

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院にて手術を受けた肝細胞がん症例を対象とし、切除され保管されていた手術検体を使用した。平成 21 年度に抽出し、タンパク質の品質の検定を行ったサンプルを蛍光色素で標識し、大型の二次元電気泳動装置によって分離した。電気泳動後のゲルをレーザースキャナーでスキャンし、タンパク質の発現プロファイルを画像情報として取得した。得られた画像データを専用の画像解析ソフトで解析し、タンパク質の定量的なデータを得た。得られた発現データはデータマイニングソフトにて解析し、正常組織と腫瘍組織の間で発現強度の異なるタンパク質スポットを検出した。発現強度が異なるタンパク質スポットは自動スポット回収装置で回収し、一部については質量分析による同定実験を実施した。

(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、検体の個人情報が出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手術検体を用いた。

C. 研究結果

合計 82 検体（腫瘍組織 42 検体、非腫瘍組織 40 検体）を対象に、蛍光二次元電気泳動法を実施した。合計 1734 スポットを観察した。そのうち、正常組織と腫瘍組織の間で発現強度に差

のあったスポット ($p < 0.05$ 、群間平均 2 倍以上) は 61 個あった。61 個のタンパク質スポットを切り取り、一部はペプチド抽出を行いタンパク質同定を実施した。

D. 考察

正常組織と腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質スポットを特定した。これらのタンパク質スポットに含まれるタンパク質が、本研究の目的とするバイオマーカーあるいは創薬標的分子となりうるかどうかを検討することが今後の課題である。

E. 結論

当初の計画通り、正常組織と腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質スポットを同定することができた。平成 22 年度は対応するタンパク質の同定を質量分析装置にて行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuta K, Tochigi N, Saito S, Shimoda T, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Suehara Y, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2010; 4, 560-7.

2. Kikuta K, Gotoh M, Kanda T, Tochigi N, Shimoda T, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Suehara Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Pfetin as a prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor: novel monoclonal antibody and external validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol.* 2010; 40(1):60-72.
3. Kondo T. Cancer proteome-expression database: Genome Medicine Database of Japan Proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7(1):21-7.
4. Harada C, Tajima H, Hirohashi S, Kondo T. Toward high throughput western blotting using vacuum-driven system and laser scanner: comparison between two signal detection methods based on chemiluminescent and immunofluorescent imaging. *J Electrophoresis* 2009; 53, 63-6.
5. Kikuta K, Tsunehiro Y, Yoshida A, Tochigi N, Hirohashi S, Kawai A, Kondo T. Proteome expression databases of Ewing sarcoma: a segment of the Genome Medicine Database of Japan Proteomics. *J Proteomics Bioinform.* 2009; 2, 500-4.
6. Kosaihiro S, Tsunehiro Y, Tsuta K, Tochigi N, Gemma A, Hirohashi S, Kondo T. Proteome expression databases of lung adenocarcinoma: a segment of the Genome Medicine Database of Japan Proteomics. *J Proteomics Bioinform.* 2009; 2(11), 463-5.
7. Suehara Y, Kikuta K, Nakayam R, Fujii K, Ichikawa H, Shibata T, Seki K, Hasegawa T, Gotoh , Tochigi N, Shimoda T, Shimada Y, Sano T, Beppu Y, Kurosawa H, Hirohashi S, Kawai A, Kondo T. Anatomic site-specific proteomic signatures of gastrointestinal stromal tumors. *Proteomics Clin Appl.* 2009; 3, 584-96.
8. Suehara Y, Kikuta K, Nakayam R, Tochigi N, Seki K, Ichikawa H, Fujii K, Hasegawa T, Shimoda T, Kurosawa H, Chuman H, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. GST-P1 as a histological biomarker of synovial sarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2009; 3, 623-34.
9. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, Nagino M, Hirohashi S, Kondo T. Antibody-based proteomics for esophageal cancer: Identification of proteins in the nuclear factor-kappaB pathway and mitotic checkpoint. *Cancer Sci.* 2009;100(9):1612-22.
10. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, Saito S, Nagino M, Hirohashi S, Kondo T. Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics. *Int J Cancer.* 2009; 124(9):2106-15.

2. 学会発表

1. 「Pfetin, as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor revealed by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and validated by antibody」ヨーロッパプロテオーム学会、ストックホルム、スウェーデン
2. 「Cancer proteomics for biomarker development toward personalized medicine」中国プロテオーム学会、中国
3. 「Cancer proteomics for biomarker development for personalized medicine」Europe Biomarker Summit、バルセロナ、スペイン
4. 「Cancer proteomics for biomarker development; lesson from 10,000 gels of two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and launch for antibody-based proteomics」Clinical and Translational Research on Cancer; Glycomic Applications、志摩
5. 「Cancer proteomics for biomarker study toward personalized medicine」International Congress of Amino Acids, Peptides, and Proteins、ウィーン、オーストリア
6. 「Nucleophosmin as a prognostic biomarker of Ewing sarcoma revealed by proteomics」Human Proteome Organization VIII World Congress、トロント、カナダ
7. 「Cancer proteomics for biomarker development」第68回日本癌学会、横浜
8. 「プロテオーム解析によるがんバイオマーカー開発」第42回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、横浜
9. 「プロテオーム解析によるがんバイオマーカー開発」第82回生化学会シンポジウム、神戸
10. 「プロテオーム解析によるがん術後の転移再発を予測するためのバイオマーカー開発」創薬イノベーションフォーラム、東京
11. 「10,000枚の2D-DIGEから学ぶこと」日本プロテオーム機構第7回大会、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

