

C. 研究結果

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、以下の点を検討し、概ねその方法論が確立できた。

C-1. 髄液前処理の検討

(1) プロテアーゼ不活化

プロテアーゼ阻害剤の使用時の同定タンパク数 271、使用しない時は 269 であり、プロテアーゼ阻害剤の使用は不要と判断した。

(2) 抗体カラム

患者髄液プール検体を用いて、抗体カラムの種類を検討した。Agilent の Hu14 では、235 タンパク数、セプロ社 IgY14LC2 では 281 タンパク数でほぼ同等であったが、血清に多量に存在するタンパク質 66 種類を除去するセプロ社 SuperMix を用いた場合は、総計 21 種類と極端に同定数が減少した。したがって、SuperMix は髄液解析には不適と判断した。

C-2. cICAT 法に特異的な前処理法の工夫

SCX カラムの分画採取の工夫により、50 個以上の同定タンパク数の増加を可能にした。

D. 考察

すでにこれまでの研究で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判明しており、この技術を生かす為には、元々蛋白量が少ない髄液で、しかも臨床的に許容できる 2 ml 以下の初期量での測定法を確立する必要がある。

今年度は、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。

E. 結論

精神・神経疾患のプロテオーム解析を行うにあたって、髄液の有用性を最大限活用できるように、微量タンパク測定系、特に前処理法の改良を継続した。これによって、300 種近くの蛋白質が髄液初期量 2 ml からでも同定できる系を確立できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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.
2. Ohsawa K., Irino Y., Sanagi T., Nakamura Y., Suzuki E., Inoue K., Kohsaka S. P2Y12 receptor-mediated integrin- β 1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* 58: 790-801, 2010.
3. 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.

G-2. 学会発表

1. Ohsawa K., Nakamura Y., Irino Y., Sanagi T., Suzuki E., Inoue K., Kohsaka S. : Involvement of β 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.

2. Namba T., Maekawa M., Yuasa S., Uchino S., 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.
3. 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 回日本神経科学学会大会、名古屋、2009 年 9 月.
4. 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.
5. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

I. 研究協力者

後藤雄一 (国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第 2 部 部長)

新規糖鎖腫瘍マーカーの探索

研究分担者 加藤菊也 大阪府立成人病センター 研究所長

研究協力者 宮本泰豪 大阪府立成人病センター研究所

研究要旨

本研究では、癌の詳細な糖鎖構造解析を行うことで新規の癌特異的糖鎖抗原の発見し、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。現在まで大腸癌症例 60 名、膵臓癌症例 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、新規の癌特異的糖鎖抗原 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癌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^a 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^a 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^a) の前駆体である DU-PAN-2 (Sialyl Le^c) が、ルイス陰性の人にとって CA19-9 (Sialyl Le^a) 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癌原発組織 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。

A. 研究目的

細胞は癌化に伴いその細胞表面の糖鎖構造を大きく変化させる（糖鎖の癌性変化、aberrant glycosylation）。変化した糖鎖の一部は、正常粘膜上皮細胞では発現が認められず、癌細胞に特異的に発現することから、癌特異的糖鎖抗原と呼ばれている。その後の機能解析から、癌特異的糖鎖抗原は、癌の転移や浸潤などの悪性度に関与することが判明した。さらに、一部の癌特異的糖鎖抗原は、腫瘍マーカーとして広く臨床応用されている。最もよく知られているのが、CA19-9 (Sialyl Le^a epitope) で、膵臓癌、大腸癌、胃癌などの多くの癌の診断や経過観察などに用いられている。そのため、新規の癌特異的糖鎖抗原は、糖鎖と癌の悪性度との関わりをより深く理解する手がかりになるとともに、新規の腫瘍マーカーの発見につながることを期待できる。

そこで我々は、新規の癌特異的糖鎖抗原の発見をめざし、癌の詳細な糖鎖構造解析を実施してきた。2007 年には大腸癌から新規の癌特異的糖鎖抗原 2-6 sialylated Type2H (ST2H)を見出し、現

在、その機能解析および腫瘍マーカーとしての意義を検討中である。本プロジェクトにおいては、大腸癌のほか膵臓癌も解析対象に加えるとともに、さらに解析症例数を増やし、新たな癌特異的糖鎖抗原の発見を目指した。

一方、がん関連創薬バイオマーカー探索研究では乳癌の予後予測のためのバイオマーカーの探索を行っている。

B. 研究方法

我々は、糖鎖の中でも特に、糖脂質に焦点を絞り、その糖鎖構造を高精度、高感度で検出できる技術を確立した。解析には、癌細胞のほかに、正常粘膜上皮細胞も解析に供した。現在までに、大腸癌患者 60 名、膵臓癌患者 5 名（ルイス型血液型が陰性の患者をそれぞれ 4 名、2 名含む）のサンプルの解析が終了している。（ルイス型血液型は、約 90%の人が陽性で、約 10%の陰性である。）解析の精度をあげるため、癌組織、正常粘膜組織を collagenase で分解し、上皮細胞マーカーである CD326 の抗体で標識された磁気ビーズを用い

て高純度に単離した癌細胞、正常粘膜上皮細胞を解析に用いた。それらの細胞から中性脂質と酸性脂質を分離した。両脂質を Endoglycoceramidase II (TAKARA) で処理することにより糖脂質の糖鎖部分を切り出した。糖鎖を高感度で検出するため糖鎖部分を 2-アミノピリジンで蛍光標識し (ピリジルアミノ化、PA 化)、C18 逆相カラム及び Amide 順相カラムの 2 種類の HPLC を用いて糖鎖構造を推定する 2 次元糖鎖マッピング法、質量分析法と酵素消化法を組み合わせ、糖鎖構造を同定した。PA 化糖鎖の質量分析にはイオントラップ型質量分析計 LCQ Deca XP を用いた。酵素消化には、 α 2-3 sialyase、neuraminidase、bovine kidney fucosidase などを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、大阪府立成人病センターに設けられた倫理審査委員会において既に承認されている。今回使用した癌組織、正常組織は、手術前に患者さんに対して文書を用いて説明し、同意の得られた患者さんのサンプルである。

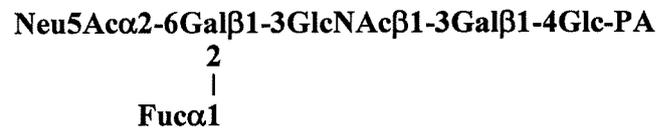
医薬基盤研究所へのサンプル提供は 23 症例行なった。11 症例の低リスク群と 12 症例の高リスク群であり、またこれらの症例は遺伝子発現プロファイル解析をすでに行っている症例であり、タンパクの解析結果と比較して解析を行っていく。

