

201207005A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 25 (2013) 年5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
疾患関連創薬バイオマーカー探索研究 -----	1
山西 弘一	
II. 分担研究報告	
1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模な バイオマーカーの探索と検証 -----	50
朝長 毅	
2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究 -----	75
角田 慎一	
3. プロテオミクス手法による悪性黒色腫治療標的分子探索 -----	86
仲 哲治	
4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質 解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用 -----	101
中山 敬一	
5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用 -----	109
平野 久	
6. 2DICAL 法による微量タンパク質解析技術の研究 -----	117
尾野 雅哉	
7. 循環器疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究 -----	122
寒川 賢治、南野 直人	
8. 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 -----	127
高坂 新一	
9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来 DNA の研究 -----	135
加藤 菊也, 宮本泰豪	
10. 血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究： 血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用 -----	139
野村 文夫	
11. 脳神経系腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究： 統合プロテオミクスによる悪性グリオーマ幹細胞分化ニッチの 治療標的分子群の解析 -----	150
荒木 令江	
12. 難治性がん早期診断技術の開発と治療標的分子候補 バイオマーカーの探索研究 -----	162
中村 和行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	172
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	189

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

研究代表者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 研究所長

研究要旨

疾患関連バイオマーカーの発見には疾患の根本的な原因であるタンパク質の異常を見つけることが必須であり、ヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス研究が重要である。本研究では、癌、生活習慣病、神経疾患等を対象とした疾患バイオマーカーの開発を目的とする。本年度は、ヒト疾患試料を用いて以下の研究を実施したので報告する。

1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と検証：朝長 毅

昨年度まで、ヒト臨床検体を用いた大規模なバイオマーカー探索を行い、大腸癌膜タンパク質数百個のバイオマーカー候補タンパク質の同定に成功した。本年度は、それらのバイオマーカー候補タンパク質のうち約 100 個のタンパク質について、SRM/MRM 法を用いた大規模検証を行い、78 個のタンパク質が大腸癌の進行に伴って変化することを確認した。また、それらのタンパク質を診断マーカーとして臨床応用するために、血中のエクソソーム中での検出を試みたところ、約 30 個のタンパク質が検出でき、約 20 個のタンパク質は健常人に比べて癌患者で変化していた。これらは有望な大腸癌診断マーカーになり得る。また、同様の SRM/MRM 法を用いて、血漿中アルツハイマー病サロゲートバイオマーカーペプチド APL1 β の定量に成功し、血漿中で数 pg/ml という超微量の濃度で存在することを明らかにした。

また、大腸癌新規創薬ターゲット分子 FAM83H の機能解析を行い、FAM83H が CK-1 α を介してケラチン細胞骨格形成を制御し、大腸癌細胞の増殖・浸潤を促進することを見出した。これらのタンパク質の相互作用阻害剤は新しい大腸癌治療薬になる可能性があると考えられた。

2. 疾患関連蛋白質の解析基盤の研究：角田慎一

我々はこれまでに、がん関連蛋白質の同定と絞り込みに有用な「抗体プロテオミクス技術」を独自に開発してきた。本技術を乳がんに応用することで見出した乳がん関連膜蛋白質 Eph receptor A10(EphA10)は、抗体医薬を始めとする分子標的治療薬に有望なターゲットと考えられ、機能的に不明な点が多い。そこで本年度は、EphA10 の各種乳がん組織・正常組織での発現分布を解析することで創薬ターゲットとしての有用性を評価した。

まず、各乳がん症例の臨床情報と EphA10 の発現プロファイルの相関を解析したところ、EphA10 は、リンパ節転移陰性症例に比較して、陽性症例で発現率・発現量ともに有意に高いことが明らかとなった。また、EphA10 高発現症例は、ステージの進行にともなって有意に増加しており、EphA10 が乳がんの悪性形質に関わる蛋白質である可能性が示された。さらに、EphA10 と、乳がんに対する既存の分子標的治療薬のターゲットである Her2、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体との発現プロファイルも解析した結果、EphA10 は、これら 3 種の受容体がいずれも陰性のトリプルネガティブ乳がん症例にも発現しており、有効な治療薬に乏しいトリプルネガティブ乳がんに対する新たな治療薬のターゲットになりうることが示された。一方で、正常組織では、精巣以外で発現は認められず、がん組織特異性の高い有用な標的であることが示唆された。

3. プロテオミクス手法による悪性黒色腫治療標的分子探索：仲 哲治

悪性黒色腫は非常に転移しやすい性質を持つことと、化学療法も効果が低いため、皮膚癌の死亡率の80%を占めており、非常に予後不良な腫瘍である。また、進行期の悪性黒色腫に対する有効な治療法が確立されていないため、新規治療法を早急に開発する必要がある。

本研究では悪性黒色腫の手術組織を用いて定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)により正常皮膚組織と比較して悪性黒色腫にて高発現するタンパク質を探索した。その結果、悪性黒色腫にて高発現する分子の1つとして Periostin を同定した。Periostin は正常皮膚では発現が非常に弱いのに対し、悪性黒色腫で高発現を示した。免疫組織化学染色法による解析の結果、Periostin は腫瘍組織でなく、間質に発現が局在していた。さらに、Periostin の発現細胞を同定するため、悪性黒色腫細胞と線維芽細胞の共培養を行い、その後悪性黒色腫細胞と線維芽細胞を単離後、Periostin の発現を RT-PCR にて解析した結果、共培養後の線維芽細胞から Periostin が産生されていることが明らかとなった。Periostin は integrin $\alpha\beta 3$ 、および integrin $\alpha\beta 5$ を受容体とし、p44/42MAPK 経路を介して悪性黒色腫の増殖を促進する作用を持つことを明らかにした。腫瘍の増殖に対する Periostin の役割を明らかにするため、Periostin/Rag2 欠損マウス樹立し、Periostin/Rag2 欠損マウスおよび Rag2 欠損マウスを用いて悪性黒色腫細胞(Mewo)を皮下移植した。その結果、Rag2 欠損マウスと比較して Periostin/Rag2 欠損マウスで腫瘍の増殖が有意に抑制されていることが明らかとなった。腫瘍組織に対して Ki-67 を免疫組織化学染色にて解析した結果、Rag2 欠損マウスと比較して Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて Ki-67 の発現が低く、細胞周期が抑制されていた。

本研究により Periostin が悪性黒色腫の腫瘍増殖と関係している事が明らかになったため、Periostin が悪性黒色腫の創薬標的となり得る事が示唆された。

4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用：中山敬一

バイオマーカーの探索の成功のためには、多数の検体に対して迅速かつ網羅的にタンパク質の定量・同定を行う必要がある。従来型の探索ベースの質量分析を基盤としたプロテオミクスアプローチは現実的には網羅性が低く、定量性に関しても精度が低いという問題を内包していた。われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法である Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法を発展させることで網羅的かつ高精度でタンパク質絶対定量を行うための基盤技術の開発を行ってきた。本年度はこれまで構築してきたプロテオームワイドな MRM 解析プラットフォームを利用して多検体の精密な絶対量計測が可能であることを実証するとともに、よりスループットが高い解析法として SWATH 法による絶対定量法の構築を試みた。MRM および SWATH 法は互いに相補的であり、これらを組み合わせることで極めてパワフルなタンパク質発現絶対定量計測が実現できると考えられる。これはバイオマーカー探索のための新たな技術基盤と成り得ることが期待される。

