

200909010A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成21年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 22 (2010) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
疾患関連創薬バイオマーカー探索研究	1
山西 弘一	
II. 分担研究報告	
1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模な バイオマーカーの探索と機能解析	28
朝長 毅	
2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究： 抗体プロテオミクスによる肺がんバイオマーカーの探索	37
堤 康央	
3. プロテオミクス手法による卵巣明細胞腺癌の抗癌剤抵抗性分子の 同定と機序の解明に関する研究	47
仲 哲治	
4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の 開発とバイオマーカー探索への応用	55
中山 敬一	
5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用： リン酸化タンパク質分析技術の検討と卵巣明細胞腺がんバイオマーカー	62
平野 久	
6. 2DICAL法に関する微量タンパク質解析技術の研究	70
尾野 雅哉	
7. 循環器疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究	73
寒川 賢治、南野 直人	
8. 精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究	78
高坂 新一	
9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索	81
加藤 菊也	
10. 血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究： 血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用	85
野村 文夫	
11. 脳腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究： 統合プロテオミクスによる抗がん剤感受性に関わる 脳腫瘍細胞内シグナルの解析	88
荒木 令江	
12. 自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究	100
中村 和行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	106
IV. 研究成果の刊行物・別刷	118

## 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

研究代表者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 研究所長

### 研究要旨

疾患関連バイオマーカーの発見には疾患の根本的な原因であるタンパク質の異常を見つけることが必須であり、ヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス研究が重要である。本研究では、がん、生活習慣病、神経疾患等を対象とした疾患バイオマーカーの開発を目的とする。

本年度は、ヒト疾患試料を用いて以下の研究を実施したので報告する。

#### 1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と機能解析：朝長 毅

この研究課題の第1期にあたるプロテオームファクトリープロジェクト（平成15～19年度：大阪市西淀川区）から医薬基盤研究所に移設した機器を整備するとともに、今年度新たに設置した6台の最新の次世代質量分析計を常時稼働できる体制を整えた。また、新しいプロジェクトリーダー、研究員を配備するとともに、日本のプロテオミクス研究の第一人者を数名研究分担者に加え、研究体制を一新した。その最新の質量分析計を用いて、同位体標識 iTRAQ 法や 2DICAL 法、MRM 法などバイオマーカー探索、同定、定量に必要な基盤技術を確立すると同時に、ヒト臨床検体を用いた大規模なバイオマーカー候補タンパク質の探索を開始した。同時にバイオマーカー候補タンパク質の検証のための機能解析実験も行った。

#### 2. 抗体プロテオミクスによる肺がんバイオマーカーの探索：堤 康央

プロテオミクス研究で得られる膨大な情報を創薬研究に有効活用するための基盤技術の開発を目的に、タンパク質の機能解析に最も有用で不可欠なモノクローナル抗体を利用し、創薬バイオマーカータンパク質を効率よく絞り込む方法としての「抗体プロテオミクス技術」の確立と応用を進めている。本技術は、プロテオミクス研究によって同定される多数の疾患関連タンパク質に対して、独自に構築したファージ抗体ライブラリを駆逐することで、僅か数週間で特異抗体を網羅的に作製し、更に、得られた抗体を組織マイクロアレイ解析に適用することで、多症例の臨床検体において候補タンパク質を一挙にバリデーションすることを可能とするものである。昨年度は、乳がんを解析対象疾患として、本技術の最適化を試みた。そこで本年度は、「抗体プロテオミクス技術」のさらなる最適化および有用性検証を目的に、肺がんを対象疾患として、発現変動タンパク質の同定と、それらに対する抗体の網羅的取得を試みた。その結果、2D-DIGE/MS 解析により転移性肺がん細胞株において高発現しているタンパク質を16種類同定すると同時に、ファージ抗体ライブラリを用いることで、それら全てに対する特異抗体を得ることができた。さらに、得られた抗体と組織マイクロアレイを用いた臨床サンプルでのバリデーションにより、肺がんバイオマーカータンパク質として有用な候補分子を絞り込むことができた。

#### 3. 卵巣明細胞腺がん薬剤耐性分子の同定と抗がん剤耐性機序の解析：仲 哲治

抗がん剤抵抗性として知られる卵巣明細胞腺がんと抗がん剤感受性として知られる卵巣漿液性腺がんの間で発現差を示すタンパク質を蛍光2次元ディファレンシャル電気泳動法(2Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis: 2D-DIGE 法)を用いて抗がん剤耐性分子の探索を試みた。その結果、卵巣明細胞腺がんを高発現する分子の一つとして Annexin A4 を同定した。Annexin A4 は漿液性腺がんと比較し、卵巣明細胞腺がんにおいて有意に高発現を示す事が免疫組織化学染色法及びウェスタンブロット法により明らかになった。さらに、Annexin A4 は漿液性腺がんにも強制発

現させることでカルボプラチンに対して抵抗性を誘導し、その機序として Annexin A4 がカルボプラチンの細胞内取り込み抑制と排出を促進することが細胞内カルボプラチンの定量解析により明らかになった。本研究結果から、Annexin A4 が抗がん剤耐性を克服する上で創薬標的となることが示唆された。

#### 4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用：中山敬一

有用なバイオマーカーの探索は、検体試料からいかに多くのタンパク質を同定・定量できる技術を開発するかという点にかかっているとんでも過言ではない。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いて網羅的・高感度にタンパク質を定量するストリームラインの開発を目指して基礎研究を行った。その結果、種々の新規技術を組み合わせて、非常に微量のタンパク質を絶対定量することに成功した。この技術は将来的に大深度プロテオミクス（ディープ・プロテオミクス）による網羅的バイオマーカー探索の道を拓くものである。

#### 5. リン酸化タンパク質分析技術の検討と卵巣明細胞腺がんバイオマーカー探索：平野 久

リン酸化タンパク質やそのリン酸化部位をハイスループットで網羅的に解析する方法を検討した。金属アフィニティー精製によってリン酸化ペプチドを濃縮し、LTQ-Orbitrap MS で解析すれば、1,500 以上のリン酸化タンパク質の同定、3,000 以上のリン酸化ペプチドの検出が可能であることが明らかになった。また、iTRAQ 法を併せて用いることによって、疾患に伴って発現が変動するリン酸化タンパク質を検出・同定することができた。しかし、iTRAQ でペプチドを標識すると同定できるリン酸化タンパク質の数は 1/3～1/4 に減少することがわかった。一方、質量分析ではリン酸化状態の異なる同一種のタンパク質を同定することは容易でない。そこで、リン酸化状態の異なる同一種のタンパク質を同定する方法に関して検討し、リン酸化アフィニティー電気泳動がリン酸化状態を解析する方法として優れていることを確認した。他方、卵巣明細胞腺がんの組織や培養細胞で検出される疾患関連タンパク質が血中で検出できないことが、診断マーカー開発の大きな壁になっている。そこで、がん細胞から分泌されるタンパク質は生体でがん組織から血液に分泌される可能性が高いと考え、卵巣明細胞腺がん培養細胞から培地に分泌されるタンパク質を検出し、バイオマーカー候補タンパク質を同定した。

#### 6. 2DICAL を用いた腎がんバイオマーカー探索：尾野雅哉

国立がんセンターが開発した 2DICAL を用いた疾患関連創薬バイオマーカー探索を行っている。本年度は、2DICAL を用いた腎がんバイオマーカー探索を行い、プロテオームリサーチセンターへの 2DICAL システム移行のための基礎実験を行った。

#### 7. 循環器疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究：寒川賢治、南野直人

循環器系疾患の病態、治療、予後などを正確に評価可能なバイオマーカーとなるタンパク質やペプチドを発見するためには、微量の対象物を高感度に分離、検出し、構造解析できるシステムと、試料からの標的物質群を効率的に分離し、分解を抑制して再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計などの高感度、高精度化により前者の目的はかなり達成されつつあるが、微量のタンパク質やペプチドを解析可能とする前処理法については依然として対象ごとに研究、開発が必要である。本年度の研究では、微量試料の取扱い手法と、定量解析に向けた取り組みを継続、実施した。また、心不全におけるバイオマーカー探索のため、イヌモデルでの実験計画を作成、着手した。

