

201107006A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 24 (2012) 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23年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 山西 弘一

平成24(2012)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検証 -----	40
朝長 毅	
2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究 -----	53
角田 慎一	
3. プロテオミクス手法による新規癌抗原探索基盤技術の 開発と治療法開発への応用 -----	63
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 -----	71
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 -----	80
平野 久	
6. 2DICAL 法による微量タンパク質解析技術の研究 -----	87
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 -----	92
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 -----	97
高坂 新一	
9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来 DNA の研究 -----	101
加藤 菊也、宮本 泰豪	
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 -----	106
野村 文夫	
11. 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悪性グリオーマ幹細胞関連 分子群の解析 -----	116
荒木 令江	
12. 自己抗体による難治性がん早期診断技術の開発と がん治療標的分子の探索研究 -----	123
中村 和行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	131
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	141

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

これまで、ヒト臨床検体を用いた大規模なバイオマーカー探索を行い、大腸癌・乳癌組織のリン酸化タンパク質や膜タンパク質のプロテオーム解析によって、数千個のタンパク質の同定、その中でそれぞれ数十～数百個前後のバイオマーカー候補タンパク質の同定に成功した。本年度は、それらのバイオマーカー候補タンパク質について、SRM/MRM法を用いた大規模検証を行った。また、血漿中に微量に存在するタンパク質をSRM/MRM法を用いて感度良く安定して測定するための条件検討を行い、アルツハイマー病のサロゲートバイオマーカー候補ペプチドである APL1 β が血漿中に数 pg/ml という超微量の濃度で存在することを明らかにした。

2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究：角田慎一

本研究では、がんをはじめとする各種細胞から生理的機構で分泌され、分泌細胞由来の機能性分子を含有することが近年明かとなってきた膜小胞、exosomeに着目したバイオマーカー探索と、その有用性の検討を進めている。Exosomeは、血中に多量に存在する主要タンパク質から容易に分離でき、がん細胞由来の膜タンパク質などの分子が搭載されている。また、がん患者の血液中には、健常人と比べて多くの exosome が存在することも報告されているなど、バイオマーカータンパク質の探索対象として有望と考えられる。本年度は、血液診断が可能な新規肺がんバイオマーカータンパク質の探索を目的に、培養肺がん細胞分泌 exosome のプロテオーム解析を試み、候補分子として CNTN-1、EphA2 を見出した。

3. プロテオミクス手法による新規癌抗原探索基盤技術の開発と

治療法開発への応用：仲 哲治

癌細胞表面に特異的に発現するタンパク質を同定することは抗体医薬品開発における標的を探索する上で重要であるが、癌抗原を同定する効率的な手法は確立されていない。本研究では子宮内膜癌に対して定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)を用いて細胞表面膜タンパク質を定量的に解析する基盤技術の確立を試みた。本手法により同定された創薬標的候補分子の1つとして Bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)を同定した。BST2は82%の子宮内膜癌患者組織で高発現を示したのに対し、正常子宮内膜組織の発現頻度は19%であり、BST-2は正常組織と比較して癌組織で優位に高発現を示した。続いて抗体医薬品の標的としてのBST2の有用性をin vitro, in vivoで解析した。その結果、抗BST2抗体は子宮内膜癌細胞株に対して、ADCC活性とCDC活性を介して抗腫瘍効果を示した。さらに、抗BST2抗体による抗腫瘍効果をSCIDマウスに子宮内膜癌細胞株(SNG-II、HEC88nu)を皮下移植したゼノグラフトモデルに対して、検証した結果、抗BST2抗体は

コントロール抗体、および PBS 投与群のいずれに対しても優位な抗腫瘍効果を示した。さらに、抗 BST2 抗体は NOD/SCID マウスに対しては抗腫瘍効果を示さなかったことから、in vivo においては ADCC を介して抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。

本研究により BST-2 が子宮内膜癌の抗体医薬品標的分子として有用であることが示唆された。また、プロテオミクス手法による細胞表面膜タンパク質の網羅的定量解析が新規癌抗原を探索する基盤技術として有用であることが示唆された。

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一点にかかっていると看做しても過言ではない。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

卵巣漿液性腺癌、粘液性腺癌および明細胞腺癌由来の細胞株が、細胞培養液に分泌するタンパク質をショットガン解析により比較し、明細胞腺癌細胞株群に特徴的に分泌（放出）されるタンパク質を同定した。培養細胞からタンパク質は、生体内で癌細胞から疾患によって分泌される可能性が高い。実際に ELISA によって、明細胞腺癌関連分泌タンパク質の中には、血清でも明細胞腺癌により特徴的な発現変動を示す診断マーカー候補タンパク質が高い確率で見いだされた。また、現段階では、予め免疫沈降によって濃縮精製する必要があるが、明細胞腺癌関連分泌タンパク質を多重反応モニタリング (MRM) によって定量的に検出できることがわかった。

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 を用いて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、国立がん研究センター、プロテオームリサーチセンターで解析し検出された腎癌血漿バイオマーカーの検証を終了し、英文論文として発表した。また、前立腺癌の血漿バイオマーカーの検出にも成功し、検証実験が終了、現在英文学術誌に投稿中である。本年度より肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカー探索のために、肝細胞癌と非癌部肝組織のプロテオームとリン酸化プロテオームの 2DICAL による解析を開始した。

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の技術的基盤はかなり前進したが更なる改良が必要であり、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、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、イヌの機械的刺激性心不全モデルの経時的発症変化を追跡する心組織のプロテオーム解析を医薬基盤研究所と共同して進め、バイオマーカー候補タンパク質を見出した。また、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た解析を ETD 法と CID 法を併用して検討し、細胞培養上清に適用して解析を実施した。

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、採取後の迅速な処理が検体の質を担保するために不可欠であることから、専属のコーディネータによって採取時の処理を行う体制を病院と連携して確立し、今年度は150検体以上の髄液を確保した。また、絶食が髄液たんぱく組成に影響するかどうかを確かめるために、同一患者の前日22時以降絶食（朝食抜き、午前中採取）と昼食後（午後2時採取）で比較したところ、同定できた約550種の髄液タンパク質のうち、2倍以上変動したものが75種（13.6%）、1.7倍以上変動したもの（25.8%）であり、食事の影響が大きいことが判明した。これは髄液採取における条件設定に食事の情報を加味することが不可欠であることを意味している。

