

1. Yabu, M., Korekane, H., Takahashi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O. & Miyamoto, Y. Accumulation of free Neu5Ac-containing complex-type N-glycans in human pancreatic cancers. *Glycoconj. J.* **30**(3), 247-56 (2013).
 2. Yabu, M., Korekane, H., Hatano, K., Kaneda, Y., Nonomura, N., Sato, C., Kitajima, K. & Miyamoto, Y. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology* **23**(6), 634-42 (2013).
 3. Nomura, M., Shimbo, T., Miyamoto, Y., Fukuzawa, M. & Kaneda, Y. 13-Cis retinoic acid can enhance the antitumor activity of non-replicating Sendai virus particle against neuroblastoma. *Cancer Sci.* **104**(2), 238-44 (2013).
 4. Nakagawa, T., Moriwaki, K., Terao, N., Miyamoto, Y., Kamada, Y. & Miyoshi, E. Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. *J. Proteome Res.* **11**(5), 2798-806 (2012).
 5. 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. Strategy for SRM-based Verification of Biomarker Candidates Discovered by iTRAQ Method in Limited Breast Cancer Tissue Samples. *J. Proteome Res.* **11**(8), 4201-10 (2012).
 6. Hatano, K., Miyamoto, Y., Mori, M., Nimura, K., Nakai, Y., Nonomura, N. & Kaneda, Y. Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. *PLoS One* **7**(2), e31234 (2012).
1. Yabu Masahiko, Korekane Hiroaki, Sato Chihiro, Kitajima Ken, Miyamoto Yasuhide : 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)
- 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。

G-2. 学会発表

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 野村文夫 千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学 教授
千葉大学医学部附属病院 検査部長・遺伝子診療部長

I. プロテオーム解析により見出された原発性肝細胞癌組織高発現蛋白質に対する血中自己抗体の診断的意義

研究要旨

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

A. 研究目的

原発性肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, 以下 HCC)は本邦における部位別がん死亡数の4位である。発展途上国においても死亡率が高い。その高死亡率の理由の一つとして早期診断が容易でないことがあげられる。HCC の早期診断においては超音波、X線 CT、MRI などの画像診断が主役を占めている。しかし、画像診断は術者の技量に依存し、また高額な機器を要するためどこでも簡単に実施できるものではない。したがって、HCC の早期診断に有用な血液腫瘍マーカーの開発が求められている。

我々は以前に HCC の癌部・非癌部のプロテオームを 2D-DIGE により比較して、CHC, FTCD などの蛋白質発現量を免疫染色により評価することが HCC の組織診断に有用であることを報告した(Hepatology 2008;48:519-530)。その知見をもとに、HCC で高い発現している蛋白質に対する血中自己抗体が HCC の血清診断に利用できるか否かについて検討した。

B. 研究方法

対象は 2008 年 1 月から 2010 年 12 月の間に千葉大学医学部附属病院消化器内科を受診した計 113 名の C 型肝炎ウイルスに起因する HCC(Stage I, N=28 および Stage II, N=30 を含む)、143 名の C 型肝炎ウイルス関連肝硬変患者、50 名の慢性肝炎患者である。プロテオーム解析により肝癌組織における高発現している蛋白質に対する血中自己抗体の検出の有無を予備検討として行った結果より、血中 Ku86 抗体に焦点をあてた。血中抗 Ku86 抗体レベルは Ku86 抗原および anti-human IgG conjugated to HRP を用い、450nm の吸光度測定により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は千葉大学医学研究院の倫理委員会の承認を得て実施し、被験者より同意が得られた検体を用いた。

C. 研究結果

図1に健常人、肝硬変(LC)、HCC、慢性肝炎(CH)血中 Ku86 抗体レベルを示した(図1)。健常人、慢性肝炎、肝硬変に比し HCC において Ku86 抗体は明らかに高値を示した。また、従来から HCC の腫瘍マーカーとして測定されている AFP、PIVKA-II と Ku86 抗体の陽性率を比較すると Stage I、Stage II いずれにおいても Ku86 抗体の陽性率が最も高かった(図2A)。ROC 曲線においても Ku86 抗体の優位性を確認することができた(図2B)。

D. 考察

本研究の結果、血清 Ku86 抗体は HCC の比較的早期に陽性となることが示された。その陽性率は HCC の既存の腫瘍マーカーの AFP、PIVKA-II を上回っていた。今回の検討は C 型肝炎ウイルスに起因する HCC に限っているため、今後その他の要因、すなわち B 型肝炎ウイルス、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)関連 HCC における検討が必要であり、多施設共同研究による確認を行うべきと考える。そのため

には自己抗体の安定した測定系の確立が急務である。また、腫瘍組織中の蛋白質が抗原性を発揮する機序として過剰発現に加えて体細胞変異、翻訳後修飾などが考えられるが、早期の HCC において Ku86 抗体が陽性となる理由については今後の検討が必要である。

E. 結論

血清 Ku86 抗体は原発性肝細胞癌の早期診断マーカーとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

(共同研究者)

千葉大学医学部附属病院疾患プロテオミクスセンター

曾川一幸、野田健太、西村 基

千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学

横須賀 収、今関文夫

千葉大学大学院医学研究院臓器制御外科学

宮崎 勝

II. 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

研究要旨

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

A. 研究目的

歯周疾患は歯肉、セメント質、歯根膜、歯槽骨からなる歯周組織にみられる疾患の総称であり、進行すると歯周組織の破壊から最終的には歯牙の喪失と口腔内の機能障害を生じる疾患である。現在、三十歳以上の国民の約八割が

歯周疾患に罹患しており、患者数は約五千万人に及ぶとされている。歯周疾患はある種の細菌感染が引き金となって発症すると言われているが、病態のメカニズムには不明な点が多く、また疾患の進行度を正確に評価する客観的指標が求められている。GCF は、歯周組織の代謝

に関連する酵素やタンパク質、および、歯周組織のリモデリングによって作られる物質が数多く存在し、歯周疾患の状態を最もよく反映する体液であると考えられている。本研究では、GCF をプロテオーム解析に用いるのに適した採取方法およびタンパク質抽出法の確立および歯周疾患マーカーの探索を目的とした。

B. 研究方法

健常人 5 名、軽度～中等度歯周疾患 6 名、重度歯周疾患 5 名を GCF の採取対象とした(表 1)。今回の解析に参加したすべての対象者において、書面による説明と同意を得た。

臨床データを基にして GCF の採取部位を選択した。また質量分析精度向上のため唾液混入の可能性の少ない部位を優先した。GCF の採取にはペーパーポイント Absorbent paper points (ZIPPERER[®], Munich, Germany)を用いた採取法を試みた。簡易防湿後、ペーパーポイントを歯肉縁下に 30 秒挿入した。挿入の深さは約 2mm 程度とした。その後ペーパーポイントを除去後、30 秒後に再び同一部位にペーパーポイントを 30 秒挿入。この操作を 10 回繰り返し 10 本採取した。得られたサンプルは直ちに -80 °C にて保管した。尚、検体は匿名化し個人情報を保護した上で分析した。

GCF を含んだペーパーポイントに 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CAPS, 2 mM DTT を加え vortex 10 分 と遠心 20000 x g, 15 分後、限外濾過装置 Ultrafree-MC (Millipore, Bedford, MA)を併用し残存しているタンパク質を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法にて測定した。