#### 8. 精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究：高坂新一

精神疾患（統合失調症、気分障害など）、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上やその発症機序の解明及び診断技術の高度化を図るため、患者由来サンプル中のタンパク質

のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴あるタンパク質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的とする。これまでの研究でプールした髄液試料を用いた絞り込みで中枢神経特異的な多数のタンパク質を同定し髄液使用の有用性を確認できたことを踏まえ、個々の患者でのプロテオーム解析を髄液 2 ml から可能にするための微量測定法の前処理及び質量分析条件を詳細に検討した。

#### 9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索：加藤菊也

がんの詳細な糖鎖構造解析を行うことで新規のがん特異的糖鎖抗原を発見し、それらの糖鎖腫瘍マーカーとしての臨床応用への可能性を検討することを目的とする。現在まで大腸がん症例 60 名、膵臓がん症例 5 名（ルイス型血液型が陰性の症例をそれぞれ 4 名、2 名含む）のサンプルの解析が終了している。その結果、新規のがん特異的糖鎖抗原 NeuAc 2-6(Fuc 1-2)Gal 1-3GlcNAc 1-3Gal 1-4Glc (2-6 sialylated Type 1H, ST1H)を見出した。ルイス型の血液型は、約 90%の人が陽性、約 10%の人が陰性であるが、ST1H はルイス型陰性症例のがんに主に発現すると考えられた。ルイス型陰性の人に対して腫瘍マーカー CA19-9 (Sialyl Le<sup>a</sup> epitope)を測定するのは意味がない。なぜなら、ルイス型陰性の人には Sialyl Le<sup>a</sup> epitope を合成できないため、血清 CA19-9 値は常に 0 あるいは 1 以下である。しかし、CA19-9 (Sialyl Le<sup>a</sup>) の前駆体である DU-PAN-2 (Sialyl Le<sup>x</sup>) が、ルイス型陰性の人にとって CA19-9 (Sialyl Le<sup>a</sup>) に代わる腫瘍マーカーとされている。今回、我々が発見した ST1H はルイス型陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。さらに、ST1H と DU-PAN-2 は合成経路が異なるため、DU-PAN-2 との相乗効果も期待される。

また、がん関連創薬バイオマーカー探索研究を行っている医薬基盤研究所へ乳がん原発組織 23 症例の提供を行い、質量分析法を用いて予後予測のためのバイオマーカーの探索を行っている。

#### 10. 血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用：野村文夫

血清プロテオーム・ペプチドーム解析によるマーカー探索およびバリデーションにおいては検体のプレアナリシス因子の検討が必要である。特に、複数施設の検体を用いてバリデーションを行う場合には採血、血清分離、保存に至る過程を共通のプロトコールで実施することが求められる。そこで MALDI-TOF MS/MS を用いた血清ペプチドプロファイリングにおける採血から血清分離までの時間の影響、凍結条件、凍結融解の影響などについて検討し、血清ペプチドプロファイリングのための至適条件の設定を試みた。血清ペプチドの MS パターンに最も影響する因子は採血から血清分離までの時間であった。我々の研究グループにおける多施設共同バリデーションにおいては、本検討で確立したプロトコールをすべての施設が遵守することとしている。

#### 11. 脳腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究、統合プロテオミクスによる抗がん剤感受性に関わる脳腫瘍細胞内シグナルの解析：荒木令江

脳神経系腫瘍の薬剤治療標的となりうるバイオマーカーを検索するため、病態組織細胞サンプルを用いた統合プロテオミクスの方法論確立を試みている。今回は、分子発現差異解析法である iTRAQ (8Plex) 法、2D-DIGE 法、および DNA array を融合的に用いて同一サンプル群を同時に解析し、得られたすべての情報を統合マイニングすることによって、病態において異常に制御されたシグナル伝達経路を特異的に抽出する方法論を検討した。全てのデータを統合マイニングし、重要分子シグナル群を抽出するための統合マイニング解析プログラム[MANGO (論文 1), iPEACH (特願 2010-81525)]を考案し、さらに抽出重要分子群の迅速検証法、siRNA、阻害剤、活性化剤等を用いた生物学的機能解析法などを検討することによって、スタンダードとなりうる一連の統合的方法論の開発を行った。特に悪性グリオーマの薬剤感受性に関わる分子群の解析、および検証に応用し、新規の抗がん剤感受性低下に関わるシグナル Vimentin activation loop を見出した(特願 2010-81524)。又、如何に融合技術によって大量に得られたプロテオームデータを迅速に処理し、重要機能分子群を抽出して検証する方法論が重要かつ有用であるか、創薬の観点から考察した。これらの方法論はすべての疾患・病態の解析はもとより、細胞生物学における基礎的な分子メカニズム情報を得るためのアプローチにも応用でき、蓄積されたデータベースを活用することによって、新

しい病態メカニズムの解明や診断や治療のマーカー・創薬開発に重要な基礎情報を得る方法論として有用であると考えられる。

## 1 2. 自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究：中村和行

難治性がんの病態、治療、予後などの評価には信頼性の高いバイオマーカーの探索が不可欠である。とくにバイオマーカーとなり得る患者血清中の新規タンパク質の高感度検出技術の開発と応用が課題となっている。その基本技術として二次元電気泳動法と質量分析法による網羅的な血清タンパク質の分析が行われ、疾患関連バイオマーカー候補の報告があるが、信頼性の高いものは少ない。本研究では、自己抗体を用いた C 型肝炎ウイルス関連肝細胞がんのバイオマーカー探索に加えて膵臓がんや乳がんなどの難治性がん組織や癌患者血清中の新規バイオマーカーの探索を目指した研究を実施した。

### 研究代表者

山西弘一	独立行政法人医薬基盤研究所 所長	中村和行	山口大学医学部医学科 教授
------	---------------------	------	------------------

### 研究分担者

朝長 毅	独立行政法人医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクトリーダー
堤 康央	独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクトリーダー
仲 哲治	独立行政法人医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクトリーダー
中山敬一	九州大学生体防御医学研究所 教授
平野 久	横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授
尾野雅哉	国立がんセンター研究所 化学療法部 室長
寒川賢治	国立循環器病センター研究所 所長
南野直人	国立循環器病センター研究所 部長
高坂新一	国立精神・神経センター研究所 所長
加藤菊也	大阪府立成人病センター研究所 所長
野村文夫	千葉大学大学院医学研究院 教授
荒木令江	熊本大学医学薬学研究部腫瘍医学分野 准教授

### A. 研究目的

医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業の発展に必要不可欠であり、ライフラインと位置付けられる。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきている。そのためには、タンパク 3000 プロジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との関連を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の質、量の違いを時空間的に評価する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬（プロテオーム創薬）への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約 2 万 2 千種の遺伝子に比して、膨大とも言える 10 万種以上にものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「iTRAQ 法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったこ

とが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ (疾患プロテオミクス)」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の背景のもと、本研究は、我が国の主要疾患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患関連たんぱく質の探索のための技術開発の推進と普及を図るとともに、探索されてきた数多くの疾患関連たんぱく質群の中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなり得るたんぱく質を絞り込み、これらを生薬品の創出等に有効活用していくための基盤技術を確立し、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、疾患組織・細胞などの臨床検体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを旨とする。

## B. 研究方法 (詳細は各研究分担者の研究方法の項参照)

### B-1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と機能解析：朝長毅

- (1) リン酸化タンパク質に着目した大腸がんバイオマーカーの探索
- (2) 膜タンパク質に着目した大腸がんバイオマーカーの探索
- (3) 血清・血漿の前処理法 (DS 法) を用いた大腸がんバイオマーカーの探索
- (4) 多発性硬化症患者自己抗体の探索とその抗原の同定
- (5) バイオマーカー候補タンパク質の機能解析
- (6) 質量分析計によるペプチド定量法の開発: タンパク質定量法・多反応モニタリング(MRM)法

