

20. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Oguro S, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Kanai Y, Hiraoka N. Arginase II expressed in cancer-associated fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer. *PLoS One* 8: e55146, 2013.
21. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108: 914-23, 2013.
22. Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, Watabe Y, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol*, in press, 2013.
23. Yamanoi K, Fukuma M, Uchida H, Kushima R, Yamazaki K, Katai H, Kanai Y, Sakamoto M. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. *Pathol Int* 63:13-19, 2013.
24. Saito Y, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Hirata K, Tsugawa H, Hibino S, Kanai Y, Saito H, Hibi T. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 132: 1751-1760, 2013.
- 2、学会発表
1. Yae Kanai (招待講演). Epigenome profiling during multistage human carcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 2013 Illumina Scientific Summit, Thailand, 2013.
  2. Eri Arai, Taisuke Mori, Masahiro Gotoh, Tohru Nakagawa, Hiroyuki Fujimoto, Yae Kanai. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. Ninth American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, 2013.
  3. Takashi Sato, Eri Arai, Takashi Kohno, Koji Tsuta, Shun-ichi Watanabe, Kenzo Soejima, Tomoko Betsuyaku, Yae Kanai. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. Ninth American Association of Cancer Research-Japanese Cancer Association Joint Conference, Hawaii, 2013.
  4. Eri Arai, Hiromi Sakamoto, Hitoshi Ichikawa, Hirohiko Totsuka, Masahiro Gotoh, Taisuke Mori, Sumiko Ohnami, Tohru Nakagawa, Hiroyuki Fujimoto, Linghua Wang, Hiroyuki Aburatani, Teruhiko Yoshida, Yae Kanai. Multilayer-omics (whole-exome, methylome and transcriptome) analysis identifies the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as a key player in the development of renal

- cell carcinoma. 103<sup>rd</sup> American Association of Cancer Research Annual Meeting, Washington DC, 2013.
5. Takashi Sato, Eri Arai, Takashi Kohno, Koji Tsuta, Shun-ichi Watanabe, Kenzo Soejima, Tomoko Betsuyaku, Yae Kanai. DNA methylation profiles at precancerous stage cluster lung adenocarcinomas into subclusters associated with carcinogenetic pathway, clinicopathological aggressiveness and patient outcome. 103<sup>rd</sup> American Association of Cancer Research Annual Meeting, Washington DC, 2013.
  6. Yae Kanai, Tatsuhiro Shibata, Takashi Ito, Yutaka Suzuki, Satoshi Yamashita, Ying Tian, Masahiro Gotoh, Hidenori Ojima and Eri Arai (招待講演). Standard epigenome analysis in digestive organs and research applications to multistage hepatocarcinogenesis. International Human Epigenome Consortium 2012, Soul, 2012.
  7. Yae Kanai (招待講演). Epigenome profiling during multistage hepatocarcinogenesis and activities of International Human Epigenome Consortium (IHEC). 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Busan, 2012.
  8. Naotaka Nishiyama, Eri Arai, Ryo Nagashio, Hiroyuki Fujimoto, Fumie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Taiji Tsukamoto, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Yae Kanai. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. 27<sup>th</sup> Annual European Association of Urology Congress, Paris, 2012.
  9. 新井恵吏、坂本裕美、市川仁、戸塚裕彦、後藤政広、森泰昌、大浪澄子、中川徹、藤元博行、王凌華、油谷浩幸、吉田輝彦、金井弥栄. 腎臓明細胞がんにおける多層的オミックス (エクソーム・メチローム・トランスクリプトーム) 解析. 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012.
  10. 佐藤崇、新井恵吏、河野隆志、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 前がん段階における DNA メチル化異常が肺腺がんの悪性度と予後を規定する. 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012.
  11. 西山直隆、新井恵吏、長塩亮、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. 尿路上皮がんにおけるゲノム構造異常: 臨床病理学的意義ならびに DNA メチル化異常との関係. 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012.
  12. 金井弥栄 (招待講演). 多層的オミックス解析による疾患の本態解明と臨床応用 シンポジウム 2「オミックス解析と病理学」第101回日本病理学会総会、東京、2012.
  13. 佐藤崇、新井恵吏、知久季倫、河野隆志、薦幸治、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析. 第101回日本病理学会総会、東京、2012.

14. 西山直隆、新井恵吏、長塩亮、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、塚本泰司、横井左奈、井本 逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. 尿路上皮がんにおける染色体構造異常と臨床病理学的検討:DNA メチル化状態と染色体構造異常との関係. 第 100 回日本泌尿器科学会総会、横浜、2012.
15. 新井恵吏、知久季倫、森泰昌、後藤政広、中川徹、藤元博行、金井弥栄. ゲノム網羅的 DNA メチル化解析による腎臓明細胞がんの CpG アイランドメチル化形質. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会、東京、2012.
16. 佐藤崇、新井恵吏、知久季倫、河野隆志、蔦幸治、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化異常のゲノム網羅的解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会、東京、2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