アガロース二次元電気泳動法を用いたゲルベースによる GCF を対象としたプロテオーム解析の検討を行った。健常人 5 名より得られた GCF および歯肉辺縁に付着した唾液をコントロールし、タンパク質抽出後にアガロース二次元電気泳動法にてタンパクスポットを検出した。一次元目は、従来からよく用いられる固定化 pH 勾配 (IPG) ゲルに比べて多量のタンパク質を添加でき、IPG ゲルでは分離できない高分子量タンパク質の検出に適しているアガロースゲルを用いた。二次元目は SDS-PAGE を行い、

銀染色(2-D silver stain II “DAIICHI”; Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Osaka, Japan)をした。有意に発現量の異なるスポットを切り出し、トリプシン (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) によるインゲル消化後、LC-MS/MS (LTQ-XL, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) と Mascot search engine (Matrix science, London, UK) にてタンパクを同定した。

続いてショットガン法を用い、GCF の網羅的解析をおこなった。健常人 5 名から GCF を採取後 4 M urea and 100 mM ammonium bicarbonate を加えタンパク質を抽出しトリプシン消化 (Trypsin sequence grade, Roche) し、LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) と Mascot search engine (Matrix science, London, UK)にてタンパク質同定をおこなった。

タンパク質発現量の変化がみられた Dermcidin (DCD), Apolipoprotein A-I (ApoA-I), Superoxide dismutase 1 (SOD1)をウエスタンブロット法で検証した。10 μ g/ μ l 相当の GCF 抽出タンパク質を SDS-PAGE、PVDF 膜に転写後、ブロッキングをした。一次抗体に Anti-Dermcidin mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) anti-Apolipoprotein A-I mouse monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, MA) anti-Superoxidase 1 rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, MA) 二次抗体に goat anti-mouse IgG HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), goat anti-rabbit IgG HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を用い、検出は ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, Tokyo, Japan) を用いた。TotalLab TL12 imaging analysis software (Shimadzu Co., Ltd. Kyoto, Japan)により発現量を解析し、有意差検定 (Kruskal-Wallis test with the Dwass-Steel-Chritchlow-Flinger method) を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は千葉大学医学研究院の倫理委員会の承認を得て実施し、被験者より同意が得られ

た検体を用いた。

C. 研究結果

GCF をプロテオーム解析に用いるのに適した採取方法およびタンパク質抽出法の検討を行った。GCF を解析対象とした研究における一般的なタンパク質抽出法はリン酸緩衝液である PBS buffer が用いられ、GCF に PBS buffer を加えボルテックスおよび遠心後、回収する。本研究では SDS-PAGE にて歯科基礎研究で一般的に用いられる PBS buffer と今回確立した Urea buffer と限外濾過装置を併用した抽出法を比較した。今回確立した Urea buffer と限外濾過装置の併用法は PBS buffer より抽出濃度が高く、更にタンパクバンド数も PBS buffer より 1.6 倍多いタンパクバンドが得られた (図 1)。健常人 5 名より得られた GCF と歯肉辺縁唾液をアガロース 二次元電気泳法で比較した。GCF に高発現している 8 つのスポットを検出した (図 2)。続いてこのスポットのタンパク質同定をおこなった。これらのスポットからは ApoA-I、酸化ストレスに關与するタンパク質 SOD1 および抗菌ペプチド DCD が同定された (表 2)。

健常人 GCF のショットガン法による網羅的解析を行ったところ、327 のタンパク質が同定された。また、同定された GCF 中のタンパク質の機能を Gene Ontology により解析した。GCF 中には歯肉線維芽細胞と比較すると刺激応答の機能を司るタンパク質や免疫応答に關与するタンパク質が歯肉線維芽細胞より多数含まれていることが明らかになった (図 3)。このことから GCF には歯周疾患に關与するタンパク質が数多く存在する事が示唆された。同定された 327 のタンパク質には歯周組織破壊に關与していると思われるタンパク質、細胞骨格系タンパク質、免疫係に關与するタンパク質等が含まれていた。更には歯周疾患との関連性が未知なものも確認された。

二次元電気泳動法とショットガン法の二つの解析法で ApoA-I, SOD1, DCD が共通に同定された。Western Blotting による発現量の比較に

おいて健常人と比較して重度歯周疾患群にて SOD1 と DCD の有意な発現の上昇が認められた ($p < 0.05$) (図 5, 6)。しかし、ApoA-I は健常群と疾患群に差は認められなかった (図 4)。

D. 考察

タンパク質抽出法の検討において Urea buffer と限外濾過装置の併用法は PBS buffer より抽出濃度が高かった。この結果は Urea buffer の強力なタンパク質変性作用と併用した限外濾過装置のフィルター処理がペーパーポイント中に残存している微量なタンパク質の回収率を確実に向上させ、抽出効率が PBS buffer よりも向上したと思われる。従って、従来の方法よりも抽出効率が向上した方法を確立した。

マクロファージでは歯周病原性細菌のエンドトキシン (LPS、リポポリサッカライド) などにより活性化され活性酸素が産生される。この活性酸素に対応すべく抗酸化タンパクである SOD1 が歯周疾患進行に伴って局所的に増加傾向を示すのかもしれない。SOD1 の GCF 中での作用メカニズムを探ることは歯周疾患における酸化ストレスに対する新たな抗酸化治療につながるかもしれない。歯肉上皮細胞の抗菌ペプチド産生は、歯周病原性細菌、サイトカイン、細胞表層のレセプター、あるいは細胞内伝達経路に依存して制御されているという報告があり、歯肉上皮細胞によって産生される抗菌ペプチドが歯周疾患発症の際の生体防御反応において重要な役割を果たしていると考えられている。DCD も同様に歯周病菌に対する抗菌作用を示すものと思われる。

E. 結論

本研究では GCF を対象とした 2 つの解析法 (二次元電気泳動法、ショットガン法) を確立し、取得されたプロテオーム情報から歯周疾患マーカーの候補タンパク質 (SOD1, DCD) を同定した。今回確立したプロテオーム解析は歯周疾患マーカー探索に有効であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

(共同研究者)

千葉大学医学部附属病院疾患プロテオミクスセンター

土田 祥央、佐藤 守

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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**(6), 1803-15 (2012).
2. Tsuchida, S., Satoh, M., Umemura, H., Sogawa, K., Kawashima, Y., Kado, S., Sawai, S., Nishimura, M., Kodera, Y., Matsushita, K. & Nomura, F. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics* **12**(13), 2190-202 (2012).
3. 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* **2012**, Article ID108609 (2012).
4. 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**(8), 1282-8 (2012).

5. 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* **2012**, Article ID623190 (2012).
6. 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 (2013).

