

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幹細胞 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)。

E. 結論

本研究では、ヒト脳神経系腫瘍幹細胞様細胞を用いた統合プロテオミクスの方法論を考案し、これを用いて腫瘍幹細胞維持と分化、およびがんの悪性化に関わって発現量と修飾構造を変動させるタンパク質群と、その機能変化に関わる責任分子群を介した細胞内シグナルネットワークを抽出することを試みた。グリオーマ患者組織より分離した GSC を対象に、iPEACH を用いた融合プロテオミクスによって、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に応用し、特異的に変動している新規 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。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。GSC のマーカー分子群や、脳神経系の悪性腫瘍

における治療抵抗性に最も有効に関わる分子シグナルカスケードを有効に抽出したこれらの基礎情報は、薬剤開発や、治療方針や予後予測を正しく診断するための病理診断マーカーの開発のための基礎情報として有効利用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Nambu, T., Araki, N., Nakagawa, A., Kuniyasu, A., Kawaguchi, T., Hamada, A. & Saito, H. Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci.* **101**, 137-142 (2010).
2. Silsirivanit, A., Araki, N., Wongkham, C., Pairojkul, C., Narimatsu, H., Kuwahara, K., Wongkham, S. and Sakaguchi, N. A novel serum carbohydrate marker for cholangiocarcinoma: values for diagnostic and prognostic indicators. *Cancer*, in press.
3. Esaki, K., Terashima, Y., Toda, E., Yoshinaga, S., Araki, N., Matsushima, K. & Terasawa, H. Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. *Protein Expr. Purif.* **77**, 86-91 (2011).
4. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる病態メカニズムの解析.『創薬のためのタンパク質・プロテオミクス解析』小田吉哉・長野光司編集,羊土社,東京,pp182-190,2010.

G-2. 学会発表

1. 荒木 令江:融合プロテオミクスによる神経系腫瘍の発症メカニズムの解析,第87回日本生理学会大会,盛岡,2010年5月.
2. Araki, N., Mizuguchi, S., Morikawa, T., Kobayashi D., Tsubota M., Midorikawa U., Niibori N., Wilson, A., Nakamura, H. & Kuratsu, J.: Analysis of cellular signals activated in the tumor tissue related to

