

田誠之, 森川 崇

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

I. 研究協力者

森川 崇、坪田誠之、水口惣平、小林大樹、緑川
宇一（熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学分
野）、中村英夫、倉津純一（同脳神経外科学分野）

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

研究分担者 中村和行 山口大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

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がん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。

A. 研究目的

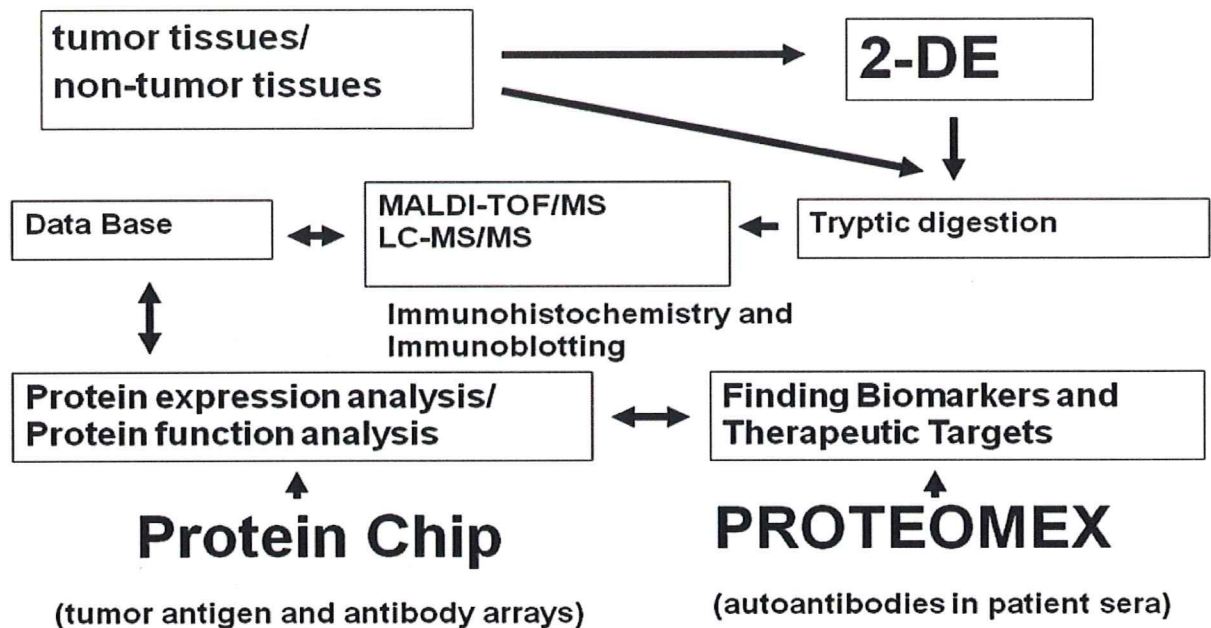
ヒトゲノムを構成する全遺伝子の塩基配列が決定され、それらの塩基配列に従ってつくられるタンパク質やペプチドの構造と機能の総合的な評価が重要な研究課題となっている。ヒトの生体内に実在して機能するタンパク質群（プロテオーム）やペプチド群（ペプチドーム）の解析技術の開発と標準化やファクトデータベースの構築が世界的な規模で進められている。ヒトの細胞や組織で実際に産生されて血液や尿などに存在するプロテオームやペプチドームの情報を包括的に利用すれば、医薬品等に利用可能な物質を見出すことができると期待される。さらに、正確な臨床履歴を伴った血液、尿などの体液や組織等に含まれるプロテオームやペプチドームの解析を経時的に実施できれば、有用なバイオマーカーの探索が可能になり、病態や予後の診断および治療評価を正確に行うことができるとともに医薬品等の開発を迅速に進めることができる。しかしながら、プロテオームやペプチドームは多彩な性質を示すとともに刻々と変化し、その濃度差も極めて大きいために、それらを定量的に解析することやリン酸化や糖鎖化等の翻訳後修飾の解析は依然として困難である。最近、ヒトプロテオーム機構（HUPO）の呼びかけによってバイオマーカー探索等のプロテオーム解析技術の世界標準化や細胞膜結合タンパク質群の網羅的な解析技術の標準化が進められている^{1,2)}。本研究では、従来の二次元電気泳

