

201010010A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 23 (2011) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
疾患関連創薬バイオマーカー探索研究	1
山西 弘一	
II. 分担研究報告	
1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの 探索と機能解析	35
朝長 毅	
2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究	44
角田 慎一	
3. プロテオミクス手法による自己免疫疾患の活動性を把握する 血清バイオマーカーの探索	54
仲 哲治	
4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の 開発とバイオマーカー探索への応用	60
中山 敬一	
5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用	67
平野 久	
6. 2DICAL法に関する微量タンパク質解析技術の研究	73
尾野 雅哉	
7. 循環器疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究	77
寒川 賢治、南野 直人	
8. 精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究	82
高坂 新一	
9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索	85
加藤 菊也	
10. 血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究： 血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用	89
野村 文夫	
11. 脳神経腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究： 融合プロテオミクスによる脳神経系腫瘍病態に関わる癌幹細胞 関連分子群の解析	92
荒木 令江	
12. 肝細胞がんのバイオマーカー探索とチップ技術を用いた自己抗体に よる診断技術の開発	101
中村 和行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	107
IV. 研究成果の刊行物・別刷	119

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

研究代表者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 研究所長

研究要旨

疾患関連バイオマーカーの発見には疾患の根本的な原因であるタンパク質の異常を見つけることが必須であり、ヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス研究が重要である。本研究では、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。

本年度は、ヒト疾患試料を用いて以下の研究を実施したので報告する。

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

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。

昨年度はバイオマーカー探索に必要なプロテオミクスの基盤技術を確立し、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。本年度は、バイオマーカー探索を継続するとともに、バイオインフォマティクスを駆使して、同定された多数のタンパク質の中からバイオマーカーとして有用なタンパク質の絞り込みを行った。さらに、バイオマーカーの実用化に必須である検証法、特に SRM/MRM 法を用いた臨床検体中のタンパク質・ペプチドの正確な定量法を確立した。その手法を用いて、大腸癌・乳癌組織のプロテオーム解析で同定されたバイオマーカー候補タンパク質の検証を行うとともに、血漿中に微量に存在するアルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチドである APL1 β の検出・定量に成功した。

2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究：角田 慎一

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、バイオ医薬品の中心である抗体医薬の開発に資する基盤技術の開発を進めるとともに、がん治療の有効な標的として期待されるがん血管に発現する疾患関連タンパク質を効率よく絞り込む方法「血管プロテオミクス」の確立と応用を行った。本技術は、プロテオミクス研究によって同定される多数の疾患関連タンパク質の中からの効率の良い薬物標的の絞り込みに向け、ビオチン化試薬を利用したケミカルプロテオミクスを駆使することで、血管に発現するタンパク質を効率良く精製するとともに、がん血管をターゲットとしたがん治療薬の開発を可能とするものである。本研究では特に、転移がん治療に資する抗体医薬のターゲット分子の探索を目的に、リンパ腫を対象疾患として、がん血管に発現する変動タンパク質の同定とそれらの分子に対する抗体の治療薬としての可能性に関する検討を行った。種々の検討の結果、リンパ腫の血管において発現変動しているタンパク質群を MALDI-TOF-MS/MS 解析により数十種類同定すると同時に、それらに対する特異抗体が新規がん治療薬として利用できる可能性が示唆された。

3. プロテオミクス手法による自己免疫疾患の活動性を把握する血清バイオマーカーの探索： 仲 哲治

近年、関節リウマチ等の自己免疫疾患に対して抗体医薬品が開発され、優れた治療効果を示している。その一方で、抗体医薬品による治療を受ける患者に対して疾患活動性を的確に把握できるバイオマーカーや抗体医薬品の奏功性予測マーカーの開発が必要とされている。

本研究では最新の定量的プロテオミクス手法(iTRAQ 法)を用いて infliximab(抗 TNF- α 抗体)治療前後の関節リウマチ患者血清タンパク質を比較解析した。その結果、leucine rich alpha-2 glycoprotein(LRG)が infliximab 治療前血清にて上昇している事を明らかにした。LRG は関節リウマチ、クローン病の活動性スコアと CRP よりも強く相関し、疾患活動性マーカーとして有用性を示

した。さらに血中 LRG はクローン病患者において infliximab 感受性患者よりも infliximab 抵抗性患者にて高値を示したことから、infliximab 治療奏功性マーカーとなりうる可能性が示唆された。

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

有用なバイオマーカーの探索は、検体試料からいかに多くのタンパク質を同定・定量できる技術を開発するかという点にかかっているとと言っても過言ではない。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を用いて網羅的・高感度にタンパク質を定量するストリームラインの開発を目指して基礎研究を行っている。本年度は MRM 法をプロテオームワイドに行うため、全てのタンパク質に対する座標決定取得のための基盤整備を行った。これは将来的にバイオマーカー探索のための巨大な知識基盤となる重要な集積情報である。

5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：平野 久

本年度は、iTRAQ 法を用いた標識法と Progenesis を用いた非標識法によるタンパク質同定結果の違いについて検討を行った。標識法と非標識法間で共通して検出できるタンパク質数は予想以上に少ないことがわかった。これらの方法では、試料タンパク質の分画方法が異なると共に、同じ質量分析装置ではあるがペプチド解離方法が異なる。また、iTRAQ 法では、iTRAQ 試薬がペプチドに結合している。これらの違いが両法によって共通して検出されるタンパク質数が少ない原因ではないか。従って、網羅的にタンパク質を検出するためには、両方の方法を利用することが望ましい。

一方、これまでに卵巣明細胞腺がん(CCA)では、アネキシン IV の発現が特異的に高まることを明らかにした。本年度は、CCA 特異的な ANX4 発現に重要なシスエレメントや転写因子を同定し、CCA の発症・進展に関わる特徴を明らかにしようと考えた。本年度の研究によって CCA において特異的に増加している ANX4 の発現は転写レベルで制御されており、第一イントロン内の p53 結合配列が重要であることがわかった。CCA では p53 の遺伝子変異は認められず、p53 が直接的に ANX4 遺伝子の CCA 特異的発現を引き起こしていたことから、ANX4 遺伝子は新規 p53 標的遺伝子であることが明らかになった。

6. 2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究：尾野 雅哉

国立がん研究センターが開発した 2DICAL を用いた疾患関連創薬バイオマーカー探索を行っている。本年度は、2DICAL をプロテオームリサーチセンターに導入し、プロテオームリサーチセンターが所有する最新の質量分析計で腎癌血漿バイオマーカー探索を行い、昨年度、国立がん研究センターで行った結果と比較解析を行った。また、すでに国立がん研究センターで試料採取が終了し、倫理審査で承認を受けた 1,000 検体以上の血液サンプルをプロテオームリサーチセンターで解析可能とするためプロテオームリサーチセンターでの倫理審査を行い、承認を得た。さらに、昨年見出した腎癌の血漿バイオマーカー候補の検証を進め、論文への投稿をおこなった。新規に前立腺癌の血漿バイオマーカー開発に着手し、バイオマーカー候補を選別した。2DICAL はその解析能力を改善し、バージョンアップに成功した。

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

循環器系疾患の病態、治療、予後等を評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するには、微量の対象物を高感度に構造解析できる解析系と、対象試料からの標的物質群を生体内に存在する状態で、再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計の進歩により前者はかなり達成されたが、後者を可能とする有効な前処理法は依然として確立されてない。本年度の研究では、バイオマーカーとして有望な分子量の大きいペプチドを対象として、微量試料の取扱い手法と解析法の開発を実施した。また、循環器系の最重要疾患である心不全のバイオマーカー探索のため、イヌ心不全モデルを作成して組織、血液検体を収集した。

8. 精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究：高坂 新一

本研究では精神疾患（統合失調症、気分障害など）、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）患者由来髄液の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的としている。本年度は、すでに確立した髄液 2mL からの測定法を踏まえて、購入した検査後残余髄液プールを標準とする方法を検証し、300 余りのタンパク質を同定できることを確認した。また髄液採取後の室温放置時間時間の影響を調べ、反動するタンパク質同定し、今後の患者検体での解析結果の解釈に有用なデータを得た。さらに採取後の迅速な処理が不可欠であることから、専属のコーディネーターによって採取時の処理を行う手順を確立した。

