

- Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Taiji Tsukamoto, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Yae Kanai. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. American Association for Cancer Research. 102nd Annual Meeting, 2011.
8. 新井恵吏、金井弥栄. 泌尿器系腫瘍及びその背景組織のメチル化解析. ワークショップ1 前癌病変及び背景粘膜におけるエピジェネティクス異常. 第100回日本病理学会総会、2011.
9. 新井恵吏、森泰昌、知久季倫、後藤政広、中川徹、藤元博行、金井弥栄. 腎細胞がん発生過程における DNA メチル化異常の網羅的解析. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.
10. 長塩亮、新井恵吏、尾島英知、小菅智男、金井弥栄. 慢性障害肝における DNA メチル化状態を指標とした発がんリスク評価の肝生検検体を用いた臨床応用. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

2、実用新案登録

該当なし

3、その他

該当なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

	氏名	所属	職名
分担研究者	近藤格	国立がんセンター研究所 創薬プロテオーム研究分野	分野長

研究要旨

蛍光二次元電気泳動法および特異抗体を用いて肝細胞癌の悪性度に相関するタンパク質の同定および機能解析を行った。蛍光二次元電気泳動法によって門脈侵襲陽性症例の原発腫瘍組織に特徴的なタンパク質を88種類同定した。同定したタンパク質のうち、文献調査から他の複数の悪性腫瘍で予後と高い相関が認められていたタンパク質について抑制実験および免疫染色を施行した。昨年度までに実施した抗体ライブラリーを用いた実験において、核酸配列からは推定されない分子量で存在するタンパク質が肝細胞癌の腫瘍組織で多く認められていた。腫瘍組織で選択的に切断されているタンパク質を網羅的に調べるために、GeLC-MS/MSによる実験を行い、構造異常を来たしたタンパク質の同定を試みた。

A. 研究目的

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

プロテオームはゲノムの機能的翻訳産物なので、バイオマーカーや治療標的を探索するうえで有用なリソース

である。肝細胞癌症例において腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差を示すタンパク質、早期再発に関わるタンパク質は診断のためのバイオマーカーや創薬のための分子標的の候補とみなすことができる。そのようなタンパク質を探索するためのプロテオーム解析は盛んに行われており、多数の論文が発表されている。しかしながら、臨床応用にはいたった例はなく、より一層の研究が必要とされている。

本研究では国立がんセンターで開発された定量性の高いプロテオーム解析の技術と、同センターで手術を受けた肝細胞癌症例の十分な数の手術検

体を用いた実験を行い、診断技術や創薬に有用なタンパク質の同定を行うことを目的とする。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院にて手術を受けた肝細胞がん症例を対象とし、切除され保管されていた手術検体を使用した。大型の二次元電気泳動装置、特異抗体、質量分析などによってタンパク質発現プロファイルを作成し、肝細胞癌の悪性度に関わるタンパク質を検出した。また、同定されたタンパク質の肝細胞癌細胞における機能を調べる目的で siRNA を用いた抑制実験を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

蛍光二次元電気泳動法で得られたデータから、門脈侵襲陽性の症例の原発腫瘍組織で高い発現を示すが、門脈侵襲陰性の症例の原発腫瘍組織では背景肝組織と変わらない発現を示すタンパク質を選択した。選択したタンパク質は複数の悪性腫瘍において悪性度との関わりが報告されていたが、肝細胞癌においては報告がなかった。抑制実験を施行したところ、腫瘍細胞の

増殖には影響がなく、浸潤を促進する役割を担っていることが分かった。抗体を用いた発現解析の結果を質量分析で検証するために、正常組織、非腫瘍組織、腫瘍組織（門脈侵襲陽性症例、陰性症例）を GeLC-MS/MS で調べた。抗体実験で同定されたバイオマーカー候補の一部は質量分析による実験でも再現された。転写因子のあるものが、配列からの予測より小さい分子量で、特に悪性度の高い症例の原発腫瘍組織で存在することが分かった。また、質量分析を用いた解析から、予測されない分子量で発現するタンパク質が腫瘍組織で多数存在することが新たに分かった。そのようなタンパク質のデータを解析するための手法の開発に着手した。

D. 考察

門脈侵襲に関わるタンパク質をプロテオーム解析で見出した。発現解析と機能解析を継続し、これらのタンパク質が本研究の目的とするバイオマーカーあるいは創薬標的分子となりうるかどうかを検討する。