C. 研究結果

大腸癌 60 症例、膵臓癌 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、癌細胞、正常粘膜上皮細胞の、糖脂質の詳細な構造解析が終了している。

この中で、ルイス型陰性の 6 名の患者のうち 2 名 (大腸癌 1 症例、膵臓癌 1 症例) の癌細胞において、新規の癌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癌細胞および、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、癌特異的糖鎖抗原としてよく知られている Sialyl Lewis a (SLe^a)、Sialyl Lewis x (SLe^x)、Sialyl Type2H (ST2H) と異性体であることがわかった。 α 2-3 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、 α 2-6 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、新規の癌特異的糖鎖抗原である。

D. 考察

65 症例の癌細胞、正常粘膜上皮細胞の糖脂質の構造を詳細に解析した結果、新規の癌特異的糖鎖抗原、ST1H を発見した。この構造は、65 症例中、2 名 (大腸癌 1 症例、膵臓癌 1 症例) の癌細胞に認められた。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、この癌特異的糖鎖構造が、ルイス型血液型が陰性の人の癌に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。すなわち、ルイス型陰性の患者 6 症例中、2 症例の癌 (大腸癌 4 症例中 1 症例、膵臓癌 2 症例中 1 症例) に発現していたこととなる。

ST1H の想定される合成経路を図 1 に示す。以前、我々が発見した ST2H は大腸癌、膵臓癌症例の癌の約半数にその発現が認められた。一方 ST1H は、ルイス型陰性症例の癌細胞にのみその発現が認められた。ルイス型の血液型は、ルイス酵素 (FUT3) 遺伝子の遺伝子型で規定され、約 90% の人が陽性で、約 10% の陰性の人には両アレルのルイス酵素遺伝子に点突然変異があるため、Le^a、Le^b、Sialyl Le^a(CA19-9) などのルイス糖鎖抗原が合成できない (図 1)。

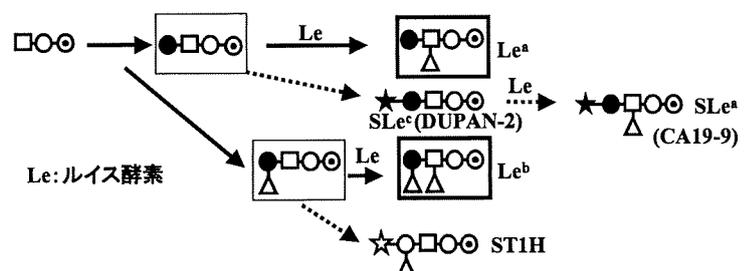


図 1. CA19-9、DU-PAN-2 および ST1H の想定される合成経路

このなかで、CA19-9 (Sialyl Le^a) は、上述したように、ルイス型の癌特異的糖鎖抗原で、この構造を認識する抗体は、膵臓癌や大腸癌、胃癌などの診断に使われている。しかし、Lewis 陰性の人には Sialyl Le^a 構造を作れないため、血清 CA19-9 は 0 となり、腫瘍マーカーとしての意味を持たない。しかし、CA19-9 (Sialyl Le^a) の前駆体である DU-PAN-2 (Sialyl Le^c) が、Lewis 陰性の人にとって CA19-9 (Sialyl Le^a) 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 はルイス陰性の人々の癌に主に発現する可能性が高い (図 1)。そのため、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。

E. 結論

大腸癌細胞、膵臓癌細胞の糖脂質の構造解析から、ルイス型陰性の患者に適した新規の腫瘍マーカー候補を発見できた。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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. Goranova TE., Ohue M., Kato K. Putative precursor cancer cells in human colorectal cancer tissue. *Int J Clin Exp Pathol* 2:154-62, 2009.
6. Kato K. Impact of the next generation DNA sequencers. *Int J Clin Exp Med* 2:193-202, 2009.
7. Kato K. Algorithm for in vitro diagnostic multivariate index assay. *Breast Cancer*. 16:248-51, 2009.
8. 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.

G-2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許

1. 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：特願 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

なし

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」

研究分担者 野村 文夫 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究要旨

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。

A. 研究の背景と目的

タンパク質を対象とする検査は臨床検査室の主役である。千葉大学医学部附属病院検査部の生化学・免疫検査室における測定対象はタンパク質以外にも、含窒素化合物、脂質、糖、電解質など多岐にわたるが、総項目数（103 項目）のうち、解析対象がタンパク質である項目が 79 項目と圧倒的に多い。血漿タンパク質の特徴はいわゆる abundant proteins がその大部分を占める点であり、存在量が上位 22 タンパク質の合計が全体の 99% を占め、残りの 1% は deep proteome と呼ばれる。deep proteome に存在する未知のバイオマーカーを効率よく探索するためには、abundant proteins の除去、ペプチドの選択的回収など多くの工夫が必要と思われる。一方、複数の施設の検体を利用してマーカー探索やバリデーションを実施する場合は、各施設の検体採取とプロセッシング、保存の条件を一定にすることが求められる。また、プロテオーム解析研究を通して見出されたバイオマーカー候補を臨床検査の現場に応用するためにもプレアナリシスの影響を精査することが不可欠である。

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。

B. 研究方法

プレアナリシスの検討では Bruker Daltonics 社の ClinProt™ システムを用いた。これは磁性ビーズを用いた前処理と MALDI-TOF MS による測定を組み合わせた系である。質量分析計は同社の AutoflexII TOF/TOF MS を使い、三種類 (WCX:弱陽イオン交換、IMAC-Cu:銅親和性、C8:疎水性)の磁性ビーズを用いた評価を行った。マトリックスには 10,000Da 以下の分子量領域を対象とする α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)マトリックスを使用した。ビーズによる血清の前処理からマトリックスとの混合、ターゲットプレートへ滴下して結晶化させるまでの工程は全てロボットで自動化して行った。質量分析はリニアモードで測定を行った。血清検体は健常人ボランティア 7 名(男性 5 名、女性 4 名、29 歳~47 歳)から採取したものである。早朝空腹時に採血し、1 時間室温で静置した後、1,500G で 10 分間遠心し、分注・保存した。ピークの検出および強度計算は専用ソフトウェアの ClinProtocols 2.1 を使用した。なお評価の対象としたのは 1,000~10,000Da の範囲であり、 $S/N > 5$ のピークを有意ととり、ピーク強度の計算には面積値を用いた。再現性に加えて、プレアナリシス変動要因として血清を遠心分離するまでの時間の影響、凍結融解の回数について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は千葉大学医学研究院の倫理委員会の承認を得て実施し、被験者より同意が得られた検体を用いた。

