

織由来細胞株に分泌刺激を与え、培養細胞上清に分泌されるたんぱく質、ペプチドを分解を抑制して回収、分析する方法を開発してきた。この方法をさらに徹底して甲状腺髄様癌由来細胞株 TT に適用し、VGF たんぱく質についてペプチド解析を進めた。

次に、上記で開発した方法をラット新生仔由来の心筋細胞に適用し、ペプチド、たんぱく質の回収、解析を実施した。無血清培地で細胞を十分洗浄して血清成分を除去し、一定時間経過後に無血清培地に分泌されたペプチド、たんぱく質を逆相系カートリッジで回収し、ゲルろ過 HPLC 分離後のペプチド画分を LTQ Orbitrap XL ETD にて分析した。心筋細胞の低分子量 (<5KDa) のペプチド画分においては、心筋線維構成たんぱく質由来のペプチド群に加え、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) や脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体由来する数多くのペプチドが見出され、今年度の研究では ANP 前駆体由来するペプチドについて重点的に解析した。

3. 初代培養細胞上清中の大分子量ペプチドの解析：血漿中のペプチド画分と同様に、低分子量 (<5KDa) ペプチド画分は少なく、高分子量 (>5KDa) 画分へ移行するほどペプチド量は増加した。また、低分子量のたんぱく質画分は、ペプチド画分量を上回る量で存在すると推察された。分子量 5KDa 以上のペプチド画分の配列や構造が決定できればペプチドの実態把握が大きく進むと考え、従来の CID 法に加えて新しい開裂法である electron transfer dissociation (ETD) 法を用いて、ペプチド構造解析の可能性を検討した。

4. イヌ心不全モデルの作成と試料収集：昨年度作成した計画に従い、イヌのベージング心不全モデルを作成した。イヌはゲノム遺伝子配列が決定されている大動物で、心機能データを正確に収集できるとともに、ベージングにより純粋な頻脈性心不全を作成できる。さらに、継続的な追跡により、代償期から非代償期への変化も観察できるなど、心不全の良いモデル実験系である。右室ベージング 230 回/分で 4 週間ベージング(2)、6 週間ベージング(5)、及び対照群(1)、偽手術群(2)を作成し、0、4、6 週で心行動態を測定するとともに、左室心筋、血清を採取し

た。

(倫理面への配慮)

血液試料は第 1 期プロテオーム研究時に当センター倫理委員会で承認を受けて採取したもので、本研究での使用承認を受けると共に、20 年度に研究協力者の意思確認を行い、同意が得られた試料を使用した。動物実験については、当センター動物実験委員会の承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

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索する計画である。

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された。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、心筋繊維、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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -ANP が Arg98-Ser99 間の切断により生成する既知のプロセッシング機序が、培養細胞上清でも確認された。続いて  $\alpha$ -ANP 構造内で切断を受けたペプチド群が同定され、その中には 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 2500Da 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、同定効率が高い。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。ゲル過 HPLC で画分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 5 kDa 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：ページング群 (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、肺動脈楔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。

#### D. 考察

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で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 カ所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  $\alpha$ -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。 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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  $\alpha$ -ANP の生成、さらに  $\alpha$ -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状態で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。

## E. 結論

血液及び培養細胞上清の解析結果により、ペプチドの中では高分子量ペプチド画分の割合が高く、前駆体たんぱく質から生成した際の一次切断部位などを保持することが示された。これらの高分子量ペプチドや低分子量たんぱく質についても、新しい開裂法の導入により同定効率を上昇させることができた。一方、各種の培養細胞株、循環器系組織の初代培養細胞の培養細胞上清を対象としたペプチド解析により、同定されたペプチド群が生体組織内にも存在すること、前駆体たんぱく質からペプチドへ変換される一次切断部位や主要な分解切断部位などを推測できることが明らかとなった。これらの結果は、提案した培養細胞を用いたバイオマーカー探索法が有用である可能性を示すものである。上記の解析法と組み合わせ、ペプチドから低分子量たんぱく質領域でのバイオマーカー探索に推進したい。また、イヌ心不全モデルの心組織のプロテオーム解析より、心不全のバイオマーカー探索も進める予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Sasaki, K., Takahashi, N. Satoh, M., Yamasaki, M. & Minamino, N. A peptidomics strategy for discovering endogenous bioactive peptides. *J. Proteome Res.* **9**, 5047-5052 (2010).
2. Osaki, T., Sasaki, K. & Minamino, N. Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5. *J. Proteome Res.*, 2011 Jan 6. [Epub ahead of print].