### B-2. 抗体プロテオミクスによる肺がんバイオ

### マーカーの探索：堤 康央

- (1) 細胞培養
- (2) 浸潤能試験
- (3) 2D-DIGE (二次元ディファレンシャル電気泳動) 解析
- (4) MS 解析
- (5) ナイーブフェージ抗体ライブラリの作製
- (6) Dot Blot パンニング
- (7) Dot Blot ELISA によるスクリーニング
- (8) フェージ抗体を用いた Western Blot
- (9) フェージ抗体を用いた組織アレイ解析

### B-3. 卵巣明細胞腺がん薬剤耐性分子の同定と抗がん剤耐性機序の解析：仲 哲治

- (1) 2D-DIGE (二次元ディファレンシャル電気泳動) 解析
- (2) トリプシンを用いたゲル内消化法と MS 解析
- (3) リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫組織化学染色法による発現解析
- (4) 抗がん剤に対する IC50 測定と細胞内抗がん剤の定量

### B-4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用：中山敬一

- (1) ノイズの除去方法に対する検討
- (2) イオンサプレッションの抑制方法に対する検討
- (3) 装置汚染の回避

### B-5. リン酸化タンパク質分析技術の検討と卵巣明細胞腺がんバイオマーカー探索：平野 久

- (1) リン酸化タンパク質の網羅的解析
- (2) リン酸化アフィニティー電気泳動
- (3) 卵巣明細胞腺がん培養細胞分泌タンパク質の検出・同定・検証

### B-6. 2DICAL を用いた腎がんバイオマーカー探索：尾野雅哉

### B-7. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：寒川賢治、南野直人

- (1) 血漿試料を用いた前処理方法の検討

- (2) 培養細胞上清の解析方法の検討
- (3) MRM 法によるペプチド定量法の検討
- (4) 循環器疾患のプロテオーム解析対象の検討

**B-8. 精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：高坂新一**

- (1) 髄液前処理の検討
- (2) cICAT 法に特異的な前処理法の工夫

**B-9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索：糖脂質の糖鎖構造の高精度、高感度検出技術の確立：加藤菊也**

**B-10. 血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用：野村文夫**

- (1) 血清・血漿のプレアナリシスの検討

**B-11. 脳腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究、統合プロテオミクスによる抗がん剤感受性に関わる脳腫瘍細胞内シグナルの解析：荒木令江**

- (1) iTRAQ、2D-DIGE、DNA chip を用いた脳腫瘍バイオマーカー、抗がん剤感受性シグナル因子の探索
- (2) 解析データの統合法の開発

**B-12. 自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究：中村和行**

- (1) 二次元電気泳動法を用いた肝がん組織のプロテオーム解析
- (2) 肝がん患者血清中の肝がん組織タンパク質に対する自己抗体の探索
- (3) 血清中自己抗体の効率的な検出法の開発

**(倫理面への配慮)**

今回の研究に用いたヒト由来試料は全て各研究機関の倫理審査委員会または独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト倫理審査委員会で承認されたものである。

**C, D. 研究結果及び考察**

**C, D-1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と機能解析：**

**朝長 毅**

プロテオームリサーチプロジェクトの創設にあたり、今年度新たに設置した 6 台の最新の次世代質量分析計を常時稼働できる体制を整えた。その最新の質量分析計を用いて iTRAQ 法によるタンパク質の定量比較解析法を確立した。また、リン酸化タンパク質および膜タンパク質のプロテオミクス解析技術を確立し、複数の培養細胞や大腸がん組織でのタンパク質の同定を行った。

血清・血漿中の微量タンパク質・ペプチドを検出するための前処理法の開発を行い、大腸癌の診断マーカー候補ペプチド *zyxin* を同定した (J Proteome Res, in press)。

多発性硬化症患者血清中の自己抗体の探索を行い、多発性硬化症の亜型である視神経脊髄炎 (NMO) の患者血清中の自己抗体の検出およびその抗原 *NSF* を同定した。

大腸がん、食道がん組織のプロテオーム解析でがん部での発現増大が見られたタンパク質 *eIF4H isoform 1* および頭頸部扁平上皮がん組織のプロテオーム解析でがん部での発現増大が見られた *plectin-1* の機能解析を行った。*eIF4H isoform 1* は大腸がん、食道がんの新しい抗がん剤のターゲットと考えられた (Int J Cancer, in press)。また *plectin-1* は頭頸部扁平上皮がんの新規予後因子マーカーになる可能性があると考えられた。

3 連四重極型質量分析計による MRM 法の検討をアルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチド *APL18* の合成ペプチドを用いて行った。

今年度から研究拠点を医薬基盤研究所に移すとともに、研究員、研究分担者および質量分析計などのプロテオミクス解析機器を一新して、新たなスタートラインに立った。そのため、この 1 年はその研究体制を整備するのにほとんど時間を費やしたと言っても過言ではない。しかし、研究分担者や協力者からの支援や技術指導のおかげで、リン酸化タンパク質、膜タンパク質、血清・血漿タンパク質、MRM など最新のプロテオーム解析技術を確立することができ、ヒト臨床検体を用いた解析も開始することができた。今後の課題は、それらの探索で得られた数千、数万のバイオマーカー候補タンパク質・ペプチドをどう絞り込んでいき、いかに実用化



につなげていくかが最重要課題である。

### C, D-2. 抗体プロテオミクスによる肺がんバイオマーカーの探索：堤 康央

リンパ節転移関連バイオマーカー蛋白質を探索するために、正常の気管上皮細胞と低リンパ節転移肺がん細胞株から調製した蛋白質を対照サンプルに、高リンパ節転移肺がん細胞株から調製した蛋白質を疾患サンプルとして2D-DIGE解析を試みた。正常細胞で発現が少なく、かつリンパ節低転移性肺がん細胞に比べて高転移性細胞間で有意に発現変動した16個のスポットに対して、MS解析による蛋白質の同定とパンニングを同時に行い、抗体作製を試みた。その結果、すべてのスポットの蛋白質の同定と抗体の取得に成功した。

上記検討で見出した蛋白質の肺がん臨床サンプルでの発現を組織マイクロアレイを用いた免疫染色で検証を行ったところ、Aldehyde dehydrogenase は約20%、Oxysterol-binding protein-like 5 (OSBPL5)、Calumenin (CALU)、Glutathione-S-transferase は約40%、Cytokeratin 18 は約60%、Cytokeratin 8 は約80%の肺がんで特異的な発現が確認された。今後、各種臨床情報との相関解析を行うことで、見出した肺がん関連分子の機能が解明可能になるものと考えられる。

以上、抗体プロテオミクス技術により肺がん関連蛋白質の探索を試み、肺がんで高発現する候補分子の絞り込みに成功した。よって、本技術が有用な創薬バイオマーカー蛋白質の迅速・効率的な絞り込み技術として有用であることが明らかとなった。

### C, D-3. 卵巣明細胞腺がん薬剤耐性分子の同定と抗がん剤耐性機序の解析：仲 哲治

2D-DIGE法を用いて抗がん剤抵抗性の卵巣明細胞腺がん細胞株(OVISE)と抗がん剤感受性の卵巣漿液性腺がん細胞株(OVSAHO)の間におけるタンパク質発現差を解析した。その結果、卵巣明細胞腺がんを高発現するタンパク質としてAnnexin Aが同定された。リアルタイムPCR法及び、ウェスタンブロット法にてAnnexin A4の発現を検証した結果、Annexin A4はmRNAレベル、タンパク質レベル共に卵巣漿液

性腺がん比べ、卵巣明細胞腺がんにて特異的に高発現を示した。また、卵巣がん患者組織を用いてウェスタンブロット、免疫組織化学染色を行った結果、Annexin A4の発現は卵巣漿液性腺がん比べ卵巣明細胞腺がんにて高発現していた。

