

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 研究協力者

水口惣平、小林大樹、森川 崇、坪田誠之、緑川宇一、平山未央（熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学分野）、秀 拓一郎、中村英夫、倉津純一（同脳神経外科学分野）、菰原義弘、竹屋元裕（同細胞病理分野）

Fig1. 融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞分化誘導に関わる分子ネットワークの解析ストラテジー

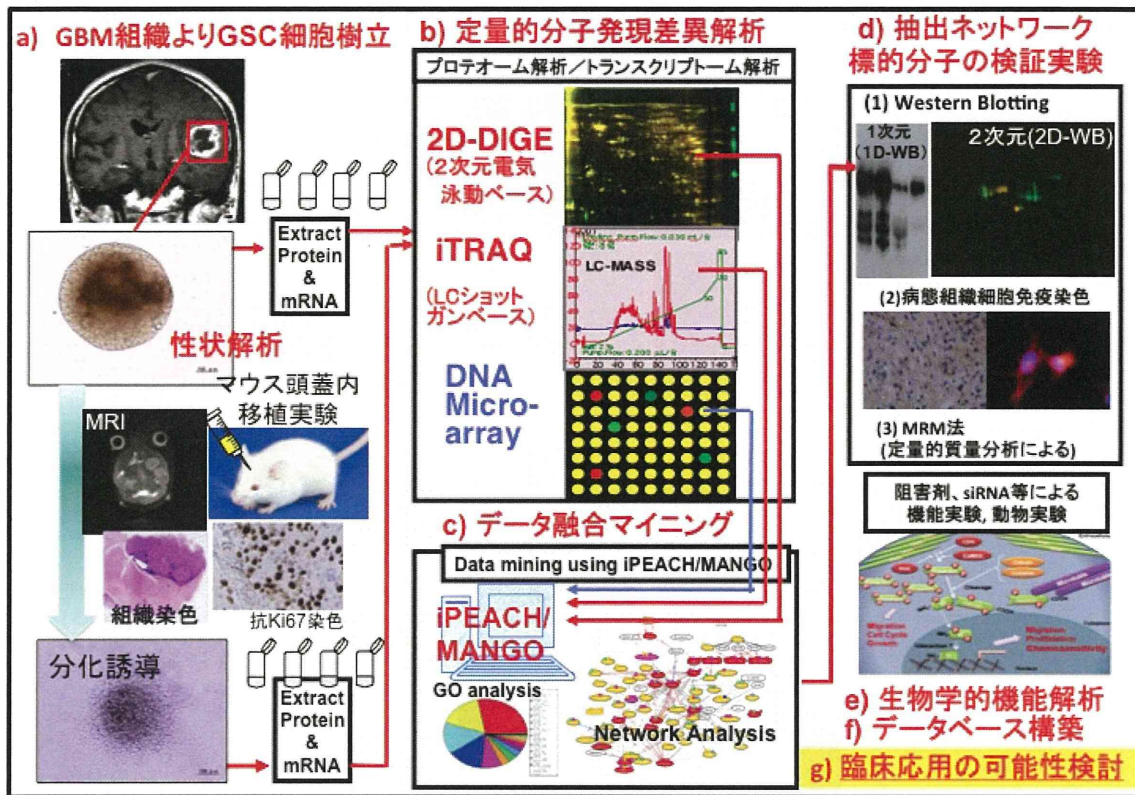


