

- ーム解析によるバイオマーカー探索. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日
30. 久保田 翔, 福本泰典, 青山和正, 石橋賢一, 盛永敬郎, 本田拓也, 久家貴寿, 朝長毅, 山口直人: SrcによるKAP1のチロシンリン酸化を介したヘテロクロマチン構造変換.第133回日本薬学会年会, 横浜, 2013年3月27-30日
 31. Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T, Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T : Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network. Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) 6th congress, Beijing, China,5-7 May, 2012.
 32. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T : A strategy for SRM-based large-scale validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples.” Asia Oceania Human proteome organization 6th Congress, Beijing, China, May 5-7, 2012.
 33. Adachi J, Kuga T, Shiromizu T, Kume H, Muraoka S, Hashiguchi K, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T : Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling. HUPO2012 11th World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.
 34. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T : A strategy for SRM-based systematic validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in breast cancer tissue samples. HUPO2012 11th World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.
 35. Shiromizu T, Adachi J, Tomonaga T : Quantitative proteomic profiling of orthotopic xenograft mouse model of colorectal cancer metastasis. HUPO 2012 11th World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.
 36. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y Tomonaga T : ATP Accessibility Screening (AAS), a high-throughput and high-resolution kinase analysis platform for signaling research. 2nd Copenhagen Bioscience Conference, Copenhagen, Denmark, 2-5 December, 2012.
 37. 堤 康央, 角田慎一: 新規乳がん分子標的治療薬の開発に向けた Eph receptor A10 に対するモノクローナル抗体の作製., 第28回日本 DDS 学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年7月
 38. 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: がん個別化医療のためのシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索., 第28回日本 DDS 学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年7月
 39. 鎌田春彦, 山下琢矢, 長野一也, 前田祐香, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央, 角田慎一: がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索., 日本プロテオーム機構 第10回大会, 東京(東京), 2012年7月
 40. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Evaluation of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer., 第71回日本癌学会学

- 術集会., 札幌(北海道), 2012年9月
41. Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., 第71回日本癌学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年9月
 42. 前田祐香, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 井上雅己, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: Eph receptor A10 を標的とした新規乳がん治療薬開発の試み., 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮(兵庫), 2012年10月
 43. 山下琢矢, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 糟谷史代, 堤 康央, 角田慎一: Exosome由来膜タンパク質のプロテオーム解析による新規肺がんバイオマーカーの探索., 第37回日本医用マススペクトル学会年会., 名古屋(愛知), 2012年10月
 44. 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 向 洋平, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: プロテオミクスによるシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索と評価., 日本薬学会第133年会., 横浜(神奈川), 2013年3月
 45. 鷹野正興, 山下琢矢, 長野一也, 尾谷三枝子, 前倉孝治, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央, 富山貴美, 森 啓, 松山正剛: APPE693Δ トランスジェニックマウス海馬における2D-DIGEによるプロテオーム解析., 日本薬学会第133年会., 横浜(神奈川), 2013年3月
 46. Nagano K., Okamura T., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression of Rho GDP dissociation inhibitor correlates positively with lymph node metastasis in colorectal cancer., EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
 47. Kamada H., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Nagano K., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Detection of drug-target proteins on tumor-derived exosomes by ELISA using anti-CD81 antibodies, EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
 48. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Furuya T., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Distribution and functional analysis of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer, The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS 2012), Quebec (Canada), 15-18 July, 2012.
 49. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Functional evaluation of Eph receptor A10 as a therapeutic target for breast cancer, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.
 50. Nagano K., Yamashita T., Kamada H., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Katayama S., Yoshioka Y., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteome analysis of lung cancer cell-derived exosomes for discovery of diagnostic biomarkers, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.
 51. Serada S, Kotobuki Y, Tanemura A, Katayama I, Naka T: Quantitative proteomic analysis of tumor growth associated proteins in cutaneous malignant melanoma. 103rd Annual Meeting of the American Association for

- Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012, Mon, Apr 2.
52. Morimoto A, Enomoto T, Serada S, Matsuzaki S, Yokoyama T, Ueda Y, Fujita M, Yoshino K, Fumimoto M, Kimura T, Naka T: Annexin A4 induces chemoresistance for multiple drugs in ovarian clear cell carcinoma. 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012, Tue, Apr 3.
 53. Yang, L, Serada, S, Fujimoto, M, Murota, H, Kotobuki, Y, Kitaba, S, Naka,T, Katayama I: Periostin, a novel extracellular matrix protein, is required for cutaneous sclerosis in a mouse model of scleroderma. EULAR 2012 Berlin, Germany 6 - 9 June 2012.
 54. Serada S, Takahashi T, Urase M, Fujimoto M, Harada E, Nishida T, Naka T: Quantitative phospho-proteomic analysis of gastrointestinal stromal tumors associated with imatinib resistance. 定量的リン酸化プロテオーム解析による消化管間質腫瘍のイマチニブ耐性因子の探索 第10回日本ヒトプロテオーム学会 2012年7月26日(木)・27日(金) 会場 日本科学未来館 7階
 55. Yang L, Murota, H, Fujimoto M, Serada, S, Yong, M, Ohkawara, Naka T, Katayama I: Up-regulation of interleukin 8 and CXCL chemokine ligand 1 by cold stimulation in human dermal microvascular endothelial cells: a role in winter ulceration and cold urticaria. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September, Geneva-Switzerland.
 56. Mei Y, Fujimoto, M, Ohkawara, T, Yang, L, Serada, S, Tsunoda, S-I, Naka T: Interleukin (IL)-6 deficiency does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutations. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September, Geneva-Switzerland.
 57. Serada, S, Fujimoto, M, Naka T: Heterogeneous Nuclear RNP-K is a novel cold-related autoantigen in patients with Raynaud's phenomenon. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, in Washington, DC, November 09 - 14, 2012. November 12 (ACR 2012 第78回米国リウマチ学会議)
 58. 中山敬一: ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. 基研研究会「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」. (招待講演) 岡崎.5/14 (2012).
 59. Nakayama, K.I.: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. 10th Stem Cell Research Symposium. (Invited speaker) Awaji.5/31 (2012).
 60. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学研究の新地平: もうウェスタンブロッティングは要らない?! 第55回日本腎臓学会学術総会. (招待講演) 横浜.6/1 (2012).
 61. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロッティングは要らない?! 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究. (招待講演) 東京.6/21 (2012).
 62. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロッティングは要らない?! 第22回日本サイトメトリー学会学術集会. (招聘講演) 豊中.6/29 (2012).
 63. 幡野 敦, 松本雅記, 中山敬一: 定量的リ