5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：平野 久

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異的に分泌(放出)されるタンパク質を同定した。これらのタンパク質のうち、TFPI2 について診断バイオマーカーとしての有用性を検証した。その結果、TFPI2 は、卵巣明細胞腺癌の診断マーカーとして優れた特徴を持つことが明らかになった。

6. 2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究：尾野雅哉

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、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、英文論

文として発表した。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、2DICAL による肝細胞癌と非癌部肝組織のリン酸化プロテオーム解析を昨年度より引き続いて行い、肝細胞癌と非癌部肝組織で有意に変動するリン酸化部位を同定した。微量タンパク質のさらなる解析のために、2DICAL のバージョンアップに着手した。

7. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：寒川賢治、南野直人

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するため、マウスの心筋症モデルのプロテオーム解析を実施し、イヌ機械的刺激心不全モデルとの比較を行った。心不全における BNP 研究から推定される糖鎖構造の量的、構造的変化について解析し、これらがバイオマーカーとなる可能性を見出した。また、ETD 法と CID 法を併用してバイオマーカーとして有望な分子量の大きいペプチド解析法をさらに拡充し、細胞培養上清に適用して解析を実施した。

8. 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：高坂新一

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、当初から進めてきた初期量 2ml をさらに減少させることを目的に測定法の改良を試みた。初期髄液タンパク質の濃度が低いほど同定タンパク質数が多い事実から、最適な濃度として 30mg/dl (2ml なのでタンパク量は 0.6mg) を見いだした。また、初期タンパク量が多いと同定タンパク数が少ない事実は、抗体カラム IgY のみでは大量に存在する血漿タンパク質が十分除去できていないことを意味し、その事実をトランスフェリンとアルブミンで確認し、その両者を除去できる GBC スピンカラムを抗体カラムに加えることで、同定タンパク質数を増加させることに成功した。これらの改良法とさらに高感度の ABsciX で測定することで、1,000 近くのタンパク質が自動検出できることを確認した。すでに多数の高品質の髄液検体が集積している統合失調症、双極性障害、大うつ病、パーキンソン病などにおいて、この測定系を応用することで、新たな疾患バイオマーカーや創薬標的が見いだされるものと期待できる。

9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来 DNA の研究：加藤菊也、宮本泰豪

本研究では、癌の詳細な糖鎖構造解析を行うことで新規の癌特異的糖鎖抗原を発見し、それらの糖鎖腫瘍マーカーとしての臨床応用への可能性を検討することを目的とする。大腸癌および膵臓癌の糖脂質の詳細な構造解析を行うことにより、新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (α 2-6 sialylated Type 1H, ST1H)の存在を見出した。この ST1H 抗原はルイス型陰性の大腸癌や膵臓癌にのみ発現が認められ、ルイス型陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。ELISA 法などを用いた臨床応用に向けて、ST1H を認識する単クローン抗体の作成を行い、昨年度までに 11 種類のクローンを得た。これらクローンの性状を検討した結果、ELISA を用いての合成糖脂質の測定にはきわめて高い特異性を有していた。しかし、免疫組織学法、組織の ELISA では陽性反応を得ることができなかった。今後は、今までと異なる方法での抗体作成を試みる必要がある。また、前立腺癌の糖鎖構造解析において、多量の遊離糖鎖が蓄積していることが判明した。詳細な構造を解析した結果、complex-type の N 型遊離糖鎖である NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc が最

も多く存在していた。さらにこれら Neu5Ac 付加された N 型の遊離糖鎖の他に、哺乳類ではその存在比率は極めて低いと考えられている deaminoneuraminic acid (KDN) が付加された N 型の遊離糖鎖が、解析症例 5 症例中 4 症例に蓄積していた。これら KDN 付加された遊離糖鎖のマーカーとしての意義も検討を要する。

血液中腫瘍由来 DNA 研究に関しては、肺癌患者の血漿中 EGFR 変異が次世代シーケンサーによる解析(deep sequencing)で可能かどうか検討した。その結果生検陽性症例の約 60% で検出できた。これは前向き試験での検証を続行できる成績である。

10. 血清・血漿の前処理法に関する微量タンパク質解析技術の研究、血清・血漿を用いたプロテオーム解析の臨床検査応用：野村文夫

原発性肝細胞癌 (HCC) の新しい腫瘍マーカーの探索の一つのアプローチとして肝癌組織で高発現蛋白質に対する血中自己抗体の検出を試みた。予備検討の結果に基づき Ku86 抗体に焦点をあてた。健常人、肝硬変に比して、血清 Ku86 抗体レベルは HCC で有意に上昇していた。Stage I, II の HCV に起因する HCC においてその陽性率は従来のマーカーである AFP, PIVKA-II を上回っていた。ROC 解析においても Ku86 の優位性を確認することができた。今後多数例、HCV 以外の要因による HCC においてさらに検討する必要がある。

歯周疾患はある種の細菌感染が引き金となって発症すると言われているが、病態のメカニズムには不明な点が多く、歯周疾患における特異性の高い疾患マーカーは報告されていない。歯肉溝滲出液 (Gingival Crevicular Fluid: GCF) は、歯周疾患の状態を最もよく反映する体液であると考えられている。本研究では、GCF をプロテオーム解析に用いるのに適した採取方法およびタンパク質抽出法の確立および歯周疾患マーカーの探索を試みた。二次元電気泳動法を用いて GCF および唾液を分離したところ、GCF 中に特異的に発現していると考えられるスポットが複数認められ、酸化ストレスに関与するタンパク質および抗菌ペプチドが含まれていた。また健常人 GCF のショットガン法による網羅的解析を行ったところ、327 のタンパク質が同定された。その中には歯周組織破壊に関与していると思われるタンパク質が含まれていた。これらの結果から、GCF を対象としたプロテオーム解析は歯周疾患バイオマーカー探索に有効である可能性が示唆された。

11. 脳神経系腫瘍に関連する微量タンパク質解析システムの開発、統合プロテオミクスによる悪性グリオーマ幹細胞分化ニッチの治療標的分子群の解析：荒木令江

脳神経系腫瘍の治療標的となりうるバイオマーカーを検索するため、病態組織/細胞を用いた統合プロテオミクスの方法論確立とその検証法を検討した。分子発現差異解析法である iTRAQ (8 Plex) 法、2D-DIGE 法、および DNA array を融合的に用いて同一サンプル群を同時に解析し、得られたすべての情報を統合マイニングすることによって、病態において異常に制御されたシグナル伝達経路を特異的に抽出する方法論 (iPEACH 法) を確立し、同定されたターゲット候補分子群を、脳神経系腫瘍の臨床サンプルおよび培養細胞と動物移植モデルによる検証実験に供した。本年は、特にグリオーマ幹細胞 (GIC) の幹細胞様特性維持と分化に関わる分子群の検索と、これらの悪性腫瘍発生に関わり治療ターゲット分子群の解析に応用した。グリオーマ患者組織より分離した GIC、分化誘導によって変動する分子群の統合プロテオミクスを行い、有意に同定された GIC による分化ニッチ形成と制御に関わる分子群の細胞生物学的検証と、その治療ターゲットとしての可能性を動物実験によって検証した。iPEACH ソフトウェアによって定量可能な全同定データ (8,471 タンパク質、21,857 mRNA) を融合し、GIC の分化誘導における発現変動分子群 (上昇 662 個、減少 326 個) から、GO 解析および network 解析に供した。GIC は、幹細胞マーカー CD133、nestin、Sox2 の発現と、分化誘導時のこれらの減少、及び Astrocyte マーカ