C.,D 研究結果と考察

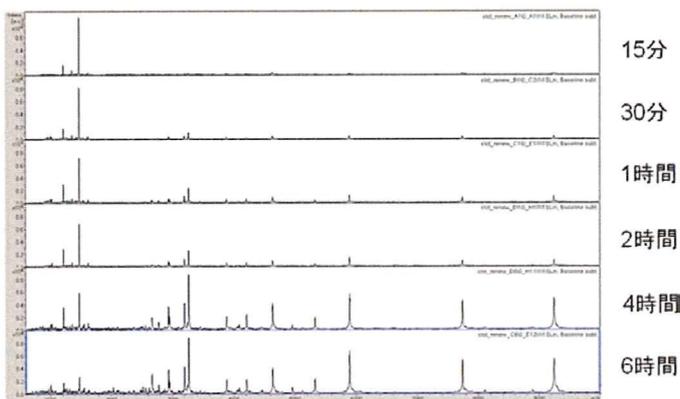
C, D-1 測定系の再現性の評価

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、WCX ビーズでは62ピークが検出され、ピーク面積の同時再現性は平均で9.5±5.4 (CV±SD)%, 日差再現性では13.5±6.7%であった。IMAC-Cu ビーズでは59ピークが検出され、同時再現性は平均で8.9±4.4%, 日差再現性は12.0±4.6%となり、C8 ビーズでは69ピークが検出され、同時再現性は平均で6.3±3.9%, 日差再現性は11.2±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。

C, D-2 血清を遠心分離するまでの時間の影響

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。今回の検討において使用した血清は、上述のようにclotting timeを1時間に設定することを基本としたが、この検討をするにあたっては、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。解析対象としたのは4人分の血清である。図1に一例を示すように、clotting timeの相違は血清のペプチドプロファイリングに明らかに大きな影響を与えていることが明らかである。

図1: Clotting timeによるスペクトル変化の一例 (IMAC-Cu ビーズ)



次に我々は各ピークを3種類のパターンに分類することを試みた。すなわち、タイプA;時間経過とともに速やかに低下していくもの、タイプB; 時間経過とともに徐々に上昇してくるもの、タイプC;最初の30分間は劇的に変化するがその後安定するもの、の3種類である(図2a)。ピークの数それぞれのピーズについてカウントしたものを図2bに示す。全体を総括するとタイプCが最も多く、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。

図2a: Clotting timeによる変化パターンの分類

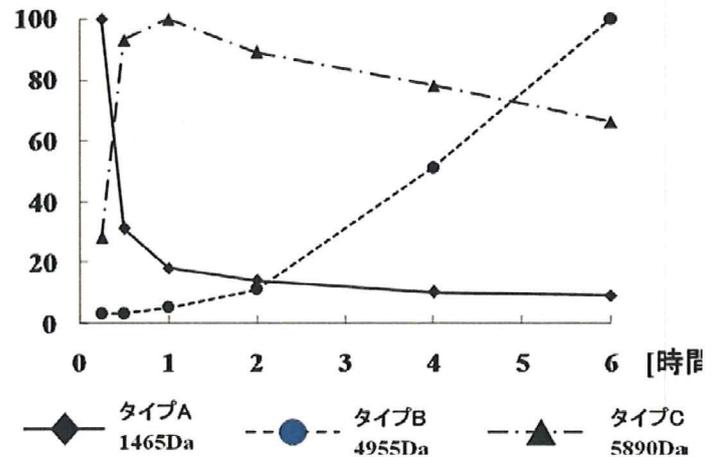
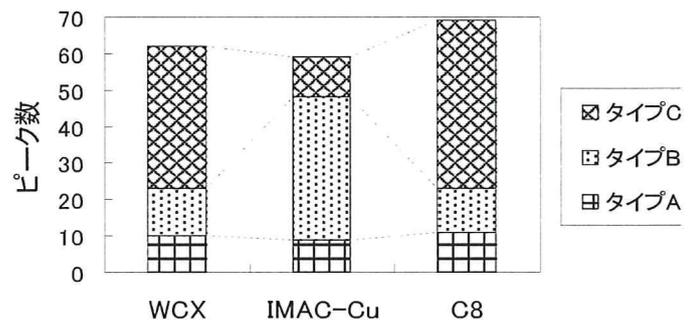


図2b: Clotting timeによる変化パターン別の集計



また、この分類によってそれぞれの磁性ビーズの特性の違いも明らかになった。IMAC-Cu のビーズは特にタイプ B のピークの数が多く、タイプ C の占める割合は相対的に少なくなった。これは IMAC-Cu ビーズが clotting time の影響を他のビーズよりも受けやすい傾向があることを示している。SELDI-TOF MS や MALDI-TOF MS を使用する際には、このようなプロテインチップや磁性ビーズの特性にも注意を払う必要があるものと思われる。

C, D-3. 凍結融解の回数

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。

我々は今回、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%を超えるピーク数をカウントした。その結果、凍結融解3回まではCVが20%を超えるピーク数が少なく、4回目以降一挙に増加する傾向にあった。これらの結果から、我々はサンプルを使用する際には凍結融解の回数を極力揃えるようにし、最大2回までとしているが目的のピーク毎にさらに確認することが望ましい。

E. 結論

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マーカー候補のバリデーションにおいて複数施設の検体を用いる場合にはプレアナリシスの影響を考慮にいたれた共通のプロトコールに基づいて実施することが不可欠である。今回の検討結果に基づいて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(6ml)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
- 4) 遠心後、住友ベークライド社スミロンプロテオセーブ SS1.5ml 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℃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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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.

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

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」

研究分担者 荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

病態サンプルを用いて、病態マーカーや創薬の標的となる細胞内異常シグナルネットワークを検索するには、ゲノム解析や mRNA 発現解析、タンパク質の発現解析や特異的翻訳後修飾/相互作用解析などの様々な分子解析結果を統合的に総合評価する事によってはじめて可能となると考えられる。しかし、これらの解析方法論は元来個々に確立されているため、出力されるデータの言語やフォーマットや表示の概念がそれぞれ異なっており、これらを融合して統合的に評価することは現状では困難である。すなわち、複数の装置によって異なる概念で解析を行い、病態組織細胞内においての異常活性を示すタンパク質ネットワークや翻訳後修飾、細胞内タンパク質の相互作用機能等の多くの情報を得たとしても、それを有機的に結びつけて解釈することが簡単にはできないのが現状である。そこで本研究では、病態関連分子解析を効率的に進めることができる統

