

- 大会日本エピジェネティクス研究会、2010.
13. 後藤政広、新井恵吏、若井-牛島抄織、平岡伸介、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. DNA メチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病態診断指標の確立. 第4回大会日本エピジェネティクス研究会、2010.
14. 長塩亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、近藤豊、金井弥栄. DNA メチル化状態を指標とする慢性肝障害患者における発がんリスク評価法の開発. 第4回大会日本エピジェネティクス研究会、2010.
15. 斎藤義正、鈴木秀和、津川仁、松崎潤太郎、平田賢郎、金井弥栄、日比紀文. マイクロ RNA を介した胃癌に対するエピジェネティック治療. シンポジウム「消化器の炎症と発癌-エピジェネティクスと RNA 研究の最前線-」. 第28回サイトプロテクション研究会、2010.
16. 新井恵吏、中川 徹、若井-牛島抄織、藤元博行、金井弥栄. Stage I 精巣セミノーマにおける DNMT3B 巢状発現は再発予測指標となる. 第69回日本癌学会学術総会、2010.
17. 後藤政広、新井恵吏、若井-牛島抄織、平岡伸介、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤 格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. DNA メチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病理診断指標の確立. 第69回日本癌学会学術総会、2010.
18. 長塩 亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、近藤 豊、金井弥栄. DNA メチル化状態を指標とする慢性肝障害患者における発がんリスク評価法の開発. 第69回日本癌学会学術総会、2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
- 該当なし
- 2、実用新案登録
該当なし
- 3、その他
該当なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

氏名	所属	職名
分担研究者 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		リーダー

研究要旨

創薬バイオマーカー探索のために、蛍光二次元電気泳動法を用いて肝細胞癌症例における腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質の同定を試みた。国立がんセンター中央病院で手術を受けた肝細胞癌の症例から得られた82検体（腫瘍組織42検体、非腫瘍組織40検体）より抽出したタンパク質を、蛍光二次元電気泳動法および抗体ライブラリーによって比較解析した。観察されたタンパク質の中から、正常組織と腫瘍組織の間で発現差があるタンパク質を特定した。特定したタンパク質の発現を他の悪性腫瘍においても確認し、抑制実験を実施した。

A. 研究目的

肝細胞癌は本邦では悪性腫瘍死の第4位を占める。肝細胞癌の5年生存率は40%程度と不良である。肝細胞癌の早期発見のための血清腫瘍マーカーとして有効なものは未だなく、また肝細胞癌に対する抗癌剤治療、分子標的治療法の開発は行われているものの、十分な成果が得られていない。このような臨床的な問題点を背景として、肝細胞癌の治療成績の向上を目指した研究開発が行われている。

プロテオームはゲノムの機能的翻訳産物なので、バイオマーカーや治療標的を探索するうえで有用なリソースである。肝細胞癌症例において腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差を示す

タンパク質、早期再発に関わるタンパク質は診断のためのバイオマーカーや創薬のための分子標的の候補とみなすことができる。そのようなタンパク質を探索するためのプロテオーム解析は盛んに行われており、多数の論文が発表されている。しかしながら、臨床応用にはいたった例はなく、より一層の研究が必要されている。

本研究では国立がんセンターで開発された定量性の高いプロテオーム解析の技術と、同センターで手術を受けた肝細胞癌症例の十分な数の手術検体を用いた実験を行い、診断技術や創薬に有用なタンパク質の同定を行うことを目的とする。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院にて手術を受けた肝細胞がん症例を対象とし、切除され保管されていた手術検体を使用した。大型の二次元電気泳動装置によってタンパク質発現プロファイルを作成し、正常組織と腫瘍組織の間で発現レベルの異なるタンパク質を検出した。また、がんの発生や進展に関わることが分かっている分子パスウェイやタンパク質ファミリーのうち代表的なタンパク質についてウェスタンブロッティングを実施し、正常組織と腫瘍組織の比較および再発時期の異なる症例の腫瘍組織同士を比較した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮したがん患者の手術検体を用いた。

C. 研究結果

蛍光二次元電気泳動法については合計 82 検体（腫瘍組織 42 検体、非腫瘍組織 40 検体）を対象に比較解析を行い、正常組織と腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質を同定した。同定したタンパク質についてはウェスタンブロッティングを行って再現性を確認した。ウェスタンブロッティングでは、さまざまなパスウェイの代表的なタンパク質 160 種類についてウェ

