

G-2. 学会発表

1. Tomonaga T., Wu D., Nomura F.:
Validation and functional analysis of a tumor marker candidate, eIF4H isoform 1, identified by 2DE. 3rd EuPA Congress, Stockholm, June 14-17th, 2009.
2. 朝長 毅: 疾患関連バイオマーカー探索研究の現状と今後の方向性. 第 7 回北里疾患プロテオーム研究会, 神奈川, 2009 年 7 月. (口頭)
3. 朝長 毅: プロテオームリサーチセンターにおける疾患関連バイオマーカー探索研究. 日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回大会, 東京, 2009 年 7 月. (口頭)
4. 朝長 毅: 最新プロテオーム解析技術を用いた疾患関連バイオマーカー探索研究. 第 82 回 日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月. (口頭)
5. 朝長 毅: プロテオーム解析の最新事情と基盤研プロテオームリサーチセンターの現状. 彩都バイオサイエンスセミナー大阪, 2009 年 11 月. (口頭)
6. 久我佳菜子, 曾川一幸, 佐藤 守, 川島祐介, 松下一之, 小寺義男, 朝長 毅, 前田忠計, 野村文夫: C 型肝炎ウイルス由来の原発性肝細胞癌の高感度バイオマーカー探索. 日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回大会, 東京, 2009 年 7 月. (ポスター)
7. 久家貴寿, 聶 華, 佐藤守, 松下一之, 前島一博, 野村文夫, 朝長 毅: 癌の染色体不安定のプロテオーム解析~lamin B2 の発現低下による染色体不安定性の誘導~. 日本ヒトプロテオーム機構 第 7 回大会, 東京, 2009 年 7 月. (ポスター)
8. 北村淳史, 松下一之, 滝口裕一, 梶原久子, 多田裕司, 田川雅敏, 島田英昭, 廣島健三, 朝長 毅, 巽浩一朗, 野村文夫: 悪性胸膜中皮腫に対する c-myc 遺伝子転写抑制因子 FIR を搭載したウイルスベクターによる治療法の開発. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
9. 梶原寿子, 松下一之, 朝長 毅, 糸賀 栄, 松原久裕, 野村文夫: 癌における c-myc 転写抑制因子 FIR の転写とスプライシングの関連について. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
10. 松下一之, 梶原寿子, 朝長 毅, 島田英昭, 糸賀 栄, 北村淳史, 野村文夫: 癌化における FBP-interacting repressor(FIR)の c-myc 遺伝子転写抑制と遺伝子のスプライシングのリンクについて. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (口頭)
11. 風見隆裕, 朝長 毅, 聶 華, 佐藤 守, 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫: Villin 1 及び annexin A2 は大腸癌細胞核内で高発現し、染色体不安定に関与する. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
12. 堅田浩司, 朝長 毅, 松下一之, 佐藤 守, 花澤豊行, 小寺義男, 岡本美孝, 野村文夫: Plectin-1 は癌細胞の遊走・浸潤を促進し、頭頸部癌の新しい予後因子マーカーとなる. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
13. アブリーズマイヌル, 朝長 毅, 曾川一幸, 佐藤 守, ウブリジュレット, 松下一之, 小寺義男, 野村文夫: Three step 血中プロテオーム解析を用いた早期膀胱癌血清マーカーの同定. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
14. 外池百合恵, 松下一之, 朝長 毅, 西森孝典, 岡本美孝, 野村文夫: ペリプラキンは咽頭と食道癌細胞株においてドセタキセル感受性と細胞運動亢進の双方に関与している. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
15. パストゥラル エロディ, 山崎泰代, リッチイ ショーン, グッデナウ ダイアン, 朝長 毅, 野村文夫: 各癌における発癌性代謝システムの臨床的比較. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
16. 吉川真太郎, 曾川一幸, 梅村啓史, 佐藤 守, 松下一之, 小寺義男, 朝長 毅, 横須賀収, 野村文夫: 胆管癌の新たなバイオマーカー探索への血清プロテオーム解析. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)

17. 久家貴寿, 聶 華, 松下一之, 野村文夫, 朝長 毅: lamin B2 の発現低下による染色体不安定性の誘導. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (口頭)
18. 松田綾子, 黒野尚美, 河野千夏, 代田 梢, 平林明子, 堀埜睦美, 越中屋里香, 祖父江里奈, 佐々木優美, 安藤津矢子, 伊藤未来, 前田純夫: 大腸菌の cell-to-cell transformation に抑制的に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月. (ポスター)
19. 黒野尚美, 松田綾子, 越中屋里香, 祖父江里奈, 佐々木優美, 伊藤未来, 安藤津矢子, 前田純夫: 大腸菌の cell-to-cell transformation に必須あるいは促進的に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月. (ポスター)
20. 風見隆浩, 朝長 毅, 聶 華, 佐藤守, 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫: アネキシン A2 は大腸癌細胞の核に局在、高発現し、染色体不安定性に関与する. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月. (ポスター)
21. Nagano K., Okamura T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Antibody proteomics technology for efficient screening of tumor-related proteins using phage antibody library. Biomarker World Congress 2009, Philadelphia (U.S.A.), 27-29, 2009.
22. Okamura T., Nagano K., Yamashita T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Identification of candidate proteins related to lymph node metastasis by antibody proteomics technology. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Tronto, 2009.
23. Nagano K., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Search for tumor-related biomarker proteins by antibody proteomics technology. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Tronto, 2009.
24. Nagano K., Yamashita T., Okamura T., Watanabe T., Kanasaki S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Frequent expression of TRAIL-R2 in human breast tumors revealed by antibody proteomics technology. 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon, 2009.
25. 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央: 創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬. CphI Japan 2009, 東京, 2009 年.
26. 角田慎一: 創薬ターゲット探索基盤としての抗体プロテオミクス. 第 46 回薬剤学懇談会研究討論会, 神戸, 2009 年.
27. 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. 第 25 回日本DDS学会学術集会, 東京, 2009 年.
28. 角田慎一, 堤 康央: 創薬バイオマーカー探索のための抗体プロテオミクス技術. 日本プロテオーム機構 (JHUPO) 第 7 回大会, 東京, 2009 年.
29. 堤 康央, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による疾患マーカー・治療ターゲットの効率的探索. 彩都バイオサイエンスセミナー, 大阪, 2010 年.
30. 長野一也, 岡村賢孝, 中川晋作, 小泉桂一, 済木育夫, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術による肺がんリンパ節転移関連蛋白質の探索 1. 第 18 回日本がん転移学会学術集会旭川, 2009.
31. 岡村賢孝, 長野一也, 小泉桂一, 済木育夫, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術による肺がんリンパ節転移関連蛋白質の探索 2. 第 18 回日本がん転移学会学術集会, (北海道), 2009 年.
32. 長野一也, 今井 直, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカーの探索とその評価. 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009 年.
33. 岡村賢孝, 長野一也, 山下琢矢, 角田慎一, 堤 康央: 抗体プロテオミクス技術によるリ