E. 結論

当初の計画通り、バイオマーカー候補および創薬標的候補を同定することができた。平成24年度は視点を変えた網羅的解析を実施し、同時に同定したタンパク質の機能解析を実施する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uhlén M, Oksvold P, Algenäs C, Hamsten C, Fagerberg L, Klevebring D, Lundberg E, Odeberg J, Pontén F, Kondo T, Sivertsson A. Antibody-based Protein Profiling of the Human Chromosome 21. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Mar;11(3):M111.013458.
2. Morofuji N, Ojima H, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Asahina D, Ushigome M, Hiraoka N, Nagino M, Kondo T. Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J Proteomics*. 2012 Feb;16(5):1577-89.
3. Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *J Proteomics*. 2012 Feb 2;75(4):1401-10.
4. Kikuta K, Kubota D, Saito T, Orita H, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Katai H, Shimada Y, Toyama Y, Sato K, Yao T, Kaneko K, Beppu Y, Murakami Y, Kawai A, Kondo T. Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor. *J Proteomics*. 2012 Feb 2;75(4):1089-98.
5. Hosako M, Muto T, Nakamura Y, Tsuta K, Tochigi N, Tsuda H, Asamura H, Tomonaga T, Kawai A, Kondo T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics*. 2012 Jan 4;75(3):833-44.
6. Kubota D, Orita H, Yoshida A, Gotoh M, Kanda T, Tsuda H, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Pftin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol*. 2011 Oct;41(10):1194-202.
7. Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer*. 2011 Oct 1;117(19):4396-405.
8. Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, Sugihara Y, Sakamoto K, Kobori Y, Palmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, Tanaka H, Mizushima H, Fujita S, Kondo T. Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteomics*. 2011 May 16;74(6):858-73.
9. Suehara Y, Tochigi N, Kubota D, Kikuta K, Nakayama R, Seki K, Yoshida A, Ichikawa H, Hasegawa T, Kaneko K, Chuman H,

- Beppu Y, Kawai A, Kondo T. Secernin-1as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics. *J Proteomics*. 2011 May 16;74(6):829-42.
10. Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*. 2011;78(1):1-9.
 11. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:780836.
 12. Hagiwara T, Saito Y, Nakamura Y, Tomonaga T, Murakami Y, Kondo T. Combined use of a solid-phase hexapeptide ligand library with liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis for intact plasma proteomics. *Int J Proteomics*. 2011;2011:739615.
- 2. 学会発表**
1. 近藤格 A linkage application of multi-dimensional chromatography, solid-phase peptide ligand library, two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry towards plasma biomarker development. H P L C 研究会、ブタペスト・ハンガリー
 2. プロテオーム解析によるがんバイオマーカー解析 (シンポジウム)、日本プロテオーム学会、新潟
 3. 近藤格 SOLID-PHASE HEXAPEPTIDE LIGAND LIBRARY WITH LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TWO-DIMENSIONAL DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS FOR INTACT PLASMA PROTEOMICS. ヒトプロテオーム機構年会、ジュネーブ、スイス
 4. 近藤格 Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine. 東・中央ヨーロッパプロテオーム学会、プラハ、チェコ
 5. 近藤格 Proteomic Study of Malignant Pleural Mesothelioma by Laser Microdissection and Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis: Cathepsin D as a Novel Candidate for a Differential Diagnosis Biomarker. 結合組織腫瘍学会、シカゴ、米国
 6. 近藤格 Proteomics application for sarcoma: The symposium of therapy and diagnosis of bone and soft tissue neoplasm in upper extremity. 手外科研究所、上海、中国
 7. 近藤格 Cancer Proteomics for Biomarker Development toward Personalized Medicine. 日本癌学会学術総会、名古屋
 8. 近藤格 プロテオーム解析による個別

化医療のためのバイオマーカー解析、
日本臨床検査学会、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

- 1) 発明の名称：「APC-binding protein EB1 を用いた大腸癌の診断、治療法」
- ①発明者：近藤格、藤田伸、谷口浩和、杉原豊
- ②出願日：2011年4月21日
- ③出願番号：特願2010-094972
- ④出願人：国立がん研究センター、バイオマトリックス研究所
- ⑤発明の内容の概略：大腸癌の診断、治療法の開発に有用なタンパク質を見出した。

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

菊田一貴 日本プロテオーム学会奨励賞
「骨肉腫、Ewing 肉腫の個別化医療を目指したバイオマーカー開発のためのプロテオーム解析」

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

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

研究要旨

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

A. 研究目的

前年度までに mTRAQ 法を利用したリン酸化ペプチドの内部標準化、3 連 4 重極型質量分析計による MRM 解析を高感度に行うための最適パラメーターの予測アルゴリズムの開発、さらには HPLC 保持時間の相対位置情報化などの要素技術開発を行い、大規模にリン酸化 MRM 解析を実行可能なプラットフォームの構築に成功した。

