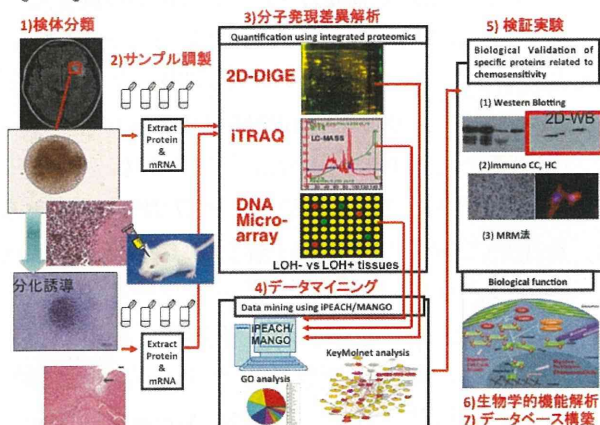


病態解明とそれに基づく治療体系の確立:ゲノム110号、平成20年改訂)。ガイドラインに従い、採取された患者の組織サンプル、遺伝子解析情報を含めすべての検査結果について守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定されない方法でのみ行うことを遵守している。本研究で採取される組織は、治療上必要不可欠な外科的手術によるもののみであり、患者に不利益及び危険性は伴わない。

### C. 研究結果・考察

1) グリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群の融合プロテオミクス解析  
今回用いた統合プロテオミクス解析の概略を図に示す (Fig.1)。

Fig1 Integrated ProteomicsによるGCS特異的分子群の検出法



Glioma 患者の腫瘍組織から、特殊培養条件にて、神経幹細胞に特徴的な Sphere を形成する幹細胞様クローンを分離した。既知の神経系幹細胞、およびグリオーマ細胞マーカー分子群の発現変動を解析するとともに、マウス頭蓋内への同所性移植によって、腫瘍形成能を評価した。現在、12人のグリオーマ患者組織より、11クローンの分離に成功し、その中で特に長期にわたって培養可能で、マウス頭蓋内移植によりグリオーマを発症する3クローン GSC03A, 03U, 07U を解析に用いた。血清添加によって分化誘導後、タンパク質と mRNA を抽出し、2D-DIGE 法、iTRAQ 法、DNA Microarray により発現解析を行い、解析データは、我々が統合プロテオミクス解析のために開発した application であ

る iPEACH (integrated Protein Expression Analysis Chart) を用いて整理・統合し、GO 解析、クラスター解析、パスウェイ解析によって、特異的変動分子群を抽出した。

2D-DIGE 法による解析結果: 2つのクローンの分化誘導におけるタンパクの発現変動数の平均は、血清添加による分化誘導2日後で851と1165、7日後で935と1228であり、分化2日後よりも7日後の方が多くの分子群が発現変動していることが判明した。この変動データを2way ANOVA 統計解析したところ、分化誘導で発現変動の有意差を示したスポットは627、このうち、分化誘導にて有意差を示したスポットは139、培養時間で有意差を示したのは63、この2つの要因に相関を示したスポットは60であった。アストロサイトマーカー

GFAP は分化誘導で発現増加が顕著であり、ニューロンマーカー Tuj1 は発現の変動は認められなかったが、両者とも翻訳後修飾を受けた複数のスポットが検出されたことから、これらの分子に GSC 内でリン酸化等やタンパク質分解等の翻訳後修飾が起こっていることが考えられた。一方、神経幹細胞マーカー CD133 と Sox2 は、分化誘導によって発現低下していた。

iTRAQ 法による解析結果: iTRAQ では約 8471 個のタンパクを同定し、そのうち定量的に有意な 4191 個を解析に用いた。Sphere 2 日後のデータを基準として発現変動したタンパク数は 2 日後で 830 個、7 日後で 1063 個であり、2D-DIGE の結果と同様に分化誘導 7 日目の方が多くの分子群の発現変動が見られた。2 日後 7 日後共通に変動した分子数は 408 であった。iPEACH によるクラスター解析にはこの共通変動分子群のリストを用いた。DNA microarray 法による解析結果: ヒト 55000 個の DNA プローブに対し、そのうち定量的に有意な 21857 分子を対象に解析を行った。Sphere 2 日後のデータを基準として発現変動したタンパク数は 2 日後で 2883 個、7 日後で 1805 個であり、mRNA はタンパクの結果と異なり、分化誘導 2 日後の方が多くの分子群の発現変動が見られた。これは mRNA とタンパク発現の間にタ

タイムラグがあるためと考えられる。2日後7日後共通に変動した分子数は583であった。

iPEACHによるクラスター解析にはこの共通変動分子群のリストを用いた。

以上のiTRAQ法とDNA Arrayのデータからクローン間で共通に変動した1458個の分子について、データを統合マイニングし、クラスター解析およびGene Ontology解析を行った。(Fig.2)

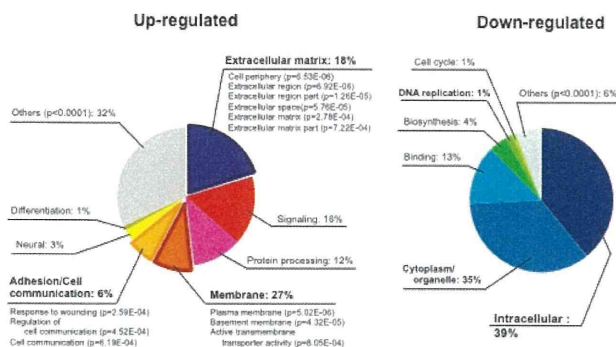


Fig.2 GSC分化誘導によって変動する分子群のGO解析

GSCの分化誘導で発現亢進した分子のGene Ontology Categoryはメンブレン(27%)、細胞外基質(ECM)(18%)、接着/細胞間コミュニケーション(6%)に関連し、発現抑制した分子のGene Ontology Categoryは亢進群が細胞外/膜分子群(50%)に対して、細胞内分子群(70%)、結合(13%)、細胞周期関連(6%)などに関連していることが明らかになった。分化誘導によって、発現変動が特徴的であったクラスター解析から、発現抑制される分子群が2クラスター抽出され、ErbB2、c-Myc、RBE2F関連分子等を含む細胞周期促進因子群、翻訳制御、細胞内輸送、タンパク合成関連分子群が、また、分化誘導によって発現が亢進する分子群は、GFAP、CD44、TGF- $\beta$ ファミリー蛋白質、そのレセプター群、SMADファミリー蛋白質群を含む、神経発生・分化制御、細胞死抑制、細胞運動関連分子であることが判明した。

