

- 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子
- 3-4.
 発明の名称: 卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
 出願番号: 特願 2010-35737
 出願日: 2010年2月22日
 出願人: 横浜市立大学
 発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 山中結子, 平野久, 川崎博史, 平原史樹, 宮城悦子
4. 尾野雅哉
- 4-1.
 発明の名称: 米国 Tumor marker for pancreatic cancer
 発明者: Masaya Ono, Tesshi Yamada, Setsuo Hirohashi
 特許番号: US8017732B2
- 4-2.
 発明の名称: 欧州 Novel tumor marker for pancreatic cancer
 発明者: Masaya Ono, Tesshi Yamada, Setsuo Hirohashi
 特許番号 EP2182061A
5. 加藤菊也
 発明の名称: 血中DNAの定量的検出による悪性新生物の病勢の進行を評価する方法
 出願番号: 特願 2011-109498
 出願日: 2011年5月16日
 出願人: 地方独立行政法人大阪府立病院機構
 発明者: 加藤菊也, 今村文生, 谷口一也, 熊谷融, 内田純二, 西野和美
6. 野村文夫
- 6-1.
 発明の名称: クラスリン重鎖に対する自己抗体の免疫測定方法、それに用いるキット、及びそれを用いた癌判定方法
 公開番号: 特許公開 2011-107064
 出願人: 千葉大学・日東紡メディカル(株) 共同出願
 発明者: 小島良, 野田健太, 清宮正徳, 曾川一幸, 野村文夫
- 6-2.
 発明の名称: クラスリン重鎖とその自己抗体との複合体の免疫測定方法、それに用いるキット及びそれを用いた癌判定方法
 公開番号: 特許公開 2100-117781
 出願人: 千葉大学・日東紡メディカル(株) 共同出願
 発明者: 小島良, 野田健太, 清宮正徳, 曾川一幸, 野村文夫
7. 荒木令江
- 7-1.
 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
 出願番号: 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
- 7-2.
 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, 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: PCT/JCT2011/58366
 出願人: 国立大学法人 熊本大学
 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
- 7-3.
 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, NF1 特異的タンパク質の腫瘍マーカー及び治療ターゲット

ットとしての使用方法

出願番号：特願 2012-075242

出願人：国立大学法人 熊本大学

出願日：2011 年 3 月 28 日

発明者：荒木令江，小林大樹，水口惣平，
平山未央

8 中村和行

発明の名称：自己抗体の検出方法

出願番号：特願 2010-188841

出願人：国立大学法人 山口大学

出願日：平成 2010 年 8 月 25 日

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

高尾 敏文 大阪大学蛋白質研究所
教授

山本 格 新潟大学大学院医歯学
総合研究科 教授

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

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

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。

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 APL1β 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。

A. 研究目的

国際的な新薬開発競争に際して、シーズとなる疾患関連バイオマーカーの発見、知的財産権の確保は、今後のわが国の医薬品産業の発展に不可欠である。そのためには、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、その疾患関連タンパク質の発見にはヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス解析が重要である。これまでもそれらの材料を用いた疾患プロテオミクス解析は行われてきたが、その解析技術の未熟さから比較的量の多いタンパク質しか同定されず、新たなバイオマーカーとなるタンパク質は発見されていない。しかし近年の質量分析計をはじめとする飛躍的な技術革新に伴い、微量なタンパク質の検出・同定が可能となった。

本研究では、その最新のプロテオミクス技術を駆使して、がん・神経疾患等の診断薬・治療薬の開発のために有用な新規バイオマーカータンパク質の探索およびその実用化を目的としている。特にキナーゼ阻害剤のターゲットとな

るリン酸化タンパク質や抗体医薬のターゲットとなる膜タンパク質の網羅的探索に力を注いでいる。これまでに数多くのバイオマーカー候補タンパク質が報告されているが、その中で臨床応用されているものは非常に少なく、その理由の一つとして候補タンパク質の多くは十分な検証作業が行われていなかったことがあげられる。そこで、我々は、得られたバイオマーカー候補タンパク質の有用性を検証するための基盤技術、特にSRM/MRM法を用いて、臨床検体を用いたハイスループットな大規模検証を行った。以上の解析により、実用化の可能性のあるバイオマーカーを一つでも多く創出できると期待される。

B. 研究方法

B-1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカー候補タンパク質の探索
(1) 組織中リン酸化タンパク質のプロテオーム解析

ヒト癌組織からのタンパク質抽出には、難溶

性画分のタンパク質も抽出するため、界面活性剤を用いた相間移動溶解法(Phase Transfer Surfactant : PTS 法)を用いた。具体的には、デオキシコール酸とラウロイルサルコシン酸を含む溶液で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加え、酸性条件にすることで質量分析の際に悪影響となる界面活性剤を除き、ペプチド抽出を行った。抽出したペプチドは脱塩処理した後、 Fe^{3+} をとリン酸基との親和性を利用した Immobilized metal affinity chromatography

(IMAC) 法によるリン酸化ペプチドの濃縮を行った。IMAC カラムにより精製されたリン酸化ペプチドを iTRAQ 試薬により安定同位体標識し、陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相カラムによる二次元分画を行った後、LTQ-Orbitrap Velos による質量分析によりリン酸化ペプチドを同定した。

(2) 組織中膜タンパク質のプロテオーム解析

組織検体をホモジュナイザーで破砕し、低速遠心で核や未破砕の細胞を除き、超高速遠心をおこない、その沈殿画分を膜タンパク質画分とした。さらに、上述の PTS 法でペプチドを抽出した。脱塩精製後得られたペプチドサンプルは、iTRAQ 試薬で同位体標識ラベル後、カラム操作により分画し、液体クロマトグラフィー質量分析装置でタンパク質の同定と定量解析を行い、グループ間で有意に発現量が増加するバイオマーカー候補タンパク質を検索した。得られたバイオマーカー候補タンパク質は、SRM 法(後述)、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法を用いて検証した。

(3) バイオインフォマティクスによるバイオマーカータンパク質の絞り込み

質量分析により同定、定量された分子から、バイオインフォマティクスの手法によりバイオマーカー候補の絞り込みを行った。解析には、分子間相互作用情報データベース(STRING)、リン酸化コンセンサスモチーフ解析データベース(Phospho.EML, PhosphoSite plus)など複数のデータベースと、それらデータベースの統合解析ツールとして NetworKIN アルゴリズムを用い、定量的プロテオーム解析で有意な変動が見

られた分子群と関連のあるシグナルパスウェイの予測を行った。さらに Ingenuity や Metacore によるジーンオントロジー解析を行いターゲット分子機能からの予測も行った。

