として基礎研究を行ってきた。近年、そのような研究の推進の一助とするため、エストロゲン応答遺伝子を搭載した、エストロゲン応答マイクロアレイチップを開発し、様々な研究を行ってきた。エストロゲン応答遺伝子群はエストロゲンに対する反応性を知るのに効果的な指標であり、その遺伝子群の発現プロファイルからホルモ

ン療法に対する反応性を知ることが出来るかもしれない。その様な考えに基づき、乳癌検体を対象とした解析を進め、候補遺伝子を抽出・同定してきた。HDAC6、IGFBP4、EGR3などいくつかの遺伝子については実際に乳癌の予後と相関することが示された。そこでさらに、ヒト組織標本を用いた解析とチップの改良を進め、高精度なホルモン療法奏効性予測診断を可能にするDNAチップの開発を目指した。3次元型マイクロアレイチップを用いて約27症例の原発乳癌を解析したところ、明瞭に2群に層別化でき、搭載した遺伝子プローブの有用性が示された。また、現在臨床的に用いられている指標であるERの発現の有無との関連を検討したところ、相関は示したが、完全な一致ではなかった。一方、技術的問題点、特にサンプルの前処理の煩雑さや検体RNAの質の問題等も明らかとなり、解析装置が高価である事も考えると、このまま臨床に適用する

のは困難であると思われた。

そこで、現状ではマイクロアレイよりも実用化しやすい PCR 法を基本とした検査法による診断キット化を目指し、エストロゲン応答遺伝群をパラフィン包埋検体を対象に Real-time PCR 法で解析した。その結果、十分定量的 PCR 解析に耐えうる精度の RNA が得られることが確認された。このことは今後の臨床検体を使った研究が非常に実行しやすくなると同時に、次の段階として、綿密なバリデーション研究の必要性を強く感じるものとなった。

また、新規診断法を目指した試みとしてウイルスによる ERE-GFP アッセイが可能になり、臨床検体の ER 活性が測定できるようになったことによって、ER の発現と ER の活性を個々の症例において直接比較検討することができるようになった。このように臨床検体の ER の活性を直接評価することは ER の発現を免疫染色で判定することとは異なった視点から新たなホルモン療法の反応性の指標となる可能性が考えられる。このアッセイ法は生検可能な再発乳癌の ER 活性も測定することが可能で、しかも個々の症例の *in vitro* での SERM 等の効果を調べることが可能であり、ホルモン療法再発乳癌の個別化、2 次治療の選択の指標となり得るかもしれない。但し、今後、このアッセイ系を臨床でより使いやすい簡便な系に改良する必要がある。

## E. 結論

原発性乳癌の集学的治療アルゴリズムの構築のためのバイオマーカー、特にホルモン療法奏効性予測に有用かもしれないバイオマーカーの候補を複数同定した。それらを搭載した 3 次元型 DNA マイクロアレイを用いた解析からこれらの候補遺伝子群の有用性が認められた。また、パラフィン標品からの RT-PCR 法を用いた検出、定量的解析を

行い、より実用的なホルモン療法応答性予測診断法として利用できる可能性を示した。ER シグナルを可視化して定量するアデノウイルス ERE-GFP アッセイによって、個々の症例の ER の転写活性を解析できることが示され、ホルモン療法反応性を評価する新たな診断指標となりうる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hayashi, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Sasano, H., Yaegashi, N. : Biosynthesis and Action of Estrogen in Gynecological Cancers. Reproductive Oncology (ed. J. Fujimoto), Research Signpost, India, pp93-120, 2007.
2. Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. 5 $\alpha$ -reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of *in situ* androgen production. Int. J. Cancer, 120, 285-291, 2007.
3. Inoue, A., Seino, Y., Terasaka, S., Hayashi, S., Yamori, T., Tanji, M. and Kiyama, R. Comparative profiling of the gene expression for estrogen responsiveness in cultured human cell lines. Toxicology In Vitro, 21, 741-752, 2007.
4. Sogon, T., Masamura, S., Hayashi, S., Santene, R.J., Nakachi, K., and Eguchi, H. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor  $\alpha$  gene is correlated with its enhanced expression in

- estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105, 106-114, 2007.
5. Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., Moriya, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Hayashi, S., Ohuchi, N. and Sasano, H. Aromatase localization in human breast cancer tissues - possible interaction between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.*, 67(8), April, 3945-3954, 2007.
  6. Suzuki, T., Inoue, A., Miki, Y., Moriya T., Ishida, T., Hirakawa, H., Yamaguchi, Y., Hayashi, S. and Sasano, H. Early growth responsive gene 3 (EGR3) in human breast carcinoma: a regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 279-292, 2007.
  7. Mita, K., Zhang, Z., Ando, Y., Toyama, T., Hamaguchi, M., Kobayashi, S., Hayashi, S., Fujii, Y., Iwase, H. and Yamashita, H. Prognostic significance of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 expression in breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 37(8), 575-582, 2007.
  8. Tanabe, K., Utsunomiya, H., Tamura, M., Niikura, H., Takano, T., Yoshinaga, K., Nagase, S., Suzuki, T., Ito, K., Matsumoto, M., Hayashi, S. and Yaegashi, N. The expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. *Cancer Sci.*, 99, 1125-1130, 2008.
  9. Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Hatakeyama, A., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N. and Hayashi, S. Estrogen signaling ability in human endometrial cancer through the cancer-stromal interaction. *Endocrine-Related Cancer*, 15, 451-463, 2008.
  10. Tanabe, K., Matsumoto, M., Ikematsu, S., Nagase, S., Hatakeyama, A., Takano, T., Niikura, H., Ito, K., Kadomatsu, K., Hayashi, S., Yaegashi, N. Midkine and its clinical significance in endometrial cancer. *Cancer Sci.*, 99, 267-271, 2008.
  11. Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 109, 201-206, 2008.
  12. Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, Honma S, Evans DB, Hayashi SI, Kondo T, Sasano H. Intratumoral Estrogens and Estrogen Receptors in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clin Cancer Res.*, 14, 4417-4426, 2008.
  13. Santen RJ, Song RX, Masamura S, Yue W, Fan P, Sogon T, Hayashi S, Nakachi K, Eguchi H. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 630, 19-34, 2008.
  14. Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, 15, 256-261, 2008.
  15. Hayashi, S., Yamaguchi, Y. Estrogen-related cancer microenvironment of breast carcinoma. *Endocrine J.*, in press, 2009.
  16. Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I.,