- 1) 発明の名称：「ペロキシレドキシシン2の使用、骨肉腫の化学療法奏効性の予測方法及び検査試薬キット」
- ①発明者：近藤格、菊田一貴、川井章、廣橋説雄
- ②出願日：2009年9月15日
- ③出願番号：特願2009-213605
- ④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
- ⑤発明の内容の概略：ペロキシレドキシシン2の発現レベルを測定することで、その後の化学療法の奏効性を予測できることを見出した。

2) 発明の名称：「セセルニン-1の使用、滑膜肉腫の予後予測方法及び検査用試薬キット」

①発明者：近藤格、川井章、末原義之

②出願日：2010年12月16日

③出願番号：特願2009-285045

④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

⑤発明の内容の概略：セセルニン-1の発現レベルを腫瘍組織において測定することで、術後の再発・生存を予測できることを見出した。

3) 発明の名称：「CapGをマーカーとする悪性腫瘍の予後予測検査方法」

①発明者：近藤格、尾島英知、諸藤教彰

②出願日：2010年3月30日

③出願番号：特願2010-076804

④出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

⑤発明の内容の概略：CapGの発現レベルを腫瘍組織において測定することで、その後の化学療法の奏効性を予測できることを見出した。

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

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

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

	氏名	所属	職名
分担研究者	中山敬一	九州大学生体防御医学研究所	教授

研究要旨

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結びつくタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用やリン酸化等の翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。この中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他の技術に比べて極端に開発が遅れており、これを可能にする画期的な技術の確立が渴望されている。われわれはリン酸化修飾に対する絶対的定量法の確立するため、現在最も有効であると思われる、三連四重極型質量分析計を用いたターゲットプロテオームアプローチを開発してきた。その結果、質量分析による定量的プロテオミクスであるMRM法を用いてリン酸化タンパク質を定量するというPhospho-mTRAQ法技術の基盤を確立した。この技術によってリン酸化の絶対定量が原理的には可能になり、将来的にバイオマーカー探索に利用できる技術基盤を確立した。

A. 研究目的

リン酸化ペプチドの精製は質量分析計によるリン酸化部位の同定のためには欠かすことのできない技術である。昨年までわれわれは、金属アフィニティークロマトグラフィーや酸化チタンを用いたリン酸化ペプチドの精製技術を確立し、おもにSILAC法やiTRAQ法によってリン酸化ペプチド

の定量解析を行ってきた。このようなショットガン解析やラベルフリー定量解析などを行った際、同定されてきたタンパク質はその後より多検体を用いたり、あるいは条件を変えたりして評価実験を行う必要がある。その際、評価対象のタンパク質が数個ならば全てに対して抗リン酸化抗体を作製し、ELISAやWestern blottingなどを

用いて評価実験を行うことが可能である。しかしながら、一般にプロテオーム解析では複数の（場合によっては数百種類）候補が解析対象として見出されてくる。このような場合は全てに対する抗体を作製して評価実験を行うことは非現実的である。したがって、文献情報などの知識を用いて解析対象を狭めるのが普通であるが、そこにはどうしても解析者のバイアスが混入し、客観的な評価ができない恐れがある。そもそもプロテオーム解析のような網羅的解析は特定の分子に固執することで見落とされてきた複数の遺伝子あるいはタンパク質によって構成されるネットワークとしての機能をあぶりだすことを目的としている。したがって、複数のタンパク質の定量データをハイスループットに取得することが肝心である。

このような目的のために、われわれは三連四重極型質量分析計の定量用測定モードであるMRM (Multiple reaction monitoring) [あるいはSRM (Selected reaction monitoring)とも呼ばれる]を利用してリン酸化ペプチドの絶対定量法の確立を行った。

MRM法はQ1にてプリカーサーイオンの選択、Q2にてCIDによる開裂、Q3にてプロダクトイオンを選択・検出する(このとき設定したQ1/Q3の組み合わせをtransitionと呼ぶ)。したがって、MRM法では測定したいペプチドの質量とその部分質量を前もって知っておく必要がある。これにはショットガン解析において得られるMS/MSスペ

クトルが利用される。つまり、代表的な試料でショットガン解析を行うことで候補ペプチドを同定し、このペプチドに対するtransitionを設定することで様々な試料中のペプチドの定量を行うことになる。MRM法は感度が高いことと、三連四重極型の質量分析計を用いるためダイナミックレンジが広いことが最大の利点であるが、近年では高感度化に伴い一つのtransitionの取得時間が短縮されたことで一度のLCで解析できるtransition数が数千まで増えているおり、大規模な解析にも利用可能な新技術として注目されている。

