

健常人に比べ癌患者で変化が見られた。これらのタンパク質は非常に有望な大腸癌のバイオマーカーと考えられ、今後さらに検体数を増やして大規模検証する必要がある。また今回エクソソーム中で検出できなかった残りの4分の3については、分画等の処理をすることで検出が可能になると思われる。

D.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

今回我々は、血清タンパク質の前処理法について、検討に検討を重ねた結果、免疫沈降法を用いずに血漿中に 1fmol/ml の濃度で存在する APL1 β の検出、定量に成功した。これも世界初の成果である。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。

D-3. 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、FAM83H が大腸癌の新しい創薬ターゲット候補タンパク質となることを見出した。大腸癌細胞において FAM83H は中間系フィラメント骨格構築を制御していることが明らかとなり、その制御を介して細胞分裂/増殖や細胞運動を促進している事が示された。その FAM83H の細胞増殖・運動の亢進は CK-1 α を介していることから、FAM83H と CK-1 α の相互作用を阻害する薬が開発できれば、大腸癌の増殖・転移を抑制することが大いに期待される。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。

E. 結論

本年度は、SRM/MRM 法を用いて、大腸癌バイオマーカー候補タンパク質の大規模検証、および血漿中のアルツハイマー病バイオマーカー超微量ペプチド APL1 β を高感度に定量することに成功した。また FAM83H の機能解析を行い、FAM83H と CK-1 α の相互作用阻害薬が大腸癌の新規治療法となる可能性があることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. [Shiromizu, T.](#), [Adachi, J.](#), [Watanabe, S.](#), [Murakami, T.](#), [Kuga, T.](#), [Muraoka, S.](#) & [Tomonaga, T.](#) Identification of missing proteins in the neXtProt database and unregistered phosphopeptides in the PhosphoSitePlus database as part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.*, in press (2013).
2. [Muraoka, S.](#), [Kume, H.](#), [Adachi, J.](#), [Shiromizu, T.](#), [Watanabe, S.](#), [Masuda, T.](#), [Ishihama, Y.](#) & [Tomonaga, T.](#) In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein List. *J. Proteome Res.* **12**, 208-13 (2013).
3. [Sogawa, K.](#), [Noda, K.](#), [Umemura, H.](#), [Seimiya, M.](#), [Kuga, T.](#), [Tomonaga, T.](#), [Nishimura, M.](#), [Kanai, F.](#), [Imazeki, F.](#), [Takizawa, H.](#), [Yoneda, M.](#), [Nakajima, A.](#), [Tsutsumi, M.](#), [Yokosuka, O.](#) & [Nomura, F.](#) Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa

- fragment (FIC 5.9) as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomics Clin. Appl.*, in press (2013).
4. 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.* **12**, 58-61 (2013).
 5. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K. & Tomonaga, T. A Strategy for large-scale phospho-proteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-22 (2012).
 6. Muraoka, S., Kume, H., Watanabe, S., Adachi, J., Kuwano, M., Sato, M., Kawasaki, N., Kodera, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Miyamoto, Y., Kato, K., Tomonaga, T. A strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 4201-10 (2012).
 7. Katada, K., Tomonaga, T., Satoh, M., Matsushita, K., Tonoike, Y., Kodera, Y., Hanazawa, T., Nomura, F. & Okamoto, Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J. Proteomics* **75**, 1803-15 (2012).
 8. Yoshida, Y., Nameta, M., Kuwano, M., Zhang, Y., Bo, X., Magdeldin, S., Cui, Z., Fujinaka, H., Yaoita, E., Tomonaga, T. & Yamamoto, T. Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. *Proteomics Clin. Appl.* **6**, 412-7 (2012).
 9. Uebi, T., Itoh, Y., Hatano, O., Kumagai, A., Sanosaka, M., Sasaki, T., Sasagawa, S., Doi, J., Tatsumi, K., Mitamura, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawamura, T., Okumura, M., Nakae, J., Takikawa, H., Fukusato, T., Koura, M., Nish, M., Hamsten, A., Silveira, A., Bertorello, AM., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Tomonaga, T., Naka, T., Ikegawa, S., Tsumaki, N., Matsuda, J. & Takemori, H. Involvement of SIK3 in Glucose and Lipid Homeostasis in Mice. *PLoS One* **7**, e37803 (2012).
 10. Nomura, F., Sogawa, K., Noda, K., Seimiya, M., Matsushita, K., Miura, T., Tomonaga, T., Yoshitomi, H., Imazeki, F., Takizawa, H., Mogushi, K., Miyazaki, M. & Yokosuka, O. Serum anti-Ku86 is a potential biomarker for early detection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 837-43 (2012).
 11. Matsushita, K., Kajiwara, T., Tamura, M., Satoh, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Yoshimoto, R., Ito, A., Kubo, S., Natsume, T., Levens, D., Yoshida, M. & Nomura, F. SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor serves as a molecular switch for c-myc gene expression. *Mol. Cancer Res.* **10**, 787-99 (2012).
 12. Kimura, K., Ojima, H., Kubota, D., Sakumoto, 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* **78**, 362-73 (2012).
13. Kimura, A., Sogawa, K., Satoh, M., Kodera, Y., Yokosuka, O., Tomonaga, T. & Nomura, F. The application of a three-step serum proteome analysis for the discovery and identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Proteomics* 623190 Epub (2012).
 14. Kikkawa, S., Sogawa, K., Satoh, M., Umemura, H., Kodera, Y., Matsushita, K., Tomonaga, T., Miyazaki, M., Yokosuka, O. & Nomura F. Identification of a novel biomarker for biliary tract cancer using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Proteomics* 108609 Epub (2012).
 15. Kajiwara, T., Matsushita, K., Itoga, S., Tamura, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Habara, Y., Matsuo, M. & Nomura F. SAP155-mediated c-myc suppressor FBP-interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues. *Cancer Sci.* **104**, 149-56 (2012).
 16. Hosako, M., Muto, T., Nakamura, Y., Tsuta, K., Tochigi, N., Tsuda, H., Asamura, H., Tomonaga, T., Kawai, A. & Kondo, T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J. Proteomics* **75**, 833-44 (2012).
 17. Guo, F., Hiroshima, K., Wu, D., Satoh, M., Abulazi, M., Yoshino, I., Tomonaga, T., Nomura, F. & Nakatani, Y. Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: its expression and possible clinical significance. *Hum. Pathol.* **43**, 1282-8 (2012).
 18. Yamada, M., Satoh, M., Seimiya, M., Sogawa, K., Itoga, S., Tomonaga, T. & Nomura F. Combined proteomic analysis of liver tissue and serum in chronically alcohol-fed rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **37**, Suppl 1, E79-87 (2012).
 19. 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.* **75**, 5342-55 (2012).
- G-2. 学会発表
招待講演
1. 朝長 毅: 最近のプロテオミクス技術の進歩とがん研究への応用. 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 千葉, 2012 年 4 月 14 日
 2. 朝長 毅: 真のバイオマーカーの発見を目指して. 第 10 回日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
 3. 朝長 毅: 疾患プロテオミクスの基礎と Human Proteome Project. 第 19 回日本遺伝子診療学会, 千葉, 2012 年 7 月 26-28 日
 4. 朝長 毅: プロテオミクスを用いた新規腫瘍マーカーの探索と実用化. 第 32 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 札幌, 2012 年 9 月 18 日
 5. 朝長 毅, 佐野聖三, 渡邊史生, 田上真次, 大河内正康, 武田雅俊, 熊谷久美子, 常見雅彦: アルツハイマー病サロゲートマーカーの定量系の確立と診断への応用. 第 31 回日本認知症学会, つくば, 2012 年 10 月 26-28 日
 6. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 橋口一成, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高

田穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012 年 9 月 6-9 日

7. 久家貴寿: 新規大腸癌関連タンパク質の予後予測マーカー応用を目指した取り組み. 第 9 回千葉疾患プロテオミクス研究会, 東京, 2012 年 11 月 24 日

一般講演

1. 久米秀明, 渡邊史生, 村岡 賢, 石濱 泰, 小寺義男, 松下一之, 松原久裕, 朝長 毅: 大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索とその検証. 第 10 回日本プロテオーム学会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
2. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 日本ヒトプロテオーム機構第 10 回大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
3. 村岡 賢, 久米秀明, 渡邊史生, 桑野晶喜, 足立 淳, 佐藤三佐子, 川崎 直子, 石濱 泰, 石飛真人, 稲治英生, 小寺義男, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅: 乳癌膜タンパク質の大規模 iTRAQ-shotgun と SRM 解析によるバイオマーカータンパク質の検証. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
4. 久家貴寿, 久米秀明, 川崎直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原久裕, 朝長 毅: 大腸癌手術標本の発現解析とインタラクトーム解析による新規癌関連タンパク質の同定. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
5. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 橋口一成, 鳴海良平, 渡邊史夫, 桑野晶喜, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
6. 村上達夫, 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 宮本泰豪, 加藤菊也, 石飛真人, 稲治英生, 小寺義男, 朝長 毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM/MRM によるヒト乳癌組織の検証法. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
7. 佐野聖三, 田上信次, 大河内正康, 渡邊史生, 熊谷久美子, 常見雅彦, 朝長 毅: Immuno-SRM/MRM 法を用いた血漿中のアルツハイマー病サロゲートマーカーペプチド APL1 β 定量のための前処理法の検討. 第 10 回日本プロテオーム学会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
8. 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅: 同所性移植モデルによる大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
9. 川崎直子, 平野賢一, 原 康洋, 足立 淳, 渡邊史生, 朝長 毅: プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26 日-27 日
10. 小寺義男, 川島祐介, 斉藤達也, 佐藤 守, 曾川一幸, 朝長 毅, 前田忠計, 野村文夫: 血中診断マーカーペプチド獲得を目指した包括的なアプローチ. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26 日-27 日
11. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 橋口一成, 鳴海良平, 渡邊史生, 桑野晶喜, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: DNA 損傷初期応答シグナル解析から創薬標的の探索へ. 第 10 回北里疾患プロテオーム研究会, 神奈川, 2012 年 8 月 23 日
12. 久米秀明, 村岡 賢, 小寺義男, 松下一之, 松原久裕, 朝長 毅: 大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索とその検証. 第 71 回日本癌学会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
13. 村岡 賢, 久米秀明, 足立 淳, 宮本泰豪, 加

- 藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: A strategy for validation of biomarker candidates combining iTRAQ and SRM/MRM assay in breast cancer tissue samples 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月19-21日
14. 久家貴寿, 久米秀明, 足立 淳, 星野 敢, 松原久裕, 朝長 毅: オミックス技術を駆使した新規大腸癌関連タンパク質の同定.第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 15. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 中山敬一, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規DNA損傷初期応答キナーゼの探索.第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 16. 村上達夫, 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 中山敬一, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: ヒト乳がん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析とSRMをベースにした検証法.第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 17. 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅: Proteomic analysis of highly metastatic colorectal cancer cells established from orthotopic metastatic mouse model. 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19-21日
 18. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 19. 松下一之, 石塚久子, 佐藤 守, 松原久裕, 島田英昭, 朝長 毅, 久保秀司, 吉田 稔, 野村文夫: c-myc 遺伝子転写抑制因子 FIR とスプライシング因子 SAP155 の結合による新規がん化メカニズムについて. 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19-21日
 20. 橋口一成, 足立 淳, 渡邊史生, 朝長 毅: Quantitative proteome and phosphoproteome analyses of chromatin proteins upon oxidative base damage. 第36回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日
 21. 渡部亮介, 足立 淳, 朝長 毅: Global quantitative phospho-proteomic analysis on the mTOR-mediated signaling pathway. 第35回日本分子生物学会、福岡2012年12月11-14日
 22. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオ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
 23. 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

国際学会

一般講演

1. 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.
2. 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 (AOHUPO) 6th Congress, Beijing, China, May 5-7, 2012.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

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

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

I. 研究協力者

石濱 泰 京都大学大学院薬学研究科 教授
近藤 格 国立がんセンター研究所プロテオーム バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー
小寺 義男 北里大学大学院理工学研究科生体分子動力学講座 准教授
大河内正康 大阪大学大学院・医学系研究科・精神医学教室 講師
田上真次 大阪大学大学院・医学系研究科・精神医学教室 講師
足立 淳 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
原 康洋 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト

久米秀明 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
久家貴寿 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
白水 崇 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
村岡 賢 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
松原三佐子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
渡部亮介 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
橋口一成 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
村上達夫 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
金川章子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
佐野聖三 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
渡邊史生 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
川崎直子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
橋本 裕希 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
岸田真里菜 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト
長野麻衣子 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト

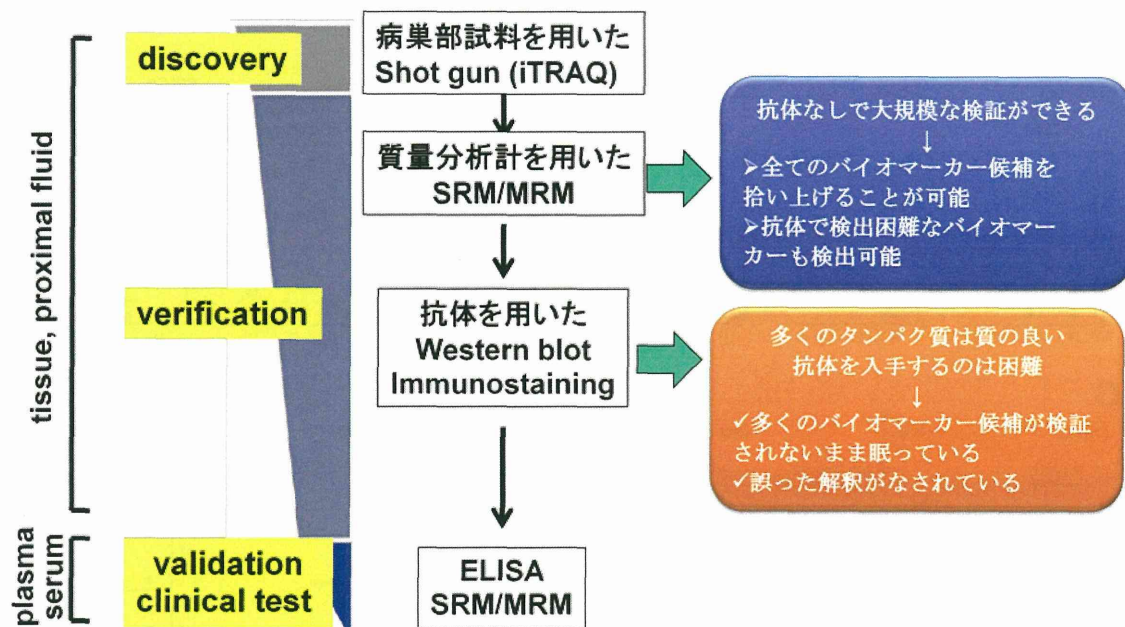


図 1 : バイオマーカー探索の戦略

		Total identified proteins				5566	
		number				%	
Number of proteins with transmembrane domains		1567				28.2%	
GO-annotated		5287				100	
Membrane		3087				58.4	
Cell surface		209				4.0	
Extracellular		652				12.3	
Number of proteins with significant difference in expression							
ratio	p-value	polyp vs cancer w/o metastasis		cancer w/o vs with metastasis		polyp vs cancer with metastasis	
		membrane	Extra	membrane	Extra	membrane	Extra
> 2.0	< 0.1	108	34	21	8	79	21
< 0.5	< 0.1	51	21	11	9	20	16
Total(399)		159	55	32	17	99	37

