

Fig. 1 Characteristics of purified exosomes.

(a) The average diameter of exosomes. The average particle diameter obtained by zeta potential measurement. (b) The TEM images of B16-F10 exosomes reported previously. The figure was reproduced from *Laboratory Investigation* (2009) 89, 1317–1328. (c) Exosomes derived from HARA-B cells (*bar, b: 200 nm, c: 100 nm*).

Table 1 The proteins identified in all lung cancer cells (HARA, HARA-B and A549) and not in normal lung cells (HPAEPiC)

	Protein name	Peptide score
1:	Chloride channel ABP	212
2:	Cyclophilin A	192
3:	GTP-binding protein smg p21B	184
4:	Solute carrier family 2	176
5:	Glucose transporter type 1	176
6:	Annexin A1	174
7:	Annexin A2	166
8:	Ezrin	158
9:	Catenin gamma	155
10:	ADP-ribosylation factor 1	153
11:	28 kDa heat shock protein	151
12:	Profilin I	146
13:	Epidermal growth factor receptor	144
14:	Heat shock 70 kDa protein	144
15:	Ephrin type-A receptor 2	143
16:	Putative uncharacterized protein GNB2	142
17:	Annexin A1 l	138
18:	14-3-3 protein gamma	134
19:	Heat shock 86 kDa	129
20:	Rab GDP dissociation inhibitor beta	128
21:	Annexin A5	126
22:	GTP-binding protein YPT3	122
23:	Ras-related protein Rap-2b	120
24:	Radixin	113
25:	Tubulin beta-7 chain	112
26:	Programmed cell death protein 6	111
27:	LDH heart subunit	108
28:	MIT domain-containing protein 1	103
29:	Glutathione S-transferase P	101
30:	TSG101	101
31:	Ras-related protein Rab-7	100
32:	Alpha E-catenin	97
33:	E-cadherin	97
34:	Fructose-bisphosphate aldolase A	96
35:	Integrin alpha-V	95
36:	Cadherin-associated Src substrate;Catenin delta-1	92
37:	Peroxiredoxin-1	91
38:	CDw156	90
39:	Contactin-1	88
40:	Annexin A4	85
41:	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	84
42:	Adenylate cyclase-stimulating G alpha protein	84
43:	14-3-3 protein zeta/delta	81
44:	Ras-related protein Rab-1B	78
45:	L-lactate dehydrogenase	77
46:	CD9	77
47:	ATL-derived factor	68
48:	SM22-alpha homolog	60
49:	Charged multivesicular body protein 2a	51
50:	Plasma membrane calcium ATPase isoform 1	51

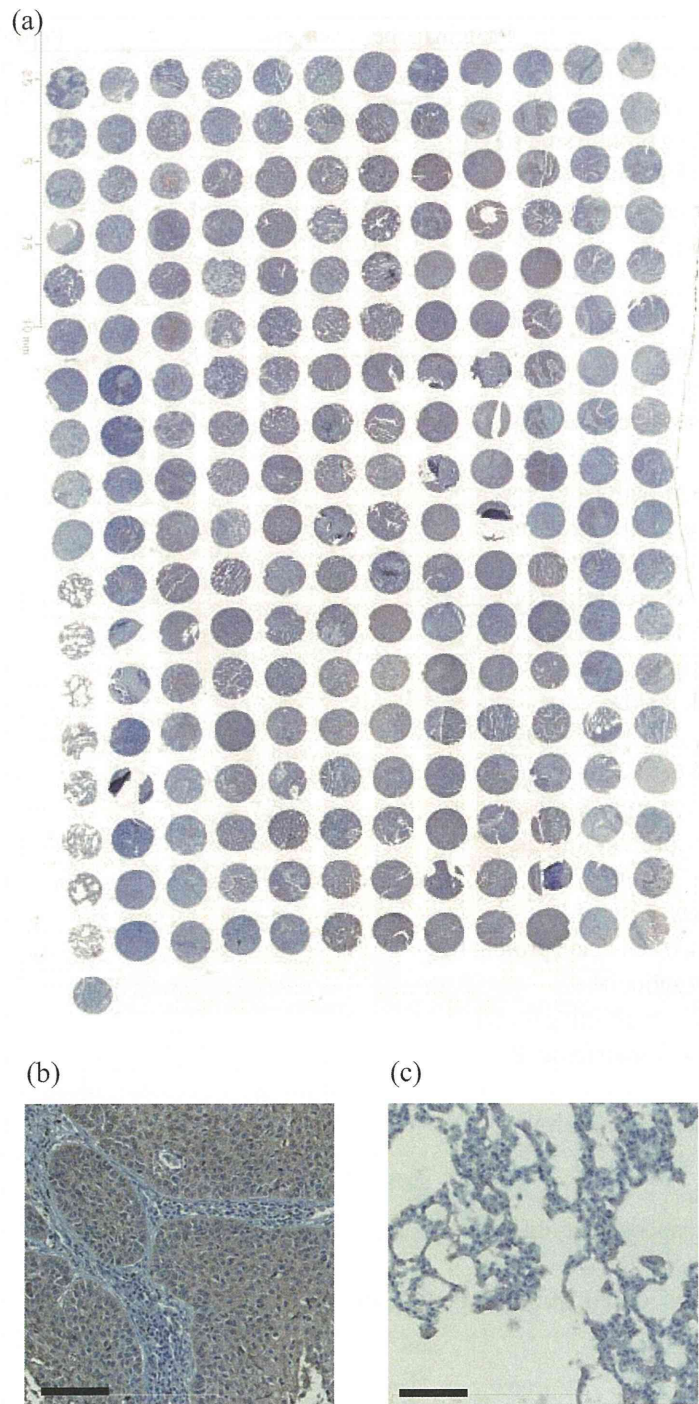


Fig. 2 Expression of EphA2 in human lung cancer and normal lung tissues. The tissues were immunostained by anti EphA2 and antibody. (a) Whole image of immunostained tissues. (b) Positive case of EphA2 in human lung cancer tissue. (c) Negative case of EphA2 in human normal lung tissue. Representative 200 x photomicrographs presented. (*bar*, 100 μ m).