2、実用新案登録

該当なし

3、その他

該当なし

## 厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

### 「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

	氏名	所属	職名
分担研究者	近藤格	国立がんセンター研究所 創薬プロテオーム研究分野	分野長

#### 研究要旨

肝細胞癌の発生や進展に関わるタンパク質を網羅的に調べ、創薬やバイオマーカー開発に資する知見を得ることを目的とした研究を行っている。電気泳動法と質量分析法を用いて全長タンパク質の情報を保持したまま超高感度にタンパク質を定量的に比較解析する手法（PROTOMAP法）を用い、正常組織と腫瘍組織、および門脈侵襲の陽性と陰性の症例の腫瘍組織について、タンパク質発現プロファイルを比較解析した。いずれの比較においても、遺伝子の配列から予測される分子量においてシグナル伝達や転写に関わるタンパク質の発現差が認められ、従来の報告を裏付ける観察結果となった。さらに、配列からは予測されない分子量においても、転写因子や細胞骨格などのタンパク質の発現差が認められた。PROTOMAP法にて電気泳動法と質量分析法を組み合わせることで、肝細胞癌におけるタンパク質断片化の全体像に迫る結果を得ることができた。

#### A. 研究目的

肝細胞癌は本邦では悪性腫瘍死の第4位を占めている。肺癌、胃癌、大腸癌と並ぶ予後不良の悪性疾患であり、肝細胞癌の治療成績の向上は本邦の健康福祉の向上に多いに寄与すると考えられる。肝細胞癌の早期発見のための血清腫瘍マーカーの開発、抗癌剤治療、分子標的治療法の開発、臓器移植に関する研究が盛んに行われてきており、今後の治療成績の向上が期待されている。一方、進行した症例の予後は依然としてきわめて不良であり、

さらなる研究が必要とされている。

プロテオームはゲノムの機能的翻訳産物であり、バイオマーカーや治療標的を探索するうえで有用なリソースであると考えられる。肝細胞癌症例において腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差を示すタンパク質、早期再発に関わるタンパク質は診断のためのバイオマーカーや創薬のための分子標的候補とみなすことができる。そのようなタンパク質を探索するためのプロテオーム解析は盛んに行われており、多数の論文が発表されている。

しかしながら、解析技術の限界から、肝細胞癌のプロテオームの全貌をとらえるレベルには到達していない。また、従来のプロテオーム解析は単なる発現量の比較に留まっており、プロテオームの多様性を網羅できていない。このような現状の元、研究者は技術的な課題を克服しながら研究を進めているのが現状である。

本研究では全長タンパク質を観察するという視点でプロテオーム解析を行ってきた。タンパク質を全長のままで観察することによって、たとえば翻訳後修飾がどのように構造の異常をもたらしているかを理解することができる。高い感度でタンパク質を検出する目的では質量分析が用いられている。しかし、質量分析を用いた解析では一般にタンパク質をペプチドに分解してから解析するので、感度は高いが全長タンパク質の情報が失われるという欠点がある。全長タンパク質のデータを比較解析するためには二次元電気泳動法など電気泳動を基盤とする手法が用いられている。しかし、電気泳動を基盤とする手法の場合、感度が低いために微量タンパク質を観察しがたいという欠点がある。このような現状を克服する技術開発が必要である。

昨年度までに、本研究課題において蛍光二次元電気泳動法を用いた解析を行い、肝細胞癌の脈管侵襲に関わるタンパク質を同定し機能解析を進めた。平行して行った抗体および質量分析を用いた予備実験から、DNA の配列

からは予測されない分子量で発現するタンパク質が腫瘍組織で存在することが分かった。従来の肝癌のプロテオーム解析ではそのようなタンパク質に特にフォーカスして研究が行われていなかった。

今年度は既存の蛍光二次元電気泳動法やショットガン法による質量分析法では同定し難い、全長タンパク質の高感度な検出を可能にする PROTOMAP 法 (Dix et al, Cell 2008) を用い、肝細胞癌における全長タンパク質の異常を網羅的に調べた。

## B. 研究方法

国立がんセンター中央病院にて手術を受けた肝細胞癌症例を対象とし、切除され保管されていた手術検体を使用した。電気泳動法 (SDS-PAGE 法) を用いて分子量にしたがってタンパク質を分画し、ペプチド断片としてタンパク質を回収し、質量分析法にてペプチドの精密質量を測定した。ペプチド単位での発現量と同定されたアミノ酸配列を SEQUEST 法で調べた。そして、得られたデータを、PROTOMAP 法のソフトウェア (Dix et al Cell 2008) を用いタンパク質単位で発現プロファイルを作成し、正常組織および肝細胞癌組織の比較を行った。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われ

るように配慮したがん患者の手術検体を用いた。

### C. 研究結果

PROTOMAP法で得られたデータから、約1400種類のタンパク質を対象に、正常組織、2種類の腫瘍組織（門脈侵襲陽性と陰性の症例に由来）の比較を行った。その結果、正常組織と腫瘍組織の比較で発現差を示すタンパク質に加え、正常組織と門脈侵襲陰性症例の腫瘍組織では同等の発現レベルで、門脈侵襲陽性症例の腫瘍組織で高発現あるいは低発現を示すタンパク質として、ある種の転写因子や細胞骨格等のタンパク質を同定した。また、正常組織との比較において、門脈侵襲陽性の腫瘍組織で特に発現異常を示すタンパク質として、転写因子およびその複合体因子、酵素、核酸結合タンパク質等を同定した。単に発現量が異なるだけでなく、門脈侵襲陽性症例において予想しなかった分子量にて、種々の転写因子が発現異常を来していることがわかった。このようなタンパク質は肝細胞癌の転移・再発に関わる可能性が高く、症例数を増やして検証した上で機能解析を実施する価値があると考えられる。