- chemotherapy sensitivity by Integrated Proteomics., 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会 JHUPO, 東京, 2010年7月.
3. 小林大樹, 平山未央, 森川崇, 水口惣平, 長山慈, ウィルソン森藤政代, 荒木令江: 統合プロテオミクスによる新規な神経系疾患関連分子群の同定と機能解析, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会 JHUPO, 東京, 2010年7月.
 4. 水口惣平, 森川 崇, 坪田誠之, 緑川宇一, 小林大樹, 中村英夫, 倉津純一, 荒木令江: バイオインフォマティクスと統合プロテオミクスの手法を用いた病態組織細胞内の活性化分子ネットワークの解析, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会 JHUPO, 東京, 2010年7月.
 5. 荒木 令江: 腫瘍医学教育における最先端基礎研究概念の導入の必要性と展望, 第42回日本医学教育学会大会, 東京, 2010年7月.
 6. Araki N.: A quick cancer proteome validation system by a fully automated 2DE-western blotting device., HUPO2010 (Human Proteome World Congress), Sydney, Australia, Sept., 2010.
 7. Mizuguti, S., Morikawa, T., Tsubota, N., Midorikawa, U., Niibori, A., Kobayashi, D., Nakamura, H. & Kuratsu, J. & Araki, N.: Integrated proteomics of brain tumor cell signals related to chemotherapy sensitivity., HUPO2010 (Human Proteome World Congress) Sydney, Australia, Sept., 2010.
 8. Kobayashi, D., Kumagai, J., Morikawa, T., Hirayama, M., Wilson, A., Wilson, M. & Araki, N.: A proteomic integrated approach for targeting and elucidating the functions of novel proteins involved in neuronal differentiation and disorders., HUPO2010 (Human Proteome World Congress), Sydney, Australia, Sept., 2010.
 9. 森藤政代, 水口惣平, 新堀晶子, 小林大樹, 森川 崇, 荒木令江: ヘテロな細胞集団における HIF シグナル伝達を介した転移性癌細胞の発育機構の解明, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010年9月.
 10. 荒木令江: 統合プロテオミクスによる腫瘍細胞内活性化シグナル分子群の解析と創薬への応用, 第69回日本癌学会学術総会ランチョンセミナー招待講演, 大阪, 2010年9月.
 11. 荒木令江: 融合プロテオミクス解析による疾患原因タンパク質群の同定方法及び薬剤効果検出方法, 平成22年度 JST九州横断新技術講演会, 東京, 2010年12月.
 12. 平山未央, 小林大樹, 森川 崇, 長山 慈, 緑川宇一, 水口惣平, 荒木令江: 融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内発現抑制による異常シグナルの解析, 第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 13. 緑川宇一, 新堀晶子, 水口惣平, 新森加納子, 丸尾祐二, 鶴沼 豊, 中村 眞, 荒木令江: プロテオミクスによる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, 第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 14. Mizuguti, S., Morikawa, T., Tsubota, T., Midorikawa U., Niibori, T., Kobayashi, D., Nakamura, H., Kuratsu, J. & Araki, N.: Integrated proteomics of cancer cellular activation signals related to chemotherapy sensitivity., 第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2010年12月.
 15. Araki, N., Midorikawa, U., Mizuguti, S., Kinoshita, H., Tsubota, N., Morikawa, T., Kobayashi, D., Maruo, Y. & Nakamura, M.: Development of a fully automated 2DE-western blotting system for quick validation and profiling cancer specific proteomes., 第33回日本分子生物学会大会・第83回日本生化学大会合同大会, 神戸, 2010年12月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許

1. 発明の名称: 胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識するモノクローナル抗体
出願番号: 特願 2009-025607、
発明者: 阪口薫雄, 荒木令江, 他2名,
出願人: 国立大学法人熊本大学、株式会社ト

ランスジェニック

(国際特許 PCT/JP2010-000708、胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識するモノクローナル抗体、出願人：国立大学法人熊本大学、2010年2月5日出願)

2. 発明の名称：融合プロテオミクス解析による疾患原因タンパク質群の同定方法および薬剤効果検出方法
出願番号：特願 2010-81524、
出願日：2010年3月31日
発明者：荒木令江、他4人
出願人：国立大学法人熊本大学
(2011年国際特許出願予定)
3. 発明の名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法
出願番号：特願 2010-81525、
出願日：2010年3月31日
発明者：荒木令江、他4人
出願人：国立大学法人熊本大学
(2011年国際特許出願予定)
4. 発明の名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法
出願番号：国際特許 PCT/JP2011/58366
出願日：2011年3月31日
発明者：荒木令江、水口惣平、森川 崇、坪田 誠之、小林大樹、ウイルソン政代
出願人：国立大学法人熊本大学
5. 発明の名称：融合プロテオミクスによるNF1特異的タンパク質の同定方法、NF1特異的タンパク質発現抑制方法、およびNF1特異的タンパク質の腫瘍マーカーとしての使用方法
発願番号：特願 2011-071110
出願日：2011年3月28日
出願人：国立大学法人熊本大学
発明者：荒木令江、小林大樹、水口惣平、平山未央

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

I. 研究協力者

水口惣平、小林大樹、森川崇、坪田誠之、緑川宇一、平山未央（熊本大学大学院生命科学研究所腫瘍医学分野）、中村英夫、倉津純一（同脳神経外科学分野）

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

分担研究者 中村和行 山口大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

難治性がんの病態、治療、予後などの評価には信頼性の高いバイオマーカーの探索が不可欠である。特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。