## 2) グリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群の検証実験

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

証実験を試みた。

神経幹細胞マーカーのCD133、Sox2の発現が分化によって減少していることから、我々のクローンは神経幹細胞様の性質を持っているが、同様のマーカーであるNestinは変動しないこと、また、分化誘導するとアストロサイトマーカーのGFAP、オリゴデンドロサイトマーカーで悪性グリオーマ高発現分子であるCD44の発現が誘導されることから、グリオーマ細胞への分化能を有していることがわかった。また、ニューロンマーカーTuj1とアストロサイトマーカーGFAP、悪性化マーカーvimentinでは、それぞれ複数のスポットが検出され、これらの分子にGSC内でリン酸化等の翻訳後修飾やタンパク質分解などが起こっていることが判明した(Fig.3)。

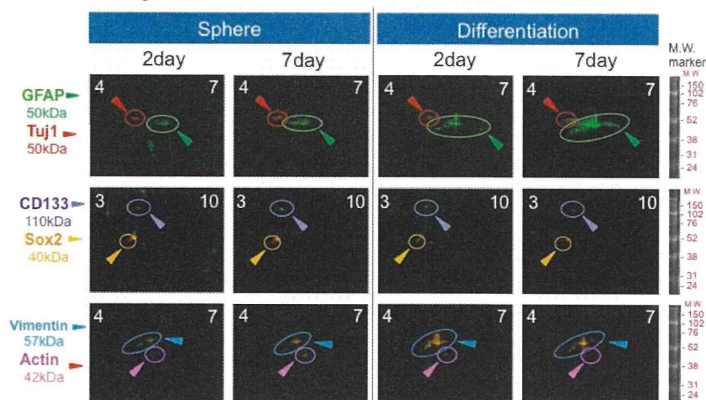


Fig.3 GSCマーカー分子群の2D-WBによる検証実験

細胞を用いた免疫染色においても、CD133とSox2はGSC Sphereで有意に発現し、血清刺激後には顕著に減少することを確認した。血清刺激条件下では、GSC Sphereは培養皿に糸状偽足/葉状仮足を出して接着し、GFAPとCD44の発現が増大したが、ニューロンマーカーのTuj1の発現変化はないことを確認した。また、GO解析で特徴的であった、細胞接着関連因子群であるインテグリンファミリー、コラーゲンファミリー、ラミニン、およびフィブロネクチンなどの発現を検証したところ、COL4、FN、およびインテグリンX、Yは、融合プロテオミクスの結果と同様に分化誘導で発現亢進していることを確認した(Fig.4)。また、組織染色の結果によって、マウス脳異種移植片で同様に

COL4、FN、およびインテグリン X、Y が発現していることが確認できたことから、インテグリンと ECM は分化誘導によって有意に発現し、これらの相互作用によって、GSC の分化と神経膠腫形成を促進していることが示唆された。これらの分子の阻害剤による GSC の維持や分化誘導阻害を介して、悪性グリオーマの抑制が可能となると期待される (Fig.5)。

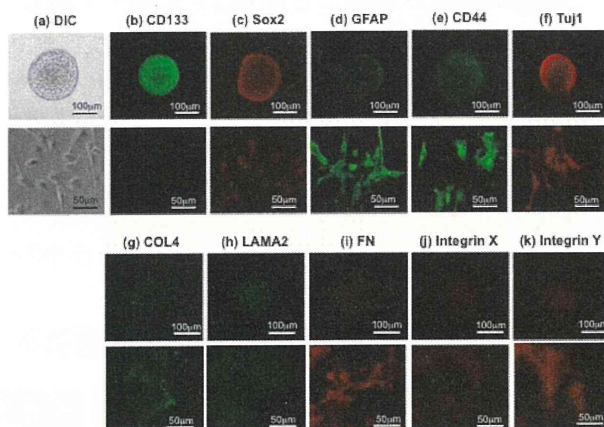


Fig. 4 GSCマーカー分子群の免疫染色による検証実験

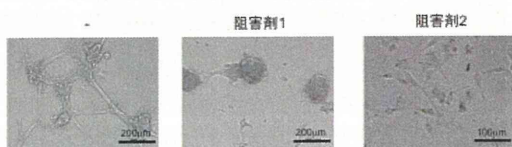


Fig 5. GSC分化に関わる分子の阻害剤の効果

#### D. 結論

本研究では、ヒト脳神経系腫瘍幹細胞様細胞を用いた統合プロテオミクスの解析方法論を考案し、これを用いて腫瘍幹細胞維持と分化、およびがんの悪性化に関わって発現量と修飾構造を変動させるタンパク質群と、その機能変化に関わる責任分子群を介した細胞内シグナルネットワークを抽出することを試みた。グリオーマ患者組織より分離した GSC を対象に、iPEACH を用いた融合プロテオミクスによって、GSC の分化誘導における発現変動分子群のプロファイルを解析し、GSC を特徴づける分子群を同定した。これらには既知の神経細胞分化/グリア細胞分化、及び腫瘍マーカーに加えて、新規の細胞周期/運動/細胞死に関する分子ネットワークシグナルが含まれていた。こ

れら神経系腫瘍(幹)細胞の新規分化調節治療ターゲット候補分子群の腫瘍悪性化のマーカーとしての可能性と、その分子機能やシグナルの上流および下流の分子を標的とした治療戦略が期待される。GSC のマーカー分子群や、脳神経系の悪性腫瘍における治療抵抗性に最も有効に関わる分子群を有効に抽出したこれらの基礎情報は、薬剤開発や、治療方針や予後予測を正しく診断するための病理診断マーカーの開発のための基礎情報として有効利用できる可能性がある。

#### E 研究発表

##### G. 研究発表

###### G-1. 論文発表

1. Esaki, K., Terashima, Y., Toda, E., Yoshinaga, S., Araki, N., Matsushima, K. & Terasawa, H. Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. *Protein Exp Purif* **77**, 86-91 (2011).
2. Araki, N. Integrated proteomics for studying cellular mechanism of neural tumor formation. *Connect Tissue Res* in press (2012).
3. Silsirivanit, A., Araki, N., Wongkham, C., Pairojkul, C., Narimatsu, H., Kuwahara, K., Wongkham, S. & Sakaguchi, N. A novel serum carbohydrate marker for cholangiocarcinoma: values for diagnostic and prognostic indicators. *Cancer*, **117**, 3393-403 (2011).