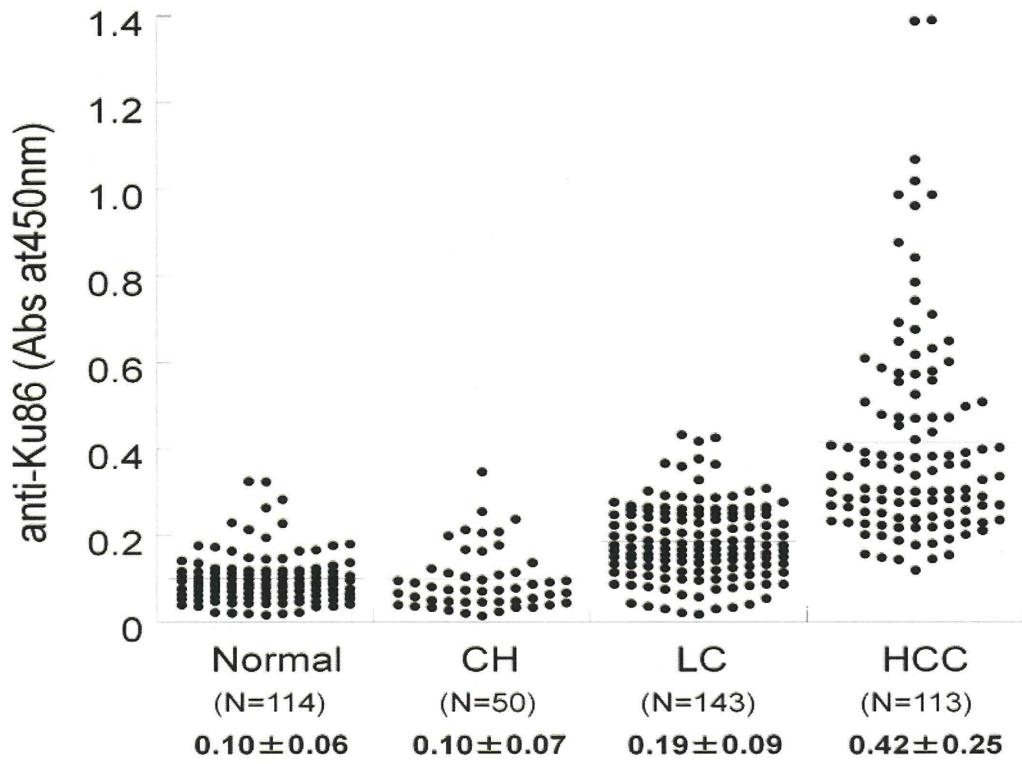
G-2. 学会発表

1. 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.
2. 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

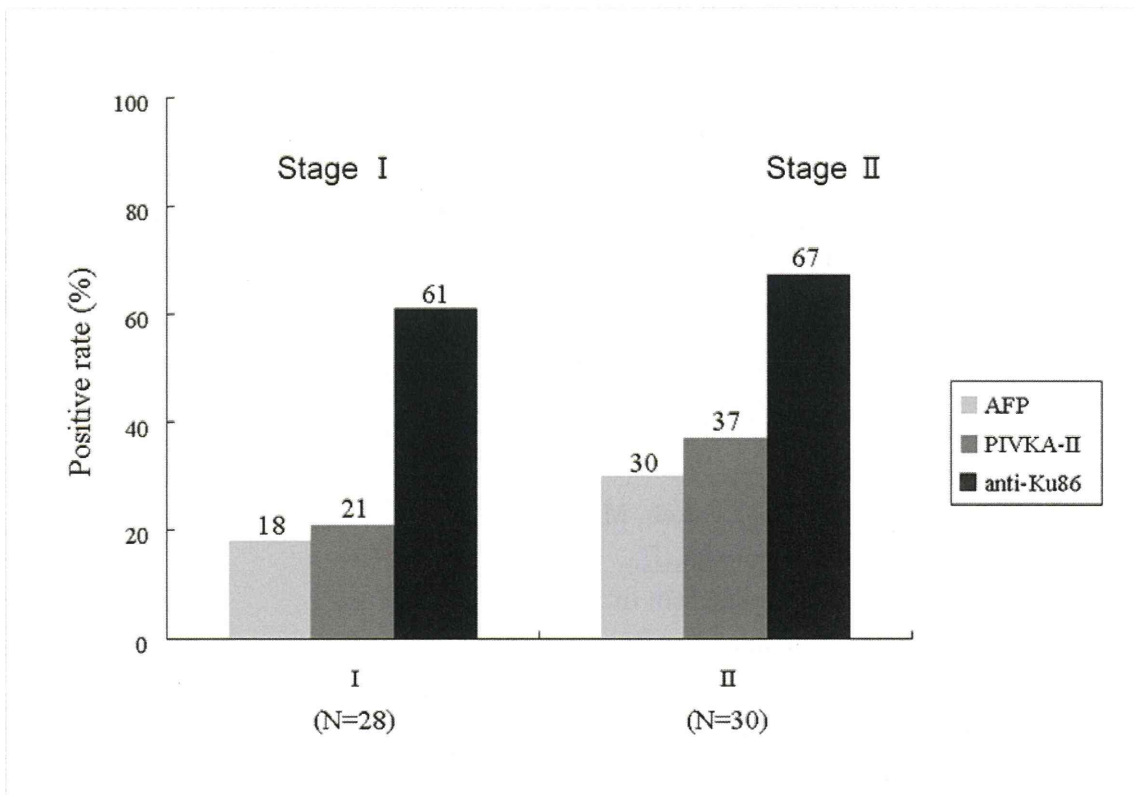
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

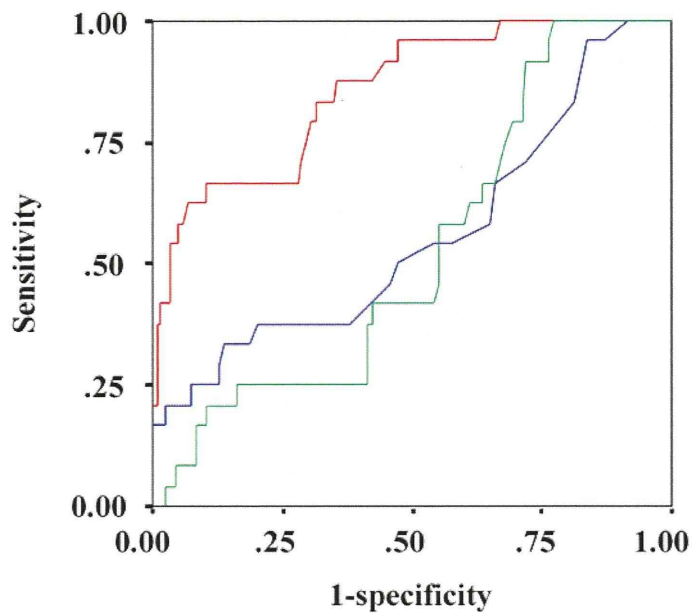
I- 图 1



I- 图 2A



I- 図 2B



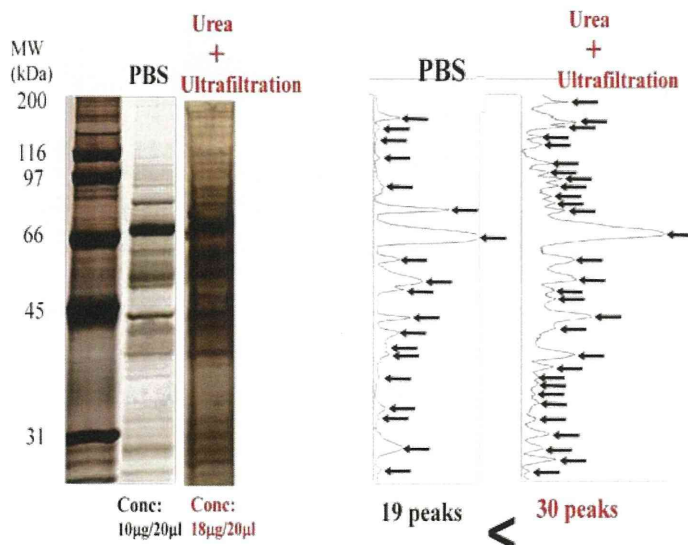
Anti-Ku86:	0.855
PIVKA-II:	0.556
AFP:	0.529

