

图 3

*b*

*a*

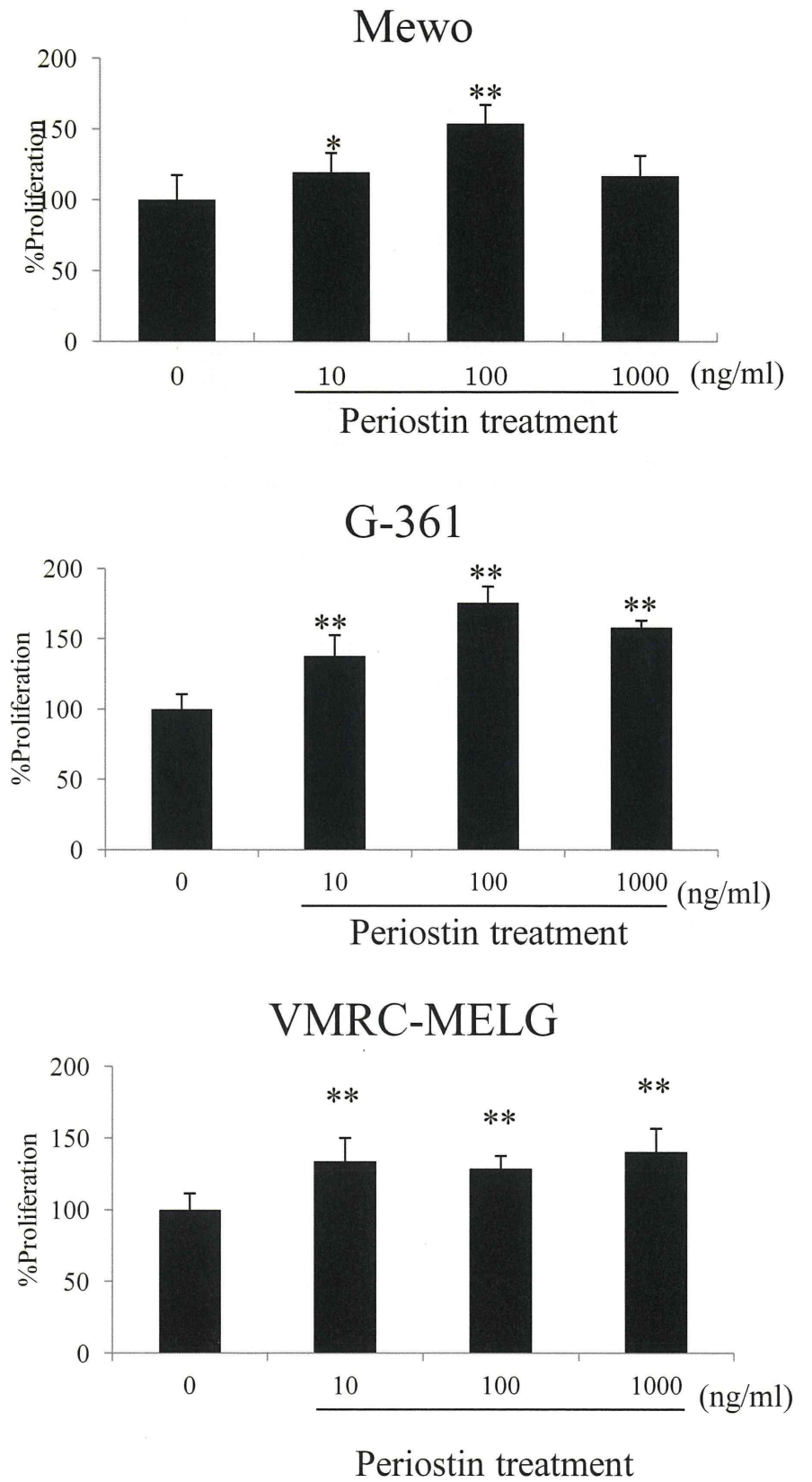
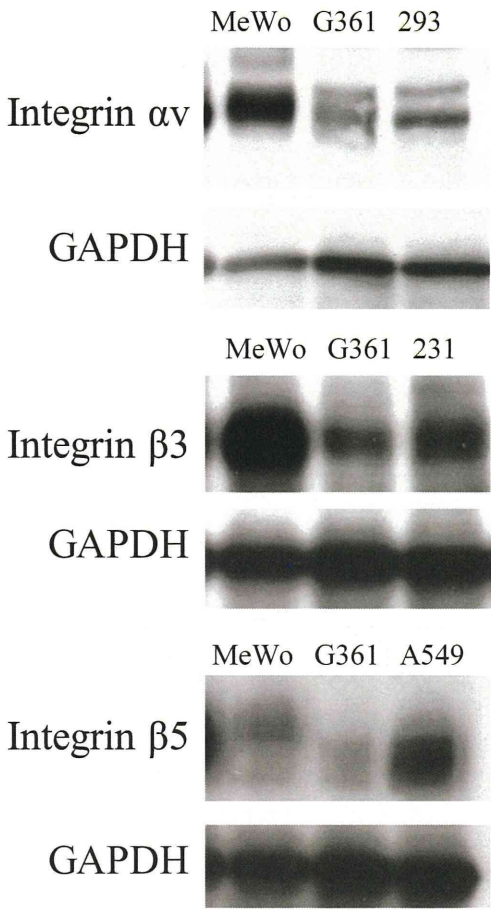


