

- functionally related transcription factors. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 12/13 (2011).
20. 白根道子, 中山敬一: Protrudin regulates vesicular trafficking in neurons via interaction with PtdIns5P. 第34回日本分子生物学会年会, (一般講演) 横浜, 12/13 (2011).
21. 沖田康孝, 松本有樹修, 中山敬一: Fbxw7 α regulates the maintenance and differentiation of neural stem cells. 第34回日本分子生物学会年会, (一般講演) 横浜, 12/13 (2011).
22. 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: Ablation of Fbw7 eliminates leukemia stem cells by preventing quiescence. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/13 (2011).
23. 松本有樹修, 武石昭一郎, 中山敬一: p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/13 (2011).
24. 柚木克之, 久保田浩行, 豊島有, 玲, 野., 曾我朋義, 松本雅記, 中山敬一, 黒田真也: A trans-omics analysis of insulin-stimulated Fao rat hepatoma cell. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜.12/14 (2011).
25. 中山敬一, 松本雅記: Road to absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. 第34回日本分子生物学会年会. (シンポジウム) 横浜.12/14 (2011).
26. 黒田真也, 柚木克之, 久保田浩行, 曾我朋義, 松本雅記, 中山敬一: An automatic and unbiased identification of insulin signaling dependent metabolic control pathway by metabolome and phospho-proteome analysis. 第34回日本分子生物学会年会. (シンポジウム) 横浜.12/14 (2011).
27. 松崎英美子, 白根道子, 松本雅記, 中山敬一: Protrudin-KIF5 complex contributes to vesicular transport during neuritogenesis. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜.12/15 (2011).
28. 村上裕輔, 前田武志, 岸ちひろ, 松本雅記, 中山敬一, 塩見泰史, 西谷秀男: Protection of licensing factor Cdt1 from degradation in M phase by mitotic kinase Plk1 and Cdk1- CyclinB phosphorylation. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
29. 細田將太郎, 白根道子, 中山敬一: The mitochondrial protein translocation from mitochondria in mitophagy. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
30. 諸石寿朗, 西山正章, 武田有紀, 岩井一宏, 中山敬一: The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
31. 西山正章, 中山敬一: Histone H1 recruitment mediated by CHD8 is essential for suppression of Wnt/beta-catenin signaling pathway. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
32. 片山雄太, 西山正章, 中山敬一: Long isoform of chromatin remodeling factor CHD8 is necessary for development and cell differentiation. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
33. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 立石悠基, 小野山一郎, 三森功士, 森正樹, 中山敬一: Promotion of cancer metastasis by deletion of Fbxw7 in host environment. 第34回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/15 (2011).
34. 藤兼亜耶, 早川浩, 伊東理世子, 中山敬一, 関口睦夫: Specific binding of human proteins to 8-oxoguanine-containing RNA.

第 34 回日本分子生物学会年会. 横
浜.12/16 (2011).

35. 立石悠基, 蟹江共春, 松本有樹修, 中山敬一: Generation and characterization of mice lacking all CIP/KIP CDK inhibitors (p21/p27/p57). 第 34 回日本分子生物学会年会. (一般講演) 横浜.12/16 (2011).
36. 中津海洋一, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: mTOR regulates transcription through FOXK1 phosphorylation. 第 34 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 横浜.12/16 (2011).
37. 中山敬一: Next-generation proteomics and its application to biology and medicine: Say good-bye to western blotting. 第 9 回心血管幹細胞研究会. (Keynote Lecture) 東京.1/13 (2012).
38. 中山敬一: がん幹細胞と細胞周期: "GO 期追出し療法"によるがん根治の可能性. 第 3 次 対がん 10 か年総合戦略・文科省がん研究支援活動合同公開シンポジウム. (招待講演) 東京.1/31 (2012)
39. Nakayama, K.I.: Cell cycle, metabolism, and signal transduction in cancer revealed by next-generation proteomics. 2012 American Association for Cancer Research Annual Meeting. (Invited speaker) Chicago, USA.3/31 (2012).

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

なし

創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用

研究分担者 平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センター センター長・
大学院生命ナノシステム科学研究科生体超分子システム科学専攻 教授

研究要旨

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。

A.研究目的

上皮性卵巣癌は、主に漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌および明細胞腺癌の4種類の組織型に分類される。これらの中で明細胞腺癌 (CCA)は化学療法に対する抵抗性と転移浸潤能が高く、早期に発見されても多数の予後不良例が見られる悪性度の高い組織型である。卵巣癌組織型の中で CCA の占める割合は、欧米諸国における発生頻度は5~6%であるのに対し、日本では20%を越えており、わが国における発生頻度は明らかに高い。一方、卵巣腫瘍マーカーとして広く使用されている CA125 の発現は、CCA では低いことがあり、これを診断マーカーとして利用できない。このような状況から、CCA に対する治療薬および診断マーカーの開発が強く望まれている。

前年度までにプロテオミクス手法を用いて、CCA 組織検体や細胞株で特異的に存在量が増加するタンパク質を検出・同定すると共に、CCA との関係を検証した。そして、アネキシン IV のようなタンパク質は創薬標的として利用できる可能性が高いことを示した。しかし、これらのタンパク質の疾患による発現変動を血液中で捉えることができず、診断マーカーとして

の利用の可能性が絶たれた。

そこで本年度は、漿液性腺癌、粘液性腺癌および CCA 由来の細胞株が、細胞培養液に分泌（あるいは放出）されるタンパク質をショットガン解析により比較することによって、CCA 細胞株群に特徴的に分泌されるタンパク質を同定し、それらの診断マーカーとしての有用性を検証した。培養細胞から分泌されるタンパク質は、生体内で癌細胞から血液中に分泌される可能性が高い。そのため培養細胞から分泌されるタンパク質を分析すれば、CCA の診断に有用な血液中の診断マーカーが高い確率で検出できると考えられた。

B.研究方法

1) 培養上清タンパク質の解析

CCA 細胞株4種類 (OVTOKO、OVISE、OVMANA、OVSAYO)、粘液性腺癌細胞株2種類 (MCAS、RMUG-S)、漿液性腺癌細胞株2種類 (OVSAHO、OVKATE) をそれぞれ、上皮増殖因子を含む無血清培地で2日間培養し、培地上清をフィルター濾過後、脱塩濃縮した。同じ組織型の試料を等量ずつプール混合し、トリプシン消化後、MS/MS を用いて解析した。