Fig2. 融合プロテオミクスを用いたGSC分化誘導前後における発現変動差異分子解析

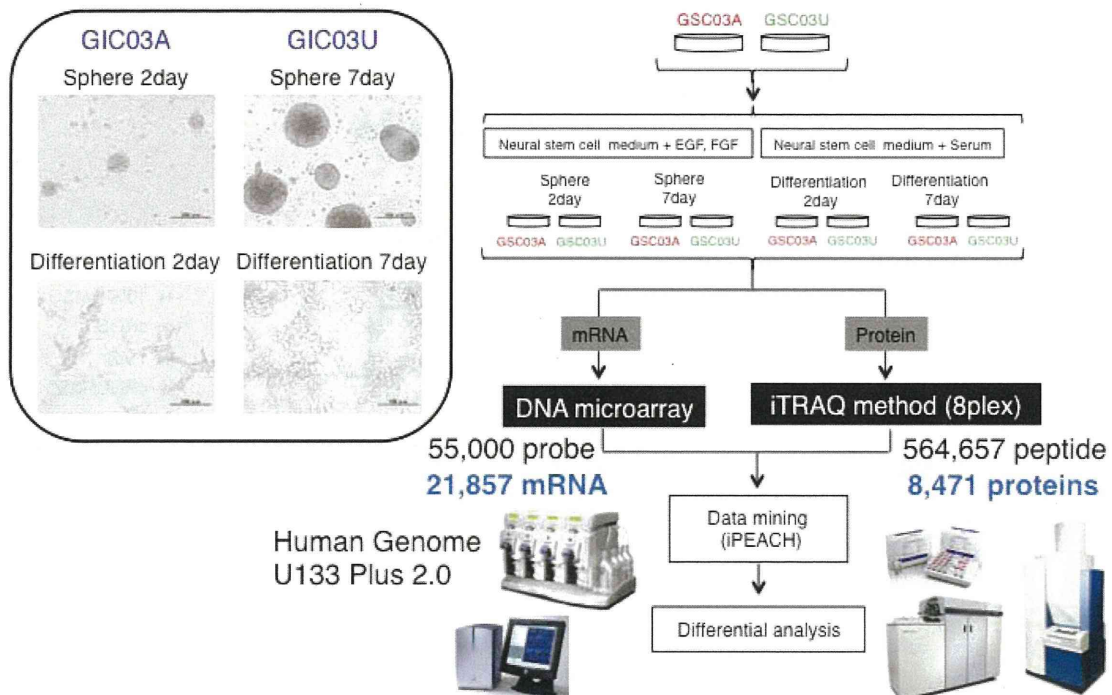


Fig3. GSC移植脳組織とGSC分化誘導時におけるfibronectinとintegrin αV の発現

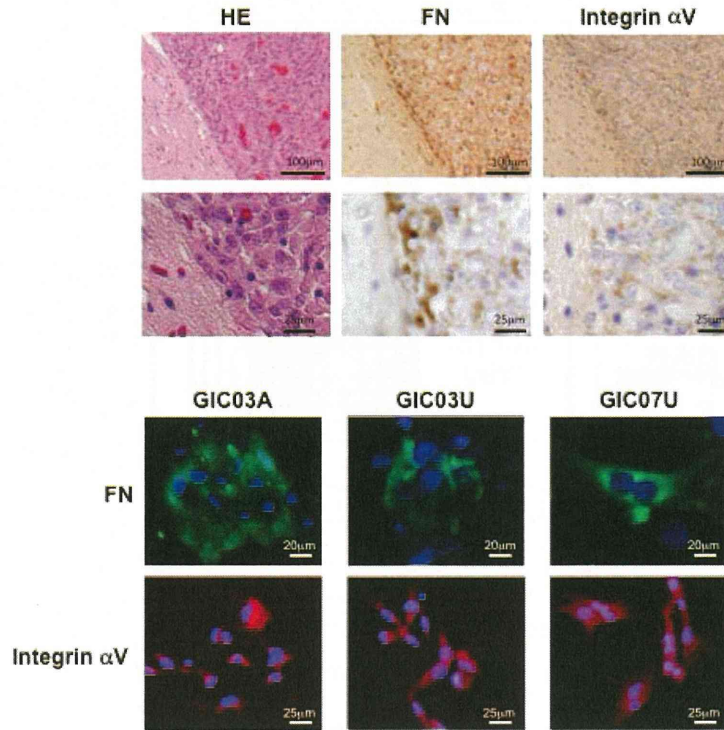


Fig 4. GSC分化誘導細胞およびGSC移植マウスにおけるRGD peptideの影響

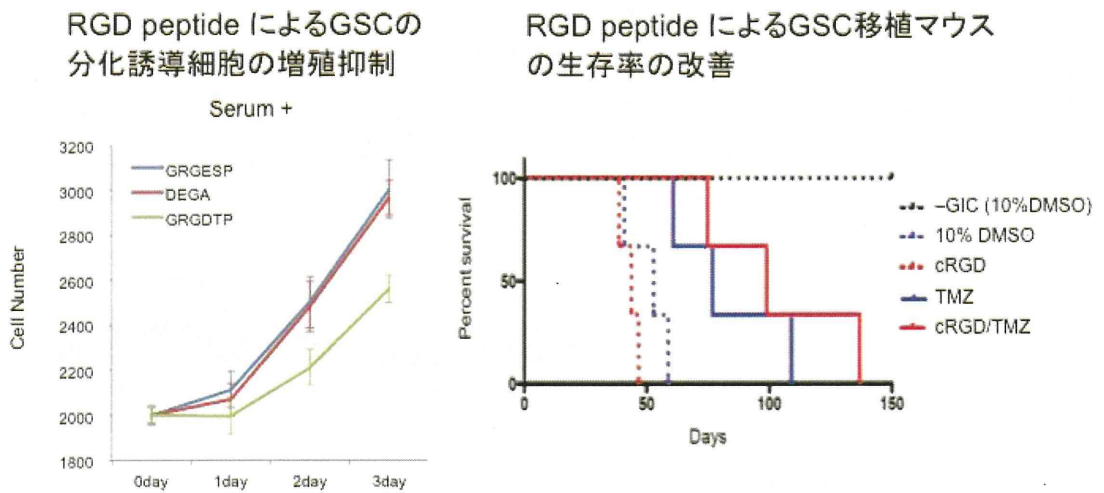
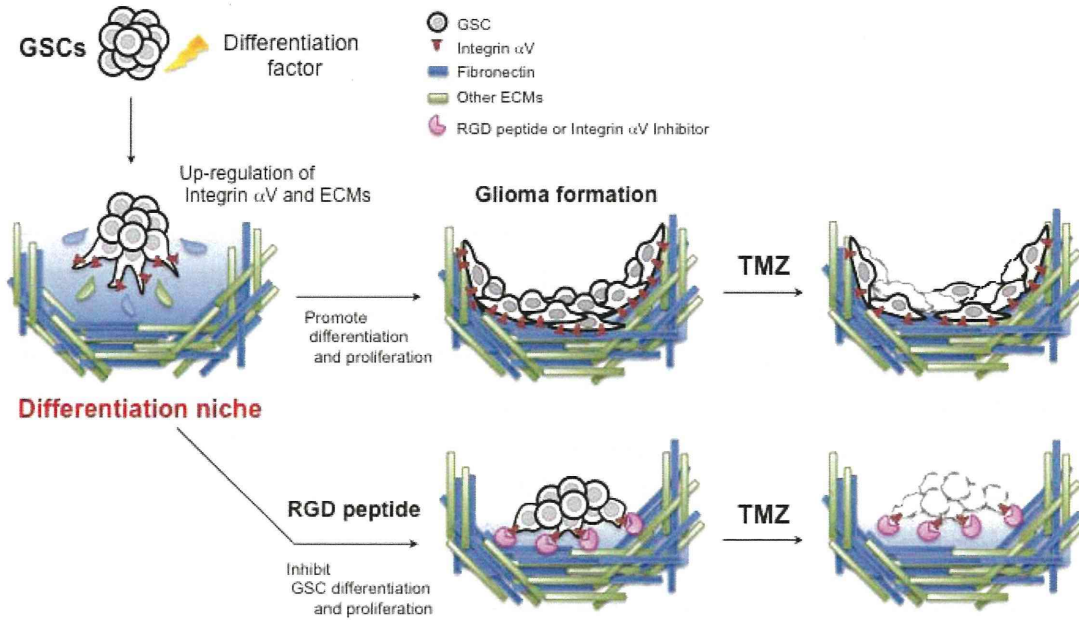