本研究ではタンパク質のリン酸化を大規模に多点定量するための方法論の確立と実際の難治がんの創薬に対する新規バイオマーカー探索への応用の可能性を探索した。

B. 研究方法

一定時間EGFで刺激したHeLa細胞抽出物をトリプシン消化し、脱塩後、IMACによるリン酸化ペプチドの精製を行った。内部標準としてEGFレセプター、Erk1、Erk2のリン酸化部位に対応するリン酸化ペプチドを合成し、加えた。得られたリン酸化ペプチドをそれぞれ113と117のmTRAQ試薬で標識し、混合した。1/20量の標識ペプチドを遠心濃縮し、0.5% TFAに再溶解後、STAGE tipにて脱塩を行った。再度遠心濃縮した後、0.1% TFA/2%アセトニトリルに溶かして1/2量をQTRAP5500

にて分析した。

(倫理面への配慮)

本研究においてはヒトサンプルを扱っておらず、特に倫理面に関する問題点はない。

C. 研究結果

EGF 刺激した HeLa 細胞抽出液に含まれるリン酸化ペプチドの絶対量を MRM によって決定した。特に EGF レセプター分子や Erk1/2 について詳細な解析を行った。その結果、EGF レセプターのある部位は EGF 添加直後から高度のリン酸化を示すのに対して、それ以外の部位では非常にゆっくりとリン酸化が起こることがわかった。一方で Erk1 や Erk2 のリン酸化は EGF 刺激から数百秒遅れて最大値を取り、明らかに EGF レセプターよりも遅い時間特性を有することが明らかとなった。

しかし MRM による定量法にはいくつかの問題点があることも判明した。

1) ノイズの問題

複雑な試料では Q1/Q3 のフィルターを通過するものが多数存在する。MRM 法では通常一つの Q1 に対して複数の Q3 を設定し、そのクロマトグラムのパターンが一致することを根拠に目的のペプチドとして認定する。しかしながら、現実的には多くのノイズが含まれ、非常に慎重な検証が必要である。これは本来のペプチドの複雑さに加えて、多価イオンによる見かけ上の成

分数の増加、酵素消化における切れ残りや翻訳後修飾による多様化などゲノム配列からの予想以上の複雑さを呈しているためであると考えられる。さらに、四重極型の装置を使っている限りそのフィルターはある程度の幅を持っていることになり、質量が設定値から外れていても、強度が著しく大きい場合はピークの裾がフィルターの幅の中に入ってくる。MRM では厳密にはマスペクトルを取得しているわけではなく、ある程度の幅を持ったフィルターを通過してきたイオンをまとめて検出することになるので、そこに微妙に異なる(四重極フィルターの分解能で区別できない)複数のイオンが入ってきても一つのシグナルとして計上してしまう。この問題の解決法として最も簡単なことは、リテンションタイムを事前に取得しておき、Q1/Q3 の情報に加えてリテンションタイムもピーク識別の情報として利用することである。また、Q3 をイオントラップとして利用できる装置であれば、MRM シグナルを引き金とした MS/MS 解析も可能であり、これによって確認できることになっている。しかしながら、リテンションタイムが近接した領域に二つのピークが出現することや、複雑な試料の中では MS/MS スペクトルの質が悪くなり同定不可能であることが多いなどの問題があり、現実的には安定同位体標識を施した内部標準をスパイクすることが現時点でできる最も有効な対策である。

2) イオンサプレッションの問題

ショットガン解析では試料を多次元に分画することで網羅性を上げることが日常的に行われている。つまり、網羅性を上げるためにスループットを犠牲にしているわけである。一方、MRM法では目的ペプチドを選択的に検出するため、試料の分画をすることなくダイレクトにLCに打ち込んで定量できるのが利点であり、このためスループットが高いと考えられている。しかしながら、分画しない試料は数十万成分を含む超複雑系のマトリックスであり、そのようなものが全てイオン化するわけではない。MRM法で評品試料を測定した場合は数十 amol のペプチドでも容易に検出できる感度を持っているが、これが実試料中に含まれると1桁以上感度低下が起きる。1桁の感度低下と考えると、10 amol で検出されていたペプチドはその10倍量装置に導入しないと検出されなくなる。また導入量を10倍上げれば単純に検出できるわけではなく、場合によってはさらなるイオン化抑制が起き、少ない導入量で検出できていたペプチドすら検出できなくなる。このように、MRM法では目的ペプチドの導入量が検出感度の下限を超えており、かつイオン化抑制が極力少なくなるような導入量を見出さないと実試料中の微量成分の検出は不可能である。

3) 装置汚染の問題

MRM法は一般に非常に複雑な試料をハイスループットに解析することを目的としているため、装置の汚染が生じやすい。また、複数試料の連続測定

ではキャリーオーバーの問題が深刻である。われわれがテストした限りでは、フル感度の条件で評品ペプチド10 fmol を測定すると、その後20回以上ブランクの測定をしても完全に評品ペプチドのシグナルが消失することはなかった。さらに厄介なことに、20回洗浄後、数時間放置し、さらに再度ブランクを測定すると、再度強いシグナルが検出されたこともあり、バルブや配管・カラムへの残留が予想以上に大きいことが判っている。実際は複雑な試料を測定する場合はこのような残留程度のペプチドが残っていたとしても、上述したイオン抑制によって実質検出されることはないが、実試料のサンプル間にブランクを20回以上挟むことも非現実的であるので、常にある程度のキャリーオーバーの影響を考慮しながら分析を行う必要がある。