2) 発現解析

同定された分泌タンパク質が CCA 細胞株で発現していることを確認するために、培養した細胞とその培養上清からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を行った。さらに各卵巣癌細胞株から RNA を抽出し、分泌タンパク質の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。CCA との関連性が示されたタンパク質については、卵巣癌組織検体を用いてさらに発現解析を行った。

3) siRNA を用いたタンパク質の機能解析

siRNA およびユニバースネガティブコントロール(低 GC) 0.18 μ L を、血清使用量低減培地 10 μ L に混合し、リポフェクチン RNAiMAX 試薬 0.2 μ L と血清使用量低減培地 10 μ L の混合液に添加し 15 分室温で放置した。これを OVMANA に添加し、siRNA を細胞に導入した。ユニバースネガティブコントロールを導入時の対照として siRNA と同量導入した。

4) 分泌タンパク質と浸潤能との関係の解析

CCA 細胞株における分泌タンパク質の発現を siRNA を用いて抑制し、CCA 細胞に現れる抗癌剤耐性や転移・浸潤能の変化を培養細胞レベルで検討した。siRNA 導入 24 時間後に種々の濃度の抗癌剤を投与し、細胞増殖能への影響を MTT アッセイにより調べた。また、siRNA を導入した細胞をマトリゲル基底膜マトリクスをコートした上層のチャンバーに播種し、48 時間後にマトリクスを分解して下層に移動した細胞数を測定した。

5) 酵素免疫測定法 (ELISA) による患者血清中の定量解析

CCA 細胞分泌疾患関連タンパク質が患者血清中にて検出されるかどうかを調べるため、各タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて CCA 5 症例、non-CCA 4 症例、良性腫瘍 7 症例、健常者 1 例について血清におけるタンパク質の定量解析を行った。

6) 多反応モニタリング(MRM)法による新規卵巣癌診断マーカーの測定

6.1) 免疫沈降 (IP)

マーカー候補タンパク質の発現ベクターを作

製し、DNA 免疫法によりマウスモノクローナル抗体を得た。抗マウス IgG コンジュゲートマグネットビーズを用いて、マーカー候補タンパク質を IP によって精製した。

6.2) MRM 測定

a. 試料調製

IP 試料を MRM 測定に供した。グリシン塩酸緩衝液(pH 3.0)で溶出した試料をトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で中和、トリエチルアミンにて溶出した試料については、溶媒を乾燥後、尿素を含む重炭酸アンモニウムで再溶解した。各試料は還元アルキル化、トリプシン消化を行い、MRM 解析に用いた。

b. トランジションの設定

IP サンプルを AB SCIEX QTRAP 5500 LC/MS/MS システムで解析し、得られた MS データに基づいて、1つのタンパク質につき 30 のトランジションを MRM Pilot ソフトウェアを用いて設定した。次に MRM 測定しながら、衝突エネルギー(CE, Q2)を最適化し、最終的には 1つのタンパク質につき 3ないし 4か所のペプチドに対する測定メソッドを作成した。

c. MRM 定量

IP 産物をゲル染色してマーカー候補タンパク質を定量した。この試料を標準物質として、MRM 測定で得られる各ペプチドのシグナル強度を測定し、濃度を換算した。

(倫理面への配慮)

提供者の同意が必要な試料は使用していない。

C, D, E. 研究結果, 考察及び結論

1) 分泌タンパク質の探索

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、CCA 細胞株群のみで検出・同定された。

2) 分泌タンパク質の発現解析

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の

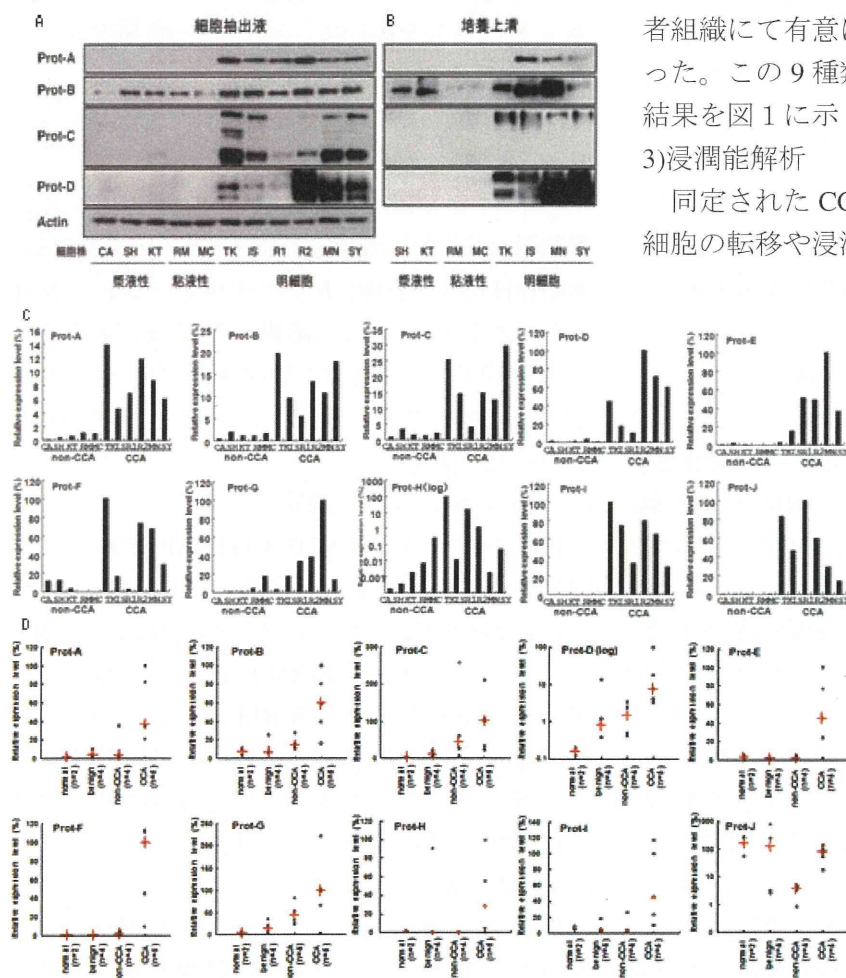


図1. CCA 特異的な分泌タンパク質の発現解析
各卵巣癌細胞株における分泌タンパク質の細胞内存在量 (A) および分泌量 (B) をウェスタンブロットにより調べた。培養細胞 (C) と組織 (D) におけるマーカー候補タンパク質遺伝子の発現量。