- ン酸化プロテオミクスによる Calcineurin の網羅的基質探索. 第 10 回日本プロテオーム学会. 東京.7/26 (2012).
64. 松本雅記: 定量プロテオミクスのための試料調製. 第 10 回日本プロテオーム学会. (教育講演) 東京.7/26 (2012).
65. 中山敬一, 松本雅記, 押川清孝, 松崎芙美子: ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. 第 10 回日本プロテオーム学会. (シンポジウム) 東京.7/26 (2012).
66. 中山敬一: プロテオームと疾患研究. ヒトプロテオゲノミクスの現状とロードマップによる推進: エピゲノムとプロテオームの統合によるヒトの生命と病気の解明. (シンポジウム) 東京.7/28 (2012).
67. Nakayama, K.I.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomics analysis. HUPO 2012 11th World Congress. (Invited speaker) Boston, MA.9/12 (2012).
68. 中山敬一: G0 期維持機構の解明: 癌幹細胞を撲滅できるか?. 第 71 回日本癌学会学術総会. (シンポジウム) 札幌.9/19 (2012).
69. 松本雅記, 松崎芙美子, 高見知代, 小山田浩二, 中山敬一: 情報基盤プロテオミクスによるヒトプロテオームの絶対定量. 第 5 回定量生物学の会年会. (招待講演) 東京.11/24 (2012).
70. 喜多泰之, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリングタンパク質 CHD7 の新規スプライシングバリエーションの発見とその機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/11 (2012).
71. 渡邊心也, 杉本のぞみ, 松本雅記, 中山敬一, 藤田雅俊: プロテオミクスアプローチを用いた新規 GRWD1 結合タンパク質の網羅的同定による GRWD1 の機能解明. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/11 (2012)
72. 中山敬一: 正常幹細胞と癌幹細胞における G0 期維持機構: "G0 期追出し療法"による癌根治の可能性. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/11 (2012).
73. 橋本 寛, 松崎芙美子, 細田将太郎, 大西隆史, 中山敬一, 白根道子: Protrudin が関与する遺伝性痙性対麻痺の病態メカニズム. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/12 (2012).
74. 細田将太郎, 清水誠之, 石谷 太, 中山敬一, 白根道子: 新規 FKBP38 結合タンパク質 ANKMY2 はソニックヘッジホッグシグナル伝達を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
75. 磯下理恵子, 小野山一郎, 鈴木淳史, 松本有樹修, 富田謙吾, 片桐秀樹, 尾池雄一, 中山啓子, 中山敬一: Fbxw7 はマウスの肝臓において脂質代謝及び細胞分化決定を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/13 (2012)
76. 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御と肝がん. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/13 (2012).
77. 中津海洋一, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: mTOR と転写をつなぐ新規分子 FOXK1 の発見とがん進展における促進作用. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
78. 足達俊吾, 穂本真佐江, 田中利好, 日置雄策, 村上 裕, 菅裕 明, 松本雅記, 中山敬一, 堀本勝久, 家村俊一郎, 夏目 徹: 質量分析計による RNA 制御因子の同定法の開発とその応用. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
79. 大西隆史, 橋本 寛, 細田将太郎, 中山敬一, 白根道子: 神経特異的な protrudin 新規アイソフォームの発現機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).

80. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦 裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝: F-box タンパク質によるユビキチン化を介した CRY タンパク質の安定性制御. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/14 (2012).
81. 沖田康孝, 松本有樹修, 弓本佳苗, 磯下理恵子, 中山敬一: Fbxw7 の発現抑制は iPS 細胞形成を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
82. 山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 弓本佳苗, 押川清孝, 中山敬一: MDM2 による RNA ヘリカーゼ DDX24 の非分解的制御機構の解明. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
83. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 小野山一郎, 森正樹, 三森功士, 中山敬一: 宿主 Fbxw7 が癌転移を抑制する. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/14 (2012).
84. 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: Fbxw7 阻害は静止期を破綻させることにより白血病幹細胞を根絶する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
85. 諸石寿朗, 西山正章, 山内隆好, 武田有紀子, 岩井一宏, 中山敬一: 生体における鉄代謝制御の中心をなす FBXL5-IRP2 系の発見. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
86. Matsumoto, M., Matsuzaki, F., Oshikawa, K., Oyamada, K., Goshima, N., Natsume, T., Nakayama, K.I.: Accurate and absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
87. Kuroda, S., Yugi, K., Kubota, H., Soga, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Unbiased identification of global network for signaling and metabolism from trans-omic data. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
88. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦 裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝: 時計タンパク質 CRY の安定化を担う新規ユビキチンリガーゼの同定. 第 85 回日本生化学会大会. (口頭発表) 福岡.12/16 (2012).
89. 中山敬一, 西山正章, 諸石寿朗: ユビキチン化による鉄代謝制御機構とその破綻. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/16 (2012).
90. 中山敬一: ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出. 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域・平成 24 年度公開シンポジウム. (シンポジウム) 東京.2/25 (2013).
91. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroiishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase DDX24 to regulate pre-rRNA processing. Post-GCOE Symposium & Retreat on Cell-fate decision: Function and dysfunction in homeostasis. (Oral) Singapore.3/4 (2013).
92. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A., Nakayama, K.I.: Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. Post-GCOE Symposium & Retreat on Cell-fate decision: Function and dysfunction in homeostasis. (Oral) Singapore.3/4 (2013).
93. Yamamura, S., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7-dependent ubiquitylation mediates the degradation of SOX9. Post-GCOE Symposium & Retreat on Cell-fate