D. 考察

今回、新しいターゲットプロテオミクスであるMRM技術を用いたPhospho-mTRAQ法を開発し、大規模なリン酸化の変動解析のために新しい技術基盤を確立した。MRM法は上述したように多数の問題点を抱えているが、現時点でMRM以外に複雑な試料中のタンパク質を直接的に検出できる方法は存在しない(もちろんウェスタンブロットなど抗体を用いた方法は別であるが)。MRM法は本来低分子の定量解析のための手段として用いられてきたものであり、ペプチド解析への

アプリケーションは始まったばかりである。さらに、装置に関してもプロテオームの解析にMRMを利用することを想定して開発されておらず、現行の装置でのペプチドMRMの実行はかなり挑戦的な取り組みである。今後、複雑な試料へ対応を想定した装置の開発やアプリケーションの開発によってMRM法が実用レベル（現時点でもある意味実用レベルではあるが、プロテオーム解析での真の実用化を意味する）に到達した際には、基礎生命科学はもとより臨床医学における診断や予後判定等に利用され、タンパク質に関する研究法にパラダイムシフトが起きることは必至であろう。われわれは、プロテオーム解析におけるMRM法を実用化するために、前処理法の開発やイオン源の改良などを日々行っており、必ず近い将来MRM法をベースとしたプロテオーム解析が可能になると信じている。今後、Phospho-mTRAQ法は様々なプロテオミクスのアプリケーションに取り入れられる定量法となることが十分に期待される。

E. 結論

質量分析による定量的プロテオミクスであるMRM法を用いてリン酸化タンパク質を定量するというPhospho-mTRAQ法技術の基盤を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsukada, Y., Ishitani, T., Nakayama, K. I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, 24: 432-437 (2010).
2. Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 9: 3549-3563 (2009).
3. Lin, H. K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S. W., Chan, C. H., Yang, W. L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K. I., Cordon-Cardo, C., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P. P.: Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature*, 464: 374-379 (2010).
4. Lin, H. K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C. H., Yang, W. L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K. I., Nimer, S., Tempst, P., Pandolfi, P. P.: Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and

- oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biol.*, 11: 420-432 (2009).
5. Wang, H., Bauzon, F., Ji, P., Xu, X., Sun, D., Locker, J., Sellers, R. S., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Cobrinik, D., Zhu, L.: Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1^{+/-} mice. *Nature Genet.*, 42: 83-88 (2010).
 6. Chan, C. H., Lee, S. W., Li, C. F., Wang, J., Yang, W. L., Wu, C. Y., Wu, J., Nakayama, K. I., Kang, H. Y., Huang, H. Y., Hung, M. C., Pandolfi, P. P., Lin, H. K.: Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.*, in press. (2010).
 7. Saiga, T., Fukuda, T., Matsumoto, M., Tada, H., Okano, H. J., Okano, H., Nakayama, K. I.: Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development. *Mol. Cell Biol.*, 29: 3529-3543 (2009).
 8. Saita, S., Shirane, M., Natume, T., Iemura, S., Nakayama, K. I.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J. Biol. Chem.*, 284: 13766-13777 (2009).
 9. Kimura, T., Sakai, M., Tabu, K., Wang, L., Tsunematsu, R., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K., Nishihara, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ladanyi, M., Tanaka, S., Nakayama, K. I.: Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.*, 89: 645-656 (2009).
 10. Susaki, E., Kaneko-Oshikawa, C., Miyata, K., Tabata, M., Yamada, T., Oike, Y., Katagiri, H., Nakayama, K. I.: Increased E4 activity in mice leads to Ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity. *J. Biol. Chem.*, in press. (2010).
 11. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., Nakayama, K. I.: Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press. (2010).
 12. Tsukuba, T., Yanagawa, M., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yasuda, Y., Nakayama, K. I., Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J. Biochem.*, 145: 565-573 (2009).
 13. Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Onoyama, I., Fukagawa, T., Kuwano, H., Nakayama, K. I., Mori, M.: p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis

- in gastric cancer cases. *Cancer Res.*, 69: 3788-3794 (2009).
14. Mitra, P., Ghule, P. N., van der Deen, M., Medina, R., Xie, R. L., Holmes, W. F., Ye, X., Nakayama, K. I., Harper, J. W., Stein, J. L., Stein, G. S., van Wijnen, A. J.: CDK inhibitors selectively diminish cell cycle controlled activation of the histone H4 gene promoter by p220NPAT and HiNF-P. *J. Cell Physiol.*, 219: 438-448 (2009).
 15. Zhang, J., Hung, A. C., Ng, P. Y., Nakayama, K. I., Hu, Y., Li, B., Porter, A. G., Dhakshinamoorthy, S.: PKC δ mediates Nrf2-dependent protection of neuronal cells from NO-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386: 750-756 (2009).
 16. Jiang, X., Austin, P. F., Niederhoff, R. A., Manson, S. R., Riehm, J. J., Cook, B. L., Pengue, G., Chitale, K., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Weintraub, S. J.: Mechanoregulation of proliferation. *Mol. Cell Biol.*, 29: 5104-5114 (2009).
 17. Bohgaki, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K. I., Okumura, F., Hatakeyama, S., Koike, T.: Plasma gelsolin facilitates interaction between β_2 glycoprotein I and $\alpha_5\beta_1$ integrin. *J. Cell. Mol. Med.*, in press. (2009).
 18. Matsuda, M., Tsutsumi, K., Kanematsu, T., Fukami, K., Terada, Y., Takenawa, T., Nakayama, K. I., Hirata, M.: Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol. Reprod.*, 81: 681-689 (2009).
 19. Wu, Y. J., Sala-Newby, G. B., Shu, K. T., Yeh, H. I., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Newby, A. C., Bond, M.: S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2) promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in vivo. *J. Vasc. Surg.*, 50: 1135-1142 (2009).
 20. Ranchal, I., Gonzalez, R., Bello, R. I., Ferrin, G., Hidalgo, A. B., Linares, C. I., Aguilar-Melero, P., Gonzalez-Rubio, S., Barrera, P., Marchal, T., Nakayama, K. I., de la Mata, M., Muntane, J.: The reduction of cell death and proliferation by p27^{Kip1} minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity. *Int. J. Cancer*, 125: 2270-2280 (2009).
 21. Oyamada, A., Ikebe, H., Itsumi, M., Saiwai, H., Okada, S., Shimoda, K., Iwakura, Y., Nakayama, K. I., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y., Yamada, H.: Tyrosine kinase 2 plays critical roles in the pathogenic CD4 T cell responses for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 183: 7539-7546 (2009).
 22. Tada, H., Okano, H. J., Takagi, H., Shibata, S., Yao, I., Matsumoto, M.,

- Saiga, T., Nakayama, K. I., Kashima, H., Takahashi, T., Setou, M., Okano, H.: Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J. Biol. Chem.*, 285: 3840-3849 (2010).
23. Fujii, M., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K. I., Moss, S. J., Nabekura, J., Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.*, 285: 4837-4846 (2010).
24. Old, J. B., Kratzat, S., Hoellein, A., Graf, S., Nilsson, J. A., Nilsson, L., Nakayama, K. I., Peschel, C., Cleveland, J. L., Keller, U. B.: Skp2 directs Myc-mediated suppression of p27^{Kip1} yet has modest effects on Myc-driven lymphomagenesis. *Mol. Cancer Res.*, 8: 353-362 (2010).
25. Masuda, K., Ishikawa, Y., Onoyama, I., Unno, M., de Alboran, I. M., Nakayama, K. I., Nakayama, K.: Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene*, 29: 1798-1809 (2010).
26. Iwatsuki, M., Mimori, K., Ishii, H., Yokobori, T., Takatsuno, Y., Sato, T., Toh, H., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Baba, H., Mori, M.: Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int. J. Cancer*, 126: 1828-1837 (2010).
27. Ma, H., Byra, E. A., Yu, L., Hu, N., Kitagawa, K., Nakayama, K. I., Kawamoto, T., Ren, J.: Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: Role of protein phosphatases. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, in press. (2010).
28. Tanaka, S., Wakeyama, H., Akiyama, T., Takahashi, K., Amano, H., Nakayama, K. I., Nakamura, K.: Regulation of osteoclast apoptosis by bcl-2 family protein bim and caspase-3. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 658: 111-116 (2010).
29. Mizokami, A., Tanaka, H., Ishibashi, H., Umebayashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K. I., Yokoyama, T., Nabekura, J., Kanematsu, T., Hirata, M.: GABA_A receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. *J. Neurochem.*, in press. (2010).
30. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K. I., Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.*, in press. (2010).
2. 学会発表

1. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by differential proteomics. *The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest*. (Invited speaker) Onna, Okinawa, Japan. 12/2 (2009).
2. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting. *5th Global-COE International Symposium: Cell cycle and differentiation*. (Invited speaker) Singapore. 2/24 (2010).
3. Saita, S., Shirane, M., Nakayama, K.I.: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with VAMP-associated protein (VAP). *5th Global-COE International Symposium: Cell cycle and differentiation*. Singapore. 2/24 (2010).
4. Nakayama, K.I.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting. *Biology of the ubiquitin and the ubiquitin-like systems*. (Invited speaker) Jerusalem. 3/14 (2010).
5. 中山敬一: 細胞周期への出入りを制御するユビキチンリガーゼ群. *日本分子生物学会第9回春季シンポジウム: 分子生物学の新たな胎動ー宮崎からの黎明の曙光ー*. (招待講演) 宮崎. 5/11 (2009).
6. 中山敬一: プロテオミクスが拓くユビキチン研究の新地平: 酵素-基質関係の網羅的解明に向けて. *千里ライフサイエンスセミナー「ユビキチン研究の新展開: 病態生理学的観点から」*. (招待講演) 大阪. 9/7 (2009).
7. 中山敬一: プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロットティングは要らない?! *第29回日本糖質学会年会*. (シンポジウム) 高山. 9/11 (2009).
8. 中山敬一: プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: リン酸化とユビキチン化に関する網羅的解析. *第82回日本生化学会大会*. (シンポジウム) 神戸. 10/21 (2009).
9. 中山敬一: 最新プロテオミクス技術による酵素-基質関係の網羅的解明. *プロテオミクス・構造生物学講演会*. (特別講演) 東京. 11/2 (2009).
10. 中山敬一: プロテオミクスが拓く生命科学研究: もうウェスタンブロットティングは要らない!?. *第3回 FANTASY*. (特別講演) 東京. 2/6 (2010).
11. 中山敬一: 細胞増殖をコントロールする分子機構: その破綻としての発癌. *第6回日本消化管学会総会学術総会*. (招待講演) 福岡. 2/19 (2010).
12. 白根道子, 中山敬一: Protrudin 依存的な小胞輸送によるシナプス制御