一GFAP、Neuron マーカーTuj1、悪性グリオーママーカーCD44・vimentin、及び活性化EGFR-RAS-MAKP と PI3K-AKT-mTOR 系路の発現を誘導し、神経幹細胞様の性質とグリオーマ細胞への分化能を有すること、さらに、分化に連動して integrin family およびそのリガンドESM タンパク質群の顕著な発現上昇が特徴的であることが判明した。細胞生物学的な検証実験の結果、integrin α V と fibronectin をコアとする分化に関わるニッチ成分が GIC より分泌されており、GIC の増殖と分化誘導に関わっていること、これらの阻害剤が有意に分化を抑制することを見出した。さらに、GIC のマウス頭蓋内移植による悪性グリオーマ発症モデルにおいて、この分化ニッチ阻害剤は抗癌剤の感受性を高め、マウスの生存率を上昇させることが判明した。以上のことから、これらの一連の解析システムによって得られた結果は、がん幹細胞の新規分化調節治療ターゲット候補分子群の検出・同定に有用であることが示唆された。

12. 難治性がん早期診断技術の開発と治療標的分子候補バイオマーカーの探索研究：中村和行

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。探索技術として二次元電気泳動法と質量分析法によるプロテオミクスが注目され、疾患関連バイオマーカー候補の探索結果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難治性がんの早期診断や抗がん剤による治療評価のためのバイオマーカー候補の探索研究を目的に、C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌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を行い、HSP70 蛋白を用いたプロテインチップによる精度の高い自己抗体価測定技術の開発を行い、さらに膵臓がんの抗がん剤による治療評価のためのバイオマーカー候補蛋白として HSP27 の有用性について研究を行った。

研究代表者	南野 直人	国立循環器病研究センター研 究所 部長
山西 弘一	独立行政法人医薬基盤研究所 所長	高坂 新一
研究分担者		国立精神・神経医療研究 センター神経研究所 所長
朝長 毅	独立行政法人医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジ ェクトリーダー	加藤 菊也
角田 慎一	独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェ クトリーダー	野村 文夫
仲 哲治	独立行政法人医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト リーダー	千葉大学医学研究院 教授
中山 敬一	九州大学生体防御医学研究所 教授	荒木 令江
平野 久	横浜市立大学大学院国際総合 科学研究科 教授	熊本大学大学院生命科学研 究部 准教授
尾野 雅哉	国立がん研究センター研究所 ユニット長	中村 和行
寒川 賢治	国立循環器病研究センター研 究所 所長	山口大学大学院医学系研究科 教授

A. 研究目的

医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業の発展に必要不可欠であり、ライフラインと位置付けられる。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際

競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきた。そのためには、タンパク 3000 プロジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との連関を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の質、量の違いを時空間的に評価する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬（プロテオーム創薬）への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約 2 万 2 千種の遺伝子に比して、膨大とも言える 10 万種以上にもものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「iTRAQ 法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模勝つ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ（疾患プロテオミクス）」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の背景のもと、本研究は、我が国の主要疾患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患関連たんぱく質の探索のための技術開発の推進と普及を図るとともに、探索されてきた数多くの疾患関連たんぱく質群の中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなり得るたんぱく質を絞り込み、これらを新規医薬品の創出等に有効活用していくための基盤技術を確立し、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、疾患組織・細胞などの臨床検

体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを旨とする。

B. 研究方法（各研究分担者の研究方法の項参照）

C, D. 研究結果および考察

C, D-1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と検証：朝長 毅

1. 大規模プロテオミクスによる疾患バイオマーカータンパク質の探索と検証

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

(discovery) を行った。iTRAQ 法によって同定・定量されたタンパク質の中から、各群間で有意な発現の差がみられたタンパク質をバイオマーカー候補として絞り込み、次のステップとしてそれらのバイオマーカー候補タンパク質の検証 (verification) を行った。従来は抗体を用いたウエスタンブロットや免疫染色で検証を行っていたが、すべてのタンパク質に対して、特異性の高い抗体が入手でき

るとは限らず、そのために検証ができなかったことがバイオマーカータンパク質の実用化を阻んできた大きな理由の1つである。最近、SRM/MRM法という質量分析計を用いたタンパク質の絶対定量法が確立されたことで、バイオマーカー候補タンパク質の検証が容易に行えるようになった。SRM/MRM法の最大の利点は、どんなタンパク質でも抗体なしで特異的に検出、定量ができるという点である。その結果、これまでよい抗体が入手できないために検証ができなかったバイオマーカー候補タンパク質全てを拾い上げることが可能となった。また、抗体を用いた検証は、通常一度に1つのタンパク質でしかできないが、SRM/MRM法は、一度に数十から百種類のタンパク質の検証を短時間でできることも大きな利点である。我々はこのSRM/MRM法を用いることで、一度に数十～百種類のバイオマーカー候補タンパク質の検証を行っている。この手法で検証できたバイオマーカー候補タンパク質について、最終的にそれらのタンパク質を血中で検出・定量を試みるという戦略を取ることにした。

(1) 膜タンパク質に着目した大腸癌バイオマーカーの探索と検証

良性腫瘍と大腸癌組織（転移なしと転移あり）、それぞれ6検体ずつ合計18検体の大腸癌組織の膜タンパク質画分の

iTRAQ-shotgun プロテオーム解析の結果、5,566個のタンパク質が同定され、その中の1,567個のタンパク質は膜貫通ドメインを持つことが推定された（表1）。また、Gene Ontology解析の結果、5,287個のタンパク質が注釈付けされ、その中の3,087個（58.4%）は膜タンパク質であることが推定された。同定タンパク質の中から、ポリープ、転移のない癌組織、転移のある癌組織の3群間で発現量の変化する（2.0倍または0.5倍以下、p値0.1以下）バイオマーカー候補タンパク質となる399個の膜タンパク質または細胞外タンパク質を見出した。その中で、診断、創薬のターゲットとなりやすい細胞膜タンパク質や

細胞外分泌タンパク質105個に着目し、SRM法を用いた検証をおこなった。SRM測定は、105個の候補タンパク質に特異的な配列を持つ2つのペプチドを測定対象としておこなった。その結果、ポリープと癌の間に発現変化の見られたタンパク質66個、転移ありなし間で発現変化の見られたタンパク質17個について検証ができ、創薬ターゲットとして有望なバイオマーカーと考えられる。また、前者は早期診断、後者は再発や予後予測の有望なバイオマーカーである。

これらのバイオマーカーの診断への応用のためには、なるだけ侵襲なく採取できる血液や尿などの体液中で検出・定量できることが重要である。そこで我々はこれらのバイオマーカー候補タンパク質が血中で検出・定量できるかどうかについて検討した。前述したように、血中でのバイオマーカータンパク質の検出は非常に難しい。なぜならば、血中タンパク質濃度のダイナミックレンジが広く、アルブミン等の量の多いタンパク質が99%を占めているため、それらのタンパク質に邪魔されてバイオマーカー候補となる微量なタンパク質は検出が難しいためである。従って、それらのバイオマーカー候補タンパク質を検出するためには何らかの前処理法が必要である。そこで我々は、血中の微細小胞であるエクソソームに着目した。なぜならば、エクソソームは細胞から分泌される小器官であり、細胞中にあるRNAやタンパク質を含むため、癌細胞中のバイオマーカー候補タンパク質を含んでいる可能性が高いこと、また、エクソソームを分離する際に量の多い血清タンパク質を除くことができるためである。我々は、上述したバイオマーカー候補タンパク質を含む約100個のタンパク質が血中エクソソーム中で検出・定量できるかどうか検討した。その結果、これまで27個のバイオマーカー候補タンパク質がエクソソーム中で検出でき、約20個のタンパク質が大腸癌の進展に伴って変化することを見出した。