###### G-2. 学会発表

1. 荒木令江：融合プロテオミクスによる病態関連分子群の統合解析と検証法，第 61 回日本電気泳動学会シンポジウム，第 7 回日本臨床ヒトプロテオーム研究会 2011，山口，2011 年 5 月 9 日～10 日。
2. 荒木令江：融合プロテオミクスによる神経系腫瘍の発症メカニズムの解析，第 43 回日本結合組織学会学術大会第 58 回マトリックス研究会大会合同学術集会，大分，2011 年 6 月 10 日～11 日。

3. 荒木令江, 水口惣平, 森川崇, 緑川宇一, ウィルソン森藤政代, 南部-新堀晶子, 小林大樹, 坪田誠之, 中村英夫, 倉津純一: 病態マーカーと治療ターゲット開発のための融合プロテオミクス, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 日本ヒトプロテオーム機構 第 9 回大会, 新潟, 2011 年 7 月 28 日~29 日.
  4. 荒木令江: 2D-PAGE/2D-DIGE の基本・新技術と応用, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 日本ヒトプロテオーム機構 第 9 回大会, 新潟, 2011 年 7 月 28 日~29 日.
  5. 平山未央, 小林大樹, 森川崇, 長山慈, 緑川宇一, 水口惣平, 荒木令江: 融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内発現抑制を介した異常シグナル分子群の解析, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 日本ヒトプロテオーム機構 第 9 回大会, 新潟, 2011 年 7 月 28 日~29 日.
  6. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる腫瘍特異的分子ネットワークの解析と病態マーカー/治療ターゲット開発への応用, ライフサイエンス統合データベースセンターセミナー, 東京, 2011 年 9 月 7 日.
  7. 水口惣平: iPEACH を用いた統合プロテオミクスデータファイルの作成と応用ライフサイエンス, 統合データベースセンターセミナー, 東京, 2011 年 9 月 7 日.
  8. 荒木令江, 水口惣平, 森川崇, 坪田誠之, 小林大樹, 平山未央, 緑川宇一, 南部晶子, 中村英夫, 倉津純一: 融合プロテオミクスによる悪性脳腫瘍化学治療耐性に関わる分子ネットワークの解析, 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年 9 月 21 日~24 日.
  9. 平山未央, 小林大樹, 森川崇, 長山慈, 緑川宇一, 水口惣平, 荒木令江: 融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制遺伝子 Neurofibromin の機能欠損による神経系細胞内異常シグナルの解析, 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年 9 月 21 日~24 日.
  10. 南部晶子, 緑川宇一, 水口惣平, 長山慈, 永井美奈子, 平野久, 荒木令江: 融合プロテオミクスによる幹細胞様グリオーマの分化制御機構の解析, 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年 9 月 21 日~24 日.
  11. 荒木令江, 水口惣平, 森川崇, 坪田誠之, 小林大樹, 平山未央, 緑川宇一, 中村英夫, 倉津純一: 融合プロテオミクスによるグリオーマの化学治療予後予測分子ネットワークの解析, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日~5 日.
  12. 森藤政代, 新堀晶子, 水口惣平, 小林大樹, 荒木令江: ヒト舌癌における HIF-1 $\alpha$  を介した高転移性がん細胞の増殖機構の解析, 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日~5 日.
  13. Silsirivant A, Araki N, Wongkham C, Kuwahara N, Sakaguchi N, Narimatsu Y, Narimatsu H, Wongkham S. : Significance of fucosyltransferase III in cholangiocarcinoma progression. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日-5 日.
  14. Wongkham S, Silsirivanit A, Wongkham C, Pairojkul C, Narimatsu Y, Narimatsu H, kuwahara K, Araki N, Sakaguchi N. : Glycans on MUC5AC mucin as diagnostic/prognostic and early markers for cholangiocarcinoma. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日-5 日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- H-1. 特許出願
- 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
  - 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

- 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

## H-2. 実用新案登録

なし

## I. その他

研究協力者：水口惣平、小林大樹、南部(新  
堀) 晶子、緑川宇一、平山未央（熊本大学  
大学院生命科学研究部腫瘍医学分野）、秀拓  
一郎、中村英夫、倉津純一（同脳神経外科  
学分野）

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

研究分担者 中村和行 山口大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

近年、難治性がんの診断、治療、予後などの評価のために信頼性の高い新規バイオマーカーの探索が進められている。プロテオミクスによる患者血清中の新規バイオマーカー候補の探索とバイオマーカー候補タンパク質の高感度検出技術の開発や臨床応用が課題となっている。プロテオミクスの基本技術として二次元電気泳動法と質量分析法によるタンパク質の分析が行われ、疾患関連バイオマーカー候補が報告されているが、信頼性の高い新規バイオマーカーは未だ少ない。本研究では、プロテオミクスによるC型肝炎ウイルス関連肝細胞癌や膵臓癌などの難治性がんの早期診断や抗がん剤による治療評価のバイオマーカー候補の探索研究を目的に、患者血清中の自己抗体を用いた癌関連抗原バイオマーカー蛋白の絞り込みとプロテインチップ技術による精度の高い自己抗体価測定技術の開発と抗がん剤による治療評価のバイオマーカー候補タンパク質の探索研究を行った。

### A. 研究目的

ヒトの細胞や組織で産生されて血液や尿などに分布するタンパク質群の情報を包括的に利用すれば、医薬品等に利用可能な物質を見出すことができる。とくに、正確な臨床履歴を伴った血液、尿などの体液や組織等に含まれるタンパク質群の網羅的に解析できれば、有用な疾患関連バイオマーカーの探索が可能になり、病態や予後の診断および治療評価を正確に行うことができる。しかしながら、タンパク質群は多彩な性質を示すと同時に刻々と変化し、その濃度差も極めて大きいため、それらを定量的に解析することやリン酸化や糖鎖化等の翻訳後修飾の解析は依然として容易ではない。ヒトプロテオーム機構（HUPO）の呼びかけによってバイオマーカー探索等のプロテオーム解析技術の世界標準化や細胞膜結合タンパク質群の網羅的な解析技術の標準化が進められている。1) Bell AW, Deutsch EW, Au CE, Kearney RE, Beavis R, Sechi S, Nilsson T, Bergeron JJ, and HUPO Test Sample Working Group (○Nakamura K et al.): A HUPO test

sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods* 6(6), 423-430, 2009. 2) Chung CM, ○Nakamura K, and Jordan TW: The AOHUPO Membrane Proteomics Initiative, Fourth Workshop June 2008 Cairns, Australia. *Proteomics* 8(19), 3920-3923, 2008.