B-2. SRM/MRM 法によるバイオマーカー候補タンパク質の検証

(1) 組織中タンパク質の SRM/MRM 定量解析

網羅的な定量解析の結果、大腸癌の悪性化に伴い発現量の変化するバイオマーカー候補タンパク質について、selected reaction monitoring (SRM)法を用いた検証をおこなった。SRM 法を用いることで、抗体を用いずに、少量のサンプルで一度に数十個の候補タンパク質の検証が可能となった。候補タンパク質に特異的なアミノ酸配列を持つペプチド(トリプシン消化断片)を SRM 測定の対象として 2 種類ずつ選択し、それぞれに対する安定同位体標識ペプチド(SI ペプチド)を合成した。SRM 測定の際は、トリプシン消化した測定サンプルに SI ペプチドを内部標準として一定量添加し、SI ペプチドに対する内在性ペプチドの比を調べることで、候補タンパク質の発現量を定量した。

SRM 測定を行うにあたって、まず SI ペプチド (1ng)をフーリエ変換-リニアイオントラップハイブリッド質量分析計 LTQ orbitrap XL で LC/MSMS 測定した。LTQ orbitrap XL で得られた MSMS スペクトルから、各ペプチドにつき、強度の大きなプロダクトイオンを 10 個選択した。さらにペプチドの開裂(コリジョン)に使用されるコリジョンエネルギー(CE)を最適化する為、各プロダクトイオンにつき 7 点の CE を設定し、合計 70 個の transition を作成した。その後さらに、SI ペプチドをトリプル四重極型質量分析計 TSQ Vantage により測定し、測定にもっとも適した 3 個の transition を選択した。さらに SRM シグナルの感度、定量性を上げる為、ペプチドの溶出時間の ± 5 分間のみ測定(Timed SRM)するよう設定した。これらの最適化の後、SI ペプチドと細胞ライセート中の内在性ペプチドを LC/SRM 測定した。その際の LC は、溶媒 A に 2% ACN 0.1%FA、B 溶媒に 90%ACN

0.1%FA を使い、グラジエントは溶媒 B 5%でスタートし、45 分で B 25%まで上げ、5 分の B 95%の洗浄の後、15 分の B 5%の平衡化を行う計 60 分のメソッドを用いた。

(2) 血漿中 APL1βペプチドの SRM/MRM 定量解析

ヒト血漿 1ml に APL1β 25, APL1β 27, APL1β 28 の安定同位体標識ペプチド (SI ペプチド) を添加し、それを buffer (0.1%N-octylglucoside, 140mM NaCl, 10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA, SIGMA Protease Inhibitor mix) で 2 倍に希釈し 50k のフィルターで 4°C、80 分間遠心ろ過後、抗 APL1β抗体と Protein sepharose A ビーズを用いて免疫沈降を行い、20%ACN,0.1%FA で APL1βペプチドを溶出した。得られたサンプルに対して SRM を行うために、トリプル四重極型質量分析計 TSQ Vantage において、それぞれ 5 つの transition を選択して最適化を行い、最も適した 3 個の transition を最終的な測定に用いた。その transition を使って、APL1β安定同位体標準ペプチドの SRM 測定により検量線を作成し、定量限界 (LOQ) と検出限界 (LOD) を定めた。その際の LC は、溶媒 A に 2% ACN 0.1%FA、B 溶媒に 90%ACN 0.1%FA を使い、グラジエントは溶媒 B 5%でスタートし、20 分で B 55%まで上げ、5 分の B 95%の洗浄の後、15 分の B 5%の平衡化を行う計 40 分のメソッドを用いた。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いたヒト由来試料は全て試料提供機関である国立大学法人千葉大学大学院医学研究院、大阪府立成人病センターの倫理審査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であり、独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターにおける使用を同審査委員会および医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト倫理審査委員会で承認されたものである。

C. 研究結果

C-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

理想的なバイオマーカーとは、なるべく侵襲の少ない検体を用いて、迅速にかつ正確に病態を診断できるものである。そのためには、血液、尿、唾液などの体液を用いて診断できることが望ましく、これまでそれらの検体を用いた多くの研究がなされてきたが、実用化まで至った例はごくわずかである。その理由として、体液中には非常に多くのタンパク質が存在するのに対し、目的とするバイオマーカータンパク質は希釈されることにより非常に低濃度に存在しており、現在の解析技術ではそのような藁の中から針を探すことは非常に困難だからである。そこで我々は、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 (図 1)。

(1) 膜タンパク質に着目した大腸癌バイオマ

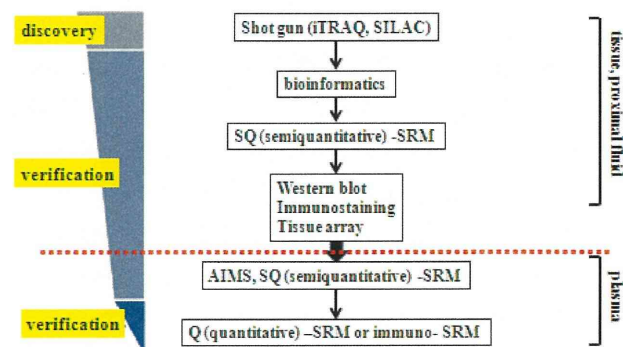


図1:バイオマーカー探索の戦略

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、5566 個のタンパク質が同定され、その中の 1567 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 (表 1)。また、Gene Ontology 解析の結果、5287 個のタンパク質が注釈付けされ、その中の 3087 個 (58.4%) は膜タンパク質であることが推定された (表 1)。

Total identified proteins		5566			
	number	%			
Number of proteins with transmembrane domains		1567			
		28.2%			
GO-annotated					
Membrane	5287	100			
Cell surface	3087	58.4			
Extracellular	209	4.0			
	652	12.3			
Number of proteins with significant difference in expression					
		C / P			
		Cm / C			
ratio	p-value	TM+ mem	Extra	TM+ mem	Extra
>2.0	<0.1	108	25	21	5
<0.5	<0.1	51	14	11	7
total		169	39	32	12

表1: 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質
 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 (表 1)。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。

有意な発現変化のみられた 25 個のタンパク質の中で、15 個は、ポリープに比べて、転移のない癌組織での発現上昇がみられ (例: 図 2A)、4 個は、転移のない癌組織に比べて、転移のある癌組織での高発現が見られた (例: 図 2B)。また、1 個は、ポリープよりも転移のない癌組織、さらに転移のない癌組織よりも転移のある癌組織と悪性度が高い癌組織でより高発現していることが示された (図 2C)。一方、5 個のタンパク質は、ポリープに比べて転移のない癌組織での発現の低下が示された (図 2D)。これらのタンパク質の中で、9 タンパク質については大腸癌または他の癌での発現変化を示唆する報告がなく、大腸癌以外の癌も含めて、癌の進行に伴って発現変化する可能性が、本研究により新