スタンブロッティングを行ったところ、ある特定のパスウェイおよび分子ファミリーに比較的集中的に発現差が認められた。そこで、そのうちの一つのパスウェイに絞り、そのパスウェイの主要なタンパク質 240 種類についてウェスタンブロッティングを実施し、正常および腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質および早期に再発する症例で特徴的なタンパク質を同定した。

D. 考察

正常組織と腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質、早期再発に相関するタンパク質を特定した。これらのタンパク質が本研究の目的とするバイオマーカーあるいは創薬標的分子となりうるかどうかについて、培養細胞を用いた機能解析を実施することが次の課題である。

E. 結論

当初の計画通り、バイオマーカー候補および創薬標的候補を同定することができた。平成 23 年度は同定したタンパク質の機能解析をいくつかのものについて実施する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mima T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y,

- Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer*, in press.
2. Kikuta K, Tochigi N, Saito S, Shimoda T, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Suehara Y, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2010; 4, 560-7.
 3. Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci.* 2010; 101, 882-8.
3. 近藤格「電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発」日本電気泳動学会、札幌
 4. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日本癌学会学術集会シンポジウム、大阪
 5. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development」ヨーロッパプロテオーム学会、エストリル、ポルトガル
 6. 近藤格「Biomarker Development by Sarcoma Proteomics」結合組織腫瘍学会、パリ、フランス
 7. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日本分子生物学会ワークショップ、神戸
 8. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine」日米癌学会合同会議、千葉

2. 学会発表

1. 近藤格「Cancer Proteomics for Biomarker Development」日本プロテオーム学会シンポジウム、千葉
 2. 近藤格「蛍光二次元電気泳動法と抗体を用いたプロテオーム解析による大腸がんバイオマーカーの開発」大腸癌研究会、鹿児島
1. 特許出願
 - 1) 発明の名称：「癌の検出法」
 - ①発明者：近藤格、岡麻子、内田好昭、小見和也
 - ②出願日：2010年12月28日
 - ③出願番号：特願2010-292664
 - ④出願人：国立がん研究センター、富士レビオ株式会社
 - ⑤発明の内容の概略：癌の血清腫瘍マーカーになりうるタンパク質を見出した。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

- 1) 発明の名称：「癌の検出法」
- ①発明者：近藤格、岡麻子、内田好昭、小見和也
- ②出願日：2010年12月28日
- ③出願番号：特願2010-292664
- ④出願人：国立がん研究センター、富士レビオ株式会社
- ⑤発明の内容の概略：癌の血清腫瘍マーカーになりうるタンパク質を見出した。

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

日本電気泳動学会 児玉受賞 近藤格「電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発」

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

氏名	所属	職名
分担研究者 中山敬一	九州大学生体防御医学研究所	主幹教授

研究要旨

質量分析計を基盤としたプロテオーム解析法は装置の高性能化に伴い、網羅性や感度を向上させてきた。さらに、最近では従来タンパク質の同定を主な目的としていたプロテオーム解析は、網羅的なタンパク質の定量的な情報の取得を目的とする方法論へ進化しつつある。特に、タンパク質の翻訳後修飾情報は細胞の状態に依存して刻一刻と変化するダイナミックなものであり、その変化の定量的な追跡は、細胞内タンパク質ネットワークのダイナミクスを理解する上で極めて重要である。われわれは、数多くあるタンパク質の翻訳後修飾の中でも、シグナル伝達や細胞周期制御において極めて重要な役割を担っているリン酸化に注目した定量的なプロテオーム解析法を開発してきた。特に、定量法として現在最も有効であると思われる、三連四重極型質量分析計を用いたターゲットプロテオームアプローチをリン酸化の解析に応用すべく、MRM法を用いてリン酸化タンパク質を定量するという Phospho-mTRAQ 法を構築した。本年度は、Phospho-mTRAQ 法をより実用的な方法とするためにいくつかの要素技術の開発を行ったので報告する。

A. 研究目的

前年度は mTRAQ Δ 4 で標識したいいくつかの合成リン酸化ペプチドを mTRAQ Δ 0 で標識した細胞抽出液消化物にスパイクした試料から IMAC によってリン酸化ペプチドを精製し、MRM 解析によって定量分析を行った。その結果、微量なリン酸化ペプチドの絶対定量が可能であることを確認した。しかしながら、本方法をより大規模に行うためには、多数のトランジクションを選定するための様々な技術