9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来DNAの研究：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。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-(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。そこで今年度は、ELISA法などを用いた臨床応用に向けて、ST1Hを認識する単クローン抗体を作成し、それらの特異性などを検討した。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11種類のクローンを得た。ただし、これらのクローンは癌組織を用いた免疫組織化学法では陽性シグナルを得ることができなかった。今後は、これらの抗体の詳しい性状を調べ、血清ELISAに使用できるか否かを検討するとともに、ST1Hを検出する他の方法も検討する必要がある。また、膵臓癌、前立腺癌の糖鎖構造解析において、一部の症例の癌細胞中に、多量の遊離糖鎖が蓄積していることが判明した。詳細な構造を解析した結果、complex-typeのN型遊離糖鎖である NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man α 1-4GlcNAc が最も多く存在していた。遊離糖鎖のマーカーとしての意義も検討を要する。

血液中に存在する腫瘍細胞由来遊離DNAは腫瘍マーカーとして大きな可能性を持っているが、微量であるため検出が難しい。このため現在最も高感度と思われるBEAMing法を確立し、肺がん由来のEGFR変異検出を試みた。EGFR-TKI適用患者を決めるため変異検査は進行肺がんでは必須だが、生検による腫瘍採取は技術的に難しく、血液検査等の非侵襲性検査は臨床上的有用性が極めて高い。原発巣でEGFR変異を確認した患者44症例の血液で検証したところ、活性化変異が72.7%、耐性変異がおよそ87%の患者で検出できた。これはは実用化に向けて有望な結果である。今後検出装置を次世代シーケンサーにかえて検証試験を行う予定にしている。

10. MALDI-TOF MSによる慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者血清のプロテオーム・ペプチドーム解析・Three-Stepプロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証：野村文夫

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（以下CTEPH）は、肺動脈内が器質化した血栓により閉塞し肺高血圧症を呈する疾患である。現行の診断方法には高コスト、侵襲性の高さなど問題があり、簡便な血清マーカーの開発が望まれている。そこで血清ペプチドの網羅的解析を行い、CTEPH診断のための新規血清マーカー探索を行った。千葉大学医学部附属病院呼吸器内科を受診した34人のCTEPH患者を対象に、Burkar Daltonics社のClinProtTMシステムを用いて、MALDI-TOF MSによる血清プロテオーム・ペプチドーム解析を行った結果、2,989DaのフィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドがCTEPHの血清マーカーとなる可能性が示された。

習慣飲酒量を反映するいわゆる飲酒マーカーとして血清 γ -GTP, 糖鎖欠損トランスフェリンなどがよく知られているが、感度・特異度において十分とは言えない。そこで血清の abundant proteins の除去後に HPLC による分画を行い、各フラクションの SDS-PAGE を行う Three-Step プロテオーム解析により新たな飲酒マーカーの探索を試みた結果、Pigment epithelial-derived factor(PEDF)が新たな飲酒マーカーとなる可能性が示された。

1 1. 脳神経系腫瘍に関連する微量タンパク質解析システムの開発・融合プロテオミクスによる悪性グリオーマ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、2 D-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、グリオーマ幹細胞(GSC)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探索と、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 11 クローン中、特にマウス頭蓋内移植にて悪性グリオーマを早期に発症する 3 クローンに注目し、血清による分化誘導によって変動する分子群の解析を行った。同定された分子群 (8,471 タンパク質、21,857 mRNA) を iPEACH ソフトウェアによって統合し、GSC の分化誘導における発現変動分子群(上昇 662 個、減少 326 個)の GO 解析によって、特徴づけられた分化誘導時の発現亢進分子群として、細胞外マトリクス(ECM)群および細胞接着関連分子群、発現抑制分子として細胞周期促進因子群等を同定し、生物学的検証実験に供した。また GSC は、幹細胞マーカー CD133、Sox2 の発現と、血清添加による分化誘導時のこれらの減少、及び Astrocyte マーカー GFAP、Neuron マーカー Tuj1、悪性グリオーママーカー CD44 の発現を誘導し、神経幹細胞様の性質とグリオーマ細胞への分化能を有することを明らかにした。また、これらの分子群を独自に開発した全自動 2 次元電気泳動排出転写装置を応用することによって、複数個のマーカー分子の同時検出法を検討し、翻訳後修飾を含めたマーカー分子群の動的発現変化を短時間でとらえる事が可能となった。これらの一連の解析システムは、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検出・同定に有用であることが示唆された。

1 2. 自己抗体による難治性がん早期診断技術の開発とがん治療標的分子の探索研究：中村和行

近年、難治性がんの診断、治療、予後などの評価のために信頼性の高い新規バイオマーカーの探索が進められている。プロテオミクスによる患者血清中の新規バイオマーカー候補の探索とバイオマーカー候補タンパク質の高感度検出技術の開発や臨床応用が課題となっている。プロテオミクス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が報告されているが、信頼性の高い新規バイオマーカーは未だ少ない。本研究では、プロテオミクスによる C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌や膵臓癌などの難治性がんの早期診断や抗がん剤による治療評価のバイオマーカー候補の探索研究を目的に、患者血清中の自己抗体を用いた癌関連抗原バイオマーカー蛋白の絞り込みとプロテインチップ技術による精度の高い自己抗体価測定技術の開発と抗がん剤による治療評価のバイオマーカー候補タンパク質の探索研究を行った。

<p>研究代表者</p> <p>山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 所長</p>	<p>准教授</p> <p>中村和行 山口大学医学部医学科 教授</p>
--	--

研究分担者

<p>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</p> <p>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</p> <p>仲 哲司 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</p> <p>中山敬一 九州大学生体防御医学研究所 教授</p> <p>平野 久 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授</p> <p>尾野雅哉 国立がん研究センター研究所 創薬臨床研究分野 ユニット長</p> <p>寒川賢治 国立循環器病研究センター研究所 所長</p> <p>南野直人 国立循環器病研究センター研究所 部長</p> <p>高坂新一 国立精神・神経医療センター神経研究所 所長</p> <p>加藤菊也 大阪府立成人病センター研究所 所長</p> <p>野村文夫 千葉大学医学研究院 教授</p> <p>荒木令江 熊本大学医学薬学研究部腫瘍医学分野</p>
--

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た。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勝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、患者と健常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旨とする。

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バイオマーカータンパク質の探索と検証

我々は、バイオマーカーが濃縮されて存在すると思われる患部組織や患部近傍の体液、例えば脳神経疾患の髄液などの検体を用いて探索を行い、その解析で見つかったバイオマーカー候補タンパク質について、近年のプロテオミクスの革新技術である SRM/MRM 法を用いて大規模検証を行い、最終的にそれらのタンパク質を血中で検出・定量を試みるという戦略を取ることにした。