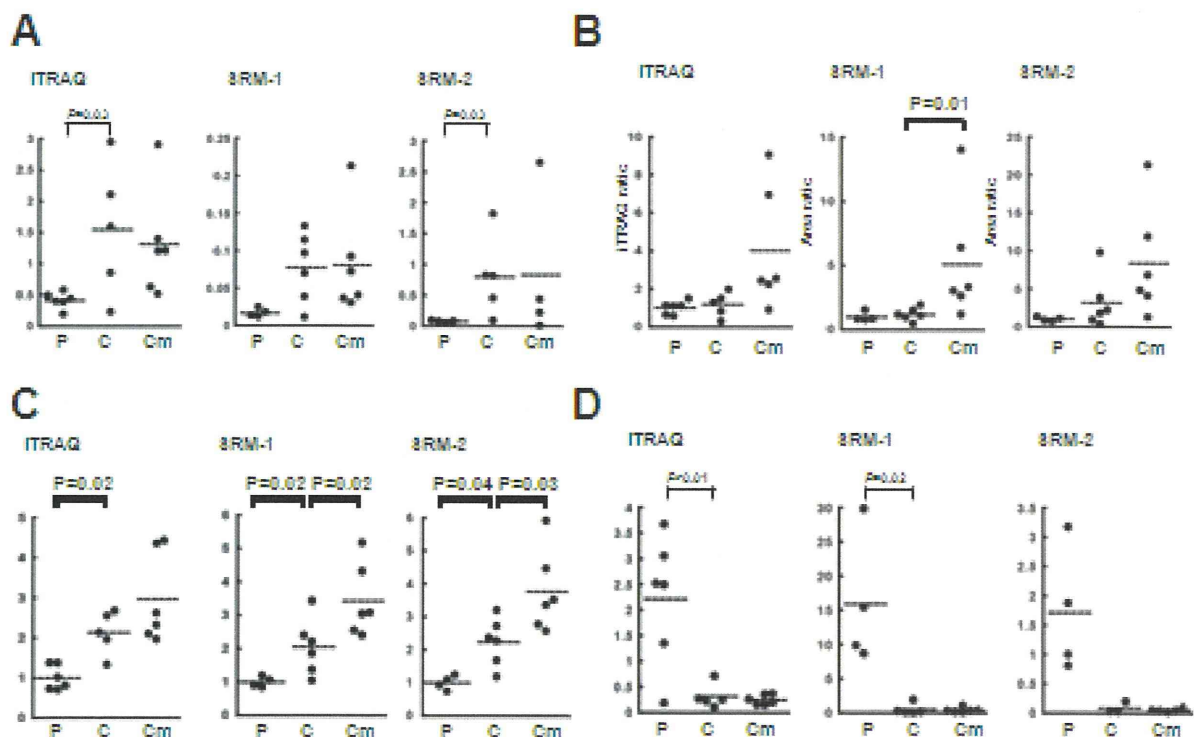


図2: 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質の検証

- A: ポリープに比べて、転移のない癌組織での発現上昇がみられたタンパク質
- B: 転移のない癌組織に比べて、転移のある癌組織での高発現が見られたタンパク質
- C: ポリープから転移のない癌組織、さらに転移のある癌組織と段階的に発現上昇がみられたタンパク質
- D: ポリープに比べて転移のない癌組織での発現の低下が示されたタンパク質

たに示された。

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、XとYについてはさらに検討を進めた。Xは、N端部分にシグナル配列または膜貫通ドメインと予想される配列を持つ機能未知のタンパク質で、SRMの検証結果から、癌の悪性化に伴う発現上昇が示された(図3A)。抗X抗体を用いたウェスタンブロットでも癌組織での発現の上昇が確認され(図3B)、大腸癌組織の免疫組織染色では、Xは正常細胞や間質での発現がほとんど認められず、癌細胞で高発現していることが示された(図3C)。

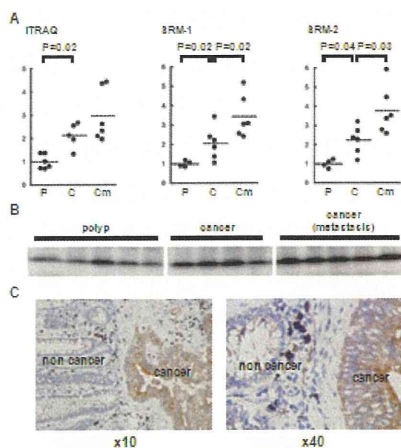


図3: 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質Xの検証
A: SRM/MRMでの検証 B: ウェスタンブロットでの検証 C: 免疫染色での検証(左図 x10, 右図 x40)

また、Yは、RRファミリータンパク質の一つで、その一次構造から2回膜貫通型の膜タンパク質と予想される。RRファミリータンパク質は、細胞内受容体に結合し、その受容体のplasma membraneへの移行を促進する機能を持つことが報告され、Yも細胞内膜のトラフィックへの関与が示唆されている。また、Yは、プロアポトーシス活性を持ち、そのpolymorphism(遺伝子多型)と大腸癌発症との関連性も示唆されている。SRMやウェスタンブロットの結果から、Yは、転移のない癌組織に比べて転移のある癌組織で発現が増加していることが示された(図4A、4B)。また、免疫組織染色の結果から、Yは癌細胞に高発現していることが示された(図4C)。

さらに、14種類の癌組織それぞれ50または100検体分を含む癌組織アレイ(TMA1150)の解析により、大腸癌におけるXの高発現が多検体で

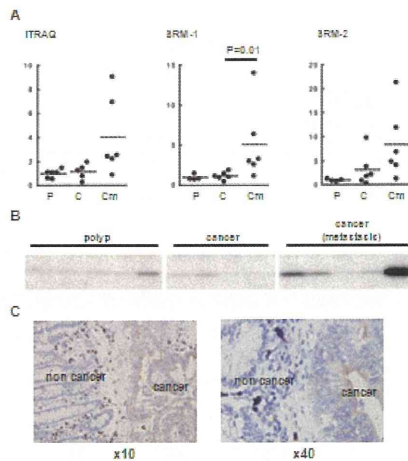


図4: 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質Yの検証
A: SRM/MRMでの検証 B: ウェスタンブロットでの検証 C: 免疫染色での検証(左図 x10, 右図 x40)

確認されただけでなく、肝臓癌や乳癌でもXの発現が増加していることが示された(図5A)。また、Yは大腸癌だけでなく、前立腺癌、乳癌でも高発現していることも示された(図5B)。

