

201207005B (1/3)

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成20年度～24年度 総合研究報告書

(分冊 1/2冊)

研究代表者 山西 弘一

平成 25 (2013) 年5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

平成20年度～24年度 総合研究報告書

(分冊 1/2冊)

研究代表者 山西 弘一

平成25 (2013) 年5月

目 次

I. 総括研究報告	
疾患関連創薬バイオマーカー探索研究 -----	1
山西 弘一	
II. 分担研究報告	
1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と検証 -----	86
朝長 毅	
2. 疾患関連タンパク質の解析基盤の研究 -----	124
角田 慎一	
3. プロテオミクス手法による癌の創薬標的分子探索 -----	139
仲 哲治	
4. 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 -----	173
中山 敬一	
5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用 -----	180
平野 久	
6. 2DICAL 法による微量タンパク質解析技術の研究 -----	191
尾野 雅哉	
7. 循環器疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究 -----	199
寒川 賢治、南野 直人	
8. 精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究 -----	207
高坂 新一	
9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来 DNA の研究 -----	219
加藤 菊也、宮本泰豪	
10. 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 -----	226
野村 文夫	
11. 脳腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究： 統合プロテオミクスによるバイオマーカー／治療ターゲットとなる 脳神経系腫瘍組織細胞内シグナル分子群の解析 -----	240
荒木 令江	
12. 自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究 -----	258
中村 和行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	272
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	300

疾患関連創薬バイオマーカー探索研究

研究代表者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 研究所長

研究要旨

疾患関連バイオマーカーの発見には疾患の根本的な原因であるタンパク質の異常を見つけることが必須であり、ヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス研究が重要である。本研究では、癌、生活習慣病、神経疾患等を対象とした疾患バイオマーカーの開発を目的とし、ヒト疾患試料を用いて以下の研究を実施したので報告する。

1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と検証：朝長 毅

疾患関連バイオマーカーの発見には疾患の根本的な原因であるタンパク質の異常を見つけることが必須であり、ヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオミクス研究が重要である。本研究では、癌、神経疾患等を対象として、主に診断に有用な疾患バイオマーカーの開発を目的とした。

まず、バイオマーカータンパク質が濃縮されていると考えられる病巣部の試料を用いた探索を行った。具体的には、iTRAQ 法を用い、大腸癌や乳癌の組織を材料として、創薬ターゲットとなりやすい膜タンパク質やリン酸化タンパク質の大規模探索を行い、数百個のバイオマーカー候補タンパク質の同定に成功した。次に、それらのバイオマーカー候補タンパク質について、SRM/MRM 法を用いた大規模検証を行い、数十から百個程度のバイオマーカー候補タンパク質の検証に成功した。さらに、それらのタンパク質の診断マーカーとしての実用化を目指して、血中のエクソソームを SRM/MRM 法で解析したところ、約 30 個のタンパク質が定量でき、約 20 個のタンパク質は健常人に比べて癌患者で変化していた。これらは有望な癌診断マーカーになり得ると考えられた。また、同様の SRM/MRM 法を用いて、血漿中アルツハイマー病サロゲートバイオマーカーペプチド APL1 β の定量に成功し、血漿中で数 pg/ml という超微量の濃度で存在することを明らかにした。

また、一部の大腸癌バイオマーカー候補タンパク質について機能解析を行い、それらが大腸癌の発症・進行に関わっていることを見出した。これらのタンパク質については、新しい大腸癌治療薬になる可能性があると考えられた。

2. 疾患関連蛋白質の解析基盤の研究：角田慎一

本研究課題では、創薬バイオマーカー蛋白質の効率的探索・絞り込みを行いうる技術基盤の開発を目的に、①抗体プロテオミクス技術、②In vivo protein biotinylation 法、③Exosome に着目した解析法、を確立した。さらに、それら手法を駆使することによって、創薬バイオマーカー蛋白質の同定を試みた結果、乳がん特異的な創薬ターゲット蛋白質や肺がんの転移促進に関わる蛋白質、リンパ腫血管に特異的に発現する蛋白質、肺がん細胞から分泌される Exosome に特異性の高い蛋白質を見いだすことができた。これらの基盤技術は、創薬バイオマーカー探索研究、プロテオーム創薬の推進に貢献するものと期待される。

3. プロテオミクス手法による癌の創薬標的分子探索：仲 哲治

我々のグループではプロテオミクス手法を用いて癌などの各種難病に対する有効な治療法の開発に資する有用なバイオマーカー探索を目的として、以下 3 つの研究を実施した。