本研究では、従来の二次元電気泳動法と質量分析法に加えて、PROTEOMEX法とプロテインチップ技術を導入し、C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌（HCV-HCC）の超早期診断や抗がん剤による膵臓癌（PC）細胞株の治療効果の評価や創薬に利用可能なバイオマーカーの発見を目指す研究を行う。患者血清中の自己抗体を用いた癌関連抗原バイオマーカー蛋白の絞り込みとプロテインチップ技術による精度の高い自己抗体価測定技術の開発を行うとともに、抗がん剤による治療評価のバイオマーカー候補タンパク質の同定と評価を行う。

### B. 研究方法

1. HCV-HCCのバイオマーカー探索研究には、

山口大学（以後本学）医学部附属病院第二外科で初診時に肝がんの診断を受け治癒切除術を施行した症例を対象とした。まずは、C型肝炎ウイルス感染の既往（HCV抗体陽性、B型肝炎ウイルス（HBV）抗原陰性かつ飲酒歴のない）のある患者から通常の治癒切除術で摘出された癌部組織（5 mm x 5 mm x 5 mm）を検体とした。これらの研究では、本学医学部倫理審査委員会で承認を受けた臨床研究に則り、患者等に本研究の内容を十分に説明して同意を得た。

1) 検体からがん部組織と非がん部組織を分別採取し、それぞれの組織から抽出されたタンパク質を試料として、分離範囲を pH 4-7 に絞ったポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法（2-DE）を実施した。得られたがん部と非がん部の 2-DE 泳動像を Progenesis を用いて画像解析し、がん部で優位に増減するタンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシンを用いた in gel digestion 法で得られたペプチド断片を nano-LC-MS/MS（LC-MSD Trap XCT, Agilent Technologies）で質量分析し、SpectralMill-III および Mascot を用いて候補タンパク質の同定を行った。

2) PROTEOMEX 法を用いて HCV-HCC 患者から得られたがん部組織タンパク質の 2-DE（分離範囲 pH 3-10）を行った後に分離されたタンパク質群を PVDF 膜に転写し、同一患者の血清を反応させた後にペルオキシダーゼ或いは蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させることにより、患者血清中の自己抗体に特異的に反応するがん部組織由来のタンパク質スポットを検出した。これらのタンパク質スポットを切り出し、質量分析して候補タンパク質の同定を行った。

3) 候補タンパク質（例として HSP70 の C-末端領域）を GFP 蛋白と融合させ、その N-末端部に His タグと C-末端部に Cys タグを挿入したベクターを作成して大腸菌内で発現させた。産生されたリコンビナント蛋白を His タグに特異的に結合するニッケルビーズで精製した後にダ

iamond 様表面加工した（DLC）チップ基板上のマレイミド基と反応させ、Cys タグのチオール基とカップリングさせ均一な配向性を保ちながら強固に固定化した。このチップに HCV-HCC 患者や他の疾患ならびに正常人から得た血清を反応させて、HSP70 に特異的に反応する自己抗体を効率的に検出した。さらに、SOD と Peroxyredoxin 6 についても同様に DLC チップ基板表面に固定し、血清と反応させて特異的に反応する自己抗体の検出を行った。

2. 抗がん剤による膵臓癌の治療効果の評価バイオマーカー候補探索研究については、ゲムシタビンに対する薬剤感受性が異なり、薬剤耐性を獲得したヒト PC 細胞株群を用いた。

1) 抗がん剤のゲムシタビンに対する薬剤感受性が異なる PC 細胞株 Miapaca-2, Panc-1, BxPC-1, AsPC-1, PK45P 及び PK59 細胞株を用いて、それぞれの細胞から抽出したタンパク質を試料として 2-DE と nano-LC-MS/MS により薬剤耐性株に特異的に増加するタンパク質のスポットを検出・同定した。さらに、ゲムシタビン感受性株 KLM1 からゲムシタビン薬剤耐性を獲得した KLM1-R を作成し、両者の細胞から抽出したタンパク質を試料として 2-DE と nano-LC-MS/MS により KLM1-R に特異的に増加するタンパク質のスポットを検出・同定した。

2) 同定されたタンパク質に対する特異抗体を用いたイムノブロット法によりゲムシタビン感受性 PC 細胞株と耐性細胞株間での定量評価を行った。

3) 評価されたタンパク質に特異な siRNA を用いてタンパク質のゲムシタビン耐性におけるタンパク質の機能解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. HCV-HCC のバイオマーカー探索研究

1) PROTEOMEX 法を用いて自己抗体に反応する HCV-HCC バイオマーカー候補タンパク質の絞り込み：HCV-HCC のがん部組織に特異的に増減するタンパク質群の中からがん患者血清中の自己抗体に特異的に反応するタンパク質として HSP70 と MnSOD および peroxiredoxin (PRDX) が同定された (図 1)。

2) プロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出：GFP と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップ (図 2) を熱処理して HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させ、Cy3 で標識した抗 GFP 抗体を内部標準として Cy5 で標識した抗体ヒト IgG 抗体を用いてチップ上の HSP70C 特異自己抗体量を Cy3/Cy5 蛍光比で数値化することによって (図 3)、患者血清中自己抗体の定量性の向上と再現性の高い検出が可能になった (図 4) (特許出願 2010-188841)。

## 2. 抗がん剤による膵臓癌の治療効果の評価候補バイオマーカー探索研究

1) ゲムシタビン耐性 PC 細胞株に特異的に増加するタンパク質の同定：ゲムシタビンに対して薬剤耐性を示す PC 細胞株 PK45p と PK59 ならびに薬剤耐性を獲得した KLM1-R に特異的に増加するタンパク質スポットは nano-LC/MS/MS により HSP27 とそのアイソフォームと同定された。

2) HSP27 に特異な抗体を用いてイムノブロット解析するとゲムシタビンに対して薬剤耐性を示す PC 細胞株 PK45p と PK59 ならびに薬剤耐性を獲得した KLM1-R に感受性株に比較して著しく増加しており (図 5)、HSP27 に特異な siRNA を用いて KLM1-R の HSP27 の増加を抑制するとゲムシタビン耐性が解除された (図 6)。