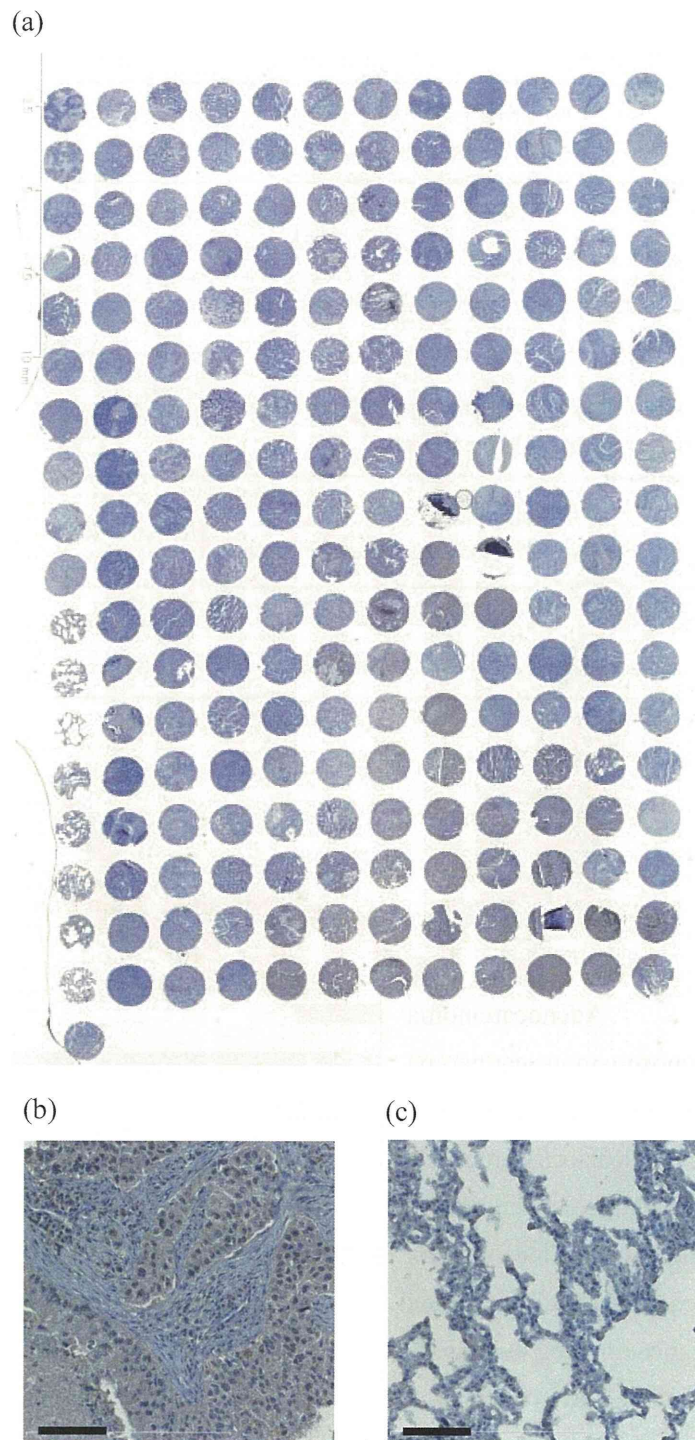


Fig. 3 Expression of CNTN-1 in human lung cancer and normal lung tissues. The tissues were immunostained by anti and CNTN-1 antibody. (a) Whole image of immunostained tissues. (b) Positive case of CNTN-1 in human lung cancer tissue. (c) Negative case of CNTN-1 in human normal lung tissue. Representative 200 x photomicrographs presented. (*bar*, 100 μ m).

Table 2 Expression profile of EphA2 and CNTN-1 in human lung cancer tissues

	Number of positive cases	Number of negative cases	Positive case ratio
EphA2	141	67	67.8%
CNTN-1	44	164	21.2%

Table 3 Expression profile of EphA2 and CNTN-1 in human normal lung tissues

	Number of positive cases	Number of negative cases	Positive ratio
EphA2	0	8	0%
CNTN-1	0	8	0%

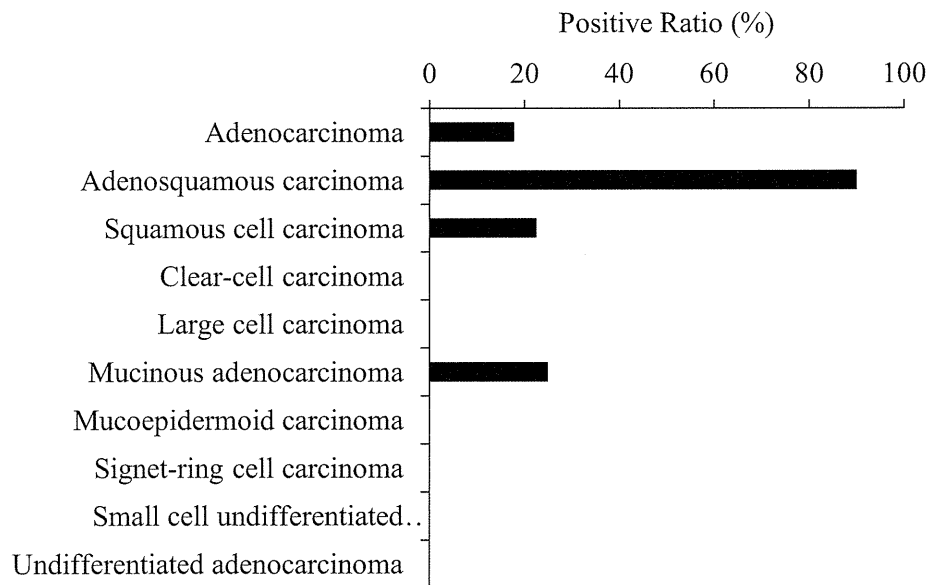


Fig. 4 CNTN-1 expression in various type of human lung tumor tissue. Expression of CNTN-1 was analyzed using tissue microarray.

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

研究分担者 仲 哲治 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 プロジェクトリーダー

研究要旨

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。

A. 研究目的

癌に対する特異的な抗原を同定することは、標的とする抗原に特異的な抗体を作成することで、抗体医薬品による新規治療法を開発することが可能である。実際にEGFR やHer2 など癌細胞に高発現する細胞表面膜タンパク質に対する抗体が癌に対する治療薬として臨床応用されている(1)。現在、これらの分子以外にも癌細胞特異的な細胞表面膜タンパク質、すなわち癌抗原の同定が試みられている。しかし、従来のDNA アレイ法などでは膨大な候補分子から癌抗原候補分子を絞り込む効率的な方法が無いことや、解析対象がmRNA レベルであることから実際にタンパク質として高発現している点不明であることに加え、mRNA レベルでの解析ではタンパク質の翻訳後修飾情報が得られないため、抗体医薬品の標的と成り得る癌細胞特異的な細胞表面膜タンパク質を同定することが容易ではなかった。近年、質量分析計の性能の劇的