- Yamaguchi, Y., Ohie, S., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y., Takei, H., Hayashi, S., Kurosuni, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.*, in press, 2009.
17. Azuma K, Urano T, Horie K, Hayashi S, Sakai R, Ouchi Y, Inoue S. Association of Estrogen Receptor  $\alpha$  and Histone Deacetylase 6 Causes Rapid Deacetylation of Tubulin in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* in press, 2009.
  18. 松本光代、畠山篤、坂本宙子、山口ゆり、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：3次元マイクロアレイ-乳癌の診断と治療効果予測への臨床応用を目指して。東北大学医学部保健学科紀要, 16(1): 19-25, 2007.
  19. 林 慎一、山口ゆり：ホルモン療法反応性と乳癌微小環境。乳癌の臨床, 特集・乳癌ホルモン療法の進歩-基礎と臨床, Vol. 22, No.1, 6-12, 2007.
  20. 林 慎一：内分泌療法感受性予測因子。日本臨床, 増刊・乳癌-基礎・臨床研究のアップデート, Vol. 65, 148-153, 2007.
  21. 林 慎一：ホルモン療法奏効メカニズムと治療効果。医学のあゆみ, Vol. 221, No. 2, 140-143, 2007.
  22. 林 慎一：乳癌とエストロゲン受容体、コレギュレーター。最新医学, 特集・内分泌代謝疾患と核内受容体, Vol. 62, No. 10, 47-54, 2007.
  23. 林 慎一：ホルモン依存性増殖の分子機構。「みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床」(戸井雅和編) in press, 2009.
2. 学会・研究会発表
    1. 林 慎一：核内レセプターを標的としたホルモン依存性癌の診断と治療の展開。シンポジウム「核内レセプターの機能と治療への応用」第66回日本癌学会学術総会(横浜) 2007.
    2. 林 慎一：ホルモン療法適応群の個別化の基礎研究。ワークショップ「癌治療の個別化と分子マーカー(乳癌)」第45回日本癌治療学会総会(京都) 2007.
    3. 林 慎一：アロマターゼ阻害剤耐性乳がんの治療戦略-基礎からのアプローチ、エストロゲンシグナル経路の変化。ランチョンセミナー38 第45回日本癌治療学会総会(京都) 2007.
    4. 林 慎一：エストロゲンと乳癌。特別講演II 第4回北関東乳腺臨床腫瘍研究会(大宮) 2007.
    5. 林 慎一：乳癌内分泌療法におけるトランスレーショナルリサーチ-エストロゲン依存性乳癌の個性と治療選択。10<sup>th</sup> Breast Cancer UP-TO-DATE Meeting (神戸) 2007.
    6. 林 慎一：AI再発に対する治療選択の基礎-エストロゲンシグナル経路の変化-。Kyushu Breast Cancer Workshop (福岡) 2007.
    7. 林 慎一、山口ゆり：内分泌療法の適応選択の基礎研究。シンポジウム「本邦における内分泌療法のエビデンスと基礎研究」第15回日本乳癌学会学術総会(横浜) 2007.
    8. 林 慎一：転写因子、RNA発現から見た核異型。シンポジウム「がんの細胞異型に迫る-核異型に対する科学的アプローチ」第46回日本臨床細胞学会(仙台) 2007.
    9. Akahira, J., Suzuki, H., Miura, I., Suzuki, T., Moriya, T. Miki, Y., Ito, K., Hayashi, S., Yaegashi, N., Sasano, H. The expression of RIZ1 in patients with epithelial ovarian cancer: Its correlation with aberrant DNA methylation. 98<sup>th</sup> Annual Meeting of