合マイニング解析プログラムの考案を試み、腫瘍組織細胞の機能分子メカニズム解析、バイオマーカー検索等に応用可能かを検討した。

解析対象サンプルとして、ヒト悪性グリオーマである退形成乏突起神経膠腫(anaplastic oligodendroglioma/astrocytoma:AO/AOA) に焦点をあてた。悪性グリオーマにおいて唯一化学療法に感受性を示す AO/AOA は、現在のところ明確に予後を予測できる簡便な診断マーカーは存在せず、早期において患者の化学療法感受性を見極めるマーカーや治療ターゲットの開発は早急に取り組むべき重要な課題として近年注目されている。これまでに唯一、AO/AOA の染色体 1 番短腕部(1p)と 19 番長腕部(19q)の片アレル欠失(LOH)と化学療法感受性の関連性が報告されているが、化学療法感受性との因果関係を詳細に説明できる特定の遺伝子などの情報は全く報告されていない。理由として、ゲノム上の欠失が必ずしも遺伝子の欠失と相関しない転座の可能性や、あるいは

は、欠失した遺伝子群を介して間接的に化学療法耐性メカニズムに作用している他の遺伝子の関与等が考えられ、詳細な AO/AOA の化学治療感受性のメカニズムをゲノムや遺伝子レベルのみで結論を出すには限界があった。

今回、プロテオミクスの融合的アプローチ、すなわち同一サンプルの iTRAQ および 2D-DIGE によるプロテオーム解析データ、および DNA array によるトランスクリプトーム解析データのすべてを統合し、統合的マイニングによる解析方法論を考案した。これによって、悪性グリオーマ腫瘍組織細胞内で抗がん剤抵抗性に関わって活性化しているシグナル分子カスケードを抽出し、関わる分子群の翻訳後修飾を含むいかなる発現変動と構造変化がグリオーマの治療抵抗性に関与するかを明らかにすること、即ち、悪性腫瘍の薬剤耐性メカニズムの一端を解明することを目標とした。さらに、これらの統合的な解析によって、病態の治療方針や予後予測をより正しく診断するための臨床マーカーや、有効な治療薬を開発するための基礎情報をデータベース化することを目標にして研究を行った。

B. 研究方法

質量分析を用いた解析には、複数の高感度タンデム質量分析器 (nano ESI-QqTOF: Qstar pulsar i, QStarElite, MALDI-TOF-TOF: 4700, 5800, nano ESI-ionTrapQQQ:4000QTRAP, AB Sciex)、および付随する nano レベルのクロマトグラフィー装置 (nanoLC:Ultimate 3000, Dionex, DiNa, MaL,KYA), 解析ソフト群 (ProteinPilot, MASCOT, Analyst QS, MRM/MRM pilot, quant, scheduled, GPS, Progenesis, Decyder, GeneSpringsGP, MANGO, iPEACH 等) を用いた。高感度タンデム質量分析器 nanoLC-ESI-QqTOF、nanoLC-MALDI-TOF-TOF は網羅的なペプチドの高感度検出および比較定量/同定用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ (QTRAP4000 Applied Biosystems) は高感度定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用した。

高感度同時比較定量解析法として、iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation) 法および検証用に

MRM(Multiple Reaction Monitoring) 法を用いた。又、リン酸化および proteolysis などの翻訳後修飾発現差異解析に関しては、ProQ-Diamond による染色法を併用した 2D-DIGE 法を用いた。mRNA 発現解析は、DNA chip (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix) を用いた。

生体サンプルとして、ヒトグリオーマ培養細胞 (U373, U251, A172, U81G)、ヒト腫瘍組織として、Anaplastic oligodendroglioma/ astrocytoma (AO/AOA), glioblastoma multiforme (GBM) 合計 51 検体を用いた。ヒト組織は術場にて摘出後、迅速に液体窒素で凍結し保存したものをを用いた。各組織は病理学的観察からその病態を判定するとともに、解析する組織が腫瘍組織の中心部のみであることを確認した。又、FISH を用いて 1p, 19qLOH の有無を全てのサンプルに関して解析した。又、同一のサンプルを同時にタンパク質(iTRAQ、2D-DIGE)と mRNA (DNA array) 用に抽出調製して解析に用いた。まず学習セットとして、10 検体を用い、全ての解析データを iPEACH (特願 2010-81524) を用いて統合した。GO 解析は GeneSpring GX (Agilent Technologies), ネットワーク解析は KeyMolnet (医薬分子設計研究所) を用いた。抽出された特異的活性化シグナル分子群に対して、各抗体を用いて 1D/2D-Western Blotting 法、組織免疫染色法、各分子に対する siRNA および阻害剤処理による細胞の抗がん剤 (Temozolomide : TMZ, ACNU, CCNU, Procarbazine, Vincristine 等) の感受性の変化を WST 法にて検討した。

(倫理面の配慮)

本研究では臨床サンプル (腫瘍組織) より genomic DNA、mRNA、タンパク質を抽出し、ゲノム/トランスクリプトーム/プロテオーム解析を検討することから、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究倫理指針」に基づき、熊本大学医学部ヒト遺伝子研究倫理審査委員会の承認を受けている (悪性脳腫瘍の病態解明とそれに基づく治療体系の確立: ゲノム 110 号、平成 20 年改訂)。ガイドラインに従い、採取された患者の組織サンプル、遺伝子解析情報を含めすべ

での検査結果について守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定されない方法でのみ行うことを遵守している。本研究で採取される組織は、治療上必要不可欠な外科的手術によるもののみであり、患者に不利益及び危険性は伴わない。