## D. 考察

今回、自己抗体を用いたがん組織特異タンパ

ク質バイオマーカーの高感度検出技術の改良を行い、HCV-HCC を中心とする難治性がんの新規バイオマーカー探索を試み、さらに、自己抗体を用いたプロテインチップ技術の改良を行い HCV-HCC において HSP70 の C 末端部および PRDX が有望なバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。HSP70 の C 末端部をチップ表面に固定化して患者血清中の自己抗体を検出すれば、特異的かつ効率的に HCV-HCC の大規模解析が容易となる。特に自己抗体を活用することにより、血清中に含まれる高濃度のタンパク質や混合物を除去する必要がなく、簡便な検診ツールとして有望であると考えられる。

一方、抗がん剤のゲムシタビンに対して感受性の異なる PC 細胞株の比較プロテオーム解析により、ゲムシタビンに対して耐性を示す細胞株および耐性を獲得とした細胞株に特異的に増加するタンパク質として HSP27 アイソフォームが同定され、siRNA を用いた HSP27 発現抑制実験から HSP27 がゲムシタビン耐性獲得に重要な役割を果たしていることが明らかになった。HSP27 遺伝子発現や蛋白機能の抑制制御分子を探索することにより薬剤耐性を示す難治性がんの治療創薬候補が見つかることと期待される。

## E. 結論

今回の HCV-HCC のバイオマーカー探索研究においては、組織特異タンパク質バイオマーカーの探索技術を改良し、患者血清中の自己抗体を活用した PROTEOMEX 法とプロテインチップ技術の改良を行い、HSP70 の C 末端領域が HCV-HCC の特異バイオマーカー候補として有望であることを明らかにした。さらに、プロテインチップの熱処理操作と二重抗体ラベル法の導入により C 型肝炎関連肝細胞がんの診断技術として患者血清中のがん特異自己抗体を活用したバイオマーカー探索とさらなる高感度診断技術への改良を試み、今後、他の難治性がんについても自己抗体を活用した臨床応用可能なバイオマーカー探索と診断技術の開発を試みる。

さらに、抗がん剤による膵臓癌の治療効果を



評価するバイオマーカータンパク質候補として HSP27 が同定され、siRNA を用いた HSP27 の機能評価においても HSP27 がゲムシタビンに対する薬剤感受性に重要な役割を果たしていることが明らかになり、今後 HSP27 の遺伝子発現やタンパク質機能の発現を調節する小分子化合物を探索し特定することによって難治性の膵臓癌の新たな治療のための創薬を目指す。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載した。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Takashima, M., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Tamesa, T., Sakaida, I., Oka, M. & Nakamura, K. Identification of four isoforms of aldolase B down-regulated in hepatocellular carcinoma tissues by means of two-dimensional Western blotting. *In Vivo* **25**, 881-6 (2011).
2. Kuramitsu, Y., Takashima, M., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Tamesa, T., Akada, J.K., Wang, Y., Toda, T., Sakaida, I., Okita, K., Oka, M. & Nakamura, K. Up-regulation of 42 kDa tubulin alpha-6 chain fragment in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Anticancer Res* **31**, 3331-6 (2011).
3. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Zhang, X., Oka, M. & Nakamura, K. Differential expression of up-regulated cofilin-1 and down-regulated cofilin-2 characteristic of pancreatic cancer tissues. *Oncol Rep* **26**, 1595-9 (2011).
4. Yoshida, k., Kuramitsu, Y., Murakami, K., Ryozaawa, S., Taba, K., Kaino, S., Zhang, X., Sakaida, I. & Nakamura, K. Proteomic differential display analysis for TS-1-resistant and -sensitive pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res* **31**, 2103-8

- (2011).
5. Kuramitsu, Y., Zhang, X., Wang, Y. & Nakamura, K. Identification of differentially expressed proteins in tumor necrosis factor-alpha-resistant and -sensitive rat hepatoma cells. *Anticancer Res* **31**, 2059-63 (2011).
6. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Yoshino, S., Takashima, M., Zhang, X., Ueno, T., Suzuki, N., Oka, M. & Nakamura, K. Screening for serological biomarkers of pancreatic cancer by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Oncol Rep* **26**, 287-92 (2011).
7. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Zhang, X., Ueyama, Y. & Nakamura, K. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient strips and Flamingo TM fluorescent gel stain identified non-nuclear proteins possibly related to malignant tumor progression. *Anticancer Res* **31**, 1259-63 (2011).
8. Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Mori-Iwamoto, S., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. & Nakamura, K. KNK437 down regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and enhances the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy* **57**, 12-6 (2011).

### G-2. 学会発表

1. Nakamura K., Furumoto H., Zhang XL., Tanaka T., Sarvari J., Akada JK., and Kuramitsu Y. : Cys-tagged stathmin chip as a powerful tool for interactomics and kinomics. HUPO 10<sup>th</sup> Annual World Congress, September 4-7th, 2011, Geneva, Switzerland.
2. Nakamura K.: Novel biomarker discovery for diagnostics and therapeutics by cancer proteomics. Keynote Lecture, The 6th International Symposium of the Protein

Society of Thailand, August 31th, 2011,  
Bangkok, Thailand.

3. 中村和行：教育セミナー：国際連携によるプロテオーム研究指導計画，日本プロテオーム学会（JPS）2011年大会，第9回日本ヒトプロテオーム機構（JHUPO）大会，2011年7月28日-30日。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