- American Association for Cancer Research, 2007.
10. Mori, K., Yamaguchi, Y., Sawada, N., Kondoh, K., Hayashi, S. In vivo and in vitro efficacy of capecitabine(X) + tamoxifen(TAM) in breast cancer. Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology, 2007.
  11. Azuma, K., Horie, K., Sakai, R., Hayashi, S., Ouchi, Y., Inoue, S. ER $\cdot$ -HDAC6 complex at plasma membrane mediates rapid tubulin deacetylation as a novel nongenomic estrogen action. The Endocrine Society's 89<sup>th</sup> Annual Meeting (Tronto), 2007.
  12. 赤平純一、鈴木 貴、鈴木史彦、三浦伊久美、三木康宏、長崎修治、伊藤 潔、森谷卓也、林 慎一、八重樫伸生、笹野公伸：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor-related receptor(ER**R**) $\beta$  の発現と臨床病理学的因子との関連について。第80回日本内分泌学会学術総会、2007。
  13. 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸：前立腺癌における Estrogen receptor $\cdot$ 及び $\cdot$ cx の機能解析。第80回日本内分泌学会学術総会、2007。
  14. 鈴木 貴、林 慎一：乳癌における EGR3(early growth response 3)の発現意義。第6回ステロイドホルモンを考える会(東京) 2007。
  15. 松本光代、伊藤 潔、新倉 仁、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：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59回産婦人科学会総会、2007。
  16. 長崎修治、中村保宏、三木康宏、赤平純一、鈴木 貴、林 慎一、笹野公伸：ヒト前立腺癌における Estrogen Receptor $\cdot$ cx の機能解析。第8回ホルモンと癌研究会(品川) 2007。
  17. 松本光代、山口ゆり、畠山 篤、清野祐子、鈴木 貴、伊藤 潔、新倉 仁、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：子宮体癌におけるエストロゲンシグナルを介した癌微小環境の解析。第8回ホルモンと癌研究会(品川) 2007。
  18. Kajiro, M., Hirota, R., Hujimura, A., Oie, S., Yamaguchi, Y., Kawanowa, K., Hayashi, S., Kurosumi, M., Kimura, K., Yanagisawa, J. : The Ubiquitinligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. 第66回日本癌学会学術総会(横浜) 2007。
  19. Matsumoto, M., Yamaguchi, Y., Seino, Y., Takei, H., Niikura, H., Ito, K., Suzuki, T., Sasano, H., Yaegashi, N., Hayashi, S. : Tumor-stromal Interaction through Estrogen-Signaling Pathway Analyzed by GFP Assay in Human Endometrial Cancer. 第66回日本癌学会学術総会(横浜) 2007。
  20. Tanabe, K., Matsumoto, M., Akahira, J., Suzuki, T., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sasano, H., Hayashi S., Yaegashi, N. : Expression of midkine in human endometrium and its disorder. 第66回日本癌学会学術総会(横浜) 2007。
  21. Yamaguchi, Y., Takei, H., Kurosumi, M., Seino, Y., Hayashi, S. : Microenvironmental regulation of estrogen-dependent and estrogen-independent growth in human breast cancer. 第66回日本癌学会学術総会(横浜) 2007。
  22. 松本光代、山口ゆり、清野祐子、畠山 篤、武井寛幸、新倉 仁、伊藤 潔、鈴木 貴、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：ヒト子宮体癌におけるエストロゲン刺激を介した

- 癌-間質の相互作用の解析. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会(仙台)2007.
23. 山口ゆり、下岡華子、清野祐子、武井寛幸、黒住昌史、林 慎一：乳癌における間質の特性. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会(仙台) 2007.
  24. 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：ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現についての検討. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会(仙台) 2007.
  25. 宇都宮裕貴、伊藤 潔、小林里香、高橋尚美、三木康宏、鈴木 貴、本間誠次郎、林 慎一、笹野公伸、八重樫伸生：子宮内膜癌におけるエストロゲン合成・代謝酵素の発現～癌細胞のエストロゲン合成に対する間質細胞の影響. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会(仙台) 2007.
  26. 松本光代、山口ゆり、坂本宙子、武井寛幸、新倉 仁、伊藤 潔、鈴木 貴、笹野公伸、八重樫伸生、林 慎一：エストロゲン依存性癌の新規診断法開発. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会合同大会(横浜) 2007.
  27. 神代理史、相馬佳絵、中島由佳、園尾 楽、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 は癌の悪性を抑制する. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会合同大会(横浜) 2007.
  28. 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 は癌の悪性を抑制する. 第 8 回関東ホルモンと癌研究会(東京) 2008.
  29. 林 慎一：アロマターゼ阻害剤耐性乳癌の治療戦略をそのメカニズムから考える. 第 44 回東海乳腺疾患懇話会(名古屋) 2008
  30. 林 慎一：アロマターゼ阻害剤の奏功性予測について. Breast Cancer Round Meeting(仙台) 2008
  31. 林 慎一：乳癌の mRNA 解析-その実体と問題点、今後の展望. シンポジウム「乳癌の内分泌療法の効果予測因子の手術/生検検体を用いた検索の実際」第 20 回日本内分泌外科学会総会(仙台) 2008
  32. 林 慎一：ホルモン依存性喪失癌. シンポジウム「ホルモン依存性喪失癌」第 9 回ホルモンと癌研究会(岐阜) 2008
  33. 林 慎一：特別講演. 蛍光タンパクを用いたレポーター細胞による乳癌・子宮癌の診断を目指して- ER 転写活性のイメージングとその臨床応用. 第 18 回日本サイトメトリ学会学術集会(東京) 2008
  34. 林 慎一：特別講演. ERE-GFP を用いたエストロゲンシグナル解析による乳癌の個別化. 第 18 回乳癌基礎研究会(福島) 2008
  35. Shin-ichi Hayashi：Estrogen signaling and response to hormonal therapy. Symposium: Hormonal Carcinogenesis and Hormonal Therapy. 2nd JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Breast Cancer Research.(淡路) 2008
  36. 林 慎一：エストロゲン受容体研究のトランスレーショナルリサーチ. シンポジウム. 第 7 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会(名古屋) 2008
  37. Shin-ichi Hayashi：Estrogen signaling in breast cancer microenvironment and aromatase inhibitor-resistant cancers. 3rd Seoul Breast Cancer Symposium(ソウル) 2008
  38. 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