今回我々は、SRM/MRM法を用いることに

より 100 個以上のバイオマーカー候補タンパク質を検証することができた。SRM/MRM 法を用いた大腸癌膜タンパク質の大規模検証の報告は世界で初めてである。これまでの検証は主に抗体を用いたウエスタンブロットや免疫染色法で行っていたが、抗体はタンパク質によっては入手できない場合が多く、また入手できたとしても非特異的反応によって目的のタンパク質の検証が出来ないケースが多々ある。それに比して、SRM/MRM 法はペプチドさえ合成できればほとんどのタンパク質を定量することが可能で、しかも感度、特異性に優れていることが大きな利点である。しかも、数十から百個程度のターゲットペプチドを一度の解析で測定ができることから、マルチマーカー解析に最適である。このような同時マルチマーカー解析は抗体を用いた方法では不可能であり、今回の我々の結果により SRM/MRM 法がバイオマーカー探索に大きな威力を発揮することが明らかとなった。

(2) 血漿中アルツハイマー病のサロゲートマーカー候補ペプチド APL1 β 定量

アルツハイマー病は脳内への A β 42 の蓄積が原因と考えられている。従って、アルツハイマー病の診断には A β 42 の蓄積量を検出することが有用と考えられるが、A β 42 は脳細胞から体液中に出てこないため、A β 42 の蓄積量を反映するサロゲートマーカーが必要である。A β 42 は細胞膜に存在する β APP タンパク質が BACE と Presenilin/ γ -secretase と呼ばれるタンパク質切断酵素によって生成されるが、 β APP タンパク質類似タンパク質である APLP1 も同様なメカニズムで切断され、しかもその生成物である APL1 β は細胞外に分泌されることが知られている。大阪大学大河内らはその APL1 β が髄液中で検出できること、また β APP から生成される A β 38、40、42 に対応して APLP1 から APL1 β 25、27、28 が生成されること、さらにアルツハイマー病患者の髄液において APL1 β 28/total APL1 β 比が健常者と比較して高いレベルで存在しており、新規のアルツハイマー病サロ

ゲートマーカーと成り得ることを報告した。しかし、髄液検査は侵襲が高いため健診には不適であり、血液検査などのより侵襲の低い手段が必要とされている。ところが、血中の APL1 β ペプチドは髄液中に千分の一以下の極微量にしか存在しないため、抗体を用いた ELISA 法では検出が困難であることが判明した。そこで我々は、前述の SRM/MRM 法を用いて、ヒト血漿中に存在する APL1 β の検出、定量を試みた。

その結果、まだ定量の再現性に問題があるものの、血漿中の APL1 β の定量に成功した。内部標準ペプチド量をもとに算出したところ、内在性 APL1 β 量は 1 fmol/ml (数 pg/ml) 以下のレベルであった。また、同一患者の髄液中と血漿中の APL1 β 28/total APL1 β 比はよい相関を示すことが確認できた。fmol/ml レベルの血中タンパク質・ペプチドを検出・定量できたという報告はこれまでになく、世界で初めて達成した超高感度定量レベルである。

今後はこの血漿中 APL1 β 量が髄液中の APL1 β 量と相関するかどうかを確認し、さらに血漿中 APL1 β の測定がアルツハイマー病の早期診断に有用かどうかを多検体を用いて検証する必要がある。また、血漿中 APL1 β 量は抗体を用いた ELISA 法では今のところ検出できないため、どうしても質量分析計に頼らざるを得ない。ただし、質量分析計自体は高価でどこの病院にあるわけではなく、操作性が ELISA に比べて煩雑であるので、もっと安価で誰もが簡単に扱えるような検査専用機の開発が必要である。それに関しては、質量分析機器メーカーと共同で開発していかなければならない。

2. 新規大腸癌関連タンパク質 FAM83H の機能解析

FAM83H は歯のエナメル質形成不全症という遺伝病の原因遺伝子として知られているが、我々はこの因子が大腸癌組織において、発現増大していることを見出した。そこで、FAM83H が細胞増殖に関与しているかどうか

か調べるために、FAM83H siRNA 処理した HCT116 大腸癌培養細胞株の細胞数変化を調べた。10000 個の細胞を 12 well dish に撒き、2 日後に FAM83H siRNA もしくは control siRNA を導入した。導入後 24、48、72 時間後の細胞数を計測した結果、コントロールの細胞と比較し、FAM83H ノックダウン細胞では細胞増殖が著しく抑制されることが示された。FAM83H ノックダウン細胞ではアポトーシスマーカーである断片化 PARP と断片化 caspase 3 が Western blot 法で検出されたことから、FAM83H は大腸癌細胞の増殖と生存に必要であることが示唆された。また、細胞の運動機能に関連する FAM83H の機能を調べるために、HCT116 細胞の FAM83H をノックダウンし Wound healing 解析を行った。HCT116 に FAM83H siRNA もしくは control siRNA を導入し、その 24 時間後に細胞シートに傷をつけた。その後の細胞シートの動きを顕微鏡でモニタリングした結果、コントロールに比べて FAM83H をノックダウンした場合に細胞シート先端の移動スピードが著しく減少していることが示された。

そのメカニズムを調べるために、プロテオミクスを用いた相互作用解析を行ったところ、FAM83H は複数のケラチンと Casein kinase 1 alpha (CK-1 α) と結合することを見出した。それらのタンパク質が複合体を形成しているかどうか確かめるために、FAM83H、Keratin18、CK-1 α の抗体を用いた免疫染色を行ったところ、それらのタンパク質が共局在していることがわかり、確かに複合体を形成していることが示された。

FAM83H や CK-1 α がケラチンと共局在を示したことから、それらのタンパク質がケラチン細胞骨格を制御することにより大腸癌細胞の浸潤に関わっているのではないかという仮説を立てた。そこで、FAM83H を細胞に過剰発現させたところ、ケラチン繊維の脱重合が認められた。逆に FAM83H をノックダウンするとケラチン繊維の bundling が認め

られた。CK-1 α のノックダウンでも FAM83H と同様にケラチン繊維の bundling が認められた。このことから、FAM83H がケラチン骨格形成を制御することによって、細胞の浸潤に関わっていることが示唆された。

次に FAM83H と CK-1 α の関係を調べるために、FAM83H を過剰発現またはノックダウンして CK-1 α の局在に対する影響を調べた。まず、FAM83H をノックダウンした時の CK-1 α の局在を調べたところ、CK-1 α がケラチン骨格と共局在しないことが認められた。逆に FAM83H を過剰発現すると、上述した脱重合したケラチン繊維上に FAM83H と CK-1 α が共局在することが分かった。

CK-1 α の過剰発現やノックダウンによって FAM83H の局在は変化しないことから、FAM83H が CK-1 α のケラチン繊維への局在を制御することによって細胞骨格形成に関わっていることが示唆された。