このようにリン酸化の大規模 MRM 法を行うために必要と考えられる要

素技術はすべて揃ったが、これを実際の研究の現場で利用するためには、簡便で迅速なメソッド構築の手立てが必要である。本年度は、これまで開発してきた要素技術をつなぐ情報処理技術の開発を行い、完全に実用可能な Phospho-MRM 法のための解析プラットフォームの構築を行った。

B. 研究方法

本年度はこれまで当研究室で取得した iTRAQ 標識リン酸化ペプチドの

MS/MS データ（約 30000 種類のリン酸化ペプチド情報）を格納するデータベースに前年度確立した要素技術を利用するための情報処理ツールを実装させ、一度の分析で最大 2500 トランジクションを同時計測できる **scheduled MRM** メソッドを自動生成できる仕組みを完成させた。さらに、得られた大量の **MRM** クロマトグラムを解析するための情報処理技術の開発にも着手した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1) **MRM-transition database ver.2** の構築

これまで当研究室で独自に取得した約 30000 種類の **iTRAQ** 標識リン酸化ペプチド情報を格納するデータベースを構築している。本年度はこれをヒトプロテオームワイドな **MRM** 情報（こちらも独自取得）と統合した、**MRM transition db ver.2** の構築を行った。本バージョンでは昨年度開発した高感度 **MRM** を実行するために必要な各種パラメーター計算アルゴリズムや保持時間予測システムなどが実装されており、より高機能なデータベースとして進化している。リン酸化ペプチド同定の際に保持時間マーカーを混合しておけば、リン酸化ペプチドの保持

時間をマーカーとの相対位置情報としてデータベースに格納できる。これによって、サンプルの測定前に、一度保持時間マーカーの溶出プロファイルを取得すれば、これを元に予測された保持時間や最適パラメーターを付与された **MRM** トランジクションファイルが出力される仕様となっている。

2) 定量データの管理データベースの構築

上記のように **MRM** を高感度かつ大規模に行うためのプラットフォームは完成させることができたが、定量値を得るためには実際の測定で得られる大量の **MRM** クロマトグラムを解析擦る必要がある。現在、質量分析メーカー等で提供される定量ソフトにおける自動ピーク判定が不完全であるため、手作業による確認が必要となり、これには多大な労力を要する。さらに、大規模な **MRM** 解析では独自フォーマットのトランジクション ID を付加しているため、各ペプチドのアノテーション（タンパク質や遺伝子情報との紐付け）が必要となる。このような問題点を解決するために、独自のアルゴリズムを実装した定量ソフトの開発や得られた定量結果を効率良く処理・管理できるデータベースの構築を行った。定量ソフトに関しては現在最適化を実行中であるが、定量結果格納データベースは既に完成しており、市販のソフトウェア(**MultiQuant**)で得られる定量結果を自動読み込みし、遺伝子あるいはタンパク質情報を元にグルー

プ化して表示できる。また、内部標準量を入力することで絶対量への換算も自動で行うことが可能である。

D. 考察

本年度は Phospho-mTRAQ 法を実施するためにこれまで開発してきた要素技術を統合し、実際に利用できる環境整備を行った。現在、特定の遺伝子名を入力すれば scheduled MRM 測定のためのメソッドファイルを生成することができるため、これまで多大な時間を要していた MRM 測定のためのメソッド開発の過程が事実上消失した。また、得られる大量の定量情報の管理を効率化することに成功した。しかしながら、MRM クロマトグラムの精査には相変わらず多大なる時間と労力を要しており、ピーク自動検出の精度向上が必須である。本年度からピーク自動検出のためのアルゴリズム開発も進めているが、多くのノイズを含むクロマトグラムの完全自動解析への道のりは予想以上に長く、さらなる工夫が必要である。

MRM によるリン酸化ペプチドの解析を実行する上での今後の課題は堅牢性の向上と絶対的な高感度化である。より精度の高い定量を行うためには、同一サンプルの複数回の計測が必要となる。また、超微量のリン酸化ペプチドの検出にはある程度の試料導入量の増加が必要である。このような稼働状況は装置の汚染を招き感度低下も否めない。

今後、新たな質量分析計の開発などに期待するとともに、試料の前処理や LC への導入法などに関してさらなる技術開発が必要であると思われる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lu, C., *et al.* miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27^{kip1}, KPC1, and SOCS-1. *Blood* **117**, 4293-4303 (2011).
2. Matsumoto, A., *et al.* Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of "stemness" and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 13754-13764 (2011).
3. Matsumoto, A., *et al.* Fbxw7 β resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci.* **102**, 749-755 (2011).