動法と質量分析法に加えて新規のプロテインチップ技術を導入してC型肝炎ウイルス関連肝細胞がんなどに対する自己抗体を用いてがん部組織のみならず患者血清中のバイオマーカーを特異的かつ系統的に解析することにより、難治性がんの病態や予後の診断ならびに治療の評価、さらには創薬に利用可能なバイオマーカーの発見を目指す研究を行う。

(引用文献)

- 1) 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. (添付文献 1)
- 2) Chung C M., Nakamura K., and Jordan T W. The AOHUP O Membrane P roteomics Initiative. Fourth Workshop June 2008 Cairns, Australia. *Proteomics* 8: 3920-3923, 2008. (添付文献 2)

Proteomic Profiling of HCV-HCC



B. 研究方法

山口大学（以後本学）医学部附属病院第二外科で初診時に肝がんの診断を受け治癒切除術を施行した症例を対象とした。本学医学部倫理審査委員会で承認を受けた臨床研究に則り、患者等に本研究の内容を十分に説明して同意を得た。まずは、C型肝炎ウイルス（HCV）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）のある患者から通常の治癒切除術で摘出された肝細胞がん（HCC）組織（5 mm x 5 mm x 5 mm）を検体とした。

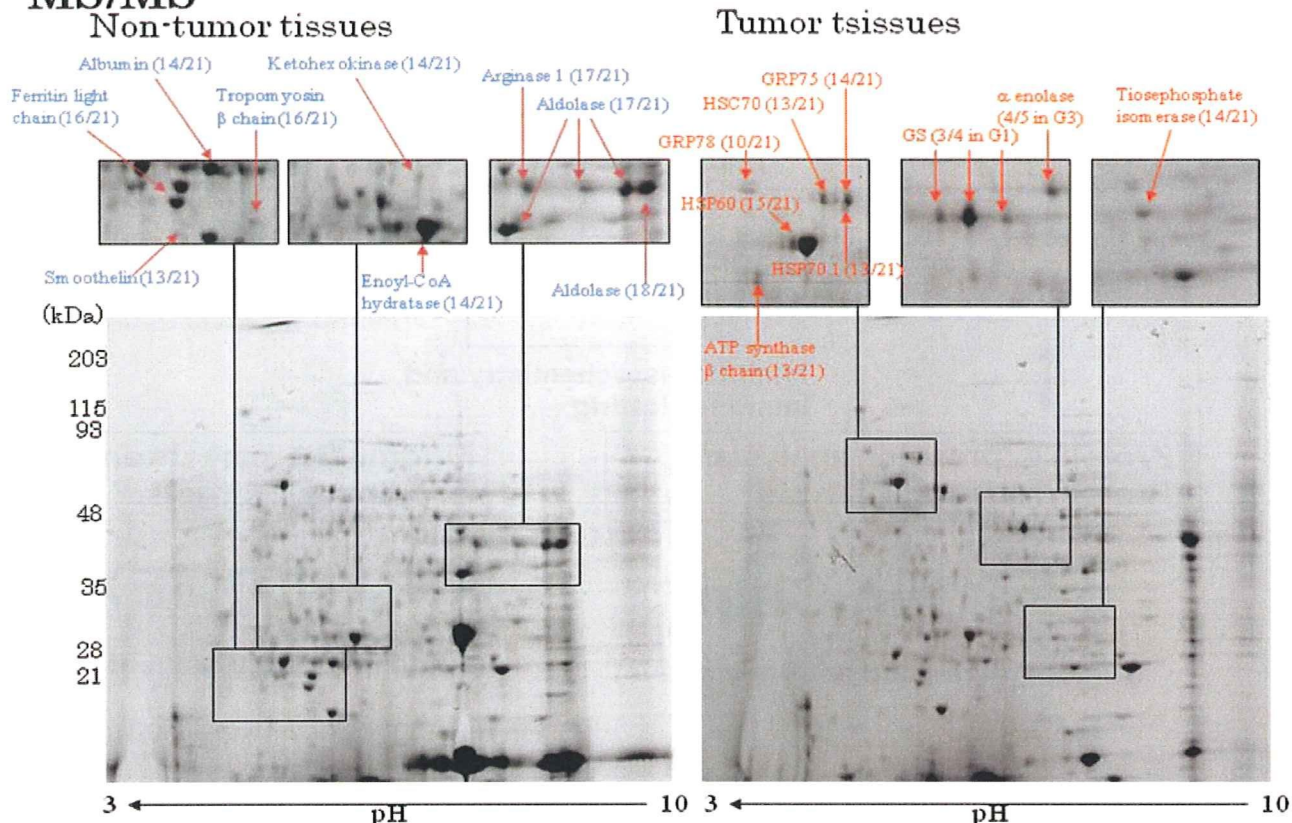
1) 検体からがん部組織と非がん部組織を分別採取し、それぞれの組織から抽出されたタンパク質を試料として、分離範囲を pH 4-7 に絞ったポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法（2-DE）を実施した。得られたがん部と非がん部の 2-DE 泳動像を Progenesis を用いて画像解析し、がん部で優位に増減するタンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシンを用いた in gel digestion 法で得られたペプチド断片を nano-LC-MS/MS（LC-MSD Trap XCT, Agilent Technologies）で質量分析し、Spectral-Mill-III および Mascot を用いて候補タンパク質の同定を行った。