图 3

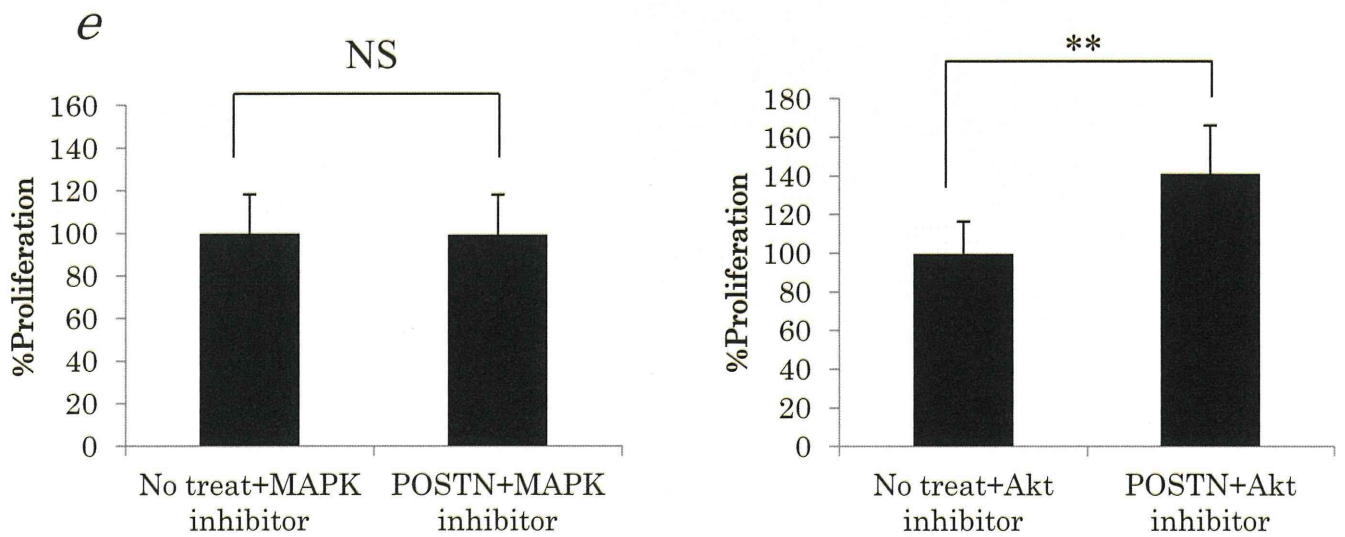
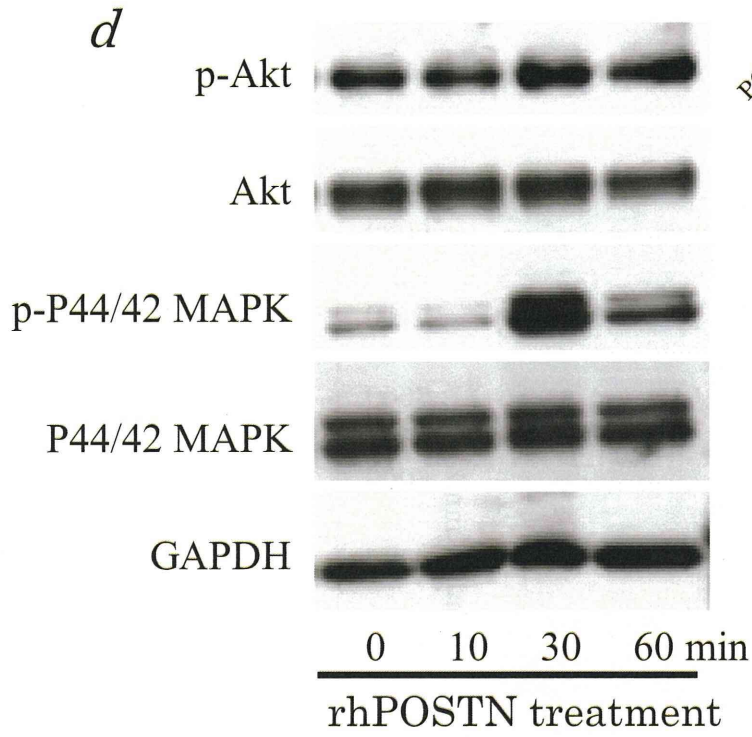
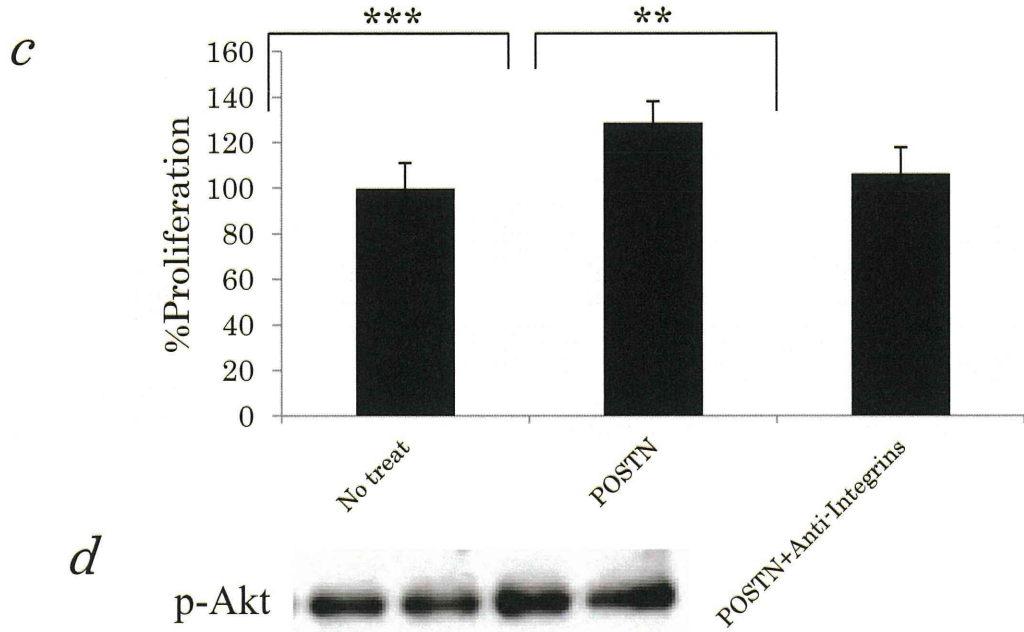
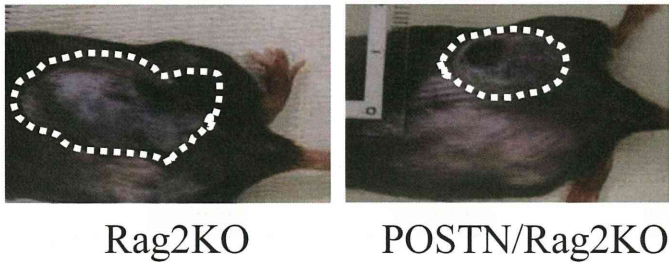
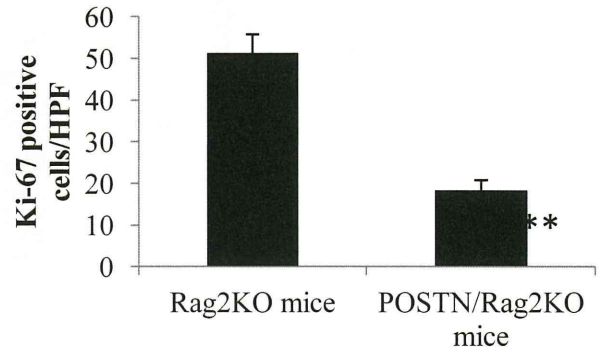