- decision: Function and dysfunction in homeostasis. (Oral) Singapore.3/5 (2013).
94. 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, Hart, G. W., 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病角膜症に伴うタンパク質への糖(O-GlcNAc)修飾の変化, 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会, つくば, 2012.5.14
 95. Akimoto, Y., Miura, Y., Toda, T., Wolfert, M. A., Wells, L., Boons, G. -J., Hart, G. W., Endo, T. and Kawakami, H.: Detection of O-GlcNAcylated proteins by glycoproteomics and in situ proximity ligation assay (PLA), 第 14 回国際組織細胞化学会議 (ICHC2012) / 第 53 回日本組織細胞化学会総会, 京都, 2012.2.29
 96. 荒川憲昭: セクリトーム解析による新規卵巣癌マーカーの同定と臨床的有用性. 日本電気泳動学会, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾, 2012.8.20
 97. 荒川憲昭: セクリトーム解析による卵巣明細胞腺癌血清マーカーの開発. 北里疾患プロテオーム研究会, 北里大学相模原キャンパス, 相模原, 2012.8.23
 98. Arakawa, N., Ohtake, N., Nomura, A., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F. and Hirano, H. : Secretome Analysis of ovarian cancer cell lines leads to discovery of a novel diagnostic marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. HUPO2012, ハイイツ・コンベンションセンター, ボストン, 2012.9.9
 99. Arakawa, N., Ohtake, N., Nomura, A., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F., and Hirano, H. : Identification of a new biomarker for ovarian clear cell adenocarcinoma by secretome analysis of cancer cell lines. 6th Congress of Asia and Oceania Human Proteome Organisation (AOHUPO), Beijing, China, 2012.5.5.
 100. 荒川憲昭, 大竹則久, 野村文子, 森田絵理奈, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: セクリトーム解析による新規卵巣癌血清診断マーカーの探索と同定. JHUPO, 東京, 2012.7.26
 101. 平野 久: たんぱく質のはたらきと病気, 先端医科学研究センター市民講座, 横浜, 2012.4.23
 102. Hirano, H.: Proteomics of co- and post-translational modifications of large protein complexes. 6th Congress of Asia and Oceania Human Proteome Organisation (AOHUPO), Beijing, China, 2012.5.7.
 103. 平野 久: Phos-tag アフィニティ電気泳動と DIGE によって見えるタンパク質のリン酸化状態の変動日本電気泳動学会シンポジウム, 沖縄, 2012.5.11
 104. 平野 久: 卵巣明細胞腺癌に対する創薬標的および診断マーカーの探索 厚生労働科学研究費医薬基盤研究所公開シンポジウム, 東京, 2012.6.7
 105. 平野 久: プロテオーム分析技術の開発、体系化と生命医科学研究への応用 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.26~27
 106. 平野 久: 血液中バイオマーカー探索のプロテオミクス, AB Sciex シンポジウム, 大阪および東京, 2012.8.28 および 8.30
 107. 井野洋子: Phosphoproteomics in androgen-independent prostate cancer, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本未来科学館, 東京都江東区, 2012.07.26-27
 108. 井野洋子: 前立腺癌のアンドロゲン非依存性に関与するリン酸化タンパク質の探索, 第 63 回日本電気泳動学会総会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市, 2012.08.20-21
 109. 井野洋子: Phosphoproteomic analysis of androgen-independent prostate cancer cells, HUPO 11th Annual World

- Congress, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, 2012.09.09-13
110. 紙田正博, 木村弥生, 井野洋子, 倉田洋一, 山田哲司, 尾野雅哉, 平野 久 出芽酵母リボソームタンパク質のN α -アセチル化とそれがタンパク質合成に及ぼす影響, 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 111. Kimura, A., Nomura, A., Kawakami, T., Arakawa, N. and Hirano, H.: Identification of the phosphoproteins implicated in the high malignancy of ovarian clear cell adenocarcinoma using comparative LC-MS/MS-based proteomic approach. 11th annual world congress HUPO 2012, Hynes Convention Center, Boston, 2012. 9. 9-13
 112. 木村鮎子, 野村文子, 川上隆雄, 荒川憲昭, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌の悪性度に関わるリン酸化タンパク質の網羅的な解析, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 26-27
 113. 倉田洋一, 木村弥生, 紙田正博, 山中結子, 石川晃代, 岡本裕之, 正岡哲治, 名古屋博之, 荒木和男, 森山俊介, 森 司, 平野 久: サケ脳下垂体プロテオームに対する成長ホルモンの影響, 日本ヒトプロテオーム研究機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 114. 増石有佑, 木村弥生, 平野 久: GPI アンカー型タンパク質の網羅的解析法の開発, Proteomic Analysis of GPI-anchored protein, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 115. 斎藤真奈美, 山下暁郎, 岡山明子, 和田佳行, 平野 久, 島田 勝: 質量分析法でヒトパピローマウイルスの感染に関わる細胞因子の同定, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 116. 菅原経継, 木村弥生, 戸田年総, 平野 久: Phos-tag 親和性電気泳動法を用いたヒトプロテオームサブユニットのリン酸化状態の解析 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 27
 117. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鍋木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会, みやこめっせ, 京都, 2012.4.13
 118. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鍋木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
 119. 高橋枝里, 久保田浩之, 本間綾香, 平野 久, 鍋木康志: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 120. 高橋枝里: 血清プロテオーム解析による 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 34 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2011.12.14
 121. 高橋枝里: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
 122. 高橋枝里: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 123. 野村文子, 荒川憲昭, 大胡田慎一郎, 勝山真人, 平野 久: 血管型 NADPH オキシダーゼのレドックスシグナルのプロテオミクス解析, 日本生化学会大会 第 85 回大会, 福岡国際会議場, 福岡, 2012. 12. 14-16