4. Tachiyama, R., *et al.* Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells* **16**, 448-466 (2011).
5. Inoue, S., *et al.* Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**, 117-128 (2011).
6. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Impaired ovarian development and reduced fertility in female mice deficient in Skp2. *J. Anat.* **218**, 668-677 (2011).
7. Chow, C., *et al.* Regulation of APC/C^{Cdc20} activity by RASSF1A-APC/C^{Cdc20} circuitry. *Oncogene* (2011).
8. Yu, Z., *et al.* Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. *Bipolar Disord.* **13**, 486-499 (2011).
9. Zou, P., *et al.* p57^{Kip2} and p27^{Kip1} cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* **9**, 247-261 (2011).
10. Matsumoto, A., *et al.* p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 262-271 (2011).
11. Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K. & Nakayama, K.I. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *Cell Metab.* **14**, 339-351 (2011).
12. Matsumoto, A., *et al.* Deregulation of the p57-E2F1-p53 axis results in nonobstructive hydrocephalus and cerebellar malformation in mice. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4176-4192 (2011).
13. Okumura, F., Okumura, A.J., Matsumoto, M., Nakayama, K.I. & Hatakeyama, S. TRIM8 regulates Nanog via Hsp90 β -mediated nuclear translocation of STAT3 in embryonic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1784-1792 (2011).
14. Fuster, J.J., *et al.* Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2455-2463 (2011).
15. Matsuzaki, F., Shirane, M., Matsumoto, M. & Nakayama, K.I. Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4602-4620 (2011).
16. Rodriguez, S., *et al.* The SKP2 E3 Ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of hematopoietic stem cells. *Blood* in press. (2011).
17. Ellman, M.B., *et al.* The pathophysiological role of the PKC δ pathway in the intervertebral disc: In vitro, ex vivo and in vivo studies.

- Arthritis Rheumat.* in press. (2011).
18. Sistrunk, h., Macias, E., Nakayama, K.I., Kim, Y. & Rodriguez-Puebla, M.L. Skp2 is necessary for Myc-induced keratinocyte proliferation but dispensable for Myc oncogenic activity in the oral epithelium. *Am. J. Pathol.* in press. (2011).
 19. Bargagna-Mohan, P., *et al.* Corneal antifibrotic switch identified in genetic and pharmacological deficiency of vimentin. *J. Biol. Chem.* **287**, 989-1006 (2012).
 20. Nishiyama, M., Skoultchi, A.I. & Nakayama, K.I. Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt- β -catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 501-512 (2012).
 21. Oshikawa, K., Matsumoto, M., Oyamada, K. & Nakayama, K.I. Proteome-wide identification of ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin. *J. Proteome Res.* **11**, 796-807 (2012).
 22. Kanie, T., *et al.* Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 590-605 (2012).
 23. Suzuki, S., *et al.* The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice is canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2^{-/-} p27^{-/-} mice. *PLoS One* in press. (2012).
 24. Ishikawa, Y., *et al.* Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth-differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* in press. (2012).
 25. Kita, Y., Nishiyama, M. & Nakayama, K.I. Identification of CHD7S as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7L. *Genes Cells* in press. (2012).
 26. Liu, N., *et al.* Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. *EMBO J.* (2012).
 27. Chan, C.-H., *et al.* The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, Herceptin sensitivity and tumorigenesis. *Cell* in press. (2012).
2. 学会発表
 1. 中山敬一: 次世代プロテオミクスによるユビキチンシステムの全貌解明. 第28回日本医学会総会. (シンポジウム) 東京.4/9 (2011).
 2. Moroishi, T., Nishiyama, M., Yumimoto, K., Matsumoto, M., Iwai, K., Nakayama, K.I.: Loss of Fbx15 results in deregulation of iron metabolism in mice. *Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family"*. Cold Spring Harbor, NY.5/18 (2011).
 3. Kanie, T., Onoyama, I., Matsumoto, A., Nakayama, K.I.: Genetic reevaluation of the role of four F-box