(1) 膜タンパク質に着目した大腸癌バイオマーカーの探索と検証

良性腫瘍と大腸癌組織（転移なしと転移あり）、それぞれ 6 検体ずつ合計 18 検体の大腸癌

組織の膜タンパク質画分の iTRAQ-shotgun プロテオーム解析の結果、5,566 個のタンパク質が同定され、その中の 1,567 個のタンパク質は膜貫通ドメインを持つことが推定された。また、Gene Ontology 解析の結果、5,287 個のタンパク質が注釈付けされ、その中の 3,087 個（58.4%）は膜タンパク質であることが推定された。同定タンパク質の中から、ポリープに比べて転移のない癌組織、または転移のない癌組織に比べて転移のある癌組織で発現量の変化する（2.0 倍または 0.5 倍以下、p 値 0.1 以下）バイオマーカー候補タンパク質となる 201 個の膜タンパク質または 51 個の細胞外タンパク質を見出した。本研究では、そうしたバイオマーカー候補タンパク質の中の 38 個に着目し、SRM 法を用いた検証をおこなった。SRM 測定は、38 個の候補タンパク質に特異的な配列を持つ 2 つのペプチドを測定対象としておこなった。その結果、25 個の候補タンパク質が、癌の進行に伴って有意に発現変化することが確認された。

新たに見出されたバイオマーカー候補タンパク質のうち、2 つのタンパク質について、ウエスタンブロット、免疫染色および 14 種類の癌組織それぞれ 50 または 100 検体分含む癌組織アレイ (TMA1150) による検証を行った。その結果、その 2 種類のタンパク質は、大腸癌だけでなく、肝臓癌や乳癌、前立腺癌でも高発現していることも示された。

(2) 膜タンパク質に着目した乳癌バイオマーカーの探索と検証

MammaPrint によりハイリスク群（9 検体）とローリスク群（9 検体）に分類された乳癌患者 18 症例の乳癌組織の膜画分を用いた iTRAQ-shotgun プロテオーム解析により 829 の膜タンパク質、340 の細胞外タンパク質を含む 5122 種類のタンパク質の同定に成功した。その中でハイリスク群とローリスク群を比較して 2 倍以上の発現の差が見られた 61 種類の膜、細胞外タンパク質をバイオマーカーの候補タンパク質とした。

61 種類の候補タンパク質から SRM/MRM を行える条件を満たした 49 種類のタンパク質に

において相対定量比較を個々の検体を用いて SRM/MRM により行った。SRM/MRM の定量値は、添加した安定同位体標識ペプチドに対する内在性ペプチドの比により算出し、その定量値をもとにハイリスク群、ローリスク群の有意差検定により比較を行った。その結果、23 種類のタンパク質でハイリスク群とローリスク群で有意差のある発現変動を示した。

その中で、2 種類のタンパク質について、ウエスタンブロット、免疫染色による検証を行ったところ、そのいずれもハイリスク群に比べローリスク群で有意に発現が増大していた。

(3) リン酸化タンパク質に着目した乳癌バイオマーカーの探索と検証

MammaPrint によりハイリスク群 (6 検体) とローリスク群 (6 検体) に分類された 12 症例の乳癌組織のリン酸化プロテオーム解析により 3,537 のリン酸化タンパク質、10,438 のリン酸化ペプチドの同定に成功した。この中で 4 セット中 3 セット同定され、両群間で 2 倍以上差がある有意差 ($p < 0.1$) のついたリン酸化タンパク質 103 種類、リン酸化ペプチドは 117 種類存在した。このうち、両群間で差の大きいもの 6 種類、タンパク質レベルで乳癌の予後不良に関与することが報告されているもの 12 種類、そして細胞膜タンパク質のリン酸化タンパク質 2 種類、計 20 種類のリン酸化タンパク質をバイオマーカー候補とした。

20 種類の候補タンパク質から SRM/MRM を行える条件を満たした 16 種類のリン酸化ペプチドを使い、個別検体による SRM/MRM を行った。SRM/MRM の定量値から、各検体におけるリン酸化ペプチドの強度を比較した結果、4 種類のリン酸化サイトについて、有意差が見られた ($p < 0.05$)。

2. 血漿中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 SRM/MRM 解析

SRM/MRM 法を用い、血中の超微量な APL1 β ペプチドの定量系を確立し、健常人血漿中の APL1 β が測定可能であることを確認した。ただし、血中の APL1 β ペプチドはごく微量であるため、安定して信頼性の高い定量値を得る

ことが難しい。そのため、さらに感度良く定量するために前処理法等の改良を試みた。

これまで血漿の前処理としてフィルターによる限外濾過→抗体を用いた免疫沈降→再度フィルターによる限外濾過を行ってきたが、限外濾過に用いるフィルターへの吸着などにより、目的のペプチドをロスしている可能性が高い。また、目的のペプチドを抗体を用いて免疫沈降を行った後に、抗体が最終サンプルに混入して、質量分析の感度を低下させる原因となる。そこで、前処理段階でのペプチドのロスや質量分析にかける際のサンプルへのコンタミの混入を軽減するため、抗体カラムによる血漿中メジャータンパク質の除去法の検討、免疫沈降に用いる抗体のビーズへの共有結合の検討、および免疫沈降後のサンプルの精製法の検討を行った。その結果、もっとも感度の改善がみられ、しかも現実的な改良法は、免疫沈降後 StageTip を用いてコンタミをなるべく除去することであった。この方法により、従来に比較してより高感度に定量することが可能になった。

3. 考察

網羅的な定量解析により見出された大腸癌・乳癌バイオマーカー候補タンパク質は、SRM 法を用いた検証法により、大腸癌の進行に伴ってあるいは乳癌再発のリスクの違いによって、有意に発現変化することが確認された。得られた大腸癌・乳癌バイオマーカー候補タンパク質の中で、いくつかについてはウエスタンブロットや免疫組織染色でも検証ができた。さらに、組織アレイ解析の結果から、大腸癌以外の癌組織でも発現量の増加がみられ、他の癌のバイオマーカーとしても有用である可能性が示唆された。

また、今回検証できたバイオマーカー候補膜タンパク質や細胞外タンパク質は、癌組織の細胞から分泌されることが予想され、癌の進行に伴う候補タンパク質の癌組織での発現量の変化が血液や腹水、尿といった体液で検出できる可能性もある。したがって、今回得られた候補タンパク質は、非浸襲的バイオマーカーとしての応用も期待される。

C, D-2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究：角田慎一

まず初代培養ヒト正常肺胞上皮細胞 (HPAEpiC) とヒト肺がん細胞株 (HARA、HARA-B、A549) から exosome を調製し、その基礎物性を評価した。超遠心法により各細胞から exosome を回収し、粒子径を動的光散乱法により解析した。その結果、各細胞から分泌された exosome の粒子径はこれまでの exosome に関する報告と同様、いずれも粒径は約 100 nm であった。また、その形態を電子顕微鏡法にて観察したところ、従来の報告同様に円形の小胞が観察され、exosome が適切に回収できていると考えられた。