- ンパ節転移関連蛋白質の探索. 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2009 年.
34. 山下琢矢, 長野一也, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 今井直, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: 抗体プロテオミクス技術による乳がん関連蛋白質の同定と機能評価. ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋, 2009 年.
 35. Serada S., Fujimoto M., Terabe F., Nishikawa T., Kishimoto T., Naka T.: Proteomics-based identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel biomarker associated with disease activity of inflammatory autoimmune disorders. 第 39 回日本免疫学会総会, 大阪, 2009 年 12 月.
 36. Kim A., Serada S., Takahashi T., Ripley B., Souma Y., Fujimoto M., Naka T.: Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. ECCO 15 · 34th ESMO Multidisciplinary Congress, Internationale Congress Centrum Berlin (ICC Berlin), Berlin, Germany from Sunday 20 to Thursday 24 September 2009.
 37. 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～宮崎からの黎明の曙光～, 宮崎, 2009 年 5 月.
 38. 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」, 大阪, 2009 年 9 月.
 39. 中山敬一: プロテオミクスが拓く生命科学 research の新地平: もうウェスタンブロットィングは要らない?! 第 29 回日本糖質学会年会, 高山, 2009 年 9 月.
 40. 中山敬一: プロテオミクスが拓く生命科学 research 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, 神戸, 2009 年 10 月.
 41. 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, 東京, 2009 年 11 月.
 42. Nakayama KI., Yumimoto K., Matsumoto M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by differential proteomics. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 恩納, 2009 年 11 月.
 43. 白根道子, 中山敬一: Protrudin 依存的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, 横浜, 2009 年.
 44. 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. (H21 年 12 月, 横浜)
 45. 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, 横浜, 2009 年 12 月.
 46. 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, 横浜, 2009 年 12 月.
 47. 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, 2009 年 12 月.
 48. 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, 2009 年 12 月.
 49. 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, 2009 年 12 月.
 50. 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, 2009 年 12 月.
51. 松崎芙美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬二: 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, 2009 年 12 月.
 52. 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ィングは要らない!?. 第 3 回 FANTASY, 東京, 2010 年 2 月.
 53. 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, 福岡, 2010 年 2 月.
 54. Nakayama KI, 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., シンガポール, 2010 年 2 月.
 55. Saita S., Shirane M., Nakayama KI: Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with VAMP-associated protein (VAP). 5th Global-COE International Symposium: Cell cycle and differentiation., シンガポール, 2010 年 2 月.
 56. Nakayama KI: 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. エルサレム, 2010 年 3 月.
 57. 安東秀晃, 山中結子, 川崎博史, 森雅亮, 横田俊平, 平野久: 川崎病原因蛋白質の探索及び翻訳後修飾の解析. 第 82 回日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009 年 10 月.
 58. 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久: 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の機能解析, 日本ヒトプロテオーム機構第 7 回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009 年 7 月.
 59. 荒川憲昭, 田矢史織, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野久: 卵巣明細胞腺癌におけるアネキシン IV 複合体の構成因子の同定, 第 82 回日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009 年 10 月.
 60. 平野久: プロテオーム解析による食品安全性評価, 日本農芸化学会シンポジウム, 福岡, 2009 年 3 月.
 61. 平野久: 蛋白質複合体の翻訳後修飾のプロテオーム解析, 第 73 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 名古屋, 2009 年 5 月.
 62. 平野久: バイオマーカー及び創薬ターゲット探索のプロテオーム研究における質量分析, 第 61 回日本細胞生物学会, 名古屋, 2009 年 6 月.
 63. 平野久: 分析技術の発達により見えてきた蛋白質の翻訳後修飾とその異常, 第 1 回公開シンポジウム科学技術振興調整費先端融合領域イノベーション創出拠点の形成, 翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成, 横浜, 2009 年 6 月.
 64. 平野久: 診断マーカーのプロテオミクス, 探索, バリデーション, 利用の方法. 第 60 回日本電気泳動学会総会, 松本, 2009 年 9 月.
 65. 平野久: プロテオームの翻訳後修飾プロテオミクス. 日本生化学会, 神戸, 2009 年 10 月.
 66. 平野久: 育種対象としてみた塩基性 7S グロブリンの特徴, 日本育種学会, 京都, 2010 年 3 月.
 67. Hirano H: Clinical proteomics, What can we see by mass spectrometry? The 7th Kitasato Symposium for Disease Proteomics, Sagamihara, Jul. 2009.
 68. Hirano H: Identification and validation of ovarian cancer-associated proteins. YCU-FDA CBER Joint Workshop, Yokohama, Mar. 2009.
 69. Hirano H: Proteomics of post-translational modification. Yamaguchi

- University Life Science Seminar, JHUPU Satellite Symposium, Jul. 2009.
70. Hirano H.: Proteomic analysis of co- and post-translational modifications in the yeast 26S proteasome. 11th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Vienna, Aug. 2009.
 71. Hirano H., Arakawa, N., Masuishi, Y., Morita, E., Miyagi, E. and Hirahara, F.: Proteome analysis for the discovery of biomarkers and therapeutic targets. 5th AOUPU Congress, 14th ADNAT Convention & 1st PSI Conference, Hyderabad, India, Feb. 2010.
 72. 井野洋子, 小池里紗, 石黒 齊, 窪田吉信, 荒川憲昭, 平野 久: 前立腺癌細胞におけるアンドロゲン非依存性獲得機構に関するリン酸化タンパク質の解析. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
 73. 加藤 悠, 川崎博史, 平野 久: 出芽酵母二倍体における Bud32p 複合体による極性制御機構. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
 74. 加藤 悠, 川崎博史, 大山良文, 岩崎博史, 古久保哲朗, 平野 久: 二倍体出芽酵母 Bud32 複合体の細胞極性制御に関する機能. 第82回日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009年10月.
 75. 木村弥生, 永田佳代子, 鈴木信勇, 横山 亮, 北村 浩, 山中結子, 平野 久, 小原 收: リン酸化アフィニティー二次元電気泳動を用いた Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K の質的・量的変動モニタリング. 日本電気泳動学会第60回総会, M ウイング文化センター, 松本, 2009年9月.
 76. 倉田洋一, 木村弥生, 名古屋博之, 岡本裕之, 正岡哲治, 荒木和男, 森山俊介, 平野 久, 森 司: 成長ホルモン遺伝子組換えアマゴの研究-5: 脳下垂体のプロテオーム解析. 日本水産学会日本大学生物資源科学部, 藤沢, 2010年3月.
 77. 増石有佑, 荒川憲昭, 川崎博史, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: 新規 p53 ターゲット ANX4 は卵巣明細胞腺癌の p53 活性を低下させる. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
 78. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 川崎博史, 平野 久: レドックスプロテオミクスによる血管型 NADPH オキシダーゼの標的タンパク質の同定. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 北里大学白金キャンパス, 東京, 2009年7月.
 79. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 川崎博史, 平野 久: 血管型 NADPH オキシダーゼが標的とするタンパク質チオールの網羅的解析. 第82回日本生化学会大会 ポートアイランド, 神戸, 2009年10月.
 80. 寺沢洋平, 高田兼則, 河原太八, 平野 久, 笹隈哲夫, 笹沼恒男: アフガニスタンのコムギ在来品種の遺伝的多様性・硬軟質性の解析. 日本育種学会, 北海道大学, 北海道, 2009年9月.
 81. Terasawa Y., Takata K., Kawahara T., Hirano H., Sasakuma T. and Sasanuma T.: Evaluation of high molecular weight-glutenin subunit of Afghan wheat landraces and identification of a novel Glu-D1 allele. Xth International Gluten Workshop Clemont-Ferrand, France, Sep. 2009.
 82. 飛田直哉, 高橋枝里, 荒川憲昭, 宮城悦子, 平原史樹, 川崎博史, 平野 久: 卵巣癌におけるプロヒビチンのリン酸化. 日本生化学会大会, ポートアイランド, 神戸, 2009年10月.
 83. 平野 久: プロテオミクスによる疾患関連タンパク質の解析. 富士フィルム講演会, 小田原, 2009年2月.
 84. 平野 久: プロテオミクス研究の変遷, 将来への課題. バイオテクノロジー研究開発動向に関する調査委員会講演会, 経済産業省, 東京, 2009年2月.
 85. 平野 久, 倉田洋一, Islam, N., 森 司: プロテオーム解析による食品安全性評価. 日本農芸化学会講演会, 福岡国際会議場, 福岡, 2009年3月.