图 4

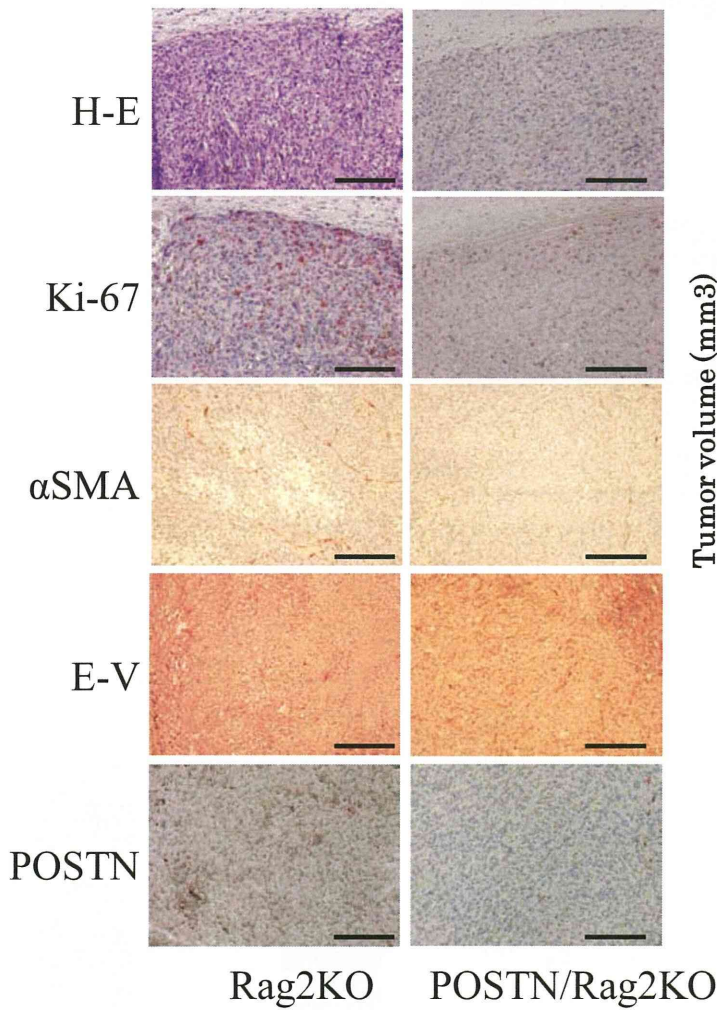
a



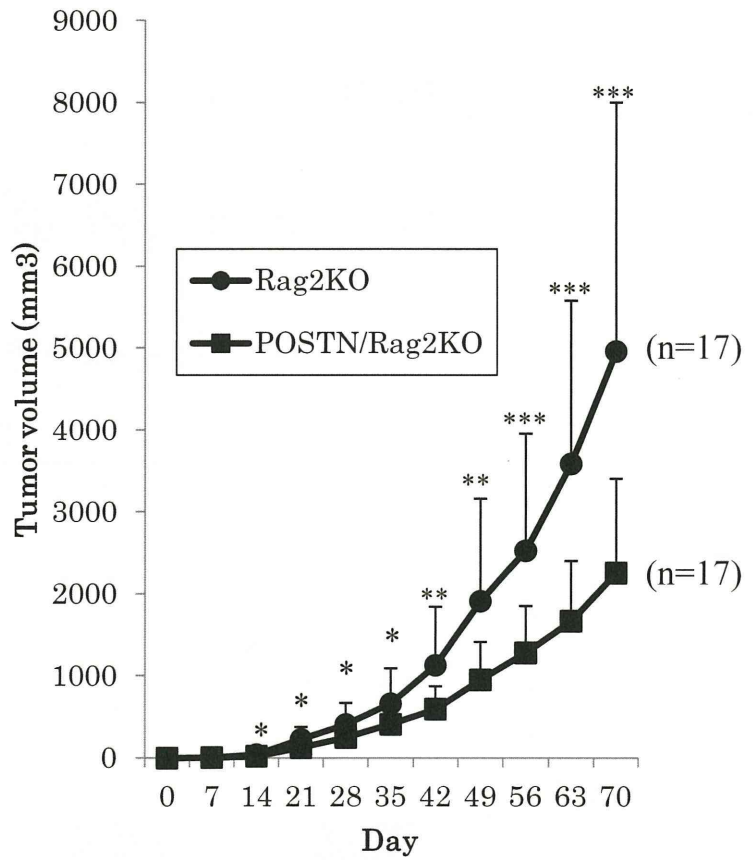
c



b



d



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

研究分担者 中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

近年、ゲノム情報の解明を背景に、トランスクリプトーム解析に代表される網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結びつくタンパク質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白であり、ゲノム情報の整備と質量分析計の高感度化を追い風に、プロテオーム解析への期待が過熱している。プロテオーム解析によってタンパク質の時空間的発現情報のみならず、タンパク質の相互作用や翻訳後修飾情報などの多次元情報を取得することが可能である。ところがこの中でもっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、他に比べて極端に発展途上であり、これを可能にする画期的な技術の開発が渴望されている。

LC-MS/MS 解析によるショットガン定量プロテオミクスは基本的にデータ依存的な自動 MS/MS 解析によっているため、何か意味のあ

るものが偶然“見つかる”ことを期待しつつ兎に角たくさんタンパク質を同定し比較する方法である。確かにこの方法である程度の網羅性を得ることが可能であるが、ショットガン法の技術的な問題点は、網羅性を上げるためには試料の分画を必要とするため、網羅性とスループットが完全にトレードオフの関係にあることである。また、偶然に任せている以上、検出されなかったものが、本当は発現しているのにたまたま同定できなかったのか、検出感度以下しか発現していないのかわからないという問題点を内包する。つまりショットガン解析では定量情報はあくまで同定結果に付随して得られるものであり、同定できなければ変動していたのかを知ることはできない。

そこでわれわれは、従来のディスカバリーアプローチから、ターゲットアプローチとして最近注目を集めている MRM (Multiple reaction monitoring)[あるいは SRM (Selected reaction monitoring)とも呼ばれる]への転換を考えた。

MRMは三連四重極型質量分析計の定量用測定モードであり、少数の検体のバリデーションには適するが、多くのタンパク質を網羅的に同定・定量することは本質的に難しいとされてきた。われわれの研究はこの障壁を乗り越えて、抜本的にMRMを改良し、将来的に大深度プロテオミクス（ディープ・プロテオミクス）を達成することによって、新たなバイオマーカー探索の時代を築くことを目的とする。

本年度は昨年度実施した全プロテオームに対する特異的ペプチド（Proteotypic peptide: PTP）情報の中からさらに効果的なペプチドの選定やそのライブラリー化、さらにはこれらの情報を用いたヒト培養細胞における主要代謝酵素の絶対定量を実施した。