同様の手法を悪性胸膜中皮腫、胃癌、肺癌等の他の難治癌にも応用し、悪性度に関わるタンパク質、治療標的と目されるタンパク質の探索に着手した。

### D. 考察

肝細胞癌においては単なる発現量の

異常だけではなく、分子量の変化を伴った異常を有するタンパク質が存在することが昨年度までの予備実験でわかっていた。今年度はPROTOMAP法を利用してそのようなタンパク質を網羅的に調べた。転写因子および関連タンパク質のような微量タンパク質が同定でき、そして異なる分子量における異常も同定できたことから、全長タンパク質の差異を調べるために本方法は有用であることがわかった。一方で、解析には膨大な手作業が必要であることがわかり、また、多数検体の比較解析は現状ではできないので、本アプローチはそのままではバイオマーカー探索には使用できない。さらに、PROTOMAP法に使用する質量分析のデータからは切断の正確な配列はわからないことから、培養細胞を用いた機能解析のためにはN末端およびC末端を決定するための技術が必要である。

PROTOMAP法の再現性はサンプル調整と質量分析装置にかかっている。前者については全自動で電気泳動・ゲルの切断・回収を行う装置の開発に着手し、特許出願を行った。後者については、質量分析の条件検討および検索条件の検討によってある程度は最適化できると考えている。

### E. 結論

肝細胞癌の発生や進展に伴うプロテオームの異常として、従来はタンパク質の発現量が主に着目されていた。しかし、今回の研究から、機能的に重要なタンパク質の分子量の変化を伴う

異常が門脈侵襲に関連して多数発生していることがわかった。また、そのような解析に PROTOMAP 法が有用であることがわかった。サンプルの前処置の方法として新しい機器開発に着手し、実用化に向けた検討を開始した。PROTOMAP 法で律速となるデータ解析、および断片化されたタンパク質の配列決定のための手法の開発が今後の大きな課題であり、スループット性を考量するとタンパク質分解酵素のデータベース等の利用も視野に入れる必要がある。肝細胞癌の発生や進展に伴うタンパク質の断片化の機構および生物学的役割の解明は臨床応用につながると考えられるため、本アプローチのさらなる検討を続けていきたい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Haga A, Ogawara Y, Kubota D, Kitabayashi I, Murakami Y, Kondo T. Interactomic approach for evaluating nucleophosmin-binding proteins as biomarkers for Ewing's sarcoma. *Electrophoresis*. 2013
2. Huang C, Wang Y, Liu S, Ding G, Liu W, Zhou J, Kuang M, Ji Y, Kondo T, Fan J. Quantitative Proteomic Analysis Identified Paraoxonase 1 as a Novel Serum Biomarker for Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res*. 2013
3. Hasegawa T, Asanuma H, Ogino J, Hirohashi Y, Shinomura Y, Iwaki H, Kikuchi H, Kondo T. Use of potassium channel tetramerization domain-containing 12 as a biomarker for diagnosis and prognosis of gastrointestinal stromal tumor. *Hum Pathol*. 2013
4. Kondo T, Suehara Y, Kikuta K, Kubota D, Tajima T, Mukaihara K, Ichikawa H, Kawai A. Proteomic approach toward personalized sarcoma treatment: lessons from prognostic biomarker discovery in gastrointestinal stromal tumor. *Proteomics Clin Appl*. 2013 7(1-2):70-8.
5. Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Kodera Y, Sato Y, Araki N, Mamitsuka H, Goshima N. Integrated view of the human chromosome X-centric proteome project. *J Proteome Res*. 2013 12(1):58-61.
6. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Fujita S, Kondo T. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal proteomic intra-tumor heterogeneity in colorectal cancer. *J Proteomics*. 2013 78:134-47.
7. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R,

- Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Sakamoto K, Nakamura Y, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T. Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J Proteomics*. 2012 75(17):5342-55.
8. Kimura K, Ojima H, Kubota D, Sakamoto M, Nakamura Y, Tomonaga T, Kosuge T, Kondo T. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. *J Proteomics*. 2013 14;78:362-73.
  9. Ito A, Mimae T, Yamamoto YS, Hagiwara M, Nakanishi J, Ito M, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. Novel application for pseudopodia proteomics using excimer laser ablation and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Lab Invest*. 2012 92(9):1374-85.
  10. Mimae T, Tsuta K, Maeshima AM, Okada M, Asamura H, Kondo T, Tsuda H. Cathepsin D as a potential prognostic marker for lung adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2012 208(9):534-40.
  11. Mimae T, Tsuta K, Kondo T, Nitta H, Grogan TM, Okada M, Asamura H, Tsuda H. Protein expression and gene copy number changes of receptor tyrosine kinase in thymomas and thymic carcinomas. *Ann Oncol*. 2012 23(12):3129-37.
  12. Suehara Y, Kubota D, Kikuta K, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Discovery of biomarkers for osteosarcoma by proteomics approaches. *Sarcoma*. 2012;2012:425636.
  13. Kondo T, Kubota D, Kawai A. Application of proteomics to soft tissue sarcomas. *Int J Proteomics*. 2012;2012:876401.
  14. Kubota D, Okubo T, Saito T, Suehara Y, Yoshida A, Kikuta K, Tsuda H, Katai H, Shimada Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Validation study on piflutin and ATP-dependent RNA helicase DDX39 as prognostic biomarkers in gastrointestinal stromal tumour. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 42(8):730-41.
  15. Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J. Decreased selenium-binding protein 1 enhances glutathione peroxidase 1 activity and downregulates HIF-1 $\alpha$  to promote hepatocellular carcinoma invasiveness. *Clin Cancer Res*. 2012 18(11):3042-53.
- ## 2. 学会発表
1. Fujii K, Suzuki N, Kaji T, Hamada T, Masashi I, Kondo T, Iwatsuki K. "HSP 70 kDa protein 1A inhibits histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis



- through mitochondrial pathway". 2nd World Congress of Cutaneous Lymphomas, 2013 2/6 ~ 2/9; Berlin, German. 講演
2. Hosoya N, Bilim V, Tomita Y, Kondo T. "Nuclear N-myc downstream-regulated gene 1 protein as a prognostic tissue biomarker in renal cell carcinoma". 26th Proteomics Forum 2013, 2013 3/17 ~ 3/21; Berlin, German. ポスター
  3. Kikuta K, Kondo T. "Proteomic study to identify novel mechanisms of tumor cell invasions in Myxofibrosarcoma". 26th Proteomics Forum 2013, 2013 3/17 ~ 3/21; Berlin, German. ポスター
  4. Kondo T. "Proteomics and immunohistochemistry validation established p16 as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor". 26th Proteomics Forum 2013, 2013 3/17 ~ 3/21; Berlin, German. 招待講演
  5. Kondo T, Kubota D, Kawai A. "Cancer proteomics for biomarker development for personalized medicine; lessons from biomarker study in gastrointestinal stromal tumor". 6th Central and Eastern European Proteomic Conference, 2012 10/14 ~ 10/17; Budapest, Hungary. 招待講演
  6. Mukaihara K, Kubota D, Tajima T, Suehara Y, Sugihara Y, Kawai A, Kaneko K, Kondo T. "Proteomic analysis revealed novel biomarker candidates for personalized medicine in epithelioid sarcoma". 6th Central and Eastern European Proteomic Conference, 2012 10/14 ~ 10/17; Budapest, Hungary. ポスター
  7. Sugihara Y, Mukaihara K, Kondo T. "Proteomic approach toward biomarker development for differential diagnosis in malignant pleural mesothelioma". 6th Central and Eastern European Proteomic Conference, 2012 10/14 ~ 10/17; Budapest, Hungary. ポスター
  8. Kimura K, Ojima H, Kondo T. "Proteomic approach towards biomarker discovery for early intra-hepatic recurrence in hepatocellular carcinoma". 6th The European Proteomics Association/ British Society for Proteome Research Meeting, 2012 7/9 ~ 7/12; Glasgow, Scotland. ポスター
  9. Sugihara Y, Taniguchi H, Kondo T. "Proteomic approach to heterogeneity of proteome contents in tumor tissues using laser microdissection and 2D-DIGE identified metastasis-associated proteins in colorectal cancer". 6th The European Proteomics Association/ British Society for Proteome Research Meeting, 2012 7/9 ~ 7/12; Glasgow, Scotland. ポスター
  10. Kubota D, Kikuta K, Suehara Y, Gotoh M, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. "Proteomics revealed novel prognostic utility of KCTD12 in gastrointestinal stromal tumor". 9th Siena Meeting FROM GENOME TO PROTEOME: OPEN INNOVATIONS, 2012 8/26 ~ 8/30; Siena, Italy. 講演
  11. Sugihara Y, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo

- T. "Proteomic study revealed APC-binding protein EB1 has malignant potentials of colorectal cancer". 9th Siena Meeting FROM GENOME TO PROTEOME: OPEN INNOVATIONS, 2012 8/26 ~ 8/30; Siena, Italy. ポスター
12. Fujiwara T, Kosaka N, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takahashi R, Takeshita F, Yoshida A, Kubota D, Kondo T, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. "RNA-i therapeutics as a novel strategy against tumor-Initiating cells of osteosarcoma; microRNA Inhibition in combination with standard chemotherapy". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. 講演
13. Ichikawa H, Kubota D, Suehara Y, Kanda T, Kikuta K, Tajima T, Mukaihara K, Sugihara Y, Kawai A, Kondo T. "Integration of proteomic and transcriptomic analysis reveals the distinctive molecular backgrounds for gastrointestinal stromal tumor of the small intestine". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. ポスター
14. Kikuta K, Kubota D, Suzuki Y, Morioka H, Toyama Y, Nakatani F, Kawai A, Chuuman H, Kondo T. "Proteomic study on myxofibrosarcoma to develop invasion and recurrence related biomarkers". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. ポスター
15. Kondo T, Kubota D, Ichikawa H, Tajima T, Mukaihara K, Sugihara Y, Suehara Y, Kikuta K, Kawai A. "Proteomic approach revealed novel prognostic biomarkers in gastrointestinal stromal tumor (GIST)". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. 講演
16. Kubota D, Fujiwara T, Mukaihara K, Suehara Y, Kikuta K, Tajima T, Ichikawa H, Sugihara Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. "Chemo-responsiveness predictive bio-marker discovery for osteosarcoma using microRNA-microarray". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. ポスター
17. Mukaihara K, Kubota D, Suehara Y, Kikuta K, Tajima T, Ichikawa H, Sugihara Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. "Proteomic analysis identified lung metastasis-related proteins in osteosarcoma". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. ポスター
18. Sugihara Y, Kubota D, Suehara Y, Tajima T, Mukaihara K, Kikuta K, Ichikawa H, Kawai A, Kondo T. "Protein expression profiling of pleural effusion in malignant pleural mesothelioma". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. Publication Only