9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索：加藤 菊也

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を発見し、それらの糖鎖腫瘍マーカーとしての臨床応用への可能性を検討することを目的とする。昨年度までに、大腸癌および膵臓癌の糖脂質の詳細な構造解析を行うことにより、新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (α 2-6 sialylated Type 1H, ST1H) の存在を見出し、報告した。この ST1H 抗原はルイス型陰性の大腸癌や膵臓癌にのみ発現が認められ、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。そこで本年度は、ELISA 法などを用いた臨床応用に向けて、ST1H を特異的に認識する単クローン抗体を作成することを試みた。糖脂質 ST1H を含む糖鎖抗原はリポソーム法で作成し、Balb/c マウスに免疫した。3~5 度の免疫後、マウスより脾細胞を調整し、PEG 法を用いてミエロマ細胞と融合させた。3,000 を超えるクローンをスクリーニングし、ELISA にて ST1H を特異的に認識する 31 種類のクローンを得た。そのうちの 2 クローンは、免疫組織学法にも適用しうることがわかった。今後は、これらの抗体の詳しい性状を調べるとともに、ヒト血清中の ST1H を測定しうる ELISA 系を構築し、多検体の血清測定を行う予定している。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 症例及び肺腺癌組織 10 例の提供を行った。

10. 血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究：野村 文夫

血清・血漿を用いたプロテオーム解析においては、abundant proteins を除去していわゆる deep proteome を探索することが一般的に行われてきた。しかし、abundant proteins と結合しているペプチド類も同時に失われる可能性があることが難点であった。そこで abundant protein と結合しているペプチドも含めた血清ペプチド抽出法を開発した。本法は再現性に優れ、血清の疾患マーカー探索、とくにペプチドマーカー探索に有用であると期待される。

11. 融合プロテオミクスによる脳神経系腫瘍病態に関わる癌幹細胞関連分子群の解析：荒木 令江

脳神経系腫瘍の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／細胞を用いた融合プロテオミクスの方法論確立とその検証法を検討している。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(iPEACH 法)を確立し、同定されたターゲット候補分子群を、脳神経系腫瘍の臨床サンプルおよび培養細胞における検証実験に供した。本年は特に、グリオーマ幹細胞(GSC)および神経系腫瘍幹細胞モデル NFKDPC12 に焦点をあて、幹細胞様特性維持と分化に関わる分子群の検索と、これらの悪性腫瘍発生に関わる分子群の解析に応用した。グリオーマ患者組織より分離した GSC 9 クローンを対象に、iPEACH を用いた融合プロテオミクスによって、1,458 個の GSC の分化誘導における発現変動分子群のプロファイルを解析し、GSC を特徴づける分子群を同定した。これらには既知の神経細胞分化／グリア細胞分化、及び腫瘍マーカーに加えて、新規の細胞周期／運動／細胞死に関する分子ネットワークシグナルが含まれていた。また、神経幹細胞 PC12 の NF1(RAS-GAP)発現抑制細胞を用いた神経系腫瘍モデル(NFKDPN12)に応用し、特異的に変動している 153 種類の蛋白質を同定した。その中で新規 mTOR 調節因子 Protein T とその上流下流ネットワークに注目し、Protein T を介した幹細胞維持及びアポトーシス調節、NF1 病態に関連する腫瘍の悪性化、特に末梢神経鞘腫瘍(MPNST)の発症に関わる可能性を示唆した。さらに Protein T の発現

抑制によって、未分化細胞が正常な分化状態へと誘導され、細胞増殖が抑制されることを明らかにした。これら神経系腫瘍(幹)細胞の新規分化調節治療ターゲット候補分子群の腫瘍悪性化のマーカーとしての可能性と、その分子機能やシグナルの上流および下流の分子を標的とした治療戦略が期待される。

12. 肝細胞がんのバイオマーカー探索とチップ技術を用いた自己抗体による診断技術の開発：

中村 和行

難治性がんの病態、治療、予後などの評価には信頼性の高いバイオマーカーの探索が不可欠である。とくにバイオマーカーとなり得る患者血清中の新規タンパク質の高感度検出技術の開発と応用が課題となっている。その基本技術として二次元電気泳動法と質量分析法による網羅的な血清タンパク質の分析が行われ、疾患関連バイオマーカー候補の報告があるが、信頼性の高いものは少ない。本研究では、プロテオーム解析による C 型肝炎ウイルス (HCV) 関連肝細胞癌や膵臓癌などの難治性がんの診断や治療標的のバイオマーカー候補の探索を進め、患者血清中の自己抗体を用いた PROTEOMEX 技術による癌関連抗原蛋白の絞り込みと Cys-tag-Protein Chip (CTPC) 技術による精度の高い自己抗体価測定技術の開発を行った。

研究代表者

山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所
所長

加藤菊也 大阪府立成人病センター研究所
所長

野村文夫 千葉大学医学研究院
教授

研究分担者

朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所
プロテオームリサーチプロジェクト
リーダー

荒木令江 熊本大学医学薬学研究部腫瘍医学
分野
准教授

堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
リーダー

中村和行 山口大学医学部医学科
教授

仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト
リーダー

中山敬一 九州大学生体防御医学研究所
教授

平野 久 横浜市立大学大学院国際総合科学
研究科
教授

尾野雅哉 国立がんセンター研究所
化学療法部
室長

寒川賢治 国立循環器病センター研究所
所長

南野直人 国立循環器病センター研究所
部長

高坂新一 国立精神・神経センター研究所
所長

A. 研究目的

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

このような疾患プロテオミクス研究に基づい

た創薬（プロテオーム創薬）への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約 2 万 2 千種の遺伝子に比して、膨大とも言える 10 万種以上にものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「iTRAQ 法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ（疾患プロテオミクス）」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

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

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

B. 研究方法（各研究分担者の研究方法の項参照）

C, D. 研究結果および考察

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

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に着目した大腸癌・乳癌バイオマーカーの探索

進行度の異なるヒト大腸癌組織（非癌部、前癌病変（ポリープ）、癌部（転移なし、あり））の安定同位体標識による定量的リン酸化プロテオーム解析により、10,477 種類のリン酸化ペプチド（3,933 種類のタンパク）を同定した。このうち、癌部（転移あり、なし）の群間比較で定量値に 2 倍以上の変動の見られた 619 種類のペプチドをバイオマーカー候補とした。さらに、NetworKIN によるキナーゼ基質予測解析およびジーンオントロジー解析により、大腸癌転移に関わる可能性のあるキナーゼパスウェイが予測された。同様に、mammaprint でローリスク、ハイリスク群に分類された乳癌患者組織のリン酸化タンパク質のプロテオミクス解析により、8,952 種類のリン酸化ペプチドが同定され、そのうち 113 種類がハイリスク、ローリスク群間で 2 倍以上の発現変動が見られた。

(2) 膜タンパク質に着目した大腸癌・乳癌バイオマーカーの探索

ヒト大腸癌組織（非癌部、前癌病変（ポリープ）、癌部（転移なし、あり））の膜タンパク質のプロテオーム解析により、5,000 を越えるタンパク質が同定され、同定タンパク質の約 50%が膜に、約 15%が表層膜に局在し、約 30%が膜貫通ドメインを持つことが予測された。大腸癌の悪性化に伴い、有意に発現量が変化する膜タンパク質も多数得られ、その中には癌の進行との関与が既に報告されているインテグリン $\alpha 5$ なども含まれていた。また、これまでにバイオマーカーとしての報告がない膜タンパク質 X は、ポリープに比べてステージ 2（癌部：転移なし）や 4（癌部：転移あり）で発現量が増加し、癌部で高発現していることが示された。同様に、mammaprint でローリスク、ハイリスク群に分類された乳癌患者組織の膜画分を用いた大規模プロテオーム解析により 5,122 種類のタンパク質が同定・定量できた。またローリスク群でハイリスク群より有意な差が示されたタンパク質 Y のウェスタンブロット法、免疫組織染色法を行ったところ発現量に差が見られた。この結果より、Y タンパク質は、バイオマーカー候補タンパク質になることが示された。

2. SRM/MRM 法によるバイオマーカー候補タンパク質・ペプチドの検証

(1) 大腸癌・乳癌組織のバイオマーカー候補タ

ンパク質の検証

6種類の大腸がん由来株化細胞に含まれる34種類のリン酸化ペプチドをSRM法により測定を試み、32種類のリン酸化ペプチドを検出することができた(そのうち定量可能なレベルは28種類であった)。このことから、大規模リン酸プロテオーム解析によってバイオマーカー候補として発見されたリン酸化ペプチドうち、多くのペプチドがSRM法によって、大規模解析の20分の1の少ないサンプル量にも関わらず、ハイスループットに検出・定量することができると考えられ、大規模リン酸プロテオーム解析後のバリデーションの方法として有効であることが示唆された。