124. Sakuma T, Ono M, Kuwabara H, Banno M, Kamita M, Yamada T: Wonder 3: A new computer algorithm for modified protein identification utilizing MS3 multi-tandem mass spectrum. 60th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics 平成 24 年 5 月 22 日 (Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada).
125. 紙田正博, きょう建生, 酒井義人, 伊藤研悠, 渡邊 研, 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 日本プロテオーム学会 2012 年大会 平成 24 年 7 月 27 日 (日本科学未来館, 東京都)
126. Kamita M, Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M: A New Diagnostic Biomarker for Prostate Cancer Patients Detected by 2DICAL. HUPO2012 11th Annual World Congress 平成 24 年 9 月 9 日 (Hynes Convention Center, Boston, USA).
127. 高倉美智子, 横溝 晃, 紙田正博, 宮永晃彦, 渡辺隆文, 鄭 基晩, 山田哲司, 内藤誠二, 尾野雅哉: PSA グレーゾーン値前立腺癌患者の新規診断マーカー 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 21 日 (ホテルロイトン札幌, 札幌市)
128. 尾野雅哉: プロテオームのがん診断と治療への応用. 生命医薬情報学連合大会 平成 24 年 10 月 17 日 (タワーホール船堀, 東京都)
129. きょう建生, 紙田正博, 東 祥子, 伊藤研悠, 酒井義人, 五十嵐文子, 渡辺 研, 山田哲司, 尾野雅哉, 原田 敦, 新飯田俊平: プロテオミクスを基盤とした脊柱管狭窄症肥厚靱帯のタンパク質局在. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 平成 23 年 10 月 26 日 (名古屋国際会議場, 名古屋市)
130. Ono M, Kamita M, Yamada T: A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL. 9th AACR-JCA Joint Conferences 平成 25 年 2 月 22 日 (Hyatt Regency Maui, Maui, USA).
131. 南野直人: ペプチドーム探索, 第 9 回 GPCR 研究会 (H24 年 5 月, 東京)
132. K. Sasaki, Y. Ueta, N. Minamino: VGF-derived peptides identified by mass spectrometry and their functions. International Symposium: Frontiers in Biologically Active Peptides, the 3rd Meeting of the Japan Branch of the International Neuropeptide Society (平成 24 年 9 月, 小倉)
133. 松下雄一, 高坂新一, 中嶋一行: ミクログリアによる GDNF の産生/分泌の調節. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.18, 2012
134. 石川理絵, 金 亮, 難波隆志, 高坂新一, 内野茂夫, 喜田 聡: メマンチン投与による成体海馬神経新生の促進と記憶形成能力との関係性の解析. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.19, 2012
135. Kotajima H, Nakamura Y, Tsuchiya A, Suzuki E, Uchino S, Kohsaka S: Ethopharmacological and gene expression analyses in the mouse in response to prenatal exposure to valproic acid. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Kobe, Japan, 9.29-10.2, 2012.
136. Yabu M, Korekane H, Sato C, Kitajima K, Miyamoto Y: Accumulation of free sialylated complex-type N-glycans in human cancers: Specific occurrence of free KDN-containing N-glycans in

- prostate cancers. 第 85 回日本生化学会 (2012 年 12 月, 福岡)
137. Nomura F, Sogawa, K, Noda, K, Seimiya, M, Matsushita, K, Tomonaga T, Yokosuka O: Diagnostic Value of Serum anti-Ku86 Levels in the Early Detection of Hepatitis C Virus-related Hepatocellular Carcinoma. AASLD (American Association of the Study of Liver Diseases), Nov. 2012.
 138. 土田祥央, 佐藤 守, 曾川一幸, 川島祐介, 荷堂清香, 澤井 撰, 西村 基, 小寺義男, 松下一之, 野村文夫: 歯肉溝滲出液のプロテオーム解析による歯周疾患マーカーの探索. 第 19 回日本遺伝子診療学会大会、2012 年 7 月 28 日、三井ガーデンホテル千葉.
 139. 荒木令江, 南部 (新堀) 晶子, 緑川宇一, 水口惣平, 小林大樹, 平山未央, 菰原義弘, 秀拓一郎, 竹屋元裕, 倉津純一: 融合プロテオミクスによるがん幹細胞の分化誘導メカニズムの解析 日本プロテオーム学会 2012 年大会日本ヒトプロテオーム機構 (東京) 平成 24 年 7 月 26 日～27 日
 140. 小林大樹, 平山未央, 菰原義弘, 水口惣平, ウィルソン-森藤政代, 尹 浩信, 竹屋元裕, 倉持 朗, 荒木令江: 融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 I 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、治療標的としての機能解析 日本プロテオーム学会 2012 年大会日本ヒトプロテオーム機構 (東京) 平成 24 年 7 月 26 日～27 日
 141. Araki N, Mizuguchi S, Morikawa T, kawano S, Yamaguchi A, Kobayashi D, Hirayama M, Midorikawa U, Nakamura H, Kuratsu J. : An integrated proteomics by iPEACH, a new application, identified novel activated signal cascades in chemotherapy resistant malignant glioma. HUPO 11th Annual World Congress (Boston,US) , 9-13 September 2012.
 142. Kobayashi D, Hirayama M, Komohara Y, Mizuguchi S, Wilson-morifuji M, Ihn h, Takeya M, Kuramochi A, and Araki N.: Integrated Proteomics Identified Translationally Controlled Tumor Protein as a Biological Target for Neurofibroma and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. HUPO 11th Annual World Congress (Boston,US) 9-13 September 2012.
 143. Hirayama M, Kobayashi D, Morikawa T, Nagayama M, Mizuguchi S, Araki N.: Analysis of abnormal cellular signals via silencing of NF1 tumor suppressor protein in neuronal cells by integrated proteomic. HUPO 11th Annual World Congress (Boston,US) 9-13 September 2012.
 144. 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(札幌)平成 24 年 9 月 19 日～21 日
 145. 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 α 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(札幌)平成 24 年 9 月 19 日～21 日
 146. 荒木令江: 薬学における融合オミクス解析 融合プロテオミクスによるがんの病態システムズバイオロジー招待講演 生命医薬情報学連合大会 2012 (2012 年日本バイオインフォマティクス学会年会 情報計算化学生物学会 (CBI 学会) 年次大会オミックス医療研究会年会) (東京) 平成 24 年 10 月 16 日
 147. 荒木令江: プロテオミクスを基盤とした