39. Shin-ichi Hayashi and Yuri Yamaguchi : Symposium. Estrogen signaling in breast cancer microenvironment and hormone refractory cancers. The 26<sup>th</sup> Congress of the International Association for Breast Cancer Research (倉敷) 2008
40. Shin-ichi Hayashi and Yuri Yamaguchi : Symposia. Estrogen signaling and response to hormonal therapy. 13<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック) 2008
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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
46. 大庭 華子、山口 ゆり、小林 康人、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎一: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
47. 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
48. 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
49. 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:ヒト上皮性卵巣癌における 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
50. 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
51. 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
52. 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
53. 大庭 華子、清野 祐子、小林 康人、武井 寛幸、黒住 昌史、林 慎一、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
54. Kotaro Azuma, Tomohiko Urano, Shin-ichi Hayashi, Ryuichi Sakai, Yasuyoshi Ouchi, Satoshi Inoue : Association of Estrogen Receptor  $\alpha$  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
55. 松本 光代、伊藤 潔、新倉 仁、笹野 公伸、八重樫 伸生、林 慎一：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
56. 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：ヒト上皮性卵巣癌における 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
57. 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
58. 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
59. 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. 13<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. (ケベック) 2008
60. 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
61. 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.
62. 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
63. 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
- 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および酸化金属の結晶形を制御することにより、同定数および回収率を改善した。乳癌細胞における定量的リン酸化プロテオミクスを行うため、細胞を透析血清と安定同位体標識アミノ酸を含む培地中で培養しタンパク質を代謝的に安定同位体標識する SILAC 法を改良し、非透析血清中での培養を可能にした二重標識 SILAC 法を開発した。本手法により、MCF-7 細胞のリン酸化プロテオームに対するラパチニブの効果を検討した。その結果 EGFR/Her2 シグナル伝達経路のリン酸化の減少が認められた。また、プロゲステロン受容体のリン酸化にも変化が認められた。また、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本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確立し、乳癌の細胞内シグナル伝達研究に応用した。キナーゼを標的とする分子標的薬の乳癌細胞内シグナル伝達ネットワークに対する作用や、ホルモンが短時間内に乳癌細胞内シグナル伝達ネットワークに誘起するリン酸化量の変化を測定する中で、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 $\beta$ -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。ラバチニブは、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]に従って細胞を破砕し、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、HAMMOB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ピ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 needles に ReproSil C18 充填剤 (3 $\mu$ m 径, Dr. Maisch-GmbH, Ammerbuch, Germany) を自家充填して作製した [7]。流速は 500 nL/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ント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 法で用いるチタニアには安定結晶形としてアナターゼ型およびルチル型があることが知られている。市販のチタニア (Titansphere) はアナターゼ型であり、