2) PROTEOMEX 法を用いて HCV-HCC 患者から得られたがん部組織タンパク質の 2-DE

（分離範囲 pH 3-10）を行った後に分離されたタンパク質群を PVDF 膜に転写し、同一患者の血清を反応させた後にペルオキシダーゼ或いは蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させることにより、患者血清中の自己抗体に特異的に反応するがん部組織由来のタンパク質スポットを検出した。これらのタンパク質スポットを切り出し、質量分析して候補タンパク質の同定を行った。

3) 候補タンパク質（例として HSP70 の C-末端領域）を GFP 蛋白と融合させ、その N-末端部に His タグと C-末端部に Cys タグを挿入したベクターを作成して大腸菌内で発現させた。産生されたリコンビナント蛋白を His タグに特異的に結合するニッケルビーズで精製した後にダイヤモンド様表面加工した（DLC）チップ基板上のマレイミド基と反応させ、Cys タグのチオール基とカップリングさせ均一な配向性を保ちながら強固に固定化した。このチップに HCV-HCC 患者や他の疾患ならびに正常人から得た血清を反応させて、HSP70 に反応する自己抗体の効率的な検出を行った。

Proteomic Profiling of HCV-HCC by 2-DE and LC-MS/MS



(倫理面への配慮)

上記の研究方法に記した。

C. 研究結果

1) HCV-HCC のバイオマーカー候補タンパク質の同定：従来、2-DE の分離範囲を pH 3-10 で実施し、HSP70 family, glutamine synthetase, arginase および三炭糖の解糖系酵素等が HCV-HCC の組織バイオマーカー候補として同定されていたが、今回は 2-DE の分離範囲を pH4-7 に絞り、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。

2) PROTEOMEX 法を用いて自己抗体に反応する HCV-HCC バイオマーカー候補タンパク質の絞り込み：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 が同定された。

3) HSP70 等を用いたプロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出：GFP

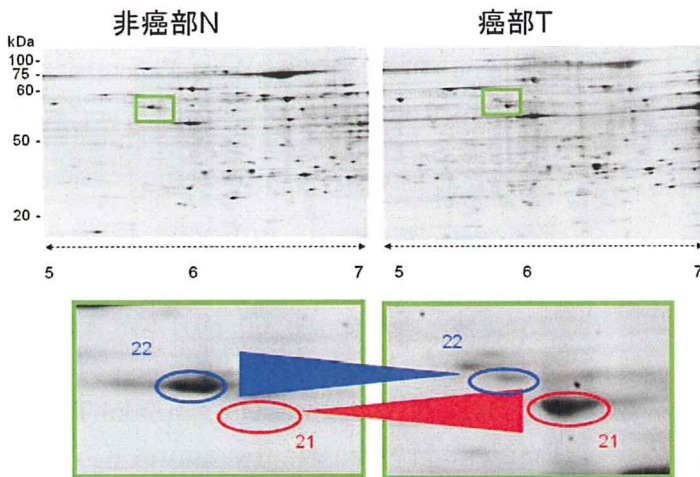
と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップに HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させたところ、正常人に比して HCV-HCC 患者の陽性率が有意に高かった。