86. Hirano H.: Proteomics for the discovery of biomarkers and therapeutic targets. The 2nd International Workshop Co-sponsored by Yokohama City University and FDA (United States Food and Drug Administration), 講演要旨 13-14, 横浜, 2009年3月.
87. 叢 偉立, 廣瀬智敬, 山下暁朗, 水野恵子, 倉田理恵, 平野 久, 大野茂男: P160はPAR-3と複合体を形成して上皮細胞客性を制御する. 日本細胞生物学会要旨集, p44, 名古屋, 2009年6月.
88. 佐々木一樹, 里見佳典, 高尾敏文, 南野直人: 調節性分泌経路のペプチドミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 東京 2009年7月.
89. 佐々木一樹, 南野直人: 分泌顆粒内ペプチドの解析から明らかになる世界. 第82回日本生化学会大会シンポジウム「ペプチドの多様性と機能」, 神戸, 2009年10月.
90. 尾崎 司, 佐々木一樹, 南野直人: 分泌ペプチドーム解析による新規活性ペプチドの探索. 第62回ペプチド討論会, 小倉, 2009年11月.
91. Ohsawa K., Nakamura Y., Irino Y., Sanagi T., Suzuki E., Inoue K. and Kohsaka S.: Involvement of $\beta 1$ integrin activation by P2Y₁₂ receptor in microglial process extension. The 22th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry / Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Busan, Korea, Aug.25th, 2009.
92. Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino S. and Kohsaka S.: Alzheimer's disease drug "memantine" promotes neurogenesis and progenitor cell self-renewing in adult mouse hippocampus. The 22th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry / Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Busan, Korea, Aug. 25th, 2009.
93. 難波隆志, 前川素子, 矢部武士, 湯浅茂樹, 内野茂夫, 高坂新一: メマンチンにより発現が亢進する PEDF は成体海馬神経新生の促進に関与する. 第32回日本神経科学会大会, 名古屋, 2009年9月.
94. 佐柳友規, 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵里, 湯浅茂樹, 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人, 高坂新一: ALSモデルラット脊髄におけるミクログリア凝集体の解析. 第14回グリア研究会, 大阪, 2009年11月.
95. 大澤圭子, 佐柳友規, 中村泰子, 鈴木恵里, 井上和秀, 高坂新一: ミクログリアの形態変化と遊走—細胞外ATPによる遊走と突起伸長の調節分子機構—. 第52回日本神経化学大会, 群馬, 2009年6月.
96. 信田京子, 是金宏昭, 御園生良子, 能浦真吾, 大植雅之, 宮本泰豪: 大腸癌の癌化に伴う糖脂質の構造変化と生合成関連糖転移酵素の解析糖脂質の構造解析. 第29回日本糖質学会年会, 岐阜, 2009年9月.
97. Taniguchi K., Yamada T., Sasaki Y., Kato K.: Genetic and epigenetic aberrations in human multiple hepatocellular carcinoma. 第100回米国癌学会 (AACR 100th Annual Meeting), 米国コロラド, 2009年4月.
98. Nishitani K., Taniguchi K., Okami J., Kodama K., Higashiyama M., Kato K.: Detection of EGFR gene T790M mutation in non-small cell lung cancer using an improved version of the BEAMing technology. 第68回日本癌学会総会, 横浜, 2009年10月.
99. 荒木令江, 森川崇, 坪田誠之, 緑川宇一, 水口惣平, 小林大樹, 新堀晶子, 中村英夫, 倉津純一: 抗体カクテルと natural protein chip を用いた簡便な病態関連分子群解析法の開発. 第82回日本生化学会 (神戸) 2009年10月.
100. 小林大樹, 平山未央, ウィルソン森藤政代, 水口惣平, 長山慈, 森川崇, 新堀晶子, 坪田誠之, 緑川宇一, 荒木令江: プロテオミクス手法による神経系細胞分化に関わるNF1腫瘍抑制遺伝子関連タンパク質の同定とその役割. 第82回日本生化学会 (神戸) 2009年10月.
101. 水口惣平, 森川崇, 坪田誠之, 緑川宇一, 長

- 山慈, 小林大樹, アンソニーウィルソン, ウィルソン森藤政代, 中村英夫, 倉津純一, 荒木令江: 統合プロテオミクスとバイオフィオマティクスの手法を用いた脳腫瘍の化学治療感受性に関する Vimentin を介した ネットワークの解析. 第82回日本生化学会(神戸) 2009年10月.
102. 南部 健, 濱田哲暢, 荒木令江, 齋藤秀之: A BCR·ABL-independent activation of ERK1/2 contributes to imatinib-resistance in K562 Cells. 第82回日本生化学会(神戸) 2009年10月.
103. ウィルソン政代, アンソニーウィルソン, 田代康介, 小林大樹, 新堀晶子, 森川 崇, 荒木令江: A study of molecular mechanisms in heterogeneous cancer development using combined transcriptomic and proteomic analysis. (トランスクリプトームとプロテオーム解析を用いた癌細胞ヘテロ集団の発育機構の解明), 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月.
104. Morikawa T., Tsubota N., Midorikawa, U., Kobayashi D., Muzuguchi, S., Nakamura H., Kuratsu, J., Araki N.: An integrated proteomics for studying mechanism of chemo-resistance in gliomas. (融合プロテオミクスによるグリオーマの化学治療抵抗性メカニズムの解析), 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月.
105. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる疾患関連タンパク質群の解析(招待講演). 日本生化学会近畿支部第15回支部シンポジウム, 大阪, 2009年9月.
106. 小林大樹, 荒木令江: プロテオミクス手法による神経系細胞分化に関わる NF1 腫瘍抑制遺伝子関連タンパク質の同定とその役割. 第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 唐津, 2009年9月.
107. 緑川宇一, 荒木令江: 全自動2次元電気泳動装置を用いた臨床サンプルの2D-Western 解析. 第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 唐津, 2009年9月.
108. 荒木令江: 融合プロテオミクスによるがん研究の最前線とその応用(招待講演). 同仁化学研究所特別講演会, 熊本, 2009年9月.
109. 新森加納子, 鹿川 哲史, 森川 崇, 小林 大樹, 坪田 誠之, 緑川 宇一, 柏木 太一, 中尾 光善, 荒木 令江, 田賀 哲也: 翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化の運命づけを司る核内分子の探索. 日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO), 東京, 2009年7月.
110. 田中 毅, 木下英樹, 緑川宇一, 菅野三奈子, 楠本晃司, 松永貴輝, 後藤真一, 大木 博, 丸尾祐二, 鶴沼 豊, 中村 眞, 荒木令江: 全自動2次元電気泳動-プロッティングシステムの開発. 日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO), 東京, 2009年7月.
111. 緑川宇一, 坪田誠之, 森川 崇, 木下英樹, 丸尾祐二, 鶴沼 豊, 中村 眞, 荒木令江: 全自動2次元電気泳動装置を用いた臨床サンプルの2D-Western 解析. 日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO), 東京, 2009年7月.
112. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる悪性腫瘍の化学療法耐性メカニズムの解析 (An integrated proteomics for studying mechanism of tumor cellular chemo-resistances). 日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO), 東京, 2009年7月.
113. 荒木令江: 「生命のナゾ解きで病気を治す!」(女性研究者による講演会 招待講演). 文部科学省女子中高生の理系進路選択支援事業 2009「サイエンス・プロジェクト for 九州ガールズ!」, 熊本, 2009年6月.
114. 荒木令江: 神経線維腫症1の分子病態 (Molecular mechanisms related to cellular abnormality in neurofibromatosis 1), ワークショップ「神経皮膚症候群研究の進歩」(招待講演). 第51回日本小児神経学会総会, 米子, 2009年5月.
115. 森川 崇, 坪田誠之, 緑川宇一, 長山 慈, 小林大樹, Anthony Wilson, Wilson 森藤政代, 中村英夫, 倉津純一, 森安眞津子, 荒木令江: 退形成性乏突起膠腫 (AOG) における化学療法感受性に関連する蛋白質

群の機能プロテオーム解析. 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月.

116. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる細胞内疾患関連シグナルの解析(招待講演). 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月.
117. Araki N.: A standard framework of sequential proteomics for cancer research (Invited Speaker Keynote Lecture). The 2nd BMB Conference: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development (Khon Kaen, Thailand) May 7-8th, 2009.
118. 杉原佳恵, 藏満保宏, 田中寿幸, 岡 正朗, 中村和行: C 型肝炎に起因する肝細胞癌のプロテオーム解析. 第 60 回日本電気泳動学会, 松本, 2009 年 9 月.
119. Sugihara K., Kuramitsu Y., Tanaka T., Fujimoto M., Oka M., Nakamura K.: Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma caused by hepatitis C virus. The HUPO 8th Annual World Congress, Toronto, Canada, Sep. 26-30th, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録情報

H-1. 特許

1. 発明の名称: 血管新生誘導分子
出願番号: 特願 2009-275254
出願日: 2009 年 12 月 3 日
出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
発明者: 仲 哲治, 世良田聡
2. 発明の名称: 自己免疫疾患検査用バイオマーカー及び検査方法
出願番号: 特願 2009-138408
出願日: 2009 年 6 月 9 日
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所, 国立大学法人大阪大学
発明者: 仲哲治, 世良田聡, 岸本忠三
3. 発明の名称: タンパク質の定量方法
出願番号: 特願 2009-169045
出願日: 2009 年 7 月 17 日

出願人: 国立大学法人九州大学
発明者: 中山敬一, 松本雅記

4. 発明の名称: 卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
出願番号: 特願 2010-035737
出願日: 2010 年 2 月 22 日
出願人: 公立大学法人横浜市立大学
発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 山中結子, 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子
5. 発明の名称: 発明の名称: 発明の名称: 融合プロテオミクス解析による疾患原因タンパク質群の同定方法および薬剤効果検出方法
出願番号: 特願 2010-81524
出願日: 2010 年 3 月 31 日
出願人: 国立大学法人熊本大学
発明者: 荒木令江, 水口惣平, 森川 崇, 坪田誠之, 小林大樹, 倉津純一
6. 発明の名称: 統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法
出願番号: 特願 2010-81525
出願日: 2010 年 3 月 31 日
出願人: 国立大学法人熊本大学
発明者: 荒木令江, 水口惣平, 小林大樹, 坪田誠之, 森川 崇
7. 発明の名称: 腫瘍マーカー、それに対する抗体、その検出キット及びその検出方法
出願番号: 2010-041859
出願日: 2010 年 2 月 26 日
出願人: 地方独立行政法人大阪府立病院機構
発明者: 宮本泰豪

H-2. 実用新案登録

なし.