### G-2. 学会発表

1. Minamino, N.: How to apply mass

spectrometry to heart research., 20th World Congress of the International Society for Heart Research, Kyoto (Japan), May, 2010.

2. 佐々木一樹, 南野直人: ペプチドミクスで明らかにされる生理活性ペプチド分解のプロセス, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、第6回日本臨床プロテオーム研究会, 千葉, 2010年7月.
3. Sasaki, K., Takahashi, N., Satoh, M., M. Yamasaki, M. & Minamino, N.: An approach to identifying endogenous functional peptides in a set of sequence information provided by mass spectrometry., The Fifth International Peptide Symposium, Kyoto (Japan), Dec., 2010.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

## I. 研究協力者

佐々木一樹, 尾崎 司 (国立循環器病研究センター研究所分子薬理部)  
北風政史, 朝倉正紀 (国立循環器病研究センター病院心不全部)

## 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

分担研究者 高坂 新一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所長

### 要旨

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群同定し、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。

#### A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。

神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。

これまでの血漿と髄液を用いた cICAT 法での研究から、髄液を用いた解析では中枢神経特異的な蛋白質が多数同定されており、その有用性が明らかになってきた。また臨床的に利用可能な髄液 2ml からのプロテオーム解析技術の開発も行った。

今年度は、正常人サンプルを用いて、標準として米国から購入していたレフトオーバーサンブルプールを対照に測定することで、コントロール群のデータ取得を行うこと、及び、髄液採

取後の室温放置時間による影響を検討することで検体の質の確保に関わる研究手順の見直しを図ることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 購入髄液を標準として使用

パーキンソン病患者 5 名のプール髄液と個人の髄液について購入髄液（標準）を対照として cICAT ラベルを行い、プロテオーム測定とその解析を行った。

##### 2. 髄液採取後の室温保存の影響

正常人の髄液を用い、①採取後直ちに氷冷して遠心後に -80℃ 保存、②採取後 3 時間室温に放置した後に遠心して -80℃ 保存、③採取後 24 時間室温に放置した後に遠心して -80℃ 保存の 3 つの処理方法を試し、それぞれ手順通り前処理をした上で購入したプール髄液を対照にして cICAT ラベルを行い、質量分析を行った。また、代表的な神経特異的なタンパク質の量をウェスタンブロットで確認した。

（倫理面への配慮）

今回の研究に用いるヒト由来試料はすべて当センター倫理委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものを使

用する。

## C. 研究結果

### C-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 名のブル髄液の解析では、多くのタンパクで変動が見られた (図 1 左上)。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 (図 1 左下)。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 (図 1 右)。

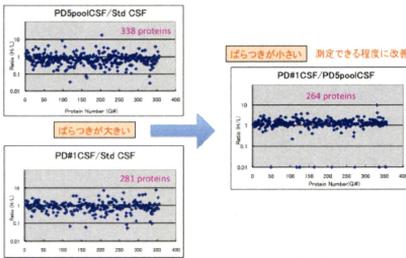


図 1. パーキンソン病解析結果と正常人髄液結果の割り算で、ブル髄液の影響を軽減する。

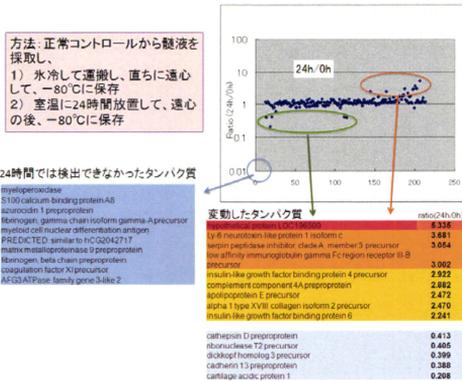


図 2. CSF 検体採取後の室温放置による影響

### C-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依りてタンパク量が減少することを確認した。

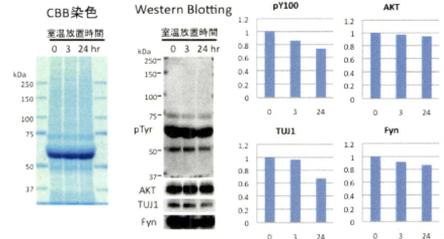


図 3 室温放置による影響

## D. 考察

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、米国 Vital 社から検査後残余髄液を購入してブルし、約 100 回分の測定に供する量を確保した。これをブ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った。しかしながら、測定値を再度割り算することで、購入ブ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ができる、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 度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。