1つ目として、抗癌剤抵抗性として知られる卵巣明細胞腺癌と抗癌剤感受性として知られる卵巣漿液性腺癌の間で発現差を示すタンパク質を蛍光2次元ディフュージョン電気泳動法(2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis: 2D-DIGE法)を用いて抗癌剤耐性分子の探索を試みた。その結果、卵巣明細胞腺癌に高発現する分子の一つとして Annexin A4 を同定した。Annexin A4 は漿液性腺癌と比較し、卵巣明細胞腺癌において有意に高発現を示す事が免疫組織化学染色法及びウェスタンブロット法により明らかになった。さらに、Annexin A4 は漿液性腺癌に強制発現させることでカルボプラチンに対して抵抗性を誘導し、その機序として Annexin A4 がカルボプラチンの細胞内取り込み抑制と排出を促進することが細胞内カルボプラチンの定量解析により明らかになった。本研究結果から、Annexin A4 が抗癌剤耐性を克服する上で創薬標的となることが示唆された。

2つ目として、子宮内膜癌に対して定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)を用いて細胞表面膜タンパク質を定量的に解析する基盤技術の確立と、抗体医薬品開発における癌抗原の標的分子の探索を試みた。本手法により同定された創薬標的候補分子の一つとして Bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)を同定した。BST2は82%の子宮内膜癌患者組織で高発現を示したのに対し、正常子宮内膜組織の発現頻度は19%であり、BST-2は正常組織と比較して癌組織で優位に高発現を示した。続いて抗体医薬品の標的としてのBST2の有用性をin vitro, in vivoで解析した。その結果、抗BST2抗体は子宮内膜癌細胞株に対して、ADCC活性とCDC活性を介して抗腫瘍効果を示した。さらに、抗BST2抗体による抗腫瘍効果をSCIDマウスに子宮内膜癌細胞株(SNG-II、HEC88nu)を皮下移植したゼノグラフトモデルに対して、検証した結果、抗BST2抗体はコントロール抗体、およびPBS投与群のいずれに対しても優位な抗腫瘍効果を示した。さらに、抗BST2抗体はNOD/SCIDマウスに対しては抗腫瘍効果を示さなかったことから、in vivoにおいてはADCCを介して抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。本研究によりBST-2が子宮内膜癌の抗体医薬品標的分子として有用であることが示唆された。また、プロテオミクス手法による細胞表面膜タンパク質の網羅的定量解析が新規癌抗原を探索する基盤技術として有用であることが示唆された。

3つ目として、非常に転移しやすく化学療法も効きにくい予後不良な腫瘍である悪性黒色腫に対して、定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)により創薬標的分子を探索した。その結果、悪性黒色腫にて高発現する分子の一つとして Periostin を同定した。Periostinは正常皮膚では発現が非常に弱いのにに対し、悪性黒色腫で高発現を示した。免疫組織化学染色法による解析の結果、Periostinは腫瘍組織でなく、間質に発現が局在していた。さらに、Periostinの発現細胞を同定するため、悪性黒色腫細胞と線維芽細胞の共培養を行い、その後に悪性黒色腫細胞と線維芽細胞を単離後、Periostinの発現をRT-PCRにて解析した結果、共培養後の線維芽細胞からPeriostinが産生されていることが明らかとなった。Periostinはintegrin $\alpha\beta 3$ 、およびintegrin $\alpha\beta 5$ を受容体とし、p44/42MAPK経路を介して悪性黒色腫の増殖を促進する作用を持つことを明らかにした。腫瘍の増殖に対するPeriostinの役割を明らかにするため、Periostin/Rag2欠損マウス樹立し、Periostin/Rag2欠損マウスおよびRag2欠損マウスを用いて悪性黒色腫細胞(Mewo)を皮下移植した。その結果、Rag2欠損マウスと比較してPeriostin/Rag2欠損マウスで腫瘍の増殖が有意に抑制されていることが明らかとなった。腫瘍組織に対してKi-67を免疫組織化学染色にて解析した結果、Rag2欠損マウスと比較してPeriostin/Rag2欠損マウスにおいてKi-67の発現が低く、細胞周期が抑制されていた。

本研究により抗癌剤耐性に関与するタンパク質として Annexin A4、子宮内膜癌の抗体医薬品標的分子として BST-2、悪性黒色腫の増殖促進分子として Periostin を同定することが出来ており、

創薬標的としての有用性が証明された。

4. 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：中山敬一

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い、最終的にプロテオームワイドな MRM 解析プラットフォームである情報基盤 MRM (Information-based MRM : iMRM 法と略称) の開発に成功した。さらに iMRM 法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 (Information-based sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra : iSWATH 法と略称) による絶対定量法の構築を試みた。iMRM および iSWATH 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。

5. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：平野 久

卵巣明細胞腺癌を研究対象として、疾患関連タンパク質の検出・同定、創薬標的分子あるいは診断マーカーとしての有用性の検証、診断マーカーのアッセイに関する効率的な方法を探索した。そして、最も効率的と考えられる方法を用いて、実際に卵巣明細胞腺癌で発現が変動するタンパク質を検出し、創薬標的分子として利用可能なタンパク質を見いだした。一方で、診断マーカーとして実用化できる可能性が高いタンパク質を発見することができた。また、質量分析装置を用いたアッセイ方法の開発も行った。

6. 2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究：尾野雅哉

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た。本研究においてわれわれは、腎癌、前立腺癌の血漿バイオマーカーの検出に成功し、多数検体を用いた実験によりバイオマーカーの有用性を検証し、学術論文として公表した。また、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たんぱく質を含めたプロテオーム解析を行い、肝細胞癌と非癌部肝組織で有意に変動するたんぱく質及びリン酸化部位を同定した。2DICAL は研究初期の段階でプロテオームリサーチセンターに導入し、さらに質量分析計の改善に対応しうる 2DICAL のバージョンアップを行った。

7. 循環器疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の研究：寒川賢治、南野直人

循環器系疾患の病態、治療、予後等を評価可能なバイオマーカーとなるたんぱく質やペプチドを発見するには、微量の対象物を高感度に構造解析できる解析系と、対象試料からの標的物質群を生体内に存在する状態で、再現的に濃縮する前処理法の確立が必須である。質量分析計の進歩により前者の技術的基盤はかなり前進したが更なる改良が必要であり、後者を可能とする有効な前処理法は依然として確立されてない。本研究では、①血漿試料を主たる対象に、微量タンパク質の回収法、消化・分解を抑制したペプチド回収法の開発、②心血管系培養細胞上清のタンパク質やペプチドの回収法、解析法、③心不全モデル動物のプロテオーム解析に基づくバイオマーカーの探索、④バイオマーカーとして有望な分子量の大きいペプチドの回収法と構造解析法の開発、などを実施した。

8. 精神・神経疾患に関連する微量タンパク質解析技術の研究：高坂新一

本研究では精神疾患（統合失調症、気分障害など）、神経変性疾患（認知症、パーキンソン病など）の治療成績向上やその発症機序の解明及び診断技術の高度化を図るため、患者由来サンプル特に髄液中の蛋白質のプロテオーム解析を実行し、当該疾患に特異的な、あるいは特徴ある蛋白質群を同定し、その臨床的応用を図ることを目的とする。個々の患者でのプロテオーム解析を髄液 2mL から可能にするための微量測定法を開発し、さらに前処理を工夫して、さらに少ない量からの測定法を可能にした。また、国立精神・神経医療研究センターにおける髄液採取システムを確立し、精神疾患を中心に 700 検体以上の髄液を収集した。また、髄液採取後の温度管理、髄液と食事の関係などについても、診断及び研究に髄液を用いる際に有用な条件検討を行った。これらの方法論は、今後の髄液を用いた研究に有用であると考えられる。

9. 新規糖鎖腫瘍マーカーおよび血液中腫瘍由来 DNA の研究：加藤菊也、宮本泰豪

本研究では、癌の詳細な糖鎖構造解析を行うことで新規の癌特異的糖鎖抗原を発見し、それらの糖鎖腫瘍マーカーとしての臨床応用への可能性を検討することを目的とする。大腸癌および膵臓癌の糖脂質の詳細な構造解析を行うことにより、新規の癌特異的糖鎖抗原 NeuAc α 2-6(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (α 2-6 sialylated Type 1H, ST1H)の存在を見出した。この ST1H 抗原はルイス型陰性の大腸癌や膵臓癌にのみ発現が認められ、ルイス型陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。ELISA 法などを用いた臨床応用に向けて、ST1H を認識する単クローン抗体の作成を行い、昨年度までに 11 種類のクローンを得た。これらクローンの性状を検討した結果、ELISA を用いての合成糖脂質の測定にはきわめて高い特異性を有していた。しかし、免疫組織学法、組織の ELISA では陽性反応を得ることができなかった。今後は、今までと異なる方法での抗体作成を試みる必要がある。また、前立腺癌の糖鎖構造解析において、多量の遊離糖鎖が蓄積していることが判明した。詳細な構造を解析した結果、complex-type の N 型遊離糖鎖である NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc が最も多く存在していた。さらにこれら Neu5Ac 付加された N 型の遊離糖鎖の他に、哺乳類ではその存在比率は極めて低いと考えられている deaminoneuraminic acid (KDN)が付加された N 型の遊離糖鎖が、解析症例 5 症例中 4 症例に蓄積していた。これら KDN 付加された遊離糖鎖のマーカーとしての意義も検討を要する。