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。この9種類のタンパク質群の発現解析の結果を図1に示してある。

3) 浸潤能解析

同定されたCCA特異的なタンパク質には、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ープレートに播種し、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 (図2)。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 (注: Prot-A から Prot-J は、MS/MS 分析によって同定できているが、特許等の関係でタンパク質名については後日報告する。)

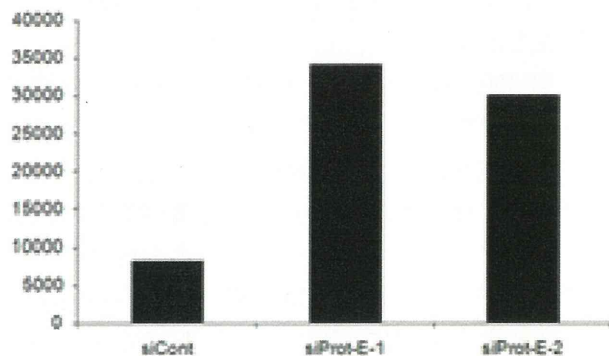


図2. 浸潤能試験の結果

CCA細胞株 OVMANA に2種類のタンパク質に対する siRNA を導入し、マトリゲルチャンバープレ

一トに播種した。48 時間後、下層に移動した細胞を測定した。

4) ELISA による患者血清中の定量解析

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（健常人および良性腫瘍群）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 (36 U/mL) 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 (図 3)。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。

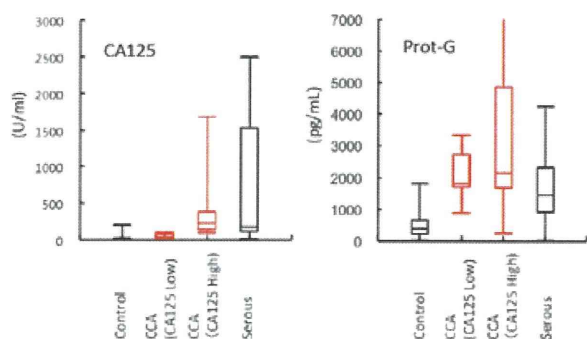


図 3. 卵巣癌患者血清における CA125 および Prot-G の濃度

Control: 健常および良性腫瘍 (23 例)。 CCA (13 例)。 Serous: 漿液性腺癌 (11 例)。

5) 多重反応モニタリング(MRM)法による新規卵巣癌診断マーカー候補の測定

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。

まず Prot-G、Prot-E を含む 3 種類のマーカー候補タンパク質に焦点を当て、当該タンパク質

に対するマウスモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体を用いて免疫沈降を行い、各タンパク質を濃縮精製した。

MRM トランジションを設定するための事前情報を得るために、各タンパク質の免疫沈降産物のトリプシン消化断片を MS(AB5500)にて解析した。得られた MS 情報に基づき、各タンパク質につき、ペプチドイオンを 10 種類、プロダクトイオンを 3 種類選択して、合計 30 通りの MRM トランジションを設定した。その中から、最も強い MRM シグナルが得られるトランジションを 3 種類選び、さらに Q2 の衝突エネルギーの検討を行い、測定メソッドの最適化を行った。

作成した MRM トランジションを用いて、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。その結果、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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Ando, Y., Tomaru, Y., Burroughs, A. M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Morinaga, A., Kimura R, Tagata, M., Ino, Y., Hirano, H., Chiba, J., Suzuki, H., Carininci, P. & Hayashizaki, Y. Nuclear pore complex protein mediated nuclear localization of dicer protein in human cells. PLoS ONE e23385(2011).
2. Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T.,

- Inuma, I., Hirano, H., Kondo, K., Suzuki, S. & Inoue, N. Proteomic identification of differentially expressed genes in neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) in vitro. *Biophys Biochim Acta* **1814**, 265-76 (2011).
3. 荒川憲昭,増石有佑,平野久. 卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現調節. *生物物理化学* **55**, 5-8 (2011).
 4. Endoh, K., Nishi, M., Ishiguro, H., Uemura, H., Miyagi, Y., Aoki, I., Hirano, H., Kubota, Y. & Ryo, A. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *Prostate* **72**, 626-37 (2012).
 5. Ino, Y. & Hirano, H. Mass spectrometric characterization of proteins transferred from polyacrylamide gels to membrane filters. *FEBS J* **278**, 3807-14 (2011).
 6. Kamita, M., Kimura, Y., Ino, Y., Kamp, R. M., Polavoda, B., Sherman, F. & Hirano, H. N^ε-Acetylation of yeast ribosomal proteins : Identification by 2D-DIGE MS/MS and analysis of the effect on proteins synthesis. *J Proteomics* **74**, 431-41 (2011).
 7. Kato, Y., Kawasaki, H., Ohyama, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Kokubo, T. & Hirano, H. Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics* **188**, 871-82 (2011).
 8. Kawashima, A., Tanigawa, K., Akama, T., Wu, H., Sue, M., Yoshihara, A., Ishido, Y., Kobiyama, K., Takeshita, F., Ishii, K. J., Hirano, H., Kimura, H., Sakai, T., Ishii, N. & Suzuki, K. Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity 1 and suppress endocrine function in the thyroid. *Endocrinology* **152**, 1702-12 (2011).
 9. Kurata, Y., Kimura, Y., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Okamoto, H., Masaoka, T., Nagoya, H., Araki, K., Moriyama, S., Hirano, H. & Mori T. Effects of growth hormone on the salmon pituitary proteome. *J Proteomics* **75**, 1718-31 (2012).
 10. Masuishi, Y., Arakawa, N. & Hirano, H. Wild-type p53 enhances Annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *FEBS J* **278**, 1470-83 (2011).
 11. Nishi, M., Akutsu, H., Masui, S., Nagashima, Y., Perrem, K., Kimura, K., Shigeri, Y., Toyoda, M., Okayama, A., Hirano, H., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S. M. & Ryo, A. A distinct role for Pin1 in the induction of pluripotency and cancer stemness. *J Biol Chem* **286**, 11593-603 (2011).
 12. Tanaka, T., Sakurada, S., Kano, K., Takahashi, E., Yasuda, K., Hirano, H., Kaburagi, Y., Kobayashi, N., Hang, N. T., Lien, L. T., Matsushita, I., Hijikata, M., Uchida, T. & Keicho, N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis* **11**, 71 (2011).
 13. Terasawa, Y., Takata, K., Hirano, H., Kato, K., Kawahara, T., Sasakuma, T. & Sasanuma, T. Genetic variation of high-molecular-weight glutenin subunit composition in Asian wheat. *Genetic Resources Crop Evolution* **58**, 283-9 (2011).
 14. Yoshizawa T., Hashimoto, H., Shimizu, T., Yamada, M., Shichijoa, N., Hanada, H., Hirano, H. & Sato, M. Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of basic 7S globulin from soybean. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**, 87-9 (2011).
 15. Yoshizawa, T., Shimizu, T., Hirano, H., Sato, M. & Hashimoto, H. Purification, crystallization and X-ray diffraction study of extracellular dermal glycoprotein from carrot and the inhibition complex that it forms with an endo-β-glucanase from *Aspergillus aculeatus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**, 830-2 (2011).