- proteins in cyclin D1 degradation. *Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family"*. Cold Spring Harbor, NY.5/18 (2011).
4. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomic analysis. *Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family"*. (Invited speaker) Cold Spring Harbor, NY.5/18 (2011).
 5. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Nagai, R., Imaizumi, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7 controls mesenchymal differentiation through degradation of functionally related transcription factors. *Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family"*. Cold Spring Harbor, NY.5/19 (2011).
 6. Nakayama, K., Onoyama, I., Matsumoto, A., Ishikawa, Y., Aoyama, S., Nakayama, K.I.: Tissue-specific functions of Fbxw7 revealed by conditional gene targeting in multiple organs. *Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family"*. Cold Spring Harbor, NY.5/19 (2011).
 7. Wei, W., Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., Aster, J., Settleman, J., Gygi, S.P., Kung, A.L., Look, T., Nakayama, K.I., DePinho, R.A.: SCFFbw7 regulates cellular apoptosis by targeting Mcl-1 for ubiquitination and destruction. *Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family"*. (Invited speaker) Cold Spring Harbor, NY.5/21 (2011).
 8. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロッティングは要らない?! . *第11回日本分子生物学会春季シンポジウム*. (招待講演) 金沢.5/26 (2011).
 9. 中山敬一: 癌幹細胞性に必要なG0期維持機構. *第15回日本がん分子標的治療学会*. (招待講演) 東京.6/24 (2011).
 10. Shiromizu, T., Narumi, R., Kuga, T., Adachi, J., Matsubara, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Tomonaga, T.: Large scale phosphoproteomic analysis of colon cancer metastasis. *第63回日本細胞生物学会大会*. 札幌.6/27 (2011).
 11. 中山敬一: Cell cycle and cancer stem cells. *第17回日本遺伝子治療学会学術集会*. (教育講演) 福岡.7/17 (2011).
 12. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロッティングは要らない?! . *がん若手研究者ワークショップ*. (特別講演) 茅野.9/1 (2011).
 13. 中山敬一: 細胞周期と癌幹細胞. *第70回日本癌学会学術総会*. (シンポジウム) 名古屋.10/3 (2011).
 14. Matsumoto, A., Takeishi, S.,

- Nakayama, K.I.: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest*. Onna, Okinawa, Japan.10/26 (2011).
15. Nakayama, K.I.: Road to absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. *The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest*. (Invited speaker) Onna, Okinawa, Japan.10/26 (2011).
16. 中山敬一: がん幹細胞の細胞周期制御機構の解明に基づく治療法の開発. *第49回日本癌治療学会学術集会*. (パネルディスカッション) 名古屋.10/27 (2011).
17. Nakayama, K.I.: Road to Human Proteome Project: Absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. *France-Japan Cancer Meeting*. (Invited speaker) Montpellier, France.11/24 (2011).
18. 大西隆史, 白根道子, 中山敬一: Identification and functional analysis of novel protrudin isoform. *第34回日本分子生物学会年会*. 横浜.12/13 (2011).
19. 山村聡, 弓本佳苗, 松本雅記, 今泉和則, 中山敬一: Fbxw7 controls mesenchymal differentiation through degradation of functionally related transcription factors. *第34回日本分子生物学会年会*. 横浜.12/13 (2011).
20. 白根道子, 中山敬一: Protrudin regulates vesicular trafficking in neurons via interaction with PtdIns5P. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/13 (2011).
21. 沖田康孝, 松本有樹修, 中山敬一: Fbxw7A regulates the maintenance and differentiation of neural stem cells. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/13 (2011).
22. 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: Ablation of Fbw7 eliminates leukemia stem cells by preventing quiescence. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/13 (2011).
23. 松本有樹修, 武石昭一郎, 中山敬一: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/13 (2011).
24. 柚木克之, 久保田浩行, 豊島有玲, 野., 曾我朋義, 松本雅記, 中山敬一, 黒田真也: A trans-omics analysis of insulin-stimulated Fao rat hepatoma cell. *第34回日本分子生物学会年会*. 横浜.12/14 (2011).
25. 中山敬一, 松本雅記: Road to absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. *第34回日本分子生物学会年会*. (シンポジウム) 横浜.12/14 (2011).
26. 黒田真也, 柚木克之, 久保田浩行, 曾我朋義, 松本雅記, 中山敬一: An