19. Tajima T, Kubota D, Mukaihara K, Kikuta K, Ichikawa H, Sugihara Y, Yoshida A, Mochizuki K, Kawai A, Kondo T. "Proteomic approach to prognostic biomarker discovery in myxoid liposarcoma". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. ポスター
20. Ichikawa H, Kanda T, Taniguchi H, Katsuyoshi H, Kondo T. "Proteomic discovery of biomarkers for the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer; application of 2D-DIGE using surgical samples". Asia Oceania Human Proteome Organization 6th Congress, 2012 5/5 ~ 5/7; Beijing, China. ポスター
21. Kondo T. "Cancer biomarker by proteomics". Asia Oceania Human Proteome Organization 6th Congress, 2012 5/5 ~ 5/7; Beijing, China. 教育講演
22. Kondo T, Huang C, Sekizaki H, Ichikawa H, Sugihara Y, Kubota D, Murakami Y, Fan J. "Proteomics for biomarker development to personalized medicine". Asia Oceania Human Proteome Organization 6th Congress, 2012 5/5 ~ 5/7; Beijing, China. 招待講演
23. Sugihara Y, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T. "Proteomic study identified APC-binding protein EB1 as a novel biomarker for malignant potentials of colorectal cancer". Asia Oceania Human Proteome Organization 6th Congress, 2012 5/5 ~ 5/7; Beijing, China. ポスター
24. Fujii K, Suzuki N, Kaji T, Hamada T, Idogawa M, Kondo T, Iwatsuki K. "HSP 70 kDa protein 1A inhibits histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis". The European Organisation for Research and Treatment of Cancer Cutaneous Lymphoma Task Force 2012, 2012 9/7 ~ 9/9; Austria, Vienna. ポスター
25. Ichikawa H, Kanda T, Taniguchi H, Hatakeyama K, Sasaki H, Kondo T. "Proteomic discovery of biomarkers for the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer; application of 2D-DIGE using surgical samples". Human Proteome Organisation, 11th Annual World Congress, 2012 9/9 ~ 9/13; Boston, US. ポスター
26. Kondo T, Kubota D, Ichikawa H, Sugihara Y, Sekizaki Y, Murakami Y, Huang C, Fan J, Kawai A. "Proteomic approach for biomarker discovery towards personalized medicine". Human Proteome Organisation, 11th Annual World Congress, 2012 9/9 ~ 9/13; Boston, USA. 講演
27. Kubota D, Suehara Y, Tajima T, Sugihara Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. "Proteomic analysis identified lung metastasis-related proteins in osteosarcoma". Human Proteome Organisation, 11th Annual World Congress, 2012 9/9 ~ 9/13; Boston, US. ポスター
28. 近藤 格. "プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第18回新潟プロテオミクス・フォーラム, 2013 1/25; 新潟. 招待講演

29. 近藤 格. "がんの個別化医療に対するプロテオーム解析". 市民公開講演会, 2012 2/25; 東京. 講演
30. 近藤 格. "レーザーマイクロダイセクション法を用いた疾患プロテオーム研究". 第 2 回レーザーマイクロダイセクション研究会, 2012 6/26; 東京. オーガナイザー講演
31. 近藤 格. "疾患プロテオミクス 基礎と臨床応用". 第 19 回日本遺伝子診療学会大会, 2012 7/26 ~ 7/28; 千葉. 教育シンポジウム
32. 近藤 格. "プロテオーム解析を用いた個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 26 回 Research in Oncology Seminar, 2012 12/18; 岩手. 招待講演
33. 窪田 大介, 末原 義之, 金子 和夫, 川井 章, 近藤 格. "microRNA マイクロアレイを用いた骨肉腫化学療法奏効性予測バイオマーカーの開発". 第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2012 7/14 ~ 7/15; 東京. ポスター
34. 菊田 一貴, 窪田 大介, 斎藤 剛, 折田 創, 吉田 朗彦, 津田 均, 末原 義之, 片井 均, 島田 安博, 戸山 芳昭, 佐藤 公一, 八尾 隆史, 金子 和夫, 別府 保男, 村上 康文, 川井 章, 近藤 格. "蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により同定した消化管間質腫瘍 GIST 予後予測マーカー - DDX39-". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. ポスター
35. 近藤 格. "電気泳動法を用いた個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. 会長講演
36. 窪田 大介. "プロテオーム解析を用いた骨軟部腫瘍の個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. 講演
37. 市川 寛, 神田 達夫, 谷口 浩和, 畠山 勝義, 佐々木 博己, 近藤 格. "GeLC-MS/MS を用いた胃がん転移に関わるタンパク質の同定". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. ポスター
38. 新井 一也, 坂本 るり子, 伊藤 学, 窪田 大介, 近藤 格. "細胞の空間的な配置の違いがもたらす薬剤応答性の違いの背景となる 分子機構の解明を目指したプロテオーム解析". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. ポスター
39. 杉原 豊, 谷口 浩和, 市川 寛, 窪田 大介, 藤田 伸, 近藤 格. "蛍光二次元電気泳動法 (2D-DIGE) による大腸がんの発生・進展関わるタンパク質 APC-binding protein EB1 の同定". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. ポスター
40. 田島 崇, 窪田 大介, 吉田 朗彦, 川井 章, 望月 一男, 近藤 格. "粘液型脂肪肉腫の治療方針決定に有用なバイオマーカーの探索". 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. ポスター
41. 米森 啓貴, 村上 康文, 近藤 格. "レーザーマイクロダイセクション (LMD) と大型蛍光二次元電気泳動を用いた大腸がんのプロテオーム解析". 第 63 回