4) 自己抗体を用いた難治性がんのバイオマーカー探索：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 やが新たなバイオマーカー候補として同定された。(添付文献 2 および 3)

D. 考察

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、C 型肝炎ウイルス感染に起因する肝細胞癌 (HCV-HCC) を中心とする難治性がんの新規バイオマーカー探索を試みた。その結果、糖鎖化 ApoE と ATP 合成酵素アイソフォームなどが新たな HCV-HCC のバイオマーカー候補タンパク質として同定され、抗がん剤 gemcitabine 耐性の膵臓がんでは HSP27 や

ATP synthase subunit beta, mitochondrial

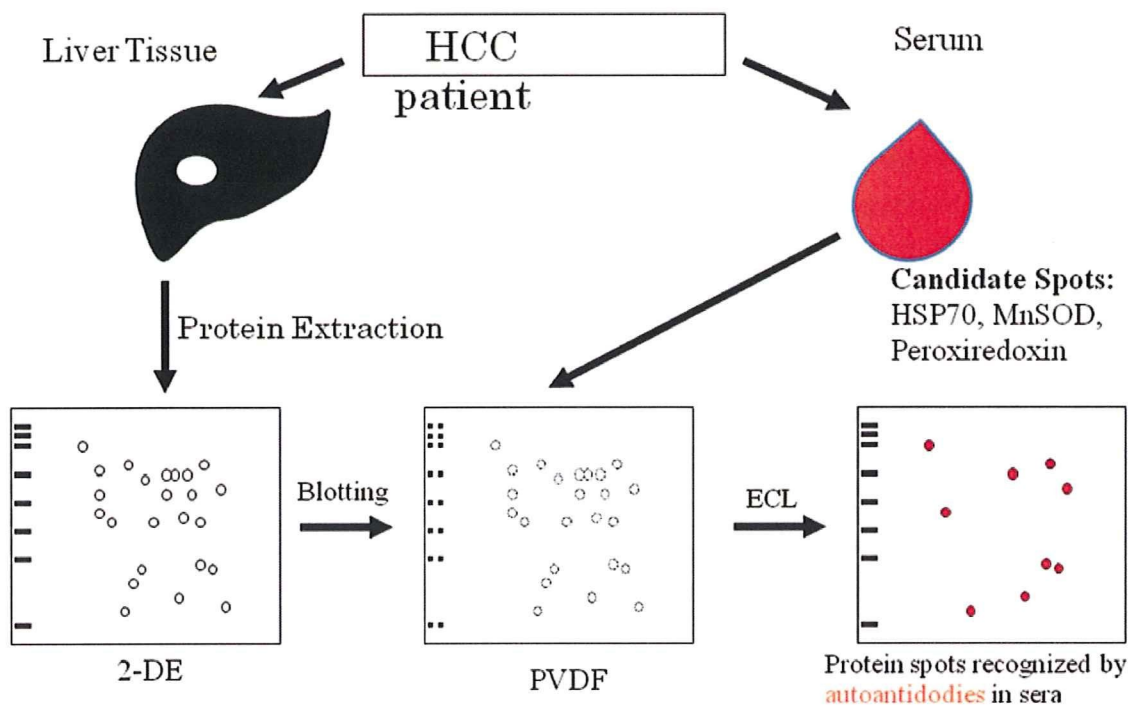


乳がんでは抗 cyclophilin A 抗体が新たなバイオマーカーとして同定された。さらに、自己抗体を用いたプロテインチップ技術の改良を行い HCV-HCC において HSP70 の C 末端部が有望なバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。HSP70 の C 末端部をチップ表面に固定化して患者血清中の自己抗体を検出すれば、特異的かつ効率的に HCV-HCC の大規模解析が容易となる。特に自己抗体を活用することにより、血清中に含まれる高濃度のタンパク質や混合物を除去する必要がなく、簡便な検診ツールとして有望であると考えられる。