- と神経障害. **第32回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 横浜. 12/10 (2009).
13. 西山正章, 中山敬一: 初期発生において p53 機能を抑制するクロマチンリモデリング因子 CHD8. **第32回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 横浜. 12/11 (2009).
14. 青山慧, 石川善則, 小野山一郎, 中山敬一, 中山啓子: ユビキチンリガーゼ SCFFbxw7 は Notch タンパク質分解により B 細胞の分化を制御する. **第32回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 横浜. 12/10 (2009).
15. 三輪正直, 山田真生, 津田雅貴, 虫明正敏, 中山啓子, 中山敬一, 藤澤順一, 田中正和: DNA 損傷で誘導される中心体増幅の新しいシグナル経路. **第68回日本癌学会学術総会**. (口頭発表) 横浜. 10/1 (2009).
16. 松本有樹修, 洲崎悦生, 小野山一郎, 中山敬一: 細胞周期抑制因子 p57 は小脳発生に必須の役割を担う. **第32回日本分子生物学会年会**. 横浜. 12/10 (2009).
17. 洲崎悦生, 金子-押川千恵, 宮田敬士, 田畑光久, 尾池雄一, 山田哲也, 片桐秀樹, 中山敬一: E4 経路の過剰な活性化は視床下部摂食中枢の神経障害と肥満を誘発する. **第32回日本分子生物学会年会**. 横浜. 12/11 (2009).
18. 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ユビキチンリガーゼ基質の網羅的な同定. **第32回日本分子生物学会年会**. 横浜. 12/11 (2009).
19. 松崎英美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一: Protrudin は KIF5 との相互作用を介して神経機能を制御する. **第32回日本分子生物学会年会**. 横浜. 12/12 (2009).
20. 東田裕一, 石谷太, 中山敬一: 新規二重特異性ヒストン脱メチル化酵素 KDM7 は脳の発生に関与する. **第32回日本分子生物学会年会**. 横浜. 12/12 (2009).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

中山敬一, 松本雅記. 「タンパク質の定量方法」(出願人 国立大学法人九州大学) 特願 2009-169045. 2009/7/17.
 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」

氏名	所属	職名
分担研究者 工藤雅文、竹内雅博	アステラス製薬	室長、専任理事

研究要旨

肝細胞癌での有用性の高い（発現の高特異性・高頻度、癌細胞増殖・生存に関わる機能を有する）創薬バイオマーカー探索を目的に、国立がんセンターで取得された肝細胞癌症例50例における腫瘍組織と非腫瘍組織のエキソンアレイデータを用いて、腫瘍組織で特異的なエキソン発現異常を示す蛋白質キナーゼ遺伝子の探索、解析を実施してきた。また、スキルス胃癌での同様な創薬バイオマーカー探索を目的に、国立がんセンターで取得された17株の胃癌細胞株のエキソンアレイデータを用いて、エキソン発現異常を示す蛋白質キナーゼ遺伝子の探索、解析を実施してきた。

A. 研究目的

肝細胞癌は本邦では悪性腫瘍死の第4位を占める。肝細胞癌の5年生存率は40%程度と不良である。また、スキルス胃癌は若年者に多く、進行が早く早期発見が困難な癌である。両癌ともに治療成績の向上を目指した診断法と治療法の早期開発が望まれる。

高頻度に腫瘍組織特異的に発現し、癌細胞の増殖・生存に関わる可能性のある遺伝子は診断のためのバイオマーカー候補であると同時に、治療標的候補となる可能性がある。本邦での非小細胞肺癌におけるEML4-ALK融合変異キナーゼの発見以来、特定癌種での診断マーカー且つ治療標的として、融合キナーゼを含む構造・配列変異キナーゼを種々の解析方法を用いて探索

することが世界的に盛んになってきた。

本研究では国立がんセンターで手術を受けた肝細胞癌症例の手術検体のエクソンアレイデータを用いて、腫瘍組織で特異的なエキソン発現異常を示すことを指標に、蛋白質キナーゼの融合変異・スプライシングバリエントを探索し、新たな診断且つ治療に有用な標的分子の同定を目的とする。