Fig 5. 細胞接着因子とintegrin αV を介したGSC分化制御機構仮説



難治性がん早期診断技術の開発と治療標的分子候補バイオマーカーの探索研究

研究分担者 中村和行 山口大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

近年、難治性がんの診断、治療、予後などの評価のために信頼性の高い新規バイオマーカーの探索が進められている。探索技術として二次元電気泳動法と質量分析法によるプロテオミクスが注目され、疾患関連バイオマーカー候補の探索結果が報告されているが、信頼性の高い新規バイオマーカーは未だ少ない。本研究では、プロテオミクスによる C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌や膵臓癌など難治性がんの早期診断や抗がん剤による治療評価のためのバイオマーカー候補の探索研究を目的に、C 型肝炎ウイルス関連感細胞癌患者血清中の自己抗体を用いた癌関連抗原バイオマーカー蛋白の絞り込みを行い、HSP70 蛋白を用いたプロテインチップによる精度の高い自己抗体価測定技術の開発を行い、さらに膵臓がんの抗がん剤による治療評価のためのバイオマーカー候補蛋白として HSP27 の有用性について研究を行った。

A. 研究目的

正確な臨床履歴を伴った血液、尿などの体液や組織等に含まれるタンパク質群を網羅的に解析できれば、有用な疾患関連バイオマーカー蛋白の探索が可能になり、病態や予後の診断および治療評価を正確に行うことができ、医薬品等の開発を迅速に進めることができる。すでに、ヒトプロテオーム機構 (HUPO) を中心にバイオマーカー探索等のプロテオーム解析技術の世界標準化や細胞膜結合タンパク質群の網羅的な解析技術の標準化が進められている (1. Bell AW, Deutsch EW, Au CE, Kearney RE, Beavis R, Sechi S, Nilsson T, Bergeron JJ, and HUPO Test Sample Working Group (○Nakamura K et al.): A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods* 6(6), 423-430, 2009. 2. Chung CM, ○Nakamura K, and Jordan TW: The AOHUPO Membrane Proteomics Initiative, Fourth Workshop June 2008 Cairns, Australia. *Proteomics* 8(19), 3920-3923, 2008) が、タンパク質群は多彩な性質を示すとともに

刻々と変化し、血液や組織中のタンパク質の濃度差も極めて大きいために、それらの定量的解析や翻訳後修飾による多様性の発現についての解析は容易ではない。

本研究では、二次元電気泳動法と質量分析法さらに PROTEOMEX 法に加えてプロテインチップ技術を導入し (Ichihara, T., et al. A novel approach of protein immobilization for protein chips using an oligo-cysteine tag. *J. Proteome Res.* 5:2144-5, 2006)、C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌 (HCV-HCC) の超早期診断や抗がん剤による膵癌 (PC) 細胞株の治療効果の評価や創薬に利用可能なバイオマーカー蛋白候補の同定を目指す。特に、C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患者血清中の自己抗体を用いた癌関連抗原バイオマーカー蛋白の絞り込み、Hsp70 蛋白を固定化したプロテインチップによる精度の高い自己抗体価計測技術の開発を行う。また、ゲムシタビンなどの抗がん剤に薬剤耐性を獲得する膵癌細胞のバイオマーカー候補蛋白 Hsp27 の同定とその hsp27 遺伝子発現抑制小分子化合物による膵癌細胞の薬剤耐性解除について研究を行う。

B. 研究方法

B-1. C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌バイオマーカー蛋白候補の Hsp70 を固定化したプロテインチップによる自己抗体価計測技術の開発

平成23年度に行った成果をもとに、山口大学（以後本学）医学部附属病院第二外科で初診時に肝がんの診断を受け治癒切除術を施行した症例を対象とした。まずは、C型肝炎ウイルス感染の既往（HCV 抗体陽性、B型肝炎ウイルス（HBV）抗原陰性かつ飲酒歴のない）のある患者から通常の治癒切除術で摘出された癌部組織（5 mm x 5 mm x 5 mm）を検体とし、患者血清を自己抗体価計測のための検体とした。

1) 検体からがん部組織と非がん部組織を分別採取し、それぞれの組織から抽出されたタンパク質を試料として、分離範囲を pH 4-7 に絞ったポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法（2-DE）を実施した。得られたがん部と非がん部の 2-DE 泳動像を Progenesis を用いて画像解析し、がん部で優位に増減するタンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシンを用いた in gel digestion 法で得られたペプチド断片を nano-LC-MS/MS（LC-MSD Trap XCT, Agilent Technologies）で質量分析し、SpectralMill-III および Mascot を用いて候補タンパク質の同定を行った。