な向上に伴って、網羅的なタンパク質の解析が可能となってきた。また、1度の解析で多検体を比較定量解析することが可能な試薬も開発され、臨床検体を用いた疾患関連蛋白質の探索が推進されている(2)。

婦人科悪性腫瘍の1つである子宮内膜癌は手術と化学療法が標準的な治療法であるが、再発や転移した癌に対する有効な治療法が確立されていない。そのため、子宮内膜癌の癌抗原タンパク質を同定する事が出来れば、新たな治療法の開発につながるものと期待される。

本研究ではビオチン標識による細胞表面膜タンパク質の濃縮と、iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 試薬による定量的なタンパク質発現解析を組み合わせることで、子宮内膜癌に対する新規癌抗原タンパク質を同定することを目的とした。

B. 研究方法

Clinical characteristics of patients (n = 182)		
Characteristic	Normal endometrium	Endometrial cancer
Age		
mean age \pm SD	49.7 \pm 9.4	55.9 \pm 9.6
median age (range)	47 (35-73)	56 (22-84)
Normal endometrium		
Proliferative phase	22 (37.3%)	
Secretory phase	22 (37.3%)	
Atrophic endometrium	15 (25.4%)	
Endometrial cancer		
Endometrioid		121 (98.4%)
Serous		2 (1.6%)
Grade		
G1		46 (38.0%)
G2		47 (38.8%)
G3		28 (23.1%)
FIGO stage		
I		77 (62.6%)
II		8 (6.5%)
III		39 (24.4%)
IV		8 (6.5%)
Total	59 (100%)	123 (100%)

表1 患者の臨床情報

(1) 試料

子宮内膜癌手術組織は大阪大学医学部附属病院にてインフォームドコンセントについて同意を得た患者より提供していただいた。正常子宮内膜細胞 E6E7/TERT は金沢大学医学部産婦人科学教室、京哲先生より分与していただいた。

(2) iTRAQ 法による細胞表面膜タンパク質の定量解析

正常子宮内膜細胞 E6E7/TERT に対して子宮内膜癌細胞株 HEC1, HEC1A, HEC6, HEC108, HEC116, HEC251, SNGII にて高発現する細胞表面膜タンパク質を探索することで子宮内膜癌特異的な癌抗原タンパク質の同定を試みた。まず、150mm シャーレで培養した8種類の細胞株に対して、sulfo-NHS-SS-biotin で細胞表面膜タンパク質をビオチン標識した。抽出したタンパク質を Neurto-avidin ビーズにて精製した。このとき、サンプル間での誤差を補正するため、sulfo-NHS-SS-biotin で標識したウシ血清アルブミンを内部標準として等量ずつ加え、質量分析計による定量結果の補正に用いた。精製したタンパク質をトリプシンで消化し、iTRAQ 試薬で標識した。8 サンプルを1つに混合し、イオン交換 HPLC にて 24 個のフラクションに粗分画し、それぞれの分画を脱塩後、質量分析計(nano LC-MS/MS)解析にて測定した。得られたデータを proteome discovererver1.1 にてデータベースサーチすることで、タンパク質の同定と定量を行った。

(3) RT-PCR および FACS による癌抗原発現の確認

RT-PCR 解析

正常子宮内膜細胞株(EM-E6/E7/TERT)、及び子宮内膜癌細胞株 HEC-1, HEC-1A, HEC-6, HEC-88nu, HEC-108, HEC-116, HEC-251, SNG-II について、RNeasy mini kit(QIAGEN)により RNA を精製し、QuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen)を用いて cDNA へ逆転写した。RT-PCR は TaKaRa Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて行った。以下のプライマー配列を用いた。

BST2, forward primer

5'-CGGCCTTCGGGCAGTGATGG-3' and reverse primer 5'-GCTGAGGCCAGCAGCACAA-3';

β -actin, forward

primer 'AGCCTCGCCTTTGCCGA-3' and

reverse primer 5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'.

FACS 解析

細胞は PBS (Nacalai Tesque) で 2 回洗浄し、0.02% EDTA solution (Nacalai Tesque) で dish よりはがした。細胞を FACS staining buffer (PBS supplemented with 1% FBS and 0.1% sodium azide) で 2 回洗浄し、100 倍希釈した mouse anti-human BST2 antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA) で染色し、続いて 100 倍希釈した Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) で染色した。染色した細胞は FACS Canto cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) で測定し、FlowJo software (Tree Star, Stanford, CA, USA) を用いてデータ解析した。

(4) 免疫組織化学染色法による癌抗原の発現解析

ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織 (正常子宮組織 59 検体、子宮内膜癌組織 123 検体) は大阪大学医学部附属病院にて手術を受けた患者より得た(検体の臨床情報の詳細は表 1 参照)。

パラフィン包埋組織の薄切は脱パラフィン処理、アルコールによる脱水を行った。BST2 に対す

る免疫組織化学染色はABC法をにより抗BST2抗体を用いて行った。免疫組織化学染色の結果、染色強度を4段階に分類した(no staining = 0, weak staining = 1, moderate staining = 2, strong staining = 3)。染色結果は3名の産婦人科腫瘍学者により独立して実施した。

(5) siRNA およびモノクローナル抗体による増殖阻害アッセイ

子宮内膜癌細胞は96ウェルプレートに1,000 cells/well まき、lipofectamine 2000 を用いた siRNA トランスフェクション後24, 48, 72時間後、あるいは抗体を加えた72時間後にWST-8アッセイ法によって細胞増殖アッセイを行った。に対するsiRNA および、negative control siRNA はQIAGEN社より入手した。

(6) 癌抗原に対するモノクローナル抗体によるADCCアッセイ

ADCCアッセイはcalcein-acetoxymethyl ester (calcein-AM) release assayにより実施した。SCIDマウス由来骨髓細胞をRPMI1640 medium (Invitrogen) supplemented with 50 ng/ml recombinant human IL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and 10 ng/ml recombinant mouse GM-CSF (Peprotech)にて5日間培養し、NK細胞、マクロファージを含む細胞障害活性をもつ細胞集団をbone marrow-derived lymphokine-activated killer cells (BM-LAK)として、エフェクター細胞として使用した。ターゲット細胞はCalcein-AM (Nacalai Tesque) を用いて37度で2時間標識した。1×10⁴ cellsの細胞を96ウェルプレートに撒き、0, 0.1, 1 (μg/ml)の濃度の抗BST2抗体を加え、エフェクターターゲット比率を50:1に設定した。抗体を含まない培地を添加したウェルを自発的なcalcein-AMの放出量、1% Nonidet P-40を添加したウェルをcalcein-AMの最大放出量とした。ADCCアッセイは37度にて4時間行った。100 μlの培養上清を新しいプレートに移し、Wallac 1420 ARVO fluoroscan (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)を用いて蛍光強度を測定した。相対細胞障害活性は以下のように計算した

$$\% \text{ lysis} = (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release}) \times 100$$