A. 研究目的

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

(HUPO) の呼びかけによってバイオマーカー探索等のプロテオーム解析技術の世界標準化や細胞膜結合タンパク質群の網羅的な解析技術の標準化が進められている。1) Bell, A.W., Deutsch, E.W., Au, C.E., Kearney, R.E., Beavis, R., Sechi, S., Nilsson, T., Bergeron, J.J. and HUPO Test Sample Working Group (Nakamura, K. et al.): A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods* 6(6), 423-430 (2009). 2) Chung, C.M., Nakamura, K. & Jordan, T. W.: The AOHUPO Membrane Proteomics Initiative, Fourth Workshop June 2008 Cairns, Australia, *Proteomics* 8(19), 3920-3923 (2008).

本研究では、従来の二次元電気泳動法と質量分析法に加えて新規の PROTEOMEX 法とプロテインチップ技術を導入して C 型肝炎ウイルス関連肝細胞がんなどに対する自己抗体を用いてがん部組織のみならず患者血清中のバイオマーカーを特異的かつ系統的に解析することにより、難治性がんの病態や予後の診断ならびに治療の評価、さらには創薬に利用可能なバイオマーカーの発

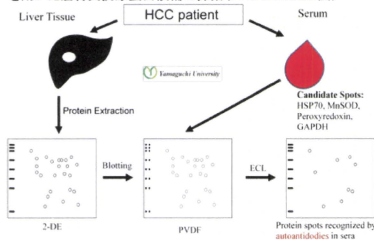
見を目指す研究を行う。

B. 研究方法

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

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

図1. C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患者血清中の自己抗体を用いた癌特異抗原蛋白候補の探索 (PROTEOMEX法)

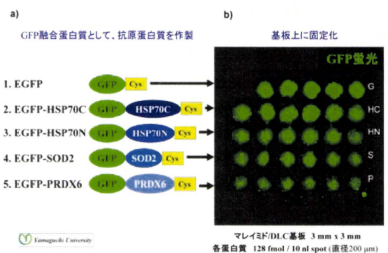


2) PROTEOMEX 法を用いて HCV-HCC 患者から得られたがん部組織タンパク質の 2-DE (分離範囲 pH 3-10) を行った後に分離されたタンパク質群を PVDF 膜に転写し、同一患者の血清

を反応させた後にペルオキシダーゼ或いは蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させることにより、患者血清中の自己抗体に特異的に反応するがん部組織由来のタンパク質スポットを検出した。これらのタンパク質スポットを切り出し、質量分析して候補タンパク質の同定を行った。(図 1)

3) 候補タンパク質 (例として HSP70 の C-末端領域) を GFP 蛋白と融合させ、その N-末端部に His タグと C-末端部に Cys タグを挿入したベクターを作成して大腸菌内で発現させた。産生されたリコンビナント蛋白を His タグに特異的に結合するニッケルビーズで精製した後にダイヤモンド様表面加工した (DLC) チップ基板の上のマレイミド基と反応させ、Cys タグのチオール基とカップリングさせ均一な配向性を保ちながら強固に固定化した。このチップに HCV-HCC 患者や他の疾患ならびに正常人から得た血清を反応させて、HSP70 に特異的に反応する自己抗体を効率的に検出した。さらに、SOD と Peroxyredoxin 6 についても同様に DLC チップ基板表面に固定し、血清と反応させて特異的に反応する自己抗体の検出を行った。(図 2 および図 3)