- 日本電気泳動学会総会, 2012 8/20 ~ 8/21; 沖縄. ポスター
42. Ichikawa H, Kanda T, Taniguchi H, Hatakeyama K, Sasaki H, Kondo T. "Protein expression profile associated with lymph node metastasis in gastric cancer". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
43. Kikuta K, Kubota D, Suzuki Y, Morioka H, Toyama Y, Nakatani F, Kawai A, Chuuman H, Kondo T. "Proteomic study on myxofibrosarcoma. 粘液線維肉腫のプロテオーム解析". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
44. Sugihara Y, Taniguchi H, Fujita S, Kondo T. "プロテオーム解析によるがん微小環境の違いに対応するタンパク質の同定. Proteomic approach towards further understanding of tumor microenvironment". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
45. Thirion M, Sugihara Y, Kosaka N, Kondo T, Ochiya T. "New potential biomarkers for the human breast cancer". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
46. 窪田 大介, 末原 義之, 金子 和夫, 川井 章, 近藤 格. "Chemo-response predictive biomarker discovery for osteosarcoma using microRNA-microarray". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
47. 細谷 法之, ビリーム ウラジミル, 富田 善彦, 近藤 格. "プロテオーム解析を用いた腎細胞癌組織予後予測マーカーの同定". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
48. 川井 章, 窪田 大介, 藤原 智洋, 菊田 一貴, 末原 義之, 小倉 浩一, 薛 宇孝, 浅野 尚文, 小林 英介, 中谷 文彦, 中馬 一広, 落合 孝広, 近藤 格. "プロテオミクスを用いた骨軟部肉腫の分子標的探索". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
49. 長谷川 匡, 浅沼 広子, 萩野 次郎, 近藤 格. "GIST のバイオマーカー pferin/KCTD12 の臨床応用と病理診断上の有用性". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
50. 藤井 一恭, 井戸川 雅史, 近藤 格, 岩月 啓氏. "Comparative proteomic analysis identified HSPA1A as a candidate target for enhancing apoptosis induced by HDAC inhibitor. HSPA1A は HDAC 阻害剤の感受性を阻害する". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. 講演
51. 藤原 智洋, 小坂 展慶, 高橋 陸宇, 吉岡 祐亮, 萩原 啓太郎, 竹下 文隆, 窪田 大介, 近藤 格, 川井 章, 尾崎 敏文, 落合 孝広. "micro RNA 機能阻害によるがん幹細胞制御を目的とした骨肉腫に対する新規治療戦略". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
52. 芳賀 絢子, 小川原 陽子, 大津 正也, 窪田 大介, 市川 寛, 細谷 法之, 杉原 豊, 川井 章, 村上 康文, 北林 一生, 近藤 格. "ユースイング肉腫の治療標的の同定を目的とした nucleophosmin

- (NPM) および NPM 結合タンパク質の機能解析". 第 71 回日本癌学会総会, 2012 9/19 ~ 9/21; 札幌. ポスター
53. 菊田 一貴, 窪田 大介, 吉田 朗彦, 鈴木 禎寿, 森岡 秀夫, 戸山 芳昭, 中谷 文彦, 別府 保男, 中馬 広一, 川井 章, 近藤 格. "粘液線維肉腫の浸潤再発に関わるバイオマーカー開発を目指したプロテオーム解析". 第 85 回日本整形外科学会学術集会, 2012 5/17 ~ 5/20; 京都. ポスター
54. 朝沼 広子, 荻野 次郎, 近藤 格, 長谷川 匡. "GIST における予後診断マーカー、Pftin の発現 EUS-FNA への応用". 第 101 回日本病理学会総会, 2012 4/26 ~ 4/28; 東京. ポスター
55. 長谷川 匡, 市川 仁, 山田 哲司, 近藤 格. "オミックス研究と病理学 軟部腫瘍のプロテオーム解析 病理診断への応用". 第 101 回日本病理学会総会, 2012 4/26 ~ 4/28; 東京. シンポジウム
56. 近藤 格. "プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー開発". 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 2012 7/26 ~ 7/27; 東京. シンポジウム
57. 市川 寛, 神田 達夫, 谷口 浩和, 畠山 勝義, 佐々木 博己, 近藤 格. "蛍光二次元電気泳動法を用いた胃癌におけるリンパ節転移診断に有用なタンパク質の探索". 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 2012 7/26 ~ 7/27; 東京. ポスター
58. Sugihara Y, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T. "Proteomic study revealed APC-binding

protein EB1 has malignant potentials of colorectal cancer". 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 2012 7/26 ~ 7/27; 東京. ポスター

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許出願

- 1) 発明の名称: 「分析方法」
- ①発明者: 木下英樹、鶴沼豊、近藤格、
- ②出願日: 2013 年 3 月 29 日
- ③出願番号: 特願 2013-7153
- ④出願人: 国立がん研究センター、シャープ株式会社
- ⑤発明の内容の概略: タンパク質サンプルを電気泳動法で分離し、分離媒体に用いたゲルを多数のゲル片に切り取ってペプチド回収に使用するという工程を全自動で行うことができる装置・手法を発明した。

### 2. 実用新案登録

特記事項なし

### 3. その他

杉原豊、優秀ポスター賞、第 6 回中央・東ヨーロッパプロテオーム学会、ブダペスト・ハンガリー「Proteomic approach toward biomarker development for differential diagnosis in malignant pleural mesothelioma」