(7) 癌抗原に対するモノクローナル抗体によるCDCアッセイ

CDCアッセイは⁵¹Cr release assayを用いて行った。子宮内膜癌細胞を0.1 μCiの⁵¹Cr-sodium chromateを用いて37度で2時間標識し、DMEM培地で2回洗浄した。標識した子宮内膜癌細胞を1×10⁴ cellsずつ96ウェルプレートに撒き、0-1 μg/mlの濃度の抗BST2抗体と15分反応させた。加えた。続いて、仔ウサギ由来補体 (CL3441, lot .6304, Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) を終濃度12.5%で加え、37度で90分インキュベートした。インキュベート後、100 μlの培養上清を新しいプレートに移し、γカウンターを用いて放射活性を測定した。相対細胞障害活性は上記式を用いて計算した。

(8) 癌抗原に対するモノクローナル抗体による抗腫瘍効果のin vivoにおける解析

Scidマウス(8週齢、メス)皮下にHEC88nuおよびSNG-IIを5×10⁶ cells/100 μl (PBS:マトリゲル=1:1)で移植した。HEC88nuは移植後9日目に抗BST2抗体、isotype control抗体を10mg/kg、あるいはPBSを週2回の頻度で4週間腹腔内に投与した。HEC88nuは抗体投与終了後4週目に腫瘍重量を計測した。SNG-IIは4日目にマウスを3群に分け、抗BST2抗体、isotype control抗体を5mg/kg、あるいはPBSを週2回の頻度で4週間投与した。SNG-IIは抗体投与終了後8週目に腫瘍重量を計測した。週2回の頻度で腫瘍体積を計算した。腫瘍体積=長径×短径×高さより計算した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会、及び、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて承認された研究計画書、「個人情報保護法」、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省

告示第415号)」に準じて実施した。対象患者に対し、大阪大学医学部附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得た。

医薬基盤研究所には大阪大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供し、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

C. 研究結果

結果はD項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

(1) iTRAQ 法による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

網羅的なタンパク質発現解析の結果、364個のタンパク質が同定された。これらの中で、細胞膜貫通ドメインを有する分子が160個同定された(図1)。正常子宮内膜細胞と比較し

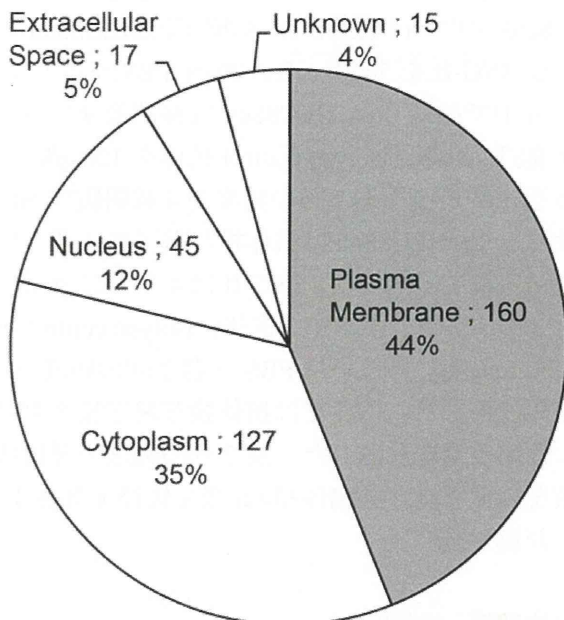


図1 iTRAQ法により同定されたタンパク質の局在分類で、7種類の子宮内膜癌細胞株の内、4種類の癌細胞株にて2倍以上に高発現する細胞表面膜タンパク質として15個同定した。これらの中には既に論文で子宮内膜癌に高発現することが知ら

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(図2)。

Description	HEC1	HEC1A	HEC6	HEC108	HEC116	HEC251	SNG II
BST-2	-	5.618	80.130	91.91	87.12	3.42	38.73
CD98 heavy chain	1.119	0.388	1.353	3.876	2.898	1.147	2.527
Adipocyte plasma membrane-associated protein	0.974	1.312	2.724	2.420	2.720	1.009	0.691
Basal cell adhesion molecule	0.750	0.730	5.100	2.810	2.629	3.950	2.189
CUB domain containing protein 1	1.026	1.949	10.975	3.781	12.346	9.095	15.013
Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2	1.396	1.323	1.964	2.880	2.236	4.805	1.409
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	1.402	0.936	1.738	3.251	2.589	3.589	1.095
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	0.854	0.249	1.226	5.577	5.351	1.291	4.570
Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT3	2.575	7.388	1.508	1.353	5.867	1.407	1.796
BSA (internal standard)	1.134	0.878	0.941	1.088	1.066	1.059	0.887

内部標準として全ての検体に等量ずつ加えたbiotin標識BSAのiTRAQ定量結果よりサンプル間の誤差は±15%の範囲であり、補正計算により正確な蛋白質発現に関する結果を得ることに成功した。

図2 iTRAQ法により同定された子宮内膜癌抗原候補タンパク質(抜粋)

(2) RT-PCR および FACS による癌抗原発現の解析

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(図3)。



図3 子宮内膜癌細胞株におけるBST2のmRNAレベルでの発現解析

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(図4)。

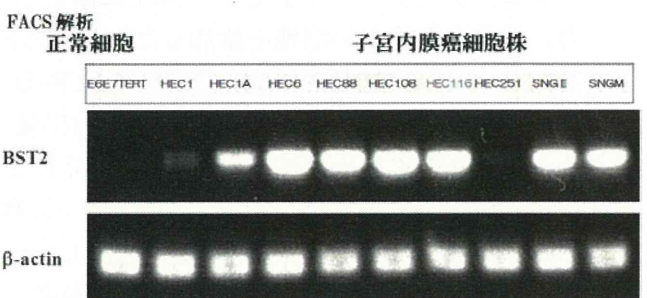


図4 子宮内膜癌細胞株におけるFACS解析によるBST2のタンパク質発現解析

これらの結果、iTRAQ 法により同定された結果と相関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。

(3) 癌抗原候補分子の癌組織での発現の検証

BST2 について、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 について、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(図 5,6)。特に BST2 については正常組織での発現が低く、癌組織での発現レベルが高いことと、細胞表面に発現していることから、抗体医薬品の標的として有用性が高いものと考えられた。