## E. 結論

採取後の迅速な処理が測定値に大きな影響を与えることから、専属のコーディネータを配置し、すべての測定時に立ち会い、氷冷、運搬、遠心、凍結操作を行うシステムを構築した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Uchino, S., Hirasawa, T., Tabat, a H., Gonda, Y., Waga, C., Ondo, Y., Nakajima, K. & Kohsaka, S. Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex. *Neurosci.* **169**, 609-618 (2010).
2. Sanagi, T., Yuasa, S., Nakamura, Y., Suzuki, E., Aoki, M., Warita, H., Itoyama, Y., Uchino, S., Kohsaka, S. & Ohsawa, K. Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2736-2746 (2010).
3. Yamamoto S, Nakajima K & Kohsaka S. Macrophage-colony stimulating factor as an inducer of microglial proliferation in axotomized rat facial nucleus. *J. Neurochem.* **115**,1057-1067 (2010).

## G-2. 学会発表

(国際学会)

1. Ohsawa, K., Sanagi, T., Irino, Y., Nakamura, Y., Suzuki, E., Inoue, K. & Kohsaka, S.: P2Y12 receptor-mediated integrin-β1 activation regulates microglial process extension induced by ATP, The 29th Naito Conference, Glia World? Dynamic Function of Glial Cells in the Brain, Kanagawa (Japan), Oct., 2010.

(国内学会)

1. 佐柳友規, 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵里, 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人, 内野茂夫, 高坂新一: 顔面神経軸索損傷負荷後の ALS モデルラットにおける運動ニューロン脆弱性に関与するミクログリアの機能の解析, 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会, 神戸, 2010 9 月.
2. 難波隆志, 服部功太郎, 功刀 浩, 貝淵弘三, 内野茂夫, 高坂新一: NMDA 受容体シグナルは統合失調症脆弱性因子 DISC1 を介して成体海馬における新生ニューロンの移動を抑制する, 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会, 神戸, 2010 9 月.
3. 大澤圭子, 佐柳友規, 中村泰子, 鈴木恵里, 井上和秀, 高坂新一: アデノシンシグナルによるミクログリアの遊走と突起伸長調節, 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学学会合同年会, 神戸, 2010 年 12 月.

## H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索

分担研究者 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

## 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 NeuAca2-6(Fuca1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc (α2-6 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ボソーム法で作成し、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 法を用いてミエロー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、免疫組織化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。

## A. 研究目的

細胞は癌化に伴い細胞表面の糖鎖構造が変化する。変化した糖鎖の一部は、癌で発現するが、正常細胞では発現が認められず、癌特異的糖鎖抗原に分類される。また癌特異的糖鎖抗原には癌の転移や浸潤などに関与するものがあることが判明するとともに、腫瘍マーカーとしても広く用いられている。もっとも有名なものが Sialyl Le<sup>a</sup> (CA19-9) (図 1) である。そのため、新たな癌特異的糖鎖抗原の発見は、癌での糖鎖の役割のより深い理解と、新規の腫瘍マーカーの開拓が期待される。そこで我々は、糖脂質の構造を高精度、高感度に解析する技術を確立し、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を目指した。大腸癌 60 症例、膵臓癌 5 症例の糖鎖構造解析が終了している。その結果、2007 年に新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAca2-6(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, (Sialyl Type2H, ST2H)を、2009 年にはさらに ST2H と異性体である新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAca2-6(Fuca1-2)Galβ1-

3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, (Sialyl Type1H, ST1H)

(図 1) を発見した。興味深いことに、ST2H は約半数の癌に発現を認めたのに対し、ST1H は、ルイス型の血液型が陰性の患者の癌にのみ発現を認めた。ルイス型は、約 90% の人が陽性で、約 10% の陰性の人にはルイス酵素遺伝子 (Le) に変異があり、Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Sialyl Le<sup>a</sup> (CA19-9) などのルイス型糖鎖が合成できない (図 1)。この中で Sialyl Le<sup>a</sup> (CA19-9) は癌特異的糖鎖抗原で、膵癌、大腸癌などのマーカーとして広く使われている。しかし、ルイス陰性の人には Sialyl Le<sup>a</sup> (CA19-9) を合成できないため、血清 CA19-9 は 0 で、マーカーとしての意味を持たない。しかし、Sialyl Le<sup>a</sup> (CA19-9) の前駆体である Sialyl Le<sup>x</sup> (DU-PAN-2) が、ルイス陰性の人々の CA19-9 に代わる腫瘍マーカーとされている (図 1)。我々が発見した ST1H は CA19-9 とは異なる合成経路で作成され、かつルイス陰性の人々の癌にのみ発現する可能性が極めて高く、DU-PAN-2 と相乗的にルイス陰性の人に対する腫瘍マーカーとなる可能性が大である (図 1)。そこで、