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 22 年 8 月 25 日

発明者：中村和行 他

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

#### I. 研究協力者

赤田純子、藏満保宏、田中寿幸（山口大学大学院医学系研究科）

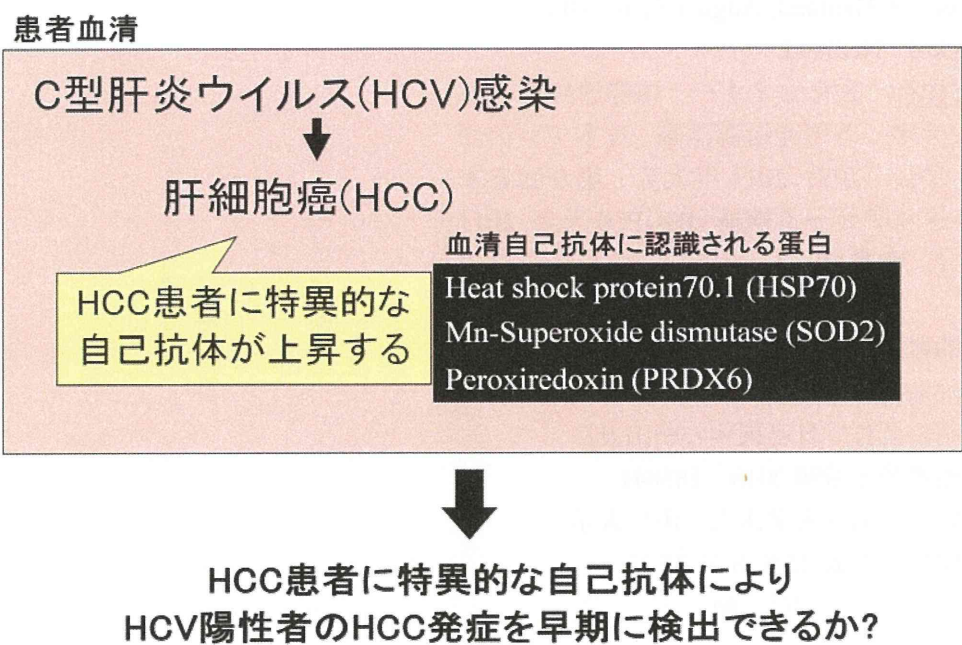


図 1. HCV-HCC 患者血清中の自己抗体に認識されるタンパク質候補。

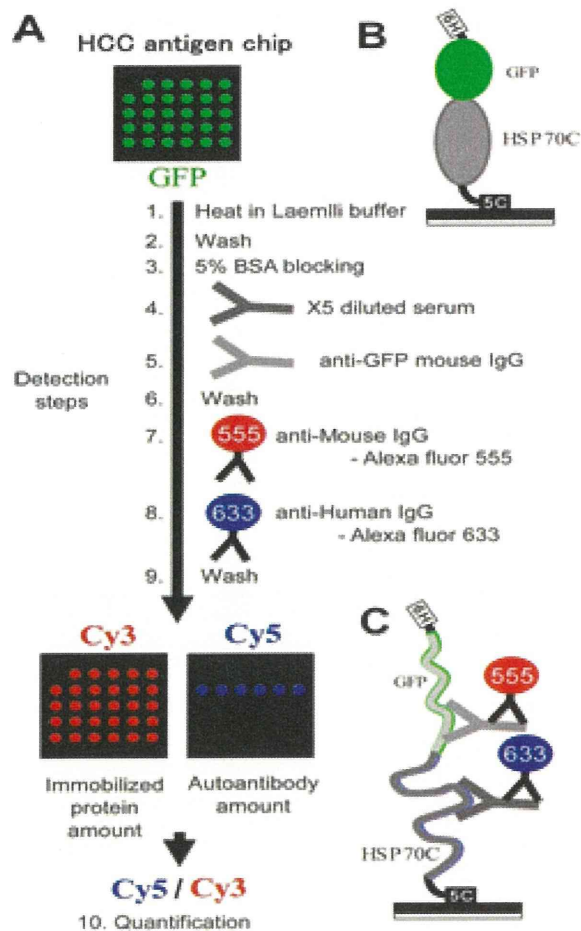
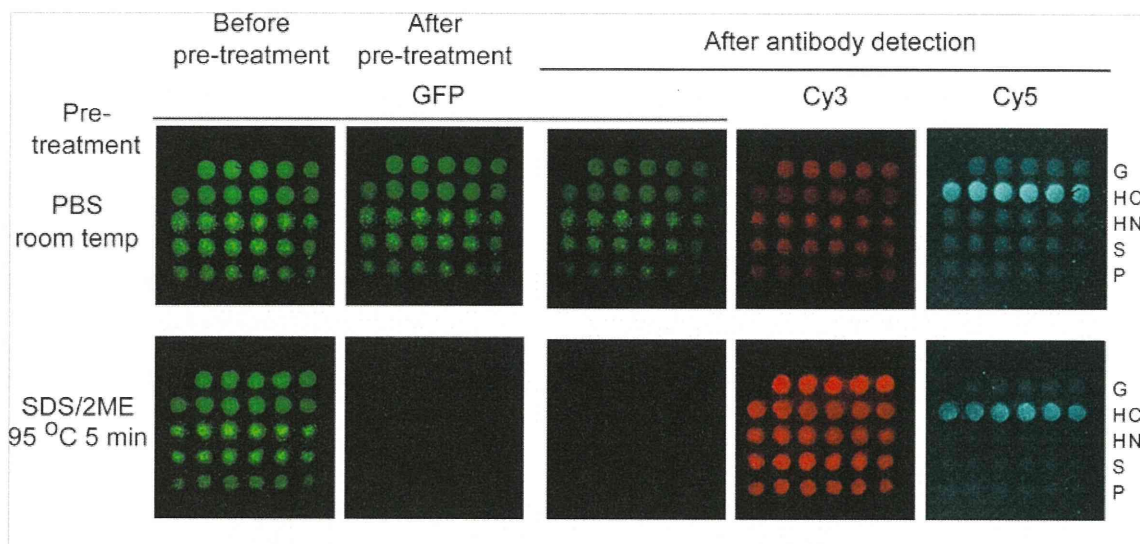


図 2. プロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出(GFP を融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化したダイヤモンド様表面加工した(DLC)チップと熱処理操作の導入)



熱処理により、GFP蛍光が消失しGFP抗体検出が向上した。  
自己抗体検出は維持され、バックグラウンドが低下した。

図 3. 熱処理操作を加えた自己抗体の高感度検出(G:GFP, HC:HSP70C 末端部, HN:HSP70N 末端部, S:SOD, P: Peroxiredoxin 6)。