卵巣明細胞腺がんにて高発現しているAnnexin A4が抗がん剤耐性と関係することを明らかにするため、抗がん剤感受性である卵巣漿液性腺がん細胞株にAnnexin A4遺伝子を導入し、安定発現株を樹立後、カルボプラチンに対するIC<sub>50</sub>値を用いてアッセイした結果、コントロール株に対し、Annexin A4安定発現株では抗がん剤に対して耐性を誘導することが明らかになった。Annexin A4安定発現株が誘導するカルボプラチン耐性機序を明らかにするため、カルボプラチンの細胞内取り込み、及び細胞外への排出に関する実験を行った。Annexin A4安定発現株、及び、コントロール細胞についてカルボプラチン処理後の細胞内プラチナ量を定量した結果、細胞内に蓄積したプラチナ量はコントロール細胞株と比べAnnexin A4安定発現株にて有意に低下を示した。逆に、カルボプラチン処理後、抗がん剤を含まない培地で培養した後の細胞内残存カルボプラチン量を測定した結果、コントロール細胞群に比べAnnexin A4安定発現株では細胞内に残存したカルボプラチン量が有意に低下した。これらのことからAnnexin A4の強制発現は細胞内への抗がん剤取り込みの抑制と細胞内カルボプラチンの細胞外排出の促進に関与することが示唆された。

以上の結果から、Annexin A4は抗がん剤耐性を克服するための標的分子となり得ると考えられる。

### C, D-4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用：中山敬一

複雑な試料(例えば未分画の細胞抽出液等)をMRMで解析すると、単一のQ1/Q3のフィルターを通過するものが多数存在し、それらがノイズとなって解析に支障をきたす。この問題を解決するために、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にした。さらに、安定同位体標識を施

した内部標準（リテンションタイムマーカーと称する）を作成し、このマーカーのリテンションタイムから個々の試料中のピークの移動度を相対的に割り出し、補正を加えることによって、全てのペプチドに対して事前情報を与えることに成功した（特許出願中）。

分画しない試料は数 10 万成分を含む超複雑系のマトリックスであり、実際に MRM 法で評価試料を測定した場合は数 10 amol のペプチドでも容易に検出できる感度を持っている場合でも、これが実試料中に含まれると 1 桁以上感度低下、すなわちイオンサプレッション効果が起きた。そこでわれわれは種々の分画法を検討した結果、液相等電点電気泳動（OFFGEL システム）を用いることで劇的にサンプルの複雑性を減らすことができ、その結果、ノイズの低減と感度上昇という大きな収穫を同時に得ることができた。

以上の基礎的検討のうえで、実際の試料中に存在する微量タンパク質の絶対定量を試みた。ヒト p27、Rab7、EGR レセプターに対して、大腸菌内でリコンビナントタンパク質を作製し、次にこれを液相等電点電気泳動（OFFGEL システム）で分画した後、リテンションタイムマーカーと共に逆相クロマトグラフィーにかけて、各タンパク質に対する PTP（Proteotypic Peptide）を LC-MS/MS によって決定した。この事前情報に基づき、試料とリコンビナントタンパク質を mTRAQ ラベルして MRM の transition を組み、MRM で得られたクロマトグラムを基に各タンパク質の絶対定量を行った。

MRM 法は上述したように多数の問題点を抱えている。しかしながら、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。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。

**C, D-5. リン酸化タンパク質分析技術の検討と卵巣明細胞腺がんバイオマーカー探索：**  
平野 久

iTRAQ 法を用いたデファレンシャルディスプレイ分析によって、卵巣明細胞腺がん細胞と漿液性がん細胞との間でリン酸化状態に差があるタンパク質の分析を試みたところ、32 種類のタンパク質を検出・同定することができた。

リン酸化アフィニティー二次元電気泳動を用いてマウスマクロファージ様細胞株 hnRNP K のリン酸化状態の解析を行った。リン酸化アフィニティー二次元電気泳動で分離された各 hnRNP K スポットは、4 種類のアイソフォーム（選択的スプライシング変異体）に由来することがわかり、核では、4 種類のアイソフォームすべてが発現していたが、細胞質では、主に 1 種類のアイソフォームのみが発現していた。また、hnRNP K は、核では主に Ser116 又は Ser284 でリン酸化された 3 種類のリン酸化タイプ及び非リン酸化タイプとして存在し、LPS 刺激後、Ser116/Ser284 及び Ser116 リン酸化タイプが増加し、Ser284 及び非リン酸化タイプが減少することがわかった。一方、細胞質では、主に非リン酸化タイプとして存在し、LPS 刺激後に非リン酸化タイプは減少し、Ser116 リン酸化タイプのみが増加することがわかった。局在毎にリン酸化タイプの比率が刺激依存的に変化することから、これらのサイトでのリン酸化による hnRNP K の機能調節の可能性が示唆された。

卵巣明細胞腺がん培養細胞分泌タンパク質の検出と同定を行った結果、3 種類の卵巣がん組織型のグループから合計 280 種類のタンパク質が同定され、半分以上が細胞外分泌型もしくは細胞質膜局在型として分類されるタンパク質であることがわかった。明細胞腺がん群のみで検出された 58 種類の中で、9 種類の分泌タンパク質の遺伝子が明細胞腺がん患者組織において有意に発現上昇していることがわかった。また、4 種類のタンパク質について明細胞腺がん細胞株中の発現を siRNA を用いて抑制したところ、TFPI2 やセルロプラスミンの発現量を抑制した時に抗がん剤の一種シスプラチンに対する感受性が大きく上昇した。またマトリゲルチャンパープレートを用いた転移浸潤能試験を行った結果、TFPI2 やセルロプラスミンの siRNA を導入した細胞では、コントロール細胞と比べて、浸潤能が減弱することが明らかになった。した

がって、これらのタンパク質は明細胞腺がん細胞の浸潤能を調節している可能性があると考えられた。

#### C, D-6. 2DICAL を用いた腎癌バイオマーカー探索：尾野雅哉

2DICAL法を用いて腎がん患者血漿とコントロール血漿を比較解析したところ、59個のマーカー候補が選抜された。そのうち、外れ値  $p=0.004$ 、U 検定  $p=0.01$ 、ROC AUC=0.70 を示し、複数のペプチドフラグメントでヒットしたたんぱく質を第一の腎癌血漿バイオマーカー候補として、さらなる検討を行った。同たんぱく質の血中量を Western Blot で確認したところ、腎がん症例群で明らかに増加していることが確認された。AlphaLISA により多数例を検討したところ、健常者群と比較し、腎がん症例群で有意に血中量が増加しており、前立腺がん患者群と比較しても、有意に増加していることが確認された。健常者と腎がん症例の間で ROC 曲線を引くと AUC 値は 0.722 であった。

この 2DICAL 解析を医薬基盤研プロテオームリサーチセンターでも行ったところ、プロテオームリサーチセンターでの計測では保持時間の変動が大きかったものの、 $t\text{-test}<0.01$ 、 $i\text{Score}>25$ 、 $\text{Expect}<0.05$  を満たすたんぱく質の検索では、プロテオームリサーチセンターでは 26 たんぱく質が選択されたのに対し、国立がんセンターでは 6 たんぱく質とプロテオームリサーチセンターでの計測から得られたマーカー候補が多かった。

すでに確立している国立がんセンターでの 2DICAL での解析が、プロテオームリサーチセンターでも解析可能であるかという点がこのプロジェクトの重要課題であったが、国立がんセンターとプロテオームリサーチセンターで同一材料を用いた計測を行うことにより、十分可能であることが証明された。今後は質量分析計に試料を流す液体クロマトグラフィーの再現性を高め、最新の質量分析計を用いることにより、新たなバイオマーカー候補の発見が期待される。