このことをさらに確かめるために、FAM83H 過剰発現によるケラチン繊維の脱重合が CK-1 α 依存的であるかどうか調べてみた。

FAM83H を過剰発現すると同時に CK-1 α をノックダウンしたところ、CK-1 α が抑制された状態ではケラチン繊維の脱重合は認められなかった。以上の結果から、FAM83H は CK-1 α の局在制御を介してケラチン細胞骨格形成に関わっていることが強く示唆された。また、大腸癌で見られた FAM83H の過剰発現は、CK-1 α のケラチン繊維への局在を阻害することでケラチン繊維の脱重合を引き起こし、大腸癌細胞の遊走・浸潤に関わっていることが示唆された。我々は、in vivo においてもこの仮説を支持する結果を得ており、

FAM83H が新しい大腸癌治療薬のターゲットとなる可能性を有していると考えている。特に FAM83H と CK-1 α の相互作用阻害剤は、新規大腸癌治療薬の有望なリード化合物となると思われる。さらに、FAM83H の遺伝子変異疾患では歯のエナメル形成不全の他には目立った表現系を示していない。これらの結果は FAM83H の阻害が正常組織に大きな影

響を与えず、癌細胞特異的に作用をもたらす可能性を示唆している。

C, D-2. 疾患関連蛋白質の解析基盤の研究：

角田慎一

1. EphA10 の発現と乳がんの悪性形質との 相関解析

新規乳がん分子標的治療薬の創薬ターゲットとしての有用性を検証すべく、各臨床検体が有する臨床情報と EphA10 の発現との相関を解析することによって、乳がんの悪性形質への関与を検証した。まず、各臨床パラメーターにおける EphA10 mRNA 高発現・低発現症例の割合の相関を解析したところ、年齢・病理組織学的分類・T 因子(原発巣の大きさ)に有意な相関は認められなかった。その一方で、N 因子(リンパ節転移)とステージにおいては、有意に相関することが明らかになった。そこで、これら因子に対する EphA10 の発現をより詳細に解析するため、リンパ節転移陰性・陽性、およびステージ I・II・III に対して、EphA10 mRNA の発現レベルをプロットした。その結果、EphA10 mRNA 高発現症例のほぼ全てで、リンパ節転移が陽性であり、陰性症例に比較して有意な差が認められた。また、ステージについても、ステージ II で高発現患者が 1 症例観察されたものの、EphA10 mRNA の発現が高いほど有意にステージが進行していた。以上の結果は、EphA10 の発現が、乳がんのリンパ節転移促進や、ステージを進行させる分子であることを示唆している。

続いて、機能発現に重要な EphA10 蛋白質との相関を免疫組織染色法にて解析した。その結果、先ほどと同様に、年齢・性別・病理組織学的分類・T 因子では有意な差は認められなかったのに対し、リンパ節転移とステージでは、正の相関が観察された。これまでに、EphA2 や EphB3 といった他の Eph ファミリー受容体が、運動性や浸潤性を亢進させる機能を有し、これら分子を発現したがん細胞が転移を促進させることなどが報告されてい

る。今後、EphA10 のこれら機能に及ぼす影響を詳細に解析する必要があるものの、EphA10 は同様の能力を有し、乳がんの悪性形質に関与している可能性が示された。

2. 乳がんの分子標的治療薬のターゲット蛋白質と EphA10 の発現プロファイル解析

乳がんに対する有効な治療薬としては、タモキシフェンといった抗ホルモン剤や、トラスツズマブなどの抗 Her2 抗体がある。しかし、これらの薬剤は、標的となる Her2 やエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体が発現している症例のみで適用可能であり、陰性患者には使用ができない。そこで、EphA10 の創薬ターゲットとしての有用性を明らかにするため、EphA10 と各標的受容体との発現プロファイルを解析した。その結果、EphA10 は、いずれの遺伝子型においても発現が認められた。特に、Her2、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の全てが陰性のため、いずれの治療薬も適用することができないトリプルネガティブ乳がん症例でも発現が認められ、これら難治性症例に対する新たな分子標的治療薬のターゲットになりうる可能性が示された。

3. EphA10 の各種正常組織での発現分布解析

抗体医薬を始めとする分子標的治療薬は、ターゲットに対する高い特異性と結合力をもとにした細胞傷害・増殖抑制作用により、切れ味鋭い薬効を発揮する。しかし一方で、これは、ターゲットとなる蛋白質が正常組織に高発現していた場合、大きな副作用を発現しかねないことを意味している。そこで、EphA10 を標的とした治療法の安全性を評価する一環として、各種正常組織での発現を解析した。数多くの正常組織が搭載された TMA を免疫組織化学染色したところ、これまでに mRNA レベルでの発現が報告されている精巣で EphA10 の蛋白質の発現も確認された。その一方で、他の組織では発現が認められなかった。以上の結果は、女性患者が大部分を占める乳がんに対する治療薬の標的として有

望であることが示された。

C, D-3. プロテオミクス手法による悪性黒色腫治療標的分子探索：仲 哲治

1. iTRAQ 法による悪性黒色腫における定量的プロテオーム解析

Melanoma *in situ*、及びその正常皮膚組織、invasive melanoma、及びその正常皮膚組織より抽出したタンパク質に対して iTRAQ 標識と質量分析計を用いて、網羅的なタンパク質発現解析を行った。その結果、1,062 個のタンパク質が同定され、1,036 個のタンパク質が定量情報を有していた。正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において 15 倍以上に高発現するタンパク質が 30 個、0.25 倍以下に低発現するタンパク質を 67 個検出した。悪性黒色腫で高発現する事が知られているタンパク質である S100 という分子が、正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において高発現する事が認められた。興味深いことに Periostin というタンパク質が正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において 25.703 倍、正常皮膚組織と比較して melanoma *in situ* で 4.434 と高発現することが確認された。

2. 悪性黒色腫における Periostin の発現解析

Invasive melanoma において iTRAQ 法により検出された Periostin の発現差を確認するため、同じ抽出サンプルを用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、Periostin は invasive melanoma にて高発現し melanoma *in situ* ではわずかに発現が認められたが、正常皮膚組織では発現が認められなかった。続いて、19 例の invasive melanoma 組織における Periostin の発現を免疫組織化学線初期右方にて解析した。その結果、Periostin は 19 例の invasive melanoma すべてにおいて発現が認められた。Periostin の発現は invasive melanoma の間質に局在し、メッシュ状の構造を示していた。これらの結果、iTRAQ 解析により Periostin

が invasive melanoma において高発現することがウェスタンブロット法、免疫組織化学染色法により確認されたことにより、

Periostin がタンパク質レベルで invasive melanoma にて高発現する事が証明された。

3. Periostin は悪性黒色腫細胞でなく皮膚線維芽細胞(NHDFs)より産生される

3 種類の悪性黒色腫細胞株(Mewo, G-361 and VMRC-MELG)より抽出したタンパク質を用いて Periostin の発現をウェスタンブロットで評価した。しかしながら Periostin の発現はこれらの細胞において検出されなかった。Periostin は悪性黒色腫組織にて高発現していることから、Periostin の発現には悪性黒色腫と皮膚線維芽細胞(NHDFs)の相互作用が必要なのではないかと考えた。そこで、NHDFs と Mewo、G-361、あるいは VMRC-MELG を共培養し、RT-PCR 法とウェスタンブロット法により Periostin の発現を解析した。Periostin の発現は共培養したときにおいてのみ検出された。また、共培養の時間依存性に Periostin がタンパク質レベルで培養上清中に検出されることが確認された。Periostin の産生源を調べるため、NHDFs に対して、CFSE で蛍光標識した Mewo を 48 時間共培養し、セルソーターで NHDFs と Mewo に分離した。Periostin の mRNA レベルでの発現を RT-PCR にて解析した結果、Periostin は NHDFs においてのみ発現されていることが明らかとなった。