HAMMOC 法開発時には、市販品をそのまま用いていた [4]。その後、さらに選択性を高めるためにチタニアを最適化していく中で、チタニア合成過程における焼成温度を変化させることにより、リン酸化ペプチドだけではなく、非リン酸化ペプチドやヒドロキシ酸に対するアフィニティーが大きく変動することを見出した。中でも 800 $^{\circ}$ C で焼成することによって作製したルチル型の結晶形を持つチタニアは、リン酸化ペプチドに対し高い選択性を示した。そこで、このルチル型チタニアを用いた全自動オンライン二次元 LC-MS/MS システムの構築を試みた。800 $^{\circ}$ C で焼成したルチル型チタニアを用いて、チタニア/C18 二相カラムを作製し、ナノ LC-MS システムを構築した (図 1 A)。

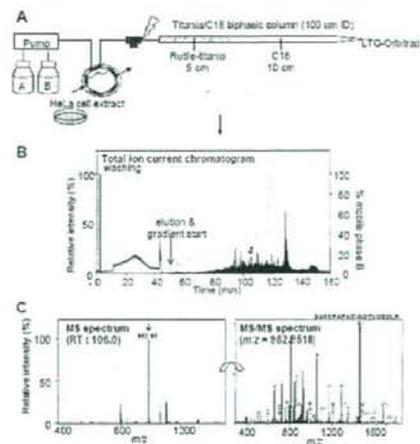


図 1 リン酸化ペプチド濃縮分析用オンライン二次元ナノ LC-MS/MS システム

- A: チタニア/C18 二相カラムを用いたシステム  
 B: 本システムで得られた典型的なトータルイオンクロマトグラム  
 C: SpSSPAPADIAQTVEQLR のマスマスペクトルと対応するマスマスペクトル

細胞試料 25 $\mu$ g 注入後、0.5%酢酸—80%アセトニトリル溶液での洗浄時間を最適化したところ、30分が最も効率的であった(図1B)。本システムでは1回の測定で平均約200個のユニークなリン酸化ペプチドを同定できた。繰り返し測定(n=22)を行った結果、696個のユニークなリン酸化ペプチド、680個のリン酸化サイトおよび463個のリン酸化タンパク質を同定することができた。チタニア市販品による結果と比較すると、同定数は半分以下であるが、マルチリン酸化ペプチド、およびチロシンリン酸化ペプチドの割合が高く、焼成ルチル型チタニアが Titansphere とは異なるリン酸化ペプチド濃縮選択性を有していることがわかった。

オフラインシステムで、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、HAMMOC法の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、濃度、アミンの種類、pHなどを詳細に調べた。その結果、5%アンモニア、5%ピペリジン、5%ピペラ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、100 $\mu$ gのHeLa細胞抽出タンパク質試料に適用した。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)。

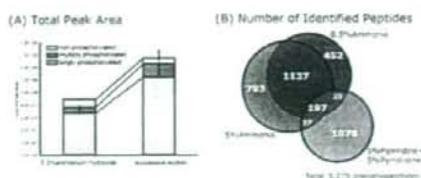


図2 従来法とSSR溶出法によるHeLa細胞から同定されたリン酸化ペプチドの比較

(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

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、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。

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3)。マ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(Arg<sup>0</sup>)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(Arg<sup>4</sup>とArg<sup>10</sup>)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。

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に対するラパ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4)。