(2) アルツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチド APL1 β の定量

1, 4, 16, 64 fmol/ml のSIペプチドの定量により、SRMシグナル(Area値)とペプチド量の線形相関が確認された。内在性ペプチドとSIペプチドのArea値の比率から、健常者由来の血漿1ml中に含まれるAPL1 β 25, 27, 28の絶対濃度がそれぞれ1.57, 1.38, 0.71fmol/ml (pM)であると定量する事が出来た。

C, D-2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究：角田慎一

A20リンパ腫移植マウスに対してビオチン化試薬を環流して、血管に存在するタンパク質をラベル化した。血管タンパク質がラベル化されているかどうかの確認のために、HRP標識アビジンにて組織染色を行った。その結果、血管周囲が染色されていることが確認出来、がん転移組織においても血管がラベル化されていることが確認された。この組織に対して抗CD31抗体にて二重染色を行った結果、上記ビオチン化タンパク質との共存が確認されており、転移巣のがん血管がラベル化されていることが確認された。この組織からビオチン化タンパク質を回収し、トリプシンにて消化した。消化後のペプチドをMALDI-TOF/MS/MSにて測定し、Protein Pilotにて定性解析するとともに、DeepQuantERにて定量解析を行った。2種類以上のペプチドが同定されたタンパク質として、肝臓から520種類、リンパ組織から295種類、脾臓から368種類のタンパク質が同定された。発現量が上昇したタンパク質の内、同定された上位のタンパク質の中か

ら候補となるタンパク質を8種類選択した。選択したタンパク質に対する抗体を用いて、移植したがん組織に対して免疫染色を行った。これまでに報告のある腫瘍関連抗原であるTransferrin ReceptorやEndoglin等の抗原の発現は低かったのに対して、BST-2ならびにEMILIN-1等の抗原は、血管に対して特異的かつ高い発現量を示すことが明らかとなった。

このうちBST-2に対してさらなる検討を行った。BST-2の発現は正常の組織(脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、リンパ節、腎臓、小腸、腎臓さらに筋肉)には見られなかったために、BST-2抗体を用いた抗体医療の可能性に関する検討を行った。上記の検討は、マウス腫瘍に関する検討であったため、よりヒトに近い検討を行うために、マウスに対してヒトのリンパ腫細胞株を移植した検討を行った。Ramos、DoHH-2、SU-DHL-4細胞をマウスに移植し、BST-2の発現を確認した。その結果、リンパ腫の血管とBST-2との共存が確認された。また、この血管に発現するBST-2への集積性を確認するために、投与した抗体が実際に集積するかどうかに関する検討を行った。その結果、投与した抗体は腫瘍の血管に集積することが明らかになった。

その結果を踏まえ、血管に集積する抗体が腫瘍増殖抑制効果を示すかどうかに関する検討を行った。1週間毎に3回抗体投与した結果、2種類の抗体のいずれも、皮下移植した腫瘍の増殖抑制効果が確認された。さらに、ヒトのリンパ腫組織にBST-2が発現しているかどうかに関する検討を行った。非ホジキンリンパ腫、播種性大B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ腫等の組織に対してBST-2抗体を用いた免疫染色を行った結果、いずれの組織においてもBST-2が発現していることが明らかとなった。

本研究では、ケミカルプロテオミクスの技術を用いて、腫瘍血管に発現するタンパク質のプロテオーム解析を通じて、がん治療を目的とした創薬ターゲットの探索を行った。これまで、mRNAの発現等ジーンチップを用いた解析が行われており、腫瘍組織で高い発現を示す分子群の同定が行われてきている。しかし、血管を標的としたプロテオーム解析はまだ例が少なく、より特異的かつ選択的なターゲット分子の同定に期待が

寄せられている。本研究で同定されたタンパク質群は、これまでの報告からも知られている分子群も数多く含まれていたが、血漿に含まれるタンパク質が同定されたことは、腫瘍部位での血液凝固を証明する意味でも興味深い知見であると考えられる。

今回同定されたBST-2はTypeIIの膜糖タンパク質であり、ミエローマ細胞に高発現するタンパク質として知られていた。本研究ではこのミエローマに発現するタンパク質が血管にも発現していることが明らかとなり、リンパ腫の新しいターゲットと分子として期待される。さらに、BST-2に対する抗体が腫瘍増殖抑制効果を持っていたことから、今後、この分子に体する抗体医薬品の創製に期待が寄せられる。

C, D-3. プロテオミクス手法による自己免疫疾患の活動性を把握する血清バイオマーカーの探索：仲 哲治

Infliximab 治療前後の同一の関節リウマチ患者血清について iTRAQ 法を用いた血清プロテオーム解析を行った結果、326 個の血清タンパク質を同定した。Infliximab 治療 12 週後(低疾患活動期)と比べ、Infliximab 治療前(高疾患活動期)において 1.5 倍以上に高発現を示すタンパク質が 31 個、逆に 0.67 倍以下に発現低下を示すタンパク質を 40 個同定した。治療前で高発現するタンパク質には CRP の様な既知の炎症マーカータンパク質も含まれていた。本解析の結果、Infliximab 治療 12 週後と比べ、Infliximab 治療前に高発現を示すタンパク質の 1 つとして leucine rich alpha 2 glycoprotein(LRG)の血中濃度が 3.89 倍に上昇していることを明らかにした。異なる関節リウマチ患者血清の抗 TNF-alpha 阻害抗体治療前後の血清タンパク質を解析した結果、同様に LRG の血中濃度が治療前にて高発現していることから、LRG は治療前(高疾患活動性期)にて発現が上昇するタンパク質であることが判明した。LRG は血清タンパク質であるが、これまで詳細な機能は報告されていない。そこで、我々は LRG が関節リウマチの活動性マーカーなどのバイオマーカーとなり得るのではないかと考え、ELISA 法を用いて、さまざまな患者血清中の LRG 濃度を解析することにした。

Infliximab 及び etanercept (完全ヒト型可溶

性 TNFalpha レセプター製剤)治療前後の血清 LRG 濃度を ELISA 法にて測定した。その結果、治療前で高値を示していた血清 LRG 濃度治療後には多くの例で減少していることが判明した。続いて、抗 TNF 阻害抗体治療前の血清 LRG 濃度を、関節リウマチ以外にもクローン病、ベーチェット病について解析した結果、いずれの疾患群においても血中 LRG 濃度は健常人よりも有意に高値を示した。このことから、LRG は関節リウマチに特異的な分子ではないものの、様々な自己免疫疾患患者において疾患活動性と関連することが示唆された。

ベーチェット病、関節リウマチ、クローン病患者血清中の LRG 濃度と CRP 濃度の相関関係を調べた結果、LRG は CRP と正の相関関係を示した。しかしながら、LRG は IL-6 との間には相関関係が認められず、LRG は炎症時に発現が認められるが、CRP とは異なる機序で発現が制御されていることが示唆された。次に、関節リウマチ患者において、血中 LRG が関節リウマチの活動性スコアと相関するか調べるために、血清中の LRG 濃度と関節リウマチ患者の疾患活動性スコア(DAS28-CRP)との相関関係を解析した。その結果、血中 LRG 濃度は DAS28-CRP と正の相関を示し、CRP よりも優れた相関関係を示したことから、関節リウマチの新たな疾患活動性マーカーとしての有用性が明らかとなった。血中 LRG 濃度が関節リウマチ以外の自己免疫疾患において活動性マーカーとしての有用性を調べるため、クローン病の活動性スコア(CDAI)との相関関係を解析した。その結果、CRP は CDAI と相関関係を示さなかったが、LRG 濃度は CDAI と相関関係を示した。従って、LRG はクローン病においても疾患活動性マーカーとしての有用性が示された。