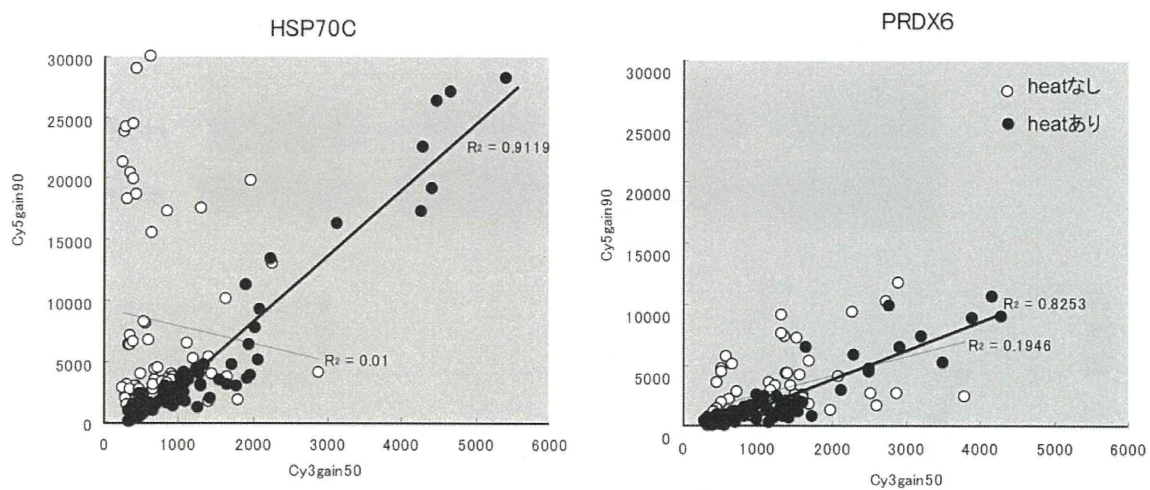


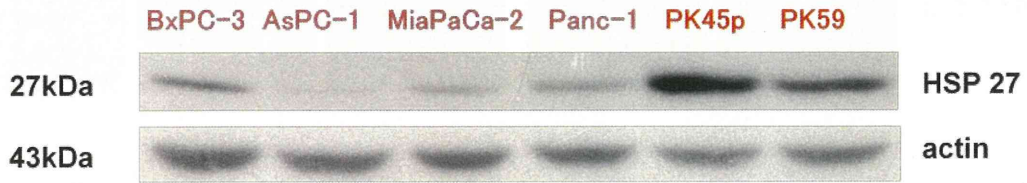
図 4. 熱処理操作を加えた定量性の向上と再現性の高い検出(HSP70 の C 末端部:HSP70C とペルオキシレドキシシン 6:PRDX6)。

The cytotoxicity of gemcitabine to the cells was evaluated by MTT assay

cell line	MiaPaCa-2	Panc-1	BxPC-3	AsPC-1	PK45p	PK59
IC50 $\mu$ g/ml	6.81	8.07	6.67	1.05	417.45	294.72

gemcitabine感受性株

gemcitabine耐性株



Mori-Iwamoto S et al. Int J Oncol. 2007

図 5. ヒト膵臓癌細胞株のゲムシタビン耐性株と HSP27 の発現。

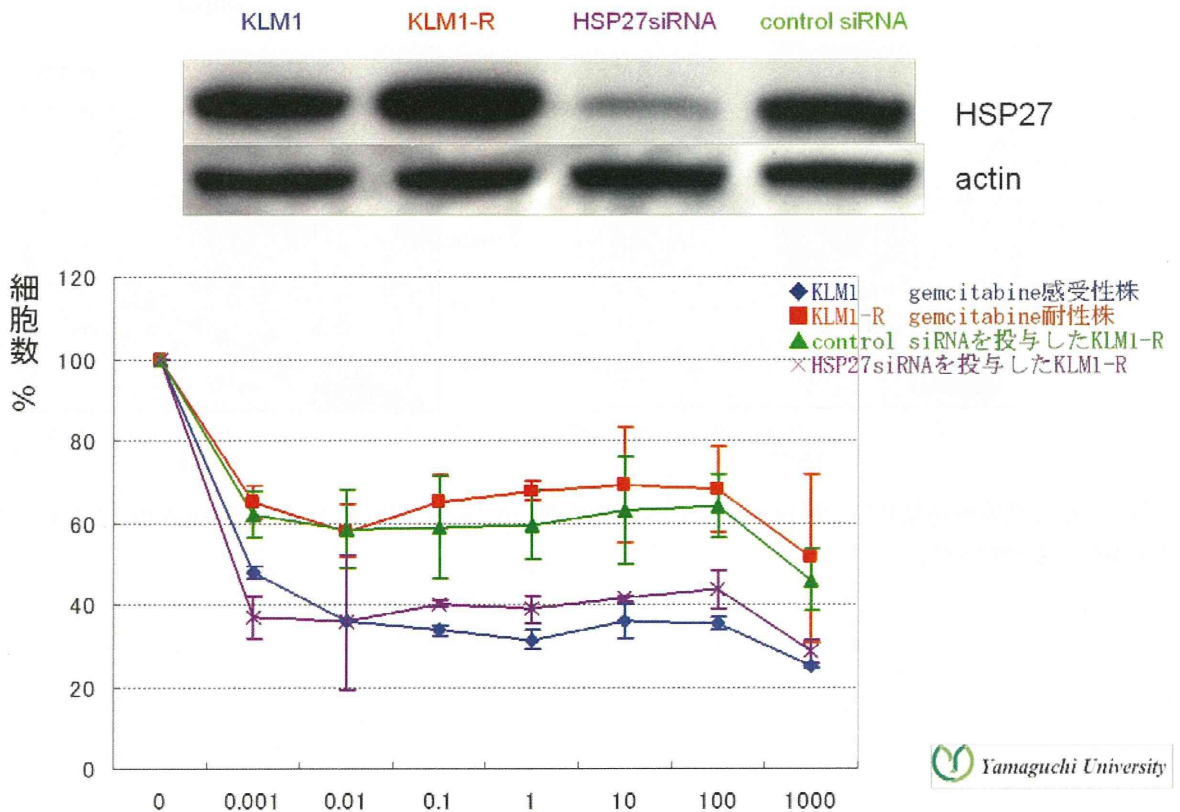


図 6. ヒト膵臓癌細胞株の siRNA を用いた HSP27 発現抑制とゲムシタビン耐性の解除。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
平野 久	質量分析装置を中心とした分析法の原理	平野 久 大野茂雄	翻訳後修飾のプロテオミクス, 講談社, 東京 (2011).	講談社	東京	2011	1-243
尾野雅哉	がん（腫瘍）マーカー	渋谷正史 湯浅保仁	がん生物学イラストレイテッド	羊土社	同上	2011	318-324
同上	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	金原出版	同上	2012	印刷中