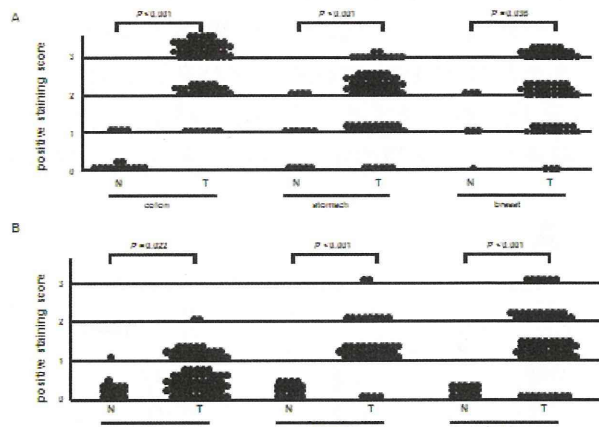


図5: 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質XとYの組織アレイを用いた検証
免疫染色強度で4段階に分類 A: Xタンパク質, B: Yタンパク質

(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

Location	Numbers	%
total	5122	
Plasma membrane	829	16.2
Extracellular Space	340	6.6

表2: 乳癌組織膜タンパク質プロテオミクス解析同定数
5122種類のタンパク質の同定に成功した(表2)。

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

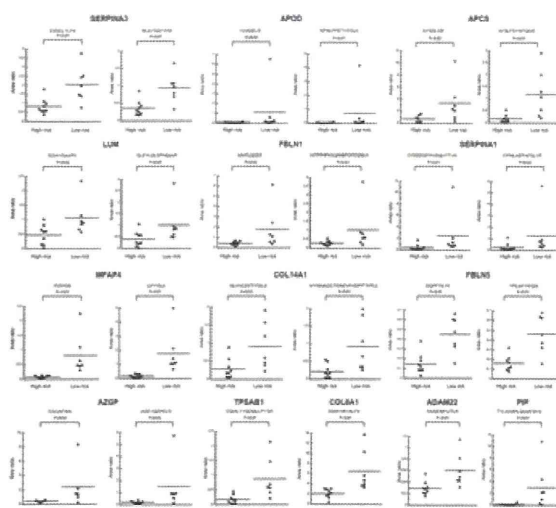


図6: 乳癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質の検証
SRM/MRMによる解析後それぞれのリスク群を有意差検定Wilcoxon testを行い有意差(p<0.05)がえられたタンパク質の結果を示している。

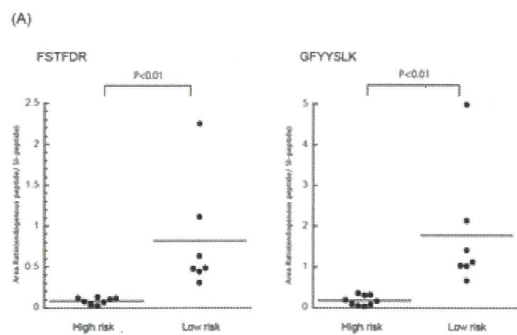


図7: 乳癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質XXの検証
A: SRM/MRMでの検証, B: ウェスタンブロットでの検証

有意差のある発現変動を示した(図6)。その中で、10個のタンパク質は現在のところ乳癌での

論文報告はない。

10種類の候補タンパク質中で利用できる抗体があったXXとYYのウェスタンブロット・免疫組織学染色による検討を行った。XXは、ウェスタンブロットの結果よりハイリスク群に比べローリスク群で有意差のある発現変動が示された(図7)。YYも同様にウェスタンブロットの結果ハイリスク群に比べローリスク群で発現変動が確認され、また免疫組織学染色によっても同様の結果が示された(図8)。

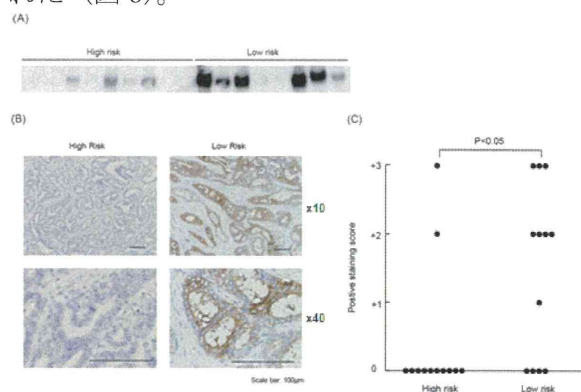


図8: 乳癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質YYの検証
A: SRM/MRMでの検証, B: ウェスタンブロットでの検証, C: 免疫染色での検証(上図x10, 下図x40)

(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3537のリン酸化タンパク質、10438のリン酸化

	Number of identified phosphoprotein/peptides		
	unique phosphoproteins	unique phosphopeptides	unique phosphorylated sites
# of identified protein/peptide	3537	10438	9250 (Ser:7814, Thr:1334, Tyr:102)
# of quantified protein/peptide	1980	4012	3648 (Ser:3240, Thr:388, Tyr:20)

Number of phosphoprotein/peptides with significant difference		
ratio, p-value(high/low risk)	phosphoprotein	phosphopeptide
> 2.0 (p<0.1)	45	50
< 0.5 (p<0.1)	58	67
total	103	117

表3: 乳癌組織リン酸化タンパク質バイオマーカー候補タンパク質
MammaPrintで再発高リスク群と再発低リスク群のTRAID解析で同定された乳癌再発バイオマーカー候補リン酸化ペプチドの同定に成功した(表3)。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(表3)。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($p < 0.05$)。また、8種類のリン酸化サイトについては、差のある傾向が見られた($p < 0.2$)。残り4個のリン酸化ペプチドについては、両群間で有意差が見られなかった(図9)。

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か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