クローン病患者において、CRP 値が正常値(CRP<0.2)でありながら、疾患活動性の高い(CDAI 値>150)患者について、血中 LRG 濃度を調べた結果、多くの患者において LRG 濃度が高値を示したことから、血中 LRG 濃度は CRP では検出できない疾患活動性の高い患者を検出することも可能と考えられた。クローン病患者において infliximab 治療有効例、無効例それぞれ 6 例ずつについて、infliximab 治療前の患者血清中の LRG 濃度を測定した結果、LRG 濃度は

infiximab 治療有効例に比べ、無効例で高値を示したことから、血中 LRG 濃度は infiximab 治療奏功性予測マーカーとしての有用性が示唆された。

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

われわれは完全長ヒト cDNA ライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行ってリコンビナントタンパク質を作製し、次にこれを液相等電点電気泳動 (OFFGEL システム) で分画した後、リテンションタイムマーカーと共に逆相クロマトグラフィーにかけて、各タンパク質に対する PTP (Proteotypic Peptide) を LC-MS/MS によって決定した。この事前情報に基づき、試料とリコンビナントタンパク質を mTRAQ ラベルして MRM の transition を組み、MRM で得られたクロマトグラムを基に各タンパク質の絶対定量を行った。

本来 MRM 法は特定タンパク質の定量に効力を発揮するものの、多くの試料の同時測定には不向きと考えられてきた。それは MRM 解析の際に、内部標準となる濃度既知の対照が必要だからである。そこでわれわれは全てのヒトタンパク質を試験管内合成すれば、基本的に全てのタンパク質の絶対量を MRM 法によって知ることができると考えた。そのため今年度は完全長ヒト cDNA ライブラリーよりロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行ってリコンビナントタンパク質を作製し、それを用いて大規模 MRM 解析が可能であることを実証した。今後、複雑な試料へ対応を想定した装置の開発やアプリケーションの開発によって MRM 法が実用レベル (現時点でもある意味実用レベルではあるが、プロテオーム解析での真の実用化を意味する) に到達した際には、基礎生命科学はもとより臨床医学における診断や予後判定等に利用され、タンパク質に関する研究法にパラダイムシフトが起きることは必至であろう。われわれは、プロテオーム解析における MRM 法を実用化するために、前処理法の開発やイオン源の改良などを日々行っており、必ず近い将来 MRM 法をベースとしたディープ・プロテオーム解析が可能になると信じている。

C, D-5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：平野 久

(1) 分析技術の検討 (iTRAQ 法と非標識法による疾患関連タンパク質の検出)

iTRAQ 試薬を用いた標識法による分析では 548 個のタンパク質を、Progenesis LC-MS を用いた非標識法による分析では 1,642 個のタンパク質が検出された。両方の方法で共通して検出されたタンパク質は 305 個であった。また、243 タンパク質は iTRAQ 法でのみ、1,337 タンパク質は Progenesis でのみ検出された。

今回の解析で、標識法と非標識法間で共通して検出できるタンパク質数は予想以上に少ないことがわかった。これらの方法では、試料タンパク質の分画方法が異なると共に、同じ LTQ Orbitrap Velos でもペプチド解離方法が異なる。また、iTRAQ 法では、iTRAQ 試薬がペプチドに結合しており、これが Progenesis 法とは異なっている。これらの違いから、両方法によって共通して検出されるタンパク質の数が少ないのではないかと考えられる。LTQ Orbitrap Velos の性能を最大限発揮させ、網羅的にタンパク質を検出するためには、両方の方法を利用することが望ましい。

(2) 卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現解析

OVISE、OVTOKO、MCAS における ANX4 の発現量をウエスタンブロット法により比較したところ、ANX4 の発現量は CCA 由来の OVISE、OVTOKO にて増加していることが確認された。さらに、リアルタイム RT-PCR により mRNA レベルでも同様の結果が得られていることから、ANX4 の発現は転写レベルで制御されていると考えられた。

CCA 細胞株および非 CCA 細胞株における ANX4 遺伝子の 5' 非翻訳領域を 5' RACE 法を用いて解析した結果、CCA および非 CCA 細胞株に発現している ANX4 遺伝子については、同じ転写開始点が使われていることが明らかになった。そこで、CCA 細胞特異的な ANX4 遺伝子の発現制御機構を解析するため、転写開始点 (+1) の上流約 1.5 kb から下流 1 kb までの領域を用いてプロモーターアッセイを行った。その結果、ANX4 遺伝子の転写活性は非 CCA 細胞と比べて CCA 細胞において非常に高い値を示すことがわ

かった。様々な ANX4 プロモーター領域の変異体や欠損体を用いた解析から、ANX4 遺伝子上の第 1 イントロン内に存在する+180 領域には転写因子 p53 の認識配列が存在しており、本領域を欠損もしくは変異導入することで、CCA 細胞では転写活性の著しい低下が認められたが、非 CCA 細胞では変化は見られなかった。p53 に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降アッセイを行ったところ、CCA 細胞においてのみ+180 領域を含む DNA 断片が PCR で検出されたため、CCA 細胞において p53 が本領域に結合していることがわかった。次に RNA 干渉法により p53 の発現を抑制すると CCA 細胞においてのみ ANX4 遺伝子のプロモーター活性および ANX4 の mRNA の発現量が低下したため、p53 は ANX4 の発現を制御していることが明らかになった。

本研究で使用した卵巣がん細胞株に対し p53 遺伝子の変異の有無を調べたところ、すべての非 CCA 細胞株では p53 遺伝子の変異が検出されたのに対し、CCA 細胞株では p53 遺伝子の変異は全く検出されなかった。ウエスタンブロット解析の結果、CCA 細胞株における p53 レベルは非 CCA 細胞株に比べて低かった。p53 標的遺伝子である MDM2、p21 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により測定した結果、非 CCA 細胞に比べ CCA 細胞でこれらの遺伝子の発現が上昇している傾向が見られた。また、野生型 p53 を持つが ANX4 の発現量が低い HEK293 細胞および LNCaP 細胞でも MDM2、p21 の mRNA 発現量は CCA に比べ低く、ANX4 の発現量と p53 機能的状態の間に相関が見られた。

HEK293 細胞に p53 の発現プラスミドを導入すると ANX4 遺伝子のプロモーター活性および ANX4 mRNA の発現量が上昇した。さらにマイトマイシン C やニュートリン 3 で処理を行った LNCaP 細胞では p53 の活性化とともに ANX4 の発現レベルの上昇を確認することができた。この結果は、ANX4 の発現には p53 の機能的状態が重要であることを示している。

ANX4 の発現量が高いことは CCA の特徴である。このことは CCA におけるユニークな分子機構により ANX4 の発現が制御されている可能性を示唆する。しかし、これまで ANX4 遺伝子の発現制御機構については、CCA に限らず明らか

にされていなかった。本研究では、ANX4 遺伝子の CCA 特異的な発現に重要な p53 結合領域を同定した。siRNA を用いて p53 の発現を抑制すると CCA における ANX4 遺伝子の転写が抑制された。また、本研究で用いたすべての CCA 細胞株においては、p53 遺伝子には変異が認められず、p21、MDM2 などの p53 標的遺伝子の発現量が他の細胞株に比べて高かった。さらに ANX4 の発現が微弱な非 CCA 細胞株に野生型 p53 を強制発現または活性化させると ANX4 の発現上昇が確認された。以上のことから、CCA において ANX4 を発現上昇させている転写因子の一つが p53 であると考えられた。

CCA 細胞が特徴的に ANX4 を発現していることから、ANX4 は CCA の高い薬剤耐性やがんの進展などの性質に関与している可能性が推測されていた。しかし、ANX4 遺伝子は CCA においてがん抑制遺伝子として知られている p53 により直接的に制御されていた。一般的に、p53 は DNA 傷害などの様々なストレスに応答し、多くの遺伝子発現を制御することで細胞のがん化を抑制している。実際に、様々な組織の進行がんにおいては、p53 遺伝子の変異が高い頻度で検出される。ところが、本研究で用いたすべての CCA 細胞株では p53 遺伝子に変異は認められなかった。野生型 p53 を過剰発現させた細胞では p21 や ANX4 の転写が上昇していたが、変異型 p53 では変化が見られなかった。従って、野生型 p53 の機能的状態が ANX4 の発現を左右していると考えられた。実際に HEK293 細胞や LNCaP 細胞は野生型 p53 を持つが、これらの細胞においては、p21、MDM2 の mRNA レベルが低いことから p53 は活性化していないと考えられ、ANX4 の発現も同様に非常に低いことが本研究の結果により示された。

CCA は卵巣がんの標準的化学療法であるパクリタキセル-シスプラチン併用療法に対し感受性が低いため、他の組織型に比べて予後不良である。また、CCA において p53 遺伝子の変異は稀である。いくつかの研究グループが卵巣がんにおける変異型 p53 の存在と化学療法との関連性を評価しており、Lavarino *et al.* (2000)、Ueno *et al.* (2006) は、野生型 p53 を持つ卵巣がん患者は変異型 p53 を持つ卵巣がん患者よりもパクリタキセル-シスプラチン併用療法に対する反応性が