そこで次に、がん細胞特異性の高い exosome 上の膜タンパク質を同定するため、HPAEpiC と HARA、HARA-B、A549 細胞の培養上清から exosome を精製し、質量分析により各 exosome のプロテオームを比較解析した。その結果、HPAEpiC 由来 exosome に比べ、がん細胞 (HARA、HARA-B、A549) 由来 exosome の全てで共通して発現レベルが高いと予想される 109 種類のたん白質を同定した。これらの中から、膜タンパク質であって、これまで exosome 上での発現が報告されていない Eph receptor A2 (EphA2) と Contactin-1 (CNTN-1) を見出した。

EphA2 と CNTN-1 の肺がんバイオマーカータンパク質としての有用性を検証するため、これらタンパク質の発現プロファイルを組織マイクロアレイにて解析した。ヒトの肺がん組織が 208 検体、正常肺組織が 8 検体搭載された組織マイクロアレイに対して、EphA2 と CNTN-1 に対する抗体を用いて免疫染色した。その結果、EphA2 と CNTN-1 は、いずれも正常の肺組織で染色されなかったのに対し、EphA2 は約 68%、CNTN-1 は肺がん症例の約 21% で発現していることが明らかとなった。病理学的組織型による発現差異を解析した結果、EphA2 は多くの組織型の肺がんが発現していたのに対し、CNTN-1 は非小細胞肺がんの中で、肺腺扁平上皮がんにおいて、約 90% (10 症例中 9 症例

が陽性) の患者で発現していることが判明した。

正常組織に比較してがん組織での特異性を評価するため、EphA2 と CNTN-1 の正常組織での発現分布を検証した。33 種類のヒト正常組織が搭載された組織マイクロアレイを各抗体で免疫染色したところ、EphA2 の発現は心臓や胃、小腸などを始めとする 28 種の組織で陽性であったのに対し、CNTN-1 の発現は脳、心臓、小腸、唾液腺と一部の組織にのみ発現していた。

C, D-3. プロテオミクス手法による新規癌抗原探索基盤技術の開発と治療法開発への応用～子宮内膜癌細胞表面膜タンパク質の定量的プロテオーム解析～：仲 哲治

子宮内膜癌細胞表面膜タンパク質の網羅的発現解析の結果、364 個のタンパク質が同定された。これらの中において、細胞膜貫通ドメインを有する分子が 160 個同定された。正常子宮内膜細胞と比較して、7 種類の子宮内膜癌細胞株の内、4 種類の癌細胞株にて 2 倍以上に高発現する細胞表面膜タンパク質として 15 個同定した。これらの中には既に論文で子宮内膜癌に高発現することが知られているタンパク質である、L1 cell adhesion molecule (L1CAM) が含まれていた。今回、我々が行った解析の結果、これまで子宮内膜癌に高発現することが報告されていないタンパク質として BST2 を同定した。

同定された BST2 について、特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法により BST2 が正常子宮内膜細胞では発現せず、子宮内膜癌細胞株に発現していることを確認した。さらに、BST2 について、特異的な抗体を用いて FACS (fluorescence-activated cell sorter) にて解析を行った。その結果、BST2 が実際に癌細胞表面に発現していることを確認した。これらの結果、iTRAQ 法により同定された結果と関連した結果が得られており、正常子宮内膜細胞ではなく、子宮内膜癌細胞表面に特異的に高発現することが明らかとなった。さらに、手術組織に対し免疫組織化学染色法を行うことで、細胞株でなく、癌組織における、癌抗原候補分子の発現に

ついて評価した。その結果、BST2は、正常子宮内膜組織よりも子宮内膜癌組織において有意に高発現することが判明した。

BST2が正常子宮内膜細胞と比較して子宮内膜癌細胞株に特異的に高発現することから、BST2に対する抗体が創薬標的となり得る可能性がある。BST2は癌細胞の増殖と直接関係しないが、BST2はADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)やCDC(complement-dependent cytotoxicity)を介してを抗体医薬の標的と成り得る可能性が示唆された。その結果、ADCCおよびCDCアッセイで抗BST2抗体はBST2陽性細胞に対して細胞障害活性を示すことが判明した。

In vivoにおける抗BST2抗体による抗腫瘍効果を明らかにするため、BST2陽性細胞である子宮内膜癌細胞(HEC88/nu及びSNG-II)をSCIDマウスの皮下に移植し、PBS投与群、isotype control IgG投与群、抗BST2抗体の3群に分け、週2回の頻度で4週間投与を行った。腫瘍体積を測定した結果、抗BST2抗体投与群ではPBS投与群、及びcontrol IgG投与群のいずれに対してもin vivoでの腫瘍の増殖に対して有意な阻害効果を示した。これらの結果、抗BST2抗体は子宮内膜癌細胞に対し優れた抗腫瘍効果を示すため、優れた治療薬と成り得る可能性が高いと考えられる。

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

本年度はヒト全遺伝子の約8割を網羅するタンパク質のPTP情報を取得し、これらを高機能データベースに格納することで、効率よく網羅的なタンパク質の絶対定量を行うワークフローを確立した。本システムを用いて一度の分析で約100種類のタンパク質の一斉定量を行うことが可能であった。例えばヒト主要代謝経路である解糖系やTCAサイクルの酵素群は一度の分析でほぼすべてを定量可能であった。また、細胞周期関連タンパク質であるサイクリンなどの微量タンパク質も検出可能であり、本システムの感度が従来の生物学研究に用いら

れてきたウエスタンブロット法などのタンパク質検出法に代わる方法と成り得ることが示された。

近年の質量分析計の高性能化によって大規模なMRM法が理論的には可能となってきたが、本来MRM法は特定タンパク質の定量を目的として発達してきたため、大規模な解析のためのワークフローが存在しなかった。本研究では、ヒトタンパク質のMRMによる定量を可能とするための事前情報(PTP情報)を組換えタンパク質を利用して網羅的に取得し、さらにこれらの情報を効率よく利用するための情報基盤の整備を行うことで、真に利用できる大規模MRMのためのプラットフォームの構築を完了した。今後、より低発現タンパク質の検出に向け装置の高感度化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～卵巣明細胞腺癌のバイオマーカー探索～：平野 久

卵巣癌細胞株から分泌されるタンパク質の解析を行った結果、3種類の卵巣癌組織型のグループから全部で280種類のタンパク質が同定された。50%以上が細胞外分泌型もしくは細胞質膜局在型として分類されるタンパク質であることがわかった。そして、58種類のタンパク質は、卵巣明細胞腺癌(CCA)細胞株群のみで検出・同定された。CCA細胞株群のみで検出された58種類の中で、細胞外分泌型もしくは細胞質膜局在型として分類されるタンパク質は30種類存在し、その中でプロテイン