C. 研究結果

今回用いた統合プロテオミクス解析の概略を図に示す (Fig.1)。

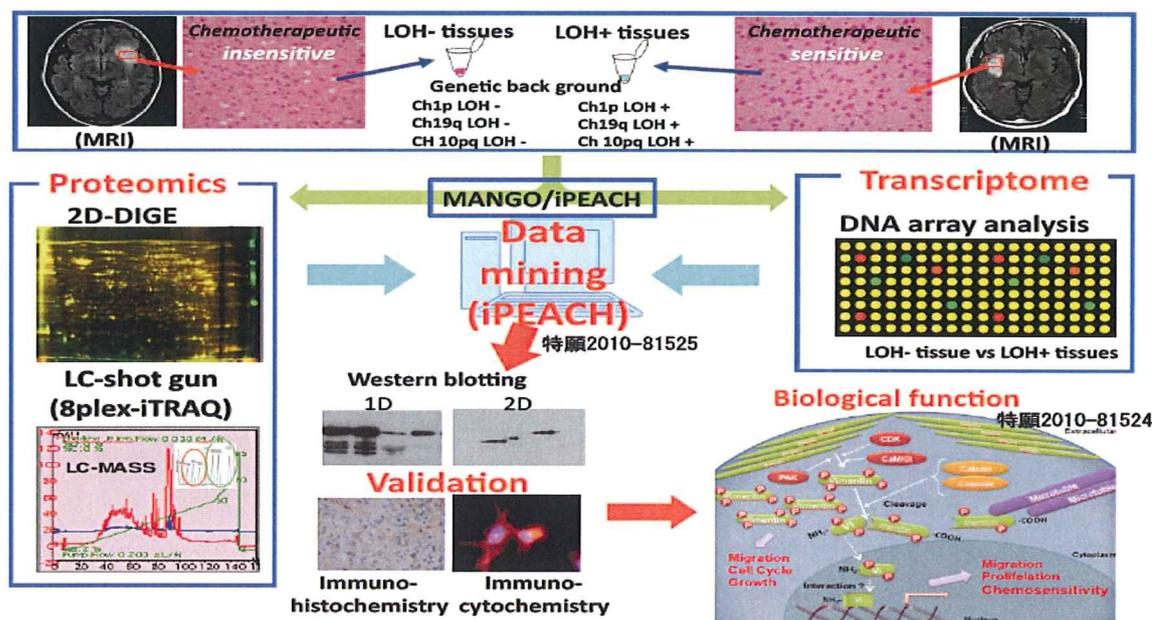
AO/AOA 47 検体のなかから 1p/19q LOH+ (28 検体中 5 検体) 及び 1p/19q LOH- (19 検体中 5 検体) の AO/AOA 組織を選択し、これらそれぞれから mRNA 及びタンパク質を回収し、それぞれ DNA microarray, iTRAQ, 2D-DIGE による解析に供した。各々の網羅的解析結果から得られたデータは、統合プロテオミクス解析のために開発した application である iPEACH (integrated Protein Expression Analysis Chart) を用いて整理・統合し、これを用いて Gene Ontology analysis (GO 解析) や KeyMolnet ソフトウェアによる分子間ネットワーク解析を行った。その結果、1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- の脳腫瘍組織において抗癌剤感受性に関連して変動している重要な分子群 107 種類を特定し、脳腫瘍細胞内における抗癌剤感受性関連シグナルネットワークを抽出することが可能となった。予測された分

子ネットワーク構成分子群に関しては、更に AO/AOA 検体 47 サンプルすべてにおいて Western Blotting 及び組織免疫染色にて検証を行うとともに、1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- のグリオーマ 培養細胞を用いて同様の検証と、さらに siRNA, 阻害剤、活性化剤を融合的に用いた生化学的な活性測定、抗がん剤感受性阻害や活性化等の検証実験を行うことによって、悪性グリオーマにおける抗癌剤感受性に関わる分子機序の解明を試みた。

C-1. プロテオミクス解析情報統合プログラム iPEACH の開発と応用

統合プロテオミクス解析のために作成した統合プログラム iPEACH によって自動的に解析ファイルを統合する一連の方法を簡単に記述する (Fig.2)。すなわち、1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- AO/AOA 組織内で発現が確認された遺伝子 (DNA array) とタンパク質群 (iTRAQ : ESI-Qq-TOF と MALDI-TOF-TOF による両解析データ、2D-DIGE:PI3-11 のデータおよび PI4-7 のデータ) のそれぞれの同定分子群の全ての情報を含むリストを読み込み、アクセスを統合したファイルを作成する。このファイルには gene description (分子の定義や機能情報), 染色体位置情報, 統合プロテオミクスにおける解析法 [DNA microarray, iTRAQ (MALDI-MS), iTRAQ

Fig. 1, Strategy of the integrated proteomics



(ESI-MS/MS) , 2D-DIGE 等], Gene Ontology annotation, タンパク質翻訳後修飾の有無と頻度 (2D-DIGE で同定された修飾スポットの情報) などが付与されている。又、統合ファイルのデータの内、それぞれの分子に重み付けを行い、優先順位をつけ、同一タンパク質でもタンパク質の翻訳後修飾が併せて確認されるものを注目すべき分子として自動的に上位にランクするアルゴリズムを用いている。更に自動的に有意と評価して閾値を設定し、閾値以下の変動分子を解析対象から外すようにマスクした後、GO 解析や KeyMolnet 等の分子ネットワーク解析に直接利用できることが出来るように整形済みテキストとして統合ファイルを出力することができる(特願 2010-81525)。今回のオリジナル解析データの一元化ファイルにおいては 30000 個の分子情報を対象とし、その中から統計学的に定量性が有意なもの 16287 分子を抽出した。

C-2. 統合プロテオミクス解析データを用いた GO 解析とネットワーク解析による活性シグナルの絞り込みの検討

1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- の AO/AOA 組織間で iPEACH 解析の後、有意に発現変動していると評価された分子群のリスト内で、1p/19q LOH- で発現が亢進している分子群 139 に焦点を当て解析を行った。mRNA の発現変動では ProteinX が最も大きく (1p/19q LOH- の腫瘍で 14.9 倍, $p < 0.01$) 発現していることが確認された。タンパク質の発現変動においては同様の比較で Vimentin が最も大きく発現が変動しており (1p/19q LOH- で 4.54 倍高発現 $p < 0.01$)、更に翻訳後修飾を受けた 6 個の vimentin が発現変動の上位 30 位までに同定された。抗癌剤耐性である 1p/19q LOH- グリオーマ 組織での ProteinX と vimentin の高い発現は、細胞膜表面レセプターの ProteinX を介したシグナル伝達と、細胞内中間径フィラメント Vimentin の高い発現、またその翻訳後修飾の亢進に何らかの抗癌剤感受性に関わる分子機構が存在することを示唆していた。そこで、一元化統合ファイル (iPEACH で作成) を用いた GO 解析および細胞内シグナルネットワーク解析を行い、これらの分子メカニズムの相互作用機序を推察した。1p/19q LOH- AO/AOA