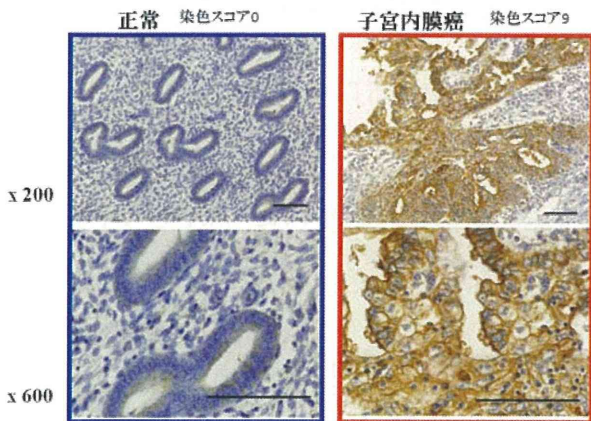
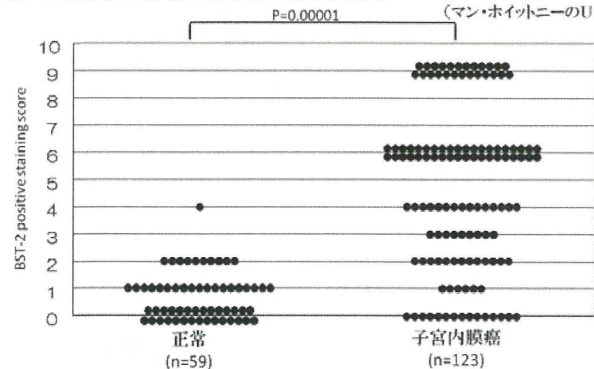


図5 子宮内膜癌組織におけるBST2の免疫組織化学染色 (マン・ホイットニーのU検定)



正常内膜59例
子宮内膜癌123例

図6 子宮内膜癌組織におけるBST2の免疫組織化学染色による発現解析

(4) 癌抗原候補分子に対する抗体を用いた ADCC、CDC アッセイ

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。ADCC アッセイを行った結果、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(図 7)。CDC アッセイについても、抗 BST2

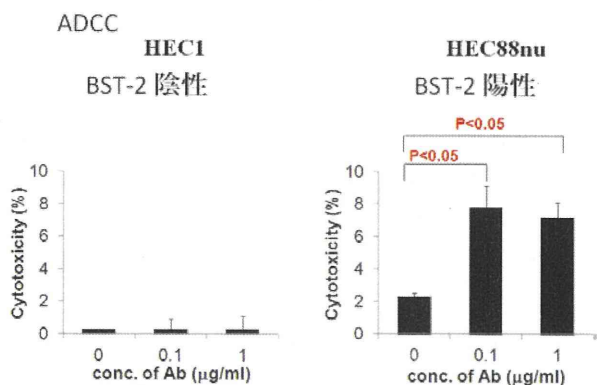


図7 子宮内膜癌細胞株に対するBST2抗体によるADCCアッセイ

抗体は BST2 陽性細胞に対して細胞障害活性を示すことが明らかとなった(図 8)。

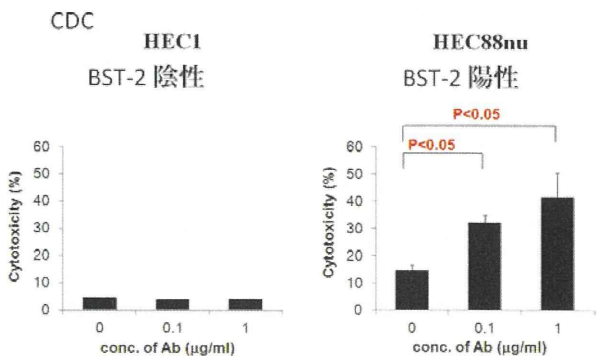


図8 子宮内膜癌細胞株に対するBST2抗体によるCDCアッセイ

(5) 癌抗原候補分子に対する siRNA および抗体を用いた増殖阻害アッセイ

BST2 が子宮内膜癌細胞株の増殖と関係しているかどうかについて明らかにするため、BST2 に対する siRNA を用いた発現抑制、及び BST2 に対するモノクローナル抗体を用いて、*in vitro* での抗腫瘍効果を検討した。BST2 陽性子宮内膜癌細胞に対して、BST2 に対する siRNA、及び抗 BST2 抗体は直接的な抗腫瘍効

果を示さなかった(図 9,10)。

FACS解析によるノックダウンの確認

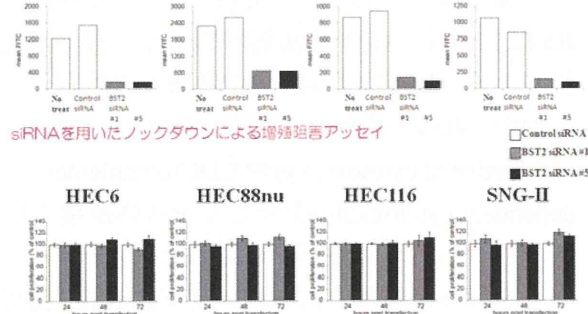


図9 子宮内膜癌細胞株のBST2 siRNAによる細胞増殖アッセイ

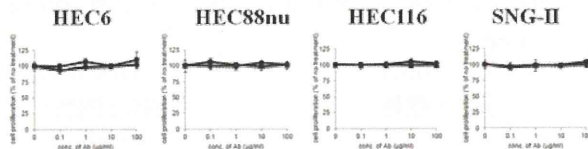


図10 子宮内膜癌細胞株のBST2抗体による細胞増殖アッセイ

(6) *In vivo* における抗 BST2 抗体による抗腫瘍効果

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 5×10^6 個ずつ移植させた。その後、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(図 11,12,13)。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。

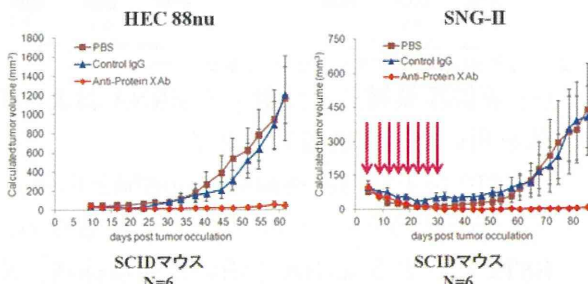


図11 子宮内膜癌細胞移植SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

さらに、抗 BST2 抗体が *in vivo* において ADCC を介して抗腫瘍効果を示すことを証明するため、NK 細胞が欠失し、ADCC を示さない免疫不全マウスである NOD/SCID マウスを用いて *in vivo*