図2. 肝細胞癌患者特異的自己抗体検出用抗原チップ



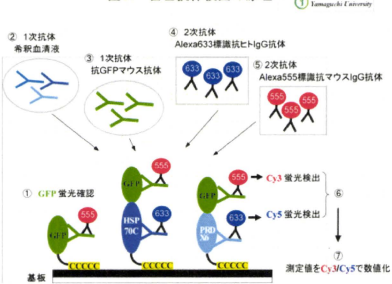
C. 研究結果

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 peroxyredoxin が同

定された (図1)。

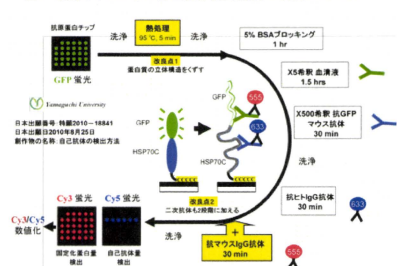
2. HSP70 等を用いたプロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出: GFP と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップ (図2) に HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させ、Cy3 で標識した抗 GFP 抗体を内部標準として Cy5 で標識した抗体ヒト IgG 抗体を用いてチップ上の HSP70C 特異自己抗体量を Cy3/Cy5 蛍光比で数値化した (図3)。

図3. 自己抗体検出の原理



さらに、熱処理過程を加えることによって (図4)、再現性の高い患者血清中の自己抗体が検出された (図5および図6) (特許出願 2010-188841)。

図4 抗原チップからの自己抗体検出方法の改良プロトコル

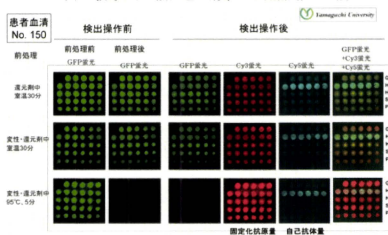


D. 考察

今回、自己抗体を用いたがん組織特異タンパク

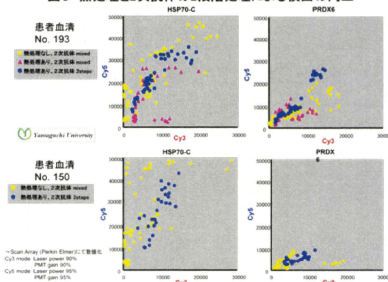
質バイオマーカーの高感度検出技術の改良を行い、C 型肝炎ウイルス感染に起因する肝細胞癌 (HCV-HCC) を中心とする難治性がんの新規バ

図5 抗原チップ熱処理の効果 ~蛍光顕微鏡下での観察



変性・還元剤中での熱処理により、GFP 蛍光が消失し、GFP 抗体検出が向上した。イオマーカ探索を試み、さらに、自己抗体を用

図6 熱処理と2次抗体の2段階処理による検出の向上



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

E. 結論

C 型肝炎ウイルス感染に起因すると考えられる肝細胞がん (HCV-HCC) の組織特異タンパク質バイオマーカーの探索技術を改良し、患者血清中の自己抗体を活用した PROTEOMEX 法とプロテインチップ技術の改良を行い、HSP70 の C

末端領域が HCV-HCC の特異バイオマーカー候補として有望であることを明らかにした。さらに、プロテインチップの熱処理操作と二重抗体ラベル法の導入により C 型肝炎関連肝細胞がんの診断技術として患者血清中のがん特異自己抗体を活用したバイオマーカー探索とさらなる高感度診断技術への改良を試み、他の難治性がんについても臨床応用可能なバイオマーカー探索と診断技術の開発を試みる。h