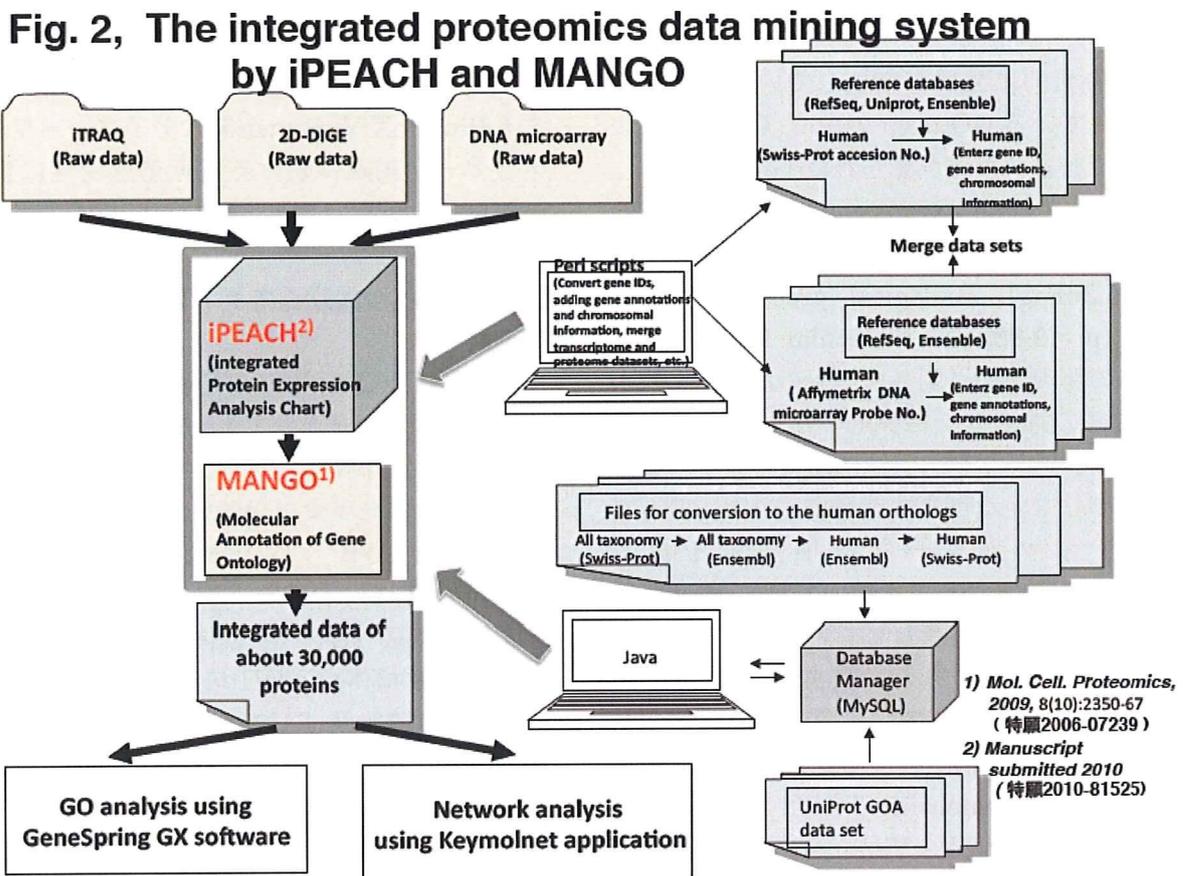
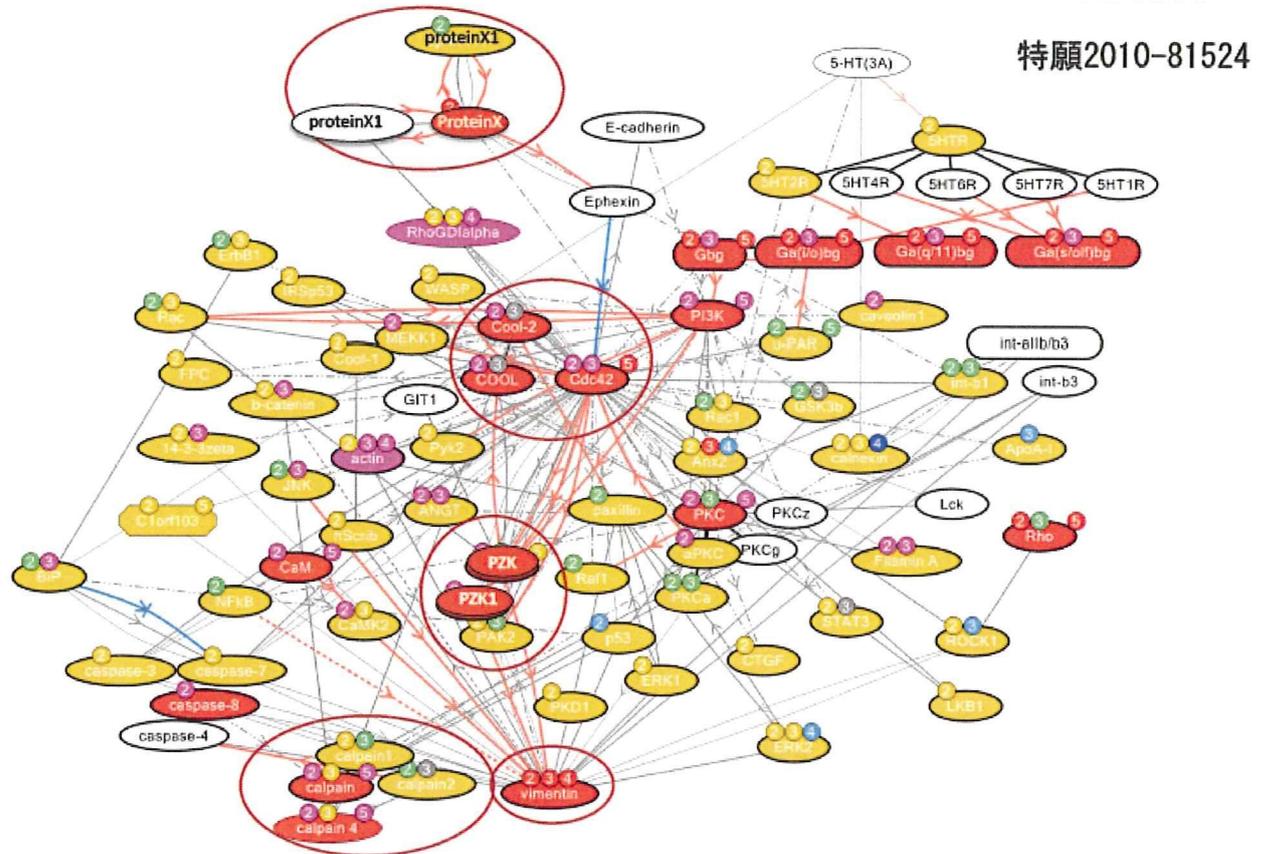


Fig. 3, Up-regulated molecular network in chemo-resistant Gliomas extracted with iPEACH