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
朝長 毅	The Application of a Three-Step Proteome Analysis for Identification of New Biomarkers of Pancreatic Cancer.	<i>Int J Proteomics</i>	2011: 62878 Epub	1-13	2011
同上	Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma.	<i>J Proteomics</i>	75	1803-1815	2012
同上	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.	<i>J Proteomics</i>	75	833-844	2012

同上	An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer.	<i>Int J Cancer</i>	128	1018-1030	2011
同上	Adhesion molecule periplakin is involved in cellular movement and attachment in pharyngeal squamous cancer cells. <i>BMC Cell Biol</i> <b>12</b> , 41	<i>BMC Cell Biol</i>	12	41	2011
同上	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.	<i>Clin Chim Acta</i>	412	1094-1099	2011
同上	Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis.	<i>J. Proteomics</i>	74	858-873	2011
佐藤（松原）三佐子	GATA3 inhibits lysyl oxidase-mediated metastases of human basal triple-negative breast cancer cells.	<i>Oncogene</i>	31	2017-2027	2012
渡部亮介	Mechanisms of translational regulation by a human eIF5 mimic protein. <i>Nucleic Acids Res</i>	<i>Nucleic Acids Res</i>	39	8314-8328	2011
同上	mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. <i>J Nuc Med</i> <b>52</b> , 497-500 (2011).	<i>J Nuc Med</i>	52	497-500	2011
角田慎一	Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer.	<i>Pharmazie</i>	67	253-255	2012

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	473-477	2012
仲哲治	Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis.	<i>Inflamm Bowel Dis</i>	Epub 28 Feb. 2012	1-11	2012
同 上	Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts.	<i>Exp Dermatol</i>	Epub 18 Apr. 2012	1-6	2012
同 上	Dysregulation of Melanocyte Function by Th17-related Cytokines: Significance of Th17 Cell Infiltration in Autoimmune Vitiligo Vulgaris.	<i>Pigment Cell Melanoma Res</i>	25	219-230	2012
同 上	Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer.	<i>J Exp Clin Cancer Res</i>	13	31:14	2012
中山敬一	p57 <sup>Kip2</sup> and p27 <sup>Kip1</sup> cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70.	<i>Cell Stem Cell</i>	9	247-261	2011
同 上	p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells.	<i>Cell Stem Cell</i>	9	267-271	2011
同 上	The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo.	<i>Cell Metab</i>	14	339-351	2011
同 上	Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver.	<i>J Clin Inves</i>	121	342-354	2011



同 上	SCFFbw7 regulates cellular apoptosis by targeting the Mcl-1 oncoprotein for ubiquitination and destruction.	<i>Nature</i>	471	104-109	2011
同 上	UBE4B promotes Hdm2-mediated degradation of the tumor suppressor p53.	<i>Nature Med</i>	17	347-355	2011
平野久	Nuclear pore complex protein mediated nuclear localization of dicer protein in human cells.	<i>PLoS ONE</i>	e23385 (Epub)	1-9	2011
同 上	Proteomic identification of differentially expressed genes in neural stem cells and neurons differentiated from embryonic stem cells of cynomolgus monkey ( <i>Macaca fascicularis</i> ) in vitro.	<i>Biophys Biochim Acta</i>	1814	265-276	2011
同 上	卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現調節.	<i>生物物理化学</i>	55	5-8	2011
同 上	Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis.	<i>Prostate</i>	72	626-637	2012
同 上	Mass spectrometric characterization of proteins transferred from polyacrylamide gels to membrane filters.	<i>FEBS J</i>	278	3807-3814	2011
同 上	N <sup>α</sup> -Acetylation of yeast ribosomal proteins : Identification by 2D-DIGE MS/MS and analysis of the effect on proteins synthesis.	<i>J Proteomics</i>	74	431-441	2011

同 上	Cell polarity in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex.	<i>Genetics</i>	188	871-82	2011
同 上	Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity 1 and suppress endocrine function in the thyroid.	<i>Endocrinology</i>	152	1702-1712	2011
同 上	Effects of growth hormone on the salmon pituitary proteome.	<i>J Proteomics</i>	75	1718-1731	2012
同 上	Annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma.	<i>FEBS J</i>	278	1470-1483	2011
同 上	A distinct role for Pin1 in the induction of pluripotency and cancer stemness.	<i>J Biol Chem</i>	286	11593-11603	2011
同 上	Identification of tuberculosis- associated proteins in whole blood supernatant.	<i>BMC Infect Dis</i>	11	71	2011
同 上	Genetic variation of high-molecular-weight glutenin subunit composition in Asian wheat.	<i>Genetic Resources Crop Evolution</i>	58	283-289	2011
同 上	Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of basic 7S globulin from soybean.	<i>Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun</i>	67	87-89	2011

同 上	Purification, crystallization and X-ray diffraction study of extracellular dermal glycoprotein from carrot and the inhibition complex that it forms with an endo- $\beta$ -glucanase from <i>Aspergillus aculeatus</i> .	<i>Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun</i>	67	830-832	2011
同 上	Crystal structure of basic 7S globulin, a xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase inhibitor protein-like protein from soybean lacking inhibitory activity against endo- $\beta$ -glucanase.	<i>FEBS J</i>	278	1944-1954	2011
尾野雅哉	Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney.	<i>Jpn J Clin Oncol</i>	41	847-853	2011
同 上	Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. <b>20</b> , 2195-203 (2011).	<i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev</i>	20	2195-2203	2011
南野直人	Peptidomics-based discovery of an antimicrobial peptide derived from insulin-like growth factor-binding protein 5.	<i>J Proteome Res</i>	10	1870-1880	2011
同 上	Japanese-Western consensus meeting on biomarkers.	<i>Int Heart J</i>	52	253-265	2011

高坂新一	NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via /Disrupted- In- Schizophrenia 1/(DISC1).	<i>Neurochem J</i>	118	34-44	2011
同 上	Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development.	<i>Psychiatr Genet</i>	21	208-211	2011
同 上	Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo.	<i>Mol Brain</i>	4	27	2011
宮本泰豪	Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells.	<i>PLoS One</i>	7	Epub, e31234	2012
加藤菊也	Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas.	<i>Clin Cancer Res</i>	17	7808-7815	2011
同 上	Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors.	<i>Clin. Exp. Metastasis</i>	28	427-435	2011
宮本泰豪	N-Glycosylation profiling of recombinant mouse extracellular superoxide dismutase produced in Chinese hamster ovary cells.	<i>Glycoconj J</i>	28	183-196	2011