2) PROTEOMEX 法を用いて HCV-HCC 患者から得られたがん部組織タンパク質の 2-DE（分離範囲 pH 3-10）を行った後に分離されたタンパク質群を PVDF 膜に転写し、同一患者の血清を反応させた後にペルオキシダーゼ或いは蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させることにより、患者血清中の自己抗体に特異的に反応するがん部組織由来のタンパク質スポットを検出した。これらのタンパク質スポットを切り出し、質量分析して候補タンパク質の同定を行った。

3) 候補タンパク質（例として HSP70 の C-末端領域）を GFP 蛋白と融合させ、その N-末端

部に His タグと C-末端部に Cys タグを挿入したベクターを作成して大腸菌内で発現させた。産生されたリコンビナント蛋白を His タグに特異的に結合するニッケルビーズで精製した後ダイヤモンド様表面加工した（DLC）チップ基板上のマレイミド基と反応させ、Cys タグのチオール基とカップリングさせ均一な配向性を保ちながら強固に固定化した。このチップに HCV-HCC 患者や他の疾患ならびに正常人から得た血清を反応させて、HSP70 に特異的に反応する自己抗体を効率的に検出した。さらに、SOD と Peroxyredoxin 6 についても同様に DLC チップ基板表面に固定し、血清と反応させて特異的に反応する自己抗体の検出を行った。

4) プロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出：GFP および GFP と融合させた自己抗体抗原蛋白質（HSP70-C 末端領域、HSP70-N 末端領域 SOD2, PRDX6）をマレイミド基板に 3-6 スポットずつ固定化した。また、同じチップ上には、2次抗体検出コントロール用として、マウス IgG、ウサギ IgG、ヒト IgG も 2 スポットずつ固定化した。GFP 抗体と Alexa555 標識マウス 2次抗体で各スポットの固定化蛋白質を、血清と Alexa633 標識ヒト 2次抗体で血清中の自己抗体量を蛍光検出し、蛍光量を数値化した。蛍光量は、マウス IgG、ヒト IgG スポットの蛍光検出量を利用して標準化した。GFP よりも高い蛍光量を示す自己抗原は、GFP の検出値と比較して有意差検定（student-t test）を行なった。

5) 蛋白質・ペプチド固定化に対する Cys 数の検討：FLAG タグと 6XHis タグを融合したペプチドの C 末端側に 0-5 個 Cys を付加したペプチドを準備し、マレイミド基板に固定化した。マウス IgG、FLAG タグ抗体と Alexa633 標識マウス 2次抗体を用いて、固定化量を蛍光検出した。

B-2. 抗がん剤ゲムシタピンに薬剤耐性を獲得

する膵癌細胞のバイオマーカー候補蛋白 Hsp27 の同定と hsp27 遺伝子発現抑制による薬剤耐性解除の研究

ゲムシタビンに対する薬剤感受性が異なり、薬剤耐性を獲得したヒト PC 細胞株群を用いた。

1) 抗がん剤のゲムシタビンに対する薬剤感受性が異なる PC 細胞株 Miapaca-2, Panc-1, BxPC-1, AsPC-1, PK45P 及び PK59 細胞株を用いて、それぞれの細胞から抽出したタンパク質を試料として 2-DE と nano-LC-MS/MS により薬剤耐性株に特異的に増加するタンパク質のスポットを検出・同定した。さらに、ゲムシタビン感受性株 KLM1 からゲムシタビン薬剤耐性を獲得した KLM1-R を作成し、両者の細胞から抽出したタンパク質を試料として 2-DE と nano-LC-MS/MS により KLM1-R に特異的に増加するタンパク質のスポットを検出・同定した。

2) 同定されたタンパク質に対する特異抗体を用いたイムノプロット法によりゲムシタビン感受性 PC 細胞株と耐性細胞株間での定量評価を行った。

3) 評価されたタンパク質に特異な siRNA を用いてタンパク質のゲムシタビン耐性におけるタンパク質の機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、本学医学部倫理審査委員会で承認を受けた臨床研究に則り、患者等に本研究の内容を十分に説明して同意を得た。

C. 研究結果

C-1. HSP70 を固定化したプロテインチップによる自己抗体価計測技術の開発

1) PROTEOMEX 法を用いて自己抗体に反応する HCV-HCC バイオマーカー候補タンパク質の絞り込み：HCV-HCC のがん部組織に特異的に増減するタンパク質群の中からがん患者血清中の自己抗体に特異的に反応するタンパク質

として HSP70 と MnSOD およ peroxiredoxin (PRDX) が同定された。

2) プロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出：GFP と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップを熱処理して HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させ、Cy3 で標識した抗 GFP 抗体を内部標準として Cy5 で標識した抗体ヒト IgG 抗体を用いてチップ上の HSP70C 特異自己抗体量を Cy3/Cy5 蛍光比で数値化することによって、患者血清中自己抗体の定量性の向上と再現性の高い検出が可能になった(特許出願 2010-188841)。

3) プロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出：これまで作成したチップでは、HCC 患者血清の中の一部に GFP スポットに対する非特異検出が高かった。この問題を解決するために、蛋白質のチップ固定化時間、検出時の血清濃度、抗体濃度などの条件を検討した。結果として、同血清での GFP スポットに対する非特異検出が低減したが、なくなることはなかった。一方健常者では全く認められないことから、肝細胞癌患者血清は、非特異検出が高くなる傾向があると考えられた(図 1)。