低いことを見いだしている。また、ANX4 は抗がん剤耐性に関わっていることを示す報告もある (Han *et al.* 2000、Kim *et al.* 2009)。以上のことから p53 による ANX4 の発現が CCA 細胞の薬剤感受性の低下を引き起こしていることが考えられた。

C, D-6. 2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究：尾野雅哉

(1) 施設間での解析結果の比較

国立がん研究センターでは、検出ピークは 23,640 個、選抜マーカー候補は健常者腎癌群間で $TTEST < 0.005$ 、 $iScore > 25$ 、 $Expect < 0.05$ の条件で 18 ピーク 3 タンパク質であったが、 $TTEST < 0.005$ を満たしながらタンパク質同定ができなかったピークが 194 ピークあった。それに対しプロテオームリサーチセンターでは、検出ピークは 25,013 個、選抜マーカー候補は健常者腎癌群間で $TTEST < 0.005$ 、 $iScore > 25$ 、 $Expect < 0.05$ の条件で 27 ピーク 8 タンパク質であったが、 $TTEST < 0.005$ を満たしながらタンパク質同定ができなかったピークが 222 ピークあった。国立がん研究センターのデータと比較し、候補ピークはほぼ同数であったが、候補ピークの同定は PRC の方が優れていた。また、同定されたピークを比較すると、PRC のピークの方の質が良かった。未同定ピークに関しては標的 MSMS を行ったが、参照データとの時間のずれがあり、十分な同定が行えなかった。

(2) 腎癌血漿バイオマーカーの開発

腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例の 2DICAL 解析で腎癌患者において有意に上昇しているタンパク質 (Protein A) を発見した。Protein A に対する特異抗体が存在したので Western Blot でその血中濃度が腎癌患者において上昇していることを確認し、さらに、AlphaLISA (パーキンエルマー社) を用い腎癌患者血漿 77 例、健常者血漿 130 例、前立腺癌患者血漿 20 例の Protein A の血中濃度を測定し、腎癌患者で優位に上昇していることを確認した。

(3) 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

前立腺癌血漿 27 例、健常者血漿 23 例での 2DICAL 解析で、あるタンパク質 (Protein X) が前立腺癌患者において有意に上昇していることを発見した。ELISA を用い、このタンパク質を前立腺癌患者血漿 54 例、健常者血漿 81 例、前

立腺癌患者血漿 7 例、前立腺肥大症患者 23 例で測定し、PSA 値のグレーゾーン (4-10 ng/ml) を示す前立腺癌患者血漿で高値を示した。前立腺癌診断において PSA 値を補完する新規バイオマーカーである可能性が示唆された。

(4) 2DICAL のバージョンアップ

2DICAL のバージョンアップにより、旧バージョンではピークのテーリング部、同位体を別ピークとみなし、同一ペプチドに対して複数ピークとして扱われる場合があったが、新バージョンではそれらのピークが一つにまとめられ、目視での再確認が基本的に不要となった。

2DICAL での解析がプロテオームリサーチセンターでも可能となり、新規の質量分析計での測定により、今まで未同定であったタンパク質の同定が可能であることが証明された。また、プロテオームリサーチセンターでの倫理審査が進展し、プロテオームリサーチセンターでのバイオマーカー探索が多くの臨床材料を用いて行えるようになった。また、昨年度から継続の腎癌血漿バイオマーカーの開発は論文発表の段階まで到達し、本年度からは前立腺癌血漿バイオマーカー探索を開始しバイオマーカー候補を選定した。

2DICAL のバージョンアップにより、多くの臨床検体を効率よく解析できるようになったため、腎癌、前立腺癌で行った探索方法と同様に、多くの疾患のバイオマーカー開発が期待され、また、多数検体によるバイオマーカーの検証が進められることも今後期待できる。

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

(1) 血漿試料を用いた前処理法の検討：昨年度までの研究により、血漿試料は凍結融解のみならず、各種アフィニティーカラム、限外ろ過ユニットなどの処理器材 (樹脂やカラム、膜など) との接触により凝固系、補体系プロテアーゼが活性化されてペプチド画分が増加し、その制御は通常のプロテアーゼインヒビター混合物では困難であることが判明している。そこで単純に逆相カラムで血漿試料を速やかに濃縮した試料、凍結融解後に同処理をした試料をゲルろ過 HPLC 分離し、各画分について質量分析を行った。その結果、凍結融解試料においてペプチド画分量が増加し、相対的には低分子量のペプチド画分 (<5KDa) がより顕著に増加し、低分子量たんぱく質画分

(10-20KDa)では増加率は少なかった。また、逆相カラムで迅速処理した試料重量は、低分子量ほど少なく高分子量側に移行するほど増加していた。

(2) 培養内分泌系細胞株及び初代培養心筋細胞の培養上清中のペプチド解析: 血漿試料を出発材料として、変化・変動する微量たんぱく質、ペプチドを見出すことは非常に困難である。問題を回避する方法として、培養細胞の産生、分泌するたんぱく質、ペプチドを包括的に同定し、病態生理的な変化・変動を解析して候補ペプチドやたんぱく質を見出す方法の開発を開始した。最終的には、候補物質の変動を循環器疾患患者血液などで解析、測定し、循環器疾患関連バイオマーカーを探査する計画である。

昨年度までの研究で、刺激による分泌誘導により効率的なペプチドの回収、分析が可能であったTT細胞を対象とし、豊富に産生・分泌されるVGFたんぱく質に注目して解析を進めた結果、同たんぱく質に由来する300以上のペプチド(重複を除く)を同定することができた。その結果に基づき、615残基からなる前駆体たんぱく質が約15箇所ですべて一次切断を受け、最終的に約15種のペプチドが生成すると推定できた。既にVGFたんぱく質のC末端部と中央部の特異的切断部位を認識する抗体を調製しており、これら2種の抗体を用いたWestern blot解析を行った結果、ラット脳及び消化管ではTT細胞と同じ部位で切断を受けることが確認された。つまり、ヒト培養細胞とラット組織を問わず、VGFたんぱく質はプロテアーゼにより同じ一次切断を受け、この切断部位が上記のペプチド解析法により同定できることが明らかとなった。

循環器系組織構成細胞として、ラット心筋細胞を用いて検討を行った。この細胞では刺激により分泌ペプチド、たんぱく質量は増加しないため、収集時間を延長して回収し、ペプチド画分について分析を行った。おそらく心筋細胞が徐々に壊死するため、心筋線維、細胞骨格、エネルギー代謝系などのたんぱく質断片ペプチドが多数に観測された。ペプチドとしてはANP前駆体由来ペプチドが最も多く観測され、集中的に解析した結果、主要な血中循環分子で活性型ペプチドである α -ANPが培養上清中でも最も多数観測された。次にシグナルペプチド直後の前駆体N末端を共有

するペプチドが多数観測され、前駆体からシグナルペプチドが切断除去された後、28残基の α -ANPがArg98-Ser99間の切断により生成する既知のプロセシング機序が、培養細胞上清でも確認された。続いて α -ANP構造内で切断を受けたペプチド群が同定され、その中ではCys105-Phe106が主要な切断部位であり、Arg101-Arg102、Ser123-Phe124、Arg112-Ile113での切断も認められた。これらの結果より、同定されたペプチドは少なくとも細胞での一次切断部位、あるいは主たる分解経路での切断部位を保持していると推定された。

(3) 初代培養細胞上清中の高分子量ペプチドの解析: 高分子量(>5KDa)のペプチド解析には、初代培養心臓線維芽細胞上清中のペプチド、たんぱく質を濃縮後、ゲルろ過HPLCで分離して使用した。心臓線維芽細胞の培養上清においても、低分子量画分からたんぱく質画分へ移行するに従って量的な増加が認められた。通常のプロテオーム解析では、たんぱく質や高分子量のペプチドは、酵素消化により分子量2,500Da以下のペプチドとし、特定配列で切断されることを前提に同定されるため、同定効率は高い。しかし、生体内に存在するペプチドを酵素消化なくそのままの形で同定することは、分子量増大に伴うイオン化効率の低下、不特定配列の切断により生成する類似分子量のペプチド数の増加により困難となり、同定効率が低下する。この問題を克服するためには、高精度で高分解能の質量分析スペクトル、情報量の多いタンデム質量分析(MS/MS)スペクトルの入手が必須である。ゲルろ過HPLCで分画した各画分についてナノLCで分離後、MS/MSを行った結果、CID法ではペプチド結合部で主に開裂するが、開裂が不均一に起こる場合が多く、ペプチド同定効率を低下させる主因となっていた。一方、ETD法では情報量の豊富なMS/MSスペクトルが得られる場合が多く、両者の併用により同定効率が向上できることが確認された。両開裂法を用いて、心臓線維芽細胞の培養上清中の高分子量ペプチドの解析を進めた結果、分子量が12,000Daを超えるペプチド前駆体や細胞外マトリックスたんぱく質断片なども同定することができた。同定された5KDa以上のペプチドの中には、生体内での存在が推定されているペプチド分子も認められた。