p<0.001

Anti-Ku86 vs AFP, PIVKA-II

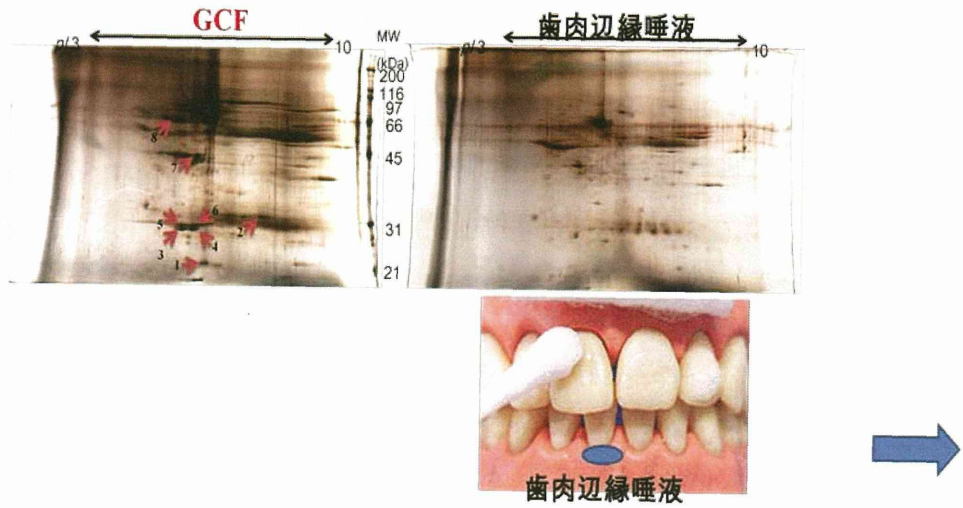
— Ku86	— PIVKA-II	— AFP
--------	------------	-------