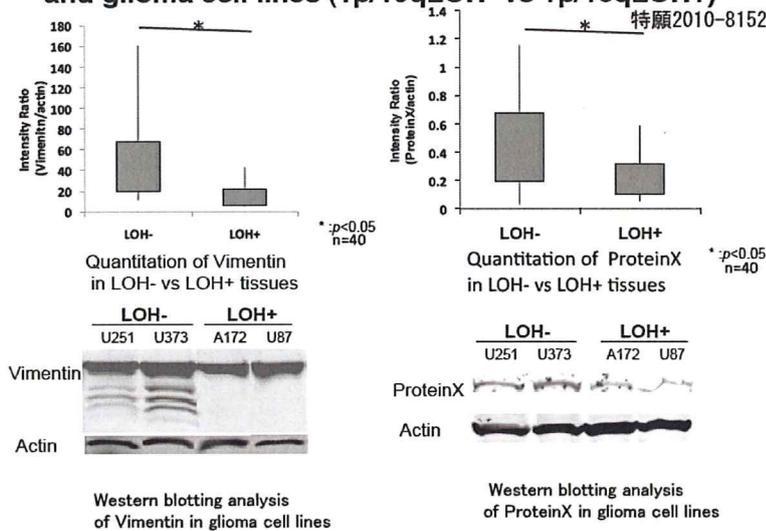
において特異的に発現が増加していた分子に注釈付けられている GO term の中で、GO 解析により統計的に有意に関連が見られた GO term は、Regulation of gene expression ($p = 2.57E-08$, Biological process)、Regulation of transcription ($p = 5.36E-07$, Biological process)、DNA binding ($p = 2.86E-07$, Molecular function) など遺伝子の発現調節に関与するものが多く、抗がん剤抵抗性の細胞内で特異的に活性化しているシグナルが、抗がん剤感受性に関わる分子の転写活性を制御している可能性が示唆された。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癌剤感受性に重要である可能性が高いことが示唆された (Fig.3)。

C-3. 抽出された分子ネットワークの生化学的検証実験

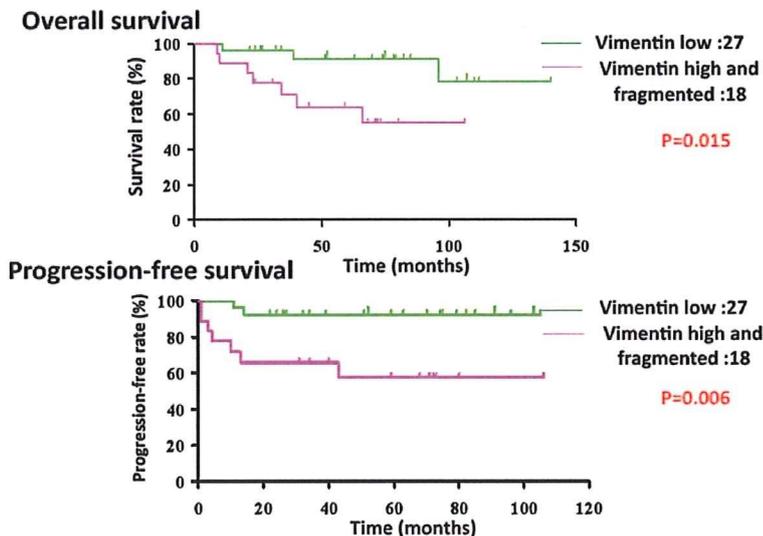
GO 解析並びに Keymolnet 解析にて有意に上昇した重要な分子として Vimentin と proteinX とそれに関わる制御因子群のネットワークに注目し、それらの発現量を組織免疫染色法と Western blotting 法 (WB) により検証した。Vimentin 及び ProteinX に対するモノクローナル抗体を用い、患者由来組織 (合計 36 検体、LOH⁻: 18 検体、LOH⁺: 18 検体)、LOH⁻培養グリオーマ細胞である U373 細胞及び U251 細、LOH⁺U87MG 細胞及び A172 細胞を用いて WB 解析を行った結果、Vimentin と ProteinX 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 (Fig.4)。

Fig. 4, Vimentin and ProteinX expressions in AO/AOA tissues and glioma cell lines (1p/19qLOH- vs 1p/19qLOH+)



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認められた。1p/19q の LOH+/- と Vimentin/ProteinX の発現量の有無が生存に及ぼす影響を 51 人の AO/AOA サンプルについて統計的に解析したところ、Vimentin および proteinX の高発現群の生存率がこれらの低発現群に比べて有意に低くなることが判明し、Vimentin および ProteinX の有無は LOH の有無と同様に予後判定の指標に成り得ることがわかった。さらに、Vimentin の分解フラグメントの上昇と生存率低下にも相関がみられ、Vimentin の増加とその分解は AO/AOA における抗がん剤感受性低下と関連性があること

Fig. 5, AO/AOA patient's overall survival and progression-free survival curves



が判明した (Fig.5)。

そこで、2D-WB と 2D-DIGE のデータから Vimentin のスポットデータを定量的かつ生化学的詳細に解析したところ、合計 16 個の修飾 Vimentin 群が検出され、そのうち 8 個のスポットが有意に LOH-で上昇していることが判明した。分子量の高い順からグループ番号 (A~E) とし、pI の高い順からスポット番号 1~16 とした。これらすべてのスポットの一次構造を質量分析および N 末端配列解析にて詳細にしたところ、すべての Vimentin スポットの C 末端構造は保存されており、N 末端部

位の切断によって分子量が変動していることが判明した。又 19 個のリン酸化部位が同定され、このうち、Tyr319, Tyr358, Tyr400, Thr449 は新規のリン酸化部位であり、他の Ser リン酸化部位の 3 つは興味深いことに LOH-にて有意に発現上昇する ProteinZ kinase によるリン酸化部位であった。又さらに興味深いことに、B, C, D 群の N 末端切断部位は全て LOH-にて有意に上昇するカルパイン(Calpains SS は 19q にローカスする)による切断部位であった (Fig. 6)。

これらの事実から、1p/19qLOH-のグリオーマ細胞の中で抗がん剤抵抗性に関連し 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というカスケードが活性化していることが想像された。又、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 (Fig.7)。さらに興味深いことに、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。これらの所見から、抗がん剤抵抗性グリオーマ細胞内で、Vimentin 特異的なリン酸化と分解修飾を活性化する ProteinX を介した新規の activation loop が存在することが

考えられた (Fig.7)。

C-4. 抗がん剤を用いた活性化分子ネットワークの生物学的検証実験

これらの事実関係を生物学的に検証するため、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。

まず、Vimentin siRNA を用いて、グリオーマ細胞 U373(LOH-)と A172(LOH+)に対する TMZ への感受性を検討した。U373 は A172 に比較して Vimentin の発現が高く TMZ に抵抗性が高いが、siRNA によって Vimentin の発現を抑制することによって、有意に TMZ への感受性を上昇させることが判明した。一方 LOH+細胞の A172 は Vimentin の発現が比較的 low、TMZ への感受性が高いため、Vimentin SiRNA の効果は顕著ではなかった。すなわち、細胞内での Vimentin activation loop が活性化している抗がん剤抵抗性のグリオーマ細胞は、Vimentin の発現を低下させることによって TMZ への感受性を上昇させる事が可能であることが判明した。