4) 蛋白質・ペプチド固定化に対する Cys 数の検討：FLAG 抗体を用いて各ペプチドスポットを検出し、蛍光検出量をマウス IgG 検出が 1 とした相対値として示した。末端の Cys タグがないペプチドは全く蛍光が認められず、タグの Cys 数が増えるに従い検出量は増加した。2 種類の並びで FLAG タグと 6XHis タグを融合したペプチドの並び方により少し違いがあるが、Cys 数は 3 つ以上で良好なペプチドの固定化が可能であった(図 2)。

C-2. 抗がん剤ゲムシタビンに薬剤耐性を獲得する膵癌細胞のバイオマーカー候補蛋白 Hsp27 の同定と hsp27 遺伝子発現抑制による薬剤耐性解除の研究

1) ゲムシタビン耐性 PC 細胞株に特異的に増加するタンパク質の同定:ゲムシタビンに対して薬剤耐性を示す PC 細胞株 PK45p と PK59 ならびに薬剤耐性を獲得した KLM1-R に特異的に増加するタンパク質スポットは nano-LC/MS/MS により HSP27 とそのアイソフォームと同定された。

2) HSP27 に特異な抗体を用いてイムノブロット解析するとゲムシタビンに対して薬剤耐性を示す PC 細胞株 PK45p と PK59 ならびに薬剤耐性を獲得した KLM1-R に感受性株と比較して著しく増加しており、HSP27 に特異な siRNA を用いて KLM1-R の HSP27 の増加を抑制するとゲムシタビン耐性が解除された。

3) さらに、hsp27 遺伝子の発現抑制小分子化合物である KNK437 (図 3) を用いたゲムシタビンに薬剤耐性を獲得した PC 細胞株 KLM1-R 中の HSP27 の量的解析を行ったところ、HSP27 の特異的な減少 (図 4) とゲムシタビンに対する薬剤耐性の解除が認められた。

D. 考察

今回、自己抗体を用いたがん組織特異タンパク質バイオマーカーの高感度検出技術の改良を行い、HCV-HCC を中心とする難治性がんの新規バイオマーカー探索を試み、さらに、自己抗体を用いたプロテインチップ技術の改良を行い HCV-HCC において HSP70 の C 末端部および PRDX が有望なバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。HSP70 の C 末端部をチップ表面に固定化して患者血清中の自己抗体を検出すれば、特異的かつ効率的に HCV-HCC の大規模解析が容易となる。特に自己抗体を活用することにより、血清中に含まれる高濃度のタンパク質や混合物を除去する必要がなく、簡便な検診ツールとして有望であると考えられる (Akada, J., et al. A new type of protein chip to detect hepatocellular carcinoma-related autoimmue antibodies in the sera of hepatitis C virus-positive

patients., submitted) 。

一方、抗がん剤のゲムシタビンに対して感受性の異なる PC 細胞株の比較プロテオーム解析により、ゲムシタビンに対して耐性を示す細胞株および耐性を獲得とした細胞株に特異的に増加するタンパク質として HSP27 アイソフォームが同定され、siRNA を用いた HSP27 発現抑制実験から HSP27 がゲムシタビン耐性獲得に重要な役割を果たしていることが明らかになり、さらに HSP27 遺伝子発現抑制剤の KNK437 が PC 細胞株の薬剤耐性を解除することが示唆され、今後 HSP27 蛋白の機能の制御分子を探索することにより薬剤耐性を示す難治性膵癌の分子標的治療法の開発の緒が見つかるかと期待される。

E. 結論

患者血清中の自己抗体を活用したプロテインチップ技術の改良を行い、HSP70 の C 末端領域が HCV-HCC の特異バイオマーカー候補として有望であることを明らかにした。さらに、プロテインチップの熱処理操作と二重抗体ラベル法の導入により C 型肝炎関連肝細胞がんの診断技術として患者血清中のがん特異自己抗体を活用したバイオマーカー探索とさらなる高感度診断技術への改良を試み、今後、他の難治性がんについても自己抗体を活用した臨床応用に向けた診断技術として自己抗体価計測技術の実用化を試みる。

さらに、抗がん剤による膵臓癌の治療効果を評価するバイオマーカータンパク質候補として HSP27 が同定され、siRNA を用いた HSP27 の機能評価においても HSP27 がゲムシタビンに対する薬剤感受性に重要な役割を果たしていることが明らかになり、hsp27 遺伝子の発現やタンパク質機能の発現を調節する小分子化合物を探索し特定することによって難治性膵癌の新たな分子標的治療法の開発を目指す。