アトラスデータベース検索によって種々の組織にて広範囲な発現は見られないタンパク質が 22 種類見いだされた。これらのタンパク質に関して、各卵巣癌細胞株における遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて調べた結果、16 種類が CCA 由来細胞株にて発現上昇していることがわかった。これらのタンパク質が CCA 患者組織にて発現上昇しているかどうかを確認するため、CCA5 症例、非 CCA4 症例、良性腫瘍 4 症例、健常者 2 例の卵巣組織検体から RNA を抽出し、遺伝子発現量を調べた。その結果、16 種類のうち 9 種類の分泌タンパク質の遺伝子が CCA 患者組織にて有意に発現上昇していることがわかった。

同定された CCA 特異的タンパク質には、癌細胞の転移や浸潤に関連するプロテアーゼインヒビター (Prot-E) が含まれていた。これらが CCA 細胞の転移・浸潤能に関与しているかどうか明らかにするために、CCA 細胞株 OVMANA に Prot-E に対する siRNA を導入後、細胞をマトリゲルチャンバプレートに播種し、2 日後、下層に浸潤して移動した細胞数を測定した。その結果、Prot-E のタンパク質の発現を抑制すると、予想に反して浸潤能が上昇することが明らかになった。このタンパク質は CCA 細胞の浸潤能を調節している可能性があると考えられた。

検出された疾患関連分泌タンパク質に対する抗体を用いて ELISA 法によって、CCA の診断に対する各タンパク質の有用性を検証した。CCA 患者における Prot-G および Prot-E の血中濃度は、コントロール群と比べて有意に高い値が示された。さらに既存の卵巣腫瘍マーカーである CA125 の値と比較すると、CA125 のカットオフ値付近、あるいはそれ以下の患者においても、上記 2 種類のタンパク質は高値を示した。これは、今回見いだしたマーカータンパク質が、CA125 では判別が難しい CCA 患者においても陽性と判別できる可能性があることを示している。

抗体を使わないで MRM 法による MS のみで血液中のマーカー候補タンパク質を検出する

系を開発しようと考えたが、現時点では、多数のタンパク質を含む血液試料から直接マーカー候補タンパク質を検出することは難しかった。そこで、免疫沈降によってマーカー候補タンパク質を濃縮精製した後、MRM で検出できるかどうか検討した。5 種類の卵巣癌細胞株の培養上清に含まれるマーカー候補タンパク質を測定した結果、CCA 細胞群で高い MRM シグナルが得られた。そこで、癌細胞の培養上清を FBS に添加して作製した患者血清モデル 200 μ L を測定したところ、Prot-G については、少なくとも 0.5 pg (2.3 pg/mL) 含まれていれば定量できることが分かった。さらに、ヒト標準血清を用いた場合においても同様の結果が得られた。現時点では、免疫沈降法を併用する必要があるが、MRM で血清中の診断マーカーを定量的に解析できる可能性があると考えられた。

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. 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 (Fibronectin 1) を発見した。

Fibronectin 1 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 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 Fibronectin 1 の血中濃度を測定し、血漿 Fibronectin 1 濃度が、健常者に比べ腎癌患者で有意に上昇しており ($p=1.87 \times 10^{-7}$)、前立腺癌患者に比べても有意に上昇している ($p=0.0053$) ことが示された。特に、腎癌の早期のステージ I、II でも、ステージ III、IV と変わらない ROC 曲線を示し、血漿 Fibronectin 1 濃度が早期の腎癌の発見に有用である可能性が示唆された。

($p=0.0053$) ことが示された。特に、腎癌の早期のステージ I、II でも、ステージ III、IV と変わらない ROC 曲線を示し、血漿 Fibronectin 1 濃度が早期の腎癌の発見に有用である可能性が示唆された。

2. 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

前立腺癌血漿 25 例、健常者血漿 15 例での 2DICAL 解析で、あるタンパク質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 5 4 例、健常者血漿 6 0 例、前立腺炎患者血漿 6 例、前立腺肥大症患者 2 2 例、腎癌患者 2 0 例で測定し、目的のタンパク質の血中濃度が他の疾患に比べ、前立腺癌患者で有意に上昇していることが示された。特に PSA 濃度が 4-10ng/ml を示すグレーゾーンの前立腺癌患者でこのタンパク質の血中濃度は上昇しており、PSA との組み合わせによる前立腺癌診断の向上に役立つ可能性が示唆された。

3. 肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの開発

肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織の比較で、1 5 1 タンパク質が肝細胞癌で量的高値を示し、非癌肝組織では 1 2 9 タンパク質が量的高値を示した。量的変動示したタンパク質の生物学的な働きを PANTHER Biological Process を用いて解析すると、癌で高値を示したタンパク質は核酸代謝、細胞分裂、細胞周期にかかわるものが認められたのに対し、非癌部肝組織で高値を示したものはアミノ酸、脂質、糖質の代謝にかかわるものが認められ、この結果は癌組織と正常肝組織から予想される細胞機能を正確に反映していると推察された。HAMMOC 法でリン酸化濃縮を加えて比較した肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織間で、3 8 5 リン酸化修飾ペプチド (癌で高値 2 0 2 ペプチド、非癌部肝組織で高値 1 8 3 ペプチド) が大きな量的変動を示した。

4. 考察

新規に開始した肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発は、これまでの血液からの解析と異なり組織からのプロテオーム解析であったが、癌組織と正常肝組織の比較で得られた結果は予想される細胞機能を正確に反映したものであった。また、リン酸化に特化して解析した結果も、癌組織と正常肝組織で差のあるリン酸化ペプチドが多数認められた。今後、検討例数を増やし、量的変動を示した個々のタンパク質、リン酸化ペプチドを詳しく解析し、肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの探索を行う予定である。

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. イヌ心不全モデルのプロテオーム解析

コントロール群及び偽手術群ではペーシング開始前の 0 週に、ペーシング群については 4 週後、6 週後に左室組織、血液を収集した。左室駆出率は顕著に低下し、肺動脈喫入圧や平均肺動脈圧の上昇により、典型的な頻脈性心不全モデルの形成を確認した。採取した試料について、国立循環器病研究センター研究所では、2DICAL 法を用いてプロテオーム解析を行い、4 週、6 週ペーシング群でそれぞれ約 40,000、30,000 のトリプシン消化ペプチドピークを検出し、その約 1 割において有意な変動 (t-test, $P<0.05$) 認められた。しかし、イヌのタンパク質データベースの整備が進んでおらず、同定できたトリプシンペプチド数は 800 程度 (重複なし) と通常の 1/3~1/4 に止まり、有意な変動を示したタンパク質数は 4 週、6 週ペーシング群でそれぞれ 30 程度に限定されたため、イヌ完全配列データの導入、再解析を進めている。医薬基盤研究所内のプロテオーム研究センターグループによって iTRAQ 法を用いて解析が実施され、4 週、6 週ペーシング群で 800 タンパク質が同定、定量解析され、4 週、6 週ペーシング群で共に 1.5 倍以上の増加、あるいは 2/3 以下の減少を示したタンパク質各約 100 種が検出された。