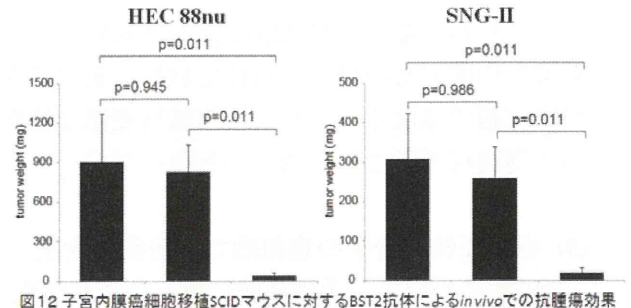


図12 子宮内膜癌細胞移植SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

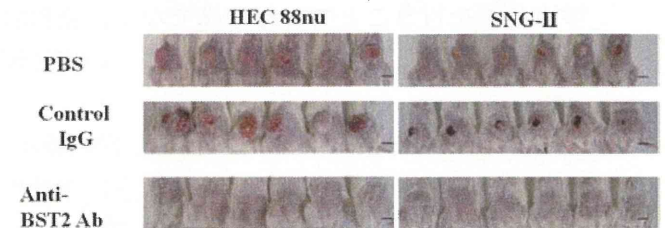


図13 子宮内膜癌細胞移植SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果での抗 BST2 抗体による抗腫瘍効果を検討した。

BST2 陽性細胞である子宮内膜癌細胞(HEC88/nu)を NOD/SCID マウスの皮下に 5×10^6 個移植した。その後、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 抗体投与群において有意な抗腫瘍効果は認められず、PBS 投与群、及び control IgG 投与群のいずれも腫瘍の増殖が同程度に認められた。(図 14,15)。これらの結果、

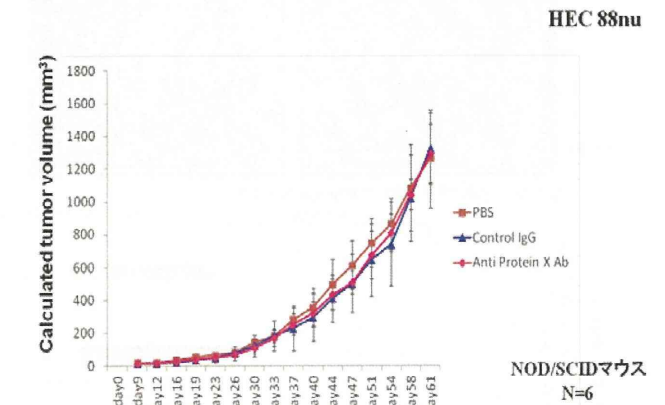


図14 子宮内膜癌細胞移植NOD/SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

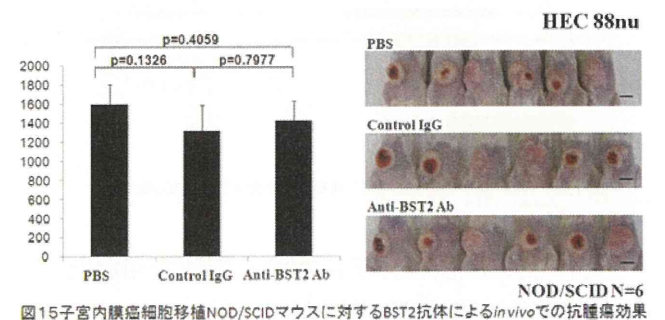


図15 子宮内膜癌細胞移植NOD/SCIDマウスに対するBST2抗体による*in vivo*での抗腫瘍効果

抗BST2抗体は *in vivo* において ADCC を介して子宮内膜癌細胞に対し優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

E. 結論

細胞表面膜タンパク質のビオチン標識による濃縮と iTRAQ 法による網羅的な定量解析は正常細胞と比較して癌細胞に高発現する癌抗原の同定に効果的であることが示された。本手法により BST2 は子宮内膜癌の治療標的としての有用性が *in vitro*, *in vivo* の実験結果より示された。本手法は様々な癌種に対して応用出来るため、優れた創薬基盤技術であると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Serada, S., Fujimoto, M., Terabe, F., Iijima, H., Shinzaki S, Matsuzaki S, Ohkawara T, Nezu R, Nakajima, S., Kobayashi, T., Plevy, S.E., Takehara, T. & Naka, T. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* in press. (2012).
2. Ontsuka, K., Kotobuki, Y., Shiraishi, H., Serada, S., Ohta, S., Tanemura, A., Yang, L., Fujimoto, M., Arima, K., Suzuki, S., Murota, H., Toda, S., Kudo, A., Conway, S., Narisawa, Y., Katayama, I., Izuhara, K. & Naka, T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts *Exp Dermatol* in press.(2012).
3. Kotobuki, Y., Tanemura, A., Yang, L., Itoi, S., Kaneda, M., Murota, H., Fujimoto, M., Serada, S., Naka, T. & Katayama, I. Dysregulation of Melanocyte Function by Th17-related Cytokines: Significance of Th17 Cell Infiltration in Autoimmune Vitiligo Vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 219-30 (2012).
4. Kim, A., Ueda, Y., Naka, T. & Enomoto T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer.

J Exp Clin Cancer Res **13**;31:14 (2012).

G-2. 学会発表

1. Takuhei Yokoyama, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Shinya Matsuzaki, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Kiyoshi Yoshino, Ayako Kim, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka: Quantitative proteomic analysis of cell-surface membrane proteins: Biomarker discovery in endometrial cancer. AACR, 2011.
2. L. Yang, M. Fujimoto, S. Serada, H. Murota, B. Ripley, S. Kitaba, Y. Kotobuki, T. Naka, I. Katayama : Periostin gene knockout is protective against the development of bleomycin-induced murine skin scleroderma. EULAR, 2011.
3. S. Serada, B. Ripley, M. Fujimoto, F. Terabe, L. Yang, T. Nishikawa, T. Naka : Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel biomarker for monitoring disease activity during therapy inpatients with inflammatory autoimmune disease. EULAR, 2011.
4. Satoshi Serada, Takuhei Yokoyama, Takayuki Enomoto, Shinya Matsuzaki, Akiko Morimoto , Ayako Kim, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka: Quantitative proteomic analysis of cell-surface membrane proteins of endometrial cancer (定量的プロテオーム解析による子宮内膜癌抗原蛋白質の探索) . 第9回日本プロテオーム学会, 新潟2011年7月28日-29日.
5. Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Fumitaka Terabe, Tetsuji Naka: Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is a novel biomarker for monitoring disease activity in patients with Ulcerative Colitis. 第40回日本免疫学会総会, 千葉, 2011年11月27日-29日.
6. Yori-hisa Kotobuki, Kanako Ontsuka, Satoshi Serada, Hiroshi Shiraishi, Atsushi Tanemura, Shoichiro Ohta, Lingli Yang, Tetsuji Naka, Kenji Izuhara, and Ichiro Katayama: Periostin, a matricellular protein, accelerates wound repair by activating dermal fibroblasts. 第36回日本