窪田大介、優秀ポスター賞、第 4 5 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、東京・日本「microRNA マイクロアレイを用いた骨肉腫化学療法奏効性予測バイオマーカーの開発」

市川寛、優秀ポスター賞、第6回アジア・オセアニアプロテオーム学会、北京・中国  
「 Proteomic study identified APC-binding protein EB1 as a novel biomarker for malignant potentials of colorectal cancer」

市川寛、若手トラベル賞、第6回アジア・オセアニアプロテオーム学会、北京・中国  
「Proteomic discovery of biomarkers for the diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer; application of 2D-DIGE using surgical samples」

杉原豊、トラベル賞、日本プロテオーム学会、  
「 Proteomic study identified APC-binding protein EB1 as a novel biomarker for malignant potentials of colorectal cancer」

## 厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

### 「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

氏名	所属	職名
分担研究者 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

生体内において、ほとんどのタンパク質は多種多様な翻訳後修飾を受けることでその機能を制御されている。特にタンパク質のリン酸化は増殖シグナルなどの細胞内シグナル伝達において決定的な役割を担う可逆的な翻訳後修飾であり、細胞の状況に応じてダイナミックに変化することが知られている。近年、細胞内シグナル伝達において様々な経路が相互作用することによって生じるシグナルの波形パターンが最終的なアウトプットを生み出す可能性が示唆されている。したがって、シグナル伝達機構の本質を理解するためには、その波形パターンに内包される情報のデコードが重要な課題となっている。シグナル伝達を最も定量的に計測する手段として、細胞内リン酸化を網羅的に多点で定量することが極めて重要である。このような観点から、われわれはリン酸化を正確かつ大規模に定量できる手法の開発を行ってきた。本年度は、前年度開発した Phospho-mTRAQ 法を補完する方法論としてノンターゲット定量アプローチである SWATH 法を利用した Phospho-SWATH 法の構築を行い、リン酸化ペプチドを大規模かつ多点での定量に成功した。

#### A. 研究目的

これまでに mTRAQ 法を利用したリン酸化ペプチドの内部標準化、3 連 4 重極型質量分析計による MRM 解析を高感度に行うための最適パラメータの予測アルゴリズムの開発、さらには HPLC 保持時間の相対位置情報化などの要素技術開発を行い、大規模にリン酸化 MRM 解析を実行可能なプラットフォームの構築に成功した。昨年度は、これまで開発してきた要素

技術をつなぐ情報処理技術の開発を行い、完全に実用可能 Phospho-MRM 法のための解析プラットフォームの構築を行った。Phospho-mTRAQ 法は非常に高感度であり、mTRAQ 標識を施した内部標準を利用しているため、その定量精度は極めて高いという特徴を有する。その反面、MRM メソッド構築における手間と、一度に分析できる成分数に限界があるため、全体を網羅的に計測することが困難であっ



た。本年度は Phospho-mTRAQ 法のこれらの欠点を補完する技術として Phospho-SWATH 法を確立し、より網羅的に多検体に対してリン酸化情報を定量計測するシステムの構築を目指す。

## B. 研究方法

SWATH 法は 25 unit 単位で Q1 ウィンドウをスイッチさせることで全成分の MS/MS スペクトルを全質量領域に渡って取得する手法であり、得られたデータには理論的に全てのイオンの MS/MS シグナルのクロマトグラムが含まれている。SWATH 法においては得られるデータから各成分（ここではリン酸化ペプチド）のクロマトグラムを抽出する必要がある。そこで、大量に精製したリン酸化ペプチド（同定効率を上げるために適宜分画を施す）を対象に SWATH 法による測定と同条件で LC-MS/MS（データ依存分析）を行い、SWATH データを解析するためのリン酸化ペプチドライブラリー構築を行う。次に、各種パラメーターを最適化することでリン酸化ペプチドの大規模定量に利用できるよう改善し、実際にリン酸化ペプチドの定量情報が取得できるか検証する。

（倫理面への配慮）

本研究においてはヒトサンプルを扱っておらず、特に倫理面に関する問題点はない。

## C. 研究結果

### 1) リン酸化ペプチドの高効率大規模同定

われわれはこれまでに金属イオンキレートクロマトグラフィー(IMAC)を用いてリン酸化ペプチドを高純度で精製できる方法を確立している。本方法をより効率的に行うためにゲル濾過や分取型 SDS-PAGE (Gelfree 法)を用いてタンパク質レベルでの事前分画を行い、各分画を酵素消化後、リン酸化ペプチドを精製した。得られたリン酸化ペプチドに対して SWATH 法での測定と同様のグラジエント条件（1 測定 120 min）でデータ依存分析を行った。また、各試料には既に開発している保持時間マーカーをスパイクすることで保持時間情報を元にしたピーク検出の精度向上を図った。得られたデータは MASCOT および ProteinPilot によるデータベース検索によってリン酸化ペプチドの配列を同定した。同定されたリン酸化ペプチドの情報は新たに作成した Phospho-SWATH 用事前情報データベースに格納した。

### 2) Phospho-SWATH 法の実施

定量計測に用いるサンプルは少量のタンパク質量であることが本方法のメリットである。そこで 200  $\mu\text{g}$  相当の前細胞抽出液をメタノールクロロフォルム沈殿後、酵素消化し、得られた消化物を 100  $\mu\text{l}$  の IMAC ビーズを充填したチップカラムに導入し精製を行った。本チップカラムは C18 メンブランをフリットとして使用している