H-3. その他

1. 報道発表
・日本経済新聞 夕刊 2009 年 10 月 28 日
「炎症判断の物質特定」

- ・日本経済新聞 2009年7月15日
「抗癌剤の「敵」発見」
- ・日経産業新聞 2009年4月22日
「がん化促すたんぱく質」
- ・日刊薬業 2009年4月22日
「基盤研 大腸がん・食道がんにかかわるタンパク質同定」

I. 研究協力者

高尾敏文 大阪大学蛋白質研究所

教授

山本 格 新潟大学大学院医歯学総合研究科

教授

角田慎一 医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト

プロジェクトリーダー

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

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

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、癌、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。

本研究では、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：大阪市加島）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。

A. 研究目的

国際的な新薬開発競争に際して、シーズとなる疾患関連バイオマーカーの発見、知的財産権の確保は、今後のわが国の医薬品産業の発展に不可欠である。そのためには、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、その疾患関連タンパク質の発見にはヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス解析が重要である。これまでもそれらの材料を用いた疾患プロテオミクス解析は行われてきたが、その解析技術の未熟さから比較的量の多いタンパク質しか同定されず、新たなバイオマーカーとなるタンパク質は発見されていない。しかし近年の質量分析計をはじめとする飛躍的な技術革新に伴い、バイオマーカーとなりやすい微量なタンパク質の検出・同定が可能となった。

本研究では、その最新のプロテオミクス技術を駆使して「がん、生活習慣病等の診断薬・治療薬の開発」のために有用な新規バイオマーカータンパク質の探索およびその実用化を目的とする。特にプロテオミクスが威力を発揮する翻訳後修飾タンパク質などの探索に力を注ぐ予定である。また、探索だけにとどまらず、得られたバイオマーカー候補タンパク質の有用性につ

いて、機能解析から多検体を用いた大規模な検証までの一連の解析を行う予定である。以上の解析により、実用化の可能性のあるバイオマーカーを一つでも多く創出できると期待される。

B. 研究方法

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候補タンパク質の探索

(1) リン酸化タンパク質

千葉大学医学部附属病院第2外科において根治手術を行った大腸癌患者の癌組織および大腸癌培養細胞株からタンパク質を抽出した。2 mg のタンパク質をトリプシンでペプチドに消化し、そこから Fe³⁺ をキレートした樹脂を用いた Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 法でリン酸化ペプチドのみを精製した。精製したリン酸化ペプチドを iTRAQ 標識し、陽イオン交換クロマトグラフィーで30分画した後に、全ての分画を LC/MS で解析し、リン酸化ペプチドの同定を行った。

(2) 膜タンパク質に着目した大腸癌バイオマーカーの探索

培養細胞や大腸組織サンプルをホモジュナイザーで破碎し、低速遠心により核や未破碎の細胞を除いた後、超高速遠心で可溶性画分を除き、

膜画分を調製した。膜画分は、デオキシコール酸ナトリウムやラウロイルサルコシン酸を含む溶液で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加え、酸性条件にすることで界面活性剤を除いた。脱塩精製後得られたペプチドサンプルは、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて解析した。

(3) 血清・血漿の前処理法 (DS 法) を用いた大腸癌バイオマーカーの探索

血清 10 μ l を 20 μ l の変性溶液 (7 M urea、2 M thiourea、20 mM DTT) に加えたものを 900 μ l の冷アセトンにゆっくり添加し、19,000g で 15 分遠心することによってタンパク質・ペプチドを沈殿させた。その沈殿物に 200 μ l の 70% アセトニトリル (ACN)、12 mM HCl 溶液を加えて 4°C、1 時間インキュベーションすることで、ペプチド成分だけを溶出させ、遠心後上清を回収した。この DS 法で抽出したペプチドを凍結乾燥にて濃縮後、逆相 HPLC で 60 分画し、それぞれを MALDI-TOF-MS で測定、健常人と大腸癌患者で発現の異なるペプチドを同定した。

(4) 多発性硬化症患者自己抗体の探索とその抗原の同定

ラット大脳組織から調製した膜画分に対する多発性硬化症患者の血清の反応性をイムノブロット法で調べることにより、自己抗体の検出を試みた。反応のみられたスポットは、切り出し、トリプシン消化後、液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて解析することにより自己抗体の抗原を同定した。同定の結果得られた N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) については、FLAG タグを付加した NSF (NSF-FLAG) を強制発現させた培養細胞の抽出物や抗 FLAG タグ抗体を用いて精製した NSF-FLAG に対する他の患者や健常人の血清の反応性を調べることにより検証をおこなった。

2. バイオマーカー候補タンパク質の機能解析

(1) eIF4H

千葉大学医学部附属病院第 2 外科において根治手術を行った大腸癌患者 10 症例、食道癌患者 20 症例の癌部および非癌部組織からタンパク質を抽出し、eIF4H isoform 1 について、ウエスタンブロット法と免疫組織染色法によりタンパク発現量を、リアルタイム PCR 法で mRNA 量を確認した。マウス線維芽細胞

NIH3T3 に eIF-4H isoform 1 遺伝子を導入した安定発現株を作製し、ヌードマウスの皮下に移植し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。また、大腸癌培養細胞 LOVO と RKO および正常線維芽細胞 MRC5 と WI38 に eIF4H isoform 1 の siRNA を導入し、生細胞数を MTS 法で、アポトーシス細胞を TUNEL 法で検討した。さらに LOVO と RKO の eIF4H isoform 1 特異的な shRNA 安定発現株を作製し、ヌードマウスの皮下に移植し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。

(2) Plectin 1

千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉科において根治手術を行った頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 患者 12 症例の癌部および非癌部組織からタンパク質を抽出し、agarose 2D-DIGE 法によりタンパク質の発現量を比較した。有意差が認められたスポットを泳動ゲルから切り出し、質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて同定した。Plectin 1 について、ウエスタンブロット法と免疫組織染色法によりタンパク発現量を確認した。また、RNAi 法を用いて plectin 1 の発現を抑制した時の、増殖能・遊走能・浸潤能を proliferation assay、wound healing assay、matrigel invasion assay で評価した。さらに、組織中タンパク質の発現強度を免疫染色によって求め、全生存率との関係について統計解析を行った。

3. 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

ターゲットペプチドとして APL18 ペプチドを選択した。APL18 標準ペプチドは疎水性が高いため DMSO 100% に溶解して用いた。まず、MRM 用のチャンネルを設定するために、APL18 標準ペプチドを LC/MSMS 測定をし、親イオンとフラグメントイオンを確認した。その結果、1 つの親イオンに対し、ピーク強度の高いフラグメントイオン 3~4 個を用いてチャンネルを設定した。そのチャンネルを使って、APL18 標準ペプチド 100 amol、250 amol、500 amol、1 fmol、2.5 fmol の MRM 測定を行い、得られたデータを Multi-Quant によって検量線を作成した。その際の LC は、溶媒 A に 2%、ACN、0.1%FA、B 溶媒に 90%ACN、0.1%FA を使い、グラジエントは 5 分間 B%5 でスタートし、20 分で B%55、10 分間 B%95 の洗浄の

計 35 分のメソッドを用いた。血漿の抗 APL18 抗体による免疫沈降は以下のように行った。血漿 5 ml を buffer 1 (0.1%N-octyl- glucoside, 140mM NaCl, 10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, SIGMA PImix1/500) で 2 倍に希釈し 50k のフィルターで 4°C、80 分間遠心ろ過後、抗 APL18 抗体と Protein sepharose A ビーズを用いて免疫沈降を行い、20%ACN、0.1%FA で溶出した。