基盤が必要である。例えば、多数の同定されたペプチド情報から MRM を行うための情報抽出の自動化や、各種パラメーターの最適化などが必要である。さらに、われわれが使用している 3 連 4 重曲型質量分析計 QTRAP5500 では一回の分析で最大 2500 MRM-transitions を設定することが可能であるが、実際に使用するためには厳密な HPLC での保持時間制御が必要となる。本年度は、情報処理を中心に技術開発を行い、大規模な MRM を真

に実用化レベルに到達させる事を目的とする。

B. 研究方法

上述したように大規模なMRMを実用化するためには様々な要素技術の開発が必要である。今回、1) MASCOTによって同定されたペプチド情報からMRM-transitionsに必要な情報の自動抽出、およびデータベース化、2) 各種パラメーターの最適値の自動算出法の開発、3) HPLCにおける保持時間の相対位置情報化による高精度保持時間予測法の開発を試みた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) MRM-transition データベース構築

われわれは、通常LC-MS/MSのデータをタンパク質同定エンジンであるMASCOTを用いてデータベース検索することでペプチド配列の同定を行っている。大規模なリン酸化プロテオーム解析では数千以上のリン酸化ペプチドが同定されるため、これらの情報からのMRM-transition設定を手作業にて行うことは非現実的である。したがって、MASCOT dat ファイルから必要な情報をテキストファイルとして抽出し、データベースに登録することを自動で可能とする情報インフラを

構築した。本システムは、幅広いニーズに答えるため、任意の遺伝子名やタンパク質名をクエリーに目的ペプチドを検索するモードや各種遺伝子機能やパスウェイなどのグループごとの情報を一括して検索するモードを実装している。さらに検索によって選出されたペプチド配列情報はMRM-transitionsに必要な情報とともにcsvファイル形式でエクスポートする機能を実装しており、容易にMRMの測定に興ずることが可能である。

2) MRM 測定パラメーター自動選定法

われわれが使用しているABSciex社製の3連4重極型質量分析計によるMRM解析では各種パラメータをユーザーが任意に設定することが可能であり、うまく最適化できれば非常に高感度な分析が可能である。その一方で、各パラメーターの設定は目的とするペプチドの合成品を用いてパラメータ値をふることで最適値を見出す作業が必要となり、非常に煩雑である。われわれは、これまでの経験からMRM測定で設定可能なパラメーターのうちCE(コリジョンエネルギー)とCXP(Q3の引きこみ電圧)の設定が最も感度に影響をあたえることを見出した。そこで多数の合成ペプチドを用いてこれら2つのパラメータを詳細に検討し、Q1およびQ3の情報を用いてこれらのパラメーターの最適値を予測するアルゴリズムを開発した。

3) HPLC 保持時間予測

MRM 測定を大規模に行うためには 1 度の分析で設定する MRM-transitions の数をできるだけ多くすることが必要である。しかしながら、各 transition で実際にイオンを通過させる時間 (Dwell time) は数 msec が必要であることから、transition 数は最大 400 程度が現実的な限界となる。この問題を解決するには HPLC での保持時間を予測してその時間だけ目的物の transition を適用する scheduled MRM 機能が有効である。高感度なペプチドの検出を行うためには nanoflow HPLC の使用が一般的であるが、コンベンショナル HPLC に比べて保持時間の再現性に乏しいことが知られている。近年、低流速ポンプの性能も向上し、グラジエント自体の再現性は極めて高くなりつつあるが、プロテオーム研究で使用する試料の複雑さや、試料毎の組成の違いが保持時間のバラつきを引き起こす。また、感度を求めるための工夫の一つであるスプレーチップ一体型のカラムでは、カラム毎のバラつきを抑えることは極めて困難である。そこで、われわれは 12 種類の合成ペプチドをマーカーとして利用することで、各ペプチドの保持時間をマーカーとの相対位置情報に換算し記録することを考案した。未知試料中にマーカーをスパイクしておき、実際に LC-MS/MS で同定を行った際の、保持時間を相対位置情報に変換し、上記データベース入力する。相対位置情報は MRM-transition と

もにエクスポートすることが可能である。実際に、MRM 測定を行う試料にも同マーカーをスパイクし、マーカーの保持時間を計測し、試料中でのマーカーの保持時間プロファイルを取得すれば、これを用いて目的ペプチドの保持時間を予測することが可能である。本方法を用いて極端にグラジエントを変えた条件下でも正確な保持時間の予測が可能であることを確認している。