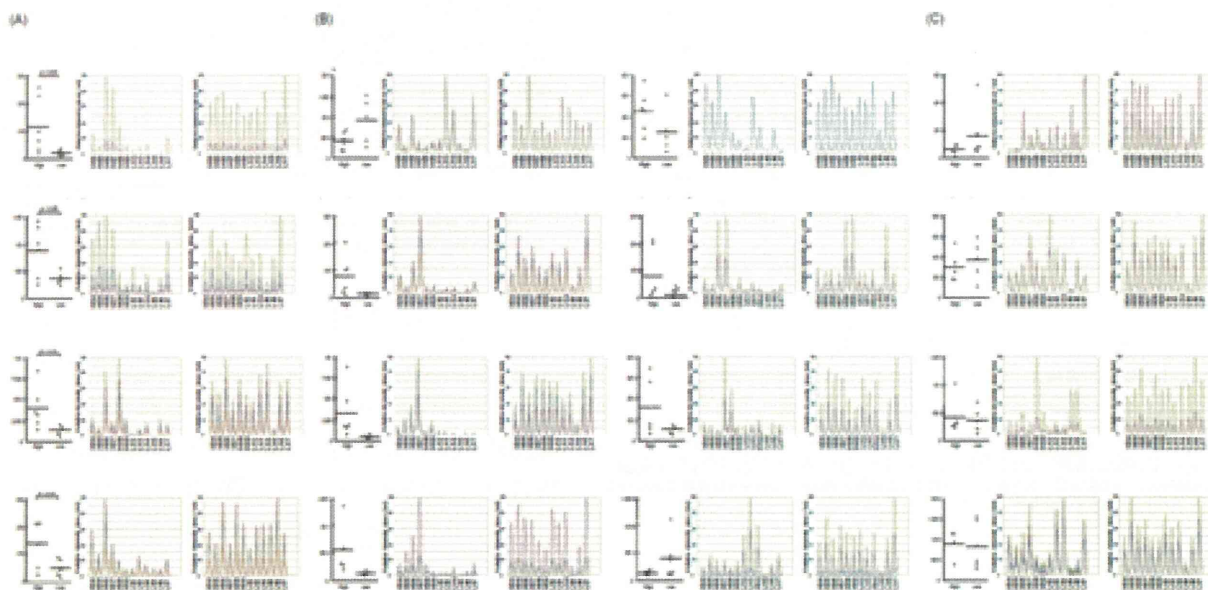


図9: 乳癌組織リン酸化タンパク質バイオマーカー候補タンパク質の検証

SRM/MRMによる解析後それぞれのリスク群に対し、有意差検定t-testを行った。

A:有意差が見られたリン酸化ペプチド($p < 0.05$)、B:有意差はなかったが差が見られたリン酸化ペプチド($p < 0.2$)

C:差の見られなかったリン酸化ペプチド

C-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 APL1βのSRM/MRM解析

SRM/MRM法を用い、血中の超微量なAPL1βペプチドの定量系を確立し、健常人血漿中のAPL1βが測定可能であることを確認した。ただし、血中のAPL1β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

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。

D. 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。これらのタンパク質には、癌のバイオマーカー候補タンパク質として既に報告されているものに加えて、未だ報告のない新規のバイオマーカー候補タンパク質も含まれていた。今回得られた大腸癌バイオマーカー候補タンパク質のうち、前癌病変であるポリープに比べて転移のない癌組織で発現の上昇または低下したタンパク質群は初期診断用マーカー、また転移に伴って発現変化するタンパク質群は予後マーカーに、ポリープよりも転移のない癌組織、さらに転移のない癌組織よりも転移のある癌組織と悪性度が高い癌組織でより高発現するタンパク質群は、進行マーカーとなる可能性もあり、さらに大規模な検証によって、明確になることが予想される。

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、XとYについては大腸癌組織の、XXとYYについては乳癌組織のウェ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XとYの発現量の増加がみられた。したがって、XとYは大腸癌だけでなく、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。

E. 結論

本年度は、SRM/MRM法を用いて、大腸癌・乳癌組織のプロテオーム解析で同定されたバイオマーカー候補タンパク質の大規模検証に成功した。また、血漿中に微量に存在するアル

ツハイマー病のバイオマーカー候補ペプチドであるAPL1 β をより感度良く、安定して定量することが可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Guo, F., Hiroshima, K., Wu, D., Satoh, M., Abulazi, M., Yoshino, I., Tomonaga, T., Nomura, F. & Nakatani Y. Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: Its expression and possible clinical significance. *Hum Pathol* in press. (2012).
2. Abulaizi, M., Tomonaga, T., Satoh, M., Sogawa, K., Matsushita, K., Kodera, Y., Obul, J., Takano, S., Yoshitomi, H., Miyazaki, M. & Nomura, F. The Application of a Three-Step Proteome Analysis for Identification of New Biomarkers of Pancreatic Cancer. *Int J Proteomics* 2011:628787, Epub 2011 Oct 17 (2011).
3. Katada, K., Tomonaga, T., Satoh, M., Matsushita, K., Tonoike, Y., Kodera, Y., Hanazawa, T., Nomura, F. & Okamoto, Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J Proteomics* **75**, 1803-15 (2012).
4. 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* **75**, 833-44 (2012).
5. Wu, D., Matsushita, K., Matsubara, H., Nomura, F. & Tomonaga T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor

- 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. *Int J Cancer* **128**, 1018-30 (2011).
6. Tonoike, Y., Matsushita, K., Tomonaga, T., Katada, K., Tanaka, N., Shimada, H., Nakatani, Y., Okamoto, Y. & Nomura, F. Adhesion molecule periplakin is involved in cellular movement and attachment in pharyngeal squamous cancer cells. *BMC Cell Biol* **12**, 41 (2011).
7. Sogawa, K., Kodera, Y., Noda, K., Ishizuka, Y., Yamada, M., Umemura, H., Maruyama, K., Tomonaga, T., Yokosuka, O. & Nomura, F. The measurement of a fibrinogen alpha C-chain 5.9kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution. *Clin Chim Acta* **412**, 1094-9 (2011).
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* **74**, 858-73 (2011).
9. Chu, I.M., Michalowski, A.M., Hoenerhoff, M., Szauter, K.M., Luger, D., Sato, M., Flanders, K., Oshima, A., Csiszar, K. & Green, J.E. GATA3 inhibits lysyl oxidase-mediated metastases of human basal triple-negative breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 2017-2027 (2012).
10. Singh, C.R., Watanabe, R., Zhou, D., Jennings, M.D., Fukao, A., Lee, B., Ikeda, Y., Chiorini, J.A., Campbell, S.G., Fujiwara, T., Ashe, M.P., Wek, R.C., Pavitt, G.D. & Asano, K. Mechanisms of translational regulation by a human eIF5 mimic protein. *Nucleic Acids Res* **39**, 8314-28 (2011).
11. Watanabe, R., Wei, L. & Huang, J. mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. *J Nuc Med* **52**, 497-500 (2011).
- G-2. 学会発表
招待講演
1. 朝長 毅 : 大規模定量プロテオミクスを用いた疾患バイオマーカー探索と SRM を基盤とした実用化へのアプローチ. 第 9 回北里疾患プロテオーム研究会, 東京, 2011 年 7 月 27 日
 2. 朝長 毅 : 定量プロテオミクス. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
 3. 朝長 毅 : 大規模定量プロテオミクスによる疾患バイオマーカー探索. 第 131 回質量分析関西談話会, 大阪, 2011 年 11 月 12 日.
 4. 朝長 毅 : 近年のプロテオーム解析技術の進歩と循環器病研究への応用. 第 11 回 Cardiovascular Frontier Conference, 東京, 2011 年 11 月 19 日.
 5. 足立 淳 : Bioinformatics -GO annotation-. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
- 一般講演
1. 白水 崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立 淳, 松原久裕, 松本雅紀, 中山敬一, 朝長 毅 : 大規模リン酸化プロテオーム解析による癌転移に関わる新規リン酸化シグナルの探索. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 北海道, 2011 年 6 月 27-29 日
 2. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅 : DNA 損傷応答におけるリン酸化・ユビキチン化プロテオーム定量解析. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
 3. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅 : 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.