次に、その activation loop 最上流に存在する ProteinX の発現を siRNA にてノックダウンし、その TMZ への感受性を同様に検討した。その結果、Vimentin と同様に有意に TMZ への感受性を上昇させることが判明した。さらに、その下流に存在して活性化する Protein Z kinase の活性阻害剤を処理する事によって、Vimentin のリン酸化および分解が阻害されることを 2D-WB にて確認した。又、この阻害効果は U373 細胞の TMZ 感受性を上昇させる事が判明した。すなわち、Protein Z kinase の活性化は Vimentin のリン酸化を上昇させるのみならず、Vimentin の分解を促進し、その結果 TMZ の感受性を低下させていることが考えられた。次に Protein Z kinase の下流で vimentin の分解に関わっている Calpain に関して、Calpain 阻害剤、活性化剤、さらに Calpain 活性化サブユニット SS に対する siRNA による Calpain 活性の阻害が抗がん剤感受性に与える影響について検討した。その結果、Calpain 阻害剤両者はグリオーマ細胞 U373 の TMZ に対

する感受性を有意に上昇させた。又、Calcium ionophore A23187 によって Calpain を活性化させることによって、抗がん剤感受性は顕著に阻害された。したがって、Calpain による Vimentin のフラグメント化は明らかにグリオーマの抗がん剤感受性を低下させていることが判明した。

最後に、Vimentin activation loop の活性化で核移行した N 末端側 Vimentin フラグメントは、ProteinX の転写活性を上昇させることから、ProteinX のリガンドである proteinX ligand(PXL)を細胞に処理することによって、細胞内 Vimentin の activation loop が活性化し、抗がん剤感受性に影響を与えるかどうかを検討した。serum free の培養条件で U373 細胞に Vimentin の siRNA 又はコントロール siRNA を処理した後、PXL を加えて培養し、経時的に ProteinX の転写活性を qRT-PCR にて測定した。その結果、PXL を処理することによって siRNA control 群では proteinX の転写活性は経時的に上昇したが、Vimentin siRNA 処理によってその活性上昇は顕著に阻害された。さらに、PXL 処理によって、U373 細胞の TMZ に対する感受性は有意に減少することが判明した。以上の所見に加えて、PXL 処理は PZK の活性を上昇させ、Vimentin のフラグメント化による N 末端の核移行を上昇させたこと、この一連の反応が PZK 阻害剤、Calpain 阻害剤で阻害された事等を考え合わせると、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、という一連のシグナルが 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 (Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、ヒト腫瘍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を試みた。これによって、悪性腫瘍における抗がん剤治療抵抗性メカニズムの一端を明らかにするとともに、治療ターゲットや臨床マーカー、創薬への基礎情報を得ようとした。

統合的に行うプロテオミクス解析の利点は、蛋白質自体の量的変動 (iTRAQ など) と、蛋白質の mRNA レベルでの発現変動 (DNA マイクロアレイ、qRTPCR など)、および蛋白質の翻訳後修飾を含めた変化 (2D-DIGE など) が同時に情報として取得できることである。一方で、統合プロテオミクスの解析結果を扱う上での問題点として、個別の複数のプロテオーム解析 (2D-DIGE や iTRAQ) 相互、およびトランスクリプトーム解析 (DNA マイクロアレイ) の結果の書式に共通性がなく、比較や統合が困難であること、そして、膨大な数の分子を解析するため、解析結果から有意な情報を抽出する効率的な方法論が確立されていないこと等があげられる。我々が開発した iPEACH および MANGO はこれらの問題を解決するため、それぞれの生データから同定された分子のすべての言語を統一し、翻訳後修飾情報や定量値、染色体情報、GOなどを紐づけした情報を網羅させ、重みづけと優先順位を付加した統合一元化ファイルを自動的に作成することができる。

今回のグリオーマ AO/AOA 組織サンプルを用いたオリジナル解析データの一元化ファイルにおいては、30,000 個の分子情報を対象とし、その中から統計学的に有意な 16,287 分子を抽出し、さらに 1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- の腫瘍組織間で有意に発現変動していると評価された分子群 139 個に焦点を当てて解析を行った。その結果、単独のプロテオミクスのみあるいは DNA アレイのみでは得る事のできなかった新規の細胞内シグナルが、全ての情報を統合マイニングし網羅的に評価して解析することではじめて有意に抽出できることが判明した。絞り込みを行ったシグナルに関しては、ひとつひとつ念入りに阻害剤や活性化剤や siRNA などを用いて細胞レベルの検証を行う必要があるが、高い絞り込みを行っているため、これらが予想通りに証明できる可能性が高くなる。少なくとも、今回我々が試みた抗がん

剤抵抗性グリオーマの解析において抽出された新規の細胞内活性化シグナル (Vimentin activation loop) に関しては、すべての検証実験に成功するとともに、患者の抗がん剤抵抗性を感受性に転ずるための方法論に対するアイデアの創出に有用であった。病態サンプルは量が限られているため、できる限りの情報を最大に生かす必要性があり、iPEACH/MANGO によって統合したファイルをデータベース化することによって様々なメタ解析に再利用することも可能である。現在、我々独自に開発した Auto-2D-Western Blotting 法を用いて、患者検体を解析し、その病態サンプルにおける翻訳後修飾を含む発現パターンから同定分子群の治療予後予測マーカー及び治療ターゲットとしての可能性を検討している。

E. 結論

プロテオミクスの高感度かつ high throughput な新技術の融合的アプローチによるプロテオーム解析データ、および DNA アレイによるトランスクリプトーム解析データを統合するアルゴリズム (iPEACH/MANGO) を開発することによって、腫瘍組織細胞内で活性化しているシグナル分子群が有効に抽出できることを証明した。悪性グリオーマの抗がん剤感受性に関わる分子シグナルを本方法論によって詳細に解析したところ、Vimentin とその翻訳後修飾に関わる責任分子群、およびその活性化シグナル分子群による新規の Vimentin activation loop が抽出され、siRNA および阻害剤、活性化剤等の検証実験の結果、これに関わる分子群の発現変動と構造変化が悪性グリオーマの治療抵抗性に大きく関わっていることを明らかにした。又、その病態サンプルにおける発現パターンの解析から本分子群の治療予後予測マーカー及び治療ターゲットとしての可能性を提唱した。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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

G-2. 学会発表

1. 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.

2. 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.
3. 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インフォ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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
 10. 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.
 11. 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(JHUPPO), 東京, 2009 年 7 月.
 12. 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-ブ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(JHUPPO), 東京, 2009 年 7 月.
 13. 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(JHUPPO), 東京, 2009 年 7 月.
 14. 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 chemoresistances). 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 (JHUPPO), 東京, 2009 年 7 月.
 15. 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.
 16. 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
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.

H. 知的財産権の出願・登録情報

H-1. 特許

1. 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
2. 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