血液中腫瘍由来 DNA 研究に関しては、肺癌患者の血漿中 EGFR 変異が次世代シーケンサーによる解析(deep sequencing)で可能かどうか検討した。その結果生検陽性症例の約 60%で検出できた。これは前向き試験での検証を続行できる成績である。

10. 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：野村文夫

血清検体をもちいた MALDI-TOF MS によるペプチドーム解析におけるプレアナリシスについて検討して至適な採取・保存条件を確立した。この条件下で採取された血清試料を用いて、慢性血栓塞栓肺高血圧症のバイオマーカー探索をおこなった。血清・血漿を用いたプロテオーム解析においては、abundant proteins を除去していわゆる deep proteome を探索することが必要である。Immunodepletion により abundant proteins を除去し、逆相 HPLC により fractionation した試料を 1D または 2D の SDS-PAGE により分離するいわゆる three-step method を用いてアルコール依存症に関連する血清マーカーの探索を行った。three-step 法では abundant proteins と結合しているペプチド類も同時に失われる可能性があることが難点である。そこで abundant protein と結合しているペプチドも含めた血清ペプチド抽出法を開発した。

血清をもちいたバイオマーカー探索では発現プロテオミクスだけでなく自己抗体からのアプ

ローチも必要である。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。

一方、疾患マーカー探索ではいわゆる proximal fluid を対象とした探索も重要である。そこで歯周疾患の状態を最もよく反映する体液である歯肉溝滲出液 (Gingival Crevicular Fluid: GCF) は用いて、その採取方法、蛋白抽出法を確立し、正常 GCF および歯周疾患における GCF バイオマーカーの探索を行った。

11. 脳腫瘍に関連する微量タンパク質解析技術の研究：統合プロテオミクスによるバイオマーカー／治療ターゲットとなる脳神経系腫瘍組織細胞内シグナル分子群の解析：荒木令江

脳神経系腫瘍の薬剤治療標的となりうるバイオマーカーを検索するため、病態組織細胞サンプルを用いた統合プロテオミクスの方法論確立を試みた。分子発現差異解析法である iTRAQ (8 Plex) 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を検討した。全てのデータを統合マイニングし、重要分子シグナル群を抽出するための統合マイニング解析プログラム (MANGO, iPEACH) を考案し、さらに抽出重要分子群の迅速検証法、siRNA、阻害剤、活性化剤等を用いた生物学的機能解析法、全自動2次元電気泳動排出転写装置の開発による迅速検証法の確立などを検討することによって、スタンダードとなりうる一連の統合的方法論の開発を行った。特に悪性グリオーマの薬剤感受性、グリオーマ幹細胞 (GSC) および NF1 病態モデル神経幹細胞の維持と分化に関わる分子群の解析、および検証に応用し、新規の治療ターゲットとして、Vimentin transcriptional activation loop、GSC-differentiation niche、NF1-Dynein-GR-COX-1 signal を見出した。又、如何に融合技術によって大量に得られたプロテオームデータを迅速に処理し、重要機能分子群を抽出して検証する方法論が重要かつ有用であるか、創薬の観点から考察した。これらの方法論はすべての疾患・病態の解析はもとより、細胞生物学における基礎的な分子メカニズム情報を得るためのアプローチにも応用でき、蓄積されたデータベースを活用することによって、新しい病態メカニズムの解明や診断や治療のマーカー・創薬開発に重要な基礎情報を得る方法論として有用であると考えられる。

12. 自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究：中村和行

難治性がんの病態、治療、予後などの評価には信頼性の高いバイオマーカーの探索が不可欠である。とくにバイオマーカーとなり得る患者血清中の新規タンパク質の高感度検出技術の開発と応用が課題となっている。その基本技術として二次元電気泳動法と質量分析法による網羅的な血清タンパク質の分析が行われ、疾患関連バイオマーカー候補の報告があるが、信頼性の高いものは少ない。

本研究では、C型肝炎ウイルス関連肝細胞がんの診断バイオマーカー候補蛋白の探索を行い、候補蛋白として HSP70 を同定し、HSP70 を固定化したプロテインチップによる患者血清中の HSP70 特異自己抗体価計測技術の開発を行った。さらには、薬剤耐性を獲得した膵臓がん細胞株を用いて、薬剤耐性獲得の診断バイオマーカー候補蛋白として HSP27 を同定し、HSP27 の発現抑制による薬剤耐性の解除を明らかにした。