16. Yoshizawa, T., Shimizu, T., Yamabe, M., Taichi, M., Nishiuchi, Y., Shichijo, N., Unzai, S., Hirano, H., Sato, M. & Hashimoto, H. Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- β -glucanase. *FEBS J* **278**, 1944-54 (2011).

G-2. 学会発表

1. Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, M., Hirano, H., Kondo, Y., Suzuki, Y. and Inoue, N. Proteomic identification of differentially expressed genes during the differentiation from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) to neutral stem cells in vitro. 10th Human Proteome Organisation World Congress, Geneva, Switzerland, 2011.9.3-7.
2. 荒川憲昭 卵巣明細胞腺がん装薬標的分子, 診断マーカーの探索, 横浜市開港記念会館, 横浜, 第 62 回日本電気泳動学会総会, 2011.11.13
3. 荒川憲昭, 森田絵理菜, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久 卵巣明細胞腺癌のセクレトーム解析, 東京ベイホテル, 浦安, 日本プロテオーム機構 2010 年会, 2010.7.26.
4. 平野 久 翻訳後修飾のプロテオミクス, 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011.7.28.
5. 平野 久 Phos-tag によるリン酸化蛋白質のショットガン分析, Phos-tag 親和電気泳動, 日本生化学会年会, 京都, 2011.9.24.
6. 平野 久 創薬標的分子と診断マーカー探索のプロテオミクス, 第 69 回 今堀アイバイフォーラム, 東京, 2011.10.12.
7. 平野 久 GE ヘルスケア DIGE User's Day, 電気泳動によって見えるタンパク質の翻訳後修飾, 東京, 2011.11.10.
8. Hirano, H. Identification and functional analysis of co- and post-translational modifications of large protein complexes. Korean Human Proteome Organization, 10th Annual Congress, Busan, Korea, 2011.4.1-2.
9. 平野 久, 木村弥生, 菊池有理亜, 岩船裕子, 秋山知子, 岡山明子, 中村浩規, 荒川憲昭 翻訳後修飾のプロテオミクス, 日本電気泳動学会シンポジウム, 山口大学医学部, 宇部市, 2011.5.9.
10. 木村鮎子, 加藤 悠, 平野 久 19S 複合体サブユニット Rpt2 の N-ミリスチル化修飾はプロテアソームの細胞内局在を制御する, パシフィコ横浜, 神奈川, 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16.
11. 木村鮎子, 酒井和徳, 野村文子, 川上隆雄, 荒川憲昭, 平野 久 非標識定量リン酸化プロテオミクス手法を用いた卵巣明細胞腺癌(CCA)の悪性度に関わるリン酸化タンパク質群の探索, 朱鷺メッセ, 新潟, 日本プロテオーム機構第 9 回大会, 2011. 7.28-30.
12. 木村弥生, 永田佳代子, 石川晃代, 平野 久 酵母プロテアソームサブユニットの N 末端メチル化, 朱鷺メッセ, 新潟, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011.7.28-30.
13. 永田佳代子, 柳澤侑哉, 野村文子, 木村弥生, 佐久間祐司, 宮城洋平, 平野久 イマチニブ二次耐性 GIST のリン酸化プロテオーム解析, 朱鷺メッセ, 新潟, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011.7.28-30.
14. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 平野 久 血管型 NADPH オキシダーゼの標的タンパク質の解析, 横浜市開港記念会館, 横浜, 第 62 回日本電気泳動学会総会, 2011.11.12-13.
15. 岡山明子, 宮城洋平, 尾下文浩, 梁 明秀, 平野 久 プロテオミクス解析による早期肺腺癌の予後予測マーカー及び治療標的候補分子の発掘, 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011.7.28-30.
16. 柳澤侑哉, 永田佳代子, 野村文子, 木村弥生, 佐久間祐司, 宮城洋平, 平野 久 リン酸化プロテオーム解析による GIST のイマチニブ二次耐性分子メカニズムの解明, パシフィ

コ横浜, 神奈川, 第 34 回日本分子生物学会
年会, 2011.12.13-16.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1-1.

発明の名称: 組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)
測定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および
検査薬

出願番号: 特願 2011-179450

出願日: 2011 年 8 月 19 日

出願人: 横浜市立大学、東ソー株式会社

発明者: 荒川憲昭, 平野 久, 宮城悦子,
大竹宣久

1-2.

発明の名称: NDRG 1 タンパク質を標的とし
た卵巣明細胞腺癌の治療

出願番号: 特願 2011-178684

出願日: 2011 年 8 月 18 日

出願人: 横浜市立大学

発明者: 荒川憲昭, 増石有佑, 平野 久

1-3.

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: PCT/JP2011/53497

出願日: 2011 年 2 月 18 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

1-4.