表 1 : 大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質

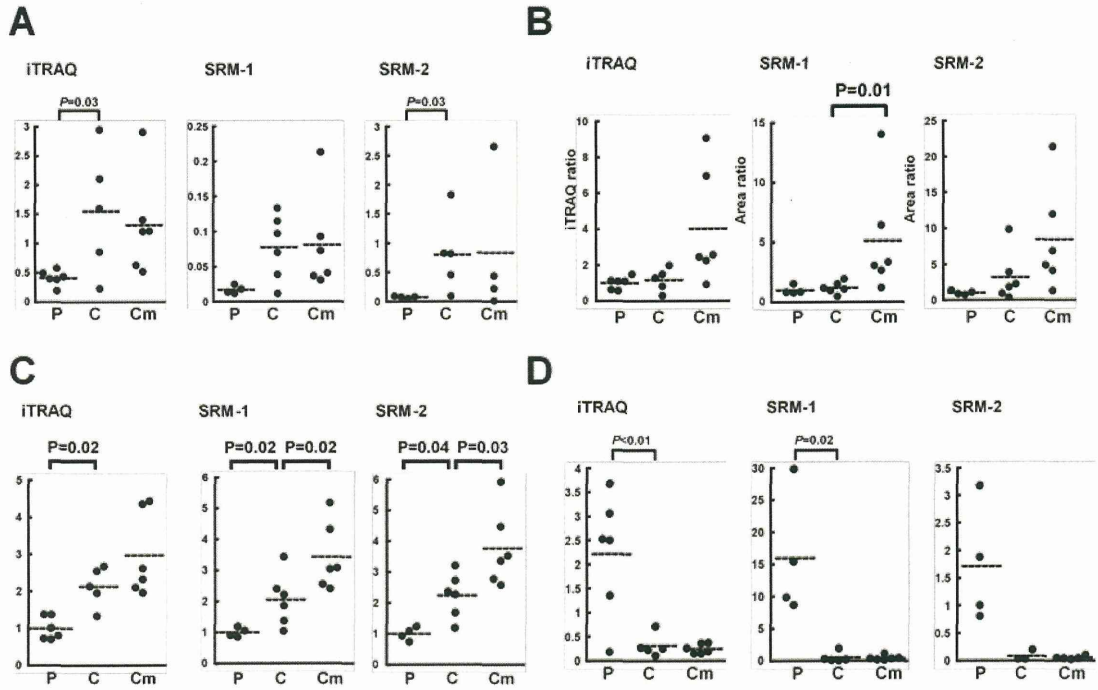


図2：大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質の検証

A：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タンパク質

B：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タンパク質

C：ポリープから転移のない癌組織、さらに転移のある癌組織と段階的に発現上昇がみられたタンパク質

D：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タンパク質

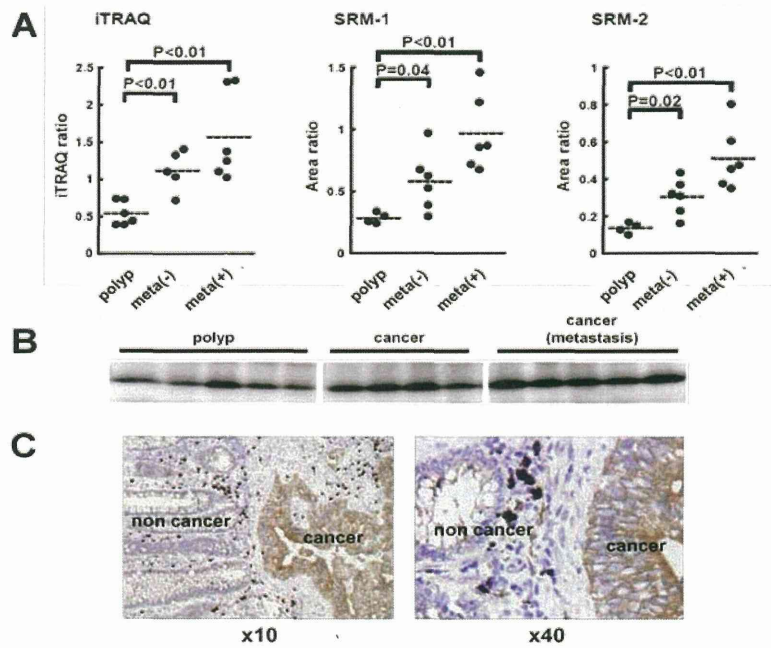


図3：大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質Xの検証

A：SRM/MRMでの検証 B：ウエスタンブロットでの検証 C：免疫染色での検証（左図 x10、右図 x40）

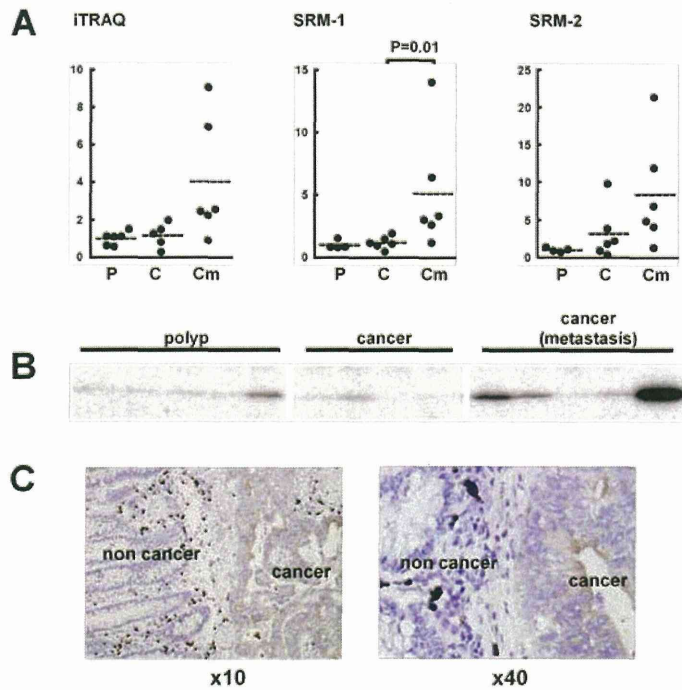


図4：大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質Yの検証
 A：SRM/MRMでの検証 B：ウエスタンブロットでの検証 C：免疫染色での検証（左図 x10、右図 x40）