## B. 研究方法

本年度は昨年度、開発したヒト全プロテオーム（ヒト全遺伝子の約8割を網羅する17,000種類）に対するPTP情報を元に、1) これらのPTPが実際に利用出来るか否かを組換えタンパク質を対象としたverificationを実施と、実証済みMRMメソッドを登録したVerifiedMRMメソッドライブラリーの構築、2) これらの情報を用いて様々なヒト培養細胞に対して代謝酵素を中心とした絶対定量、を実施した。また、MRMを相補する方法としてSWATH法（Sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra）を用いた比較定量法およびリン酸化定量法の開発を行った。

### B-1. 実証済みMRMメソッドライブラリーの構築

これまでに取得したPTP情報を元にMRM-methodを作成し、組換えタンパク質消化物（mTRAQ標識済み）を用いて実際にMRMクロマトグラムが検出できるか否かの実証と、各ペプチドの検出感度の定量化を実施した。組換えタンパク質は1タンパク質あたり20μgで98タンパク質単位で混合し、精製を行った。

これらのタンパク質を変性後、酵素消化を行い、50倍希釈したものを1μlを質量分析計に導入しMRM測定を行った。得られたデータをMultiQuantにてクロマトグラムのピーク検出を行い、手作業による確認後、各ピークの面積値および強度値をデータベースに入力した。現在、18000タンパク質のうち、約半数に対して同実証実験を完了している。既に検証済みのタンパク質セット中には主要パスウェイ構成タンパク質や代謝経路構成タンパク質などがほぼ全て含まれており、現時点で十分にパスウェイ単位でのタンパク質絶対定量が即時可能な状況になっている。

### B-2. ヒト培養細胞における代謝経路の絶対定量

ヒト培養細胞（HeLa, HEK293, U2OS, T98G, HepG2, HCT116, SW480, MCF7, Jurkat, Namalwa, SKOV3, TIG1, TIG3, WI38, NTERA-2 など）から2% SDS/7 M urea/100 mM Tris-HClにてタンパク質を抽出し、BCAアッセイによるタンパク質定量を実施し、それぞれ200μgを1.5 ml チューブに取り分けてメタノール・クロホルム法によって塩、界面活性剤、および夾雑物の除去を行った。得られたタンパク質沈殿を7 M グアニジン塩酸塩・500 mM triethylammonium bicarbonateバッファーにて可溶化し、65°C, 15 min 加熱処理後、超純水にて4倍希釈を行った。これに2μgのLys-Cを添加し、37°C, 3 h 処理後、さらに2倍希釈し、1μg trypsinを添加後、37°C, 4 h インキュベーションを行った。さらに1μg trypsinを加えて一晩37°Cにてインキュベーション後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥ペプチドを15μlの超純水に再溶解し、50μlのイソプロパノールおよび20μlのmTRAQΔ0試薬を添加し、ボルテックス後、室温にて2 h 反応させ、その後再度凍結乾燥を行った。これらを200μg/mlとなるよう再溶解後、1μg相当をLC-MS用バイアルに分注し、mTRAQΔ4標識済み内部標準を原液0.04μl相当を添加し、総量10μlとした後、2μlをLC-MSに導入した