#### C, D-7. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：寒川賢治、南野直人

血漿試料を対象に、各種アフィニティーカラ

ム、限外口過ユニット、逆相カートリッジで系統的に濃縮することにより、微量ペプチド質画分の再現的な濃縮・調製法を検討したが、血液試料等から微量たんぱく質、ペプチドの差分解析を行い、変化・変動するたんぱく質を見出すことは非常に困難である。問題を回避する方法として、培養細胞の産生、分泌するたんぱく質、ペプチドを包括的に同定し、生理的変動、病態生理的ストレス等による変化を解析して候補物質を見出す研究を昨年度より開始した。本年度はホルモン産生、分泌が確認されている細胞株について検討を行った。分泌顆粒を有する細胞群では、分泌刺激により非常に効率的なペプチドの回収、分析が可能であった。特に甲状腺髄様がん由来の TT 細胞では、カルシトニン、CGRP、ガストリン放出ペプチド、グレリン等のペプチドホルモン前駆体由来のペプチド、クロモグラニン B 等のグラニン類由来ペプチド、プロホルモン変換酵素 2、アミド化酵素等に由来するペプチドが観測され、細胞内たんぱく質に由来するペプチド断片はごく少数であった。豊富に存在するたんぱく質については、前駆体のプロセッシング経路の予測も可能であった。また、心筋細胞で多量に分泌されている心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)も、当初は優位に検出されなかったが、細胞の調製法や純度、維持・管理法などの改良により観測されるペプチド大きく改善され、主要なペプチドとして観測されるようになった。心臓非心筋細胞の大部分は線維芽細胞であるために細胞外マトリックス由来ペプチドが主体であるが、その中にはアドレノメデュリンや分泌たんぱく質由来ペプチドも多数存在した。培養細胞が分泌するタンパク質は血液にも存在する可能性があり、種々の循環器疾患のバイオマーカーになる可能性があることが示唆された。

一方、下垂体抽出物をマトリックスとし、様々な濃度の合成ペプチドを添加してナノ LC で分離し、MRM 法で解析、定量を行った。11 種のペプチドについて検討したが、5 種のペプチドについて良好な添加量・ピーク面積の関係が得られた。

今後、プロテオームリサーチセンターと共同で、イヌの機械的刺激による心不全モデルを用

いて、対照正常心組織に比して不全心組織で有意に変化するたんぱく質の解析を行い、心不全の早期発見バイオマーカーを探索する予定である。

#### C, D-8. 精神・神経疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：高坂新一

これまでの検討では、最初の髄液量が 10 ml 必要であるという制約はあるものの、Agilent 抗体カラム (Hu14) で分画し、素通り画分と吸着溶出画分を得て、0.1% SDS、50 mM Tris/HCl (pH 8.5) に溶解することで、cICAT 法解析で 311 種類のタンパク質を同定でき、そのうち 294 種は髄液特異的蛋白として同定できていた。

本年度は髄液 2 ml からの cICAT 法測定を可能にするために、前処理の検討、特にプロテアーゼ阻害剤の必要性、抗体カラムの選択、SCX カラムの分画採取法について検討し、概ねその方法論が確立できた。

髄液を用いることで、直接的に中枢神経の病態を反映している蛋白群をとらえることが可能であると考えられるが、そのためには元々蛋白量が少ない髄液で、しかも臨床的に許容できる 2ml 以下の初期量での測定法を確立する必要がある。我々は、初期量 10 ml で解析可能であった測定系を、初期量 2 ml の微量から解析できる前処理の検討をさらに行った。結果として、コンスタントに 300 種類のタンパクを同定できる方法を確立できた。今後は cICAT 法に加えて、iTRAQ 法や MRM 法などを行うことも検討する。

#### C, D-9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索：加藤菊也

大腸がん 60 症例、膵臓がん 5 症例、(計 65 症例、ルイス型血液型が陰性の患者をそれぞれ 4 名、2 名含む) の、がん細胞、正常粘膜上皮細胞の、糖脂質の詳細な構造を解析した結果、ルイス型陰性の 6 名の患者のうち 2 名 (大腸がん 1 症例、膵臓がん 1 症例) のがん細胞において、新規のがん特異的糖鎖構造と思われるものが存在した。一方、この構造は 59 名のルイス型陽性症例のがん細胞および、すべての症例の正常粘膜上皮細胞には検出されなかった。質量

分析の結果、その構造は、がん特異的糖鎖抗原としてよく知られている Sialyl Lewis a (SLe<sup>a</sup>), Sialyl Lewis x (SLe<sup>x</sup>), sialyl Type2H (ST2H) と異性体であることがわかった。α2-3 sialyase、neuraminidase、bovine kidney fucosidase を用いた酵素消化法、2次元マッピング法および質量分析法を用いて、構造決定を行った結果、下記に示す構造であることが判明し、α2-6 sialylated Type1H (ST1H) と名づけた。この構造は今まで報告されたことはなく、新規のがん特異的糖鎖抗原である。この構造は、65 症例中、2 名 (大腸がん 1 症例、膵臓がん 1 症例) のがん細胞に認められた。

この発現頻度は非常に低いと判断できるかもしれない。しかし、このがん特異的糖鎖構造が、ルイス型血液型が陰性の人のがんが発現しやすい構造であることを考慮すると、決して低い頻度ではない。今回、我々が発見した ST1H は DU-PAN-2 と同様に、Lewis 陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。さらに、ST1H は DU-PAN-2 とは異なる経路で合成されると考えられたため、DU-PAN-2 との相乗効果が期待できる。今後はその構造に対する抗体を作成し、腫瘍マーカーとして診断などに適用可能か否かを検討する必要がある。

#### C, D-10. 血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用：野村文夫

本年度は MALDI-TOF MS を用いた血清ペプチド解析における検体のプレアナリシスについて検討した。まず単一の健常人血清を用いて同時再現性(n=5)と日差再現性(n=5)を求めた。その結果、ピーク面積の同時再現性と日差再現性は WCX ビーズ;  $9.5 \pm 5.4$  (CV  $\pm$  SD)%,  $13.5 \pm 6.7\%$ 、IMAC-Cu ビーズ;  $8.9 \pm 4.4\%$ 、 $12.0 \pm 4.6\%$ 、C8 ビーズ;  $6.3 \pm 3.9\%$ 、 $11.2 \pm 4.5\%$ であった。特に注目したピークの定量にあたっては安定同位体標識標準を利用することにより、同時再現性、日差再現性ともにさらに改善できることを確認している。

次に血液を採取してから遠心分離するまでの時間(以下、clotting time と表記)は MALDI-TOF MS を用いてプロファイリングする際には最も影響を持つ因子とされているので、15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間のタイ

ムコースでデータを取得した。その結果、採血してから血清を分離するまでには 30 分以上は静置する必要があることが示唆された。理想的には clotting time をすべての検体で厳密に統一するのが望ましい。しかしながら臨床検体を解析の対象としている以上、特に実際の検査室では実現困難であるため、我々は変化の激しい最初の 30 分を避け、血清を 30 分以上 2 時間以内に遠心分離することで対応している。

凍結融解の繰り返しは血清・血漿を用いたルーチンの検体検査においても注意が必要とされている。今回、3 人分の血清を氷上の操作で 1 回から 7 回までの凍結融解を繰り返し、CV が 20% を超えるピークの数のカウントした。その結果、凍結融解 3 回までは CV が 20% を超えるピークの数少なく、4 回目以降一挙に増加する傾向にあった。

以上の検討結果に基づいて血清の採取、保存は以下のプロトコールで実施することとした。

1) 早朝空腹時採血とし、採血は座位でホルダーを用いた真空採血による。2) 血清を採取するスピッツは徳山積水化学工業のインセパック II-D カバ(6 ml)のスピッツを使用する。3) 遠心までには最低 30 分間室温で静置する。遠心は 2 時間以内に 1,500G で 10 分間、室温で実施する。4) 遠心後、住友ベークライト社スミロンプロテオセーブ SS 1.5 ml チューブ 3 本に分注する。5) 分注したサンプルはそのまま -80°C のフリーザーに保存する。6) サンプルの凍結融解の回数は少ないことが望ましいが、2 回までは許容できる。