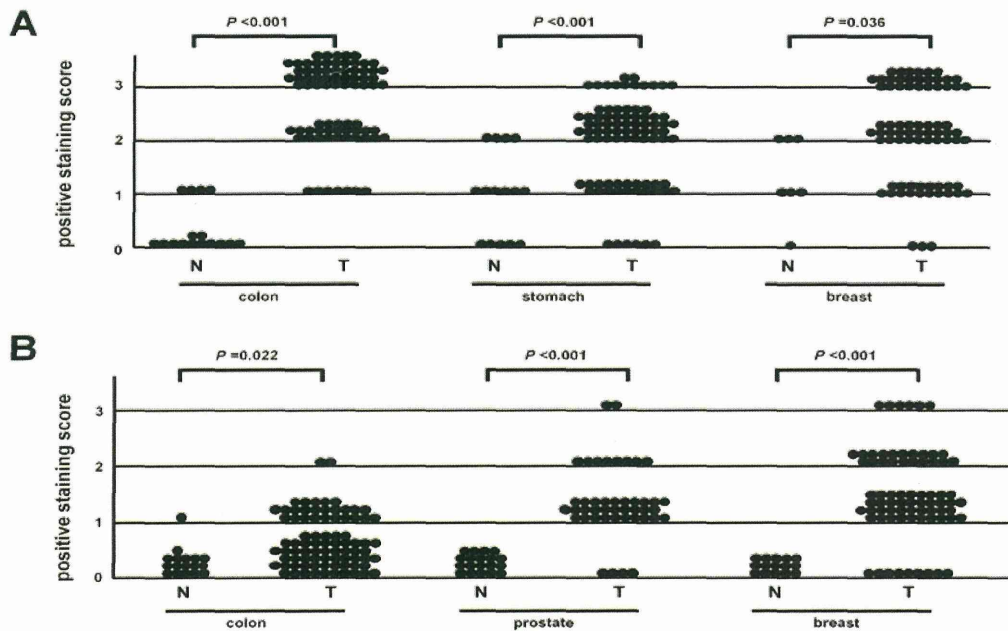


図5：大腸癌組織膜タンパク質バイオマーカー候補タンパク質XとYの組織アレイを用いた検証
 免疫染色強度で4段階に分類 A：Xタンパク質、B：Yタンパク質

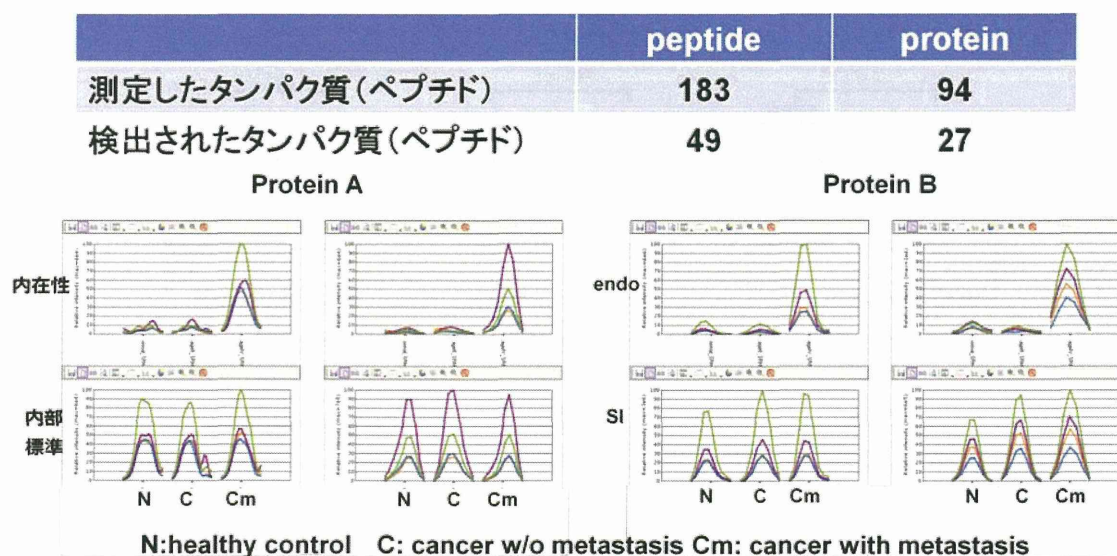
➤ポリープと癌の間で発現変化の見られたタンパク質:66個
 →創薬ターゲット、早期診断マーカー