2DICAL 法にて有意な変動が検出されたタンパク質のほとんどが、iTRAQ 法により上記基準で検出されるか、同様の変動を示した。増加したタンパク質は、細胞骨格・構造系、血液由来、リボゾーム系、エネルギー代謝系タンパク質の順となり、血液、リボゾーム関連の寄与が 1/3 程度認められた。一方、減少したタンパク質は、エネルギー代謝系が 4 割、細胞骨格・構造系が 2.5 割、情報伝達系が 1 割を占め、トロポニン、ミオシン及びミオシン軽鎖、ミトコンドリアエネルギー代謝酵素、カルシウム関連受容体などの変動が認められ、疾患との関連が示唆されるタンパク質が多数見出された。また、複数のアイソタイプが存在する酵素や情報伝

達系タンパク質群で、減少、増加という相反する変動が誘導され、アイソタイプスイッチングが起こっている可能性が示唆された例が数組見出され、バイオマーカーへの適用の可能性が示唆された。

2. 血漿試料を用いた前処理法の検討

血漿中の内在ペプチド、分解ペプチドの識別法を作成するため、副腎髄質組織を標識試薬入り培養液に浸漬し、ホモジナイズ後加熱、抽出した試料では、同定ペプチドの大部分が標識されていた。しかし、生合成後、特異的プロセッシングを受けるタンパク質では、プロセッシング部位をC末端とするペプチドには試薬は導入されておらず、他の同タンパク質由来ペプチドでは標識されていた。この結果、本標識法により試薬添加以降に発生した消化・分解ペプチドが識別可能であることが示された。血漿試料においても、標識試薬の早期導入、迅速分離により、内在ペプチドの識別、同定が可能と考えられた。

3. 培養細胞株上清中の大分子量ペプチドの解析

神経内分泌細胞株培養上清のペプチド画分を分泌ペプチドーム解析の手法により回収し、ゲルろ過法により分離した画分を順次解析にした。その結果、最大で分子量 15,000 Da のペプチドまで同定でき、CID 法、ETD 法により同定できたペプチド数は、約 800 と約 550 (重複なし) であり、同定数では CID 法が勝った。分子量 3000 Da 以上のペプチドの割合は、各開裂法でほぼ 50% であった。両開裂法での重複同定ペプチド数は約 400 であり、両法の併用により同定ペプチド総数は 1,000 近くに達することが分かった。ETD 法により得られる MS/MS スペクトルは、一般に CID 法に比してフラグメントが進み、得られる情報が多い。そのため、従来の CID 法のみでは十分な MS/MS スペクトル得られないペプチド、類似したアイソペプチドの明確な同定、リン酸化をはじめとする修飾構造と残基の同定については有効であることが確認された。

4 培養初代心筋細胞、非心筋細胞の培養上清中のペプチド解析

ラット培養初代心筋細胞の培養上清については、CID 法に加え ETD 法を用いて解析を継続、展開した結果、ゲルろ過の高分子量分画では、分子量約 10500Da の proANP の N 末端ペプチド (proANP[1-98]) が豊富に観測された。C 末端部 α -ANP と共に主要なプロセッシング産物であり、proANP の Arg98-Ser99 間の一次切断により生成することが確認された。

培養非心筋細胞の培養上清中のペプチド解析では、最大で分子量 12,000 Da を超えるペプチドまでが同定され、ペプチド前駆体由来するペプチド、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。更にプロリンのヒドロキシル化、糖鎖付加をはじめとする修飾残基の同定も実施でき、特に複数のヒドロキシル化残基を多数のプロリン残基の中で特定できた。

5. 考察

イヌ心不全モデルのプロテオーム解析結果については、減少、増加の何れにおいても、分泌タンパク質で大きな変動を示したものは全て血液成分由来と考えられ、心臓の心筋細胞、線維芽細胞などの構成細胞に由来する分泌タンパク質で顕著な変動を示すものは見出せていない。一方、心筋細胞の機能発現に必須な収縮機能関連タンパク質は、4 週、6 週ペーシング群で約 50% あるいはそれ以下に減少する例が多く、心不全モデル動物の心筋収縮機能の低下に繋がると推定される。カルシウム関連受容体などの収縮情報伝達系にも異常が発生している可能性が高い。

CID 法と ETD 法の 2 種類の開裂法の比較と高分子量ペプチド解析における有用性について検討を行った結果、最大で分子量 15,000Da のペプチドまでが同定可能となり、CID 法と ETD 法の併用により同定ペプチド数を約 1.5 倍に増加でき、総数で 1,000 ペプチド程度の同定可能と考えられた。更に、これらの約半数のペプチドの分子量は 3,000Da 以上であり、一次切断部位構造を保持する可能性が向上したと推定された。また、ETD 法はリン酸化やヒドロキシル化をはじめとする修飾構造の決定に

も有用であり、これらの構造にも基づくバイオマーカー探索へも大きく道を拓くものである。

上記の2種の開裂法を培養初代心筋細胞、非心筋細胞の分泌ペプチドーム解析に適用した結果、proANPのプロセッシングにおいては、N末端部のproANP[1-98]とC末端部の α -ANPへのArg98-Ser99間の一次切断が主体であることが確認された。昨年度の研究成果より、 α -ANPの消化・分解の責任酵素、Endopeptidase 24.11による切断（Arg101-Arg102, Ser123-Phe124, Arg112-Ile113）で生成する断片は低分子量でイオン化効率が高いために数多く観測されるが、これらは二次的切断による生成と結論された。

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. 髄液採取体制の整備

担当医が診療上必要な検査として髄液検査を行う場合、主治医の要請に応じ常にコーディネータが髄液検査に立ち会う体制を整備した。コーディネータは研究の説明と同意を得る時点から関与し、採取後はただちに氷冷して臨床検査部へ運搬する。運搬された髄液の一部で細胞数、タンパク量などの一般的な検査を臨床検査部で行い、残りを遠心・分注して、匿名化を行ってのち、TMCバイオリソース管理室の超低温フリーザーに保存する。2011年12月までの集計では、症例数275例（検体数312例）となっている。

2. 髄液採取時の食事の影響

同一患者の前日22時以降絶食（朝食抜き、午前10時採取）と昼食後（午後2時採取）の髄液タンパク質を比較したところ、同定できた約550種のタンパク質のうち、2倍以上の変動を示したものは75種（13.6%）で、そのうち64種（変動したタンパク質の85%）が絶食時に低下していた。1.7倍以上の変動にすると142種（25.8%）にもなり、そのうち128種（変動したタンパク質の90%）が低下していた。絶食により全体の25%ものタンパク質が6割以下の量に減少していたことになる。