4. TGFβ1 と TGFβ3 の mRNA 発現は悪性黒色腫細胞と共培養した NHDFs において検出される

NHDFs と悪性黒色腫細胞の共培養は Periostin の発現誘導に効果的であるが、共培養により Periostin の発現がどのように誘導されるか不明である。悪性黒色腫細胞による可溶性因子の影響を調べるため、NHDFs を Mewo 及び G-361 の培養上清で刺激し、Periostin の発現を解析したが、Periostin の発現誘導は認められなかった。NHDFs における Periostin の発現誘導因子を調べるため、

Periostin の発現を誘導することが知られているサイトカインである TGF- β 1, 3, IL-4, and IL-13 の発現解析を行った。NHDFs と悪性黒色腫細胞株との共培養により IL-4 と IL-13 の発現に変化は認められなかったが。一方で、NHDFs と悪性黒色腫細胞株を共培養した際において、TGF- β 1 と TGF- β 3 の mRNA レベルでの発現が共培養後の NHDFs において有意に上昇することが明らかとなった。これらの結果、NHDFs と悪性黒色腫細胞株との共培養は NHDFs からの TGF- β 発現に重要であることが明らかとなった。

5. 悪性黒色腫は Periostin 受容体である integrin α β 3 と integrin α β 5 を発現する

integrin α β 3、integrin α β 5、integrin α 6 β 4 は Periostin の受容体である事が知られているため、悪性黒色腫細胞株におけるこれら分子の発現をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、Mewo と G-361 において、integrin α β 3 と integrin α β 5 の発現が確認された。一方で、integrin α 6 β 4 の発現は悪性黒色腫細胞株において検出されなかった。

6. 遺伝子組み換えヒト Periostin は悪性黒色腫の増殖を促進する

悪性黒色腫における Periostin の機能を解析するため、遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて悪性黒色腫細胞株に対する増殖への影響を解析した。悪性黒色腫の増殖は遺伝子組み換えヒト Periostin を添加することでコントロール群よりも有意な増殖促進作用が認められた。悪性黒色腫に対する遺伝子組み換えヒト Periostin による増殖促進作用は integrin α β 3、及び integrin α β 5 に対する中和抗体の両方の存在下で抑制されたことから、悪性黒色腫において integrin α β 3 と integrin α β 5 が Periostin の受容体として機能している事が確認された。

悪性黒色腫細胞に対して 100 ng/ml の濃度で遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて刺激を行った結果、Akt(Ser473)と p44/42MAPK(Thr202/Tyr204)のリン酸化が

検出された。一方で、悪性黒色腫細胞における遺伝子組み換えヒト Periostin を介した細胞増殖促進作用は LY294002

(phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase 阻害剤)により阻害されなかったが、U0126(MAPK 阻害剤)で抑制された。これらの結果、悪性黒色腫において Periostin は integrin/p44/42 MAPK 経路を介して細胞増殖(名)牙鑿(木)ピラネ示唆された。

7. Periostin 欠損マウスにおいて、悪性黒色腫の増殖は抑制される

In vivo における Periostin による悪性黒色腫の増殖への影響を明らかにするため、免疫不全マウスである Rag2 欠損マウスと Periostin 欠損マウスを交配することで Periostin/Rag2 欠損マウスを樹立した。Periostin/Rag2 欠損マウス、およびコントロールとして Rag2 欠損マウスの皮下に Mewo 細胞を移植し、腫瘍増殖の経過を観察した。その結果、Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて腫瘍の増殖速度が抑制されることが明らかとなった。

免疫組織化学染色法により Ki-67 陽性細胞の数が Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて有意に少なかったことから、細胞周期レベルで増殖が抑制されていることが判明した。また、筋線維芽細胞のマーカーである α SMA の発現についても Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて低下していることが認められた。

C, D-4. ターゲットプロテオミクスを用いた網羅的タンパク質解析技術の開発とバイオマーカー探索への応用：中山敬一

本年度は昨年度迄に作成した PTP データベースに格納されているデータを元にさらに最適化された MRM method ライブラリーを構築し、より高感度に MRM 測定を実施できる体制を整えた。得られた実証済み MRM method を用いて、多数のヒト培養細胞において代謝酵素を中心とした精密なタンパク質絶対定量を実施した。その結果、中心炭素代

謝をはじめとする代謝酵素の発現量は概ね細胞種間で保存されているものの、一部の酵素が特定細胞にのみ発現していることで代謝経路の特性を大きく左右している可能性が示された。また、一部の細胞株に対して実施したより網羅性と感度の高い分析によって代謝酵素の発現量は5桁以上の極めて広範なダイナミックレンジを有することが判明した。

また、MRM法の欠点を補う手法としてSWATH法の導入を検討した。SWATH法においてはSWATH法で得た極めて複雑なMS/MSスペクトルをペプチドにアサインするために、同一クロマトグラフィー条件で取得したIDAモードによるMS/MSライブラリーが必要であり、これが本方法を実際に使用する上で大きな障壁となっている。また、現在のSWATHの仕様では絶対量計測のための内部標準の添加が困難である（詳細は述べないが装置への導入イオン量の制限のため）。そこで、われわれは組み替えタンパク質リソースを用いてIDAおよびリファレンスSWATHデータを取得することを試みた。その結果、組換えタンパク質を利用して取得したIDAデータやSWATHデータを有効に利用することで、SWATHを用いた大規模なタンパク質絶対量が可能であることが示された。また、リン酸化の解析においてもSWATH法は有効であり、細胞刺激後の詳細なリン酸化の経時変化の定量的追跡が可能であることが判明した。

これまでにPTP情報の取得、より高感度な解析のための前処理技術の開発、情報処理インフラの構築などを行い大規模なMRM解析のためプラットフォームが完成した。本年度は主要なタンパク質に関しては全て測定可能であることが実証済みであるMRM methodのライブラリーを構築し、これを用いて多検体における絶対量を実施することが可能となり、代謝経路のパスウェイ構造比較などを実施することができた。また、MRM法の原理的欠点を相補する手法としてSWATH法を導入したが、SWATH法の原法が抱える、

事前情報不足によるピークアサインの問題や絶対定量の問題を、組換えタンパク質を利用することで解決することができた。今後は、SWATH法を用いてより正確な絶対定量のため、組み替えタンパク質を用いて得たSWATHデータを合成ペプチドによる複数の内部標準添加によってノーマライズし、これをライブラリーとして保持することで、同様にノーマライズした実サンプルSWATHデータとのシグナル強度の比からタンパク質絶対量を見積もることを試みる。これまでに、予備的なデータ取得は完了しており、一部のタンパク質に関しては本方法による絶対定量が可能であることが判明しており、大規模なタンパク質絶対量の実現が期待できる。

C, D-5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：平野 久

前年度、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TFPI2を同定した。このTFPI2に対するモノクローナル抗体を作製し、サンドイッチELISA法に基づく自動免疫アッセイ系を構築したところ、明細胞腺癌の培養上清を識別することができた。本アッセイ系を用いて、健常女性（ $n=30$ ）および子宮内膜症患者（ $n=30$ ）、明細胞腺癌患者（ $n=50$ ）の血清中のTFPI2濃度を測定した。健常群および子宮内膜症群に比べて、明細胞群ではTFPI2濃度が有意に高かった（ $P<0.0001$ ）。また、CCA検体における血清中TFPI2の濃度は、年齢、臨床病期に相関は見られなかった。本タンパク質は妊婦胎盤で非常に多く発現することが知られているため、妊婦血清におけるTFPI2濃度を測定したところ、予想に沿って、妊娠月例に伴いTFPI2が増加することがわかった。したがって、構築したELISA測定系が確かにTFPI2を検出していることが確認できた。