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Kuramitsu, Y., Baron, B., Yoshino, S., Zhang, X., Tanaka, T., Yashiro, M., Hirakawa, K., Oka, M. & Nakamura, K. Proteomic differential display analysis shows up-regulation of 14-3-3 protein sigma in human scirrhous-type gastric carcinoma cells. *Anticancer Res.* **30**, 4459-4465 (2010).
2. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Zhang, X., Tanaka, T., Ueyama, Y. & Nakamura, K. Staining with highly sensitive Coomassie Brilliant Blue SeePico™ stain after Flamingo™ fluorescent gel stain is useful for cancer proteomic analysis by means of two-dimensional gel electrophoresis. *Anticancer Res.* **30**, 4001-4005 (2010).
3. Kuramitsu, Y., Taba, K., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Zhang, X., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. & Nakamura, K. Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res.* **30**, 3367-3372 (2010).
4. Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Mori-Iwamoto, S., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. & Nakamura, K. KNK437 down-regulates HSP27 of pancreatic cancer cells, and helps the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy* **57**, 12-16 (2011).
5. Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. & Nakamura, K. Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* **30**, 2539-2543 (2010).
6. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Tanaka, T., Zhang, X., Ueyama, Y. & Nakamura, K. Proteomic analysis for nuclear proteins related to tumour malignant progression: a comparative proteomic study between malignant progressive cells and regressive cells. *Anticancer Res.* **30**, 2093-2099 (2010).
7. Kuramitsu, Y., Miyamoto, H., Tanaka, T., Zhang, X., Fujimoto, M., Ueda, K., Hamano, K. & Nakamura, K. Proteomic differential display analysis identified upregulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human differential display analysis identified upregulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human malignant pleural methothelioma cell lines. *Proteomics* **9**, 5078-5089 (2009).
8. Hayashi, E., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Zhang, X., Tanaka, T., Uchida, K., Fukuda,

- T., Furumoto, H., Ueyama, Y. & Nakamura, K. Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 protein is upregulated in human oral squamous cell carcinoma and dependent on the differential level. *Proteomics Clin. Appl.* **3**, 1338-1347 (2009).
9. Tamesa, M.S., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Maeda, N., Nagashima, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., Oka, M. & Nakamura, K. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* **30**, 2168-2181 (2009).
 10. Bell, A.W., Deutsch, E.W., Au, C.E., Kearney, R.E., Beavis, R., Sechi, S., Nilsson, T., Bergeron, J.J. and HUPO Test Sample Working Group (Nakamura, K. et al.): A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods* **6**, 423-430 (2009).
 11. Mori-Iwamoto, S., Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Tanaka, T., Maehara, Y., Okita, K., Nakamura, K. and Sakaida, I.: Interferon-gamma down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine. *Pancreas* **38**, 224-226 (2009).
- G-2. 学会発表**
1. Nakamura, K., Akada, J., Kuramitsu, Y., Furumoto, H., Tanaka, T., Sugihara K., Itoh M. & Oka M.: PROTEOMEX and Cys-tag-Protein Chip Technology for Cancer Biomarker Discovery., HUPO 9th Annual World Congress, Sydney, Australia, Sept., 2010.
 2. Zhang, X-L., Tanaka, T., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M. & Nakamura, K.: Proteomic study of endoplasmic reticulum from Jurkat cells during heat stress., HUPO 8th Annual world Congress, Toronto, Canada, Sept., 2009.
 3. Peng, L., Kapp, E.A., Fenyó, D., Kwon, M.S., Jiang, P., Wu, S., Jiang, Y., Aguilar, M., Baker, M., Cai, Z., Chi, P.V., Chung, M., He, F., Nakamura, K., Nagi, S.M., Paik, Y.K., Pan, T.L., Poon, T., Salekdeh, G.H., Siddiqui, N.A., Sideshmukh, R., Srisomsap, C., Svasti, J., Tyan, Y.C., Dreyer, F., Klotz, D., McLaughlan, J.D., Rawson, P. and Jordan T.M.: Strategies for membrane proteomics., The AOHUPO Membrane Proteomics Initiative. HUPO 8th Annual world Congress, Toronto, Canada, Sept., 2009.
 4. Sugihara, K., Kuramitsu, Y., Tanaka, T., Fujimoto, M., Oka, M. and Nakamura, K.: Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma caused by hepatitis C virus., HUPO 8th Annual world Congress, Toronto, Canada, Sept., 2009.
 5. Nakamura, K., Zhang, X., Kaku, C. & Fujimoto, M.: Invited Lecture, Proteomic profiling of ER fraction from Jurkat cells during heat stress response., 2009TPS International Proteomics Conference and 5th AOHUPO MPI Workshop, Taipei, Taiwan, June, 2009.
 6. Sugihara, K., Kuramitsu, Y., Tanaka, T., Fujimoto, M., Oka, M. and Nakamura, K.: Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma caused by hepatitis C virus., HUPO 8th Annual World Congress, Toronto, Canada, Sept., 2009.
 7. 藏満保宏, 岩本早耶香, 田場久美子, 藤本正憲, 坂井田功, 中村和行: シンポジウム, プロテオミクスの医学への応用 (抗糖剤 Gemcita-

bine 感受性関連蛋白のプロテオーム解析による同定), 第 7 回日本ヒトプロテオーム機構 (JHUPO)大会, 東京, 2009 年 6 月.