(4) イヌ心不全モデルの作成と試料収集：ペーシング群（4週及び6週）と対照群及び偽手術群について、手術前の0週(10)、4週後(2)、6週後(5)について心行動態の測定を行った。左室駆出率は0週の79%から4週の36%、6週の25%へと顕著に低下し、肺動脈喫入圧や平均肺動脈圧も2.7倍、2.0倍の増加し、典型的な頻脈性心不全モデルの形成が確認された。これらの動物より採取した試料について、現在、医薬基盤研究所内のプロテオーム研究センター及び国立循環器病研究センター研究所にて、2DICAL法などを用いて網羅的なたんぱく質の発現解析を実施している。

昨年度までの研究により、血液試料では処理方法の如何を問わず凝固系、補体系などのプロテアーゼの活性化が避けられず、バイオマーカーとして使用頻度の高い低分子量たんぱく質やペプチドを循環血液中と同じ状態に取り出すことは困難と考えられた。プロテアーゼインヒビター混合物の添加はたんぱく質分解をある程度抑制できたが、抜本的な解決には至らなかった。一方、従来は困難であった分子量の大きいペプチドや低分子量たんぱく質が、質量分析法での構造解析の対象となり始めた。そこで、量的な比率と見掛け上の安定性について検討したところ、血液のみならず培養細胞の上清においても、ペプチド量は分子量が大きくなるにつれて増加することが確認された。低分子量ペプチドは特にプロテアーゼの作用により著増するため、高分子量ペプチドから低分子量たんぱく質の領域が、バイオマーカー標的として有望となる可能性が示唆された。

甲状腺髄様癌由来細胞株であるTT細胞が豊富に産生・分泌するVGFたんぱく質を対象に解析を行った結果、前駆体分子の全領域をほぼカバーするペプチドが得られた。これらのペプチド配列と前駆体たんぱく質の配列比較より、約15ヶ所で特異的な切断を受け、最終的に約15種のペプチドが生成することが判明した。これらのペプチドはかなりの割合で、プロテアーゼによる一次切断を受けた後にエクソペプチダーゼによりN末端あるいはC末端より消化を受けているが、ペプチドの配列集合化によりプロテアーゼの一次切断部位が十分に予測可能であった。更に、TT細胞で観測された切断部位とラット脳、消化管での切断部位が一致することが確認され、培養

細胞での分泌ペプチドやたんぱく質の結果がそのまま生体内の細胞や組織、血液中の存在状態の推測へと展開できることが示され、細胞レベルからのバイオマーカー探索法が十分な論理的根拠を持つことが示された。実在の甲状腺髄様癌等においてVGFたんぱく質が豊富に産生されれば、本研究で同定したペプチド群の血中濃度測定に意義がある可能性もある。

循環器系組織構成細胞の例として取り上げたラット心筋細胞は、細胞の脆弱性のために心筋線維などの構成たんぱく質の断片ペプチドが多数に観測され、研究対象としては不適と考えられた。しかし、多数観測されたANP前駆体由来ペプチドについて同定ペプチド群と前駆体たんぱく質配列と比較すると、前駆体からシグナルペプチドが切断除去され、28残基の α -ANPが生成する既知のプロセシング機序が明確に示された。 α -ANPより量的に少ないペプチドの同定を進めた結果、二次的なエクソペプチダーゼ消化を受けているものの、幾つかの主要ペプチドと切断部位が同定された。最も多く観測されたCys105-Phe106の切断は、Endopeptidase 24.11が責任プロテアーゼであることが証明されており、 α -ANPの主要分解経路であることが報告されている。その他のArg101-Arg102, Ser123-Phe124, Arg112-Ile113の切断も、 α -ANPの分解的切断として報告されており、培養細胞により放出されたプロテアーゼがこれらの分解を司り、本実験で観測されたと考えられる。培養細胞系を用いてANP前駆体たんぱく質から活性型ペプチドホルモンの α -ANPの生成、さらに α -ANPの主要分解ペプチドが同定された事実は、培養細胞を基盤とするバイオマーカー探索法の有用性が確認されたと考えられる。

バイオマーカー探索上、高分子量ペプチド画分が有望と考えられたので、初代心臓線維芽細胞の培養上清中のペプチド、たんぱく質の解析を試みた。生体内に存在するペプチドを酵素消化なくそのままの分子として同定することは困難であるが、通常のプロテオーム解析法で酵素消化を行うと元の分子型が推定できないため、バイオマーカー候補の探索上は意味を持たない。高精度で高分解能の質量分析計と、CID法とETD法の2種類の開裂法を併用することにより、分子量5kDa以上のペプチドの同定効率を上昇させることが

できた。特に分子量が 12,000Da を超える低分子量たんぱく質まで同定可能とできた意義は大きい。この分子量領域のペプチドや分子量たんぱく質がバイオマーカーとなる可能性が上昇しているため、今後さらに同定効率の向上を目指したい。

イヌ心不全モデルについては、心行動態の測定結果等より順調に作成でき、組織、血液試料の収集を行うことができた。当センターの共同研究者は、心不全患者や動物モデルの心筋組織のトランスクリプトーム解析を実施してきており、過去の解析データとの比較解析を行うとともに、本研究試料についても必要に応じてトランスクリプトーム解析を行い、たんぱく質量、mRNA 量と心行動態パラメータなどの比較解析を行うことにより、また心筋細胞などの分泌ペプチドやたんぱく質の解析結果と総合することにより、新たなバイオマーカーの発見を目指したい。

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

(1) 購入髄液を標準として使用

各測定で 250~350 のタンパク質を同定できた。パーキンソン病患者 5 名のプール髄液の解析では、多くのタンパクで変動が見られた。また、一人のパーキンソン病患者髄液解析でも多くのタンパクで変動が認められた。しかし、この両者の結果を再度割り算することで、購入髄液の影響をできるだけ除くことが可能になり、実際タンパクのばらつきは小さくなった。

(2) 髄液採取後の室温保存の影響

髄液採取後の室温放置時間によって、量が上昇したタンパク群、量が減少したタンパク群があり、24 時間放置で検出ができなくなったタンパク群も存在した。さらに、神経特異的なタンパク質である TUJ1, pY100 やシグナル伝達物質である AKT, Fyn についてウェスタンブロットを行い、3 時間、24 時間と室温放置する時間に応じてタンパク量が減少することを確認した。

正常対照の髄液を常に保有し、各測定の際に標準として用いる事は不可能である。そのために、米国 Vital 社から検査後残余髄液を購入してプールし、約 100 回分の測定に供する量を確保した。これをプール患者髄液や個々の患者髄液の測定の際に標準として用いたところ、250~340 のタンパクを同定できたもののばらつきが大きかつ

た。しかしながら、測定値を再度割り算することで、購入プール髄液の影響をできる限り除外でき、実際にタンパク量のばらつきは小さくなった。この方法で、患者髄液と正常人髄液の測定値を比較できると考える。髄液の採取後に、凍結までの時間によってタンパクの量が増加するもの、減少するものを知ることは、今後の測定値の解析に有用である。場合によっては、過去に保存されていた髄液検体を研究利用する道も開ける可能性がある。採取直後に氷冷して運搬し、遠心後直ちに -80°C に保存した場合に比べて、3 時間の室温放置、24 時間の室温放置で増加したり、減少したり、さらには 24 時間放置後には検出ができなくなるタンパク質群を知ることができた。これらの情報は今後、各疾患患者髄液を用いた解析結果の解釈に重要な情報となる。