- 癌のシステムズバイオロジー和歌山県立医科大学特別公演(和歌山)平成24年10月19日
148. 荒木令江: 翻訳後の分子間相互作用をとらえる新しいタンパク質解析技術～融合プロテオミクスによる病態シグナルの検出と創薬への挑戦シンポジウム招待講演 新薬理セミナー2012(熊本)平成24年11月24日
149. 荒木令江, 南部(新堀)晶子, 緑川宇一, 永井美奈子, 小林大樹, 水口惣平, 秀拓一郎, 中村英夫, 菰原義弘, 竹屋元裕, 倉津純一: 融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞の分化誘導ニッチの解析 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日～16日
150. 小林大樹, 平山未央, 菰原義弘, 水口惣平, ウィルソン森藤政代, 尹浩信, 竹屋元裕, 倉持朗, 荒木令江: 融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症1型(NF1)関連因子TCTPの同定と、そのNF1腫瘍における機能解析 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日～16日
151. 西村宗徳, 緑川宇一, 長山慈, 小林大樹, 平山未央, 廣田由夏, 村上洋嗣, 和田孝浩, 今村隆寿, 直江秀昭, 佐々木裕, 鷗沼豊, 荒木令江: 全自動2次元電気泳道装置を用いた腫瘍マーカータンパク質の解析 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日～16日
152. 山口浩, 小林大樹, 荒木令江: 腫瘍細胞内ビメンチンの翻訳後就職およびフラグメント化とその機能解析 第84回日本生化学会大会(福岡)平成24年12月14日-16日
153. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる癌特異的分子の統合的解析産業総合技術研究所セミナー(つくば)平成25年3月28日
154. 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
155. 藏満保宏, 岩本早耶香, 田場久美子, 藤本正憲, 坂井田功, 中村和行: シンポジウム プロテオミクスの医学への応用(抗癌剤Gemcitabine感受性関連蛋白のプロテオーム解析による同定)第7回日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)大会、2009年6月27日-28日、北里大学薬学部、東京
156. 中村和行: 特別講演「電気泳動法の過去・現在・未来」第60回日本電気泳動学会総会、2009年9月19日-20日、松本市中央公民館、長野
157. 杉原佳恵, 藏満保宏, 田中寿幸, 中村和行, 岡正朗: C型肝炎に起因する肝細胞癌のプロテオーム解析 第60回日本電気泳動学会総会、2009年9月19日-20日、松本市中央公民館、長野
158. 田中寿幸, 藏満保宏, 張秀蓮, 内藤誠二, 中村和行: 転移能の異なる腎細胞癌株のプロテオーム解析 第82回日本生化学会大会、2009年10月21日-24日、神戸ポートアイランド、神戸
159. 加藤元士, 木村有香, 長坂祐二, 田中寿幸, 張秀蓮, 藏満保宏, 中村和行: 2型糖尿病モデルKK-Ayマウスの血漿プロテオーム解析 第82回日本生化学会大会、2009年10月21日-24日、神戸ポートアイランド、神戸
160. 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 10th Annual World Congress, September 4-7, 2011, Geneva, Switzerland).
161. 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 31, 2011, Bangkok, Thailand).

162. Nakamura K., Akada J., Kuramitsu Y., Furumoto H., Tanaka T., Sugihara K., Itoh M., and Oka M.:
PROTEOMEX and Cys-tag-Protein Chip Technology for Cancer Biomarker Discovery.(HUPO 9th Annual World Congress, September 19-23, 2010, Sydney, Australia).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称:「乳がん治療の予後判定方法」
発明者: 朝長 毅、村岡 賢、村上達夫、加藤菊也、宮本泰豪
出願日: 2012年5月23日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-117961 (国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 2) 発明の名称:「大腸癌治療剤」
発明者: 朝長 毅、久家貴寿、久米秀明
出願日: 2012年6月15日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-135619 (国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 3) 発明の名称:「大腸がんの判定方法」
発明者: 朝長 毅、久米秀明
出願日: 2012年12月27日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-274638(国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 4) 発明の名称:「癌が疑われる患者または患者由来の組織の癌部と非癌部との判別方法およびそれに用いる判別試薬」
発明者: 清宮正徳、朝長 毅、宮崎 勝、野村文夫
出願日: 2008年10月14日(国内出願)
出願番号: 特願 2008-264794(国内出願)
出願人: 国立大学法人千葉大学、日東紡績株式会社特許番号: 特許第 5133842 号
登録日: 2012年11月16日
- 5) 発明の名称: 結核検査用バイオマーカー

発明者: 仲 哲治、藤本 穰、世良田 聡、松本智成

出願日: 2012年4月3日

出願番号: 2012-84996

出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所

- 6) 発明の名称: 膠原病のレイノー症状を診断する免疫学的手法

発明者: 仲 哲治、藤本 穰、世良田 聡

出願日: 2012年6月22日

出願番号: 特願 2012-141434

出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所

- 7) 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

発明者: 荒川憲昭、平野久、宮城悦子、大竹宣久

出願日: 2011年8月19日

出願番号: 特願 2011-179450

出願人: 公立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社

- 8) 発明の名称: Novel tumor marker for pancreatic cancer

発明者: 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

特許番号: 第 EP2182061 号 (欧州)