8. 中村和行: 特別講演, 電気泳動法の過去・現在・未来, 第 60 回日本電気泳動学会総会, 松本, 2009 年 9 月.
9. 杉原佳恵, 藏満保宏, 田中寿幸, 中村和行, 岡正朗: C 型肝炎に起因する肝細胞癌のプロテオーム解析. 第 60 回日本電気泳動学会総会, 松本, 2009 年 9 月.
10. 田中寿幸, 藏満保宏, 張 秀蓮, 内藤誠二, 中村和行: 転移能の異なる腎細胞癌株のプロテオーム解析, 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
11. 加藤元土, 木村有香, 長坂祐二, 田中寿幸, 張秀蓮, 藏満保宏, 中村和行: 2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスの血漿プロテオーム解析, 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
12. 杉原佳恵, 藏満保宏, 田中寿幸, 岡 正朗, 中村和行: C 型肝炎に起因する肝細胞癌のプロテオーム解析, 第 60 回日本電気泳動学会, 松本, 2009 年 9 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

出願日: 平成 22 年 8 月 25 日

出願番号: 特願 2010-188841

発明の名称: 自己抗体の検出方法

出願人: 国立大学法人 山口大学

発明者: 中村和行 他

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

I. 研究協力者

赤田純子, 藏満保宏, 田中寿幸 (山口大学大学院医学系研究科)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
朝長 毅	血清・血漿バイオマーカー探索のための新しい前処理法の開発	小田吉哉 長野 光司	実験医学別冊「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」	羊土社	東京	2010	97-103
尾野雅哉	血漿・血清プロテオミクス解析による診断, 副作用, 予後マーカーの開発	小田吉哉 長野 光司	同 上	同 上	同 上	2010	90-96
同 上	腫瘍マーカー温故知新	丸 義朗	がん転移 臨床と研究の羅針盤	学研メディカル秀潤社	同 上	2010	22-26
荒木令江	融合プロテオミクスによる病態メカニズムの解析	小田吉哉 長野光司	実験医学別冊「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」	羊土社	東京	2010	182-190

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
朝長 毅 野村文夫	Reduction of novel circulating long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age.	<i>BMC Gastroenterol.</i>	Epub10	140	2010

同上	An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer.	<i>Int. J. Cancer</i>	128	1018-1030	2011
同上	High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples.	<i>J. Proteome Res.</i>	9	1694-1705	2010
同上	Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: Proteomic analysis.	<i>J. Neuroimmunol.</i>	218	112-115	2010
久家貴寿 朝長 毅 野村文夫	Phosphorylation statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle.	<i>Exp. Cell Res.</i>	316	2301-2312	2010
久家貴寿	The Lyn kinase C-lobe mediates Golgi export of Lyn through conformation-dependent ACSL3 association.	<i>J. Cell Sci.</i>	123	2649-2662	2010
越中屋里香	Cell-to-cell transformation in <i>Escherichia coli</i> : a novel type of natural transformation involving cell-derived DNA and a putative promoting pheromone.	<i>PLoS One</i>	6	e16355	2011
足立 淳	Efficiency of rice bran for removal of pesticides in artificial gastric fluid.	<i>J. Health Sci.</i>	56	88-91	2010