- automatic and unbiased identification of insulin signaling dependent metabolic control pathway by metabolome and phospho-proteome analysis. *第34回日本分子生物学会年会*. (シンポジウム) 横浜.12/14 (2011).
27. 松崎美美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一: Protrudin-KIF5 complex contributes to vesicular transport during neuritogenesis. *第34回日本分子生物学会年会*. 横浜.12/15 (2011).
28. 村上裕輔, 前田武志, 岸ちひろ, 松本雅記, 中山敬一, 塩見泰史, 西谷秀男: Protection of licensing factor Cdt1 from degradation in M phase by mitotic kinase Plk1 and Cdk1-CyclinB phosphorylation. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
29. 細田將太郎, 白根道子, 中山敬一: The mitochondrial protein translocation from mitochondria in mitophagy. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
30. 諸石寿朗, 西山正章, 武田有紀, 岩井一宏, 中山敬一: The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
31. 西山正章, 中山敬一: Histone H1 recruitment mediated by CHD8 is essential for suppression of Wnt/beta-catenin signaling pathway. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
32. 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: Long isoform of chromatin remodeling factor CHD8 is necessary for development and cell differentiation. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
33. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 立石悠基, 小野山一郎, 三森功士, 森正樹, 中山敬一: Promotion of cancer metastasis by deletion of Fbxw7 in host environment. *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
34. 藤兼亜耶, 早川浩, 伊東理世子, 中山敬一, 関口睦夫: Specific binding of human proteins to 8-oxoguanine-containing RNA. *第34回日本分子生物学会年会*. 横浜.12/16 (2011).
35. 立石悠基, 蟹江共春, 松本有樹修, 中山敬一: Generation and characterization of mice lacking all CIP/KIP CDK inhibitors (p21/p27/p57). *第34回日本分子生物学会年会*. (一般講演) 横浜.12/16 (2011).
36. 中津海洋一, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: mTOR regulates transcription through FOXK1 phosphorylation. *第34回日本分子生物学会年会*. (ワークショップ) 横浜.12/16 (2011).

37. 中山敬一: Next-generation proteomics and its application to biology and medicine: Say good-bye to western blotting. **第9回心血管幹細胞研究会**. (Keynote Lecture) 東京.1/13 (2012).
38. 中山敬一: がん幹細胞と細胞周期: "G0期追出し療法"によるがん根治の可能性. **第3次 対がん10か年総合戦略・文科省がん研究支援活動合同公開シンポジウム**. (招待講演) 東京.1/31 (2012).
39. Nakayama, K.I.: Cell cycle, metabolism, and signal transduction in cancer revealed by next-generation proteomics. **2012 American Association for Cancer Research Annual Meeting**. (Invited speaker) Chicago, USA.3/31 (2012).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」

氏名	所属	職名
分担研究者 黒光貞夫、鞍馬岳吏	アステラス製薬	室長、主管研究員

研究要旨

肝細胞癌及びスキルス胃がんでの有用性の高い（発現の高特異性・高頻度、癌細胞増殖・生存に関わる機能を有する）創薬バイオマーカー探索を目的に、ゲノムDNAディープシーケンシング解析より遺伝子変異の抽出とその機能・発現解析を国立がんセンターと共同で実施している。キナーゼ分子種の遺伝子変異に注目して、肝癌細胞株及びスキルス胃がん細胞株のゲノムDNAシーケンスから見出したキナーゼ遺伝子変異について、その機能解析を実施してきた。今年度、既知キナーゼ活性化変異の構造情報を基にした活性化変異の予測アルゴリズムを改変し、肝細胞癌臨床検体及びスキルス胃がん細胞株のゲノムDNAディープシーケンシングより見出したキナーゼ遺伝子変異を解析、その機能解析を国立がんセンターと共同で実施した。

A. 研究目的

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

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

合キナーゼを含む構造・配列変異キナーゼを種々の解析方法を用いて探索することが世界的に盛んになってきた。

本研究では、キナーゼ遺伝子に着目したゲノムDNAディープシーケンシング解析を行い、直接的に変異キナーゼ遺伝子を検出、その機能解析を行って、癌細胞の増殖や生存に機能的に重要な癌特異的な遺伝子変異の探索を行う。

前年度は、肝癌細胞株のゲノムDNAディープシーケンスを行って見出したキナーゼ遺伝子点変異、及びスキルス胃がん細胞株で見出した融合遺伝子変異の機能解析を行ってきた。

今年度は、既知キナーゼ活性化変異の構造情報を基にした活性化変異の予測アルゴリズムを改変し、肝細胞癌臨床検体及びスキルス胃がん細胞株のゲノムDNAディープシーケンシングより見出したキナーゼ遺伝子変異を解析、その機能解析を実施した。本手法によって、新たな診断且つ治療に有用な標的分子の同定を目的とする。