研究皮膚科学会学術大会・総会，京都，2011
年12月9日-11日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 出願予定

発明の名称：結核検査用バイオマーカー

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

発明者：仲 哲治、藤本穰、世良田聡、松本智成

2. 出願予定

発明の名称：膠原病のレイノー症状を診断する
免疫学的手法

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

発明者：仲 哲治、藤本穰、世良田聡

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

研究分担者 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

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。

A. 研究目的

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結び付くタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用や翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。ところがこの中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他に比べて極端に発展途上であり、これを可能にする画期的な技術の開発が渴望されている。

LC-MS/MS 解析によるショットガン定量プロテオミクスは基本的にデータ依存的な自動 MS/MS 解析によっているため、何か意味のあるものが偶然“見つかる”ことを期待

しつつ兎に角たくさんタンパク質を同定し比較する方法である。確かにこの方法である程度の網羅性を得ることが可能であるが、ショットガン法の技術的な問題点は、網羅性を上げるためには試料の分画を必要とするため、網羅性とスループットが完全にトレードオフの関係にあることである。また、偶然に任せている以上、検出されなかったものが、本当は発現しているのにたまたま同定できなかったのか、検出感度以下しか発現していないのかわからないという問題点を内包する。つまりショットガン解析では定量情報はあくまで同定結果に付随して得られるものであり、同定できなければ変動していたのかを知ることはできない。

そこでわれわれは、従来のディスカバリーアプローチから、ターゲットアプローチとして最近注目を集めている MRM (Multiple reaction monitoring)[あるいは SRM (Selected reaction monitoring)とも呼ばれる]への転換を考えた。MRM は三連四重極型質

量分析計の定量用測定モードであり、少数の検体のバリデーションには適するが、多くのタンパク質を網羅的に同定・定量することは本質的に難しいとされてきた。われわれの研究はこの障壁を乗り越えて、抜本的に MRM を改良し、将来的に大深度プロテオミクス（ディープ・プロテオミクス）を達成することによって、新たなバイオマーカー探索の時代を築くことを目的とする。

本年度はヒト全プロテオームの絶対定量を目的として、ヒト全遺伝子の約 8 割を網羅する 17,000 種類の組み換えタンパク質を作製し、これを用いた MRM のための特異的ペプチド（Proteotypic peptide: PTP）情報の決定とデータベース化を完了した。さらに、これらのマテリアルおよび情報を利用して、ヒト主要タンパク質の絶対定量を行った。

B. 研究方法

MRM 法は Q1 にてプリカーサーイオンの選択、Q2 にて CID による開裂、Q3 にてプロダクトイオンを選択・検出する(このとき設定した Q1/Q3 の組み合わせを transition と呼ぶ)。したがって、MRM 法では測定したいペプチドの質量とその部分質量を前もって知っておく必要がある。これにはショットガン解析において得られる MS/MS スペクトルが利用される。つまり、代表的な試料でショットガン解析を行うことで候補ペプチドを同定し、このペプチドに対する transition を設定することで様々な試料中のペプチドの定量を行うことになる。MRM 法は感度が高いことと、三連四重極型の質量分析計を用いるためダイナミックレンジが広いことが最大の利点であるが、近年では高感度化に伴い一つの transition の取得時間が短縮されたことで一度の LC で解析できる transition 数が数千まで増えているおり、大規模な解析にも利用可能な新技術として注目されている。

平成 23 年度は、前年度作製した大規模な

ヒト組み換えタンパク質ライブラリーを用いて高感度な MRM のための PTP 情報の取得と、格納する高機能データベースの作成、さらにこれらを利用したヒト主要パスウェイ構成タンパク質の絶対定量を行った。合わせて、より高感度かつハイスループットな MRM 解析のための前処理法の確立を行った。

(1) PTP 情報取得

不溶性タグを付加した完全長ヒト cDNA ライブラリーを元に、ロボット技術を用いて全てのタンパク質をコムギ胚芽抽出液中で試験管内翻訳を行い、タンパク質試料を調製する。各 20 μ l のタンパク質 96 種類を混合し、0.1% NP40 を含むバッファにて希釈後、高速遠心することで、高純度のタンパク質標品を得た。これらのタンパク質標品タンパク質をアセトンによって洗浄し、20 μ l の 7 M グアニジン塩酸塩を含む mTRAQ バッファにて可溶化し、加熱処理後、Lys-C 処理、還元アルキル化、さらにトリプシン処理を行った。得られた消化物は凍結乾燥後、10 μ l の蒸留水に再可溶化し、50 μ l のイソプロパノールと 1 unit の mTRAQ Δ 4 を添加して、室温にて 2 時間インキュベーションを行った。これらの標識ペプチドは凍結乾燥後、100 μ l の蒸留水に溶かし冷凍保存した。本消化物 2 μ l を保持時間マーカーを含む 0.1% TFA 溶液 8 μ l と混合し、2 μ l を Qq TOF 型ハイブリッド質量分析計 (ABSciex 社製 TripleTOF 5600) による LC-MS/MS 解析に用いた。得られたデータは ABSciex 社の MS data converter (beta version) にてピークリスト (mgf file) を作成し、MASCOT によるタンパク質同定を行った(対象データベース: FLJ protein db 産総研より提供)。

(2) PTP データベースの構築

MASCOT 検索結果(MASCOT dat ファイル)から各セットに含まれるタンパク質のみを抽出し、MySQL によって構築した独自

のデータベースへ登録を行った。本データベースは1) 同定されたペプチド情報をゲノム情報に自動リンクさせ、各ペプチドの特異性情報(タンパク質特異的ペプチド、遺伝子特異的ペプチド、あるいは冗長ペプチド)を元にクラス分けを行う機能や2) 任意のタンパク質名、遺伝子名、あるいはパスウェイ名などを元に目的タンパク質のPTP情報を抽出する機能、3) MRMを行うために必要な情報(Q1, Q3, collision energyなどのパラメータ)を付加してMRM測定メソッドを自動作成する機能、4) 保持時間マーカーに対する相対的な位置情報を元に保持時間予測を行う機能など、多様な機能を実装させた。