D. 考察

昨年度開発した Phospho-mTRAQ 法をより大規模に行うための技術開発として、データベースを中心とした情報処理インフラの構築と、各種パラメーターの最適値や保持時間を予測するための要素技術の開発を試み、すべて具現化することに成功した。その結果、これらの要素技術を組み合わせることでリン酸化ペプチドの大規模な MRM 解析がようやく実用レベルに到達できたと思われる。しかしながら、MRM 解析の結果得られる多数のクロマトグラムからのピーク抽出は現時点では質量分析メーカーが提供するソフトウェアを利用しており、その精度、信頼性は未だ満足できるものではない。今後は MRM 測定後の情報処理に関しても独自にソフトウェアの開発に着手する必要がある。また、Phospho-mTRAQ 法ではプローブとして合成リン酸化ペプチドが必要となるが、そのコスト面での負担は極めて大きい。この問題に関しても、ハイス

ルーブットなペプチド合成システムの導入なども検討する必要がある。

E. 結論

これまでに確立した Phospho-mTRAQ 法をより大規模に実行するための要素技術の開発に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chan, C.H., Lee, S.W., Li, C.F., Wang, J., Yang, W.L., Wu, C.Y., Wu, J., Nakayama, K.I., Kang, H.Y., Huang, H.Y., Hung, M.C., Pandolfi, P.P. & Lin, H.K. Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biol.* **12**, 457-467 (2010).
2. Susaki, E., Kaneko-Oshikawa, C., Miyata, K., Tabata, M., Yamada, T., Oike, Y., Katagiri, H. & Nakayama, K.I. Increased E4 activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity. *J. Biol. Chem.* **285**, 15538-15547 (2010).
3. Iwatsuki, M., Mimori, K., Ishii, H., Yokobori, T., Takatsuno, Y., Sato, T., Toh, H., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Baba, H. & Mori, M. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int. J. Cancer* **126**, 1828-1837 (2010).
4. Ohzono, C., Etoh, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hirota, Y., Tanaka, Y. & Fujita, H. Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 951-957 (2010).
5. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T. & Nakayama, K.I. Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **397**, 93-99 (2010).
6. Mizokami, A., Tanaka, H., Ishibashi, H., Umebayashi, H., Fukami, K., Takenawa, T., Nakayama, K.I., Yokoyama, T., Nabekura, J., Kanematsu, T. & Hirata, M. GABA(A) receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice. *J. Neurochem.* **114**, 302-310 (2010).
7. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I. & Hatakeyama, S. TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. *J. Cell Sci.* **123**, 2238-2245 (2010).

8. Ma, H., Yu, L., Byra, E.A., Hu, N., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T. & Ren, J. Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: role of protein phosphatases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 322-329 (2010).
9. Benirschke, R.C., Thompson, J.R., Nomine, Y., Wasielewski, E., Juranic, N., Macura, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Botuyan, M.V. & Mer, G. Molecular basis for the association of human E4B U box ubiquitin ligase with E2-conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4. *Structure* **18**, 955-965 (2010).
10. Tsukada, Y. & Nakayama, K.I. In vitro histone demethylase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb prot5512 (2010).
11. Takeda, H., Kawamura, Y., Miura, A., Mori, M., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Isogai, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Natsume, T., Nomura, N. & Goshima, N. Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate specificity in vitro. *J. Proteome Res.* **9**, 5982-5993 (2010).
12. Hayakawa, H., Fujikane, A., Ito, R., Matsumoto, M., Nakayama, K.I. & Sekiguchi, M. Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403**, 220-224 (2010).
13. Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K.I. & Kinashi, T. Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1. *Immunity* **34**, 24-38 (2011).
14. Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J. Clin. Invest.* **121**, 342-354 (2011).
15. Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K.I., Blazar, B.R., Zeng, Y. & Zhou, X. MiR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1 and SOCS-1. *Blood* (2011).
16. Iriuchishima, H., Takubo, K., Matsuoka, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Nojima, Y. & Suda, T. Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α ; overexpression. *Blood* **117**, 2373-2377 (2011).
17. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J. Anat.* in press. (2011).