今年度は、ST1H の腫瘍マーカーへの臨床応用に向けて、ST1H を特異的に認識する単クローン抗体を作成した。

基礎研におけるがん関連創薬バイオマーカー探索研究のため以下の癌組織検体を提供した。

### 1) MammaPrint 低リスク群及び高リスク群の検体

MammaPrint は現時点で最も強力な予後予測分子診断システムである。成人病センターでは日本人症例による最初の検証試験を行ったが、その時の検体 23 症例分を提供した。

### 2) Briochioloaoveolar adenocarcinoma(BAC) の検体

BAC は特徴的な組織型を持つ比較的前後のよい肺腺癌である。以前取得した肺癌の遺伝子発現プロファイルデータを再解析したところ、cell matrix 関連の発現低下が認められた。蛋白発現を確認する目的で合計 10 症例分の検体を提供した。

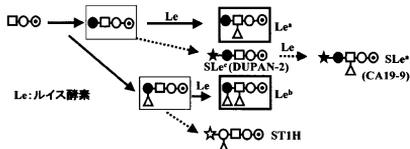


図 1. CA19-9、DU-PAN-2 および ST1H の想定される合成経路

## B. 研究方法

### B-1. ST1H モノクローナル抗体の作成：

#### 免疫

マウスの免疫に用いる糖鎖抗原はリポソーム法を用いて作成した。マウス 1 匹あたり合成した糖脂質 ST1H を 35  $\mu\text{g}$ 、ジパルミトイルホスファチジルコリン 0.5  $\mu\text{mol}$ 、コレステロール 0.5  $\mu\text{mol}$ 、*Salmonella Minnesota R595* の LPS 10  $\mu\text{g}$  を混合し、ロータリーエバポレーターを用いてリポソームを作成した。この liposome を 6 週齢の BALB/c マウス (雌) 4 匹の腹腔内に投与した。初回免疫後、3-4 日ごとに 2,3 回目の追加免疫を行い、最終免疫の 2 日後にマウスを採血し、下記の ELISA 法にて糖脂質に対する抗体力価を測定し、力価の高いマウス 2 匹を選び、細胞融合に用いた。

### B-2. 細胞融合

ミエローマは、P3-X63Ag8.653 を用いた。免疫したマウスから脾細胞を調整した。脾細胞：ミエローマ細胞=5:1 となるように混合し、PEG solution を用いて細胞融合させた。脾細胞換算  $1 \times 10^6$  cells/ml の細胞密度で HAT 培地 (S-Clone CM-B+ HAT) に懸濁させ、96 well microplate に 100  $\mu\text{l}$  ずつ巻き込み、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にて培養した。

### B-3. 抗体スクリーニング

コロニーが可視化後スクリーニングを開始した。抗体のスクリーニングには ELISA 法を用いた。

glycolipid (2  $\mu\text{g}$ )、egg yolk phosphatidylcholine (20  $\mu\text{g}$ )、cholesterol (10  $\mu\text{g}$ ) を 2ml ethanol で溶解し、20  $\mu\text{l}$  per well ずつ 96 穴の ELISA plate に加え、室温で 2-3 時間放置し、乾燥させて、固相化した。各 well に 5% BSA-PBS 100  $\mu\text{l}$  を入れ、2 時間反応させ、非特異吸着を抑えた。well を洗浄後、ハイブリドマの上清を 100  $\mu\text{l}$  加え、37 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス Immunoglobulin (1,000 倍希釈) を 50  $\mu\text{l}$  加え、37 $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。PBS で well を洗浄後、TMB ペルオキシダーゼ発色基質キットを用いて発色させた。反応後、1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50  $\mu\text{l}$  を加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで波長 450nm の吸光度を測定する。陽性のクローンは限界希釈法で 2nd スクリーニングを行い、目的の抗体を産生するクローンを得た。

### B-4. 抗体の作成、精製

クローニングした陽性のクローン  $5 \times 10^6$  を BALB/c nude マウスの腹腔内に投与し、投与後 10-14 日後に、腹水を回収した。回収した腹水を 1ml の protein G カラムに 1ml/min で通し、10ml の PBS で洗浄後、5ml の溶出バッファー (0.1M glycine pH 2.5) で抗体を溶出し、中和バッファー (2M Tris-HCl pH 9.0) にて中和した。遠心濃縮器にて濃縮後、PD-10 カラムを用いたゲルろ過でバッファーを PBS に置換した。

(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。

医薬基盤研究所へのサンプル提供は 23 症例行った。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

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<sup>x</sup> や SLe<sup>a</sup> 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  $2 \times 10^6$  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。