F. 健康危険情報

C型肝炎ウイルスの感染した肝細胞がん組織

ならび患者血清の取り扱いについては、二次感染を避けるための処置を行う必要があるとともに、その廃棄などについて十分な考慮が必要である。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Takenawa, T., Kuramitsu, Y., Wang, Y., Okada, F., Tokuda, K., Kitagawa, T., Ueyama, Y. & Nakamura, K. Proteomic analysis showed down-regulation of nucleophosmin in progressive tumor cells compared to regressive tumor cells. *Anticancer Res.* **33**, 153-60 (2013).
2. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Zhang, X., Akada, J., Oka, M. & Nakamura, K. Proteomic differential display identifies upregulated vinculin as a possible biomarker of pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* **28**, 1845-50 (2012).
3. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Akada, J., Kitagawa, T., Oka, M. & Nakamura, K. Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer Res.* **32**, 3219-22 (2012).
4. Kuramitsu, Y., Wang, Y., Taba, K., Suenaga, S., Ryozaawa, S., Kaino, S., Sakaida, I. & Nakamura, K. Heat-shock protein 27 plays the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* **32**, 2295-99 (2012).
5. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Takashima, M., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Tamesa, T., Sakaida, I., Oka, M. & Nakamura, K. Identification of four isoforms of aldolase B down-regulated in hepatocellular carcinoma tissues by means of two-dimensional Western blotting. *In Vivo.* **25**: 881-6 (2011).
6. Kuramitsu, Y., Takashima, M., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Tamesa, T., Akada, J., Wang, Y., Toda, T., Sakaida, I., Okita, K., Oka, M. & Nakamura, K. Up-regulation of 42 kDa tubulin alpha-6 chain fragment in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Anticancer Res.* **31**:3331-6 (2011).
7. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Zhang, X., Oka, M. & Nakamura, K. Differential expression of up-regulated cofilin-1 and down-regulated cofilin-2 characteristic of pancreatic cancer tissues. *Oncol. Rep.* **26**, 1595-9 (2011).
8. Yoshida, K., Kuramitsu, Y., Murakami, K., Ryozaawa, S., Taba, K., Kaino, S., Zhang, X., Sakaida, I. & Nakamura, K. Proteomic differential display analysis for TS-1-resistant and -sensitive pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res.* **31**, 2103-8 (2011).
9. Kuramitsu, Y., Zhang, X., Wang, Y., Nakamura, K. Identification of differentially expressed proteins in tumor necrosis factor-alpha-resistant and -sensitive rat hepatoma cells. *Anticancer Res.* **31**, 2059-63 (2011).
10. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Yoshino, S., Takashima, M., Zhang, X., Ueno, T., Suzuki, N., Oka, M. & Nakamura, K. Screening for serological biomarkers of pancreatic cancer by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Oncol. Rep.* **26**, 287-92, (2011).
11. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Zhang, X., Ueyama, Y. & Nakamura, K.

Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient strips and Flamingo TM fluorescent gel stain identified non-nuclear proteins possibly related to malignant tumor progression. *Anticancer Res.* **31**, 1259-63 (2011).

12. Taba, K. Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Mori-Iwamoto, S., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. & Nakamura, K. KNK437 down regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and enhances the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy.* **57**, 12-6 (2011).

G-2. 学会発表

(国際学会)

1. 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 4th-7th, 2011, Geneva, Switzerland).
 2. 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 31st, 2011, Bangkok, Thailand).
 3. 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 19th-23rd, 2010, Sydney, Australia).
- (国内学会)

1. 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)

2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
発明の名称: 自己抗体の検出方法
出願日: 平成 22 年 8 月 25 日
出願番号: 特願 2010-188841
出願人: 国立大学法人 山口大学
発明者: 中村和行 他
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