E. 結論

C 型肝炎ウイルス感染に起因すると考えられる肝細胞がん (HCV-HCC) の組織特異タンパク質バイオマーカーの探索技術の改良を行い、従来の HSP70, MnSOD, peroxiredoxin に加えて糖鎖化 ApoE および ATP 合成酵素アイソフォームなどを新たなバイオマーカー候補蛋白として同定した。今後、これらの候補タンパク質の翻訳後修飾を PRC と共同で明らかにしたい。一方、患者血清中の自己抗体を活用した PROTEOMEX 法とプロテインチップ技術の改良を行い、HSP70 の C 末端領域が HCV-HCC の特異バイオマーカー候補として有望であることを明らかにした。さらに、自己抗体を用いた PROTEOMEX 法により乳がんのバイオマーカー候補として抗 cyclophilin A 抗体を同定した。今後、自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索と効率的なバイオマーカー探索のための高感度解析技術の改良を試みたい。

PROTEOMEX of HCV-HCC tumor tissues



F. 健康危険情報

C型肝炎ウイルスの感染した肝細胞がん組織ならび患者血清の取り扱いについては、二次感染を避けるための処置を行う必要があるとともに、その廃棄などについて十分な考慮が必要である。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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 methothelioma cell lines. *Proteomics* 9: 5078-89, 2009.
2. 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-Clinical Applications* 3(11), 1338-1347, 2009.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

G-2. 学会発表

1. 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.
2. 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

特許申請準備中

H-2. 実用新案登録

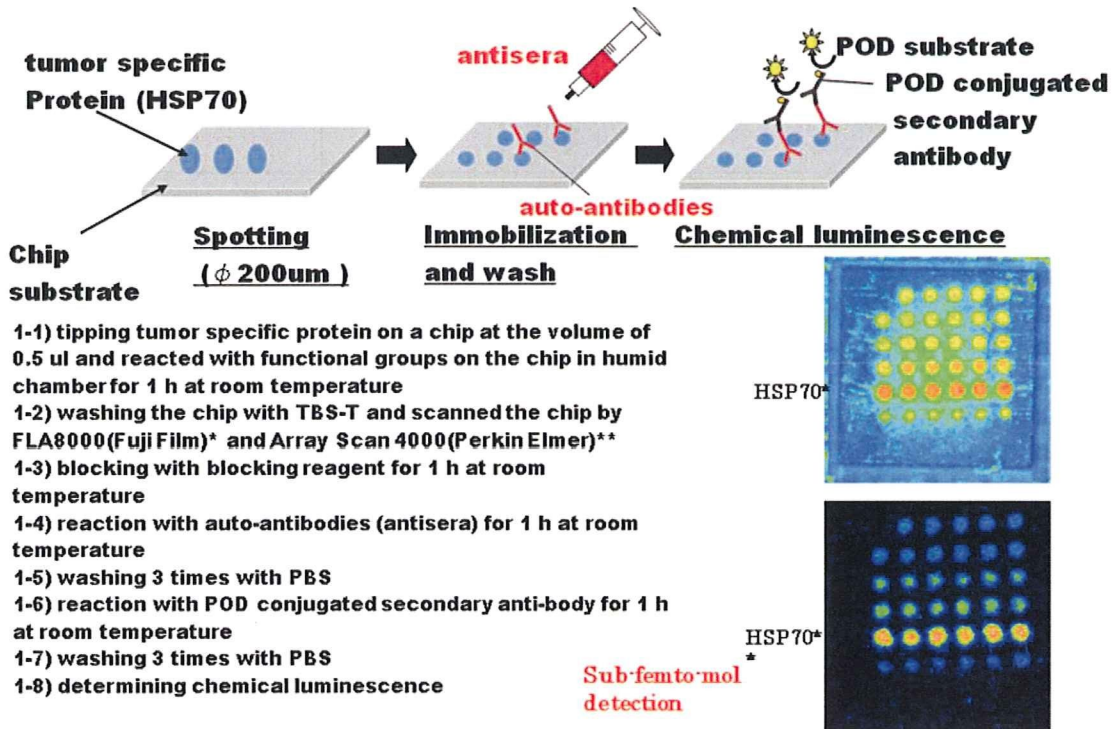
なし.