➤転移ありなし間で発現変化の見られたタンパク質:17個
 →創薬ターゲット、再発・予後マーカー



⇒実用化に向けて血中での検出・定量の検討

図6：大腸癌膜タンパク質バイオマーカー最終候補



⇒20個のタンパク質が大腸癌の進展に伴って変化

図7：血中exosome中の大腸癌バイオマーカー候補の検出・定量

血漿中APL1 β SRM測定

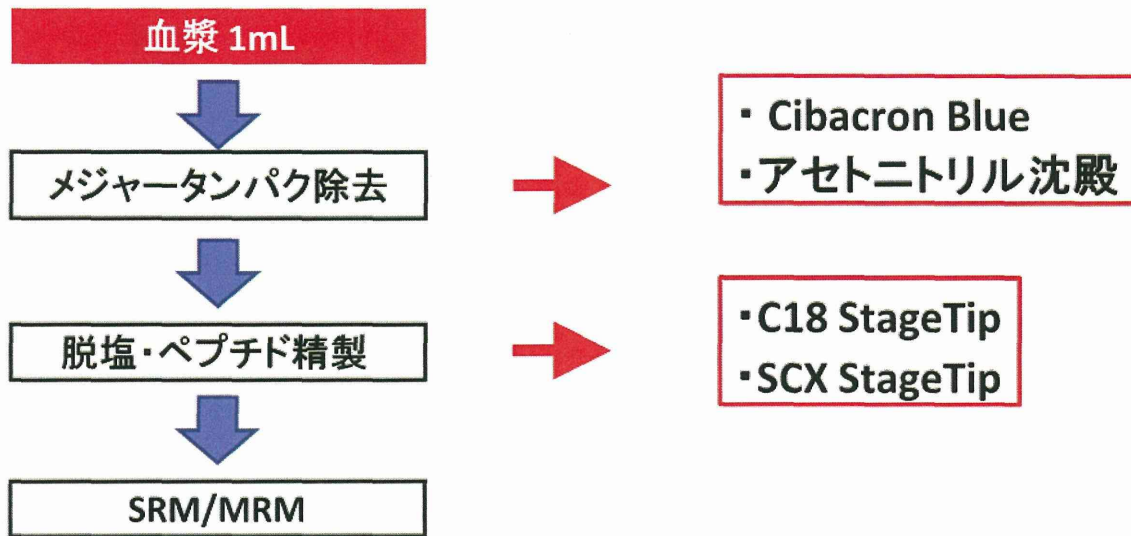


図 8 : 血漿中APL1 β 検出定量のための前処理法の検討

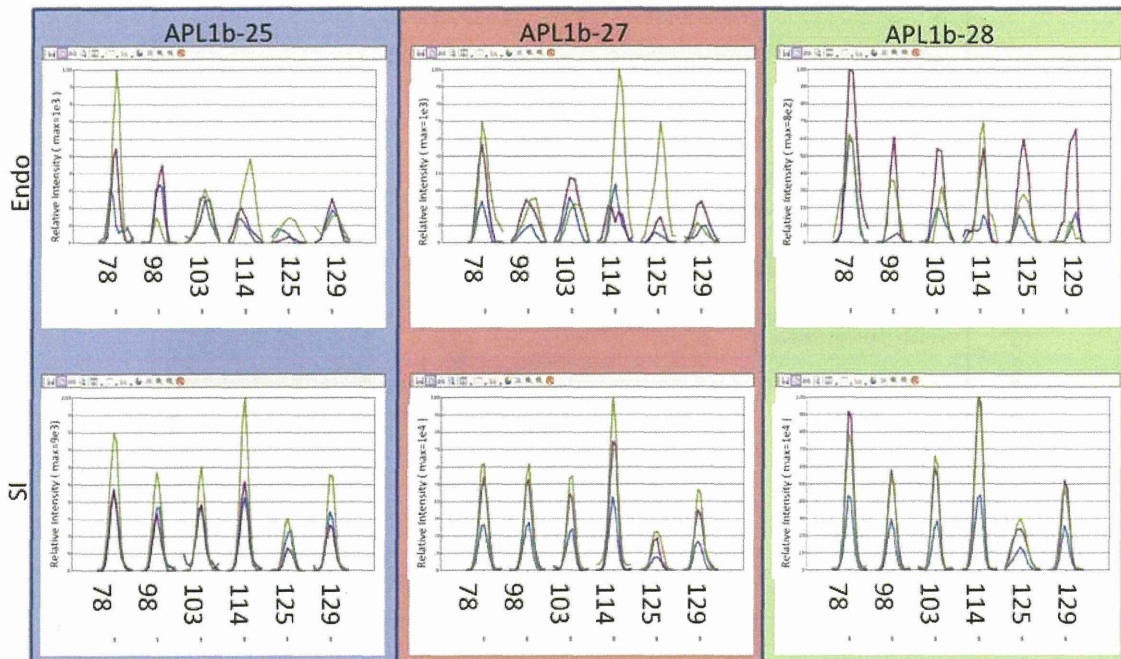


図 9 : SRM/MRMを用いた血漿中APL1 β の定量

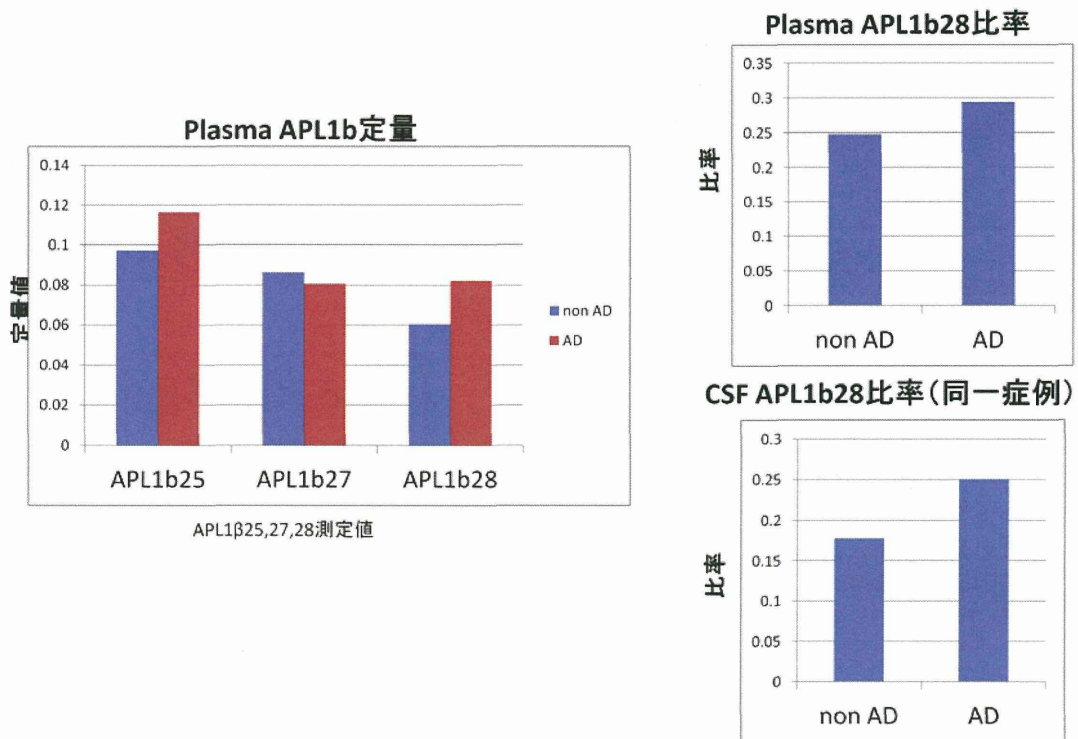
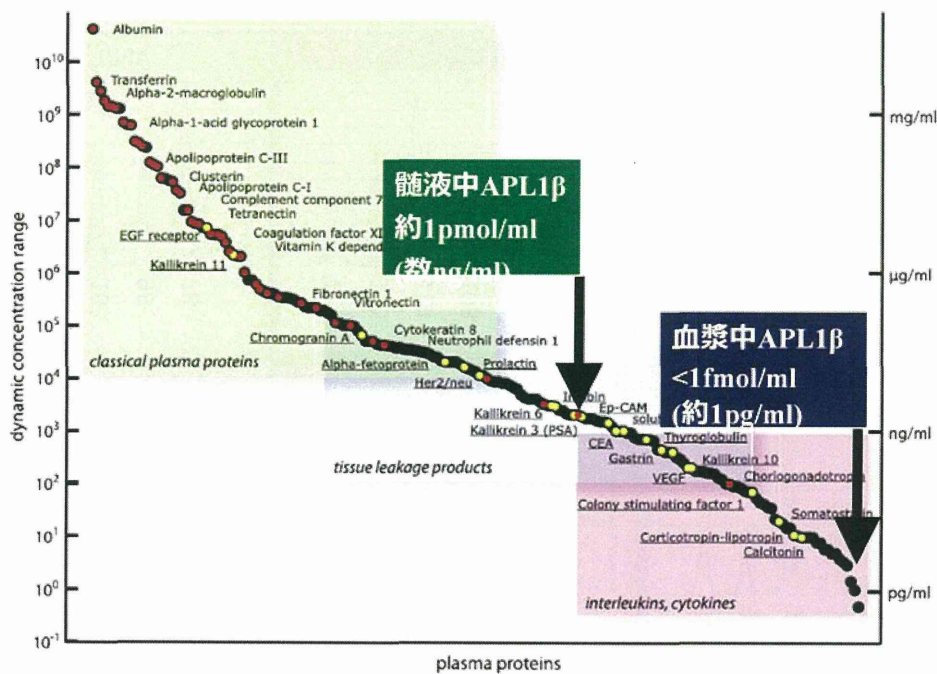