### D. 考察

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。

### E. 結論

Lewis 陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある ST1H を特異的に認識する単クローン抗体が得られたと考えられる。今後は、臨床診断に向けて、血清 ELISA の系を構築し、様々な癌患者血清中の ST1H 値を測定する必要がある。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### G-1. 論文発表

1. Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N. & Kaneda Y. GD1a and sialyl paragloboside, is regulated by NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional control of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase I, II and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. *Int. J. Cancer*, in press (2011).
2. Shida, K., Korekane, H., Misonou, Y., Noura, S., Ohue, M., Takahashi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O. & Miyamoto, Y. Novel ganglioside found in adenocarcinoma cells of Lewis-negative patients. *Glycobiology* **20**, 1594-1606 (2010).
3. Korekane, H., Matsumoto, A., Ota, F., Hasegawa, T., Misonou, Y., Shida, K., Miyamoto, Y. & Taniguchi, N. Involvement of ST6Gal I in the biosynthesis of a unique human colon cancer biomarker candidate,

alpha2,6-sialylated blood group type 2H (ST2H) antigen. *J. Biochem.* **148**, 359-370 (2010).

4. Kuwamoto, K., Takeda, Y., Shirai, A., Nakagawa, T., Takeishi, S., Ihara, S., Miyamoto, Y., Shinzaki, S., Ko, J.H. & Miyoshi, E. Identification of various types of  $\alpha$ 2-HS glycoprotein in sera of patients with pancreatic cancer: Possible implication in resistance to protease treatment. *Mol. Med. REPORTS* **3**, 651-656 (2010).

## G-2. 学会発表

1. Shida, K., Korekane, H. & Miyamoto, Y.: Identification of a novel carbohydrate tumor marker candidate appropriate for Lewis negative individual., 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo (Japan), Aug., 2010.
2. 宮本泰臺, 信田京子, 能浦真吾, 大植雅之, 高橋秀典, 大東弘明, 石川 治: ルイス型陰性の人に適した新規糖鎖腫瘍マーカー候補の同定, 第 69 回日本癌学会総会, 大阪, 2010 年 10 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

分担研究者 野村文夫 千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学 教授  
千葉大学医学部附属病院 検査部長・遺伝子診療部長

研究要旨

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。

A. 研究の背景と目的

タンパク質、ペプチド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が、従来から用いられている immunodepletion 法を用いると abundant proteins と結合している可能性があるマーカー候補が同時に失われてしまうと考えられ、この点が大きな難点とされてきた。したがって、abundant proteins と結合しているペプチドを回収する手法が求められている。今回、北里大学の小寺・川島らと共にその方法を開発した。

B. 研究方法

本方法は大きく、differential solubilization 法によるペプチド抽出とその抽出物の逆相クロマトグラフィーによる分画物の MALDI-TOF MS 解析の 2 つのステップに分かれる。

血清 20 $\mu$ l と可溶化液（7M urea, 2M thiourea, 20mM DTT）40 $\mu$ l を混和したのち氷冷した acetone 180 $\mu$ l に滴下し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間 mixing を続けた。その後、19000G で遠心（4 $^{\circ}$ C）し、そ

の沈殿物に抽出液（70% CAN, 12mM HCl）を 400 $\mu$ l 加えて、4 $^{\circ}$ C で 1 時間 mixing した後、19000G で再度遠心（4 $^{\circ}$ C）し上清を回収して凍結乾燥し、ペプチド抽出物とした。本抽出法は以下 differential solubilization 法（DS 法）と呼ぶ。DS 法による抽出物を 0.1% TFA に溶解後、逆相 HPLC により 60 分画に fractionation した後、各分画を MALDI-TOF MS（UltraFlex II, Bruker Daltonics）により解析した。

（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, E. 研究結果、考察及び結論

図1 DS法のペプチド抽出効率

— 従来法（有機溶媒沈殿法・限外濾過法）との比較 —

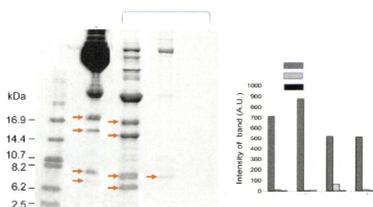


図 1 に DS 法により得られたペプチド抽出物の Tricine-SDS-PAGE パターン（レーン 1）を従来法である有機溶媒沈殿法（レーン 2）、限外濾過法（レーン 3）および未処理血清と比較し

て示した。従来法に比し、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 $\mu$ 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

図2 アルブミン/IgG 結合ペプチドの抽出(1)