(200 ng 消化物相当)。計測対象は中心代謝経路を構成する 107 種類のタンパク質に関して全ての細胞で MRM 計測を実施するとともに、一部の細胞においては約 1200 種類の全代謝経路セット (96 タンパク質 12 セット) に関して実施した。

### B-3. SWATH 法による絶対定量法およびリン酸化定量法の確立

われわれは組換えタンパク質による事前情報取得と組み合わせることで大規模な MRM を可能とするプラットフォームを構築してきた。しかしながら、本方法を用いた場合、現状ではヒトタンパク質の網羅的絶対定量は物理的に困難である。そこで MRM 法の解析対象タンパク質の数的限界を解消する方法として親イオン MS スペクトルデータ非依存的な MS/MS 取得法である SWATH 法を用いることを検討した。SWATH 法は網羅的に MRM 様データを取得できるが、そのデータの帰属が別途取得した MS/MS スペクトルライブラリーを利用する必要がある。そこで、われわれが保有する組み換えタンパク質リソースを用いて SWATH 用事前情報ライブラリーを構築した。SWATH 法は現在の仕様ではラベルフリー法に向いているため、mTRAQ 標識前の組換えタンパク質消化物を IDA モードにて LC-MS/MS 解析し、得られた結果を MASCOT および ProteinPilot にて解析し、事前情報ライブラリーを構築した。また、リン酸化ペプチドについても同様の解析を行うため EGF 刺激後の HeLa 細胞消化物を鉄イオンキレートカラムに通すことでリン酸化ペプチドを精製し、ライブラリー調製用試料とし、同様に IDA モードによる LC-MS/MS 解析と MASCOT/ Protein Pilot 解析を実施した。

### C. 研究結果

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、われわれは組み換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定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。

### D. 考察

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定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、組み換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定量の実現が期待できる。

## E. 結論

より信頼性の高いMRM methodライブラリーの構築によって容易に多検体でのMRM解析が可能となり、精密なタンパク質発現絶対量の計測が実施できた。また、SWATH法を導入することでより網羅的な絶対定量法の構築の目処がたった。さらにSWATH法のリン酸化定量解析への応用の可能性も示すことができた。これらの方法を組み合わせることで容易にパスウェイワイド・システムワイドなタンパク質の絶対量計測やリン酸化変動計測が可能であり、バイオマーカー探索実施のための大規模データ取得において次世代の有効な手段となることが十分に期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S.W., Nakayama, K.I. & Nakayama, K., Lo, K.W. Regulation of APC/CCdc20

activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene* **31**, 1975-87 (2012).

2. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T. & Nakayama, K.I. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis. *J. Proteome Res.* **11**, 3175-85 (2012).
3. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa, A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Liu, N., Niida, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Yamamoto, T. & Kitagawa, M. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One* **7**, e36249 (2012).
4. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H. & Kitagawa, M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBO J.* **31**, 2365-77 (2012).
5. Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y., Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K., Flores, L.G., Shao, Y., Hazle, J.D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M.C., Nakayama, K.I. & Lin, H.K. The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis. *Cell* **149**, 1098-1111 (2012).
6. Fukushima, H., Matsumoto, A., Inuzuka, H., Zhai, B., Lau, A.W., Wan, L., Gao, D., Shaik, S., Yuan, M., Gygi, S.P., Jimi, E., Asara, J.M., Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Wei, W. SCF(Fbw7) modulates the NFkappaB signaling pathway by targeting NFkappaB2 for ubiquitination and destruction. *Cell Rep.* **1**, 434-43 (2012).

7. Ellman, M.B., Kim, J.S., An, H.S., Kroin, J.S., Li, X., Chen, D., Yan, D., Buechter, D.D., Nakayama, K., Liu, B., Morgan, S. & Im, H.J. The pathophysiologic role of the protein kinase Cdelta pathway in the intervertebral discs of rabbits and mice: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Arthritis Rheum.* **64**, 1950-59 (2012).
8. Grim, J.E., Knoblaugh, S.E., Guthrie, K.A., Hagar, A., Swanger, J., Hespelt, J., Delrow, J.J., Small, T., Grady, W.M., Nakayama, K.I. & Clurman, B.E. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2160-67 (2012).
9. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* **32**, 1921-32 (2012).
10. Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Tanaka, F., Sato, T., Toh, H., Sudo, T., Iwaya, T., Tanaka, Y., Onoyama, I., Kuwano, H., Nakayama, K.I. & Mori, M. Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **41**, 253-9 (2012).
11. Kita, Y., Nishiyama, M. & Nakayama, K.I. Identification of CHD7(S) as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7(L). *Genes Cells* **17**, 536-47 (2012).
12. Hoshi, H., Hao, W., Fujita, Y., Funayama, A., Miyauchi, Y., Hashimoto, K., Miyamoto, K., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, H., Yoshida, S., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T., Sano, M., Fukuda, K., Ohsawa, I., Ohta, S., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Toyama, Y. & Miyamoto, T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2015-23 (2012).
13. Okita, Y., Matsumoto, A., Yumimoto, K., Isoshita, R. & Nakayama, K.I. Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation. *Genes Cells* **17**, 768-77 (2012).
14. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 285-92 (2012).
15. 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).
16. Cremasco, V., Decker, C.E., Stumpo, D., Blackshear, P.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Lupu, T.S., Graham, D.B., Novack, D.V. & Faccio, R. Protein kinase C-delta deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2452-63 (2012).
17. Saita, S., Shirane, M. & Nakayama, K.I. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.* **4**, 1410 (2013).



18. Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K.I. & Fukada, Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106-18 (2013).
  19. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A. & Nakayama, K.I. Ablation of fbwx7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* **23**, 347-61 (2013).
  20. Reavie, L., Buckley, S.M., Loizou, E., Takeishi, S., Aranda-Orgilles, B., Ndiaye-Lobry, D., Abdel-Wahab, O., Ibrahim, S., Nakayama, K.I. & Aifantis, I. Regulation of c-Myc ubiquitination controls chronic myelogenous leukemia initiation and progression. *Cancer Cell* **23**, 362-75 (2013).
  21. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J.* **32**, 970- 81 (2013).
2. 学会発表
    1. 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. 基生研研究会「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).
    2. Nakayama, K.I.: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. 10th Stem Cell Research Symposium. (Invited speaker) Awaji.5/31 (2012).
    3. 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ト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).
    4. 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ト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).
    5. 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ト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).
    6. 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).
    7. 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).
    8. 中山敬一, 松本雅記, 押川清孝, 松崎英美子: 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).
    9. 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).
    10. 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).
    11. 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).
    12. 松本雅記, 松崎英美子, 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).

13. 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).
14. 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)
15. 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).
16. 橋本 寛, 松崎英美子, 細田將太郎, 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).
17. 細田將太郎, 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).
18. 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)
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. 大西隆史, 橋本 寛, 細田將太郎, 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).
23. 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).
24. 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).
25. 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).
26. 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).
27. 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).
28. 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).
29. 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).
30. 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).
31. 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).
32. 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).
33. 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).
34. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, 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).
35. 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).
36. 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).
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用

研究分担者 平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センター センター長・  
大学院生命ナノシステム科学研究科生体超分子システム科学専攻 教授

### 研究要旨

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。

#### A. 研究目的

上皮性卵巣癌は、主に漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌および明細胞腺癌の4種類の組織型に分類される。これらの中で明細胞腺癌(CCA)は化学療法に対する抵抗性と転移浸潤能が高く、早期に発見されても多数の予後不良例が見られる悪性度の高い組織型である。卵巣癌組織型の中で CCA の占める割合は、欧米諸国における発生頻度は5~6%であるのに対し、日本では20%を越えており、わが国における発生頻度は明らかに高い。一方、卵巣腫瘍マーカーとして広く使用されている CA125 の発現は、CCA では低いことが多い上、CA125 は子宮内膜症や良性卵巣腫瘍でも陽性になることがある。このような状況から、CA125 より精度の高い CCA 診断マーカーの開発が強く望まれている。

前年度は、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）されるタンパク質を同定した。培養細胞からタンパク質は、生体内で癌細胞から疾患によって分泌される可能性が高い。実際に ELISA によって、明細胞腺癌関連分泌タンパク質の中には、血清でも明細胞腺癌により特徴的

な発現変動を示す診断マーカー候補タンパク質が高い確率で見いだされた。また、現段階では、予め免疫沈降によって濃縮精製する必要があるが、明細胞腺癌関連分泌タンパク質を多重反応モニタリング (MRM) によって定量的に検出できることがわかった。今年度は、培養細胞から分泌された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質の一つである **TFPI2** の臨床的有用性を評価した。

#### B. 研究方法

##### 1) 試料

卵巣明細胞腺癌細胞株4種類、非明細胞腺癌細胞株4種類を用いて、培地に分泌された **TFPI2** 量を解析した。また、健常女性30名、子宮内膜症患者30名および明細胞腺癌患者50名の血清を用いて、血清中の **TFPI2** 量を解析した。

##### 2) 抗 **TFPI2** モノクローナル抗体の作製

**TFPI2** に対するモノクローナル抗体を作製した。

##### 3) 発現解析

**TFPI2** が卵巣癌細胞株から分泌されているかどうか、培養上清のタンパク質を SDS ゲル電気泳動で分離し、ウエスタンブロッティングを行って調べた。また、サンドイッチ ELISA

法に基づく自動イムノアッセイ系 (ELISA 測定) を構築し、培養上清中の TFP12 を測定することによって明細胞腺癌を識別できるかどうか調べた。また、本アッセイ系を用いて、卵巢明細胞腺癌患者検体における血清中 TFP12 の濃度が年齢や臨床病期によって際があるかどうかを調べた。

#### 4) ROC 曲線の解析

感度 (真陽性率) と偽陽性率 (1 - 特異度) とから、TFP12 の ROC 曲線を描き、診断マーカーとしての精度 (検出力の高さと確実性) を評価した。

#### (倫理面への配慮)

提供者の同意を得て採取した試料を使用した。

### C. 研究結果

#### <結果>

本抗体に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、種々の細胞の培養上清に対して免疫沈降を行ったところ、TFP12 は明細胞腺癌細胞株から数本のバンドとして検出され、作製した抗体が効率よく目的のタンパク質を捉えていることが確認された (図 1)。

この抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法に基づく自動イムノ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 (図 1C)。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 TFP12 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 TFP12 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 TFP12 の濃度は、年齢 (図 2C)、臨床病期 (図 2D) 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 TFP12 濃度を測定したところ、予想に沿って、妊娠月例に伴い TFP12 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 TFP12 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 TFP12 (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 TFP12 (AUC 0.93) の方が高かった (図 3)。したがって、TFP12 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 (図 4)。

### D. 考察

上皮性卵巢癌の組織型の中で、卵巢明細胞腺癌は日本での増加傾向が指摘され、他の卵巢癌組織型に比べ予後不良であることから、卵巢明細胞腺癌の診断、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、他の卵巢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。代表的卵巢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)他の卵巢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、そのうちの一つである TFP12 の臨床的有用性を評価した。

ROC 解析の結果から、TFP12 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。

## E. 結論

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中に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ものを見いだすことができた。培養細胞から培地に分泌される疾患関連タンパク質を解析すれば、効率的に血清中の診断マーカー候補タンパク質を検出することができると考えられた。