I. 研究協力者

赤田純子、藏満保宏、田中寿幸（山口大学大学院医学系研究科）

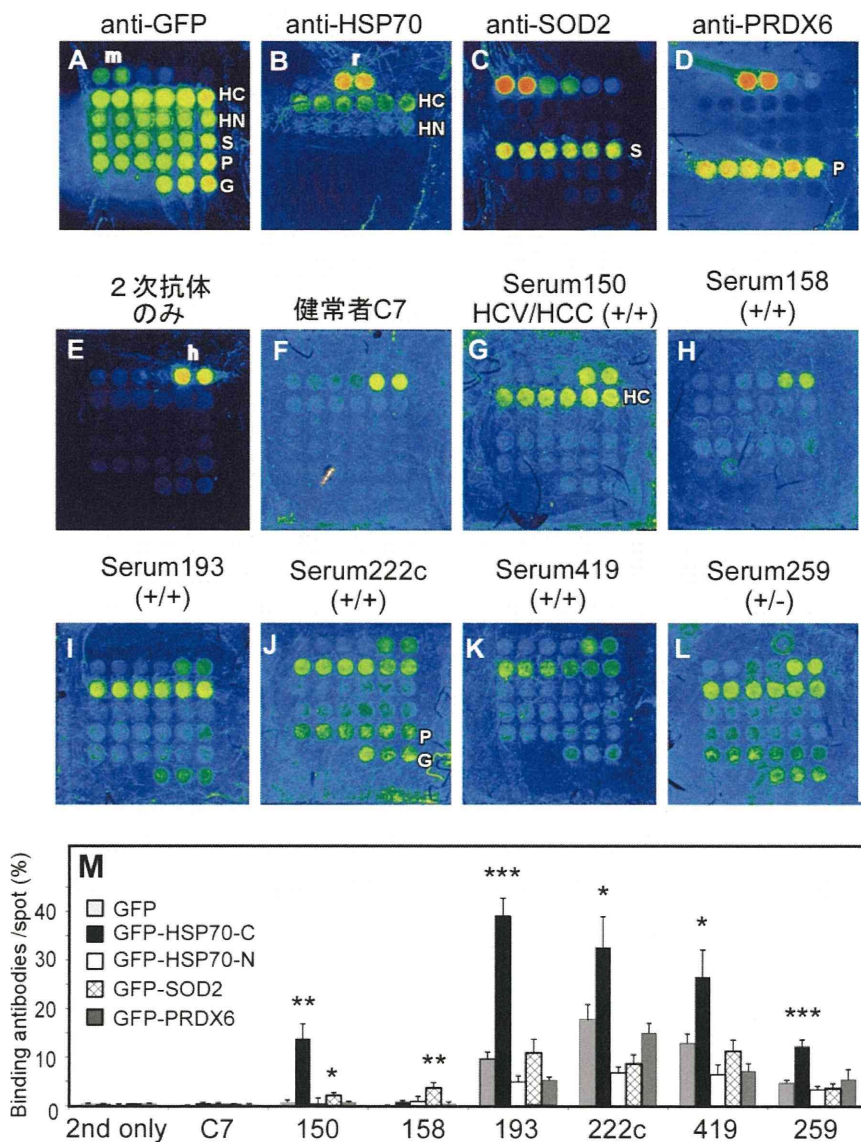


図 1. HCC 抗原チップによる血清自己抗体の蛍光検出と数値化 A-D) 市販抗体による各抗原蛋白質検出の確認。A) 抗 GFP、B) 抗 HSP70、C) 抗 SOD2、D) 抗 PRDX6 抗体。E-L) 血清自己抗体検出例。E) 2 次抗体のみ、F) 健常者血清検出、G-K) HCV 陽性肝細胞癌患者(++) 血清、L) HCV 陽性者(+/-)血清。M) 検出後チップ蛍光量の数値化。GF と各自己抗体スポット間の蛍光量の有意差を 3 段階に分けて*で示す (Student-t 検定)。各チップ最上列には 2 次抗体検出コントロールとして左よりマウス IgG、ウサギ IgG、ヒト IgG が 2 スポットずつ固定化してある。

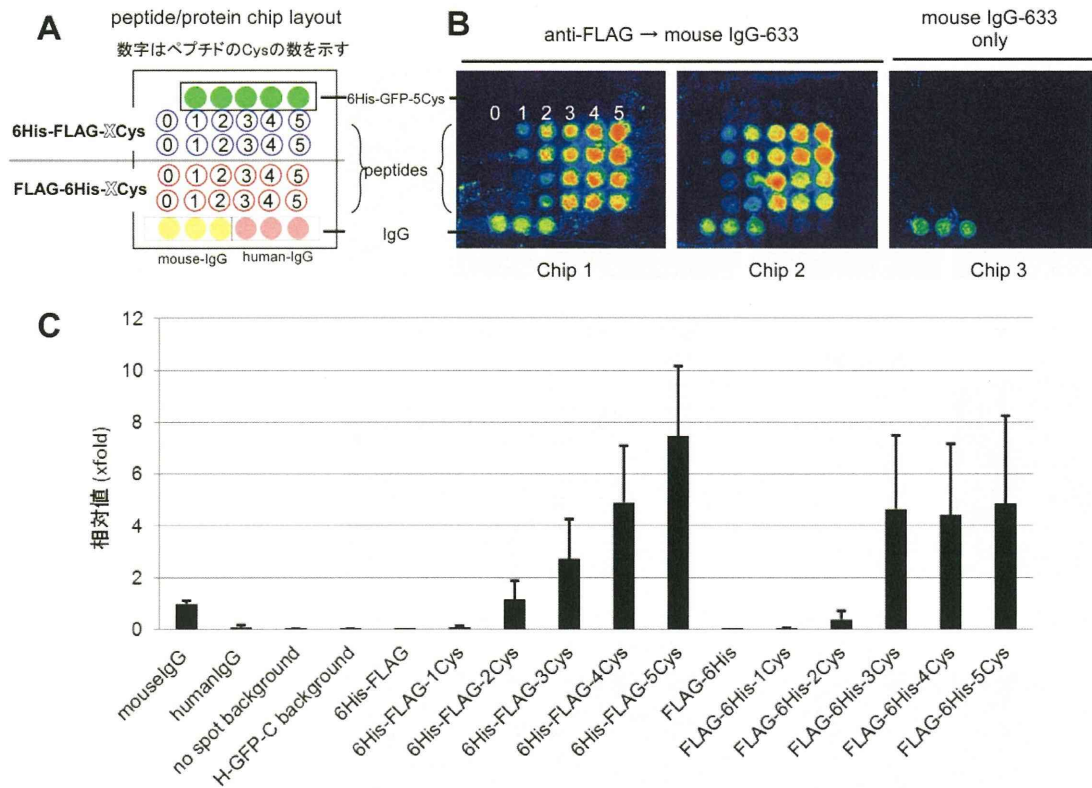


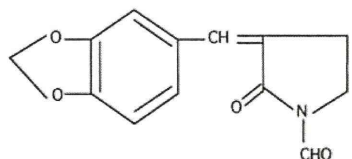
図 2. マレイミド基板固定化に対するペプチド末端のシステイン数の影響 A. 基板に固定化させたペプチドおよび蛋白質の配列図。B. FLAG 抗体による固定化ペプチドの蛍光検出 (Chip1 と 2) および 2 次抗体のみの検出 (Chip 3)。C. チップ蛍光量の数値化。Mouse IgG に対する 2 次抗体検出を 1 (左端) とし、各スポットの蛍光量を相対値で示した。

HSP inhibitor KNK437

Benzylidene Lactam Compound, KNK437, a Novel Inhibitor of Acquisition of Thermotolerance and Heat Shock Protein Induction in Human Colon Carcinoma Cells

Yokota S. et al. Cancer Res.60:2000

構造式:



N-formyl-3,4-methylenedioxy-benzylidene- γ -butyrolactam

- 大腸癌細胞株において用量依存的に mRNAレベルで数種類のHSPを抑制した。
- 200 μ M投与しても細胞生存に有毒ではなく、抗腫瘍効果はなかった。
- Quercetinよりも細胞毒性が弱く、HSP抑制効果が強い。
- 薬剂的効果としてはまだ明らかではない。