特許日: 2012年10月12日

- 9) 発明の名称: 液体クロマトグラフィーのデータ補正方法

発明者: 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

特許日: 2012年11月2日

特許番号: 第 5119405 号

- 10) 発明の名称: 修飾αフィブリノゲンタンパク質またはその免疫原性断片

発明者: 尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

特許日: 2012年11月30日

特許番号: 第 5140809 号

- 11) 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

発明者: 荒木令江、小林大樹、水口惣平、平山未央

出願番号：特願 2012-075242

出願日：2012年3月28日

公開番号：特開 2012-213391

公開日 2012年11月8日

出願人：国立大学法人熊本大学

- 12) 発明の名称：統合プロテオーム解析用データ群の生成方法ならびに同生成方法にて生成した統合プロテオーム解析用データ群を用いる統合プロテオーム解析方法、およびそれを用いた原因物質同定方法
発明者：荒木令江, 水口惣平, 坪田誠之, 小林大樹, 倉津純一, ウイルソン政代.
出願番号：国際特許
PCT/JP2011/58366,13/638,836
公開番号 US-2013-0023574-A1
公開日：2013年1月24日
出願人：国立大学法人熊本大学

I. 研究協力者

高尾 敏文 大阪大学蛋白質研究所
教授

山本 格 新潟大学大学院医歯学
総合研究科 教授

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

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

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。

A. 研究目的

国際的な新薬開発競争に際して、シーズとなる疾患関連バイオマーカーの発見、知的財産権の確保は、今後のわが国の医薬品産業の発展に不可欠である。そのためには、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、その疾患関連タンパク質の発見にはヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオーム解析が重要である。これまでそれらの材料、特に血液や尿を用いた疾患プロテオーム解析はさかんに行われてきたが、新たなバイオマーカーとなるタンパク質は発見されていない。その大きな理由として、例えば血中のタンパク質濃度のダイナミックレンジは 10^{11} と非常に広く、現在の質量分析計の性能では量の多いタンパク質しか同定されなためである。近年になり、質量分析計の性能は飛躍的に向上し、微量なタンパク質の検出・

同定が可能となったが、それでも血中のタンパク質を網羅的に同定するには程遠い。そのため本研究では、バイオマーカーの探索に用いる試料として、バイオマーカー候補タンパク質が濃縮されている病巣部の試料、たとえば癌の組織や神経疾患の髄液を用いた。

実用化に結びつくバイオマーカーが見つからないもう一つの理由は、探索で見つかったバイオマーカー候補タンパク質を検証する手段が乏しかったからである。従来はその検証作業は抗体を用いたウエスタンブロットや免疫染色で行っていたが、よい抗体が入手できないために、せつかく同定されたバイオマーカー候補タンパク質が検証されずに埋もれてしまった例は多々あったと思われる。近年 SRM/MRM 法と呼ばれる質量分析計を用いた検証方法が開発され、抗体を用いなくても精度よくバイオマーカー候補タンパク質を検証す

ることが可能となった。そこで我々は、SRM/MRM法を用いて、得られたバイオマーカー候補タンパク質の大規模検証を行った。さらに、その有用性を高めるためには、疾患との因果関係を裏付けるような候補タンパク質の機能の解明も実用化には重要である。そこで我々は、一部のバイオマーカー候補タンパク質についてはその機能解析も試みた。

以上の手法を用いて、がん・神経疾患等の診断に有用な新規バイオマーカータンパク質の探索を行った。特に抗体医薬のターゲットとなる膜タンパク質やキナーゼ阻害剤のターゲットとなるリン酸化タンパク質の網羅的探索に力を注いだ。さらに、それらのバイオマーカー候補タンパク質の血液や尿中での検出・定量を試みた。

B. 研究方法

B-1. バイオマーカー候補タンパク質の探索 組織中膜タンパク質の iTRAQ 解析

組織検体をホモジュナイザーで破碎し、低速遠心で核や未破碎の細胞を除き、超高速遠心をおこない、その沈殿画分を膜タンパク質画分とした。さらに、上述の PTS 法でペプチドを抽出した。脱塩精製後得られたペプチドサンプルは、iTRAQ 試薬で同位体標識ラベル後、カラム操作により分画し、液体クロマトグラフィー質量分析装置でタンパク質の同定と定量解析を行い、グループ間で有意に発現量が変化するバイオマーカー候補タンパク質を検索した。得られたバイオマーカー候補タンパク質は、SRM法（後述）、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法を用いて検証した。

B-2. SRM/MRM法によるバイオマーカー候補タンパク質の検証

(1) 組織中膜タンパク質の SRM/MRM 定量解析

網羅的な定量解析の結果、大腸癌の悪性化に伴い発現量の変化するバイオマーカー候補タンパク質について、selected reaction monitoring (SRM)法を用いた検証をおこなっ

た。SRM法を用いることで、抗体を用いずに、少量のサンプルで一度に数十個の候補タンパク質の検証が可能となった。候補タンパク質に特異的なアミノ酸配列を持つペプチド(トリプシン消化断片)をSRM測定の対象として2種類ずつ選択し、それぞれに対する安定同位体標識ペプチド(SIペプチド)を合成した。SRM測定の際は、トリプシン消化した測定サンプルにSIペプチドを内部標準として一定量添加し、SIペプチドに対する内在性ペプチドの比を調べることで、候補タンパク質の発現量を定量した。

SRM測定を行うにあたって、まずSIペプチド(1ng)をフーリエ変換・リニアイオントラップハイブリッド質量分析計LTQ orbitrap XLでLC/MSMS測定した。LTQ orbitrap XLで得られたMSMSスペクトルから、各ペプチドにつき、強度の大きなプロダクトイオンを10個選択した。さらにペプチドの開裂(コリジョン)に使用されるコリジョンエネルギー(CE)を最適化する為、各プロダクトイオンにつき7点のCEを設定し、合計70個のtransitionを作成した。その後さらに、SIペプチドをトリプル四重極型質量分析計TSQ Vantageにより測定し、測定にもっとも適した3個のtransitionを選択した。さらにSRMシグナルの感度、定量性を上げる為、ペプチドの溶出時間の±5分間のみ測定(Timed SRM)するよう設定した。これらの最適化の後、SIペプチドと細胞ライセート中の内在性ペプチドをLC/SRM測定した。その際のLCは、溶媒Aに2%ACN 0.1%FA、B溶媒に90%ACN 0.1%FAを使い、グラジエントは溶媒B5%でスタートし、45分でB25%まで上げ、5分のB95%の洗浄の後、15分のB5%の平衡化を行う計60分のメソッドを用いた。