18. Inoue, S.I., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T. & Shimazaki, K.I. Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* in press. (2011).
19. Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., Xiao, Y., Christie, A.L., Aster, J., Settleman, J., Gygi, S.P., Kung, A.L., Look, T., Nakayama, K.I., DePinho, R.A. & Wei, W. SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* **471**, 104-109 (2011).
20. Wu, H., Pomeroy, S.L., Ferreira, M., Teider, N., Mariani, J., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Tron, V.A., Saltibus, L.F., Spyropoulos, L. & Leng, R.P. UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53. *Nature Med.* **17**, 347-355 (2011).
21. Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Yoshimori, T., Yokota, S., Himeno, M., Tanaka, Y. & Fujita, H. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells* **16**, 448-466 (2011).
22. Matsumoto, A., Tateishi, Y., Onoyama, I., Okita, Y., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Fbxw7beta resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci.* **102**, 749-755 (2011).
23. Rodriguez, S., Wang, L., Mumaw, C., Srour, E.F., Celso, C.L., Nakayama, K.I. & Carlesso, N. The SKP2 E3 Ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of hematopoietic stem cells. *Blood* in press. (2011).
24. Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H. & Nakayama, K.I. Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. *J. Biol. Chem.* in press. (2011).
25. Sistrunk, h., Macias, E., Nakayama, K.I., Kim, Y. & Rodriguez-Puebla, M.L. Skp2 is necessary for Myc-induced keratinocyte proliferation but dispensable for Myc oncogenic activity in the oral epithelium. *Am. J. Pathol.* in press. (2011).
2. 学会発表
1. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロッティングは要らない?! . 第74回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム. (招待講演) 名古屋. 5/29 (2010).

2. 中山敬一: ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出. **戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域・平成22年度公開シンポジウム**. (シンポジウム) 東京. 6/1 (2010).
3. 中山敬一: プロテオミクスを用いた酵素-基質関係の網羅的解明: ターゲットプロテオミクスの現状と将来. **日本プロテオーム学会2010年会**. (招待講演) 浦安. 7/27 (2010).
4. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting. **6th Global-COE International Symposium: New Horizons for Modern Science - Biology and Medicine at the Crossroads**. (Invited speaker) Fukuoka. 8/19 (2010).
5. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロットィングは要らない?! **Neuro 2010**. (シンポジウム) 神戸. 9/4 (2010).
6. 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫, 松原久裕, 中山敬一, 朝長毅: 大腸癌の大規模リン酸化プロテオーム解析. **第69回日本癌学会学術総会**. 神戸. 9/24 (2010).
7. 中山敬一: 次世代プロテオミクスの現状と将来: もうウェスタンブロットィングは要らない?! **第69回日本癌学会学術総会**. (モーニングレクチャー) 神戸. 9/24 (2010).
8. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く新時代の医学生物学: もうウェスタンブロットィングは要らない?! **RNA フロンティアミーティング 2010**. (特別講演) 裾野. 9/27 (2010).
9. Nakayama, K.I.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting. **MEXT Priority Research Project "Cell Proliferation Control" International Symposium "Cell Cycle and Cell Differentiation: From A to Z"**. (Invited speaker) Nagoya. 10/6 (2010).
10. 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ディファレンシャル・プロテオミクス技術を用いた鉄代謝制御ユビキチンリガーゼ Fbx15 の網羅的基質探索と個体における機能解析. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/7 (2010).
11. 西山正章, 中山敬一: 発生過程におけるアポトーシスの新しい制御機構: クロマチンリモデリングによる p53 のエピジェネティックコントロール. **第33回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 神戸. 12/7 (2010).
12. Shirane, M., Nakayama, K.I.: Protrudin regulates Rab11-dependent synaptic function via interaction with sphingolipid. **第33回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/7 (2010).

13. Hayakawa, H., Ito, R., Sekiguchi, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Human Proteins Specifically Bound to 8-Oxoguanine-containing RNA and their Responses to Oxidative Stress. **第33回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 神戸. 12/7 (2010).
14. 蟹江共春, 小野山一郎, 松本有樹修, 立石悠基, 中山敬一: サイクリンD1を抑制するユビキチンリガーゼの遺伝学的再検証. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/8 (2010).
15. 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子CHD8のL型アイソフォームはマウスの個体発生や細胞分化に必須である. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/8 (2010).
16. 松崎芙美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一: ProtrudinはKIF5のアダプタータンパク質として働き、神経機能を制御する. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/8 (2010).
17. 松本有樹修, 洲崎悦生, 小野山一郎, 星野幹雄, 中山敬一: p57はE2F活性を調節することにより脳発生に必須の役割担う. **第33回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/8 (2010).
18. 村上裕輔, 岸ちひろ, 松本雅記, 中山敬一, 塩見泰史, 西谷秀男: Cdt1のM期安定化分子機構の解析. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/8 (2010).
19. 押川清孝, 松本雅記, 中山敬一: ユビキチン化修飾部位を網羅的に同定する方法の開発と応用. **第33回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 神戸. 12/8 (2010).
20. Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Fujimoto, K., Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Tanaka, Y.: The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis. **第33回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/8 (2010).
21. 足立淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水崇, 松本雅記, 中山敬一, 茂木章, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: DNA損傷応答ネットワークにおけるリン酸化・ユビキチン化修飾ダイナミクスのプロテオーム解析. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/9 (2010).
22. 松本雅記, 中山敬一, 五島直樹, 夏目徹: 次世代プロテオミクスを用いたヒト総プロテオームの絶対定量. **第33回日本分子生物学会年会**. (ワークショップ) 神戸. 12/9 (2010).
23. 宗岡哲也, 坪井智広, 弓本佳苗, 中山敬一: ユビキチンリガーゼSCFFbx13は基質Cry1の結合に依存してSCF複合体を形成する. **第33回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/9 (2010).
24. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もう