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 尾野雅哉 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

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。

A. 研究目的

2DICAL は国立がん研究センターが開発したプロテオーム解析技術であるが、従来では検出不能であった微量たんぱく質をプロテオームリサーチセンター、国立がん研究センターが所有する最新の質量分析計と 2DICAL を用いて解析し、多数の臨床検体からさまざまな疾患の新規バイオマーカー開発を行うことが本プロジェクトの目的である。

B. 研究方法

(1) バイオマーカーの開発

バイオマーカー開発に用いた腎癌症例群 20 例、健常者群 20 例の平均年齢はそれぞれ 62.25 歳、65.95 歳で、両群間で年齢のへだたりがないように調整した。腎癌症例の病期は 1a 期 11 例、1b 期 5 例、2 期 1 例、3a 期 2 例、3b 期 1 例であった。血漿は ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit (血漿免疫除去キット) を用いて前処理し、albumin、IgG、IgA、IgM、IgD、transferrin、fibrinogen、haptoglobin、 α 1-acid glycoprotein、 α 2-macroglobulin、apolipoprotein A-I、apolipoprotein A-II、apolipoprotein B、ceruloplasmin、 α 1-antitrypsin、complement C1q、complement C3、complement C4、plasminogen、prealbumin の 20 の血中に豊富に存在するたんぱく質を除去し、質量分析計には QTOF Ultima (ウォーターズ社)、液体クロマトグラフィーにはナノフロンティア LC (日立ハイテクノロジー

社) を用い、データを採取し、2DICAL にてバイオマーカー候補を選別した。選別された腎癌血漿バイオマーカー候補たんぱく質

(Fibronectin 1) には既存の抗体があったため、Western Blot によって血中量を確認し、さらに AlphaLISA (パーキンエルマー社) 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 例での検討を行った。

(2) 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

東レ中空糸膜を用いた分画法による前処理を行い、低分子量タンパク質(~ 3 nm) を選択的に分画し、前立腺癌血漿 25 例、健常者血漿 15 例を 2DICAL で解析したところ、あるタンパク質 (Protein X) 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、このタンパク質の血中濃度を前立腺癌患者血漿 54 例、健常者血漿 60 例、前立腺炎患者血漿 6 例、前立腺肥大症患者 22 例、腎癌患者 20 例で測定した。

(3) 肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの開発

本年度より肝臓癌の組織試料を用いて、肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発に着手した。肝細胞癌組織 19 例、同一症例非癌部肝組織 19 例を可溶化し、トリプシン処理を施した試料と、同試料から HAMMOC 法を用いてリン酸化ペプチド濃縮を行った試料を作成した。それぞれの試料を質量分析計で計測して、2DICAL にて解析した。

C. 研究結果

(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 (パーキンエルマー社) 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。本内容は Cancer Biomarker に受理され、印刷中である。

(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 (Protein X) 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 54 例、健常者血漿 60 例、前立腺炎患者血漿 6 例、前立腺肥大症患者 22 例、腎癌患者 20 例で測定し、Protein X 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 $4-10 \text{ ng/ml}$ を示すグレイゾーンの前立腺癌患者で Protein X 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能の向上に役立つ可能性が示唆された。本結果は英文学術雑誌に投稿中である。

(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、151 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 129 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 (図 1)。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、385 リン酸化修飾ペプチド (癌で高値 202 ペプチド、非癌部肝組織で高値 183 ペプチド) が大きな量的変動を示した (図 2)。

D. 考察

2DICAL で血漿腎癌バイオマーカーとして Fibronectin 1 を探索し、多数検体を用いて Fibronectin 1 が腎癌患者血漿で上昇していることが検証されたので、論文としてまとめ学術雑誌の掲載に至ることができた。同様に 2DICAL で探索された前立腺癌血漿バイオマーカーも多数検体を用いた検証実験が終了したので、学術雑誌に投稿する形に仕上げることができた。

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、検討症例数を増やし、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。

E. 結論

2DICAL を用いた血漿バイオマーカーの探索、および、多数検体での検証に成功し、本事業での研究成果を上げることができた。今後、バイオマーカーとして実用化するためには、臨床の現場で測定を行い、その有用性についての最終的判断が下せるデータを獲得していかなければならない。また、肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発は、組織検体を用いたバイオマーカー開発とともに、リン酸化ペプチドを利用した新規の診断治療にかかわるバイオマーカー

一開発の可能性があり、重要な研究となつていくと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito, H., Honda, K., Satow, R., Arai, E., Shitashige, M., Ono, M., Sakuma, T., Sakano, S., Naito, K., Matsuyama, H. & Yamada, T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. *Jpn J Clin Oncol* **41**, 847-53 (2011).
2. Matsubara, J., Honda, K., Ono, M., Sekine, S., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Sakuma, T., Nakamori, S., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Tsuchida, A., Shimahara, M., Yasunami, Y., Chiba, T. & Yamada, T. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 2195-203 (2011).
3. Yokomizo, A., Takakura, M., Kanai, Y., Sakuma, T., Matsubara, J., Honda, K., Naito, S., Tesshi, Y. & Ono, M. Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Biomark* in press (2012).
4. Miyamoto, T., Kitamura, N., Ono, M., Nakamura, Y., Yoshida, M., Kamino, H., Murai, R., Yamada, T. & Arakawa, H. Identification of 14-3-3 γ as a Miep-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Scientific Reports* in press (2012).
5. Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S. & Ono, M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *Cancer*, submitted (2012).
6. Ono, M., Kamita, M., Murakoshi, Y., Matsubara, J., Honda, K. & Yamada, T. Biomarker

discovery of pancreas cancer and gastrointestinal cancer by 2DICAL -2-dimensional image converted analysis of LC/MS. *Int J Proteomics* submitted (2012).

2. 学会等発表

1. 日本プロテオーム学会 2011 年大会、シンポジウム 6 定量プロテオミクス 平成 23 年 7 月 29 日 (朱鷺メッセ、新潟市) 尾野雅哉、紙田正博、五十嵐文子、山田哲司 2DICAL による定量プロテオミクス
2. 日本プロテオーム学会 2011 年大会 平成 23 年 7 月 28、29 日 (朱鷺メッセ、新潟市) 紙田正博、五十嵐文子、きょう建生、酒井 義人、伊藤研悠、原田 敦、新飯田俊平、山田哲司、尾野雅哉 2DICAL を用いた腰部脊柱管狭窄症のプロテオーム解析
3. 第 15 回薬物動態談話会セミナー 平成 23 年 8 月 25 日 (ホテルコスモスクエア国際交流センター、大阪市) 尾野雅哉 2DICAL を用いた疾患関連蛋白質の探索法と臨床研究への応用
4. 第 10 期第 2 回バイオフィナンスギルドセミナー 平成 23 年 9 月 9 日 (バイオフィロンティアパートナーズ特別講堂、東京都) 尾野雅哉 プロテオームを活用した最先端がん研究
5. 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 5 日 (名古屋国際会議場、名古屋市) Ono M., Kamita M, Ikarashi A, Negishi A, Matsubara J, Yamada T. Identifying new therapeutic The discovery of molecular targets for cancer diagnosis and therapy by a proteome platform - 2DICAL.
6. 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 5 日 (名古屋国際会議場、名古屋市) Yamada T, Honda K, Masuda M, Shitashige M, Ono M. Identifying new therapeutic targets for

personalized medicine.