レーン	1	2	3	4	5	6	7
血清量(μl)		0.5	5	10	5	10	100
抽出法	-	-	K	K	A	F	F

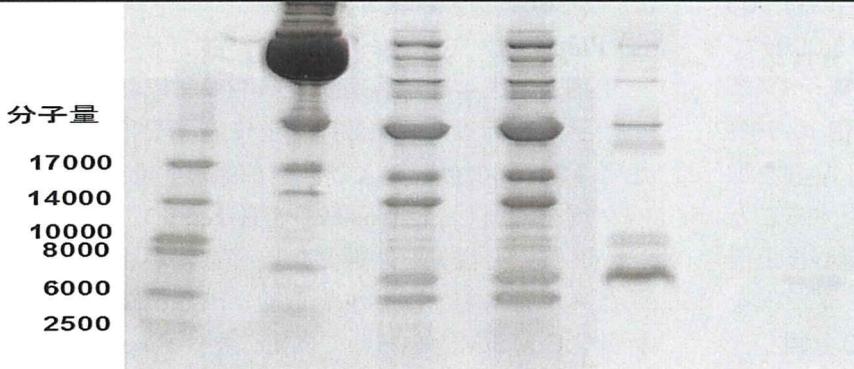


図1. DS法で抽出したペプチドの電気泳動分析結果
レーン1: 分子量マーカー, レーン2: 未処理血清0.5 μl, レーン3, 4: 血清5 μlならびに10 μlからDS法で抽出した成分。レーン5: 有機溶媒沈殿法(A)で血清5 μlから抽出した成分, レーン6, 7: 限外ろ過法(F)で血清10 μlならびに100 μlから抽出した成分。他の方法に比べてDS法では、未処理血清で見られるアルブミンが除去され低分子量ペプチドが濃縮されている(矢印)。

(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試料提供機関である千葉大学大学院医学研究院および大阪大学医学部附属病院の倫理審査委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものであり、独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターにおける使用を両審査委員会および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. 研究結果

C-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候補タンパク質の探索

(1)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、同位体標識 iTRAQ 法によるタンパク質の定量比較解析法を確立した。同時に研究協力機関から解析に用いるヒト試料の収集を行い、倫理審査委員会で承認された。

(2)リン酸化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癌組織でのリン酸化タンパク質の同定を行った。その結果、培養細胞からリン酸化ペプチド約 6,000 種

類、リン酸化タンパク質約 3,000 種類同定でき、組織からはリン酸化ペプチド約 3,000 種類、リン酸化タンパク質約 1,500 種類が同定できた。

(3)抗体医薬のターゲットとなる細胞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癌組織での膜タンパク質の同定を行った。その結果、培養細胞からペプチド約 6,000 種類、

タンパク質約 3,000 種類同定でき、組織からはペプチド約 3,000 種類、タンパク質約 1,500 種類が同定できた。

(4)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) (図 1, 2)。

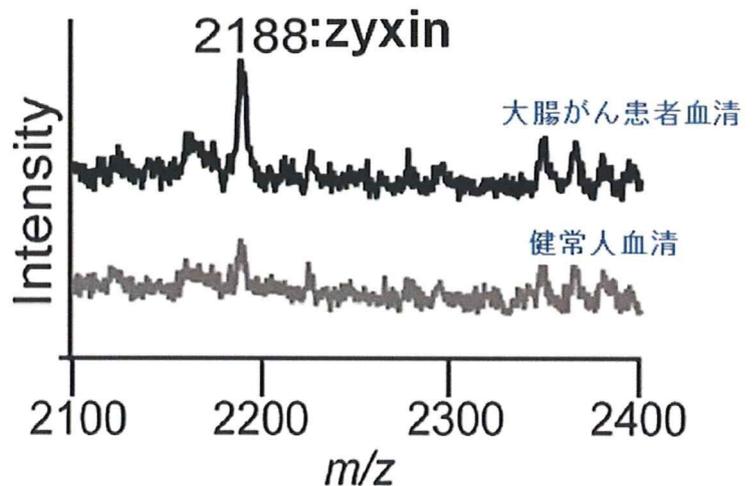


図2. 大腸がんマーカー候補ペプチドの分析結果
DS法を用いて前処理を行った血清を逆相HPLCで分画後、MALDI-TOF-MSで大腸がん患者血清8例、健常人血清8例の比較検討を行った。その結果2188m/zのzyxinタンパク質の断片が大腸癌患者で増加していた。

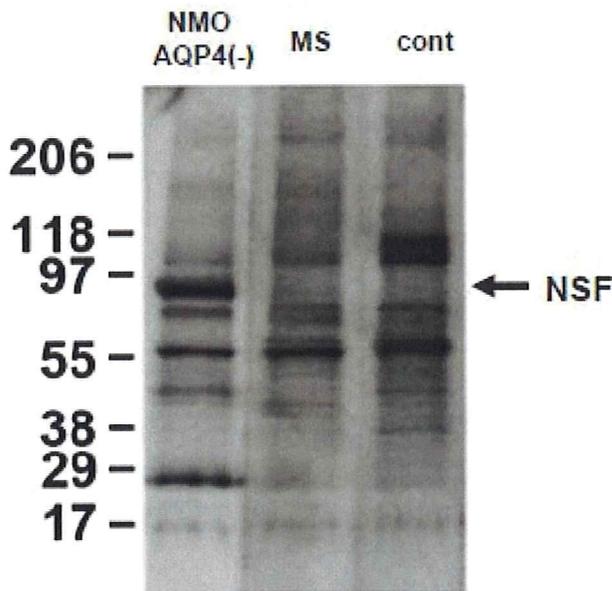


図3. 多発性硬化症患者血清中の自己抗体の探索
ラット大脳膜タンパク質画分をSDS-PAGEで分離し、そのタンパク質を転写したメンブレンに患者と健康人の血清を反応させ、患者血清特異的なバンドを検索した。その結果、NMO(視神経脊髄炎)患者血清に特異的に反応するタンパク質NSF(矢印)が検出された。

(5)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(図3)。

C-2. バイオマーカー候補タンパク質の機能解析

(1)大腸癌のバイオマーカー候補タンパク質: eIF4H isoform 1

大腸癌組織のプロテオーム解析で癌部での発現増大が見られたタンパク質 eIF4H isoform 1 の機能解析を行った。eIF4H isoform 1 遺伝子をマウス線維芽細胞 NIH3T3 cell に強発現させ、その細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ腫瘍が形成された。逆に eIF4H isoform 1 に対する RNAi でその発現を抑制させると、マウスの皮下移植腫瘍の縮小がみられた(図4)。この RNAi は正常培養細胞の増殖に影響を与えないことから、新しい抗がん剤のターゲットと考えられた。