C, D-9. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索：加藤菊也

3,000 以上のクローンを ELISA にてスクリーニングし、31 種類の陽性クローンが得られた。6 種類が IgM で 25 種類が IgG であった。これらのクローンは、ST1H の異性体である SLe^x や SLe^a は認識しなかった。ELISA のほかに免疫組織化学を用いて、これらのクローンをさらに検討した。サンプルには、ST1H の発現が確認されているルイス型陰性の大腸癌組織、正常大腸組織、さらに、ST1H の発現が確認されなかったルイス陽性の大腸癌組織を用いた。これらの凍結切片を作成し、31 種類のハイブリドーマの上清と反応させ、通常の ABC 法にて発色させた。その結果、2 種類のクローン(2C10 (IgM), 23D11 (IgM))が、免疫組織化学にも適応可能であることが示唆された。すなわち、この 2 種類のクローンの染色パターンは、ルイス型陰性の大腸癌細胞は陽性であるものの、ルイス型陰性の正常粘膜大腸組織およびルイス陽性の大腸癌組織では陽性シグナルを認めなかった。さらに、免疫陽性シグナルは、ST1H 抗原との preincubation で完全に消失した。そこで今後の研究には、この 2 種類のクローンをを用いることとした。この 2 種類のハイブリドーマ 2 x 10⁶ をマウスの腹腔内に投与し、腹水を回収後、抗体を精製し、2 mg を超える単クローン抗体が得られた。

ST1H は、DU-PAN-2 と同様に、Lewis 陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。さらに、ST1H は DU-PAN-2 とは異なる経路で

合成されると考えられたため、DU-PAN-2 との相乗効果が期待できる。そこで今年度は、ST1H の腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性を検討するために、ST1H を特異的に認識する単クローン抗体の作成を行った。その結果、ST1H を免疫したマウスを用いてハイブリドーマを作成し、ELISA および免疫組織化学的手法を用いて、ST1H を特異的に認識すると考えられるハイブリドーマを 2 種類(2C10, IgM, 23D11, IgM)作成することができた。両クローンは ELISA で ST1H を特異的に認識するとともに、免疫組織染色においても、ルイス型陰性の大腸癌細胞を特異的に染色した。今後は、両クローンの特異性をさらに検討するとともに、血清診断に向けて、サンドイッチ法などを用いた ELISA の系を構築する必要がある。

C, D-10. 血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究：野村文夫

DS 法により得られたペプチド抽出物は、従来法である有機溶媒沈殿法、限外濾過法および未処理血清に比し、低分子量蛋白質やペプチドの抽出効率が良好であり、高存在量の 4 つのペプチドの抽出効率の定量的比較においても DS 法が最も優れていた。本法で最も期待されるのはアルブミンやグロブリンなどのいわゆる abundant proteins と結合している低分子量蛋白質やペプチドを回収できることである。

そこで同一血清 10 μ l 中のペプチドを 3 種類のペプチド抽出法およびアルブミン/IgG 除去法により処理したのちに分析した。RP-HPLC の分画を MALDI-TOF MS により解析するとアルブミン/IgG 除去法では検出されていないピークが多数検出できていることが確認された。この方法をマーカー探索に用いる場合はその再現性が優れていることが求められる。その点を確認するために各ステップ、すなわち DS 法によるペプチド抽出、RP-HPLC、MALDI-TOF MS のいずれにおいて同時再現性は良好であることが確認された。今後は本法を血清・血漿を用いたマーカー探索、とくにペプチドマーカー探索に応用していく予定である。

C, D-11. 融合プロテオミクスによる脳神経系腫瘍病態に関わる癌幹細胞関連分子群の解析：荒木令江

1) グリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群

のプロファイリング解析

Glioma 患者の腫瘍組織から、特殊培養条件にて、神経幹細胞に特徴的な Sphere を形成する幹細胞様クローンを分離した。既知の神経系幹細胞、およびグリオーマ細胞マーカー分子群の発現変動を解析するとともに、マウス頭蓋内への同所性移植によって、腫瘍形成能を評価した。現在、11 人のグリオーマ患者組織より、9 クローンの分離に成功し、今回は、その中で特に長期にわたって培養可能で、マウス頭蓋内移植によりグリオーマを発症する 2 クローン GSC03A および 03U を解析に用いた。血清添加によって分化誘導後、タンパク質と mRNA を抽出し、2D-DIGE 法、iTRAQ 法、DNA Microarray により発現解析を行い、解析データは、我々が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、GO 解析、クラスター解析、パスウェイ解析によって、特異的変動分子群を抽出した。

2D-DIGE 法による解析結果：2 つのクローンの分化誘導におけるタンパクの発現変動数の平均は、血清添加による分化誘導 2 日後で 851 と 1,165、7 日後で 935 と 1,228 であり、分化 2 日後よりも 7 日後の方が多くの分子群が発現変動していることが判明した。この変動データを 2way ANOVA 統計解析したところ、分化誘導で発現変動の有意差を示したスポットは 627、このうち、分化誘導にて有意差を示したスポットは 139、培養時間で有意差を示したのは 63、この 2 つの要因に相関を示したスポットは 60 であった。アストロサイトマーカー GFAP は分化誘導で発現増加が顕著であり、ニューロンマーカー Tuj1 は発現の変動は認められなかったが、両者とも翻訳後修飾を受けた複数のスポットが検出されたことから、これらの分子に GSC 内でリン酸化等やタンパク質分解等の翻訳後修飾が起こっていることが考えられた。一方、神経幹細胞マーカー CD133 と Sox2 は、分化誘導によって発現低下していた。

iTRAQ 法による解析結果：iTRAQ では約 5,600 個のタンパクを同定し、そのうち定量的に有意な 4,191 個を解析に用いた。Sphere 2 日後のデータを基準として発現変動したタンパク数は 2 日後で 830 個、7 日後で 1,063 個であり、

2D-DIGEの結果と同様に分化誘導7日目の方が多くの分子群の発現変動が見られた。2日後7日後共通に変動した分子数は408であった。iPEACHによるクラスター解析にはこの共通変動分子群のリストを用いた。

DNA microarray法による解析結果：ヒト55,000個のDNAプローブに対し、そのうち定量的に有意な20,752分子を対象に解析を行った。Sphere 2日後のデータを基準として発現変動したタンパク数は2日後で2,883個、7日後で1,805個であり、mRNAはタンパクの結果と異なり、分化誘導2日後の方が多くの分子群の発現変動が見られた。これはmRNAとタンパク発現の間にタイムラグがあるためと考えられる。2日後7日後共通に変動した分子数は583であった。iPEACHによるクラスター解析にはこの共通変動分子群のリストを用いた。以上のiTRAQ法とDNA Arrayのデータからクローン間で共通に変動した1458個の分子について、データを統合マイニングし、クラスター解析を行った。

分化誘導によって、発現変動が特徴的であったクラスターを抽出し、GO解析を行った結果、発現抑制される分子群が2クラスター抽出され、ErbB2、c-Myc、RBE2F関連分子等を含む細胞周期促進因子群、翻訳制御、細胞内輸送、タンパク合成関連分子群が、また、分化誘導によって発現が亢進する分子群は、GFAP、CD44、TGF- β ファミリー蛋白質、そのレセプター群、SMADファミリー蛋白質群を含む、神経発生・分化制御、細胞死抑制、細胞運動関連分子であることが判明した。GSC様クローンの血清添加による分化で変動した同定分子群の検証をおこなうため、免疫細胞染色とウエスタンブローディングを行った。その結果、神経幹細胞マーカーのCD133、Sox2の発現が分化によって減少していることから、我々のクローンは神経幹細胞様の性質を持っているが、同様のマーカーであるNestinは変動しないこと、また、分化誘導するとアストロサイトマーカーのGFAP、オリゴデンドロサイトマーカーで悪性グリオーマ高発現分子であるCD44の発現が誘導されることから、グリオーマ細胞への分化能を有していることがわかった。また、ニューロンマーカーTuj1とアストロサイトマーカーGFAPでは、それぞれ複数のスポットが検出され、これらの分子にGSC内でリン酸化等の翻訳後修