4. 久家貴寿, 鳴海良平, 村上達夫, 足立 淳, 白水 崇, 小寺義男, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長 毅: 大腸がん手術組織標本の定量的リン酸化プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
5. 越中屋里香, 久家貴寿, 足立 淳, 朝長 毅: 大腸癌組織の細胞核プロテオーム解析による染色体不安定性に関連するタンパク質の探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
6. 久米秀明, 鳴海良平, 渡邊史生, 石濱 泰, 松原久裕, 小寺義男, 朝長 毅: 大腸癌バイオマーカーとなる膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM による検証. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
7. 白水 崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立 淳, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長 毅: ヒト大腸癌臨床検体を用いたリン酸化プロテオーム解析による新規転移因子の探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
8. 村岡 賢, 久米秀明, 渡邊史生, 川崎直子, 足立 淳, 鳴海良平, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: 乳癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM 解析による検証. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
9. 川崎直子, 平野賢一, 原 康洋, 足立 淳, 朝長 毅: プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
10. 渡邊史生, 田上真次, 佐野聖三, 熊谷久美子, 常見雅彦, 大河内正康, 朝長 毅: SISCAPA-SRM を用いた血漿中に pM レベルで存在するアルツハイマー病バイオマーカーペプチド APL1 β の絶対定量. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
11. 佐野聖三, 田上真次, 大河内正康, 熊谷久美子, 常見雅彦, 小寺義男, 朝長 毅: SISCAPA-SRM を用いた血漿中のアルツハイマー病バイオマーカーペプチド APL1 β 定 量のための前処理法の検討. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
12. 吉田 豊, 張エイ, シャイマエナニー, 許波, 渡邊史生, 八尾板永信, 朝長 毅, 山本 格: 正常ヒト尿プロテオームの特徴: AKI バイオマーカーの多項目同時測定の基礎的検討. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
13. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 中山敬一, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
14. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
15. 久米秀明, 松原久裕, 小寺義男, 朝長 毅: 膜タンパク質の大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索と SRM 法を用いた検証. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
16. 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 松原久裕, 中山敬一, 小寺義男, 朝長 毅: 大腸癌の定量的リン酸化プロテオーム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
17. 白水 崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立 淳, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長 毅: Phosphoproteomic analysis of human colorectal cancer tissues for exploring a novel cancer metastatic biomarker. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
18. Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for Shotgun Proteomics and SRM-based systematic validation of membrane proteins in breast cancer tissues. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
19. 風見隆浩, 朝長 毅, 佐藤 守, 久家貴寿,

- 松下一之, 野村文夫: annexin A2 の核内高発現はセントロメア損傷と染色体不安定性に関与する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
20. 松下一之, 梶原久子, 朝長 毅, 松原久裕, 島田英昭, 久保秀司, 吉田 稔, 野村文夫: c-myc 遺伝子転写抑制因子 FIR は SAP155 によりスプライシング変化を受け c-Myc の発現スイッチとして機能する. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
21. 杉原 豊, 谷口浩和, 朝長 毅, 藤田 伸, 近藤 格: 大腸がんにおけるバイオマーカー研究のためのプロテオミクス. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
22. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日.
23. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
24. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
25. 久米秀明, 鳴海良平, 渡邊史生, 石濱 泰, 松原久裕, 小寺義男, 福岡順也, 朝長 毅: 大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索と SRM/MRM 法を用いた定量法の確立および診断への応用. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
26. 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 村上達夫, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 福岡順也, 朝長 毅: 定量的リン酸化プロテオミクスとバイオインフォマティクスを用いた大腸がんリン酸化シグナル伝達機構の包括的理解. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
28. 村岡 賢, 久米秀明, 渡邊史生, 川崎直子, 足立 淳, 鳴海良平, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: 乳癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM/MRM を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検証および予後予測診断への応用. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
29. 村上達夫, 鳴海良平, 久家貴寿, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: SRM/MRM 法を用いたリン酸化ペプチドの定量法の確立. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
30. 川崎直子, 平野賢一, 原 康洋, 足立 淳, 白水 崇, 朝長 毅: プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
31. 渡邊史生, 田上真次, 佐野聖三, 熊谷久美子, 常見雅彦, 大河内正康, 朝長 毅: Immuno-SRM/MRM を用いた新規アルツハイマー病血漿バイオマーカーペプチド APL1 β の絶対定量法の確立と臨床応用. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
32. 風見隆浩, 朝長 毅, 佐藤 守, 久家貴寿, 松下一之, 野村文夫: Overexpression of annexin A2 in the nucleus is involved in centromere damage and chromosomal instability. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
33. 東濃篤徳, 坂手龍一, 高橋一朗, 足立 淳, 朝長 毅: カニクイザル白血球における細胞外カルレティキュリンによる遺伝子発現の変化. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
34. 竹内昌夫, 東濃篤徳, 竹内喜久子, 牧野初音, 田沼玲子, 足立 淳, 高橋一朗, 朝長 毅, 梅澤明弘, 亀岡洋祐: ヒト間葉系幹細胞株 (UE6E7T-3) の形質転換過程における mRNA 発現解析. 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.

35. 阿部紘平, 盛永敬郎, 久保田翔, 石橋賢一, 幸龍三郎, 本田拓也, 久家貴寿, 福本泰典, 中山祐治, 朝長 毅, 山口直人: リソソームにおける c-Src のチロシンリン酸化基質の解析. 第 132 回日本薬学会年会, 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.
36. 盛永敬郎, 阿部紘平, 長谷川智津, 久家貴寿, 久保田翔, 福本泰典, 中山祐治, 朝長 毅, 山口直人: 浮遊細胞における Lyn の高密度膜への集積化. 第 132 回日本薬学会年会, 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日.