### C, D-11. 脳腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究、統合プロテオミクスによる抗がん剤感受性に関わる脳腫瘍細胞内シグナルの解析：荒木令江

ヒト悪性グリオーマ (anaplastic oligodendroglioma/astrocytoma:AO/AOA) のうち抗がん剤感受性 1p/19q LOH+ 及び抗がん剤耐性 1p/19q LOH- の AO/AOA 組織を用いて、DNA microarray を iTRAQ を 2D-DIGE による解析を行った。各々の網羅的解析結果から得られたデータを統合プロテオミクス解析のために作成したプログラム iPEACH を用いて、1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- の AO/AOA 組織間で

有意に発現変動している分子群の絞込みを行った。その結果、抗がん剤耐性である 1p/19q LOH- グリオーマ 組織での vimentin と proteinX の高い発現が確認された。関連活性化分子ネットワークを抽出するため KeyMolnet ソフトウェアを用いて特に proteinX と vimentin を始点終点として焦点をあてたネットワーク図を検索すると、興味深いことに、1p/19q のローカスに位置する分子群が多数ネットワーク上に抽出され、特に Cdc42 や、その下流で活性化する vimentin リン酸化に関わる proteinZ kinase (PKZ)、vimentin の断片化に関わる calpainSS (calpain small subunit) 等を介する proteinX-vimentin 間の分子ネットワークが グリオーマ組織における抗がん剤感受性に重要である可能性が高いことが示唆された。

以上の解析で抽出された分子ネットワークを生化学的手法で検証した結果、vimentin と proteinX 両分子ともに LOH- 群の組織/細胞にて有意な上昇がみとめられた。特に組織細胞の vimentin の発現が LOH- 群において顕著に上昇すると同時に、特徴的な vimentin 分解フラグメントにおいても有意な増加がみとめられた。さらに、切断されたフラグメント vimentin の細胞内局在を調べたところ、フラグメント化された N 末端側 vimentin が特異的に核へ移行することが判明した。興味深いことに、このフラグメント N 末端側 vimentin は核に移行することによって proteinX の mRNA 発現を上昇させていることが判明した。このことから、1p/19q LOH- のグリオーマ細胞の中で抗がん剤抵抗性に関連して、proteinX → Cdc42 活性化 → proteinZ kinase 活性化 → vimentin リン酸化 → vimentin のカルパインによる切断化 → vimentin N 末端側の細胞内核移行 → proteinX の転写活性上昇 → vimentin activation loop の活性化というカスケードが活性化していることが想像された。さらに、それぞれのカスケードに関わる分子群の発現及び活性阻害剤を用いて、悪性グリオーマの第一選択薬 Temozolomide: TMZ に対するグリオーマ細胞の感受性変化を解析したところ、いずれの分子の発現や活性を抑制しても TMZ に対する感受性が増強された。以上の結果から、上記の activation loop が LOH- の悪性グリオーマ細胞内で活性化してお

り、これが TMZ などの抗がん剤の耐性機序のひとつであるということが明らかとなった。

我々は統合プロテオミクスの方法論を考案し、これを用いて抗がん剤耐性に関わって発現量と修飾構造を変動させるタンパク質群と、その機能変化に関わる責任分子群を介した細胞内シグナルネットワークを抽出することに成功した。本方法論は脳腫瘍のみならず、数々の疾患メカニズムの解析に応用可能であることが示唆された。

#### C, D-12. 自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究：中村和行

C 型肝炎ウイルス感染の既往 (HCV 抗体陽性、B 型肝炎ウイルス (HBV) 抗原陰性かつ飲酒歴のない) のある肝細胞がん (HCV-HCC) 組織を用いた 2-DE (分離範囲 pH4-7) により、ApoE アイソフォーム (糖鎖化?) と ATP 合成酵素アイソフォーム (リン酸化?) を新たなバイオマーカー候補として同定した。また、HCV-HCC のがん部組織に特異的に増減するタンパク質群の中からがん患者血清中の自己抗体に特異的に反応するタンパク質として HSP70 と MnSOD および peroxiredoxin が同定した。そのうち HSP70 に着目し、GFP と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップに HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させたところ、正常人に比して HCV-HCC 患者の陽性率が有意に高かった。難治性がんとして HCV-HCC の他に、乳癌では抗 cyclophilin A 抗体さらに抗がん剤 gemcitabine 耐性の膵臓がんでは HSP27 が新たなバイオマーカー候補として同定された。

今回、従来の二次元電気泳動法と質量分析法 (nano-LC-MS/MS) の改良を行うとともに、自己抗体を用いたがん組織特異タンパク質バイオマーカーの高感度検出技術の改良を行い、種々のがんの新しいバイオマーカー候補タンパク質を同定した。特に自己抗体を用いたプロテインチップ技術の改良は、血清中に含まれる高濃度のタンパク質や混合物を除去する必要がなく、簡便な検診ツールとして有望であると考えられる。

#### E. 結論

この研究課題の第 1 期にあたるプロテオーム

ファクトリープロジェクト (平成 15~19 年度：大阪市西淀川区) から医薬基盤研究所に移設した機器を整備するとともに、今年度新たに設置した 7 台の最新の次世代質量分析計を常時稼働できる体制を整えた。また、新しいプロジェクトリーダー、研究員を配備するとともに、日本のプロテオミクス研究の第一人者を数名研究分担者に加え、研究体制を一新した。この研究体制の下、同位体標識 iTRAQ 法、リン酸化タンパク質分析技術、膜タンパク質分析技術、血液、髄液などの体液や細胞培養液からの微量タンパク質検出技術、ファージ抗体ライブラリを用いた抗体プロテオミクス技術、2D-DIGE 法、2DICAL 法、MRM 法、糖鎖構造解析技術、自己抗体解析技術、データ統合マイニング技術などの疾患創薬バイオマーカー探索に必要な次世代プロテオミクス基盤技術を確立するとともに、ヒト臨床検体を用いた大規模なバイオマーカー候補タンパク質の探索を開始した。同時にバイオマーカー候補タンパク質の検証のための機能解析実験も行った。

その結果、卵巣明細胞腺がんマーカーとして annexin IV、大腸がんマーカーとして eIF4H isoform 1、膵臓がんマーカーとして血中 prolyl hydroxylated  $\alpha$ -fibrinogen、抗がん剤ゲムシタビン毒性予測マーカーとして血中 haptoglobin、炎症性自己免疫疾患マーカーとして leucine rich alpha 2 glycoprotein、大腸がん、膵臓がんマーカーとして新規のがん特異的糖鎖抗原 (ST1H) を同定し、論文として発表した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### G-1. 論文発表

1. Wu D., Matsushita K., Matsubara H., Nomura F., Tomonaga T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. Int J Cancer, in press.
2. Kawashima Y., Fukutomi T., Tomonaga T., Takahashi H., Nomura F., Maeda T., Kodera Y. High-yield peptide-extraction