飾やタンパク質分解などが起こっていることが判明した。

2) 神経系幹細胞分化異常による神経系腫瘍形成と悪性化に関わる分子群の解析

神経系腫瘍病態モデル細胞として、神経系幹細胞PC12細胞のNF1遺伝子発現抑制細胞を用いた。PC12細胞は、NGF(神経成長因子)刺激により、ニューライトを伸長させて神経細胞様に分化することから、神経細胞の分化モデルとして様々な研究に用いられている。一方、NF1遺伝子は、神経系細胞内では増殖や分化、細胞死などの細胞内シグナルの重要な調節を司るRasの活性化を制御している腫瘍抑制遺伝子である。NF1タンパク質neurofibrominはRASのGAPとして機能し、NF1欠損によるRasを介した細胞内シグナル伝達異常は、神経系細胞の増殖と分化異常を誘発し、悪性グリオーマやMPNST発生のトリガーとなっていると考えられている。NF1病態である多発性神経線維腫形成、神経性分化異常、神経系腫瘍悪性化における分子メカニズムと治療ターゲットを明らかにすることを目的としてNF1遺伝子発現抑制NF1病態モデル細胞を確立し、特異的シグナル分子群を融合プロテオミクスを用いて解析した。

PC12細胞において、NF1をノックダウンした細胞(NFKDPC12)は、コントロール細胞と比べて、ニューライトの伸長が抑制されるという表現型を有す。PC12細胞を用い、上記の融合プロテオミクスを使って、現在までに約1,600種の神経系PC12細胞内発現蛋白質を同定し、その内、NGF刺激によって神経分化の際に特異的な発現差異を示す72種の蛋白質を同定した。これらには既知のNGF誘導分子のみならず、新規の分子群が含まれており、これらの機能解析と細胞生物学的検証を行うことによって、神経系細胞分化と細胞死抑制に関わる新規機能分子群であることが判明した(Kobayashi *et al.* Mol. Cell. Proteomics 2009)。さらに神経線維腫症一型腫瘍抑制遺伝子NF1の発現抑制により、NGFで刺激したNFKDPC12内で特異的に発現が変動する38種の蛋白質を確認した。DNA micro arrayと2D-DIGE法を行い、NF1の欠損の結果生じるPC12細胞内変動mRNAとタンパク質群の網羅的発現解析を行った。統計学的解析を行った結果、NF1発現抑制によりmRNAは352分子、タン

パク質では 153spot を経時的に有意な変動分子として同定した。クラスター解析によって、類似した発現パターンを抽出したところ、mRNA は 11 個、タンパク質は 5 個の特徴あるクラスターに分類することができた。特徴ある各クラスターについて GO 解析を行い、変動する分子群の機能を特徴づけた。NF1 発現抑制により増加傾向分子群として、mRNA とタンパク質発現が共通に制御されているものとして、防御反応、外胚葉系組織形成、細胞運動性、細胞接着制御、アポトーシスの調節、神経発生・分化、微小管関連小胞輸送関連分子群がリストアップされた。特に神経分化に関わる分子ネットワーク中に新規 mTOR 経路の調節因子である Protein T が含まれておりこれに注目した。Protein T は酵母からヒトにいたるまで、真核生物種間で構造および機能面において高度に保存されており、多彩な機能を示す蛋白質であるが、特にアポトーシス抑制、蛋白質合成、細胞分裂に関わる機能などの面から、腫瘍との関連性が示唆されている。そこで、腫瘍細胞内における NF1 遺伝子機能欠損が、Protein T の発現に及ぼす影響を解析した。

NF1 遺伝子発現抑制 Schwann 細胞(NFSY6) および NF 患者由来腫瘍細胞 Pt cell の Protein T の発現をウエスタンブロットイングおよび免疫染色により検討したところ正常 Schwann 細胞、NF 患者由来 fibroblasts に比較して、NFSY6 細胞および Pt cell とともに Protein T が有意に高発現していた。また、Protein T siRNA を処理した PT cell は、顕著な形態変化を示し、この形態は正常シュワン細胞の形態に酷似していた。また、細胞増殖能の低下も同時に認められた。さらに神経線維腫の中で最も悪性度が高い悪性末梢神経線維腫鞘 MPNST 細胞 sNF96.2 に Protein T siRNA を処理した場合も同様に顕著な形態変化および細胞生存能の低下が確認された。また、NF1 患者 neurofibroma および MPNST 組織における Protein T の発現を免疫組織化学的に観察したところ、neurofibroma の悪性化に従ってその MPNST では S100 の発現が 50%以下に低下していたが、特異的な Protein T の発現の増強が顕著に観察された。以上の結果より Protein T が神経線維腫の治療ターゲットとなることのみならず、NF1 欠損による細胞の悪性化の指標となる可能性が示唆された(特願

2011-071110)。

C, D-12. 肝細胞がんのバイオマーカー探索とチップ技術を用いた自己抗体による診断技術の開発：中村和行

(1) 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。

(2) 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、Cy3 で標識した抗 GFP 抗体を内部標準として Cy5 で標識した抗体ヒト IgG 抗体を用いてチップ上の HSP70C 特異自己抗体量を Cy3/Cy5 蛍光比で数値化した。さらに、熱処理過程を加えることによって、再現性の高い患者血清中の自己抗体が検出された。

今回、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、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

本年度は、同位体標識 iTRAQ 法、リン酸化タンパク質分析技術、膜タンパク質分析技術、血液、髄液などの体液や細胞培養液からの微量タンパク質検出技術、ファージ抗体ライブラリーを用いた抗体プロテオミクス技術、2D-DIGE 法、2DICAL 法、MRM 法、糖鎖構造解析技術、自己抗体解析技術、データ統合マイニング技術など、

昨年度確立した次世代プロテオミクス基盤技術を用いて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行った。その結果、大腸癌の eIF4H isoform 1、乳癌の EphA10、肝細胞癌患者血清中の HSP70、Mn-SOD、Peroxiredoxin 6 に対する自己抗体、ルイス型血液型陰性大腸癌、膵臓癌の ST1H、関節リウマチ活動性マーカーLRG、アルツハイマー病の早期診断マーカーペプチド APL1625, 27, 28 などの新規バイオマーカーの同定に成功した。また、バイオマーカー候補タンパク質の絞込みや検証を行うための SRM/MRM 法を確立し、複数のバイオマーカー候補タンパク質の検証をハイスループットに行える体制を整えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- Ritchie, S. A., Heath, D., Yamazaki, Y., Grimmalt, B., Kavianpour, A., Krenitsky, K., Elshoni, H., Takemasa, I., Miyake, M., Sekimoto, M., Monden, M., Tomonaga, T., Matsubara, H., Sogawa, K., Matsushita, K., Nomura, F. & Goodenowe, D.B. Reduction of novel circulating long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age. *BMC Gastroenterol.*, epub 10: 140 (2010), in press.
- Etchuuya, R., Ito, M., Kitano, S., Shigi, F., Sobue, R. & Maeda, S. Cell-to-cell transformation in *Escherichia coli*: a novel type of natural transformation involving cell-derived DNA and a putative promoting pheromone. *PLoS One* 6, e16355 (2011).
- 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* 128, 1018-1030 (2011).
- Kuga, T., Nozaki, N., Matsushita, K., Nomura, F. & Tomonaga, T. Phosphorylation statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 316, 2301-2312 (2010).
- Kawashima, Y., Fukutomi, T., Tomonaga, T., Takahashi, H., Nomura, F., Maeda, T. & Kodera, Y. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J. Proteome Res.* 9, 1694-1705 (2010).
- Sawai, S., Umemur, H., Mori, M., Satoh, M., Hayakawa, S., Kodera, Y., Tomonaga, T., Kuwabara, S. & Nomura, F. Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: Proteomic analysis. *J. Neuroimmunol.* 218, 112-115 (2010).
- Adachi, A., Okita, Y. & Adachi J. Efficiency of rice bran for removal of pesticides in artificial gastric fluid. *J. Health Sci.* 56, 88-91 (2010).
- Sasaki, K., Nishida, Y., Adachi, J., Okawa, K., Nakayama, A., Yoneda, M. & Morisawa, S. Proteomic analysis for the purpose of understanding the mechanisms of benzene and X-ray induced leukemia using human bone marrow cells. *J. Proteomics Bioinform.* 3, 66-73 (2010).
- Obata, Y., Fukumoto, Y., Nakayama, Y., Kuga, T., Dohmae, N. & Yamaguchi, N. The Lyn kinase C-lobe mediates Golgi export of Lyn through conformation-dependent ACSL3 association. *J. Cell Sci.* 123, 2649-2662 (2010).
- Miyazaki, K., Wakabayashi, M., Hara, Y. & Ishida, N. Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2. *Genes Cells* 15: 351-358 (2010).
- Maki, N., Suetsugu-Maki, R., Sano, S., Nakamura, K., Nishimura, O., Tarui, H., Del Rio-Tsonis, K., Ohsumi, K., Agata, K. & Tsonis, P. A. Oocyte-type linker histone