図 10 : APL1 β 28/total APL1 β 比率は血漿中と髄液中で相関する



Schiess et al., Molecular oncology 3, 33-44, 2009

図 11 : SRM/MRMを用いた血漿中 APL1 β の超高感度定量

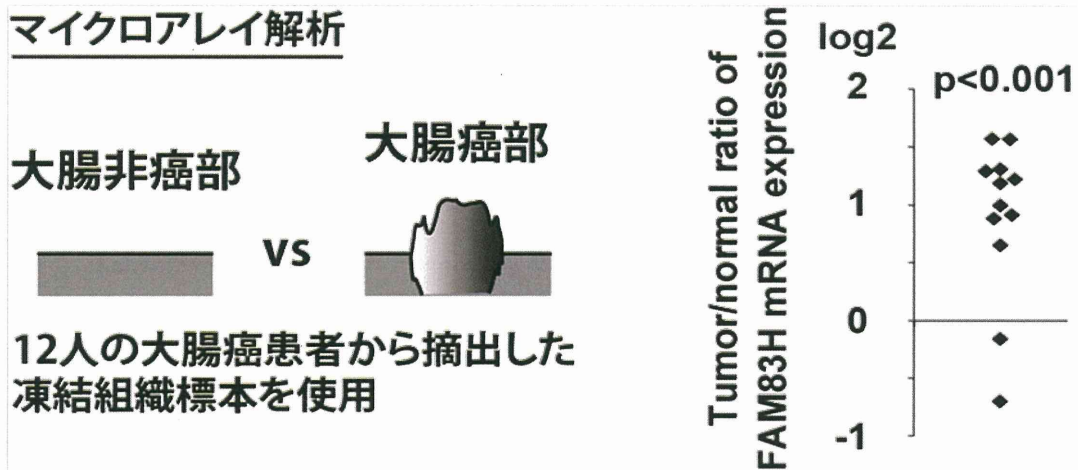


図 1 2 : FAM83Hは大腸癌で発現増大している

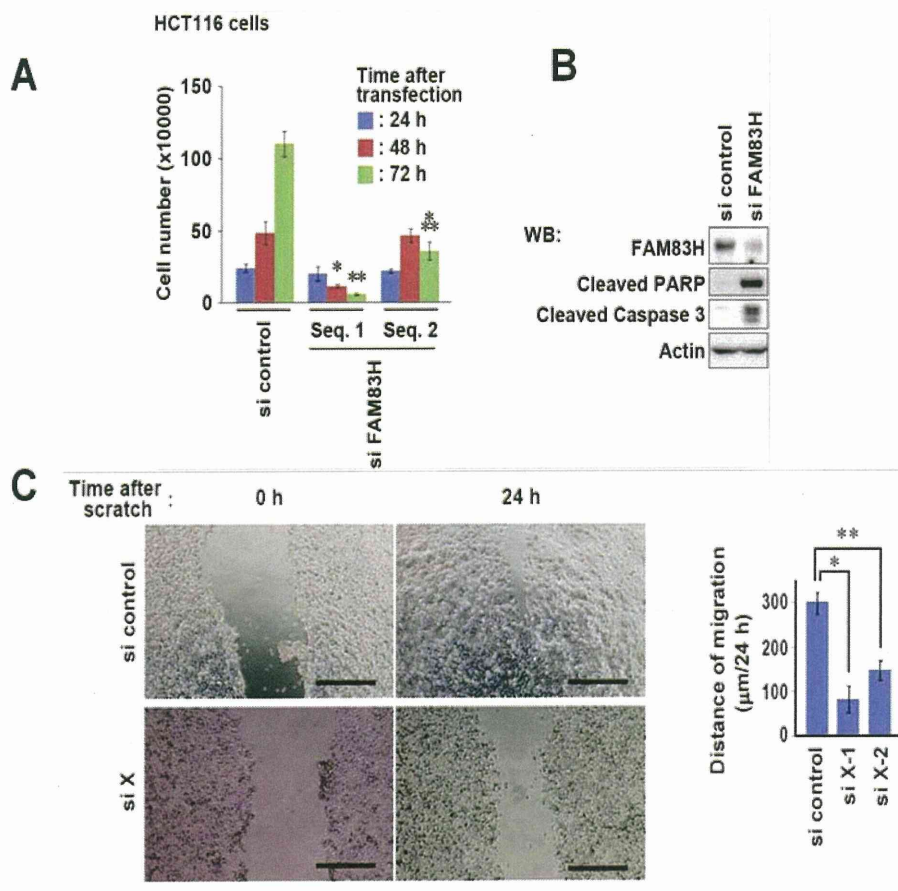


図 1 3 : FAM83Hは細胞増殖 (A)、遊走 (B) に関する

Specific interactions: 76

Identified Proteins (TOP10)	Accession	MW (kDa)	Spectral count/kDa	
			FAM83H	Control
Protein FAM83H	FA83H	130	49.0	0.0
Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19	44	15.3	0.5
Keratin, type I cytoskeletal 18	K1C18	48	11.5	0.1
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71	8.3	0.2
Protein unc-45 homolog A	UN45A	103	4.5	0.0
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B	83	4.2	0.0
Heat shock 70 kDa protein 1	HSP71	70	4.0	0.0
Plectin	PLEC	532	4.0	0.0
60S ribosomal protein L38	RL38	8	3.9	0.0
Casein kinase I isoform alpha	KC1A	39	3.5	0.0

Dynamic exclusion: OFF

Transfection:

FLAG

Keratin 8

Keratin 18

CK-1 α

IP: FLAG

Control

FAM83H-FLAG

図 1 4 : FAM83Hと相互作用する因子の解析

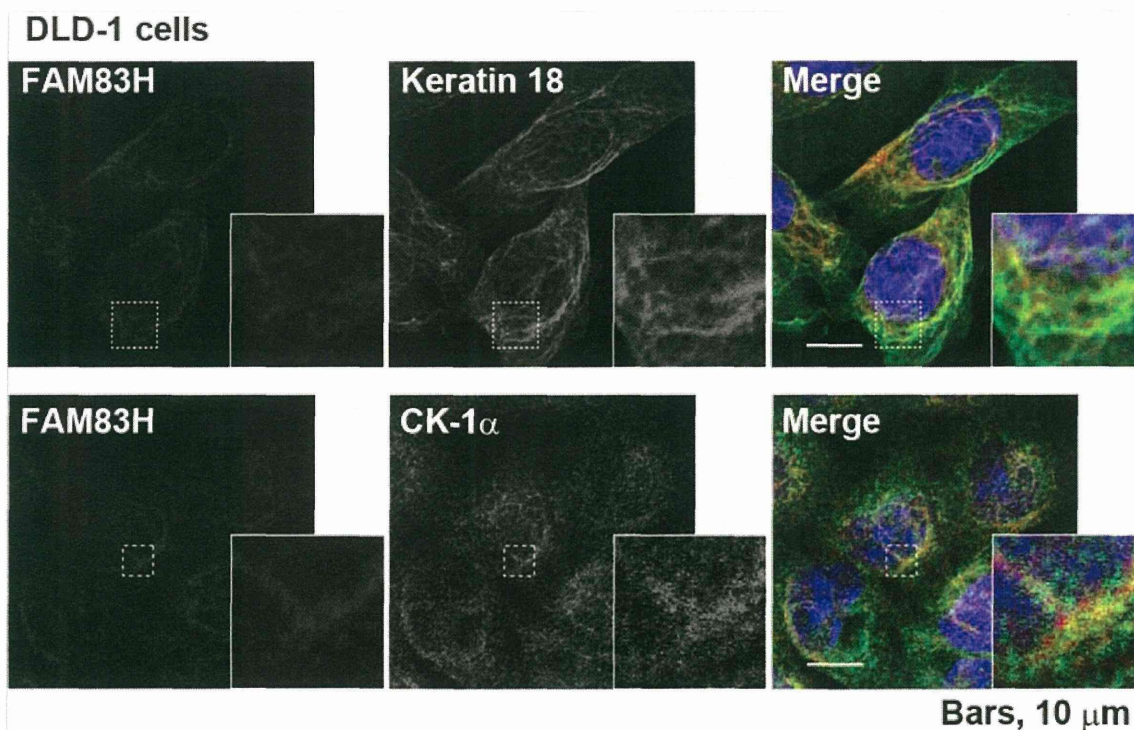


図 1 5 : FAM83HはCK-1 α , keratinと複合体を形成している

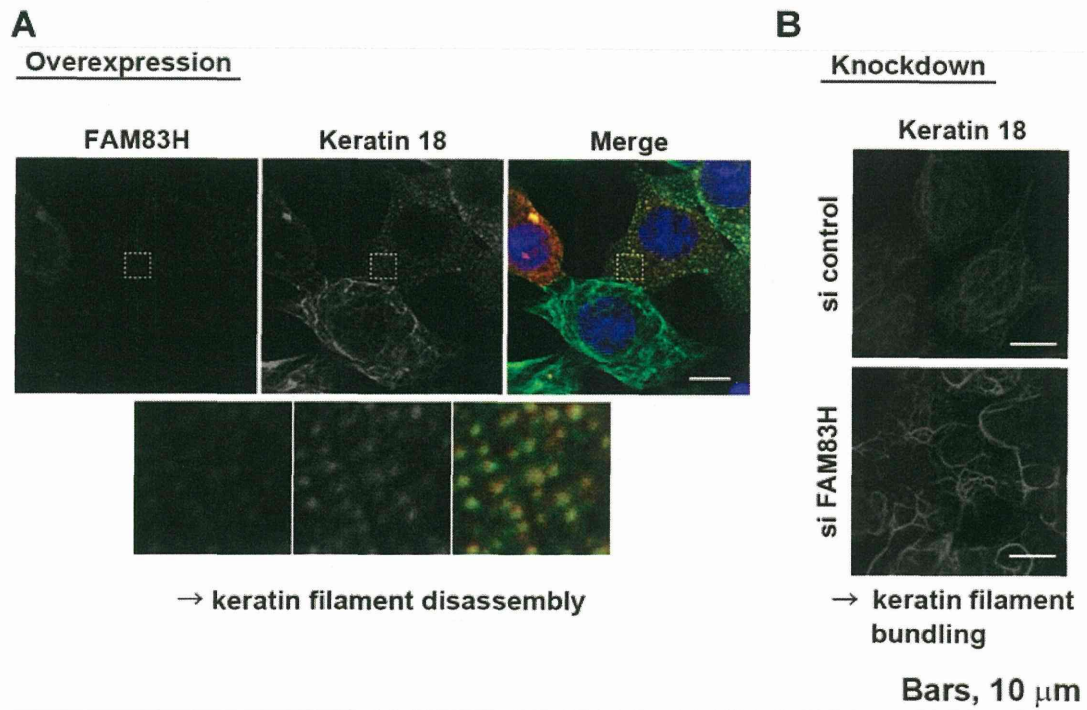


図 1 6 : FAM83Hはケラチン細胞骨格形成に関わっている

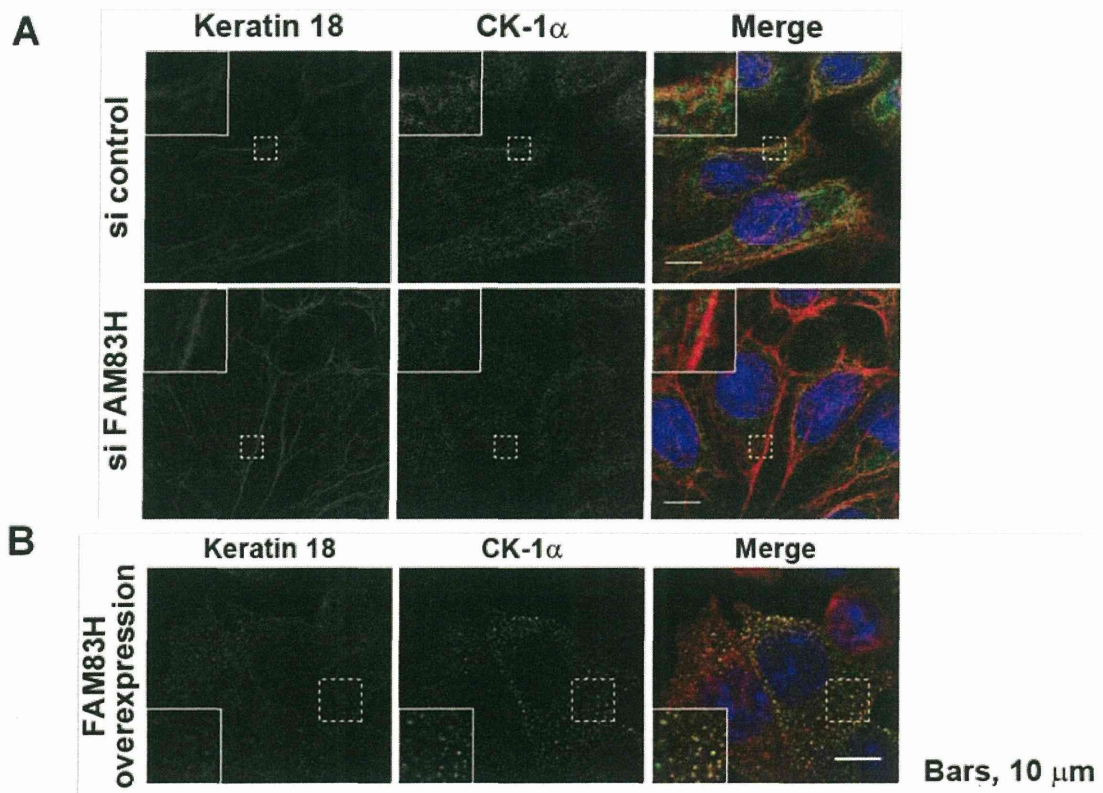
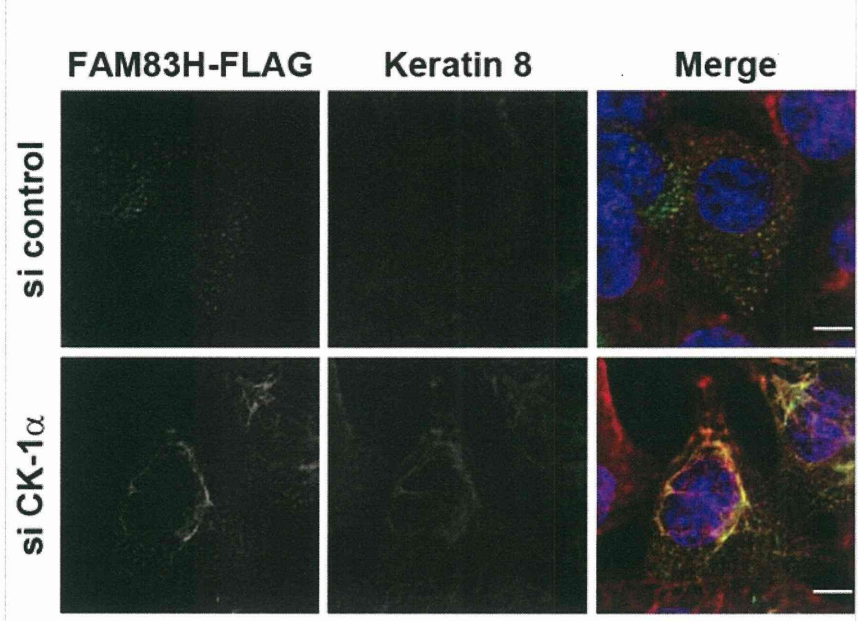