- method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res*, in press.
3. Yamamoto-Ishikawa K., Suzuki H., Nezu M., Kamiya N., Imamoto T., Komiya A., Sogawa K., Tomonaga T., Nomura F., Ichikawa T. The isolation and identification of apolipoprotein C-I in hormone-refractory prostate cancer using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Asian J Androl* 11:299-307, 2009.
  4. Umemura H., Nezu M., Kodera Y., Satoh M., Kimura A., Tomonaga T., Nomura F. Effects of the time intervals between venipuncture and serum preparation for serum peptidome analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 406:179-80, 2009.
  5. Sawai S., Umemura H., Mori M., Satoh M., Hayakawa S., Kodera Y., Tomonaga T., Kuwabara S., Nomura F. Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: Proteomic analysis. *J. Neuroimmunol* 218:112-5, 2009.
  6. Matsushita K., Tomonaga T., Kajiwara T., Shimada H., Itoga S., Hiwasa T., Kubo S., Ochiai T., Matsubara H., Nomura F. c-myc suppressor FBP-interacting repressor for cancer diagnosis and therapy. *Front Biosci* 14:3401-8, 2009.
  7. Hattori N., Oda S., Sadahiro T., Nakamura M., Abe R., Shinozaki K., Nomura F., Tomonaga T., Matsushita K., Kodera Y., Sogawa K., Satoh M., Hirasawa, H. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock* 32:393-400, 2009.
  8. Guo WZ., Sugaya S., Satoh M., Tomonaga T., Nomura F., Hiwasa T., Takiguchi M., Kita K., Suzuki N. Nm23-H1 is responsible for SUMO-2-involved DNA synthesis induction after X-ray irradiation in human cells. *Arch Biochem Biophys* 486:81-7, 2009.
  9. Kume H., Murayama KS., Araki W. The two-hydrophobic domain tertiary structure of reticulon proteins is critical for modulation of beta-secretase BACE1. *J Neurosci Res* 87: 2963-72, 2009.
  10. Kume H., Konishi Y., Murayama KS., Kametani F., Araki W. Expression of reticulon 3 in Alzheimer's disease brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35: 178-88, 2009.
  11. Takahashi A., Obata Y., Fukumoto Y., Nakayama Y., Kasahara K., Kuga T., Higashiyama Y., Saito T., Yokoyama K., Yamaguchi N. Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp Cell Res* 315:1117-41, 2009.
  12. 朝長 毅: 疾患プロテオミクス: 発現解析から機能解析へ. 「*BIO Clinica*, 印刷中」.
  13. 朝長 毅: 清宮正徳、野村文夫: 肝細胞がんのプロテオーム解析. 「*病理と臨床*, 印刷中」.
  14. 小寺義男、朝長 毅: 血清・血漿バイオマーカー探索のための新しい前処理法の開発. 「*創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析*, 印刷中」.
  15. Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie* 64:238-41, 2009.
  16. 角田慎一: 癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究. *Pharma VISION NEWS*, 13: 32-7, 2009.
  17. 堤 康央: 蛋白療法の最適化に叶う創薬基盤技術の開発とその評価. *Drug Delivery System*, 24:514-21, 2009.
  18. 長野一也、阿部康弘、角田慎一、堤 康央: プロテオーム解析とタンパク質のDDSの設計・評価. *PharmTech Japan* 24: 24-30,

- 2009.
19. Kim A., Enomoto T., Serada S., Ueda Y., Takahashi T., Ripley B., Miyatake T., Fujita M., Lee CM., Morimoto K., Fujimoto M., Kimura T., Naka T. Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. *Int J Cancer* 125(10):2316-22, 2009.
  20. Serada S., Fujimoto M., Ogata A., Terabe F., Hirano T., Iijima H., Shinzaki S., Nishikawa T., Ohkawara T., Iwahori K., Ohguro N., Kishimoto T., Naka T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 69: 770-4, 2010.
  21. 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: 3549-63, 2009.
  22. 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: 420-32, 2009.
  23. 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 p220<sup>NPAT</sup> and HiNF-P. *J. Cell Physiol* 219: 438-48, 2009.
  24. 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: 3788-94, 2009.
  25. 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: 3529-43, 2009.
  26. Jiang X., Austin P.F., Niederhoff R.A., Manson S.R., Riehm J.J., Cook B.L., Pengue G., Chitaley K., Nakayama K., Nakayama K.I., Weintraub S.J. Mechanoregulation of proliferation. *Mol Cell Biol* 29: 5104-14, 2009.
  27. 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<sup>Kip1</sup> minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity. *Int J Cancer* 125: 2270-80, 2009.
  28. 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: 1135-42, 2009.
  29. Zhang J., Hung A.C., Ng P.Y., Nakayama K., Hu Y., Li B., Porter A.G., Dhakshinamoorthy S. PKC $\delta$  mediates Nrf2-dependent protection of neuronal cells from NO-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 750-6, 2009.
  30. 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:



- 7539-46, 2009.
31. Saita S., Shirane M., Natume T., Iemura S., Nakayama KI. Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J Biol Chem* 284: 13766-77, 2009.
  32. Tsukuba T., Yanagawa M., Okamoto K., Okamoto Y., Yasuda Y., Nakayama KI, 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: 565-73, 2009.
  33. 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 KI. Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab Invest* 89: 645-56, 2009.
  34. Matsuda M., Tsutsumi K., Kanematsu T., Fukami K., Terada Y., Takenawa T., Nakayama KI, Hirata M. Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels. *Biol Reprod* 81: 681-9, 2009.
  35. Tanaka S., Wakeyama H., Akiyama T., Takahashi K., Amano H., Nakayama KI, Nakamura K.: Regulation of osteoclast apoptosis by bcl-2 family protein bim and caspase-3. *Adv Exp Med Biol* 658: 111-6, 2010.
  36. Wang H., Bauzon F., Ji P., Xu X., Sun D., Locker J., Sellers R.S., Nakayama K., Nakayama KI, Cobrinik D., Zhu L. Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1(+/-) mice. *Nature Genet* 42: 83-8, 2010.
  37. Bohgaki M., Matsumoto M., Atsumi T., Kondo T., Yasuda S., Horita T., Nakayama KI, Okumura F., Hatakeyama S., Koike T. Plasma gelsolin facilitates interaction between  $\beta_2$  glycoprotein I and  $\alpha_5\beta_1$  integrin. *J Cell Mol Med*, in press, 2010.
  38. Iwatsuki M., Mimori K., Ishii H., Yokobori T., Takatsuno Y., Sato T., Toh H., Onoyama I., Nakayama KI, Baba H., Mori M. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinical significance. *Int J Cancer* 126: 1828-37, 2010.
  39. Fujii M., Kanematsu T., Ishibashi H., Fukami K., Takenawa T., Nakayama KI, 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: 4837-46, 2010.
  40. Tada H., Okano H.J., Takagi H., Shibata S., Yao I., Matsumoto M., Saiga T., Nakayama KI, Kashima H., Takahashi T., Setou M., Okano H. Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J Biol Chem* 285: 3840-9, 2010.
  41. Masuda K., Ishikawa Y., Onoyama I., Unno M., de Alboran I.M., Nakayama KI, Nakayama K. Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* 29: 1798-809, 2010.
  42. Tsukada Y., Ishitani T., Nakayama KI. KDM7 is a dual demethylase for histone H3 lysines 9 and 27 and functions in brain development. *Genes Dev* 24: 432-7, 2010.
  43. Susaki E., Kaneko-Oshikawa C., Miyata K., Tabata M., Yamada T., Oike Y., Katagiri H., Nakayama KI. Increased E4 activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity. *J Biol Chem*, in press, 2010.
  44. Old J.B., Kratzat S., Hoellein A., Graf S., Nilsson J.A., Nilsson L., Nakayama KI, Peschel C., Cleveland J.L., Keller U.B. Skp2 Directs Myc-Mediated Suppression