I. 研究協力者

藏満保宏、赤田純子、田中寿幸（山口大学大学院医学系研究科）

（この報告書は、委託業務の成果として、産業財産権等の対象となる技術情報（未出願又は未公開の産業財産権又は未公開論文）、ノウハウ等の秘匿情報が含まれているので、通例の取り扱いにおいて非公開とする。ただし、行政機関の保有する情報の公開に関する法律（平成11年法律第42号）に基づく情報開示請求等の対象の文書となりません）

Protein Chip for HCV-HCC



Confidential

患者血清判定結果のまとめ

血清グループ	血清試料数	全面検出血清数	検出良好血清数	検出蛋白質						陽性判定
				HSP70C	GFP HSP70C	HSP70C HSP70N	GFP HSP70C PRDX6	GFP HSP70C SOD2 PRDX6	PRDX6	
HCV / HCC										
+ / +	14	1	13	2	1	1	2	1	0	7/13
+ / -	6	2	4	0	0	0	1	0	1	2/4
- / -	10	3	7	0	0	0	0	0	0	0/7
健常者	8	2	6	0	0	0	0	0	0	0/6
計	38	8	30	1	1	1	3	3	1	9/30

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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」	小田 吉哉 長野 光司	創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析	羊土社	東京	2010	印刷中
平野 久	タンパク質のアミノ酸配列と翻訳後修飾の分析	長谷俊治 高尾敏文 高木淳一	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一編	化学同人	京都	2009	1-32
同 上	N-Terminal sequencing of N-terminally modified proteins.	Walker, J. M.	The Protein Protocols Handbook	Humana Press	New York	2009	1063-80
同 上	iTRAQ 試薬を用いた疾患バイオマーカー探索	中山敬一 松本雅記	細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」	秀潤社	東京	2009	116-21
同 上		原田久也		学会出版センター	東京	2009	49
尾野 雅哉	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」	中山敬一 松本雅記	細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」	秀潤社	東京	2009	122-30

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
朝長 毅	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	印刷中		2010
同 上	High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples	J Proteome Res.	印刷中		2010
同 上	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
同 上	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
同 上	Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: proteomic analysis.	J Neuroimmunol	218	112-5	2009
同 上	c-myc suppressor FBP-interacting repressor for cancer diagnosis and therapy.	Front Biosci	14	3401-8	2009
同 上	YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis	Shock	32	393-400	2009

同 上	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
同 上	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		2010
同 上	肝細胞がんのプロテオーム解析。	病理と臨床	印刷中		2010
久米 秀明	The two-hydrophobic domain tertiary structure of reticulon proteins is critical for modulation of beta-secretase BACE1.	J Neurosci Res	87	2963-72	2009
同 上	Expression of reticulon 3 in Alzheimer's disease brain.	Neuropathol Appl Neurobiol	35	178-88	2009
久家 貴寿	Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization.	Exp Cell Res	315	1117-41,	2009
堤 康央	Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library.	Pharmazie	64	238-41	2009
同 上	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
同 上	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
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

仲 哲治	Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin.	Int J Cancer	125	2316-22	2009
同 上	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
中山 敬一	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
同 上	Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB.	Nature Cell Biol	11	420-32	2009
同 上	CDK inhibitors selectively diminish cell cycle controlled activation of the histone H4 gene promoter by p220 ^{NPAT} and HiNF-P.	J Cell Physiol	219	438-48	2009
同 上	p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases.	Cancer Res	69	3788-94	2009
同 上	Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development.	Mol Cell Biol	29	3529-43	2009
同 上	Mechanoregulation of proliferation.	Mol Cell Biol	29	5104-14	2009

同 上	The reduction of cell death and proliferation by p27 ^{Kip1} minimizes DNA damage in an experimental model of genotoxicity.	Int J Cancer	125	2270-80	2009
同 上	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.
同 上	PKC δ mediates Nrf2-dependent protection of neuronal cells from NO-induced apoptosis.	Biochem Biophys Res Commun	386	750-6	2009
同 上	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
同 上	Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein.	J Biol Chem	284	13766-77	2009
同 上	Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages.	J Biochem	145	565-73	2009
同 上	Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration.	Lab Invest	89	645-56	2009