(2) 血漿中 APL1 βペプチドの SRM/MRM 定量解析

ヒト血漿 1ml に APL1 β 25、APL1 β 27、APL1 β 28 の安定同位体標識ペプチド (SI ペプチド) を添加し、それを buffer

(0.1%N-octylglucoside, 140mM NaCl, 10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA, SIGMA Protease Inhibitor mix) で2倍に希釈し50kのフィルターで4°C、80分間遠心ろ過後、抗APL1β抗体とProtein sepharose Aビーズを用いて免疫沈降を行い、20%ACN,0.1%FAでAPL1βペプチドを溶出した。得られたサンプルに対してSRMを行うために、トリプル四重極型質量分析計TSQ Vantageにおいて、それぞれ5つのtransitionを選択して最適化を行い、最も適した3個のtransitionを最終的な測定に用いた。そのtransitionを使って、APL1β安定同位体標準ペプチドのSRM測定により検量線を作成し、定量限界(LOQ)と検出限界(LOD)を定めた。その際のLCは、溶媒Aに2%ACN 0.1%FA、B溶媒に90%ACN 0.1%FAを使い、グラジエントは溶媒B 5%でスタートし、20分でB 55%まで上げ、5分のB 95%の洗浄の後、15分のB 5%の平衡化を行う計40分のメソッドを用いた。

B-3. バイオマーカー候補タンパク質の機能解析

(1) 細胞培養

大腸癌培養細胞株HCT116とDLD1細胞はATCCから購入した。細胞は5%CO₂存在下、10%牛胎児血清(Invitrogen)を添加したIMDM培地(Invitrogen)で培養した。siRNAの細胞導入はLipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)を用いて行った。

(2) 過剰発現とノックダウン

過剰発現には、FAM83H cDNAを組み込んだp3XFLAG-CMV-14ベクターを用いた。ノックダウンにはインビトロジェン社から購入したsiRNAを用いた。大腸癌培養細胞株を播種した翌日に、Lipofectamine 2000またはLipofectamine RNAiMAXを用いて発現ベクターまたはsiRNAを導入した。過剰発現については24時間後に、ノックダウンについては48時間後に各種解析を行った。siRNAの配列の配列は以下のとおりである。

FAM83H siRNA S1

5'-ACACGAAGGCCAUUCUGGAGCAGAU-3'

3'-UGUGCUUCCGGUAAGACCUCGUCUA-5'

FAM83H siRNA S2

5'-CAACGCCUUGUACAGCAGCAACCUU-3'

3'-GUUGC GGAACAUGUCGUCGUUGGAA-5'

Control siRNAにはMedium GC Duplex #2(Invitrogen)を用いた。

(3) インタラクトーム解析

大腸癌培養細胞株にFLAG標識したFAM83H発現ベクターを導入したのち、1%NP-40を含む可溶化剤で細胞を処理し、タンパク質抽出液を得た。Protein G-Dynabeadsにdimethyl pimelimidateでクロスリンクさせた抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行い、FAM83H-FLAGとそれに相互作用するタンパク質を精製した。精製したタンパク質群をSDS-PAGEで分離した後、SDS-PAGEゲルを分子量にしたがって分割し、全てをゲル内消化した後に、LC-MS/MSで解析した。コントロールベクターを用いた対象実験との比較から、FAM83Hに特異的に結合するタンパク質群を決定した。

(4) 大腸組織中の遺伝子発現解析

千葉大学において、13名の大腸癌患者から摘出された大腸癌組織とその周辺非癌部組織を解析に用いた。各組織からRNeasy Plus kit(Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出した。

12名分の組織検体を用いてMicroarray解析を行った。Total RNAからGene Chip(R) 3' IVT Express Kit(Affymetrix)を用いてaRNAを作成し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array(Affymetrix)で解析した。226129_atプローブセットの結果からFAM83Hの発現量を調べた。

qPCRは11名分の組織検体(10名分はmicroarray解析に用いた検体、1名分は新たな検体)を使って行った。Power CYBR Green試薬を用いて(Applied Biosystems)、Applied

Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System で解析した。FAM83H の qPCR に用いたプライマーの配列は Forward primer 5' -cgacaagtgcctgtcaacc-3' と Reverse primer 5' -acttcccagtgccgcagtag である。得られた結果を Actin の発現量で補正した。Actin に対するプライマーは Forward 5' -agaaaatctggcaccacacc-3' と Reverse 5' -ggggtgtgaaggtctcaaa-3' である。

(5) 細胞増殖試験

10000 個の HCT116 細胞を 12 well dish に撒き、2 日後に siRNA を導入し、その後 24、48、72 時間後にトリパンブルー染色法で生細胞の数を計測した。

(6) 抗体

用いた一次抗体: 抗 PARP 分解物抗体(#5625、Cell Signaling Technology)、抗 Caspase-3 分解物抗体(#9664、Cell Signaling Technology)、抗 FAM83H 抗体 (HPA024604、Sigma)、抗 actin 抗体 (sc-1615、Santa Cruz Biotechnology)、抗 ケラチン 18 抗体 (MS-142-P0、Thermo Scientific)、抗 ケラチン 8 抗体(EP1628Y、Epitomics)。

Western blot 解析に用いた二次抗体: HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2020、Santa Cruz Biotechnology)、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (NA934、GE ヘルスケア)。免疫染色に使用した二次抗体: Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa488 標識抗ヤギ IgG 抗体、Alexa594 標識抗マウス IgG 抗体。Alexa 標識抗体は全てインビトロジェン社から購入した。

(7) Western blot 解析

細胞タンパク質の抽出は Laemmli の SDS サンプルバッファーで行った。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写した。Blocking One (ナカライテスク)でブロッキングした後に、一次抗体、二次抗体を順次あてた。ECL 試薬 (GE ヘルスケア) を用いた化学発光法で発光させ、LAS4000(GE ヘルスケア)で検出した。