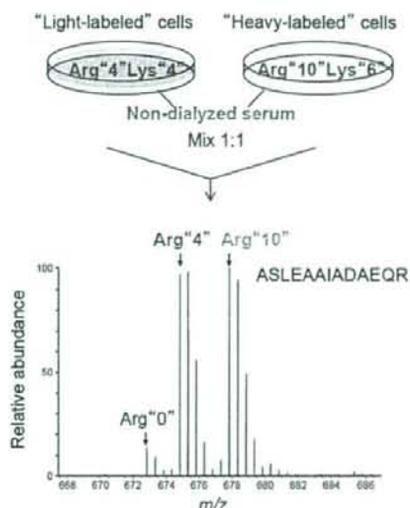


図3 二重標識 SILAC法の概要

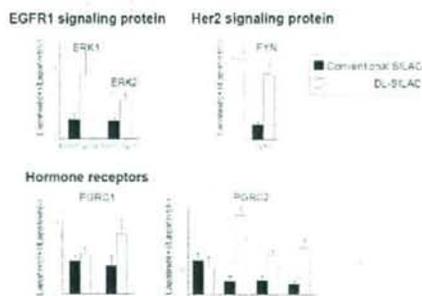


図4 透析血清-従来法(SILAC法)と通常血清-二重標識 SILAC法によるラパチニブ処理MCF-7細胞のリン酸化量の変動

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変動したものは全体の約 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/ $\beta$ -catenin 経路とのクロストークを示唆する結果を得た。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 (PGR) 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/ $\beta$ -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

改良 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/ $\beta$ -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。

本法はバイアスをかけずに未知のシグナル分子を探索することが可能であり、複雑なネットワークの中で制御されている乳癌関連リン酸化シグナルの動きを見極めることが可能であった。またラバチニブ等の分子標的薬の未知の作用機序の評価法としての可能性も示すことができた。一方で、これらのシグナル分子の中から臨床応用可能な分子マーカーを見出すまでには至らず、用いる試料の選択をはじめ、これらは今後の研究の課題である。

## 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\***, Schmidt T, Rappsilber J, Mann M, Hartl FU, Kerner MJ, Frishman D\*: Protein abundance profiling of the Escherichia coli cytosol. BMC Genomics 9: 102, 2008.
- [11] Shinoda K, Sugimoto M, Tomita M, **Ishihama Y\***: Informatics for Peptide Retention Properties in Proteomic LC-MS. Proteomics 8: 787-798, 2008.
- [12] Masuda T, Tomita M, **Ishihama Y\***: Phase Transfer Surfactant-aided Trypsin Digestion for Membrane Proteome Analysis. J. Proteome Res. 7 (2): 731-740, 2008.
- [13] Imami K, Sugiyama N, Kyono Y, Tomita M and **Ishihama Y\***: Automated Phosphoproteome Analysis for Cultured Cancer Cells by Two-Dimensional NanoLC-MS using a Calcined Titania/C18 Biphasic Column. Anal. Sci. 24: 161-166, 2008.
- [14] **Ishihama, Y\***. Molecular dynamics in cellular signal transduction systems. J. Jpn. Soc. Mechanical Engineers. 111(7) 578-81, 2008.
- [15] **Ishihama, Y\***. NanoLC-MS systems in proteomics. Chromatography. 29: 25-31, 2008
- [16] 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.
- [17] Hashimoto M, **Ishihama Y\***, Tomita M and Soga T: Microelectrospray interface with coaxial sheath flow for high-resolution capillary electrophoresis/mass spectrometry separation. Rapid Commun Mass Spectrom 21: 3579-3584, 2007.
- [18] Monton MR, Tomita M, Soga T and **Ishihama Y\***: Polymer Entrapment in Polymerized Silicate for Preparing Highly Stable Capillary Coatings for CE and CE-MS. Anal Chem 79: 7838-44, 2007.
- [19] Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, Nakamura A, Tomita M and **Ishihama Y\***: Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. Mol. Cell. Proteomics 6: 1103-9, 2007.
- [20] Sato T, **Ishihama Y** and Oda Y\*: Quantitative proteomics of mouse brain and specific protein-interaction studies using stable isotope labeling. Methods Mol. Biol. 359: 53-70, 2007.
- [21] Rappsilber J, Mann M and **Ishihama Y\***: Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nat. Protoc. 2: 1896-906, 2007.
- [22] Kotake Y, Sagane K, Owa T, Mimori-Kiyosue Y, Shimizu H, Uesugi