また、スキルス胃癌に関しては治療標的としての機能検証実施を優先し、17株の細胞株のエキソンアレイデータを国立がんセンターで取得し、そのデータ解析より蛋白質キナーゼの融合変異・スプライシングバリエントを探索し、新たな診断且つ治療に有用な標的分子の同定を目的とする。

B. 研究方法

国立がんセンターで取得された肝細胞癌症例 50 例における腫瘍組織と非腫瘍組織のエキソンアレイデータおよび 17 株の胃癌細胞株のエキソンアレイデータを、アステラス製薬において PAC 解析法 (Schutte et al. *PLoS ONE*, Vol. 3, 1-8 (2008)) により、前者は腫瘍組織に特異的なエキソン発現異常を示す蛋白質キナーゼ遺伝子を、後者は特定株でのエキソン発現異常を示す蛋白質キナーゼ遺伝子を抽出し、qPCR 法等による発現確認・コピー数推定・正常組織発現検討、5' -RACE クローニングと塩基配列解析による構造決定を実施した。

(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、検体の個人情報が出ることがな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手術検体を用いた。また、本共同研究は国立がんセンターの倫理委員会およびアステラス製薬の倫理委員会において審査・承認された。

C. 研究結果

肝細胞癌症例 50 例のエキソンアレイデータの PAC 解析法により、蛋白質キナーゼ 9 種のエキソン発現異常が予備的に抽出された。当該遺伝子の 5' -RACE クローニングおよび塩基配列決定により、融合変異は検出されなかったが、蛋白質キナーゼ A、蛋白質

キナーゼ B のキナーゼドメインを有する新規スプライシングバリエーションの発現可能性が示唆された。前者は qPCR 法により肝細胞癌症例の腫瘍組織特異的 (16 例/50 例) 発現を確認したが (図 1)、正常組織においても脳、脾臓等での有意な発現が認められた (図 2)。後者は qPCR 法では野生型と区別できなかったため、RT-PCR 法により肝細胞癌症例の 2 例の腫瘍組織のみで発現が確認されたが、低コピー発現が示唆された (図 3)。

胃癌細胞株 17 種 (HSC27, HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60, HSC64, AZ521-2, MKN45, NUGC2, NUGC3, NUGC4, TGBC, OKAJIMA, KatoIII) のエキソンアレイデータの PAC 解析より蛋白質キナーゼ 5 種のエキソン発現異常が予備的に抽出された。当該遺伝子の 5' -RACE クローニングおよび塩基配列決定により、融合変異は検出されなかったが、蛋白質キナーゼ C、蛋白質キナーゼ D のキナーゼドメインを有する新規スプライシングバリエーションの発現可能性が示唆された。前者は野生型遺伝子も発現する KatoIII 株で検出され、後者は野生型遺伝子を発現していない NUGC2 細胞株で検出された。癌細胞での増殖・生存への機能的寄与の可能性を検討するために、野生型および新規スプライシングバリエーション候補の区別なく上記遺伝子の発現を十分抑制できる (80% 以上の発現抑制) siRNA を選定し、KatoIII 株あるいは NUGC2 株において細胞増殖への影響を検討したが、有意

な増殖抑制は認められなかった。

D. 考察

肝細胞癌症例50例のエキソンアレイデータを基に見出された、蛋白質キナーゼAの新規スプライシングバリエーション候補は肝細胞癌症例では腫瘍発現特異性が高かったが、脳、脾臓等の正常組織においても有意に検出されたため、癌特異的な増殖亢進能が期待されず、診断マーカー・治療標的としての可能性は低いと判断した。また、蛋白質キナーゼBの新規スプライシングバリエーション候補は、肝細胞癌症例2例の腫瘍組織でのみ検出され、また低コピー発現が示唆されたため、診断マーカー・治療標的としての可能性は低いと判断した。

胃癌細胞株17種のエキソンアレイデータを基に見出された蛋白質キナーゼC、蛋白質キナーゼDの新規スプライシングバリエーション候補は、内在発現を示す細胞株での機能検証実験より治療標的候補としての可能性が無いと判断し、臨床サンプルでの発現検討等の解析は実施しないこととした。

E. 結論

エキソンアレイデータ解析によるエキソン発現異常を検出する方法論は構築できた。しかしながら、エキソンアレイでは false-positive 1 次データも多く、更に効率的且つ網羅的な解析手段の検討と、それを用いた癌種特異的な異常を探索する必要があると結論した。そこで次年度は次世代シー

クエンサーデータ解析による融合遺伝子の網羅的抽出、特定分子種の点変異解析方法の確立と実践を国立がんセンターと共同で対応する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