- of p27<sup>Kip1</sup> yet Has Modest Effects on Myc-driven lymphomagenesis. *Mol Cancer Res* 8: 353-62, 2010.
45. Okumura F., Matsunaga Y., Katayama Y., Nakayama KI., Hatakeyama S. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J Cell Sci*, in press, 2010.
  46. Chan C.H., Lee S.W., Li C.F., Wang J., Yang W.L., Wu C.Y., Wu J., Nakayama KI., Kang H.Y., Huang H.Y., Hung M.C., Pandolfi P.P., Lin H.K. Deciphering the transcription complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol*, in press, 2010.
  47. Lin H.K., Chen Z., Wang G., Nardella C., Lee S.W., Chan C.H., Yang W.L., Wang J., Egia A., Nakayama KI., Cordon-Cardo C., Teruya-Feldstein J., Pandolfi P.P. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf/p53-independent cellular senescence. *Nature* 464: 374-9, 2010.
  48. Izumi N., Yamashita A., Iwamatsu A., Kurata R., Nakamura H., Saari B., Hirano H., Anderson P., Ohno S. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK family and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Science Signaling*, in press.
  49. Cong W., Hirose T., Yamashita A., Mizuno K., Harita Y., Hirano H., Ohno S. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) is involved in the PAR complex to regulate epithelial cell polarity. *Current Biol*, in press.
  50. Kobiyama K., Takeshita F., Jounai N., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Ishii K. J., Kawai T., Sasaki S., Hirano H., Ishii N., Okuda K., Suzuki K. Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J Virol* 84: 822-32, 2010.
  51. Shinya T., Osada T., Desaki Y., Hatamoto M., Yamanaka Y., Hirano H., Takai R., Che F.-S., Kaku H., Shibuya N. Characterization of receptor proteins using affinity cross-linking with biotinylated ligands. *Plant Cell Physiol* 51:262-70, 2010.
  52. Islam N., Campbell P. M., Higgins T. J. V., Hirano H., Akhurst R. J. Transgenic peas expressing an  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from beans show altered expression and modification of endogenous proteins. *Electrophoresis* 30:1863-68, 2009.
  53. Intoh 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: 126-37, 2009.
  54. Kato Y., Arakawa N., Mashuishi Y., Kawasaki H., Hirano H. Mutagenesis of longer inserts by the ligation of two PCR fragments amplified with a mutation primer. *J Biosci Bioeng* 107: 95-7, 2009.
  55. Kobiyama K., Takeshita F., Ishii K. J., Koyama S., Aoshi T., Akira S., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Yamanaka Y., Hirano H., Suzuki K., Okuda, K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class vaccine adjuvant. *J Immunol* 182:1593-601, 2009.
  56. Yokoyama R., Iwafune Y., Kawasaki H., Hirano, H. Isoelectric focusing of high-molecular-weight-protein complex under native conditions using agarose gel. *Anal Biochem* 387:60-3, 2009.
  57. Yamashita A., Izumi N., Kashima I., Ohnishi T., Saari B., Katsuhata Y., Muramatsu R., Morita T., Iwamatsu A., Hachiya T., Kurata R., Hirano H., Anderson P., Ohno, S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 23:1091-105, 2009.
  58. 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, タンパク質をみる一構造と挙動—。長谷俊治高尾敏文, 高木淳一編, 化学同人, 京都, pp1-32, 2009.
59. Kamp K, Hirano H. N-Terminal sequencing of N-terminally modified proteins. In: The Protein Protocols Handbook (Walker, J. M. ed.) Humana Press, New York, pp1063-80, 2009.
  60. 木村弥生, 平野 久: iTRAQ試薬を用いた疾患バイオマーカー探索, 明日を拓く新次元プロテオミクス. 中山敬一, 松本雅記編, 秀潤社, 東京, pp 116-21, 2009.
  61. 丸山伸之, 平野 久, 内海 成: 種子成分の合成と生化学, 原田久也監修, 種子の科学とバイオテクノロジー, 学会出版センター, p 49, 種子生理生化学研究会編, 学会出版センター, 東京, 2009.
  62. 平野 久: 医学略語辞典, 橋本信也監修, 中央法規, 東京, 印刷中.
  63. 尾野雅哉, 松原淳一, 根岸綾子, 山田哲司: 2DICALを用いた疾患バイオマーカー探索. 細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」pp122-30, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2009.
  64. Sasaki K., Satomi Y., Takao T., Minamino N. Snapshot peptidomics of the regulated secretory pathway. Mol. Cell. Proteomics 8:1638-47, 2009.
  65. Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Kohsaka S., Uchino S. The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in adult hippocampus. Glia 57: 1082-90, 2009.
  66. Ohsawa, K., Irino Y., Sanagi, T., Nakamura Y., Suzuki, E., Inoue K., Kohsaka S. P2Y12 receptor-mediated integrin-β1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. Glia 58: 790-801, 2010.
  67. Namba T., Yabe T., Gonda Y., Ichikawa N., Sanagi T., Arikawa-Hirasawa E., Mochizuki H., Kohsaka S., Uchino S. Pigment epithelium-derived factor up-regulation induced by memantine, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, is involved in increased proliferation of hippocampal progenitor cells. Neuroscience 167: 372-83, 2010.
  68. Shida K., Misonou Y., Korekane H., Seki, Y., Noura S., Ohue M., Honke K., Miyamoto Y. Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells. Glycobiology 19:1018-33, 2009.
  69. Misonou Y., Shida K., Korekane H., Seki, Y., Noura S., Ohue M., Miyamoto Y. Comprehensive clinico-glycomic study of 16 colorectal cancer specimens: Elucidation of aberrant glycosylation and its mechanistic causes in colorectal cancer cells. J Proteome Res 8: 2990-3005, 2009.
  70. Shirahata M., Oba S., Iwao-Koizumi K., Saito S., Ueno N., Oda M., Hashimoto N., Ishii S., Takahashi JA., Kato K. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. Cancer Sci 100:165-72, 2009
  71. Yukinawa N., Oba S., Kato K., Ishii S. Optimal aggregation of binary classifiers for multiclass cancer diagnosis using gene expression profiles. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform. Apr-Jun;6(2):333-43, 2009.
  72. Goranova TE., Ohue M., Kato K. Putative precursor cancer cells in human colorectal cancer tissue. Int J Clin Exp Pathol 2:154-62. 2009.
  73. Kato K. Impact of the next generation DNA sequencers. Int J Clin Exp Med. 2:193-202, 2009.
  74. Kato K. Algorithm for in vitro diagnostic multivariate index assay. Breast Cancer. 16:248-51, 2009.
  75. Otsuka N., Tsuritani K., Sakurai T., Kato K., Matoba R., Itoh J., Okuyama S., Yamada K., Yoneda Y. Transcriptional induction and translational inhibition of

- Arc and Cugbp2 in mice hippocampus after transient global ischemia under normothermic condition. *Brain Res* 1287:136-45, 2009.
76. Umemura H., Nezu M., Satoh M., Kimura A., Tomonaga T., Kodera Y., Nomura F. Effects of the time intervals between venipuncture and serum preparation for serum peptidome analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 406:179-80, 2009.
  77. Kobayashi D., Kumagai J., Morikawa T., Wilson M M., Wilson A., Irie A., Araki N. An integrated approach of differential Mass Spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival. *Mol Cell Proteomics* 8:2350-67, 2009.
  78. Nambu T., Araki N., Nakagawa A., Kuniyasu A., Kawaguchi T., Hamada A., Saito H. The Contribution of BCR-ABL-independent Activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci* 101:137-42, 2010.
  79. Wongkham S., Junking M., Wongkham, C., Sripa B., Chur-in S., Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke associated cholangio-carcinoma. *Cancer Sci.* 100: 2077-84, 2009.
  80. Ihara T., Ishii T., Araki N., Wilson A., Jyo A. Silver ion unusually stabilizes the structure of a parallel-motif DNA triplex. *J Am Chem Soc* 131:3826-27, 2009.
  81. Motoyama K., Kameyama K., Onodera R., Araki N., Hirayama F., Uekama K., Arima H. Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl-beta-cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl-alpha-cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur J Pharm Sci* 38:249-61, 2009
  82. Kuramitsu Y., Miyamoto H., Tanaka T., Zhang X., Fujimoto M., Ueda K., Hamano K., Nakamura K. Proteomic differential display analysis identified up-regulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human malignant pleural mesothelioma cell lines. *Proteomics* 9: 5078-89, 2009.
  83. Hayashi E., Kuramitsu Y., Fujimoto M., Zhang X., Tanaka T., Uchida K., Fukuda T., Furumoto H., Ueyama Y., Nakamura K. Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 protein is upregulated in human oral squamous cell carcinoma and dependent on the differential level. *Proteomics Clin Appl* 3:1338-1347, 2009.
  84. Tamesa MS., Kuramitsu Y., Fujimoto M., Maeda N., Nagashima Y., Tanaka T., Yamamoto S., Oka M., Nakamura K. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* 30:2168-81, 2009.
  85. Bell AW., Deutsch EW., Au CE., Kearney RE., Beavis R., Sechi S., Nilsson T., Bergeron JJ., HUPO Test Sample Working Group (Nakamura K. et al.): A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nat. Methods* 6: 423-430, 2009.
  86. Mori-Iwamoto S., Taba K., Kuramitsu Y., Ryozaawa S., Tanaka T., Maehara Y., Okita K., Nakamura K., Sakaida I. Interferon-gamma down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine. *Pancreas* 38:224-226, 2009.