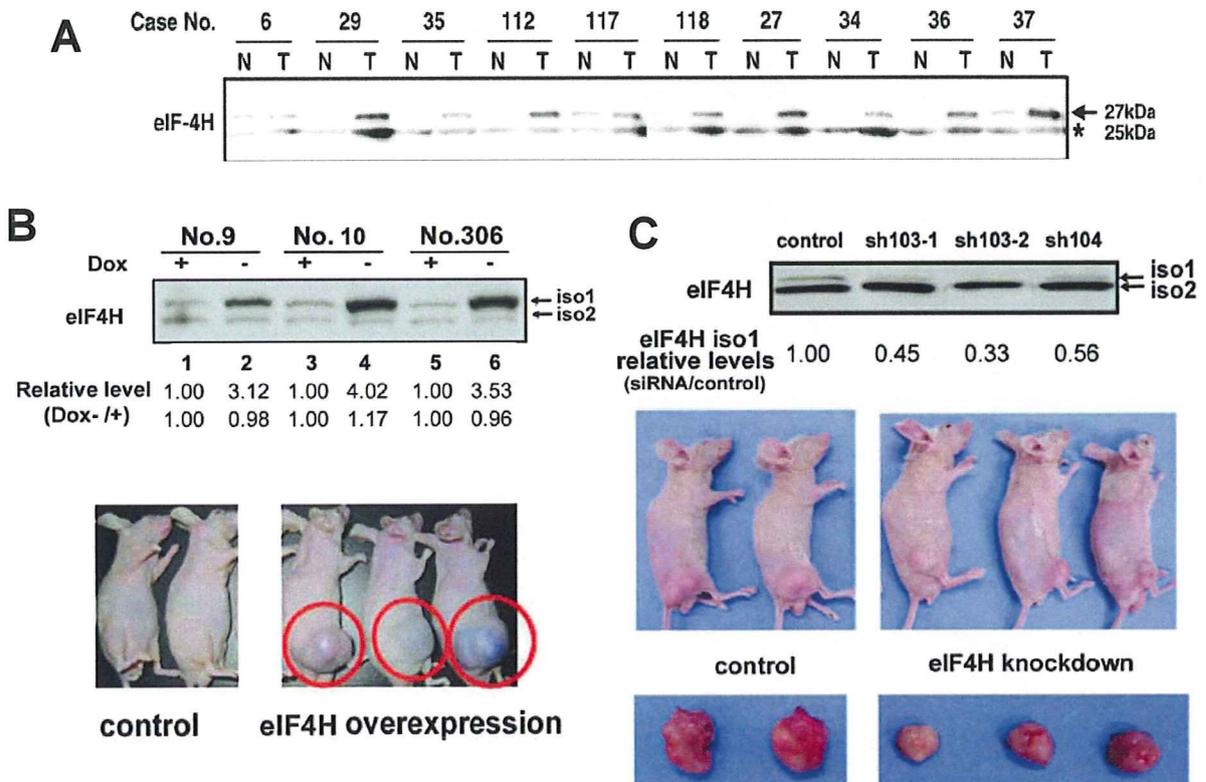


図4. 大腸癌のバイオマーカー候補タンパク質: eIF4H isoform 1

A. ヒト大腸癌手術標本の非癌部(N)と癌部(T)からタンパク質を抽出し、抗eIF4H抗体でウエスタンブロットを行った。eIF4Hはisoform 1(27kDa)と2(25kDa)の2つのisoformが存在するが、癌部組織でisoform 1が特異的に発現増大していた。B. NIH3T3細胞のDox誘導性のeIF4H isoform 1安定発現株を作製し、ヌードマウスの皮下に移植したところ、eIF4H isoform 1発現株のみで腫瘍が形成された。C. 大腸癌細胞LOVOにeIF4H isoform 1特異的なshRNAを導入し、その細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、コントロール群に比べ有意に腫瘍の大きさが減少した。

(2)頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の予後予測マーカータンパク質: plectin-1

HNSCC 組織のプロテオーム解析で癌部での発現増大が見られた plectin-1 の機能解析を行った。頭頸部癌細胞の plectin-1 の発現を RNAi で抑制した結果、癌細胞の増殖・遊走・浸潤が抑制された (図 5)。また、HNSCC 全 62 症例の組織標本を抗 plectin-1 抗体で免疫染色を行ったところ、plectin-1 の発現が高い症例は低い症例に比して有意に予後が悪く、しかも転移する頻度が高かった (図 6)。

以上の結果から plectin-1 は HNSCC 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。

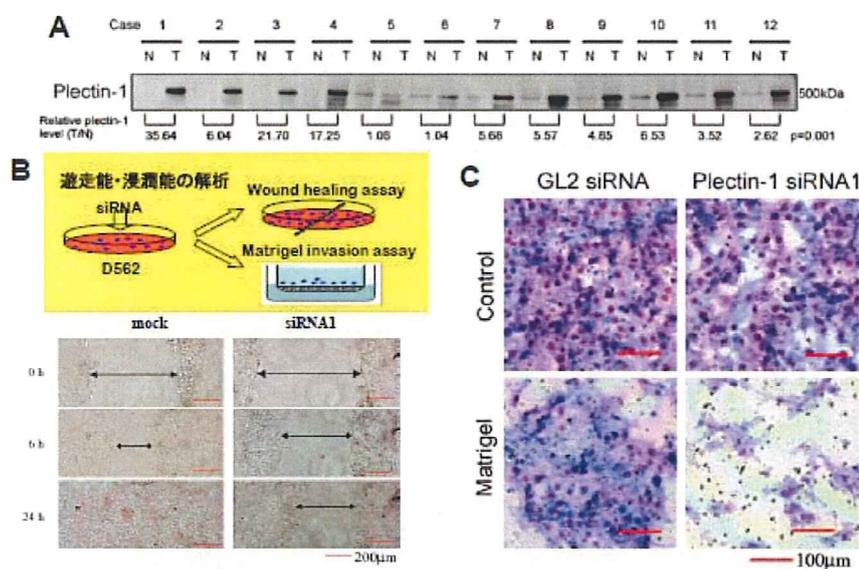


図5. plectin-1は頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)で発現増大し、細胞の遊走、浸潤に関するA. ヒトHNSCC手術標本の非癌部(N)と癌部(T)からタンパク質を抽出し、抗plectin 1抗体でウェスタンブロットを行ったところ、癌部組織でplectin 1が特異的に発現増大していた。B 頭頸部癌細胞D562のplectin 1をsiRNAを用いてノックダウンし、wound healing assayを行ったところ、コントロールに比べsiRNA処理した細胞は傷の修復が遅延した。C. D562のplectin 1ノックダウン細胞を用いて、matrigel invasion assayを行ったところ、コントロールに比べsiRNA処理した細胞はmatrigelを通過して浸潤した細胞が減少した。

C-3. 質量分析計によるタンパク質定量法の開発

バイオマーカー候補タンパク質のハイスループットの検証を実現するため、3連四重極型質量分析計によるMRM法の検討を行った。このMRM法は、選択性が高く、高感度に対象物を検出でき、さらに定量を実現することができる手法である。まず、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定量した結果、40 amol の微量なペプチドが検出できた (図 7)。またヒト血清中の APL18 を免疫沈降法で濃縮した試料も MRM

法で検出できることがわかった。このことより、MRM法がアルツハイマー病の早期診断・病態把握に有用である可能性が示された。

3連四重極型質量分析計によるMRM法を用いて、アルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチド APL1825、27、28 の合成ペプチドを定量した結果、40 amol の微量なペプチドまで検出できた。

D. 考察

本研究の特色・独創的な点は最新の高精度次世代質量分析計を駆使し、日本のプロテオミクス研究の第一線で活躍している研究分担者と協力して、今までにない網羅性の高いタンパク質の検出・同定・検証のための基盤的技術の開発を行うこと、およびその技術を用いて臨床検体を材料としたバイオマーカー探索を行うことである。

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の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。

また、今年度解析に用いたヒト臨床検体の疾患の種類はまだ限られており、ヒト試料を用いるための倫理審査も承認されたものはわずかである。来年度は対象とする疾患の種類を増やして、より多くの疾患のバイオマーカー探索を目指す予定である。