7. 第 11 回バイオメディカル研究会
平成 23 年 1 月 28 日 (都市活力研究所、
大阪市)
尾野雅哉
2DICAL による新規がんマーカー探索
8. 神戸大学大学院グローバル COE 平成 23
年度神戸大学大学院先端医学シリーズ
平成 23 年 1 月 31 日 (神戸大学大学院医
学研究科、神戸市)
尾野雅哉
プロテオーム解析技術 2DICAL を用いた新
規がん診断・治療法の開発
9. France-Japan Symposium on Cancer Research
2011
平成 23 年 1 月 1 日 (フランス大使館、東
京都)
Shitashige M, Honda K, Masuda M, Ono M,
Yamada T.
Targeting the WNT signaling pathway
10. メタボロミクス/プロテオミクスセミナー
平成 23 年 1 月 8 日 (千里ライフサイエン
スセンター、大阪府豊中市)
尾野雅哉
プロテオーム解析技術「2DICAL」を基盤と
した質量分析計による新しいがん診断・治療
法の開発
11. メタボロミクス/プロテオミクスセミナー
平成 23 年 1 月 10 日 (ホテルラフォーレ
東京、東京都)
尾野雅哉
プロテオーム解析技術「2DICAL」を基盤
とした質量分析計による新しいがん診
断・治療法の開発

3. 書籍

1. 山田哲司, 尾野雅哉, 本田一文: がん (腫瘍)
マーカー, 渋谷正史, 湯浅保仁 編: がん生
物学イラストレイテッド. 東京, 羊土社, pp
318-324, 2011
2. 尾野雅哉, 松原淳一, 山田哲司: 第 9 章 研
究例 6. 膵癌 1) 血漿を用いた膵癌早期
マーカー探索, 日本臨床プロテオーム研究
会編: 臨床プロテオーム. 東京, 金原出版,
印刷中, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

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
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

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

研究協力者

増田 万里 (国立がん研究センター 創薬臨
床研究分野)

図 1

肝がん・非がん肝組織で差のあったタンパク質

肝がん・非がん腎組織間でピーク強度比が2倍以上あったものを選択した

がんで高値 321ペプチド(151タンパク質) 非がん部で高値 353ペプチド(129タンパク質)

PANTHER Biological Process

	タンパク数
BP00031 Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	34
BP00206 Chromosome segregation	7
BP00203 Cell cycle	16
BP00178 Stress response	10
BP00282 Mitosis	10
BP00125 Intracellular protein traffic	22
BP00047 Pre-mRNA processing	11
BP00062 Protein folding	11

	タンパク数
BP00013 Amino acid metabolism	18
BP00295 Steroid metabolism	11
BP00019 Lipid, fatty acid and steroid metabolism	22
BP00020 Fatty acid metabolism	13
BP00289 Other metabolism	18
BP00001 Carbohydrate metabolism	20
BP00299 Steroid hormone metabolism	5
BP00017 Amino acid catabolism	6
BP00292 Other carbon metabolism	8

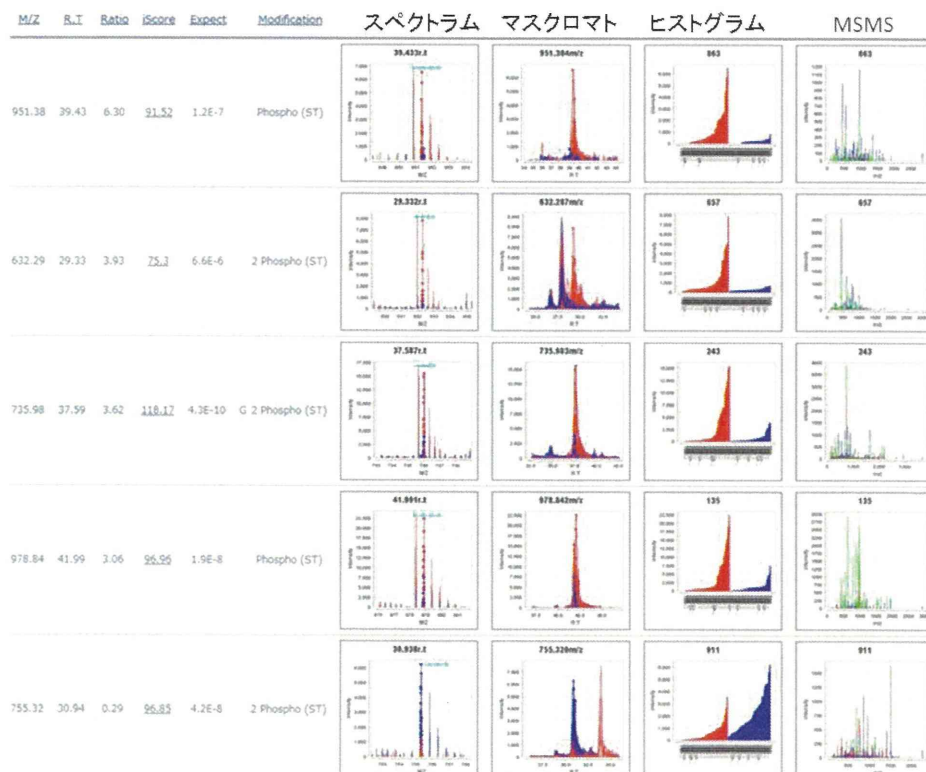
PANTHER Molecular Function

	タンパク数
MF00042 Nucleic acid binding	39
MF00077 Chaperone	14
MF00265 Tubulin	5
MF00209 Hsp 70 family chaperone	5
MF00069 Ribonucleoprotein	8
MF00264 Microtubule family cytoskeletal protein	6

	タンパク数
MF00131 Transferase	24
MF00124 Oxygenase	10
MF00123 Oxidoreductase	34
MF00137 Glycosyltransferase	5