B. 研究方法

肝細胞癌臨床検体 20 症例の癌部、非癌部のゲノムDNAのうち、全キナーゼ関連遺伝子 513 遺伝子にフォーカスしたディープシーケンシング解析データおよびその変異候補情報を国立がん研究センター研究所にて取得した。

スキルス胃がん細胞株 HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60, HSC64, NUGC-3, NUGC-4, AZ521, HGC27, okajima, KATO-III の 14 株のゲノムDNAのディープシーケンシング解析データを国立がん研究センター研究所にて取得した。

アステラス製薬においては前年度のキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムに、新たな既知キナーゼ遺伝子活性化変異と構造的な位置情報を付加し改変したアルゴリズムを用い、上記の変異配列情報を解析して、活性化変異候補を抽出した。その後、当該変異配列の mRNA レベルでの発現検討、そして当該変異配列を発現する細胞株での腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を

検討した。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることがないように匿名化が厳重に行われるように配慮したがん患者の手術検体を用いた。また、本共同研究は国立がんセンターの倫理委員会およびアステラス製薬の倫理委員会において審査・承認された。

C. 研究結果

肝細胞癌症例 20 例の癌部、非癌部における全キナーゼ遺伝子のゲノムDNAディープシーケンシング解析から変異配列候補を抽出した。癌部選択的な発現を示すキナーゼに着目し、改変したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムにより活性化変異候補キナーゼ A (V2220G) 変異、キナーゼ B (K1172E) 変異を抽出した。しかしながら、キナーゼ A (V2220G) 変異はゲノムDNAレベルでは存在するが mRNA 発現が認められなかったため、更なる解析を中止した。

キナーゼ B (K1172E) 変異に関しては肝細胞癌臨床検体のゲノムDNAの解析において、20 例中 1 例で癌部選択的に変異が確認され、更に mRNA レベルで変異の存在が確認された。腫瘍増殖ドライバーとしての可能性を検討するために、肝癌細胞株 20 株

(Alexander, HepG2, HepG2(C3A), HLE, HLF, HuH1, HuH6, HuH7, JHH1, JHH4,

JHH5, JHH7, Kim1, SK-Hep1, SNU182, SNU378, SNU398, SNU423, SNU449, SNU475) について当該変異遺伝子の内在的な発現の有無を解析した。しかしながら今回解析した細胞株において、当該変異遺伝子を発現する株は認められなかった。臨床検体におけるキナーゼ B (K1172E) 変異の頻度は 20 例中 1 例であり、腫瘍増殖ドライバーとしての機能を検討するための内在発現細胞株が得られなかったことより、更なる解析を中止した。

スキルス胃がん細胞株 14 株の全キナーゼ遺伝子のゲノム DNA ディープシーケンシング解析から変異配列候補を抽出した。改変したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムにより既知の PIK3CA (E542K) 及び PIK3CA (E545K) 活性化変異が HGC27 及び HSC-59 細胞株にてコードされていることを検出した。更に、Okajima 株におけるキナーゼ C (R31G 及び L166R) 変異、AZ521 株におけるキナーゼ D (H176Q) 変異、HSC-59、AZ521 株におけるキナーゼ E (P469L) 変異、AZ521 株におけるキナーゼ F (T98M) 変異、HSC-58 株におけるキナーゼ G (E561G) 変異を抽出した。

これら変異の mRNA レベルでの発現を確認したところ、キナーゼ C (R31G 及び L166R) 変異を除く 4 キナーゼ変異について各細胞株で mRNA レベルでの存在が確認された。

そこで、これら変異遺伝子の腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討するために、当該発現細胞株での siRNA

実験による発現抑制実験を実施した。

その結果、キナーゼ D (H176Q) 変異を発現する AZ521 株および野生型を発現する Okajima 株において、キナーゼ D の発現抑制は同程度に部分的な増殖抑制を示し、変異キナーゼを発現する AZ5221 株に対し、特に顕著な増殖抑制を示す傾向は認められなかった。

キナーゼ E (P469L) 変異を発現する HSC-59 株においてキナーゼ E の発現抑制は顕著な細胞増殖抑制を示さず、変異型を発現する AZ521 株および野生型を発現する HSC-58 株においては同程度に軽微な細胞増殖抑制を示すのみであった。

キナーゼ F (T98M) 変異を発現する AZ521 株および野生型を発現する HSC-58、HSC-59 株においてキナーゼ F の発現抑制は同程度に部分的な増殖抑制を示し、変異キナーゼを発現する AZ5221 株に対し、特に顕著な増殖抑制を示す傾向は認められなかった。