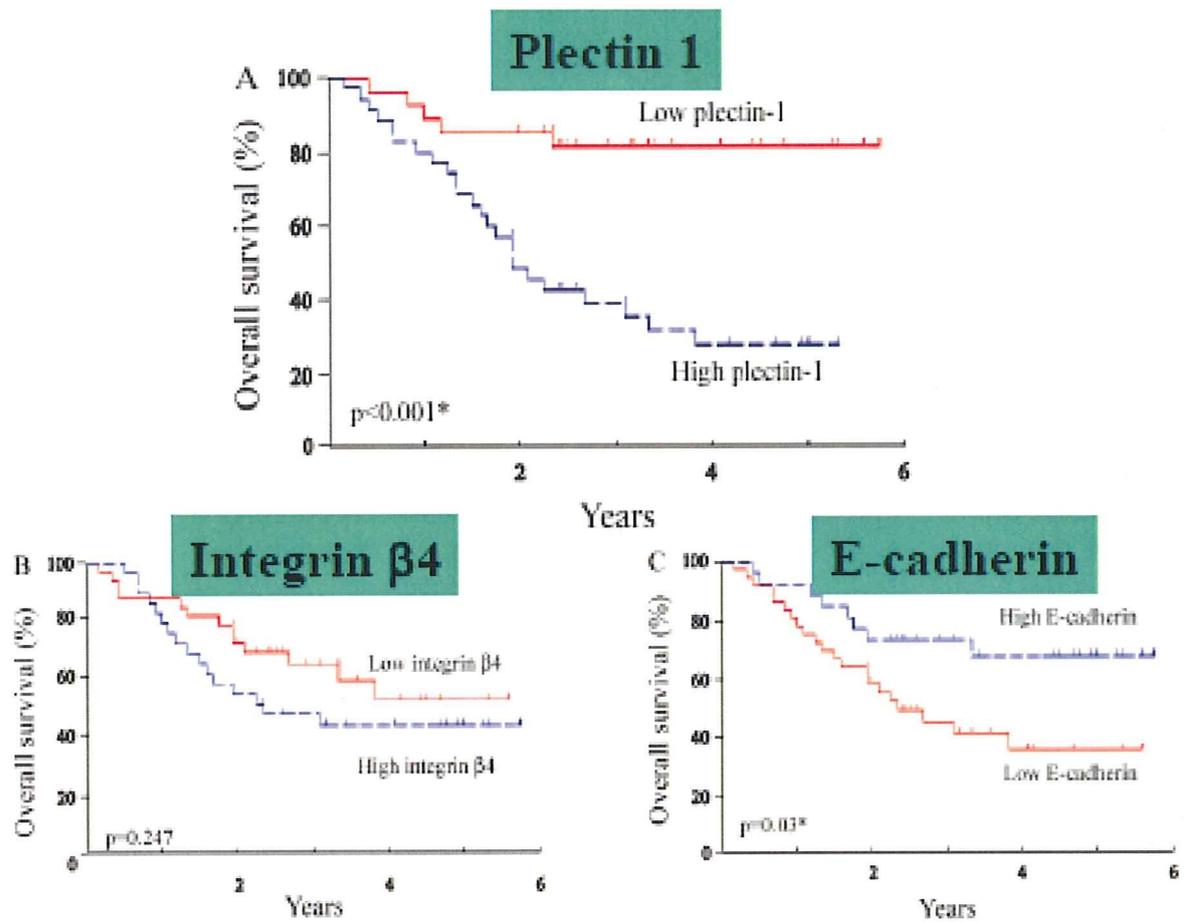


図6. 頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の予後予測マーカータンパク質: plectin-1
 HNSCC患者の予後を plectin 1、integrin β 4、E-cadherin の発現レベルで比較したところ、 plectin 1 高発現群は低発現群に比較して明らかに生存率が低下していた。その生存率の差は integrin β 4 や E-cadherin の高発現群と低発現群間の生存率の差よりも明らかに大きいことが分かった。

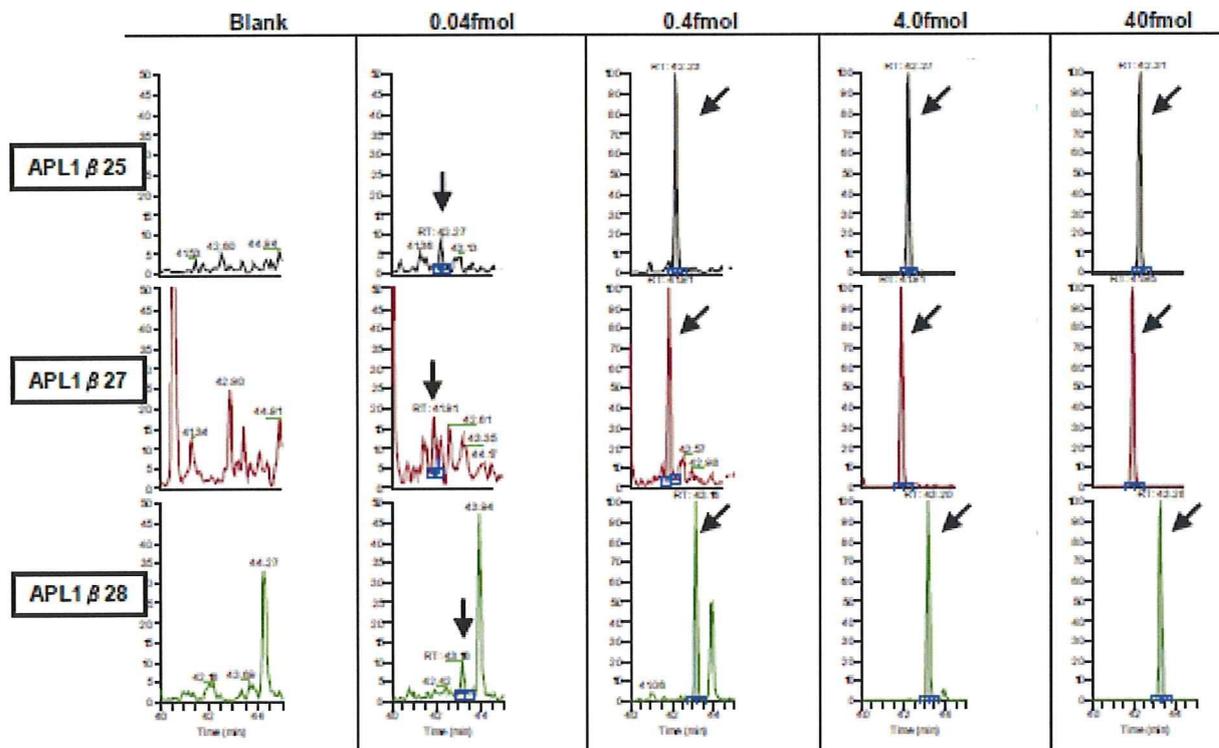


図7. MRM法によるタンパク質定量法の開発
 3連四重極型質量分析計によるMRM法を用いて、アルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチド APL1 β 25、27、28 の合成ペプチドを定量した結果、40 amol の微量なペプチドまで検出できた。

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から医薬基盤研究所に拠点を移すとともに、最新の質量分析計7台などプロテオーム解析に必要な機器、体制を完備した。iTRAQ法、リン酸化タンパク質、膜タンパク質の解析法やMRM法などバイオマーカー探索に必要な基盤技術を確立すると同時に、大腸癌、頭頸部扁平上皮癌や多発性硬化症のバイオマーカー候補タンパク質の同定に成功した。大腸癌のバイオマーカー候補タンパク質eIF4H isoform 1に関しては、論文発表、プレスリリースを行った。

F. 健康危険情報

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., Koder 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., Koder 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., Koder 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., Koder 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」.

G-2. 学会発表

1. Tomonaga T., Wu D., Nomura F.: Validation and functional analysis of a tumor marker candidate, eIF4H isoform 1, identified by 2DE. 3rd EuPA Congress, Stockholm, June 14-17th, 2009.
2. 朝長 毅: 疾患関連バイオマーカー探索研究の現状と今後の方向性. 第7回北里疾患プロテオーム研究会, 神奈川, 2009年7月. (口頭)
3. 朝長 毅: プロテオームリサーチセンターにおける疾患関連バイオマーカー探索研究. 日本ヒトプロテオーム機構 第7回大会, 東京, 2009年7月. (口頭)
4. 朝長 毅: 最新プロテオーム解析技術を用いた疾患関連バイオマーカー探索研究. 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月. (口頭)
5. 朝長 毅: プロテオーム解析の最新事情と基盤研プロテオームリサーチセンターの現状. 彩都バイオサイエンスセミナー大阪, 2009年11月. (口頭)
6. 久我佳菜子, 曾川一幸, 佐藤 守, 川島祐介, 松下一之, 小寺義男, 朝長 毅, 前田忠計, 野村文夫: C型肝炎ウイルス由来の原発性肝細胞癌の高感度バイオマーカー探索. 日本ヒトプロテオーム機構 第7回大会, 東京, 2009年7月. (ポスター)
7. 久家貴寿, 聶 華, 佐藤守, 松下一之, 前島一博, 野村文夫, 朝長 毅: 癌の染色体不安定のプロテオーム解析~lamin B2の発現低下による染色体不安定性の誘導~. 日本ヒトプロテオーム機構 第7回大会, 東京, 2009年7月. (ポスター)
8. 北村淳史, 松下一之, 滝口裕一, 梶原久子, 多田裕司, 田川雅敏, 島田英昭, 廣島健三, 朝長 毅, 巽浩一朗, 野村文夫: 悪性胸膜中皮腫に対するc-myc遺伝子転写抑制因子FIRを搭載したウイルスベクターによる治療法の開発. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (ポスター)
9. 梶原寿子, 松下一之, 朝長 毅, 糸賀 栄, 松原久裕, 野村文夫: 癌におけるc-myc転写抑制因子FIRの転写とスプライシングの関連について. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (ポスター)
10. 松下一之, 梶原寿子, 朝長 毅, 島田英昭, 糸賀 栄, 北村淳史, 野村文夫: 癌化におけるFBP-interacting repressor(FIR)のc-myc遺伝子転写抑制と遺伝子のスプライシングのリンクについて. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (口頭)
11. 風見隆裕, 朝長 毅, 聶 華, 佐藤 守, 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫: Villin 1及びannexin A2は大腸癌細胞核内で高発現し、染色体不安定に関与する. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (ポスター)
12. 堅田浩司, 朝長 毅, 松下一之, 佐藤 守, 花澤豊行, 小寺義男, 岡本美孝, 野村文夫: Plectin-1は癌細胞の遊走・浸潤を促進し、頭頸部癌の新しい予後因子マーカーとなる. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (ポスター)
13. アブリーズマイヌル, 朝長 毅, 曾川一幸, 佐藤 守, ウブリジュレト, 松下一之, 小寺義男, 野村文夫: Three step 血中プロテオーム解析を用いた早期膀胱癌血清マーカーの同定. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (ポスター)
14. 外池百合恵, 松下一之, 朝長 毅, 西森孝典, 岡本美孝, 野村文夫: ペリプラキンは咽頭と食道癌細胞株においてドセタキセル感受性と細胞運動亢進の双方に関与している. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月. (ポスター)