図 2

リン酸化ペプチドの解析



がん(赤)で高値 202ペプチド

非がん部(青)で高値 183ペプチド

循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 寒川賢治 国立循環器病研究センター研究所 所長

南野直人 国立循環器病研究センター研究所 部長

研究要旨

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。

A. 研究目的

ゲノム遺伝子配列の決定に続き、生体で実在、機能するたんぱく質、ペプチド、代謝物などの実験的解析 (プロテオーム、ペプチドーム、メタボローム解析) に基づくファクトデータベース構築が大きな目標となっている。細胞や組織が産生し、血液、尿などに多種類で存在するたんぱく質、ペプチド、代謝物などを包括的に解析、利用できれば、医薬品や診断法の開発などの各種目的に利用可能な物質を探索、発見する上で極めて有用な情報源となるからである。また、正確な臨床情報を伴った血液、尿などの体液、組織や細胞試料のプロテオーム、ペプチドーム解析を疾患発症から追跡、実施できれば、有用なバイオマーカーを発見でき、病因、病態、治療、予後などの診断、医薬品の開発、評価が可能と期待される。しかし、生体内に存在するたんぱく質、ペプチドは極めて多様な性質を示す物質の混合物であると共に、濃度差が極めて大きいことが解析上の障害となり、ゲノムやトランスクリプトーム解析のような全ゲノムやその産物に亘る均一な解析が実施できていな

い。特に微量たんぱく質やペプチドを生体内の状態に取り出し解析することや、翻訳後修飾を受けた微量たんぱく質の正確な構造情報を得ることは、依然として極めて困難である。本研究では、これまで培ってきた前処理法、解析技術を改良し、循環器疾患患者の細胞、組織、血液、尿などに含まれる微量たんぱく質やペプチドの定量比較、修飾などの構造変化を解析可能とする研究技術を開発して、心不全などの心疾患などの病因、病態、予後などの診断・評価や、これらの疾患の治療や医薬品の効果判定に使用可能なバイオマーカーの発見を目指す。

本年度の研究では、イヌの機械的刺激心不全モデルにおけ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実施し、マーカー候補の探索を行った。血中のペプチドの前処理法を開発するため、消化ペプチドの標識法の開発に着手した。血中でのマーカー候補として有望な一次切断構造を保持する大分子量ペプチドの解析法の確立のため、ETD 法と CID 法を併用しつつ、細胞培養上清の解析を行った。また、継続実施している心筋細胞、心臓線維芽細胞の分泌

ペプチドの解析を進めた。

B. 研究方法

1. イヌ心不全モデルの作成と試料収集: イヌはゲノム遺伝子配列が決定されており、心機能データを正確に収集できるとともに、ペーシングにより純粋な頻脈性心不全を作成でき、代償期から非代償期への変化も継続観察できるなど、心不全の適切な大型実験モデル動物である。右室ペーシング 230 回/分で 4 週間ペーシング(2 例)、6 週間ペーシング(5 例)、及び対照群(1 例)、偽手術群(2 例)を作成し、0、4、6 週で心行動態を測定するとともに、左室心筋、血清を採取した。本年度は左心室心筋について、iTRAQ 法による解析を医薬基盤研究所の朝長先生により、2DICAL 法による解析を国立循環器病研究センターが実施し、有意な量的変動を示すタンパク質の解析を行った。

2. 血漿試料を用いた前処理法の検討: 昨年度までの研究により、血漿中のペプチドは基本的に数量共に非常に少ないが、前処理により人為的に変化、増加することを確認している。一定方法で処理しても処理毎に変動し、定量的な比較解析は困難である。一方、組織ペプチドーム解析においても消化・分解の阻害は困難であるが、血漿より制御が可能であるため、副腎髄質組織を対象に消化・分解ペプチドの選択的標識法の使用の可否を検討した。迅速摘出、細片化した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・抽出した試料を逆相カラムで濃縮、脱塩し、ペプチド画分をナノ LC で分離後、質量分析計で解析し、標識試薬の取込率を検討した。

3. 培養細胞株上清中の大分子量ペプチドの解析: 血漿中のペプチド画分と同様に、培養細胞株の上清においても低分子量ペプチド (<5KDa) は少なく、高分子量側へ移行するにつれてペプチド量は増加し、高分子量ペプチドは一次切断部位を記録することが多いことがこれまでの研究により判明している。分子量 >5KDa のペプチド画分の配列や構造が決定できればペプチドの実態把握が進むと考え、昨年度に引き続き electron transfer dissociation(ETD) 法を用いて、LTQ-Qorbitrap ETD にてペプチド構造解析の検討を行い、CID 法と比較しつつ効率

的な構造決定法、同定法について検討を行った。4 培養初代培養心筋細胞、非心筋細胞の培養上清中のペプチド解析: 組織の状態を反映し、血液、尿、髄液等の体液成分で大きな変化を観測可能な主体は分泌性たんぱく質、ペプチドと推定されるため、神経内分泌系細胞株の培養細胞上清に分泌されるペプチドを分解を回収、分析する分泌ペプチドーム法を開発してきた。この方法をラット新生仔由来の心筋細胞、非心筋細胞(主に線維芽細胞)に適用し、従来からの CID 法に加えて 3. に記した ETD 法を用いて解析を継続、展開した。

(倫理面への配慮)

血液試料は第 1 期プロテオーム研究時に当センター倫理委員会で承認を受けて採取したもので、本研究での使用承認を受けると共に、20 年度に研究協力者の意思確認を行い、同意が得られた試料を使用した。動物実験については、当センター動物実験委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

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 40000、30000 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 15000 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

したタンパク質が各約 100 種が検出された。同定ペプチド総数は 1000 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 12000 Da を超えるペプチドまでが同定され、ペプチド前駆体に由来するペプチド、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。

D. 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情報量が多いため、4 週、6 週ペーシング群でコントロール群や偽手術群に比較して共通して増加あるいは減少しているタンパク質、各約 100 種について検討を進めている。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 (一定タンパク質量当たり)、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く、これらの情報伝達系での役割と変動について、またエネルギー代謝関連タンパク質については、解糖系をはじめとするエネルギー産生系における変動タンパク質の機能と代謝経路の変動について、解析を行っている。また、アイソタイプが存在する代謝系酵素や情報伝達系タンパク質群で、アイソタイプスイッチングが起こっている可能性が複数の例で観測されたため、これらについては、抗体によるタンパク質量の定量、あるいは mRNA レベルでの変動などを確認し、バイオマーカーとしての可能性について検討する予定である。一方、当センターの心不全モデルでは様々な心不全モデル、疾患症例で mRNA の発現プロファイルを解析しているため、それらのデータとプロテオーム解析データの比較解析を進めている。これらの解析結果を総合して、有望なバイオマーカーの発見へとつなげたい。更に、現在の解析が進めば、4 週ペーシング群（代償期）、6 週ペーシング群（非代償期）での比較も行い、病態の進行を評価するバイオマーカー探索も実施する予定である。