F. 健康危険情報  
なし。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Kohda, K., Kakegawa, W., Matsuda, S., Yamamoto, T., Hirano, H. & Yuzaki, M. Gating of LTD by  $\delta 2$  glutamate receptors-a new mechanism by coordinated interaction between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E948-57 (2013).
2. Satake, T., Otsuki, K., Banba, Y., Suenaga, J., Hirano, H., Yamanaka, Y., Ohno, S. & Hirai, S. -I. The interaction of Kinesin-1 with its adaptor protein JIP1 can be regulated via proteins binding to the JIP1-PTB domain. *BMC Cell Biology*, **14**, 12 (2013).
3. Takahashi, E., Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Hirano, H., Kasuga, M. & Kaburagi, Y. Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK- $A^y$  mouse model using the iTRAQ technique. *J. Proteomics*, in press.
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. The integrated view of human chromosome X-centric proteome project. *J. Proteome Res.* **12**, 58-61 (2013).
5. Endoh, K., Nishi, M., Ishiguro, H., Uemura, H., Miyagi, Y., Aoki, I., Hirano, H., Kubota, Y. & Ryo, A. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *Prostate* **72**, 626-37 (2012).
6. Izumi, N., Yamashita, A., Hirano, H. & Ohno, S. Heat shock protein 90 regulates phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase family proteins together with the RUVBL1/2 and Tel2-containing co-factor complex. *Cancer Sci.* **103**, 50-7 (2012).
7. Kimura, A., Kato, Y. & Hirano, H. N-Myristoylation of the Rpt2 subunit regulates intracellular localization of the yeast 26S proteasome. *Biochemistry* **51**, 8856-66 (2012).
8. Kurata, Y., Kimura, Y., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Okamoto, H., Masaoka, T., Nagoya, H., Araki, K., Moriyama, S., Hirano, H. & Mori, T. Effects of growth hormone on the salmon pituitary

proteome. *J. Proteomics* **75**,1718-31 (2012).

9. Yoshizawa, T., Shimizu, T., Hirano, H., Sato, M. & Hashimoto H. Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo- $\beta$ -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18710-16 (2012).
- G-2. 著書・総説
1. 平野 久: プロテオミクス, 高山光男, 早川滋雄, 瀧浪欣彦, 和田芳直編, 現代質量分析学, 化学同人, 京都, p. 293-304, 2012.
  2. Ino, Y., Kazamaki, R. & Hirano, H.: On-membrane identification of gel-resolved proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). In: *Modern Methods in Protein Chemistry* (Tschesche, H. ed.) Walter De Gruyter, Berlin, p. 113-126, 2012.
  3. 木村弥生, 平野 久: LC/MS/MSによる疾患プロテオーム解析, 試料分析講座 タンパク質分析(日本分析化学会編), 丸善出版, 2012.
  4. 木村弥生, 野村文子, 井野洋子, 小原 收, 平野 久: Phos-tag アガロースおよび質量分析装置を用いたリン酸化ペプチドのショットガン分析. *生物物理化学* **56**; s25-28, 2012.
  5. 木村弥生, 永田佳代子, 平野 久, 小原 收: 二次元 Phos-tag 親和性電気泳動. *生物物理化学*. **56**; s21-24, 2012.
  6. Stephani-Kosin, K., Hirano, H. & Kamp, R. M. : Proteomic analysis of Duchenne muscular dystrophy (DMD). In *Modern Methods in Protein Chemistry* (Tschesche, H. ed.) Walter De Gruyter, Berlin, p. 235-248, 2012.
- G-3. 学会発表
1. 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
  2. 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
  3. 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
  4. 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
  5. 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, ハイツ・コンベンションセンター, ボストン, 2012.9.9
  6. 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. AOHUPO2012, 北京, チャイナ・ナショナル・コンベンションセンター, 2012.5. 5
  7. 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
  8. 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

9. Hirano, H.: Proteomics of co- and post-translational modifications of large protein complexes. 6th Congress of Asia and Oceania Human Proteome Organisation, Beijing, China, 2012.5.7~7
10. 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
11. 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
12. 平野 久: プロテオーム分析技術の開発、体系化と生命医学研究への応用 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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 Na<sup>+</sup>-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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鏑木康志: 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



25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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
- なし
3. その他
- なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

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  
出願人: 公立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社

出願番号: 特願 2011-179450

出願年月日: 2011 年 8 月 19 日 国内

### 2. 実用新案登録

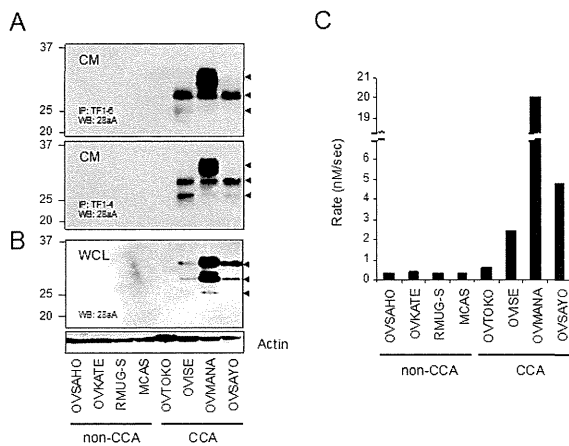


図1 抗TFPI2抗体による卵巣癌細胞株TFPI2の発現解析

A, 培養上清中のTFPI2の免疫沈降/ウエスタンブロット; B, 全細胞抽出液中のTFPI2のウエスタンブロット; C, 自動ELISA装置による培養上清中のTFPI2の測定