15. パストゥラル エロディ, 山崎泰代, リッチイ ショーン, グッデナウ ダイアン, 朝長毅, 野村文夫: 各癌における発癌性代謝システムの臨床的比較. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
16. 吉川真太郎, 曾川一幸, 梅村啓史, 佐藤 守, 松下一之, 小寺義男, 朝長毅, 横須賀収, 野村文夫: 胆管癌の新たなバイオマーカー探索への血清プロテオーム解析. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (ポスター)
17. 久家貴寿, 聶 華, 松下一之, 野村文夫, 朝長毅: lamin B2 の発現低下による染色体不安定性の誘導. 第 68 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月. (口頭)
18. 松田綾子, 黒野尚美, 河野千夏, 代田 梢, 平林明子, 堀埜睦美, 越中屋里香, 祖父江里奈, 佐々木優美, 安藤津矢子, 伊藤未来, 前田純夫: 大腸菌の cell-to-cell transformation に抑制的に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月. (ポスター)
19. 黒野尚美, 松田綾子, 越中屋里香, 祖父江里奈, 佐々木優美, 伊藤未来, 安藤津矢子, 前田純夫: 大腸菌の cell-to-cell transformation に必須あるいは促進的に関与する遺伝子の網羅的スクリーニング. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月. (ポスター)
20. 風見隆浩, 朝長毅, 聶 華, 佐藤守, 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫: アネキシン A2 は大腸癌細胞の核に局在、高発現し、染色体不安定性に関与する. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月. (ポスター)

H. 知的財産権の出願・登録情報

H-1. 特許

なし

H-2. 実用新案登録

なし.

H-3. その他

1. 報道発表

- ・日経産業新聞 2009 年 4 月 22 日
「がん化促すたんぱく質」
- ・日刊薬業 2009 年 4 月 22 日
「基盤研 大腸がん・食道がんにかかわるタンパク質同定

I. 研究協力者

石濱 泰 慶應大学先端生命科学研究所
准教授

近藤 格 国立がんセンター研究所プロテオーム
バイオインフォマティクスプロジェクト
プロジェクトリーダー

原 康洋 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

久米 秀明 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

久家 貴寿 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

恩田 弘明 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

金川 章子 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

佐野 聖三 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

鳴海 良平 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

越中屋 里香 医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト

疾患関連タンパク質の解析基盤の研究

研究分担者 堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

本研究課題では、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、蛋白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蛋白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蛋白質に対して、独自に構築したファージ抗体ライブラリを駆使することで、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蛋白質を一挙にバリデーション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、発現変動蛋白質の同定と、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蛋白質を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蛋白質として有用な候補分子を絞り込むことができた。

A. 研究目的

近年のプロテオミクス研究の進展に伴って、がんや自己免疫疾患をはじめとする各種難治性疾患に関連する創薬バイオマーカー蛋白質を探索・同定しようとする研究が、世界的規模で推進されている。この創薬バイオマーカー蛋白質には、疾患の発症や悪化といった病態を的確に診断するための「疾患マーカー蛋白質」や、疾患の発症や悪化に直接関与している「創薬ターゲット蛋白質」等が含まれており、これらの情報を有効活用することで、画期的診断薬・治療薬の開発が可能になるものと期待されている。しかし、これまでのところ、創薬プロテオミクス研究から画期的診断薬・治療薬の開発に成功した例は、世界的にみても乏しいのが現状である。これは、疾患時の細胞や組織においては、数十から数百種類以上の蛋白質が、質的・量的・時空間的に発現変動しており、これら膨大な数の発現変動蛋白質（疾患関連蛋白質）の中から真に有用な創薬バイオマーカー蛋白質を絞り込む方法論が十分に確立されていないことに大きく起因している。とりわけ、蛋白質レベルでの機能解析やバリデーションに不可欠な抗体の作製過程が、プロテオミクス研究から

医薬品開発に迅速に展開するうえでのボトルネックとなっている。

本観点から我々は、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ことを目的に、モノクローナル抗体の迅速創製とその活用により、創薬バイオマーカー蛋白質を効率よく絞り込む方法論の確立を進めている。これ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蛋白質に対して、独自に構築したファージ抗体ライブラリを駆使することで、僅か数週間で特異抗体を網羅的に作製すること、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蛋白質を一挙にバリデーションを可能とするものである。昨年度は、乳がんをモデルとしたバイオマーカー蛋白質探索・バリデーションにより、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、発現変動蛋白質の同定と、それらに対する抗体の網羅的取得、さらに、取得した抗体と組織マイクロアレイを用いたバイオマーカー蛋白質のバリデーションを試みた。

B. 研究方法

B-1. 細胞培養

ヒト初代培養気管上皮細胞 (NHBE) は Lonza 社より、ヒト肺がん細胞株 (RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ) は JCRB Cell Bank より入手した。NHBE 細胞の培養には気管上皮細胞培地 Kit (Lonza) を、RERF-LC-MS の培養には、10% FBS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む E-MEM 培地を、RERF-LC-KJ の培養には 10% FBS 及び 1% 抗生物質カクテルを含む RPMI-1640 培地を用い、いずれも継代培養をしてサブコンフルエント状態のものを実験に供した。

B-2 浸潤能試験

ヒト肺がん細胞株 RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ を、無血清培地 (Opti-MEM, Invitrogen) で 24 時間培養した。In vitro invasion assay には 96 well BME cell invasion assay Kit (Trevigen) を使用した。Top chamber に basement membrane extract (BME) を 50 μ l 添加し 4 時間インキュベーションすることで膜をコートした。続いて、上清を除き、無血清培地で 1×10^6 cells/ml に調製した各細胞を 50 μ l 播種し、75 μ l の血清入り培地で満たされた bottom chamber 上にセットし、48 時間培養した。アスピレーターで bottom chamber の培地を吸引後、wash buffer で 2 回洗浄し、calcein-AM solution を 100 μ l 添加し、1 時間インキュベーションすることで bottom chamber に浸潤した細胞を蛍光標識した。細胞溶解後の蛍光強度を、ARVO MX を用いて測定した。培地のみを蛍光強度をブランク (0%)、Top chamber に播種した細胞の蛍光強度をポジティブコントロール (100%) として、bottom chamber に浸潤した細胞の割合 (% invasion) を算出した。

B-3. 2D-DIGE (二次元ディファレンシャル電気泳動) 解析

ヒト肺がん細胞株 RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ と気管上皮細胞 NHBE を培養後、細胞溶解液 (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)) で溶解し、2D Quant Kit (GE Healthcare) を用いて蛋白質の濃度を測定した。RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ、NHBE の三者を混合して作製した内部標準用サンプル

と、RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ、NHBE のうち発現蛋白質の比較を行いたい 2 種のサンプル各 50 μ g をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 cy2、cy3、cy5 (GE Healthcare) と氷上で 30 分間反応させ、その後 10 mM Lysine を加え、氷上で 10 分間静置して反応停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT、2% pharmalyte (GE Healthcare)、7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS) で 450 μ l にメスアップした。一方、蛋白質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化試薬にて標識しないサンプルも同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 5-6) スリッパ (GE Healthcare) を入れ、oil を重層することで封をした。ETTAN IPGPhor (GE Healthcare) を用いて、10 時間のプレ膨潤後、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に浸し、各 15 分間平衡化を行った。二次元目の SDS-PAGE を行うにあたり、溶解可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyltartardiamide gels) に IPG-gel スリッパをセットし、アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE Healthcare) を用いて、2 次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare) を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE (GE Healthcare) を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (GE Healthcare) を使用した。抗体作製用の蛋白質抽出には、溶解可能ピックゲルを 88 mM NaIO₄ を用いて室温で 30 分インキュベーションし、ゲルを溶解することで得た。

B-4. MS 解析

ピックしたゲル片に 100 μ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate/ 50% acetonitrile) を加え、室温で 10 分振盪させることで脱色を行った。続いて 200 μ l の 100% acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後、取り除き、遠心濃縮器によ