II- 図 1

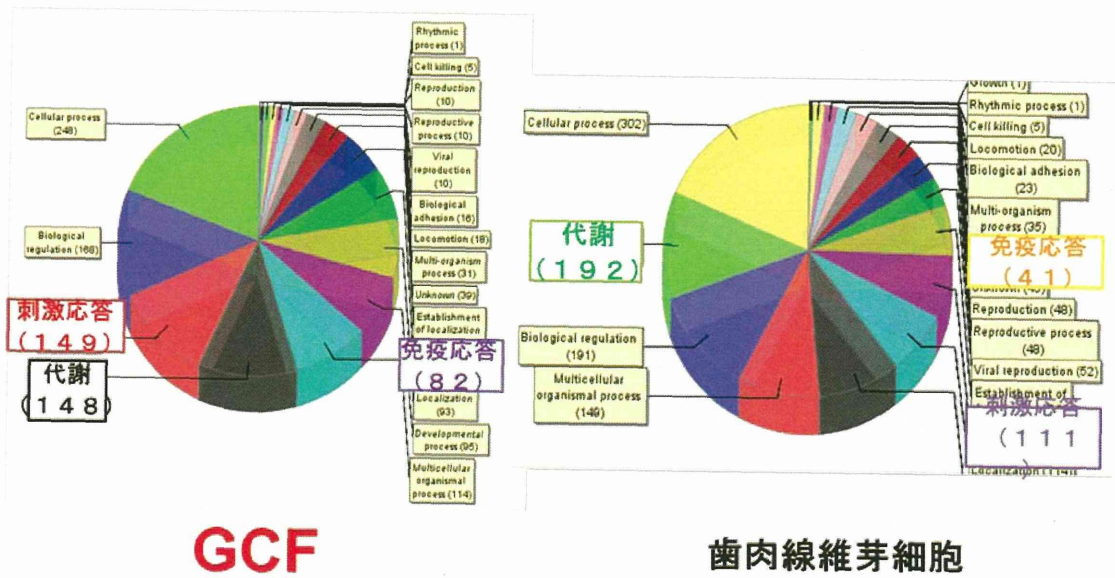


1つのpeakが1つの
バンドに相当する。

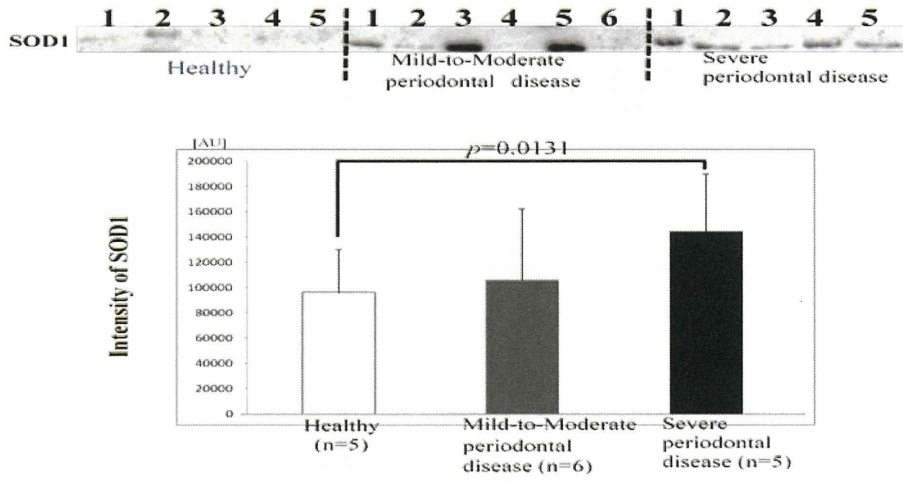
II- 圖 2



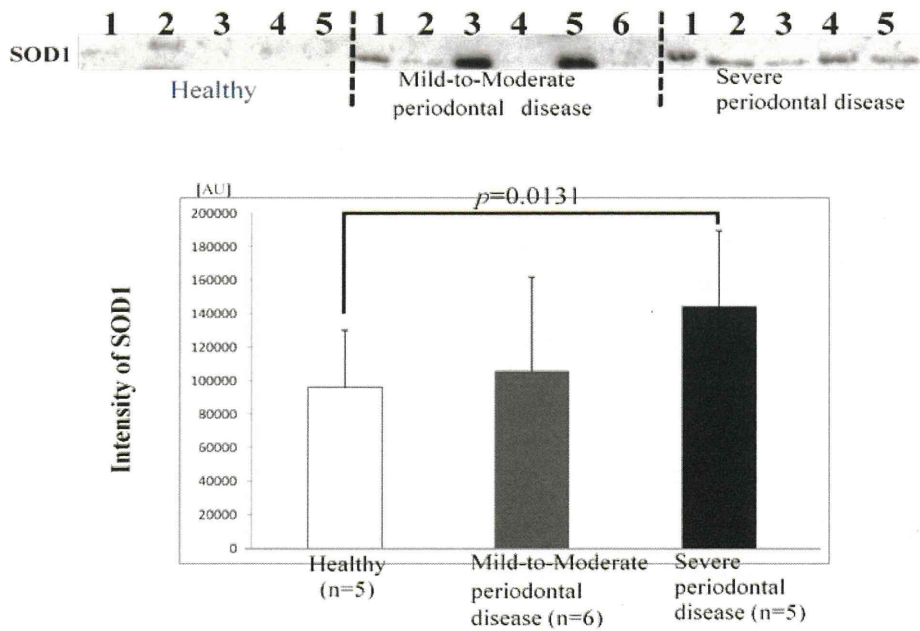
II- 圖 3



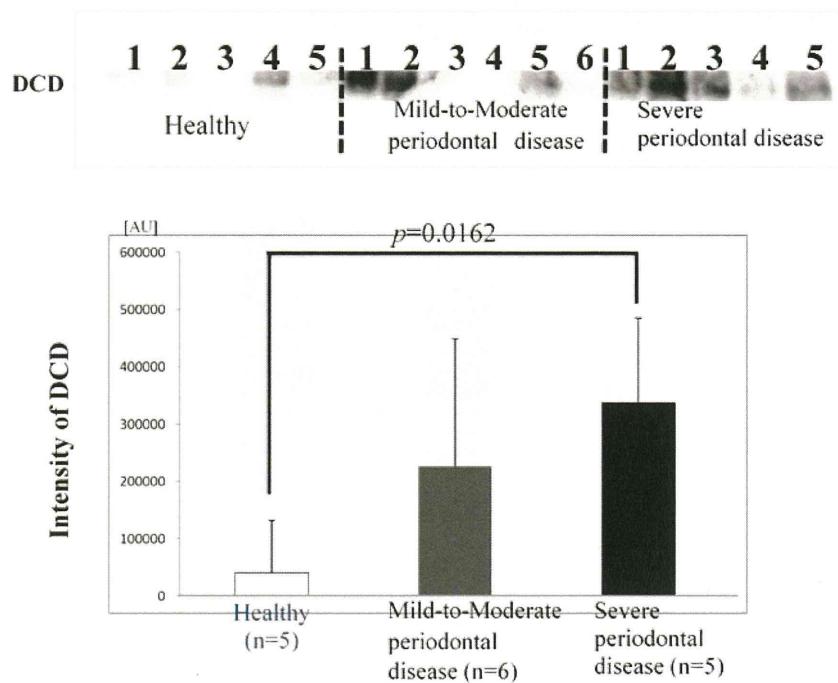
II- 图 4



II- 图 5



II- 图 6



II- 表 1

Group	PPD (mm)	CAL (mm)	GI	FMPS (%)	FMBS (%)
Healthy (n=5)	1.2±0.2	1.3±0.3	0	38.6±23.5	8.6±20.5
Mild periodontal disease (n=3)	2.7±0.2*	2.9±0.4*	0.7±0.2*	48.8±25.7	46.7±22.5*
Moderate periodontal disease (n=3)	4.7±0.3*	4.6±0.2*	1.3±0.2*	51.7±35.6	61.8±33.7*
Severe periodontal disease (n=5)	7.5±0.3*	7.8±0.3*	1.5±0.3*	60.8±33.5	70.9±23.4*

mean ± SD
 Abbreviations:
 PPD: Probing depth, CAL: Clinical attachment level, GI: Gingival index, FMPS: Full-mouth plaque scores
 FMB: Full-mouth bleeding scores. The asterisk indicates significant difference from the healthy group (Mann-Whitney U-test, $P < 0.05$).

II- 表 2

Spot number ^{a)}	Protein name	MW ^{b)}	pI ^{c)}	Score ^{d)}	Sequence coverage ^{e)}	MS/MS ^{f)} (Unique)	Fold increase ^{g)}
1	HP Haptoglobin precursor	46693	6.28	118	7%	4	1.58
	SOD1 Superoxide dismutase	15926	5.7	61	9%	1	
2	ALB ALB protein	45130	5.77	75	3%	1	1.51
	IGL@ IGL@ protein	24777	5.93	52	8%	1	
3	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	557	50%	12	1.77
4	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	713	41%	11	1.77
	IGK@ IGK@ protein	25757	5.94	204	28%	4	
	DCD Dermcidin precursor	11277	6.08	74	10%	1	
5	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	571	41%	11	1.73
6	APOA1 Apolipoprotein A-I precursor	30759	5.56	392	43%	11	1.75
	IGKV1-5 IGKV1-5 protein	26218	6.3	136	15%	2	
7	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin precursor	46707	5.37	241	18%	7	1.62
	IGHV3OR16-13	53054	6.46	136	8%	3	
8	ALB Uncharacterized protein ALB	71658	6.33	151	9%	6	1.61

- a) Protein spots were described in Fig.2.
- b) Theoretical molecular mass (Da) based on NCBI BLAST data base
- c) Theoretical pI based on Swiss-Prot data base
- d) SEQUEST score of candidate proteins
- e) Sequence coverage of MS/MS analysis of protein
- f) MS/MS unique peptide
- g) Intensity of spots in 2D-PAGE gel of 10 matched samples (GCF versus supragingival saliva) was measured.

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

研究分担者 荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

脳神経系腫瘍の治療標的となりうるバイオマーカーを検索するため、病態組織／細胞を用いた融合プロテオミクスの方法論確立とその検証法を検討した。分子発現差異解析法である iTRAQ（8Plex）法、2D-DIGE 法、および DNA array を融合的に用いて同一サンプル群を同時に解析し、得られたすべての情報を統合マイニングすることによって、病態において異常に制御されたシグナル伝達経路を特異的に抽出する方法論(iPEACH 法)を確立し、同定されたターゲット候補分子群を、脳神経系腫瘍の臨床サンプルおよび培養細胞と動物移植モデルによる検証実験に供した。本年は、特にグリオーマ幹細胞(GIC)の幹細胞様特性維持と分化に関わる分子群の検索と、これらの悪性腫瘍発生に関わり治療ターゲット分子群の解析に応用した。グリオーマ患者組織より分離した GIC、分化誘導によって変動する分子群の融合プロテオミクスを行い、有意に同定された GIC による分化ニッチ形成と制御に関わる分子群の細胞生物学的検証と、その治療ターゲットとしての可能性を動物実験によって検証した。iPEACH ソフトウェアによって定量可能な全同定データ(8,471 タンパク質、21,857 mRNA)を融合し、GIC の分化誘導における発現変動分子群(上昇 662 個、減少 326 個)から、GO 解析および network 解析に供した。GIC は、幹細胞マーカー CD133、nestin、Sox2 の発現と、分化誘導時のこれらの減少、及び Astrocyte マーカー GFAP、Neuron マーカー Tuj1、悪性グリオーママーカー CD44・vimentin、及び活性化 EGFR-RAS-MAKP と PI3K-AKT-mTOR 系路の発現を誘導し、神経幹細胞様の性質とグリオーマ細胞への分化能を有すること、さらに、分化に連動して integrin family およびそのリガンド ESM タンパク質群の顕著な発現上昇が特徴的であることが判明した。細胞生物学的な検証実験の結果、integrin αV と fibronectin をコアとする分化に関わるニッチ成分が GIC より分泌されており、GIC の増殖と分化誘導に関わっていること、これらの阻害剤が有意に分化を抑制することを見出した。さらに、GIC のマウス頭蓋内移植による悪性グリオーマ発症モデルにおいて、この分化ニッチ阻害剤は抗癌剤の感受性を高め、マウスの生存率を上昇させることが判明した。以上のことから、これらの一連の解析システムによって得られた結果は、がん幹細胞の新規分化調節治療ターゲット候補分子群の検出・同定に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