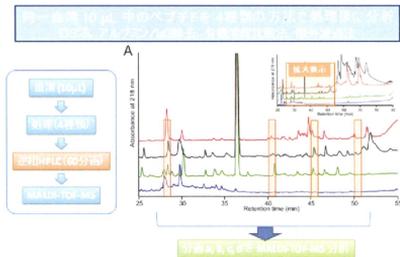
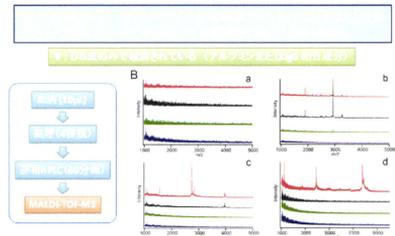


図3 アルブミン/IgG 結合ペプチドの抽出(2)



り処理したのちに分析した。図2に示すRP-HPLCの分画a-dをMALDI-TOF MSにより解析すると図3に示すようにアルブミン/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(図4)、RP-HPLC(図5)、MALDI-TOF MS(図6)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

図4 DS法によるペプチド抽出の再現性

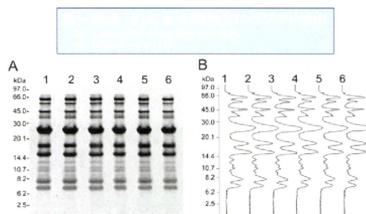


図5 ペプチド分析の再現性 (RP-HPLC)

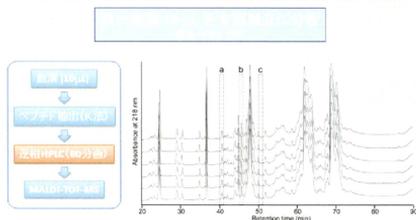
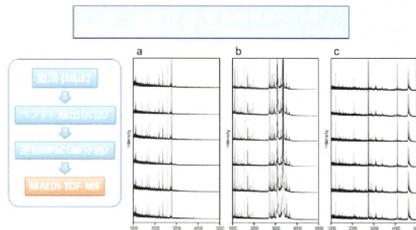


図6 ペプチド分析の再現性 (MALDI-TOF MS)



索に応用していく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. 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).

## H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし。

脳神経系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  
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 GSC9 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、1458 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。

## 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ける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 iPEACH の考案を試み、脳神経系腫瘍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した。特に今回、悪性脳腫瘍から樹立した幹細胞、および神経系腫瘍モデル幹細胞の分化と悪性化誘導モデルに注目した。

脳神経系腫瘍の中でも悪性脳腫瘍はほとんどの場合、手術による治療は不可能であり、術後脳内に残った腫瘍細胞は放射線療法・化学療法に対する反応性、再発などの予後を決める最も重要な因子である。現在のところ、予後を予測できる診断マーカーは存在せず、患者の化学

療法感受性を見極める診断法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されている。近年、glioma 組織細胞由来の幹細胞様癌細胞(GSC)の存在が示され、その濃縮法および樹立法が各地で検討される様になった。多様に分化する GSC の研究が悪性脳腫瘍再発や、薬剤耐性の謎をとく最も重要な鍵となることが示されているが、GSC の純粋分離法や検出に用いるマーカー分子群はもとより、GSC の化学治療耐性機能などに関わる分子群の詳細な情報は非常に限られているため、研究開発は困難を極めていた。以前より、我々は glioma において唯一化学療法に感受性を示す予後良好な anaplastic oligodendroglioma (AO)/oligoastrocytoma (AOA)に関して、詳細な分子レベルの解析を行ってきたが、現在までに全 6800 種の glioma 組織細胞蛋白質を定量的に同定することに成功している (glioma 組織細胞蛋白 database 特許出願 2010-81524)。これらの情報から、化学治療感受性に関与すると考えられる新規の 34 機能蛋白質を含む 209 種類の蛋白質を特定し、翻訳後修飾によって発現と活性が特異的に制御される新規の転写因子活性化ネットワークを発見した (特願 2010-081524)。

本研究では、融合型 differential プロテオームトランスクリプトーム解析技術 iPEACH(特許出願 2010-81525、PCT/JP2011/58366)を微量な神経系(幹)細胞に最適化して応用開発することによって、脳神経系腫瘍幹細胞の維持と分化に関わる分子群の同定と、詳細な分子特性解析を試みた。

## 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 pulsari, 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)、解析ソフトウェア (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、affimetrix)を用いた。