図 1 7 : FAM83HはCK-1 α のケラチン骨格への局在に関与する

FAM83H overexpression + CK-1 α knockdown



→ inhibition of keratin filament disassembly induced by FAM83H overexpression

図 1 8 : FAM83Hの細胞骨格形成制御にはCK-1 α が必要である

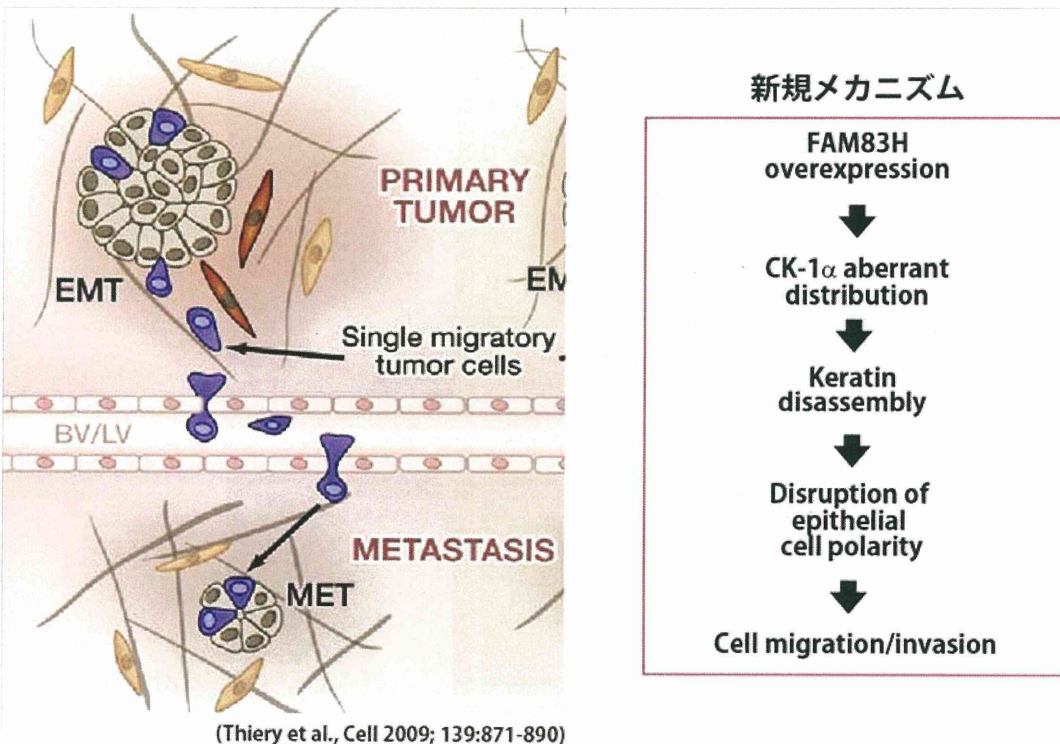


図 1 9 : FAM83Hの大腸癌浸潤のメカニズム

疾患関連蛋白質の解析基盤の研究

研究分担者 角田 慎一 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

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を示された。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。

A. 研究目的

本研究課題において、我々はこれまでに、プロテオーム創薬のボトルネックの 1 つであった「疾患状態で発現変動している数多くの候補蛋白質の中から、創薬につながる有用な蛋白質の絞り込み」を克服すべく、蛋白質の発現や機能解析に必須のモノクローナル抗体を *in vitro* で簡便に作製可能なファージ抗体ライブラリのプロテオミクスへの応用を図ってきた。最適化の結果、2 次元ディファレンシャル電気泳動法から見いだされる発現変動蛋白質をゲルから直接抽出し、それら数多くの微量抗原に対して迅速・網羅的に抗体を作製可能な「抗体プロテオミクス技術」の開発に至った。本技術を乳がん細胞と正常乳腺細胞に応用したところ、数多くの発現変動蛋白質の中から、正常乳腺組織に比べ、乳がん組織で高発現する機能未知の細胞膜蛋白質

Eph receptor A10(EphA10)を同定することに成功している。

EphA10 が属する Eph receptor ファミリーは、チロシンキナーゼ型受容体の 1 つであり、EphA2 や EphB4 などのファミリー分子が、Tumorigenesis や増殖、転移といった各種がんの悪性形質に関与していることが報告されている。また、EphA2 に対するモノクローナル抗体は、現在、臨床試験が進行しており、Eph ファミリーは創薬の観点からも注目を集めている。しかし、EphA10 に関しては、精巣に mRNA レベルで発現していることが報告されている以外、詳細な発現分布も機能も明らかにされていない新規性の高い細胞膜蛋白質である。そこで本年度は、EphA10 の発現プロファイルを解析し、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

を検証した。

B. 研究方法

B-1. Real Time PCR

乳がん組織由来の cDNA は、OriGene technologies より購入した。PCR は、左記の cDNA を Template に、10 μ l の TaqMan Gene Expression Master Mix と各 1 μ l の TaqMan probe set (EphA10: Hs01017018_m1、actin-beta: Hs99999903_m1) から、20 μ l の反応液を調製し、①50°C で 2 min、②95°C で 20 sec、③95°C で 3 sec、④60°C で 30 sec (③と④を合計 40 cycle) 反応させることで、各遺伝子を増幅させた。Threshold cycle は、デフォルトの Analyze 機能を用いて決定した。EphA10 mRNA の発現レベルは、actin-beta を用いて補正した。

統計解析にあたっては、中央値よりも発現レベルの高い症例を High expression group、低い症例を Low expression group として、有意差検定を行った。

B-2. 免疫組織化学染色

乳がん組織が搭載された組織マイクロアレイ (TMA)、並びに各種正常組織が搭載された TMA は、それぞれ US Biomax から購入した。各 TMA スライドを 60°C で 2 時間加温し、キシレンに 3 度浸すことで脱パラフィン処理した。次いで、無水エタノール、90% エタノール、75% エタノールに順次浸すことで親水化した。各 TMA スライドを DAKO Target Retrieval Solution pH 9(DAKO) に浸漬し、加温加圧装置 : Pascal(DAKO) にて組織中の抗原を賦活化させた (125°C・30 秒、90°C・10 秒)。その後、組織内在性のペルオキシダーゼをブロッキングするため、0.3% の過酸化水素水で処理し、抗ヒト EphA10 ポリクローナル抗体 (Abgent) を 30 min 室温で作用させた。洗浄後、Envision+ Dual Link(Dako) を 30 min 室温で反応させ、3,3'-diaminobenzidine にて発色させた。カウンターステインとしてマイヤーのヘマトキシ

リンを用いて核を染色した。以上の作業は、自動装置 DAKO AutoStainer(DAKO) を使用した。

各症例は、発現分布 [0 (0%), 1 (1-50%), 2 (51-100%)] と発現強度 [0 (no signal), 1 (weak), 2 (moderate) or 3 (marked)] を指標にスコアリングし、その合計が 2 以下で Low expression group、3 以上で High expression group として、有意差検定を行った。

B-3. 統計解析

全ての統計解析には、GraphPad Prism 5 version(GraphPad Software Inc.) を用いた。分割表解析には、Chi-square test または Fisher's exact test により有意差を検定した。また、2 群間・3 群間の有意差はそれぞれ、Mann-Whitney test・Kruskal-Wallis test により検定した。全ての解析を、両側検定で行い、p 値が 0.05 以下を有意差とした。

C. 研究結果

C-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。

C-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

ご承知の通り、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。

C-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。そこで本節では、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。

D. 考察

C. 研究結果に記載

E. 結論

抗体プロテオミクス技術を駆使することによって同定した新規乳がん関連蛋白質EphA10の各種ヒト組織での発現プロファイルを解析した結果、以下の知見を得た。

- EphA10は、乳がんのリンパ節転移陰性症例に比較して、陽性症例において発現割合・発現量が有意に高い。
- EphA10は、乳がんのステージの進行に伴って、発現割合・発現量が有意に高くなる。
- EphA10は、乳がんの既存薬である抗Her2抗体や抗ホルモン剤の標的となるHer2、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現と無関係に発現し、これら全ての発現が陰性のために有効な治療法のないトリプルネガティブ乳がん症例にも発現が認められた。
- EphA10の生体分布は、今回検討した組