ため、精製後、脱塩処理までを単一カラムで実施できるため微量検体の処理に向いている。得られたリン酸化ペプチドを SWATH 法によるデータ取得を行った。SWATH 法はグラジエント条件や SWATH の測定パラメーターを詳細に検討しより、効率よくリン酸化ペプチドの定量に適した条件を設定した。

リン酸化ペプチドデータベースから、任意のタンパク質のリン酸化ペプチドの情報をダウンロードして、PeakView (ABSciex の SWATH 解析用ソフトウェア)に読み込ませることで SWATH データから目的リン酸化ペプチドの抽出クロマトグラムを得ることができた。検証実験として HeLa 細胞への EGF 刺激後のリン酸化の変化を追跡したところ、EGF 受容体や MAP キナーゼのリン酸化の経時変化を正確に捉えることに成功した。

#### D. 考察

本年度は phospho-MRM 法の欠点を補完する手法として新たに phospho-SWATH 法を構築した。Phospho-SWATH 法は現時点では内部標準を使用していないため、絶対定量は出来ていないが、MRM 測定メソッドを作成することなく簡便に定量情報の取得が可能であることが大きな利点である。また、リン酸化ペプチドの同定作業は事前に一度だけ大規模に行えば良く、量を得ることが困難な試料（臨床検体）に関してはモデル細胞（培養細胞）を用いて事前情報を取

得しておけば、実際の検体に関しては少量で定量実施が可能となり、今後のバイオマーカー探索などへの応用に向けて大きなメリットがある。

現時点では得られた SWATH データとリン酸化データベースに格納されたデータのヒモ付には質量分析メーカ提供のソフトウェアを利用して、リン酸化ペプチド解析に特有の問題が多数生じており、実用面では未だ不完全である。今後、Phospho-SWATH をより実用化するためのソフトウェアの独自開発が必須であると思われる。

#### E. 結論

新規リン酸化定量プロテオーム解析法である Phospho-SWATH 法を開発した。さらに、実際に Phospho-SWATH 法を用いて、EGF 刺激に伴う大規模なリン酸化の定量情報取得に成功した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S.W., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Lo, K.W. Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene* **31**, 1975-1987 (2012).

2. Yumimoto, K., Matsumoto, M.,

- Oyamada, K., Moroishi, T., Nakayama, K.I. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis. *J. Proteome Res.* (2012).
3. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa, A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Liu, N., Niida, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Yamamoto, T., Kitagawa, M. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One* **7**, e36249 (2012).
  4. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H., Kitagawa, M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBO J.* **31**, 2365-2377 (2012).
  5. Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y., Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K., 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* **149**, 1098-1111 (2012).
  6. Fukushima, H., Matsumoto, A., Inuzuka, H., Zhai, B., Lau, A.W., Wan, L., Gao, D., Shaik, S., Yuan, M., Gygi, S.P., Jimi, E., Asara, J.M., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Wei, W. SCF(Fbw7) modulates the NFkappaB signaling pathway by targeting NFkappaB2 for ubiquitination and destruction. *Cell Rep.* **1**, 434-443 (2012).
  7. Ellman, M.B., Kim, J.S., An, H.S., Kroin, J.S., Li, X., Chen, D., Yan, D., Buechter, D.D., Nakayama, K., Liu, B., Morgan, S., Im, H.J. The pathophysiologic role of the protein kinase Cdelta pathway in the intervertebral discs of rabbits and mice: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Arthritis Rheum.* **64**, 1950-1959 (2012).
  8. Grim, J.E., Knoblaugh, S.E., Guthrie, K.A., Hagar, A., Swanger, J., Hespelt, J., Delrow, J.J., Small, T., Grady, W.M., Nakayama, K.I., Clurman, B.E. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2160-2167 (2012).
  9. 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* (2012).
  10. Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Tanaka, F., Sato, T., Toh, H., Sudo, T., Iwaya, T., Tanaka, Y., Onoyama, I., Kuwano, H., Nakayama, K.I., Mori, M. Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous

- cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **41**, 253-259 (2012).
11. Kita, Y., Nishiyama, M., Nakayama, K.I. Identification of CHD7(S) as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7(L). *Genes Cells* **17**, 536-547 (2012).
  12. Hoshi, H., Hao, W., Fujita, Y., Funayama, A., Miyauchi, Y., Hashimoto, K., Miyamoto, K., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, H., Yoshida, S., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T., Sano, M., Fukuda, K., Ohsawa, I., Ohta, S., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Toyama, Y., Miyamoto, T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2015-2023 (2012).
  13. Okita, Y., Matsumoto, A., Yumimoto, K., Isoshita, R., Nakayama, K.I. Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation. *Genes Cells* **17**, 768-777 (2012).
  14. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K., Nakayama, K.I. Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 285-292 (2012).
  15. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Koderu, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K., Tomonaga, T. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-5322 (2012).
  16. Cremasco, V., Decker, C.E., Stumpo, D., Blackshear, P.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Lupu, T.S., Graham, D.B., Novack, D.V., Faccio, R. Protein kinase C-delta deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2452-2463 (2012).
  17. Saita, S., Shirane, M., Nakayama, K.I. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.* **4**, 1410 (2013).
  18. Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K.I., Fukada, Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106-1118 (2013).
  19. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A., Nakayama, K.I. Ablation of fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* **23**,