3. 考察

髄液は中枢神経の様子を鋭敏に反映してい

ると想定され、実際これまでの本研究で脳特異的な数多くのタンパク質が同定されてきている。しかしながら、微量であるが故に、その測定結果に影響する種々の要因をしらべ、最適な検体採取条件を決めることは結果の解釈を行う際に重要になる。

その意味で採取後の検体の取扱、とくに氷冷して運搬し、直ちに遠心し細胞成分を除去し、小分けして-80°Cに保存することは室温での変化を最小限に防ぐ方法として重要と判断し、国立精神・神経医療研究センターでは病院各診療科、臨床検査部と連携して、その手順を確立した。

髄液採取に対する食事の影響を調べた結果、同定できた約550種のタンパク質の約25%が食事で増加する（絶食で低下する）ということを発見した。この事実は、被験者数を増加させて検討を行うことでさらにその意味が確実になるとともに、髄液タンパク質の日内変動を調べる研究へと発展できる可能性がある。

C, D-9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来DNAの研究：加藤菊也

1. 新規糖鎖腫瘍マーカーの探索

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。そこで今年度は、ELISA法などを用いた臨床応用に向けて、ST1Hを認識する単クローン抗体を作成し、それらの特異性などを検討した。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11種類のクローンを得た。ただし、これらのクローンは癌組織を用いた免疫組織学法では陽性シグナルを得ることができなかった。

大腸癌、膵臓癌、前立腺癌の糖脂質の構造解析を実施している際に、N型糖鎖のシアル酸(Neu5Ac)付加遊離糖鎖が正常細胞にはほとんど認めないが、癌細胞には蓄積されていることを見出した。5種類の糖鎖を検出、構造決定し

た。その結果すべて complex-type の N 型の遊離糖鎖であり、

NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manα1-4GlcNAcβ1 が最も多く、ついで NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6Manβ1-4GlcNAcβ1 が多かった。遊離糖鎖の量を、糖脂質糖鎖と比較すると、大腸癌細胞の遊離糖鎖は、糖脂質と比較するとその量は極めて少ない。一方、膵臓癌や前立腺癌では約半数の症例では、糖脂質よりも桁違いに多くの遊離糖鎖が蓄積していた。

2. 血液中肺がん由来 DNA の EGFR 変異検出

肺癌患者の血漿 DNA から癌由来 EGFR 変異を BEAMing で検出可能かどうか調べるために、生検で EGFR 活性化変異があることが確認されている EGFR-TKI 治療後増悪症例と EGFR-TKI 治療前の進行肺癌症例の血漿 DNA を解析した。その結果、活性化変異は全 4 4 症例中 3 2 例 (72.7%, 95%CI 58.0-83.6%)、耐性変異は治療後増悪症例 2 3 例中 1 0 例 (43.5%, 96% CI 2.5.6-53.4%) 検出できた。耐性患者の約半数でこの変異が検出されるため、成功率は 90%近いといえる。また、活性化アレルの中で耐性変異を持つものの割合は 13.3%から 94%であった。これらは実用化に向けて有望な結果である

3. 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。今回、ST1H を認識する単クローン抗体の作成によって、ST1H に対して特異性が高い 11 種類のクローンが得られたが、免疫組織学法では、ST1H を発現している癌組織で陽性シグナルが得られず、実用性に疑問が残った。一方、膵臓癌、前立腺癌で、多量の complex-type の N 型の遊離糖鎖が蓄積されていることが明らかとなった。構造も明らかとなったため、マーカーとしての有効性を検討する必要がある。

BEAMing による血中肺癌由来 DNA の解析により、活性化変異は 7 割以上の進行癌症例で、耐性変異は EGFR-TKI 治療後耐性症例の 9 割近くで検出できた。実用化に向けて有望な結果

であり、前向き試験で検証を行うことになっている。

C, D-10. MALDI-TOF MS による慢性血栓性肺高血圧症患者血清のプロテオーム・ペプチド解析・Three-Step プロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証：野村文夫

1. 慢性血栓性肺高血圧症 (CTEPH) 患者血清の MALDI-TOF MS 解析

MALDI-TOF MS を用いて作成された、探索群の CTEPH 患者と健常対照者血清のペプチドプロファイルの比較において、14 ペプチドのピーク強度で有意差を認めた。CTEPH 患者血清で、6 つのピーク強度が増強、8 つのピーク強度が減弱を示した。次に、探索群で差を認めた 14 ペプチドのピークについて、検証群でも有意差の再現性が確認できたのは 4 ペプチドであった ($m/z2970$, $m/z2989$, $m/z7760$, $m/z9262$)。うち、2 つのピーク ($m/z2970$, $m/z2989$) は CTEPH 患者血清で増強を認め、残りの 2 つ ($m/z7760$, $m/z9262$) は減少した。

検証群で確認された 2 群間で有意差を認める 4 つのペプチドのピーク強度について、CTEPH 患者を健常対象者から鑑別する有効性の評価のために ROC 解析を行った。その結果 $m/z2989$ のペプチドが最も高い AUC を示した。カットオフ値 $61.0 \mu\text{mol/L}$ とすると感度 0.51、特異度 0.82 であった。そこでペプチドの同定を行ったところ、フィブリノゲン A α 鎖の断片であることが判明した。

次に安定同位体標識ペプチドを用いた絶対定量を試みた。血清中フィブリノゲン A α 鎖濃度の中央値および四分位範囲 (fmol/ μL) は健常対照者血清、他疾患を有する患者血清、CTEPH 患者血清で、それぞれ 37.1(30.9-52.9)、38.5(26.4-57.9)、63.9(37.35-96.9) であった。CTEPH 患者血清ではほか 2 群と比較して有意に高値を示した ($p<0.01$)。CTEPH 患者の各種臨床パラメーターとフィブリノゲン A α 鎖断片濃度との比較において、有意な相関を示したのは TAT ($p=0.031$ 、正の相関) のみであった。

CTEPH のバイオマーカーとして、DD、BNP、

CRP、heart-type の脂肪酸結合タンパクなどが報告されている。しかし、これまでの報告されたバイオマーカーは多くの他疾患でも陽性を示すため特異度が低く、バイオマーカーとしての信頼度は決して高くはない。さらに、これまでプロテオミクス手法を用いたCTEPHのバイオマーカー検索の報告はない。今回の解析でフィブリノゲンA α 鎖断片は優れた特異度を示した(カットオフ値 61.0 $\mu\text{mol/L}$ で感度 0.51、特異度 0.82)。質量分析計による血清や血漿の解析において、異なる部位や長さのフィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドの報告がなされている。我々の研究室でも、アルコール多飲者のマーカーとして 5.9kDa のフィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドの報告を行っているが、今回我々が報告した 2,989Da のフィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドは、血清マーカーとしての報告は初めてである。

次のステップとしてフィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドの濃度測定のため、安定同位体標識ペプチドを用いた絶対定量を行った。我々の、予備実験では安定同位体標識ペプチドを用いた絶対定量の日差変動係数と日内変動係数が各々4.05%、10.4%であるのに対し、ピーク強度のみによる日差変動係数と日内変動係数は各々6.7%、16.3%であった。安定同位体標識ペプチドを用いる方法は絶対定量ができるのみでなく、測定誤差の減少にも有効であった。

フィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドはPICと負の相関の傾向($p=0.073$)、およびTATと正の相関($p=0.031$)を示したが、血中PIC濃度は採血時の線溶活性化の程度を示し、血中TAT濃度は採血時の凝固活性化の程度を示している。本研究において測定されたフィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドの血中濃度の高い患者では線溶活性が低下し、また凝固活性が亢進している可能性が示唆され、フィブリノゲンA α 鎖断片ペプチドが血栓形成と何らかの関連性を持っていることが予想された。

2. Three-Step プロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証

アルコール性肝硬変患者 8 名 (入院時・入院

後 8 週間・計 16 サンプル) から Multi Affinity Removal Column を用い主要 6 タンパク質を除去した後、HPLCにより分画した 40 フラクシオンを SDS-PAGE を行い、タンパク質発現の違いを Total Lab TL120 software で数値化した後、2 群間を比較し有意差検定 (Mann-Whitney test) を行った。その結果、 $p<0.05$ と有意な違いを 27 バンドでみられた。Mann-Whitney test により $p<0.01$ と有意に発現量の違いが見られた 6 バンドを同定した結果、入院時に増加していたバンドは、Alpha2-HS glycoprotein, Apolipoprotein A- I, Glutathione peroxidase 3,, Heparin cofactor II, Pigment epithelial-derived factor であり、入院後 8 週間に増加したバンドは、Apolipoprotein C-III であった。

Apolipoprotein A- I, Alpha2-HS glycoprotein,, Apolipoprotein C-III, Glutathione peroxidase 3, Heparin cofactor II は既に習慣飲酒との関連が報告されているが、Pigment epithelial-derived factor(PEDF)のタンパク質発現量変化とアルコール性肝障害との関連性は報告されていない。

飲酒マーカー探索に用いたアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用い、PEDF の蛋白発現量変化をウエスタンブロット法で検証した。入院時と断酒 8 週間後では、 7.68 ± 0.15 vs 6.08 ± 0.16 ($p<0.05$) と有意な違いが認められた。入院時の \square -GTP は 2 症例で正常域にとどまり、いわゆる non-responder と考えられたが、これら 2 症例においても変化が認められた。

PEDF はセリンプロテアーゼインヒビターのスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、ヒト網膜芽細胞腫細胞において強力な神経分泌活性を有する因子として網膜色素上皮細胞の培養上清から精製され、血管新生抑制作用を有することが報告されている。

Matsumoto らは健常者、慢性肝炎患者、肝硬変患者、肝硬変を伴う原発性肝細胞癌患者、各 8 名の血清中 PEDF 濃度を ELISA で測定した。健常者、慢性肝炎と比較し、肝硬変患者、肝硬変を伴う原発性肝細胞癌患者で $p<0.01$ と有意に PEDF 濃度の低下がみられたと報告してい

る。アルコール性肝硬変患者において、PEDFが入院時に高く、断酒8週間後で低下が見られたこと、そして低下後の血中レベルは健常人とほぼ同様であったこと（テータ示さず）からアルコール性肝硬変患者の入院時のPEDFの上昇は、肝障害の影響ではなく、飲酒の影響であると考えられる。また、PEDFの発現量変化が□GTP ノンリスポンダーにおいてもみられることから、従来のマーカーと組み合わせることにより常習飲酒者の検出効率が上がると期待される。

C, D-1 1. 脳神経系腫瘍に関連する微量タンパク質解析システムの開発・融合プロテオミクスによる悪性グリオーマ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融合プロテオミクス解析

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、12人のグリオーマ患者組織より、11クローンの分離に成功し、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3クローン GSC03A, 03U, 07U 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1165、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8471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。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55000個のDNAプローブに対し、そのうち定量的に有意な21,857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、クラスター解析およびGene Ontology解析を行った。

GSCの分化誘導で発現亢進した分子の Gene Ontology Category はメンブレン(27%)、細胞外基質(ECM)(18%)、接着/細胞間コミュニケーション(6%)に関連し、発現抑制した分子の Gene Ontology Category は亢進群が細胞外/膜分子群(50%)に対して、細胞内分子群(70%)、結合(13%)、細胞周期関連(6%)などに関連していることが明らかになった。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解析から、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。

2) グリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群の検証実験

分化誘導によって発現変動した分子のうち、有意なマーカーとして抽出された分子群の細胞の2次元 western blotting と免疫染色による検証実験を試みた。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、悪性化マーカー vimentin 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。

細胞を用いた免疫染色においても、CD133 と Sox2 は GSC Sphere で有意に発現し、血清刺激後には顕著に減少することを確認した。血清刺激条件下では、GSC Sphere は培養皿に糸

状偽足/葉状仮足を出して接着し、GFAP と CD44 の発現が増大したが、ニューロンマーカーの Tuj1 の発現変化はないことを確認した。また、GO 解析で特徴的であった、細胞接着関連因子群であるインテグリンファミリー、コラーゲンファミリー、ラミニン、およびフィブロネクチンなどの発現を検証したところ、COL4、FN、およびインテグリン X、Y は、融合プロテオミクスの結果と同様に分化誘導で発現亢進していることを確認した。また、組織染色の結果によって、マウス脳異種移植片で同様に COL4、FN、およびインテグリン X、Y が発現していることが確認できたことから、インテグリンと ECM は分化誘導によって有意に発現し、これらの相互作用によって、GSC の分化と神経膠腫形成を促進していることが示唆された。これらの分子の阻害剤による GSC の維持や分化誘導阻害を介して、悪性グリオーマの抑制が可能となると期待される。

C, D-12. 自己抗体による難治性がん早期診断技術の開発とがん治療標的分子の探索研究：中村和行

1. HCV-HCC のバイオマーカー探索研究

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 (PRDX) が同定された。

また、GFP と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップを熱処理して 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 蛍光比で数値化することによって、患者血清中自己抗体の定量性の向上と再現性の高い検出が可能になった。

2. 抗がん剤による膵臓癌の治療効果の評価候補バイオマーカー探索研究

ゲムシタビン耐性 PC 細胞株に特異的に増