(3) 微量サンプルを対象とした前処理法の確立

MRM法は極めて高感度なタンパク質検出法であるが、超微量タンパク質の検出は困難なことも多い。この問題点を解決するために昨年度液相等電点電気泳動(OFFGEL法)による前処理法を導入することで微量タンパク質の検出に成功した。しかしながら、OFFGEL法は試料として50–100 µgのタンパク質消化物を必要とし、微量のサンプルしか入手できない場合など適用が困難である。そこで、本年度はOFFGELに代わる前処理法として1) マイクロチップに挿入した逆相担体を用いた塩基性条件下における固相抽出法、2) 逆相キャピラリーHPLCを用いた塩基性条件下での逆相クロマトグラフィー法を開発し、1–10 µgのペプチド試料を効率よく分画する前処理法を確立した。

(4) 主要パスウェイ構成タンパク質の絶対定量

ヒトの主要生化学反応を網羅するパスウェイ構成タンパク質の絶対定量を行うため、KEGGに登録されているタンパク質リストを作成し、これらを96種類1セットとして

内部標準タンパク質混合物消化物を作製し、mTRAQ4標識を施した(IS)。一方、細胞抽出液の消化物はmTRAQ0にて標識し、ISと混合し、上述した微量分画法による前処理を行った。各分画をMRM解析し、得られたMRMクロマトグラムのピーク面積値を算出し、得られたISとの面積比をISに含まれる個々のタンパク質量に基づいて絶対値に変換した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

ヒトタンパク質の大規模絶対定量を行うため、MRM 法に必要なヒトプロテオームの大半を網羅する PTP 情報を含む高機能データベースの構築し、これを利用して代謝経路やシグナル伝達、あるいは細胞周期制御などのパスウェイ構成タンパク質の絶対定量に成功し、本システムが今後の生命科学を大きく変革させる重要な基盤技術と成り得ることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K.I., Blazar, B.R., Zeng, Y. & Zhou, X. 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**, 4293-303 (2011).
- Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H. & Nakayama, K.I. Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of "stemness" and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. *J Biol Chem* **286**, 13754-764 (2011).
- Matsumoto, A., Tateishi, Y., Onoyama, I., Okita, Y., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Fbxw7 β resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci* **102**, 749-55 (2011).
- Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Yoshimori, T., Yokota, S., Himeno, M., Tanaka, Y. & Fujita, H. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells* **16**, 448-66 (2011).
- Inoue, S., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T. & Shimazaki, K.I. Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol* **156**, 117-128 (2011).
- 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**, 668-77 (2011).
- Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S.W., Nakayama, K.I., Nakayama, K. & Lo, K.W. Regulation of APC/C^{Cdc20} activity by RASSF1A- APC/C^{Cdc20} circuitry. *Oncogene* **31**, 1975-87 (2011).
- Yu, Z., Ono, C., Kim, H.B., Komatsu, H., Tanabe, Y., Sakae, N., Nakayama, K.I., Matsuoka, H., Sora, I., Bunney, W.E. & Tomita, H. Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. *Bipolar Disord* **13**, 486-99 (2011).
- Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y.,

- Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Suda, T. p57^{Kip2} and p27^{Kip1} cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* **9**, 247-61 (2011).
10. Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K. & Nakayama K.I. p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 262-71 (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**, 339-51 (2011).
 12. Matsumoto, A., Susaki, E., Onoyama, I., Nakayama, K., Hoshino, M. & Nakayama, K.I. Deregulation of the p57-E2F1-p53 axis results in nonobstructive hydrocephalus and cerebellar malformation in mice. *Mol Cell Biol* **31**, 4176-92 (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**, 1784-92 (2011).
 14. Fuster, J.J., González-Navarro, H., Vinué, A., Molina-Sánchez, P., Andrés-Manzano, M.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Díez-Juan, A., Bernad, A., Rodríguez, C., Martínez-González, J. & Andrés, V. Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* **31**, 2455-63 (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**, 4602-20 (2011).
 16. Rodriguez, S., Wang, L., Mumaw, C., Srour, E.F, Lo, Celso, C., Nakayama, K. & Carlesso N. The SKP2 E3 Ligase regulates basal homeostasis and stress-induced regeneration of hematopoietic stem cells. *Blood* in press. (2011).
 17. Ellman, M.B., Kim, J., An, H.S., Kroin, J.S., Li, X., Chen, D., Yan, D., Buechte,r D.D., Nakayama, K., Liu, B., Morganand, S. & Im, H.J. 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. Onoyama, I., Suzuki, A., Matsumoto, A., Tomita, K., Katagiri, H., Oike, Y., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest* **121**, 342-54 (2011).
 20. Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Tseng, A., Gaom D., Maserm R., Zhaim B., Gutierrezm A., Wanm L., Laum A., Xiaom Y., Christiem A., Asterm J., Settleman, J., Kung, AL., Gygi, S.P., Look, T., Nakayama K,I., DePinho, R.A. & Wei, W. SCFFbw7 regulates cellular apoptosis by targeting the Mcl-1 oncoprotein for ubiquitination and destruction. *Nature* **471**, 104-9 (2011).
 21. Wu H., Pomeroy S. L., Ferreira M., Teider N., Mariani J., Nakayama K. I. Hatakeyama S., Tron V. A., Saltibus L. F., Spyrapopoulos L. & Leng R. P.: UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor

- suppressor p53. *Nature Med* 17, 347-55 (2011).
22. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Zhan, C.G., Lee, D.M., Kim, K.B., Lau, D.L., Srinivasan, C., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Herrmann, H. & Mohan, R. Corneal antifibrotic switch identified in genetic and pharmacological deficiency of vimentin. *J Biol Chem* 287, 989-1006 (2012).
23. 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, 501-12 (2012).
24. 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).
25. Kanie, T., Onoyama, I., Matsumoto, A., Yamada, M., Nakatsumi, H., Tateishi, Y., Yamamura, S., Tsunematsu, R., Matsumoto, M. & Nakayama K.I. Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. *Mol Cell Biol* 32, 590-605 (2012).
26. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa, A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., Liu, N., Nakayama, K., Nakayama K.I., Yamamoto, T. & Kitagawa M. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice is canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2^{-/-} p27^{-/-} mice. *PLoS One* in press. (2012).
27. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth-differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* in press. (2012).
28. 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).
29. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H., & Kitagawa M. Chk1 phosphorylates the tumor suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signaling. *EMBO J Epub*, Apr 13 (2012).
30. Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y., Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K.C., Flores, L.G., Shao, Y., Hazle, J.D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M.C., Nakayama, K.I. & Lin, H.K. The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, Herceptin sensitivity and tumorigenesis. *Cell* in press. (2012).

G-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) ColdSpring 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トイングは要らない?!。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トイングは要らない?!。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