国際学会

一般講演

1. Shio Watanabe, Shinji Tagami, Seizo Sano, Kumiko Yoshizawa-Kumagaye, Masahiko Tsunemi, Masayasu Okochi and Takeshi Tomonaga "Absolute quantitation of plasma biomarker peptides for Alzheimer disease at pico-molar level using SRM coupled with stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies." HUPO2011 10th World Congress, Geneva, Switzerland, 4-7 September, 2011.
2. Jun Adachi, Ryohei Narumi, Shozo Sano, Takahisa Kuga, Takashi Shiromizu, Masaki Matsumoto, Kei-ichi Nakayama, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura, Minoru Takata, Takeshi Tomonaga. "Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network." HUPO2011, Geneva, Switzerland, 4-7 September, 2011.
3. Shiromizu T, Narumi R, Kuga T, Adachi T, Matsubara H, Matsumoto M, Nakayama K, Tomonaga T, "Phosphoproteomic analysis of clinical colon cancer specimen; Exploring a novel factor of cancer metastasis" HUPO 2011, Geneva, Swiss, September 2011.
4. Naoko Kawasaki, Kenichi Hirano, Yasuhiro Hara, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Takeshi Tomonaga "Biomarker Discovery for Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy using Proteome and Transcriptome Analysis." THE FIRST

INTERNATIONAL SYMPOSIUM on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy & Neutral Lipid Storage Disease, Kyoto, November 26, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

石濱 泰 京都大学大学院薬学研究科 教授
 近藤 格 国立がんセンター研究所プロテオーム バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー
 小寺 義男 北里大学大学院理工学研究科生体分子動力学講座 准教授
 大河内 正康 大阪大学大学院・医学系研究科・精神医学教室 講師
 田上真次 大阪大学大学院・医学系研究科・精神医学教室 講師
 足立 淳 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 原 康洋 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 久米 秀明 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 久家 貴寿 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 白水 崇 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 村岡 賢 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 金川 章子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 佐野 聖三 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 鳴海 良平 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 越中屋 里香 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 渡邊 史生 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
 川崎 直子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト

サーチプロジェクト

疾患関連たん白質の解析基盤の研究

研究分担者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

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たん白質から容易に分離でき、がん細胞由来の膜たん白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、バイオマーカーたん白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たん白質の探索を目的に、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。

A. 研究目的

がんの中で肺がんの死亡者数は本邦で最多であり、肺がん治療の最適化に資する新たなバイオマーカーの開発が期待されている。現在、肺がんの診断マーカーとして **CEA**、**SCC** 抗原、**NSE** などが使われているが、これらは肺がんの有無の判断に用いることはできるものの、治療方針の決定など、個別化医療に資する高性能なバイオマーカーたん白質とはなっていない。また、肺がんの場合、生検等による病理組織検査も実施困難である場合が多いため、血液で診断可能なバイオマーカーが期待される。

血液中には、アルブミン等の主要たん白質が多量に存在する一方、バイオマーカーとなりうるたん白質は微量である。多量に存在する主要たん白質を除去する前処理法が種々試みられているものの、血清・血漿のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索は困難である。そこで我々は、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。**exosome** は、血中に多量に存在する主要たん白質から容易に分離でき、がん細胞由来の膜たん白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、バイオマーカーたん白質の

探索対象として有望と考えた。そこで本年度は、がん細胞分泌 **exosome** 上のたん白質のプロテオーム解析により、血液診断が可能な新規肺がんバイオマーカー候補たん白質の探索を試み、その有用性を評価した。

B. 研究方法

1. 培養肺がん細胞分泌 **exosome** の調製

(1)細胞培養

ヒト肺扁平上皮がん細胞 **HARA**、**HARA-B** は **JCRB** 細胞バンクより、**A549** は **ATCC** より、ヒト肺胞上皮細胞 **HPAEpiC** は **ScienCell** より入手した。**HARA**、**HARA-B** は 10% **FCS**(**Biowest**)含有 **RPMI-1640** を用いて、**A549** は **Eagle's minimal essential medium** を用いて 37°C、5% **CO2** 下で培養した。**HPAEpiC** は肺胞上皮用培地(**ScienCell**)を用いて培養した。いずれの細胞も継代培養し、サブコンフルエント状態のものを **exosome** 調製に供した。

(2)培養上清および培養上清由来 **exosome** の調製

各細胞を培養ディッシュ上で継代培養し、サブコンフルエント状態になったものを **PBS** で洗浄し、無血清培地 (**OptiMEM** 培地、**Invitrogen**) に置換して 72 時間培養した。培養上清を回収し、200 g で 5 分の遠心で細胞を除去し、上清を回収した。次に、上清を 16,000 g で 20 分間遠心分離し、上清を 0.22 μm のメンブレンフィルター (**ADVANTEC**)でろ過することで細胞デブリス

等を除去した。回収した溶液を超遠心機により 140,000 g、70 分遠心分離し、ペレットに PBS を加えて、再度 140,000 g で 70 分遠心分離することで洗浄し、得られたペレットを PBS で懸濁し、exosome 分画として回収した。

(3) Exosome のたん白質量

Exosome のたん白質量の測定は、PBS(pH 7.4) に懸濁した exosome 溶液を Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific) で測定した。

(4) Exosome の粒子径の測定

Exosome の粒子径は動的光散乱法で測定した。たん白質量として 1 µg/ml になるよう PBS で調整した exosome を、Zetasizer Nano-ZS(Malvern Instruments)にて測定した。

(5) Exosome の電子顕微鏡観察

フォームバル膜を張った銅メッシュグリッドをカーボン蒸着(30 Å × 3 回蒸着)した。親水化処理した後、パラホルムアルデヒドで固定した exosome サンプルを 5 µl 載せ 15~20 分吸着した。染色のため 2%酢酸ウラン溶液を添加し、濾紙で余分な溶液を除去した。乾燥させたサンプルメッシュを透過型電子顕微鏡 (HITACHI H-7650) により観察した。

2. Exosome のプロテオーム解析

(1) プロテオーム解析

たん白量として 1 µg の exosome を 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)100 µl に希釈し、20 ng のトリプシンを添加後、37°C で 16 時間反応させることで、たん白質を消化した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮した後、ZipTip C18 チップを用いて精製してサンプル溶液とした。質量分析には LTQ Orbitrap XL(Thermo Scientific)を用いた。たん白質の同定には、メチオニン残基の酸化、Iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮し、Mascot search により swiss prot のデータバンクをもとに解析した。