- ウェスタンブロッティングは要らない?! **第33回日本分子生物学会年会**. (パイオニアズレクチャー) 神戸. 12/9 (2010).
25. Okumura, F., Matsunaga, Y., Katayama, Y., Nakayama, K.I., Hatakeyama, S.: TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/9 (2010).
26. Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., Nakayama, K.I.: Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/9 (2010).
27. 鳴海良平, 久家貴寿, 松本雅記, 中山敬一, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長毅: 定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌組織の予後不良群と予後良好群の比較. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/10 (2010).
28. 弓本佳苗, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: DiPIUS 法を用いたユビキチンリガーゼ基質の網羅的同定. **第33回日本分子生物学会年会**. 神戸. 12/10 (2010).
29. 久家貴寿, 鳴海良平, 村岡賢, 足立淳, 松本雅記, 中山敬一, 松原久裕, 松下一之, 野村文夫, 長野一也, 角田慎一, 朝長毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索. **第33回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/10 (2010).
30. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 mTOR 下流分子の網羅的探索と機能解析. **第33回日本分子生物学会年会**. (一般口頭発表) 神戸. 12/10 (2010).
31. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Nakayama, K.I.: Generation and characterization of mice lacking all CIP/KIP CDK inhibitors. **7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity**. Singapore. 2/12 (2011).
32. Okita, Y., Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Nakayama, K.I.: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. **7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity**. Singapore. 2/12 (2011).
33. Muneoka, T., Tsuboi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: Association with Cry1 is essential for Fbxl3 to form SCF complex. **7th Global-COE International Symposium: Cancer Stem Cells, Inflammation and Immunity**. Singapore. 2/12 (2011).
34. Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Protrudin is a novel adaptor protein of KIF5 and regulates neuronal function. **7th Global-COE International**

*Symposium: Cancer Stem Cells,
Inflammation and Immunity.* (Oral)
Singapore. 2/12 (2011).

35. Moroishi, T., Nishiyama, M.,
Yumimoto, K., Matsumoto, M., Iwai,
K., Nakayama, K.I.: Loss of
SCFFbx15 results in deregulation of
iron metabolism in mice. *7th
Global-COE International
Symposium: Cancer Stem Cells,
Inflammation and Immunity.* (Oral)
Singapore. 2/12 (2011).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」

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

研究要旨

肝細胞癌での有用性の高い（発現の高特異性・高頻度、癌細胞増殖・生存に関わる機能を有する）創薬バイオマーカー探索を目的に、新たにゲノムDNAディープシーケンシング解析より遺伝子変異の抽出とその機能・発現解析を国立がんセンターと共同で実施している。キナーゼ分子種での遺伝子変異に注目して、肝癌細胞株のゲノムDNAシーケンスから見出したキナーゼ遺伝子変異の中から、既知キナーゼ活性化変異の構造情報を基に活性化変異を予測し、その機能解析を実施してきた。またスキルス胃がんでの同様の目的に、スキルス胃がん株でのゲノムDNAディープシーケンシング解析よりまずは融合遺伝子変異の探索と機能解析を国立がんセンターと共同で実施してきた。

A. 研究目的

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

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

ーゼを種々の解析方法を用いて探索することが世界的に盛んになってきた。

本研究は前年度のエクソンアレイ遺伝子発現データ解析手法に変えて、直接的に遺伝子変異を探索するゲノムDNAディープシーケンシング解析に着手した。まずは肝癌細胞株、スキルス胃がん細胞株での遺伝子変異解析とその機能解析を実施し、機能的に重要な癌特異的な遺伝子変異の同定を目指し、その後当該癌種の臨床サンプルでの発現確認（国立がんセンター）を実施する計画で進めている。本手法によって、新たな診断且つ治療に有用な標的分子の同定を目的とする。