ROC曲線の曲線下面積(AUC)を算出した

ところ、健常群を対照とした場合、CA125(AUC 0.80)と比べてTFPI2 (AUC 0.97)の方が高値であり、子宮内膜症群を対象にした場合も、CA125(AUC 0.80)よりもTFPI2 (AUC 0.93)の方が高かった。したがって、TFPI2は従来のCA125よりも明細胞腺癌の診断精度が高い可能性が示された。さらに、本タンパク質は、CA125が正常値(35 U/mL以下)を示す明細胞腺癌検体13例中12例にて陽性(12.3 ng/mL以上)を示した。

上皮性卵巣癌の組織型の中で、卵巣明細胞腺癌は日本での増加傾向が指摘され、他の卵巣癌組織型に比べ予後不良であることから、卵巣明細胞腺癌の診断、治療、予防が重要な課題になっている。明細胞腺癌は、早期症例が半数以上を占めること、子宮内膜症との関連性、化学療法抵抗性などの点において、他の卵巣癌組織型とは性質が異なる。明細胞腺癌は再発率が高く、早期発見された場合でも治療が必ずしも容易でない。代表的卵巣腫瘍マーカーであるCA125は明細胞腺癌では低値の例が多く、明細胞腺癌の検出にCA125は有効でないことが多い。これまで明細胞腺癌由来細胞株の分泌タンパク質をプロテオミクス手法を用いて解析し、本疾患に対する新しいマーカータンパク質の探索を試みており、明細胞腺癌細胞株から共通して検出されるタンパク質群の中から、1)他の卵巣癌組織型由来の細胞株の培養上清からは同定されない、2)“細胞外分泌タンパク質”、あるいは“膜タンパク質”として分類される、3)様々な組織や細胞で広範囲に発現していない(組織特異性が高い)タンパク質を探索することで、数種類の明細胞腺癌診断マーカー候補タンパク質を同定した。今年度は、そのうちのひとつであるTFPI2の臨床的有用性を評価した。

ROC解析の結果から、TFPI2はCA125よりも高い精度で、健常人と明細胞腺癌、あるいは子宮内膜症と明細胞腺癌を識別できる可能性が示された。明細胞腺癌は他の組織型の卵巣癌と比べて、子宮内膜症から発展する率が高いことが指摘されており、子宮内膜症と

明細胞腺癌を識別することは臨床的に重要である。特にCA125は子宮内膜症患者においては高値になる例が多いことから、子宮内膜症から明細胞腺癌の移行を監視できる血清マーカーは利用価値が高いと思われる。さらに臨床病期初期の段階の明細胞腺癌においても高値傾向を示すことが分かった。明細胞腺癌は再発率が高いため、早期に発見され切除されたような症例を監視する上でも、TFPI2測定が役立つと考えられる。

C, D-6. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：尾野雅哉

1. 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、Carbonic Anhydrase I (CAI)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、CAI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 ng/mlを示すグレーゾーンの前立腺癌患者でCAI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。また、10例の前立腺癌原発巣のCAIの発現を免疫染色により検討したところ、CAI血中濃度が高い患者において組織での免疫染色の強度が強い傾向にあることが認められた。

2. 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でリン酸化ペプチドの量を比較すると、173リン酸化ペプチドが肝細胞癌で2倍以上の量的高値を示し、非癌肝組織では145リン酸化ペプチドが2倍以上の量的高値を示した。量的変動を示した145リン酸化ペプチドが由来するタンパク質の生物学的な働きをGene Ontology terms (Biological Process)に従っ

て分類すると、癌で高値を示したタンパク質は核酸転写、mRNA スプライシング、アポプトーシス、細胞分裂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糖代謝、薬物代謝、反応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。また、肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織間で変化の見られたリン酸化ペプチドの中にはこれまでに報告されたことのないものも存在しており、これらのリン酸化ペプチドは肝臓がんのバイオマーカー候補となるだけでなく、肝臓がんの治療標的となる可能性も示唆された。

3. 2DICAL のバージョンアップ

バージョンアップした 2DICAL で肝細胞癌組織 54 例、同一症例非癌部肝組織 52 例のデータを解析したところ、同定されたリン酸化ペプチド数が 718 ペプチドから 2,390 ペプチドまで増加した。バージョンアップした 2DICAL は近年急速に発達した質量分析計の想定能力に対応して、同定されたペプチドフラグメントをすべて取り込むことに成功した。しかし、各ピークの定量性に関しては旧来のシステムが勝っており、さらなる改良の余地が認められている。

C, D-7. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：寒川賢治、南野直人

1. マウス心筋症モデルのプロテオーム解析

24 週令の 4C30 マウスにおいては、心筋症発症後の時間経過に従い重度な心不全状態にあることを確認した。同定タンパクの内、有意な上昇及び減少を示したタンパク質はそれぞれ 186、145 であった。線維化の亢進を示すペリオスチンをはじめとする細胞外マトリックス、細胞膜裏打ち構造や中間系フィラメントタンパク質、ER ストレス関連タンパク質、ヘパラン硫酸タンパク質等の上昇が認められた。一方、減少タンパク質の変動がより顕著であり、特にエネルギー代謝に関わる解糖系、TCA 回路では、Hexokinase-1 以外の

多くの酵素が大きく減少していた。心筋の主要エネルギー源である β 酸化経路においても、主要酵素群の減少は非常に明確であった。また、筋収縮に関わるタンパク質やその制御に関わるカルシウム制御タンパク質にも減少が認められた。しかし、イヌ機械的刺激心不全モデルと共通した増加及び減少タンパク質はそれぞれ 44、18 と限定的であった。

4C30 マウス心筋症モデルのプロテオーム解析の結果より、解糖系・TCA 回路だけではなく β 酸化経路においてもほとんどの酵素が減少しており、エネルギー代謝が非常に低下した状態にあった。この結果は、別途行ったハムスター心筋症モデルの代謝変化と非常に類似しており、代謝系酵素群の発現低下が極めて顕著であるため、この現象が単なる結果ではなく、病態の発症や基礎代謝変化を誘導する可能性も示唆された。また、ミトコンドリア酵素系の変化より、酸化ストレスの増大も推定される。線維化に関わる細胞外マトリックス、細胞裏打ち構造、筋収縮関連のタンパク質の変化も認められるが、上記の代謝系タンパク質の変化より軽度であった。イヌ機械的刺激心不全モデルとの共通性が少ない点は、発症原因や時間経過によると推定される。一方、代謝系酵素群に変化が大きい点は、がん細胞で報告されているエピゲノム変化に基づく遺伝子発現変動による代謝経路の変化を推察させるもので、今後、循環器系、特に心臓においては、発症・増悪機序として検討が必要と考えられる。上記の代謝系酵素群の変化を血中測定することは難しいが、産生される代謝物濃度をバイオマーカーとする可能性については検討の余地があると考えられる。