血液試料では処理方法を問わず凝固系、補体系などのプロテアーゼの活性化が避けられず、インヒビター類の添加などにより阻害を行っても、血液から抽出したペプチドの比較解析からバイオマーカーを探索することは困難と考えられた。本年度は消化・分解は不可避とし、人為的な消化・分解を選択的に標識、識別するという見地で研究を行った。副腎髄質組織では、消化、分解を起こす条件で試薬添加以降に発生した消化、分解ペプチドは標識され、本選択的標識法により識別が可能と結論された。次年度は、本選択的標識法をプロテオアーゼ消化・分解を抑制した血液系に導入し、調製したペプチドの解析により内在性ペプチド、一次切断部位を保持するペプチドを見出し、バイオマーカーとしての可能性を検討する予定である。

一次切断部位構造（選択的プロセッシング部位を含む）を保持する高分子量ペプチド画分や低分子量タンパク質がバイオマーカーとして有望と考えられるので、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、昨年度に続いて検討を

行った。その結果、最大で分子量 15000Da 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 1000 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 3000Da 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。

これらの成果を有効に組み合わせ、微量で不安定な内在ペプチドを基盤としたバイオマーカー探索法を開発したい。

E. 結論

イヌ頻脈性心不全モデルの心組織のプロテオーム解析より、明確な変動を示すバイオマーカー候補タンパク質が数多く見出されてきた。これらのエネルギー代謝、収縮機能などにおける役割、細胞機能や変動パターン、mRNA や他の変動因子との関連を解析し、有望なバイオマーカーの発見へと研究を進展させる予定である。血液中のバイオマーカー探索においては、従来の試料調製法では 2 次的な消化・分解は不可避であるため、消化・分解反応による生成物は識別可能として構造解析後に排除し、内在ペプチドの同定とそれらの定量解析に基づくマーカー探索を実施可能としたい。これまでのペプチド解析結果より、ペプチドーム中では高分子量ペプチドの割合が高く、生成した際の一次切断部位情報などを保持する割合が高いことが示されたので、高分子量ペプチドや低分子量たんぱく質の同定効率の向上を目指して研究

実施してきた。その結果、最大で分子量15000Daまでのペプチド（低分子量タンパク質）が同定可能となったので、これを適切に調製された対象に適用し、前駆体たんぱく質からペプチドへ変換される一次切断部位、あるいは疾患により特異的な変換を受ける際の切断部位推定などに活用し、ペプチドや切断部位を起点とするバイオマーカー同定へと、研究を進展させる予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Osaki, T., Sasaki, K. & Minamino, N.
Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5. *J Proteome Res* **10**, 1870-80 (2011).
2. Maisel, A.S., Nakao, K., Ponikowski, P., Peacock, W.F., Yoshimura, M., Suzuki, T., Tsutamoto, T., Filippatos, G.S., Saito, Y., Seino, Y., Minamino, N., Hirata, Y., Mukoyama, M., Nishikimi, T. & Nagai, R. Japanese-Western consensus meeting on biomarkers. *Int Heart J* **52**, 253-65 (2011).

G-2. 学会発表

1. 佐々木一樹, 高橋憲行, 佐藤光男, 山崎基生, 南野直人: セクレトペプチドーム解析に基づく新規生理活性ペプチド探索. 第84回日本内分泌学会学術総会 (H23年4月, 神戸)
2. 尾崎 司, 佐々木一樹, 南野直人: ペプチドーム解析で見出されたインスリン様成長因子結合タンパク質-5由来の新規抗菌ペプチド AMP-IBP5. 第84回日本生化学会 (H23年9月, 京都)
3. N. Minamino: Discovery and function of secreted peptides. Neuroscience 2011, Society for Neuroscience Meeting, Symposium: Neuropeptides: From Discovery to Function (H23年11月, Washinton DC)
4. 佐々木一樹, 尾崎 司, 南野直人: ラット心筋初代培養系の分泌ペプチド解析による心

房性ナトリウム利尿ペプチドのプロセッシング・切断部位の同定. 第15回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (H23年11月, 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

なし

H-2. 実用新案登録

なし

H-3. その他

研究協力者

朝長 毅 (医薬基盤研究所プロテオーム研究センター)

佐々木一樹, 尾崎 司 (国立循環器病研究センター研究所分子薬理部)

北風政史, 朝倉正紀 (国立循環器病研究センター病院心不全部)

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

研究分担者 高坂 新一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所長

研究要旨

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。

A. 研究目的

本研究では、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上を図り、またその発症機序の解明や診断技術の高度化を図るため、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群の同定とその臨床的活用をめざす。

神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられているが、その成立には免疫機序の関与も認められ、また自律神経症状などを認めることも多い。さらに、生活習慣がその発症に影響を与えることは近年の疫学的調査から明らかになってきており、血液、髄液、尿などの解析から予防・診断に関して新たな知見が得られるとの期待が高まっている。

これまでの血漿と髄液を用いたcICAT法での研究から、髄液を用いた解析では中枢神経特異的な蛋白質が多数同定されており、その有用性が明らかにできた。また臨床的に利用可能な髄液2mlからのプロテオーム解析技術の開発も行った。

今年度は、昨年度明らかにした採取後の冷蔵及び保存処理が検体の質に大きく影響することを踏まえて、ほぼすべての髄液採取に専属のコーディネータが対応するシステムを病院全体で構築すること、また髄液採取時における食事の影響について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 髄液採取体制の整備

国立精神・神経医療研究センター内にトランスレーショナル・メディカルセンター（TMC）が設立され、その一部門にバイオリソース管理室が設置された。病院での髄液採取と検査体制を見直し、研究利用を踏まえたTMCを中核にした髄液保存プロトコールを構築する。

(2) 髄液採取時の食事の影響

髄液タンパク質組成における食事の影響を調べるために、同一患者で前日22時以降絶食（朝食抜き、午前中の髄液採取）と昼食後（午後2時の髄液採取）で比較する。