(8) 免疫染色

細胞は-20 度に冷やした 100%メタノールで 1 分間浸すか、30 度に加温した 4%パラフォルムアルデヒドに 20 分間浸す事で固定した。パラフォルムアルデヒドで固定した場合は PBS に 0.5%Triton X-100 を添加した溶液を用いて細胞膜に穴をあけた。3% 牛血清アルブミンでブロッキングした後に一次抗体、二次抗体を順に反応させた。二次抗体溶液に DAPI を混ぜる事で DNA を共染色した。細胞の観察は共焦点顕微鏡 (LSM710、Zeiss) を用いて行った。

(9) Wound healing assay

HCT116 細胞に siRNA を導入し、24 時間が経過した後に細胞シートに傷をつけ、その直後と 24 時間後の細胞シートの状態を光学顕微鏡下で観察した。細胞シート先端部が傷の内側に向けて移動した距離を測定した。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いたヒト由来試料は全て試料提供機関である国立大学法人千葉大学大学院医学研究院、大阪大学大学院医学研究科の倫理審査委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものであり、独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターにおける使用を両審査委員会および医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト倫理審査委員会で承認されたものである。

C. 研究結果

C-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ェ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 (図 1)。

(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、5566 個のタンパク質が同定され、その中の 1567 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、5287 個のタンパク質が注釈付けされ、その中の 3087 個 (58.4%) は膜タンパク質であることが推定された (表 1)。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 (表 1)。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。

有意な発現変化のみられたタンパク質のうち、ポリープに比べて、転移のない癌組織での発現上昇がみられた例 (図 2A)、転移のない癌組織に比べて、転移のある癌組織での高発現が見られた例 (図 2B)、ポリープよりも転移のない癌組織、さらに転移のない癌組織よりも転移のある癌組織と悪性度が高い癌組織でより高発現している例 (図 2C)、ポリープに比べて転移のない癌組織での発現の低下が示された例 (図 2D)を示す。

新たに見出されたバイオマーカー候補タンパク質のうち、X と Y についてはよい抗体が入手できたため、抗体を用いた検証も行った。X は、N 端部分にシグナル配列または膜貫通ドメインと予想される配列を持つ機能未知のタンパク質で、SRM の検証結果から、癌の悪性化に伴う発現上昇が示された (図 3A)。抗 X 抗体を用いたウェスタンブロットでも癌組織での発現の上昇が確認され (図 3B)、大腸癌組織の免疫組織染色では、X は正常細胞や間質での発現がほとんど認められず、癌細胞で高発現していることが示された (図 3C)。

また、Y は、RR ファミリータンパク質の一つで、その一次構造から 2 回膜貫通型の膜タン

パク質と予想される。RR ファミリータンパク質は、細胞内受容体に結合し、その受容体の plasma membrane への移行を促進する機能を持つことが報告され、Y も細胞内膜のトラフィックへの関与が示唆されている。また、Y は、プロアポトーシス活性を持ち、その polymorphism (遺伝子多型) と大腸癌発症との関連性も示唆されている。SRM やウェスタンブロットの結果から、Y は、転移のない癌組織に比べて転移のある癌組織で発現が増加していることが示された(図 4A、4B)。また、免疫組織染色の結果から、Y は癌細胞に高発現していることが示された(図 4C)。

さらに、14 種類の癌組織それぞれ 50 または 100 検体分含む癌組織アレイ(TMA1150)の解析により、大腸癌における X の高発現が多検体で確認されただけでなく、肝臓癌や乳癌でも X の発現が増加していることが示された(図 5A)。また、Y は大腸癌だけでなく、前立腺癌、乳癌でも高発現していることも示された(図 5B)。

以上の解析により、ポリープと癌の間で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(図 6)。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。そのうち 2 つのタンパク質 A、B の例を図 7 に示す。下段の図は内部標準のタンパク量、上段は目的のタンパク量を示している。タンパク質 A、B ともに、健常人、転移のない大腸癌患者に比して、転移のある大腸癌患者で増加していることがわかる。このことから、これらのタンパク質が大腸癌バイオマーカーとして実用化できる可能性が高いと考えられた。

(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 APL1 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 APL1 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 (Yanagida K. et al. EMBO Mol. Med. 1,223-235, 2009)。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の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。

図 8 に血漿中 APL1 β の検出、定量のワークフローを示す。当初は APL1 β 抗体による免疫沈降後に SRM/MRM 法を用いて APL1 β の検出を試みたが、免疫沈降は手順が煩雑であるため、免疫沈降をせずに直接血漿中 APL1 β が検出できないか検討した。まず、血漿中に多く含まれるメジャータンパク質をアルブミン吸着カラム Cibacron blue で除去し、その後さらにアセトニトリル沈殿によりメジャータンパク質を除いた。この状態でもまだ残存タンパク質が APL1 β の検出を妨げたため、さらに C18 と SCX 担体を重層させた StageTip を用いて精製した。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。図 9 の下段が内部標準ペプチド、上段が内在性 APL1 β ペプチドである。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 1fmol/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 (図 10)。fmol/ml レベルの血漿中タンパク質・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 (図 11)。

C-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 (図 12)。そこで、FAM83H が細胞増殖に関与しているかどうか調べるために、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 (図 13A)。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 (図 13B)、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 (図 13C)。

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 (図 14)。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 (図 15)。

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 (図 16A)。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 (図 16B)。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 (data not shown)。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 (図 17A)。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 (図 17B)。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 (図 18)。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 (図 19)。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。

D. 考察

D-1. 大腸癌バイオマーカー候補タンパク質の検証

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。

今回検証できたバイオマーカー候補膜タンパク質や細胞外タンパク質は、癌組織の細胞から分泌されることが予想され、血液や尿などの体液で検出できる可能性が高いと考えられたが、前述のように血清・血漿中でのバイオマーカーの検出は非常に難しい。そこで我々は、血中のエクソソームに着目してバイオマーカー候補タンパク質の検出を試みた。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。その結果、検出を試みた約 100 個のタンパク質のうち約 4 分の 1 が検出定量でき、そのうち 20 個弱が