生体サンプルとして、ヒトグリオーマ組織より分離樹立した 9 つのクローンより、グリオーマ幹細胞 GSC03A、GSC03U、グリオーマ培養細胞 (U373、U251、A172、U81G)、ヒト腫瘍組織、NF1 患者 neurofibroma、MPNST 組織と、これら組織からの初期培養細胞、市販の培養細胞を用いた。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、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。全ての解析データを iPEACH(特願 2010-81524、PCT/JP2011/58366)を用いて統合した。GO 解析は Gene Spring 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て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. D. 研究結果及び考察

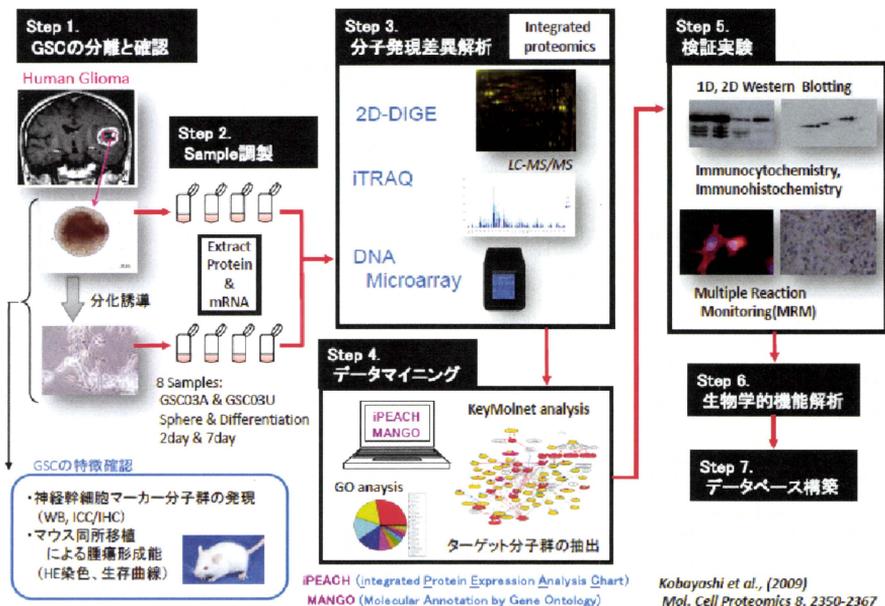
1) グリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群のプロファイリング解析

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)。

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

Fig. 1 Strategy of Integrated Proteomics for GSC bio-system analysis



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 4191 個を解析に用いた。Sphere2 日後のデータを基準として発現変動したタンパク数は 820 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。

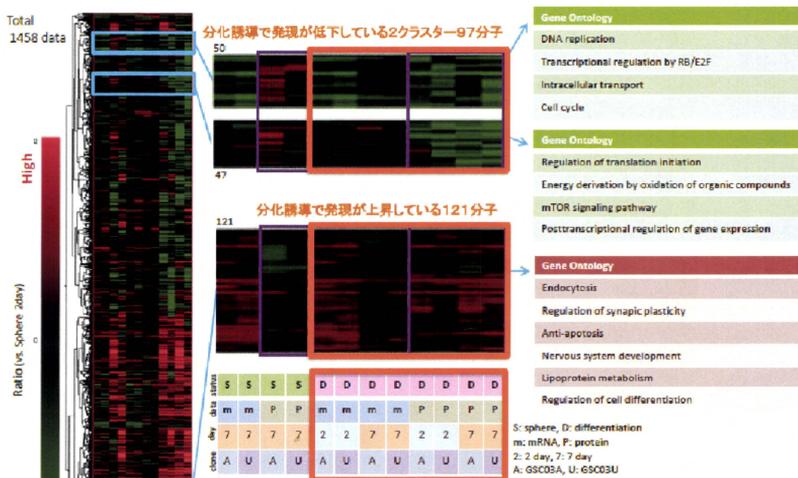
**DNA microarray** 法による解析結果 : ヒト 55,000 個の DNA プロブに対し、そのうち定量的に有意な 20,752 分子を対象に解析を行っ

た。Sphere2 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 1805 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 1,458 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。

Fig.2 に示すヒートマップは Sphere2 日目の全分子の発現量をコントロールとして、赤は発現亢進分子、緑は発現抑制分子を示している。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** 関連因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- $\beta$**  ファミリー蛋白質、そのレセプター群、

Fig. 2 Cluster Analysis of total data obtained from integrated proteomics



分化誘導による発現抑制分子群: 翻訳制御、細胞周期促進、細胞内輸送、タンパク合成関連分子  
分化誘導による発現亢進分子群: 神経発生・分化、分化抑制、細胞死抑制、細胞運動関連分子