同 上	Proteomic analysis for the purpose of understanding the mechanisms of benzene and X-ray induced leukemia using human bone marrow cells.	<i>J.Proteomics Bioinform.</i>	3	66-73	2010
原 康洋	Tumor growth suppression in vivo by overexpression of the circadian component, PER2.	<i>Genes Cells</i>	15	351-358	2010
佐野聖三	Oocyte-type linker histone B4 is required for transdifferentiation of somatic cells in vivo.	<i>FASEB J.</i>	24	3462- 3467	2010
角田慎一	Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins.	<i>Biomaterials</i>	32	162-169	2011
仲 哲治	iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases.	<i>Ann. Rheum. Dis.</i>	69	770-774	2010
同 上	Targeting annexin A4 to counteract chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary.	<i>Expert Opin. Ther. Targets</i>	14	963-971	2010
中山 敬一	Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis.	<i>Nature Cell Biol.</i>	12	457-467	2010

同 上	Increased E4 activity in mice leads to ubiquitin-containing aggregates and degeneration of hypothalamic neurons resulting in obesity.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	15538-5547	2010
同 上	Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance.	<i>Int. J. Cancer</i>	126	1828-1837	2010
同 上	Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	33	951-957	2010
同 上	Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	397	93-99	2010
同 上	GABA(A) receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice.	<i>J. Neurochem.</i>	114	302-310	2010
同 上	TRIM8 modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3.	<i>J. Cell Sci.</i>	123	2238-2245	2010
同 上	Aldehyde dehydrogenase 2 knockout accentuates ethanol-induced cardiac depression: role of protein phosphatases.	<i>J. Mol. Cell. Cardiol.</i>	49	322-329	2010

同 上	Molecular basis for the association of human E4B U box ubiquitin ligase with E2-conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4.	<i>Structure</i>	18	955-965	2010
同 上	In vitro histone demethylase assay.	<i>Cold Spring Harb. Protoc.</i>		pdb prot 5512	2010
同 上	Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate specificity in vitro.	<i>J. Proteome Res.</i>	9	5982-5993	2010
同 上	Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	403	220-224	2010
同 上	Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1.	<i>Immunity</i>	34	24-38	2011
同 上	Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver.	<i>J. Clin. Invest.</i>	121	342-354	2011
同 上	MiR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1 and SOCS-1.	<i>Blood</i>	117	4293-4303	2011
同 上	Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7 α overexpression.	<i>Blood</i>	117	2373-2377	2011
同 上	Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2.	<i>J. Anat.</i>	218	668-677	2011

同 上	Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis.	<i>Plant Physiol.</i>	156	117-128	2011
同 上	SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction.	<i>Nature</i>	471	104-109	2011
同 上	UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53.	<i>Nature Med.</i>	17	347-355	2011
同 上	Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation	<i>Genes Cells</i>	16	448-466	2011
同 上	Fbxw7beta resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress.	<i>Cancer Sci.</i>	102	749-755	2011
同 上	The SKP2 E3 Ligase regulates basal homeostasis and stress- induced regeneration of hematopoietic stem cells.	<i>Blood</i>			In press
同 上	Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of stemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells	<i>J. Biol. Chem.</i>			In press
同 上	Skp2 is necessary for Myc-induced keratinocyte proliferation but dispensable for Myc oncogenic activity in the oral epithelium.	<i>Am. J. Pathol.</i>			In press

平野 久	Proteomic identification of differentially expressed genes in neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>) in vitro	<i>Biophys. Biochim. Acta</i>	1814	265-276	2011
同 上	N ^ε -Acetylation of yeast ribosomal proteins : Identification by 2D-DIGE MS/MS and analysis of the effect on proteins synthesis.	<i>J. Proteomics</i>	74	431-441	2011
同 上	Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity 1 and suppress endocrine function in the thyroid.	<i>Endocrinology</i>	152	1702-1712	2011
同 上	Wild-type p53 enhances Annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma.	<i>FEBS J.</i>			In press
同 上	Genetic variation of high-molecular-weight glutenin subunit composition in Asian wheat.	<i>Genet. Resour. Crop Evol.</i>	58	283-289	2011
同 上	Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of basic 7S globulin from soybean.	<i>Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Cryst. Commun.</i>	67	87-89	2011
同 上	Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) is involved in the PAR complex to regulate epithelial cell polarity.	<i>Current Biol.</i>	20	1408-1414	2010