B. 研究方法

肝癌細胞株 Alexander, HepG2, HepG2(C3A), HLE, HLF, HuH1, HuH6, HuH7, JHH1, JHH4, JHH5, JHH7, Kim1, SK-Hep1, SNU182, SNU378, SNU398, SNU423, SNU449, SNU475 の 20 株のゲノム DNA のうち、全キナーゼ関連遺伝子 513 遺伝子にフォーカスしたディープシークエンシング解析データおよびその変異候補情報を国立がん研究センター研究所にて取得した。アステラス製薬においては多数の既知キナーゼ遺伝子活性化変異とその構造的な位置情報を鋳型にして、上記の変異配列情報を解析して、活性化変異候補を抽出した。その後、当該変異配列の mRNA レベルでの発現検討、そして当該変異配列を発現する細胞株での腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討した。

一方、スキルス胃がん株 HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60 の RNA を用いてディープシークエンシング解析データを国立がん研究センター研究所にて取得し、アステラス製薬においてはそのデータ解析より融合遺伝子候補を抽出した。その後、融合遺伝子候補を発現する細胞株での腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が漏出することが無いように匿名化が厳重に行われ

るように配慮したがん患者の手術検体を用いた。また、本共同研究は国立がんセンターの倫理委員会およびアステラス製薬の倫理委員会において審査・承認された。

C. 研究結果

肝癌細胞株 20 株 (前述) の全キナーゼ遺伝子に関するゲノム DNA ディープシークエンシング解析から変異配列候補を抽出し、多数の既知キナーゼ遺伝子活性化変異とその構造的な位置情報とをドッキングさせて、上記の変異配列候補から活性化変異候補を抽出した。この解析により既知の B-raf(V600E) 活性化変異が SK-Hep1 細胞株にてコードされていることを初めて見出した。更に、HepG2, HepG2(C3A) 株におけるキナーゼ A (G480R) 変異、SNU182 株における PHKG1(A192D) 変異、JHH5 株におけるキナーゼ B(K69M) 変異が抽出された。しかしながら、SNU18 株の PHKG1(A192D) 変異はゲノム DNA レベルでは存在するが mRNA 発現が認められなかったため、更なる解析を中止した。一方、細胞株での発現が確認されたキナーゼ A (G480R) 変異、キナーゼ B(K69M) 変異に関しては、当該発現細胞株において siRNA 実験による発現抑制実験からそれらの腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討した。その結果、キナーゼ A (G480R) 変異を発現する HepG2 および野生型を発現する JHH5, SK-Hep1 においてもキナーゼ A の発現抑制 (発現抑制の程度は解析した細胞

間でほぼ同程度：用いた siRNA の標的配列は当該標的キナーゼの変異部位を含まず、野生型も変異型も発現抑制し得る。また、発現抑制は qPCR にて野生型、変異型の区別なく測定した。) は強力な増殖抑制を示したが、HepG2 が特に顕著な増殖抑制を示す傾向は認められなかった (図 1)。また、キナーゼ B (K69M) 変異を発現する JHH5 においてキナーゼ B の発現抑制は増殖抑制を示さなかった (図 2)。

スキルス胃がん株 HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60 の RNA を用いたディープシーケンシング解析データから融合変異遺伝子候補を抽出した。その後、これら融合変異遺伝子の腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討するために、当該発現細胞株での siRNA 実験による発現抑制実験を実施した。融合パートナー遺伝間で配列類似性が低い視点で、カテプシン D (1-1205 残基あるいは 1343 残基) -CD225 ファミリー蛋白の融合候補、および BOLA2 (1-877 残基)-SMG1 キナーゼ (1766 残基-) の融合候補の注目した。カテプシン D-CD225 ファミリー融合遺伝子が発現する HSC45 および野生型カテプシン D を発現する HSC58 において、siRNA によるカテプシン D の発現抑制は同程度に部分的な細胞増殖抑制を示した (siRNA の標的配列はカテプシン D の 1205 残基よりも前に位置し、野生型も融合型も発現抑制し得る。なお、発現抑制は qPCR にて siRNA 標的配列付近の発現で測定した。) (図 3)。BOLA2 (1-877 残

基)-SMG1 キナーゼ (1766 残基-) に関して、当該融合遺伝子が発現する HSC43 において、siRNA による SMG1 の発現抑制は細胞増殖抑制を示さなかった (siRNA の標的配列は SMG1 の 1766 残基以降に位置し、野生型も融合型も発現抑制し得る。なお、発現抑制は qPCR にて siRNA 標的配列付近の発現で測定した。)