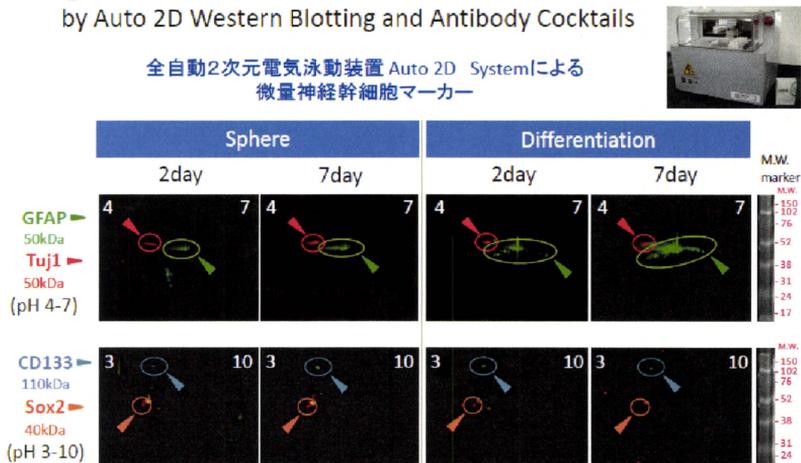
SMADファミリー蛋白質群を含む、神経発生・分化制御、細胞死抑制、細胞運動関連分子であることが判明した。GSC様クローンの血清添加による分化で変動した同定分子群の検証をおこなうため、免疫細胞染色とウェスタンブロッティングを行った。その結果、神経幹細胞マーカーのCD133、Sox2の発現が分化によって減少していることから、我々のクローンは神経幹細胞様の性質を持っているが、同様のマーカーであるNestinは変動しないこと、また、分化誘導するとアストロサイトマーカーのGFAP、オリゴデンドロサイトマーカーで悪性グリオーマ高発現分子であるCD44の発現が誘導されることから、グリオーマ細胞への分化能を有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 (Fig.3)。

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

Fig. 3 Detection of Neural Stem Cell Markers in GSCs by Auto 2D Western Blotting and Antibody Cocktails



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を確認した。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た。

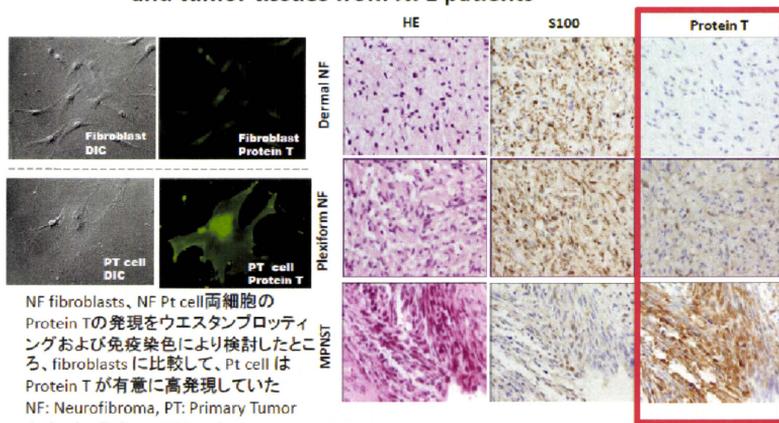
ロテオミクスを使って、現在までに約 1,600 種の神経系 PC12 細胞内発現蛋白質を同定し、その内、NGF 刺激によって神経分化の際に特異的な発現差異を示す 72 種の蛋白質を同定した。これらには既知の NGF 誘導分子のみならず、新規の分子群が含まれており、これらの機能解析と細胞生物学的検証を行うことによって、神経系細胞分化と細胞死抑制に関わる新規機能分子群であることが判明した(Kobayashi et al. Mol. Cell. Proteomics 2009)。さらに神経線維腫症一型腫瘍抑制遺伝子 NF1 の発現抑制により、NGF で刺激した NFKDPC12 内で特異的に発現が変動する 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ティ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 (Fig.4)。また、Protein T siRNA を処理した PT cell は、顕著な形態変化を示し、

**Fig. 4 Expression and localization of Protein T in primary culture cells and tumor tissues from NF1 patients**



NF fibroblasts, NF Pt cell 両細胞の Protein T の発現をウエスタンブロッティングおよび免疫染色により検討したところ、fibroblasts に比較して、Pt cell は Protein T が有意に高発現していた  
 NF: Neurofibroma, PT: Primary Tumor derived cells from NF1 patient  
 MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor from NF1 patient  
 S100: Schwann cell marker

Neurofibromaの悪性化に伴って、protein Tの発現が顕著に亢進した。(各ステージの患者組織 n=15)