(2) 組織マイクロアレイの免疫染色

がん組織マイクロアレイ (TMA) は US Biomax 社から購入した。抗体は anti-human CNTN-1 polyclonal antibody (AF904: R & D)、

anti-human EphA2 polyclonal antibody (AF3035: R & D)を用いた。TMA を 60°C で 2 時間加温し、キシレンに 3 度浸すことで脱パラフィン処理した。次いで、無水エタノール、90% エタノール、75% エタノールに順次浸すことで親水化した。DAKO Target Retrieval Solution pH 9(DAKO)に浸漬し、加温加圧装置 (Pascal、DAKO)にて抗原賦活化処理 (125°C、30 秒、90°C、10 秒)を行った。染色作業は自動装置 DAKO AutoStainer(DAKO)を使用した。発色には ENVISION+ Systemlabelled polymer-HRP (DAKO)と DAB+ liquid(DAKO)を用いた。カウンターステインとしてマイヤーのヘマトキシリンで染色を行った。各抗原の発現の有無については、組織中のがん細胞での発現割合を 2 段階、発現強度を 3 段階でスコアリングし、その合計が 2 以下で陰性、3 以上で陽性と判定した。

C. 研究結果

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(Fig. 1a)。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(Fig. 1 b-c)。

そこで次に、がん細胞特異性の高い exosome 上の膜たん白質を同定するため、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、膜たん白質であって、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(Table 1)。

EphA2 と CNTN-1 の肺がんバイオマーカーたん白質としての有用性を検証するため、これらたん白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%(Fig. 2, Table 2)、CNTN-1 は肺がん症例の約 21%(Fig. 3, Table 3)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で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(Fig. 4)。

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。

D. 考察

本研究では、肺がんの検査・診断のためのバイオマーカーたん白質となり得る exosome 上の膜たん白質の同定を試みた。その結果、腺扁平上皮がんで高発現するたん白質 CNTN-1 を見出した。肺腺扁平上皮がんの症例数は少ないものの、予後不良であることが報告されている。従って、CNTN-1 は肺がんの中でも難治性の肺腺扁平上皮がんの可能性を示すバイオマーカーたん白質として有用であることが示唆された。CNTN-1 は神経細胞の Notch1 経路を活性化し、細胞接着能の制御に関係していることが知られていることから、本たん白質が高発現している肺がん細胞では転移性が亢進している可能性がある。また、EphA2 も肺がんで高発現している

ことが判明した。しかし、EphA2 は正常組織でも広く発現していたことから (data not shown)、発現レベルやがん細胞での機能について、さらなる解析が必要と考えられる。

以上の結果から、肺がん分泌 exosome 上の CNTN-1 や EphA2 は、新規肺がんバイオマーカーたん白質として有望であることが示唆された。がん細胞分泌 exosome 上の CNTN-1 は、血液での検出によって肺がんの組織型を評価できるものと考えられ、がん個別化医療に資する検査法・診断法への応用が期待される。

E. 結論

血液診断が可能な新規肺がんバイオマーカー候補たん白質の探索を目的に、がん細胞分泌 exosome のプロテオーム解析を試みた。その結果、肺がんバイオマーカー候補として CNTN-1、EphA2 を見出した。今後、血液での検出系の確立や患者血液での検証等を試みる予定である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Yamashita, T., Okamura, T., Nagano, K., Imai, S., Abe, Y., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. and Tsunoda S. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer. *Pharmazie* **67**, 253-5 (2012).
2. 鎌田春彦. 抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術. *薬学雑誌* **132**, 473-7 (2012).

G-2. 学会発表

1. Yamashita T., Nagano K., Watanabe T., Kanasaki S., Maeda Y., Zhao X., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression of Annexin A4 is related to cisplatin-susceptibility in mesothelioma cells.,

- HUPO2011, 2011.
2. Kamada H., Abe Y., Nagano K., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The search for a biomarker of hepatic injury expressed by sinusoidal endothelial cells., HUPO2011, 2011.
 3. Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Imai S., Abe Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The relationship between oxysterol binding protein like 5 and calumenin during lymph node metastasis., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 2011.
 4. Kanasaki S., Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Possibility of Ephrin receptor A10 as a drug target in triple negative breast cancer., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 2011.
 5. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Functional analysis of a novel breast cancer related protein, ephrin receptor A10., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 2011.
 6. 金崎聡一郎, 長野一也, 山下琢矢, 渡邊貴信, 前田祐香, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : 乳がん関連たんぱく質 Ephrin receptor A10 に対する抗体医薬開発に向けた基礎検討., 第 27 回日本 DDS 学会学術集会., 2011 年.
 7. 前田祐香, 長野一也, 山下琢矢, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : 新規乳がん関連たんぱく質 Ephrin receptor A10 の機能解析と創薬標的としての有用性評価., 第 27 回日本 DDS 学会学術集会., 2011 年.
 8. 長野一也, 岡村賢孝, 山下琢矢, 堤 康央, 角田慎一 : プロテオミクスによる大腸がん転移関連たんぱく質の探索., 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会., 2011 年.
 9. Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteomic profiling of proteins associated with metastasis in colorectal cancer cell lines., 第 70 回日本癌学会学術総会., 2011 年.
 10. 山下琢矢, 長野一也, 金崎聡一郎, 前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : Exosome 由来膜たんぱく質のプロテオーム解析による新規肺がん血液診断マーカーの探索., 日本薬学会第 132 年会., 2012 年.
 11. 前田祐香, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 古屋 剛, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : 新規乳がん分子標的治療薬の開発を目指した Eph receptor A10 の創薬ターゲットとしての有用性評価., 日本薬学会第 132 年会., 2012 年.
 12. 長野一也, 岡村賢孝, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 古屋 剛, 井上雅己, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一 : 大腸がん転移診断・治療薬の開発を目指した転移関連たんぱく質の探索., 日本薬学会第 132 年会., 2012 年.
- H. 知的財産の出願・登録状況**
- H-1. 特許取得**
1. 発明の名称 : 抗体、乳がんの治療に用いられる医薬組成物、腫瘍検査方法、及び、腫瘍検査用試薬
出願番号 : 特願 2011-57029 号
出願日 : 2011 年 3 月 15 日
(PCT/JP2012/001802)
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所
発明者 : 角田慎一, 長野一也, 堤 康央
 2. 発明の名称 : 肺腺扁平上皮癌の腫瘍マーカー及び診断キット
出願番号 : 特願 2012-050629 号
出願日 : 2012 年 3 月 7 日
出願人 : 独立行政法人医薬基盤研究所
発明者 : 鎌田晴彦, 角田慎一, 堤 康央
- H-2. 実用新案登録**

該当無し

H-3. その他

該当無し

I. 研究協力者

鎌田 春彦 医薬基盤研究所 バイオ創薬
プロジェクト

阿部 康弘 医薬基盤研究所 バイオ創薬
プロジェクト

長野 一也 医薬基盤研究所 バイオ創薬
プロジェクト

山下 琢矢 医薬基盤研究所 バイオ創薬
プロジェクト