D. 考察

肝癌細胞株で見出したキナーゼ A (G480R) 変異、キナーゼ B (K69M) 変異は当該発現細胞株での発現抑制、また野生型発現細胞株での発現抑制による細胞増殖阻害の強度の比較を行った結果、両変異とも強力な腫瘍増殖ドライバー変異として機能していないと結論した。キナーゼ A の発現抑制は、野生型を発現する JHH5 ではほぼ完全な細胞増殖阻害を示したが、変異型発現株を含む肝癌細胞株 7 株すべてにおいて程度の差こそあれ細胞増殖抑制を示したことから、キナーゼ A は一般的に細胞増殖制御に関係する可能性が示唆された。スキルス胃がん株で見出したカテプシン D (1-1205 残基あるいは 1343 残基) -CD225 ファミリー蛋白の融合候補、および BOLA2 (1-877 残基)-SMG1 キナーゼ (1766 残基-) の融合遺伝子も、強力な腫瘍増殖ドライバー変異として機能していないと結論した。

E. 結論

多数の既知キナーゼ遺伝子活性化変

異とその構造的位罨情報を鋳型にして、キナーゼ遺伝子の変異配列から活性化変異候補を抽出して、その腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討する予備的な解析土台は確立できた。今後は、活性化変異候補を抽出するプログラムの改良と実験的検証の範囲を広げて対応したい。また、スキルス胃がん株14株のゲノムDNAディプシーケンシング解析から全キナーゼ遺伝子の変異解析を行い、肝癌同様に腫瘍増殖ドライバー変異の同定に挑みたい。

F. 健康危険情報

特になし

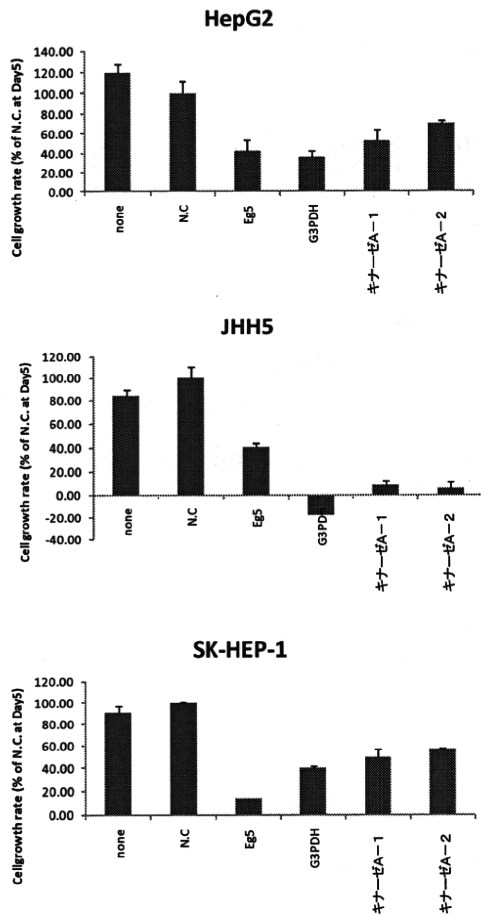
G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

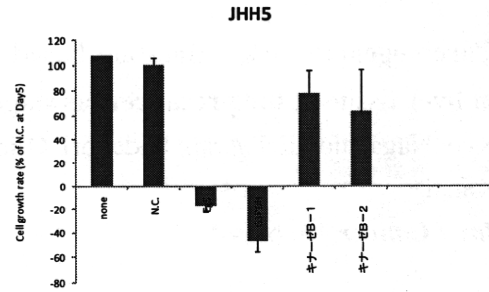
図 1



キナーゼ A-1, キナーゼ A-2 はキナーゼ A 遺伝子の異なる配列に対する siRNA。キナーゼ A の発現抑制率 (qPCR にて測定) はそれぞれ HepG2 (65%, 84%), JHH5 (83%, 88%), SK-Hep1 (85%, 92%) であった。Cell growth rate は、CellTiter Glo (Promega) で細胞数指標を取り、negative control siRNA を導入した細胞群の四日目の細胞数から siRNA を導入した日の細胞数を引いた値を 100% とする。従って、0% は細胞死を示唆する。

Eg5, G3PDH に対する siRNA は本実験のトランスフェクションおよび細胞増殖抑制のポジティブコントロールとして使用した。

図 2



キナーゼ B-1, キナーゼ B-2 はキナーゼ B 遺伝子の異なる配列に対する siRNA。キナーゼ B の発現抑制率 (qPCR にて測定) は、90%, 95% であった。

図 3