キナーゼ G (E561G) 変異を発現する HSC-58 株においてキナーゼ G の発現抑制は顕著な細胞増殖抑制を示さなかった。

D. 考察

スキルス胃がん細胞株で見出したキナーゼ D (H176Q) 変異、キナーゼ E (P469L) 変異、キナーゼ F (T98M) 変異、キナーゼ G (E561G) 変異は当該発現細胞株での発現抑制、また野生型発現細胞株での発現抑制による細胞増殖阻害の強度の比較を行った結果、いずれの変異ともに強力な腫瘍増殖ド

ライバー変異として機能していない
と結論した。

E. 結論

改変したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムを用い活性化変異キナーゼを抽出可能であることは示された。しかしながら、現アルゴリズムによる予測においては false-positive も数多く抽出され、ディープシーケンシングにより検出される変異から効率よく活性化変異を予測、抽出する為に、更なるアルゴリズムの改良が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

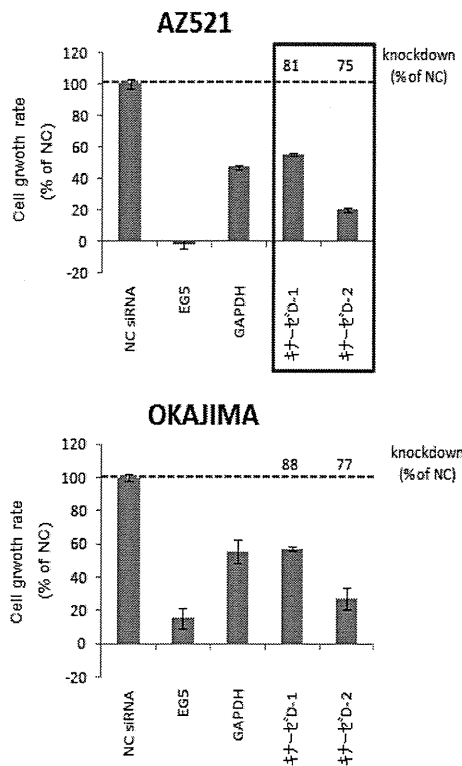
G. 研究発表

特になし

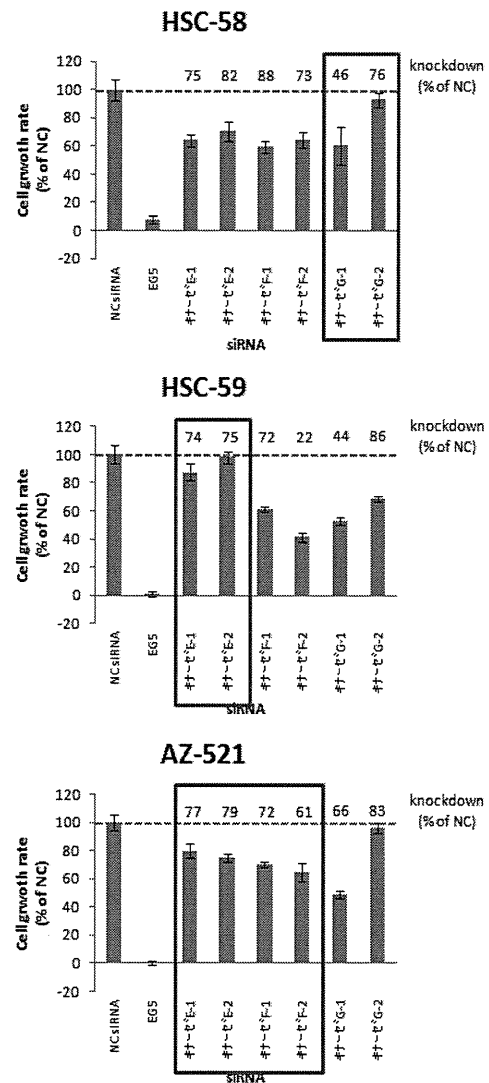
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

☒ 1



☒ 2



Cell growth rate は、CellTiter Glo (Promega)で細胞数指標を取り、negative control siRNA を導入した細胞群の四日目の細胞数から siRNA を導入した日の細胞数を引いた値を 100%とする。従って、0% は細胞死を示唆する。

EG5, G3PDH に対する siRNA は本実験の細胞増殖抑制およびトランスフェクションのポジティブコントロールとして使用した。