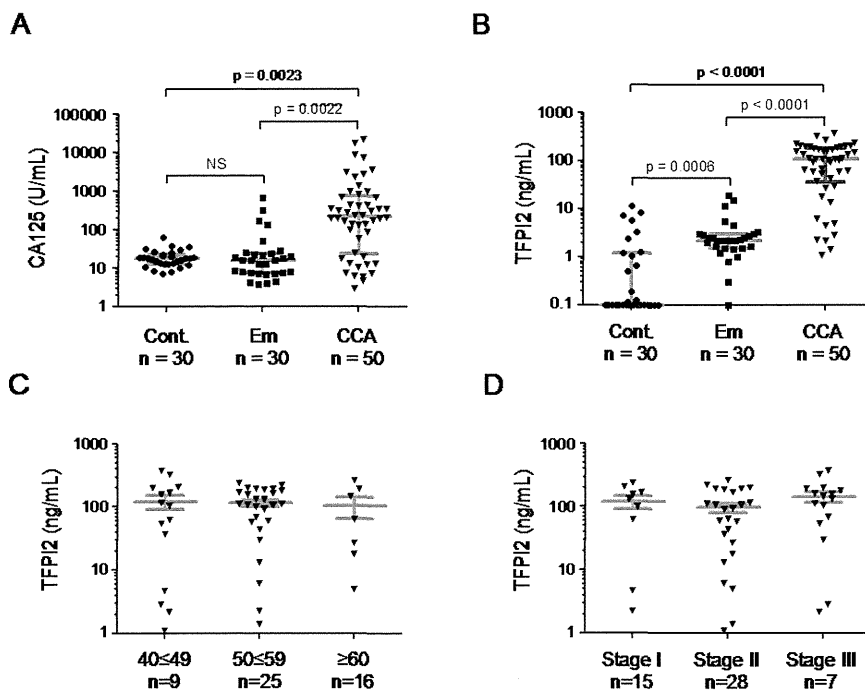


図2 抗TFPI2抗体を用いた自動免疫アッセイ計によるTFPI2の発現解析

A, 子宮内膜症(Em)と卵巣明細胞腺癌(CCA)患者血清におけるCA125の発現量; B, 子宮内膜症(Em)と卵巣明細胞腺癌(CCA)患者血清におけるTFPI2の発現量; C, 卵巣明細胞腺癌患者の年齢とTFPI2の発現量の関係; D, 卵巣明細胞腺癌の進行とTFPI2の発現量の関係

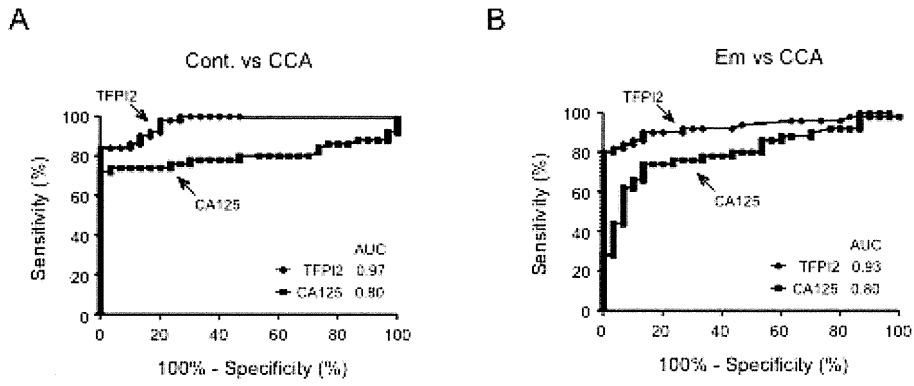


図 3 TFPI2 と CA125 の ROC 曲線

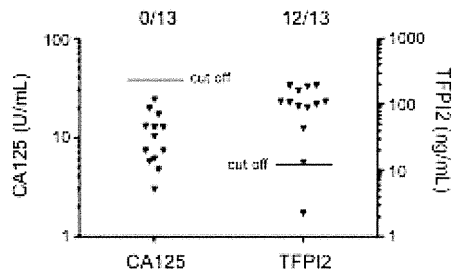


図 4 CA125 陰性の卵巣明細胞腺癌患者における血清 TFPI2 の量  
CA125 が陰性の患者でも TFPI2 は高値を示す。

## 2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 尾野 雅哉 国立がん研究センター研究所 ユニット長

### 研究要旨

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。

#### A. 研究目的

2DICAL は国立がん研究センターが開発したプロテオーム解析技術であるが、従来では検出不能であった微量たんぱく質をプロテオームリサーチセンター、国立がん研究センターが所有する最新の質量分析計と 2DICAL L を用いて解析し、多数の臨床検体からさまざまな疾患の新規バイオマーカー開発を行うことが本プロジェクトの目的である。

#### B. 研究方法

##### B-1. 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

東レ中空糸膜を用いた分画法による前処理を行い、低分子量タンパク質（～3 nm）を選択的に分画し、前立腺癌血漿 25 例、健常者血漿 15 例を 2DICAL で解析したところ、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、CAI の血中濃度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 例で測定した。また、10 例の前立腺癌原発巣を CAI による免疫染色でその発現を確認した。

##### B-2. 肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの開発

肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発のために、2DICAL を用いて肝細胞癌および非癌部肝組織のリン酸化プロテオームの

変化を解析した。肝細胞癌組織 54 例、同一症例非癌部肝組織 52 例を可溶化し、トリプシン処理を施した試料と、同試料から HAMMOC 法を用いてリン酸化ペプチド濃縮を行った試料を作成した。それぞれの試料を質量分析計で計測して、2DICAL にて解析した。

##### B-3. 2DICAL のバージョンアップ

旧来の 2DICAL のプログラム過程では、質量分析計でアノテーション情報が十分に利用できない点を改善するために、タンデムマス (MSMS) のアノテーションデータをすべて拾い上げるアルゴリズムを加えた（図 1）。

（倫理面への配慮）

国立がん研究センター、その他連携各施設の倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮した患者、および健常人より得られた血液検体を用いた。

#### C. 研究結果

##### C-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