図 1

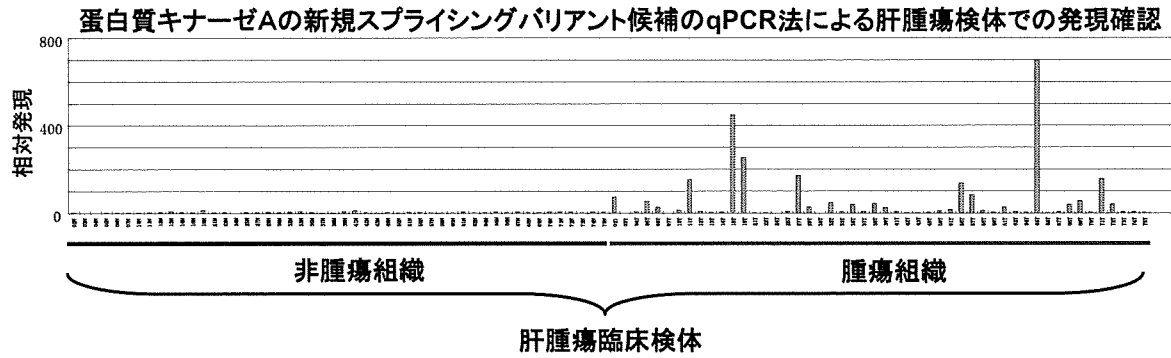


図 2

蛋白質キナーゼAの新規スプライシングバリエント候補のqPCR法による正常組織種での発現検討

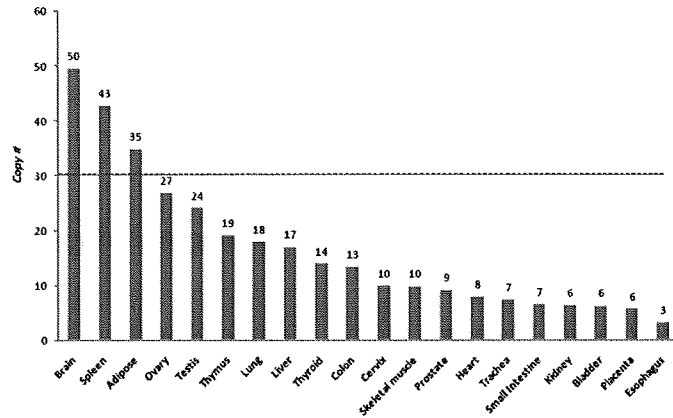
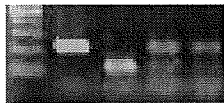


図 3

蛋白質キナーゼBの新規スプライシングバリエント候補のRT-PCR法による発現検討

1) 2) 3) 4)



- 1) ゲノムDNA
- 2) クローニングした新規スプライシング候補
- 3) 肝腫瘍検体 51T腫瘍組織
- 4) 肝腫瘍検体 71T腫瘍組織

別紙 5 研究成果の刊行に関する一覧表

Combined Functional Genome Survey of Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma

Reiko Satow, Miki Shitashige, Yae Kanai, Fumitaka Takeshita, Hidenori Ojima, Takafumi Jigami, Kazufumi Honda, Tomoo Kosuge, Takahiro Ochiya, Setsuo Hirohashi, and Tesshi Yamada

Clin Cancer Res, Vol. 16, No.9, pp.2518–28, 2010.

Reduced Argininosuccinate Synthetase Is a Predictive Biomarker for the Development of Pulmonary Metastasis in Patients with Osteosarcoma

Eisuke Kobayashi, Mari Masuda, Robert Nakayama, Hitoshi Ichikawa, Reiko Satow, Miki Shitashige, Kazufumi Honda, Umio Yamaguchi, Ayako Shoji, Naobumi Tochigi, Hideo Morioka, Yoshiaki Toyama, Setsuo Hirohashi, Akira Kawai, and Tesshi Yamada

Mol Cancer Ther, Vol. 9, No.3, pp.535–44, 2010.

Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma

Eri Arai¹, Saori Ushijima¹, Masahiro Gotoh, Hidenori Ojima, Tomoo Kosuge, Fumie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, and Yae Kanai

Int J Cancer, Vol. 125, No. 12, pp. 2854-2862, 2009.

Nucleophosmin as a Candidate Prognostic Biomarker of Ewing's Sarcoma Revealed by Proteomics

Kazutaka Kikuta, Naobumi Tochigi, Tadakazu Shimoda, Hiroki Yabe, Hideo Morioka, Yoshiaki Toyama, Ako Hosono, Yasuo Beppu, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, and Tadashi Kondo

Clin Cancer Res, Vol. 15, No.8, pp.2885–94, 2009.

Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics

Norihisa Uemura, Yukihiko Nakanishi, Hoichi Kato, Shigeru Saito, Masato Nagino, Setsuo Hirohashi, and Tadashi Kondo

Int J Cancer, Vol. 124, No. 9, pp. 2106-15, 2009.

KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development

Yu-ichi Tsukada, Tohru Ishitani, and Keiichi I. Nakayama

Genes Development, Vol. 24, No. 5, pp. 432-7, 2010.

***Skp2* targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence**

Hui-Kuan Lin, Zhenbang Chen, Guocan Wang, Caterina Nardella, Szu-Wei Lee, Chan-Hsin Chan, Wei-Lei Yang, Jing Wang, Ainara Egia, Keiichi I. Nakayama, Carlos Cordon-Cardo, Julie Teruya-Feldstein, and Pier Paolo Pandolfi

Nature, Vol. 464, No. 7284, pp. 374-9, 2010.