同 上	Involvement of phospholipase C-related inactive protein in the mouse reproductive system through the regulation of gonadotropin levels.	Biol Reprod	81	681-9	2009
同 上	Regulation of osteoclast apoptosis by bcl-2 family protein bim and caspase-3.	Adv Exp Med Biol	658	111-6	2010
同 上	Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1(+/-) mice.	Nature Genet	42	83-8	2010
同 上	Plasma gelsolin facilitates interaction between β_2 glycoprotein I and $\alpha_5\beta_1$ integrin.	J Cell Mol Med	印刷中		2010
同 上	Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinical significance.	Int J Cancer	126	1828-37	2010
同 上	Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of γ -aminobutyric acid type A receptors.	J Biol Chem	285	4837-4846	2010
同 上	Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity.	J Biol Chem	285	3840-9	2010
同 上	Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts.	Oncogene	29	1798-809	2010
同 上	KDM7 is a dual demethylase for histone H3 lysines 9 and 27 and functions in brain development.	Genes Dev	24	432-7	2010

同 上	Increased E4 activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity.	J Biol Chem	印刷中		2010
同 上	Skp2 Directs Myc-Mediated Suppression of p27 ^{Kip1} yet Has Modest Effects on Myc-driven lymphomagenesis.	Mol Cancer Res	8	353-62	2010
同 上	TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3.	J Cell Sci	印刷中		2010
同 上	Deciphering the transcription complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis.	Nature Cell Biol	印刷中		2010
同 上	Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf/p53-independent cellular senescence.	Nature	464	374-9	2010
平野 久	AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK family and function in nonsense-mediated mRNA decay.	Science Signaling	印刷中		2010
同 上	Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) is involved in the PAR complex to regulate epithelial cell polarity.	Current Biol	印刷中		2010

同 上	Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA.	J Virol	84	822-32	2010
同 上	Characterization of receptor proteins using affinity cross-linking with biotinylated ligands.	Plant Cell Physiol	51	262-70	2010
同 上	Transgenic peas expressing an α -amylase inhibitor gene from beans show altered expression and modification of endogenous proteins.	Electrophoresis	30	1863-68	2009
同 上	Proteomic analysis of membrane proteins expressed specifically in pluripotent stem cells.	Proteomics	9	126-37	2009
同 上	Mutagenesis of longer inserts by the ligation of two PCR fragments amplified with a mutation primer.	J Biosci Bioeng	107	:95-7	2009
同 上	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.
同 上	Isoelectric focusing of high-molecular-weight protein complex under native conditions using agarose gel.	Anal Biochem	387	60-3	2009

同 上	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
南野 直人	Snapshot peptidomics of the regulated secretory pathway.	Mol Cell Proteomics	8	1638-47	2009
高坂 新一	The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in adult hippocampus.	Glia	57	1082-90	2009
同 上	P2Y12 receptor-mediated integrin-β1 activation regulates microglial process extension induced by ATP.	Glia	58	790-801	2010
同 上	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.
宮本 泰豪	Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells.	Glycobiology	19	1018-33	2009.
同 上	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

加藤 菊也	Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas.	Cancer Sci	100	165-72	2009
同 上	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
同 上	Putative precursor cancer cells in human colorectal cancer tissue.	Int J Clin Exp Pathol	2	154-62	2009.
同 上	Impact of the next generation DNA sequencers.	Int J Clin Exp Med	2	193-202	2009
同 上	Algorithm for in vitro diagnostic multivariate index assay.	Breast Cancer	16	248-51	2009
同 上	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
野村 文夫	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.
荒木 令江	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

同 上	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
同 上	Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke associated cholangio-carcinoma.	Cancer Sci	100	2077-84	2009
同 上	Silver ion unusually stabilizes the structure of a parallel-motif DNA triplex.	J Am Chem Soc	131	3826-27	2009
同 上	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
同 上	Proteomic differential display analysis identified up-regulated astrocytic phospho-protein PEA-15 in human malignant pleural mesothelioma cell lines.	Proteomics	9	5078-89	2009
同 上	Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 oprotein is upregulated in human oral squamous cell carcinoma and dependent on the differential level.	Proteomics Clin Appl	3	1338-1347	2009

中村 和行	Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis.	Electrophoresis	30	2168-81	2009
同 上	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.
同 上	Interferon-gamma downregulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine.	Pancreas	38	224-6	2009