脳神経系腫瘍の中でも悪性脳腫瘍(グリオブラストーマ;GBM)はほとんどの場合、手術による治癒は不可能であり、術後脳内に残った腫瘍細胞は放射線療法・化学療法に対する反応性、再発などの予後を決める最も重要な因子である。現在のところ、予後を予測できる診断マーカーは存在せず、患者の化学療法感受性を

見極める診断法や治療ターゲットの開発は早急に取り組むべき重要な課題とされている。近年、glioma 組織細胞由来の幹細胞様癌細胞(GIC)の存在が示され、その濃縮法および樹立法が各地で検討される様になった。多様に分化する GIC の研究が悪性脳腫瘍再発や、薬剤耐性の謎をとく最も重要な鍵となることが示唆されているが、GIC の純粋分離法や検出に用い

るマーカー分子群はもとより、GICの化学治療耐性機能などに関わる分子群の詳細な情報は非常に限られているため、研究開発は困難を極めている。以前より、我々は glioma において唯一化学療法に感受性を示し予後良好な anaplastic oligodendroglioma (AO)/ 同 oligoastrocytoma(AOA)に関して、詳細な分子レベルの解析を行ってきたが、現在までに全 8,471 種の glioma 組織細胞蛋白質を定量的に同定することに成功している (glioma 組織細胞蛋白質 database 特許出願 2010-81524)。これらの情報から、化学治療感受性に関与すると考えられる新規の 34 機能蛋白質を含む 209 種類の蛋白質を特定し、翻訳後修飾によって発現と活性が特異的に制御される新規の転写因子活性化ネットワークを発見した (特願 2010-081524)。

本研究では、融合型 differential プロテオーム・トランスクリプトーム解析技術 iPEACH(特許出願 2010-81525、PTC/JP2011/58366)を微量ながん幹細胞に最適化して応用開発することによって、特にグリーマ幹細胞の維持と分化に関わる分子群の同定と、詳細な分子特性解析を試み、悪性グリーマの新規な治療ターゲットになり得る分子を探索することを目的とした。

B. 研究方法

質量分析を用いた解析には、複数の高感度タンデム質量分析器 (nano ESI-QqTOF: QStarElite、TripleTOF 5600、MALDI-TOF-TOF:4700、5800、nano ESI-ionTrapQQQ: 4000QTRAP、AB Sciex)、および付随する nano レベルのクロマトグラフィー装置

(nanoLC:Ultimate 3000、Dionex、DiNa、MaL、KYA)、解析ソフト群 (ProteinPilot、MASCOT、Analyst QS、MRM/MRM pilot、quant、scheduled、GPS、Progenesis、Decyder、GeneSpringsGP、MANGO、iPEACH 等)を用いた。高感度タンデム質量分析器 nanoLC-ESI-QqTOF、nanoLC-MALDI-TOF-TOF は網羅的なペプチドの高感

度検出および比較定量/同定用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ (QTRAP4000 Applied Biosystems)は高感度定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用した。

高感度同時比較定量解析法として、iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation)法および検証用にMRM(Multiple Reaction Monitoring)法を用いた。又、リン酸化および proteolysis などの翻訳後修飾発現差異解析に関しては、ProQ-Diamond による染色法を併用した 2D-DIGE 法を用いた。mRNA 発現解析は、DNA chip (Human Genome U133 Plus 2.0 Array、affimetrix)を用いた。

生体サンプルとして、ヒトグリーマ組織より分離樹立した9つのクローンより、グリーマ幹細胞 GIC03A、GIC03U、GIC07Uを用いた。同一のサンプルを同時にタンパク質 (iTRAQ、2D-DIGE)と mRNA (DNA array)用に抽出調製して解析に用いた。全ての解析データを iPEACH(特願 2010-81524、PTC/JP2011/58366)を用いて統合した。GO 解析は GeneSpring GX (Agilent Technologies)、ネットワーク解析は KeyMolnet (医薬分子設計研究所)を用いた。抽出された特異的活性化シグナル分子群に対して、各抗体を用いて 1D/2D-Western Blotting 法、組織免疫染色法、各分子に対する中和抗体および阻害剤処理による細胞の抗がん剤の感受性の変化を WST 法にて検討した。

動物移植モデルとして、NOD-scid マウスを用い、GICの頭蓋内移植による悪性腫瘍形成能を評価した。又、抗癌剤の感受性評価をマウス移植モデルの生存能で評価した。

さらに、検証法の一つとして、独自に開発を行った全自動 2次元電気泳動装置を用いた Western Blotting 法 (Auto2D-WB)を用いて、複数個のマーカー分子の同時検出法を検討し、経時的な分子の翻訳後修飾を含めた発現変動を高感度かつ定量的に検出することに成功した。特に今回、悪性脳腫瘍グリオブラストーマから樹立した幹細胞の分化と悪性化誘導モデ

ルに注目して最適化を試みた。

(倫理面の配慮)

本研究では臨床サンプル（腫瘍組織）より genomic DNA、mRNA、タンパク質を抽出し、ゲノム/トランスクリプトーム/プロテオーム解析を検討することから、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究倫理指針」に基づき、熊本大学医学部ヒト遺伝子研究倫理審査委員会の承認を受けている（悪性脳腫瘍の病態解明とそれに基づく治療体系の確立：ゲノム 110 号、平成 22 年改訂）。ガイドラインに従い、採取された患者の組織サンプル、遺伝子解析情報を含めすべての検査結果について守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定されない方法でのみ行うことを遵守している。本研究で採取される組織は、治療上必要不可欠な外科的手術によるもののみであり、患者に不利益及び危険性は伴わない。

C, D. 研究結果・考察

1) グリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群のプロファイリング解析

融合プロテオミクス解析の概略を図に示す (Fig.1)。

Glioma 患者の腫瘍組織から、特殊培養条件にて、神経幹細胞に特徴的な Sphere を形成する幹細胞様クローンを分離した。既知の神経系幹細胞、およびグリオーマ細胞マーカー分子群の発現変動を解析するとともに、マウス頭蓋内への同所性移植によって、腫瘍形成能を評価した。5 人の患者脳腫瘍(4 つの GBM と 1 つ AOA)から GIC を分離し、8 つの GIC クローンの樹立に成功した。樹立した GIC は成長因子を含む神経幹細胞用培地にて、単離後 10 日以内に直径 100um 以上の Sphere を形成する。GIC03A、-03U、-06A、-06U、-07U、-08U、-09A、-09U は現在まで 2 年以上継続的に継代培養できることを確認している。今回は、その中で特に長期にわたって培養可能で、マウス頭蓋内移植に

より 1 ヶ月以内に悪性グリオーマを発症する 3 クローン GIC03A,03U,07U を解析に用いた。血清添加によって分化誘導後、タンパク質と mRNA を抽出し、2D-DIGE 法、iTRAQ 法、DNA Microarray により発現解析を行い、解析データは、iPEACH (integrated Protein Expression Analysis Chart) を用いて整理・統合し、GO 解析、クラスター解析、パスウェイ解析によって、特異的変動分子群を抽出した。分化誘導における GIC の分子の発現変動を解析するために、GIC03A と GIC03U 両細胞を Sphere あるいは血清によって分化させ、培養 2 日目と 7 日目の mRNA とタンパク質を回収し、DNA microarray によって mRNA 21,857 分子、iTRAQ 法によってタンパク質 8,471 分子を同定した。DNA microarray データは the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus に登録した (GEO series accession number: GSE43762) (Fig.2)。