同 上	Contribution of K11-linked ubiquitination to MIR2-mediated MHC class I internalization.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	35311-35319	2010
同 上	AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK family and function in nonsense-mediated mRNA decay.	<i>Sci. Signal.</i>	3	1-13	2010
同 上	Subcellular localization of the interaction of bipolar landmarks Bud8p and Bud9p with Rax2p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> diploid cells.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	399	525-530	2010
同 上	Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast.	<i>Proteomics</i>	10	2769-2779	2010
同 上	Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis.	<i>Proteomics</i>	10	3884-3895	2010
尾野雅哉	Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment.	<i>Mol. Cell. Proteomics</i>	9	695-704	2010
同 上	Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in <i>Xenopus</i> axis formation.	<i>J. Biol. Chem.</i>	285	26289-26294	2010

同 上	Traf2- and Nek-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth.	<i>Cancer Res.</i>	70	5024-5033	2010
同 上	Reduced plasma level of CXC chemokine ligand 7 in patients with pancreatic cancer.	<i>Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.</i>	20	160-171	2011
同 上	Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control.	<i>PLoS ONE</i>	6	e16054	2011
同 上	Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray.	<i>Cancer Sci.</i>	102	630-638	2011
南野直人	A peptidomics strategy for discovering endogenous bioactive peptides.	<i>J. Proteome Res.</i>	9	5047-5052	2010
同 上	Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5.	<i>J. Proteome Res.</i>	10	1870-1880	2010
高坂新一	Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex.	<i>Neurosci.</i>	169	609-618	2010

同 上	Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis.	<i>J. Neurosci. Res.</i>	88	2736-2746	2010
同 上	Macrophage-colony stimulating factor as an inducer of microglial proliferation in axotomized rat facial nucleus.	<i>Neurochem.</i>	115	1057-1067	2010
宮本泰豪	Expression of gangliosides, GD1a and sialyl paragloboside, is regulated by NF- κ B-dependent transcriptional control of α 2,3-sialyl-transferase I, II and VI in human castration-resistant prostate cancer cells.	<i>Int. J. Cancer</i>			In press
同 上	Novel ganglioside found in adenocarcinoma cells of Lewis-negative patients.	<i>Glycobiology</i>	20	1594-1606	2010
同 上	Involvement of ST6Gal I in the biosynthesis of a unique human colon cancer biomarker candidate, alpha2,6-sialylated blood group type 2H (ST2H) antigen.	<i>J. Biochem.</i>	148	359-370	2010
同 上	Identification of various types of α 2-HS glycoprotein in sera of patients with pancreatic cancer: Possible implication in resistance to protease treatment.	<i>Mol. Med., REPORTS</i>	3	651-656	2010

荒木令江	Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells.	<i>Cancer Sci.</i>	101	137-142	2010
同上	A novel serum carbohydrate marker for cholangio-carcinoma: values for diagnostic and prognostic indicators.	<i>Cancer</i>			In press
同上	Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5.	<i>Protein Expr. Purif.</i>	77	86-91	2011
中村和行	Proteomic differential display analysis shows up-regulation of 14-3-3 protein sigma in human scirrhous-type gastric carcinoma cells.	<i>Anticancer Res.</i>	30	4459-4465	2010
同上	Staining with highly sensitive Coomassie Brilliant Blue SeePico™ stain after Flamingo™ fluorescent gel stain is useful for cancer proteomic analysis by means of two-dimensional gel electrophoresis.	<i>Anticancer Res.</i>	30	4001-4005	2010
同上	Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.	<i>Anticancer Res.</i>	30	3367-3372	2010