High-Yield Peptide-Extraction Method for the Discovery of Subnanomolar Biomarkers from Small Serum SamplesYusuke Kawashima,[†] Toshiyuki Fukutomi,[†] Takeshi Tomonaga,^{‡,§} Hiroki Takahashi,[†]
Fumio Nomura,^{‡,§} Tadakazu Maeda,^{†,||} and Yoshio Kodera^{*,†,§,||}

Laboratory of Biomolecular Dynamics, Department of Physics, Kitasato University School of Science, 1-15-1 Kitasato, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan, Center for Disease Proteomics, Kitasato University School of Science, 1-15-1 Kitasato, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan, Department of Molecular Diagnosis (F8) Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan, and Clinical Proteomics Research Center, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

Received September 8, 2009

Serum proteins/peptides reflect physiological or pathological states in humans and are an attractive target for the discovery of disease biomarkers. However, the existence of high-abundance proteins and the large dynamic range of serum proteins/peptides make any quantitative analysis of low-abundance proteins/peptides challenging. Furthermore, analyses of peptides, including the cleaved fragments of proteins, are difficult because of carrier protein binding. Here, we developed a differential solubilization (DS) method to extract low-molecular-weight proteins/peptides in serum with good reproducibility and yield as compared to typical peptide-extraction methods such as organic solvent precipitation and ultrafiltration. Using the DS method combined with reverse-phase HPLC fractionation followed by MALDI-TOF-MS, we performed high-quality comparative analyses of more than 1500 peptides from 1 μ L of serum samples, including low-abundance peptides in the subnanomolar range and containing many peptides bound to carrier proteins such as albumin. We applied this method and successfully discovered four new biomarker candidates of colon cancer, none of which have previously been observed in serum and one of which is a fragment of the protein zyxin that possibly originated from tumor cells. Our results indicate that serum peptide analyses based on the DS method should greatly contribute to the discovery of novel low-abundance biomarkers.

Keywords: biomarkers • colorectal cancer • mass spectrometry • peptide extraction • peptidomics • plasma • serum

Introduction

Serum/plasma contains thousands of different types of proteins and peptides,^{1–5} and can provide valuable information about the numerous processes that take place within the body. Quantitative analysis of the proteins/peptides in serum/plasma samples is expected to reveal biomarkers. Therefore, many researchers have attempted to provide disease-specific biomarkers for the early detection of disease, drug susceptibility, and the evaluation of prognosis.^{6–9}

The low-molecular-weight (LMW) proteins/peptides in the serum/plasma include members of several physiologically important classes, such as cytokines, chemokines, and peptide hormones, along with proteolytic fragments of larger proteins,^{10,11} including those generated by cancer-specific exopeptidase.¹²

The LMW region is of great interest in proteomic studies that aim to identify disease-specific proteins. The most widely used approaches for the LMW serum/plasma proteome employ SELDI-TOF-MS^{13–17} and MALDI-TOF-MS analysis coupled with simple preparations using solid-phase extraction methods or functionalized paramagnetic beads.^{7,12,18} When these approaches are combined with advanced bioinformatic techniques, many key LMW proteins/peptides with putative molecular masses below 20 kDa are identified, some of which could be used to determine the onset of disease.^{7,12–17,19–22} These results suggest that the LMW serum/plasma proteome might contain an unexplored archive of histological information, and are expected to yield useful biomarkers for disease detection. However, these approaches can detect only a small portion of the LMW proteins/peptides in the serum/plasma.

Serum/plasma proteins/peptides are present at concentrations that are likely to extend over 10 orders of magnitude or more. So far, 22 major proteins have been defined, constituting approximately 99% of the total serum/plasma proteins.^{4,5} Among the remaining 1% are thousands of low-abundance proteins/peptides that are of great interest for proteomic studies, as they include potential biomarkers. However, high-

* To whom correspondence should be addressed: Yoshio Kodera, Laboratory of Biomolecular Dynamics, Department of Physics, Kitasato University School of Science, 1-15-1 Kitasato, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan. E-mail: kodera@kitasato-u.ac.jp. Tel: 81-42-778-9542. Fax: 81-42-778-9953.

[†] Department of Physics, Kitasato University School of Science.

[‡] Department of Molecular Diagnosis (F8) Graduate School of Medicine, Chiba University.

[§] Clinical Proteomics Research Center, Chiba University Hospital.

^{||} Center for Disease Proteomics, Kitasato University School of Science.