同定したそれぞれの分子群のリストに iPEACH ソフトウェアによって Entrez Gene ID を付加し、Entrez Gene ID を用いて両データを紐付けた。この融合プロテオミクスによる 21,857 分子のリストを用いて、GIC の分化・増殖に関わる分子の網羅的同定と発現・機能プロファイリングを行った。分化誘導において発現変動が認められた mRNA は、発現増加を示したのが 3200 分子、発現低下を示したのが 1612 分子であった。また、分化誘導において発現変動が認められたタンパク質は、発現増加を示したのが 791 分子、発現低下を示したのが 951 分子であった。これらを統合すると発現増加を示したのが 3,864 分子、発現低下を示したのが 2,513 分子となった。このリストを用いて Gene Ontology 解析を行い、GIC の分化における特徴的な分子群の特定を行った。

GSC の分化誘導で発現亢進した分子の Gene Ontology Category はメンブレン(27%)、

細胞外基質(ECM)(18%)、接着/細胞間コミュニケーション(6%)に関連し、発現抑制した分子の Gene Ontology Category は亢進群が細胞外/膜分子群 (50%) に対して、細胞内分子群 (70%)、結合(13%)、細胞周期関連(6%)などに関連していることが明らかになった。分化誘導によって、発現変動が特徴的であったクラスター解析から、発現抑制される分子群が2クラスター抽出され、ErbB2、c-Myc、RBE2F 関連分子等を含む細胞周期促進因子群、翻訳制御、細胞内輸送、タンパク合成関連分子群が、また、分化誘導によって発現が亢進する分子群は、GFAP、CD44、TGF- β ファミリー蛋白質、そのレセプター群、SMAD ファミリー蛋白質群を含む、神経発生・分化制御、細胞死抑制、細胞運動関連分子であることが判明した。

分化誘導によって発現亢進した分子のうち、インテグリンファミリーとコラーゲンファミリー、ラミニン、およびフィブロネクチンなどの ECM の細胞接着分子に焦点を合わせた。

2) ECM とインテグリンファミリー分子の GIC の分化誘導促進の検証

GIC 分化における ECM の効果を検討するため、ECM(コラーゲン IV ; COL4、ラミニン ; LAM、およびフィブロネクチン ; FN)がコーティングされた環境において、血清による GIC 分化を解析した。GIC Sphere の血清刺激による接着と遊走は、コーティングの無い培養皿上で培養した細胞の接着・分化の始動が 24 時間程度であることに比べて、ECM 上では分化誘導後、数時間以内に接着・分化が始動し、顕著な促進が見られた。また、分化誘導 48 時間後のタンパク質を回収して、ウェスタンブロッティングを行った結果、GIC は分化誘導によって、COL4、LAM、FN 上ではアストロサイト分化マーカーの GFAP の発現が分化誘導後で顕著に増大したのに対して、コーティングの無い、あるいはポリエルリジン(PLL)コーティン

グでは、GFAP の発現は低い状態だった。従って、血清刺激による分化誘導を ECM が促進することが分かった。

融合プロテオミクスで有意に上昇する分子として同定されたインテグリン a2 と aV が、ECM と相互作用することによって GIC の接着/遊走を引き起こしているかどうかを確認するため、これらのインテグリン阻害剤の検討を行った。血清非存在下の条件で、インテグリン抗体と ECM の持つインテグリン結合部位のアミノ酸配列の RGD または DGEA ペプチドを処理した。インテグリン a2 抗体は COL4 に対する GIC の接着を抑制したが、インテグリン a2 に対するリガンドのアミノ酸配列である DEGA ペプチド阻害剤では COL4 も他の ECM 上でも GIC の接着は抑制されなかった。一方、インテグリン aV 抗体は FN に対する GIC の接着を抑制し、インテグリン aV に対するリガンドのアミノ酸配列である RGD ペプチドの阻害剤でも FN に対する GIC の接着を抑制した。これらの結果から、COL4 と FN がインテグリン a2 と aV を介して GIC の接着/遊走を引き起こすことが判明した。しかし、GIC の分化マーカーである GFAP は、血清因子と ECM の両方が GIC 分化促進に必須であることを示唆して、血清無しの条件下では上昇しなかった。

インテグリン阻害剤の分化抑制効果を評価するため、ECM のコーティングの無い培養皿にて血清による分化誘導条件下でインテグリン阻害剤の添加を行った。インテグリン a2 抗体および DEGA ペプチドは分化抑制効果を示さなかったが、インテグリン aV 抗体と RGD ペプチドは GIC の接着/遊走を抑制した。また、分化誘導 48 時間後のタンパク質を回収して、ウェスタンブロッティングを行った結果、GIC は分化誘導によって、分化マーカーである GFAP の発現は、インテグリン a2 抗体および DEGA ペプチドではコントロールと

同様に発現レベルであったのに対して、インテグリン aV 抗体と RGD ペプチドを処理したものでは、発現抑制が見られた。この結果から、インテグリン aV が RGD 配列を介して GIC の分化を制御していることが示唆された。また、FN と結合すると報告されているインテグリン a5、a6、および b1 に対する抗体でも同様の実験を行った結果、それらの抗体による GIC の分化抑制効果は見られなかった。従って、インテグリン aV と FN の相互作用が GIC の分化に重要であることが明らかとなった。

インテグリンや ECM が GIC と実際に同所移植によって形成された腫瘍で発現しているかを確認するため、免疫細胞染色と免疫組織染色を行った。免疫細胞染色の結果、COL4、FN、およびインテグリン a2、aV は、融合プロテオミクスの結果と同様に分化誘導で発現されていることが確認できた。また、組織染色の結果によって、マウス脳異種移植片で同様に COL4、FN、およびインテグリン a2、aV が発現していることが確認できた。これらの結果からインテグリンと ECM は分化誘導によって発現し、インテグリンと ECM の相互作用によって、GIC の分化と神経膠腫形成を促進していることが示唆された。特に、インテグリン aV と FN については、上記の RGD を介した結合とその阻害効果も確認できたことから、本研究で樹立した GIC で腫瘍形成能も確認できた

GIC03A,03U,07U について、DAPI による核染色と共に免疫細胞染色も行い、GIC クローンすべてにおいて、インテグリン aV と FN の発現を確認した (Fig.3)。

3) GIC の分化ニッチを標的とした治療への考案

GRGESP、GRGDTP、および DGEA のペプチドを GIC と処置し、それらの細胞増殖への効果を分析した。GIC Sphere ではペプチドのすべてが細胞増殖に影響を

示さなかったが、一方、血清刺激に分化誘導した GIC では、RGD ペプチドによって GIC Sphere とほとんど同じレベルまで増殖が抑制された。GRGESP または DGEA ペプチドでは、増殖抑制効果は見られなかった。このことから、RGD ペプチドが効果的に GIC 分化における細胞増殖を抑制することが判明した。