図 3. HSP 阻害剤 KNK437 の引用文献、構造、および効果のまとめ

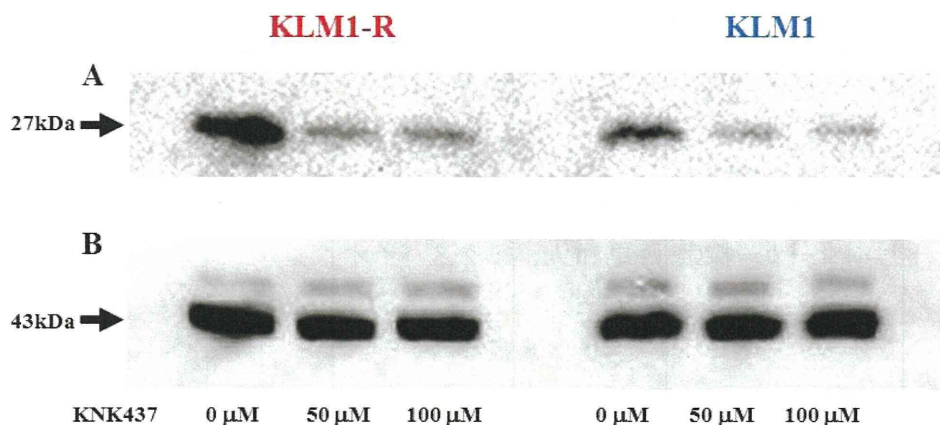


図 4. HSP 阻害剤 KNK437 による HSP27 の抑制 膵臓癌細胞株 KLM1-R 株および KLM1 株に、各種濃度の KNK437 を添加し、48 時間後に蛋白質を抽出して、ウエスタンブロットを行った。A) HSP27 検出、B) Actin 検出。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	現代質量分析学	化学同人	京都	2012	293-304
同上 (Ino, Y., Kazamaki, R.)	On-membrane identification of gel-resolved proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS)	Tschesche, H.	Modern Methods in Protein Chemistry	Walter De Gruyter	Berlin, Germany	2012	113-126
同上 (木村弥生, 平野 久)	LC/MS/MSによる疾患プロテオーム解析	日本分析化学会編	試料分析講座タンパク質分析	丸善出版	東京	2012	
同上 (Stephani-Kosin, K., Hirano, H. & Kamp, R.M.)	Proteomic analysis of Duchenne muscular dystrophy (DMD)	Tschesche, H.	Modern Methods in Protein Chemistry	Walter De Gruyter	Berlin, Germany	2012	235-248
尾野雅哉, (松原淳一, 山田哲司)	血漿を用いた膵癌早期マーカー探索	中村和行, 西尾和人, 西村俊秀	臨床プロテオミクスバイオマーカー探索から個別化医療へ	金原出版	東京	2012	338-340

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
朝長 毅	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
同 上	In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein list.	J. Proteome Res	12	208-13	2012
朝長 毅 野村文夫	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
朝長毅、中山敬一、 平野 久、荒木令江	Integrated view of the Human Chromosome X- centric Proteome Project.	J. Proteome Res.	12	58-61	2013
朝長 毅 中山敬一 宮本泰豪 加藤菊也	A strategy for large-Scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples.	J. Proteome Res.	11	5311-22	2012
朝長 毅 宮本泰豪 加藤菊也	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

朝長 毅 野村文夫	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
朝長 毅	Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser micro-dissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins.	Proteomics Clin. Appl.	6	417-7	2012
朝長 毅 野村文夫	Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice.	PLoS One	7	e37803	2012
同 上	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
同 上	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
朝長 毅	Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma.	J. Proteomics	78	362-73	2012
朝長 毅 野村文夫	The application of a three-step serum proteome analysis for the discovery and identification of novel biomarkers of hepatocellular carcinoma.	Int. J. Proteomics		Article ID: 623190 (Epub)	2012

朝長 毅 野村文夫	Identification of a novel biomarker for biliary tract cancer using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.	Int. J. Proteomics		Article ID: 108609 (Epub)	2012
同 上	SAP155- mediated c-myc suppressor FBP- interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues.	Cancer Sci.	104	149-56	2012
朝長 毅	Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser micro-dissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker..	J. Proteomics	75	833-44	201 2
朝長 毅 野村文夫	Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: its expression and possible clinical significance.	Hum. Pathol.	43	1282-8	2012
同 上	Combined proteomic analysis of liver tissue and serum in chronically alcohol-fed rats.	Alcohol Clin. Exp. Res.	37	Suppl E79-87	1,2012
朝長 毅	Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue bio-marker and therapeutic target for colorectal cancer.	J. Proteomics	75	5342-55	2012
角田慎一	Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer.	Pharmazie	67	253-5	2012

角田慎一	Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	421	140-4	2012
同 上	Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis.	Neurosci. Lett.	534	85-9	2013
鎌田春彦	抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術	薬学雑誌	132	473-7	2012
仲 哲治	CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells.	Int J Cancer	In press	1-9	2013
同 上	Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer.	Int. J. Cancer	132	472-84	2013
同 上	Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma.	PLoS One	7	E41994	2012
同 上	Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris.	Pigment Cell Melanoma Res.	25	219-30	2012

仲 哲治	Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts.	Exp. Dermatol.	21	331-6	2012
同 上	Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis.	Inflamm. Bowel Dis.	18	2169-79	2012
同 上	Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer.	Tumour Biol.	33	1141-9	2012
同 上	Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis.	Intestine	17	107-9	2013
中山敬一	Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry.	Oncogene	31	1975-87	2012
同 上	Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis.	J. Proteome Res.	11	3175-85	2012
同 上	The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2 ^{-/-} p27 ^{-/-} mice.	PLoS One	7	e36249	2012
同 上	Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling.	EMBO J.	31	2365-77	2012
同 上	The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis.	Cell	149	1098-111	2012