2. 心不全の発症・重症化と組織における糖付加との関連解析

心不全モデルとして、12 週令(発症期)および 16 週令(確立期)の時点での HS 群、LS 群の比較を行った。各群における血圧、心エコー、心重量、肺重量の測定結果は、心不全の発症、確立を明確に示した。左心室組織において、心不全を発症する HS 群では著しい

ANP の遺伝子発現、ペプチド量の上昇が認められ、BNP、MMP2 も有意に上昇し、その上昇率は遺伝子により 12 週と 16 週で異なっていた。同時に、GALNT 類をはじめとする O-glycan 合成酵素系の上昇が認められ、2 種については 12 週→16 週、LS→HS 群での上昇を ELISA 法で確認した。レクチンアレイでは、ハイマンノース型 N-glycan の減少、コアフコースの減少、シアル酸の減少などが認められた。この結果も踏まえてタンパク質を選択し、再度 qPCR 法や Western blot 法にて発現量を測定した結果、O-glycan 合成酵素系を中心に 5 種の酵素において 12 週→16 週、LS→HS 群で有意な増加を示すことが確認できた。

Dahl SS rat を使用した心不全モデルにおいて、心不全の発症、進行に伴い ANP や BNP 発現量が増加し、それとほぼ並行してハイマンノース型 N-glycan、シアル酸などの減少、O-glycan 合成酵素系の発現増加が認められた。これらの結果より、心不全の発症・重症化に伴う BNP の分子型の変動、つまり proBNP への O-glycan 付加の増加、それに伴う活性型 BNP-32 分子への変換阻害が、心不全状態の心室組織で起こる一般的現象である可能性が支持され、当初の推論が正しいことが明らかとなった。この事実は、BNP においては、組織あるいは血中の O-glycan 付加 proBNP の測定、あるいは proBNP/BNP-32 比の測定がより詳細な心不全病態評価を可能とする可能性があることを示すと共に、心不全の発症により糖鎖合成酵素系や脱離酵素系に変動が起こりタンパク質の糖鎖修飾が変化、変動するため、糖鎖修飾の変動を標的とした新たな心不全マーカーの開発が可能であることを示唆すると考えられる。

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。タンデム質量分析に関わる様々なパラ

メータの最適化した結果、価数で 14 価にまでの範囲で解析が実施可能で、分子量 15,000 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 570 (重複なし) 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、両法の併用により同定ペプチド総数は 1,000 近くに達し、半数以上が分子量 3,000 Da 以上であった。同定数では CID 法が勝ったが、ETD 法では、配列全体にわたりペプチド鎖の開裂がおきる結果、リン酸化修飾を受ける残基が明確に同定された。しかし、ETD 法では、質量電荷比が 1,000 を超える分子の開裂の効率が低下する点が CID 法との顕著な違いとして観察された。また、高分子量ペプチドの配列決定について、従来よりも 3-10 倍程度の高感度化を達成した。

CID 法で同定できないペプチドの存在は従来より懸案となっており、ETD 法が CID 法の弱点を相補しうる技術として有望であることが示された。また、ETD 法はリン酸化、硫酸化、糖鎖付加、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。しかし、分子量 7,000 を超えるペプチドの翻訳後修飾残基の確実な同定には依然として課題が残り、ハードウェア面を含めて ETD 法のさらなる改良が必要である。なお、高分子量ペプチドの同定ペプチド総数は約 1,000 に達したが、質量分析の論文では最も網羅性のあるデータとなっている。

C, D-8. 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：高坂新一

1. 初期髄液量と同定タンパク数の検討

初期髄液量は 2ml と固定していたが、そのタンパク濃度は 28mg/dl、108mg/dl と大きな変動があったが、約 60 回の質量分析計での測定の結果を見ると明らかな逆相関 ($R=-0.51$) を認めた。すなわち、初期のタンパク量が多いほど同定タンパク質数が少な

いという結果であった。

髄液は中枢神経の様子を鋭敏に反映していると想定され、実際これまでの本研究で脳特異的な数多くのタンパク質が同定されてきている。本研究の目的は血液に比較して少ないタンパク量しかない髄液を対象にするために微量測定系を確立することにある。前処理から質量分析までの行程におおよそ1ヶ月かかり、一度に3検体程度しか処理できないファシリティーにおいて、60回にも及ぶ前処理及び質量分析の結果を得ていた。そのデータを踏まえて、さらに同定数を増加させる目的で検討を行った。

2. タンパク同定数の高かった測定条件の検討

質量分析の結果で、アルブミンの total peptide count と同定数を比較すると、アルブミン残量が多いほど同定タンパク数が少ない傾向を認めた ($R=-0.21$)。すなわち、抗体カラムで除去できていないアルブミンなどの血漿に大量に存在しているタンパクが同定タンパク数の低下に寄与していると考えられる。

これら2つの結果から、初期量のタンパク量はできるだけ少なくした方がよく、またアルブミン等のタンパク質の除去をさらに徹底させるべきであるということを示唆している。そこで、初期髄液量を2mlという容量ではなく、0.6mgという重量で統一することに意味があるかないかを調べるために、30mg/dlの2ml(0.6mgと表示)と60mg/dl以上2ml(2mlと表示)のそれぞれ10例で同定タンパク質数を比較したところ、明らかに初期タンパク質量が少ない方(0.6mg)が優位に同定タンパク質数が多かった ($p<0.0001$)。

3. 抗体カラム処理後のタンパク成分の検討と新たな処理法の導入

初期髄液量を0.6mgにすることで一定の効果は得られたが、1で明らかになった血漿大量タンパクの除去不全に対処するために、トランスフェリン、アルブミン、IgGを除去できるスピнкаラム(GBCカラム、コスモバ

イオ)をこれまでの抗体カラムIgYに加えてみたところ、質量分析結果におけるトランスフェリンとアルブミンの total peptide count が著しく低下し、これらのタンパク質が十分除かれていることが判明した ($n=3$)。

また、処理前の髄液、抗体カラムIgYのみ、GBCカラムのみ、抗体カラムIgYとGBCスピнкаラムの組み合わせ、さらにIgYとGBCスピнкаラム2回処理をしたもので、トランスフェリンの濃度をELISA法にて測定した。結果は、抗体カラムIgY+GBCスピнкаラムにて、十分血漿タンパク質の除去ができることが判明した。この結果を踏まえて、抗体カラムIgY+GBCスピнкаラム1回の処理法を採用したところ、同定タンパク数の明らかな増加をみた。

さらに、平成24年度に導入したABSciX5600を用いた質量分析を行うと、同定タンパク数が一挙に1,000近くまで増加することが明らかになっている。

C, D-9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来DNAの研究：加藤菊也、宮本泰豪

1. 糖鎖構造解析

昨年度は3,000以上のクローンをELISAにてスクリーニングし、11種類の陽性クローンが得られた。2種類がIgMで9種類がIgGであった。これらのクローンは、合成糖脂質のELISAにおいては、ST1Hの異性体であるST2H、SLe^x、SLe^aは認識しなかった。免疫組織化学を用いて、これらのクローンをさらに検討した。サンプルには、ST1Hの発現が確認されているルイス型陰性の大腸癌組織、正常大腸組織を用いた。これらの凍結切片を作成し、11種類のハイブリドーマの上清と反応させ、通常のABC法にて発色させた。その結果、どのクローンからも陽性シグナルを得ることができなかった。さらに、2種類の抗体についてはsandwich ELISAの系を確立した。ST1Hの発現が確認できた大腸癌を反応させたが、免疫組織法と同様に、陽性反応は認められなかった。