次に分化の早い段階における GIC の抗癌剤による増殖抑制効果、および抗癌剤と RGD の組み合わせ処理による増殖抑制効果を分析した。抗癌剤には神経膠腫の治療におけるアルキル化試薬として広く使われている TMZ を用いた。GIC Sphere では、RGD、TMZ、RGD の TMZ の組み合わせのいずれも増殖抑制効果は小さいが、血清刺激に分化誘導した GIC では、RGD の TMZ の組み合わせによって高い GIC の増殖抑制が確認された。

RGD と TMZ による増殖抑制効果がアポトーシスによって起こされたかどうかを決定するために、GIC はアポトーシスアッセイを行った。GIC Sphere では TMZ、RGD ペプチド、または両方の組み合わせ処理は細胞の表現型への影響は小さかったが、分化誘導した GIC では、アポトーシス細胞の数が増大したことによって、TMZ と RGD ペプチドの両方で効果的に細胞障害を引き起こした。また、血清による GIC の早い分化段階に、TMZ と RGD ペプチドの併用処理は、効果的に、GIC の抗癌剤感受性を増大させ、TMZ とコントロールペプチドの処理に比べて 1.7 倍のアポトーシス効果があった。この結果より、血清刺激後、GIC のインテグリン aV の阻害による分化と増殖抑制が抗癌剤感受性を増大させ、神経膠腫形成を抑制できることが示唆された。

生体内で RGD と TMZ の GIC に対する増殖抑制効果を確認するために、マウス頭蓋内に GIC を異種移植したモデル実験を行い、150 日までのマウスの生存曲線から RGD と TMZ の

治療効果を分析した。移植後のマウスの Kaplan-Meier 生存曲線は、コントロールの 10% DMSO (median survival = 53 days) に比べて、cRGD のみ投与 (median survival = 44 days) では生存に効果的でなかったが、TMZ との cRGD の組み合わせ (median survival = 100 days) では、TMZ のみの投与 (median survival = 77 days) に比べて、マウス生存は延長された。TMZ との cRGD の組み合わせることで、GBM の発生を抑制し、マウスの延命させることが判明した (Fig.4)。

本研究の結果から、GIC は ECM 存在下で接着因子群を介した足場依存的な分化様形態を示し、血清存在下では、分化は促進され、血清非存在下では、ECM 存在下でも分化は誘導されないことが分かった。また、インテグリン αV 抗体や RGD ペプチドは血清による GIC の接着と分化を抑制し、血清因子とインテグリン αV と結合する ECM の両方が GIC の分化に重要であることが示唆された。

従って、GIC は ECM を自ら発現・分泌して RGD 配列を認識するインテグリン αV を介して分化を制御していると考えられる。また、分泌された ECM によって GIC は接着・分化のための足場環境を形成することが示唆される。この環境を“分化ニッチ”と命名した (Fig.5)。

E. 結論

マウス脳への異種移植で悪性神経膠腫を発症する GIC クローンを樹立し、血清による分化誘導モデルを確立した。GIC の分化誘導において特異的に発現変動している分子群を同定するため、統合プロテオミクス解析を行い、GIC 分化誘導において発現亢進された分子リストを得た。さらに GO 解析を行い、GIC の分化を制御していると考えられる ECM、接着/細胞間コミュニケーション、および細胞膜などに関連する分子群を抽出した。この分子群に含まれる細胞接着に関するインテグリンファミリーと

COL4、LAM、および FN などの ECM に注目し、インテグリン αV と FN の発現と相互作用が GIC の分化を促進していることを明らかにした。また、GIC の分化阻害実験から、インテグリン αV 抗体と RGD ペプチドの阻害剤が GIC の分化抑制に有用であることを示した。これはインテグリン αV と FN が GIC の分化における主要因子であることを証明するものである。これらの事から、GIC は FN をコアとした ECM を自ら発現・分泌し、インテグリン αV を介して分化を制御する微小環境“分化ニッチ”を形成することを提唱した。インテグリン αV や RGD 認識部位をターゲットとすることで GIC の接着、遊走、分化を抑制することが可能であり、グリオーマの再発・転移を早期に阻害する新規な治療法の考案につながることを期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Hirayama, M., Kobayashi, D., Mizuguchi, S., Morikawa, T., Nagayama, M., Yoshizawa, A., Kawano, S. & Araki, N. Integrated proteomics identified a novel activation signaling of dynein IC2-GR-COX-1 in NF1 disease model cells. *Mol. Cell. Proteomics*, in press (2013).
2. Nambu, NA., Midorikawa U, Mizuguchi S, Hide T, Nagai M, Komohara Y, Nagayama M, Hirayama M, Kobayashi D, Tsubota N, Takezaki T, Makino K, Nakamura H, Takeya M, Kuratsu J & Araki, N. Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin αV . *PLOS ONE*, in press (2013).
3. Nitta, H., Wada, Y., Kawano, Y., Murakami, Y., Irie, A., Taniguchi, K., Kikuchi, K., Yamada, G., Suzuki, K.,

- Honda, J., Wilson-Morifuji, M., Araki, N., Eto, M., Baba, H. & Imamura, T. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88). *Clin. Cancer Res.* **19**(8), 2004-13 (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. The integrated view of human chromosome X-centric proteome project. *J. Proteome Res.* **12**, 58-61 (2012).
5. Sawanyawisuth, K., Wongkham, C., Riggins, GJ., Wongkham, S., Araki, N. Possible involvement of Cyclophilin A processing in fumagillin-induced suppression of cholangiocarcinoma cell proliferation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, Suppl: 137-41(2012).
6. Irie, A., Harada, K., Araki, N. & Nishimura, Y. Phosphorylation by PKD2 at Ser171 of SET reduced its inhibitory effect on PP2A phosphatase in T cells. *PLoS One* **7**(12):e51242. doi: 10.1371 (2012).
7. Khaenam, P., Niibori, NM., Okada, S., Jearanaikoon, P. & Araki, N. & Limpaboon, T. Contribution of RIZ1 in proliferation and migration of liver fluke-related cholangiocarcinoma cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, 4007-11 (2012).
8. Shimada, H., Nambu-Niibori, A., Wilson-Morifuji, M., Mizuguchi, S., Araki, N., Mezaki, Y., Senoo, H., Ishikawa, K., Okamoto, O. & Fujiwara, S. Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of three-dimensional cell clusters. *J. Dermatol.* **40**(4), 249-58 (2013).
9. Sawanyawisuth, K., Wongkham, C., Araki, N., Zhao, Q., Riggins, GJ. & Wongkham, S. Serial Analysis of Gene Expression Reveals Promising Therapeutic Targets for Liver Fluke-associated Cholangiocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, Suppl: 89-93 (2012).
- G-2. 学会発表
1. 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
2. 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
3. Araki N., Mizugushi 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. HUPPO 11th Annual World Congress (Boston,US) , 9-13 September 2012
4. 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. HUPPO 11th Annual World Congress (Boston,US)

9-13 September 2012

5. 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. HUPPO 11th Annual World Congress (Boston,US) 9-13 September 2012
6. 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
7. 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
8. 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) 年次大会オミクス医療研究会年会) (東京)平成 24 年 10 月 16 日
9. 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
10. 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
11. 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

12. 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
13. 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、鶴沼豊、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
14. 山口浩、小林大樹、荒木令江: 腫瘍細胞内ピ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
15. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 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.

発願番号: 特願 2012-075242

出願日: 平成 24 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

2) 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