研究代表者

山西 弘一 独立行政法人医薬基盤研究所
所長

研究分担者

朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所
プロテオームリサーチプロジェクトリーダー

角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクトリーダー

仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所
免疫シグナルプロジェクト
リーダー

中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所
教授

平野 久 横浜市立大学大学院国際総合
科学研究科 教授

尾野 雅哉 国立がん研究センター研究所
ユニット長

寒川 賢治 国立循環器病研究センター研
究所 所長 所長

南野 直人 国立循環器病研究センター研
究所 部長

高坂 新一 国立精神・神経医療研究
センター神経研究所 所長

加藤 菊也 大阪府立成人病センター研
究所 所長

野村 文夫 千葉大学医学研究院
教授

荒木 令江 熊本大学大学院生命科学研究
部 准教授

中村 和行 山口大学大学院医学系研究科
教授

A. 研究目的

医薬品開発に際して、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーとなる疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保は、今後の医薬品産業の発展に必要不可欠であり、ライフラインと位置付けられる。従って、近年ますます激化しつつある新薬開発や新規治療技術の創出において、欧米諸国等との国際

競争に打ち勝つためには、疾患関連たんぱく質の発見とその知的財産権の確保に向けた作業を加速させることが重要となってきた。そのためには、タンパク 3000 プロジェクトなどのように、たんぱく質全般の基本構造と機能との連関を解析する「たんぱく質からのアプローチ」に加え、患者と健常者との間のたんぱく質の質、量の違いを時空間的に評価する「疾患からのアプローチ」により、創薬ターゲットや医薬品シーズ、疾患マーカーを同定することが急務となっている。

このような疾患プロテオミクス研究に基づいた創薬（プロテオーム創薬）への期待と注目が国際的・学際的に集約されてきた背景として、ゲノムシーケンス研究から判明した約 2 万 2 千種の遺伝子に比して、膨大とも言える 10 万種以上にものぼるたんぱく質、特に解析困難であった巨大分子量のたんぱく質に対しても、高性能質量分析機器の開発および「iTRAQ 法」、「ショットガン法」などの網羅性の高い新規開発などにより大規模かつ包括的なハイスループット解析が可能となり、「疾患からのアプローチ」が昨今の技術革新により現実的になったことが挙げられる。事実、スイスやドイツ、米国などの欧米諸国は、この「疾患からのアプローチ（疾患プロテオミクス）」に国家プロジェクトとして、大量の予算を投入し、今まさに着手し始めている。

以上の背景のもと、本研究は、我が国の主要疾患などに関して、患者と健常人との間の発現たんぱく質の変動を、質的、量的、時空間的に評価することにより、疾患関連たんぱく質の探索のための技術開発の推進と普及を図るとともに、探索されてきた数多くの疾患関連たんぱく質群の中から医薬品シーズ・創薬ターゲット・疾患マーカーとなり得るたんぱく質を絞り込み、これらを新規医薬品の創出等に有効活用していくための基盤技術を確立し、我が国独自の知的財産を創出しようとするものである。

以上の観点から本研究では、疾患関連たんぱく質解析研究を総合的に推進していくため、

疾患組織・細胞などの臨床検体から、疾患関連たんぱく質の探索・同定と、その中から医薬品シーズ・創薬ターゲットとなり得るたんぱく質の絞り込みを効果的かつ効率的に行い、疾患の予防・治療・診断方法の確立や画期的医薬品の開発に資することを旨とする。

B. 研究方法（各研究分担者の研究方法の項参照）

C, D. 研究結果および考察

C, D-1. 次世代プロテオミクス解析技術による大規模なバイオマーカーの探索と検証：朝長 毅

1. 大規模プロテオミクスによる疾患バイオマーカータンパク質の探索と検証

理想的なバイオマーカーとは、なるべく侵襲の少ない検体を用いて、迅速にかつ正確に病態を診断できるものである。そのためには、血液、尿、唾液などの体液を用いて診断できることが望ましく、これまでそれらの検体を用いた多くの研究がなされてきたが、実用化まで至った例はごくわずかである。その理由として、体液中には非常に多くのタンパク質が存在するのに対し、目的とするバイオマーカータンパク質は希釈されることにより非常に低濃度に存在しており、現在の解析技術ではそのような藁の中から針を探すことは非常に困難だからである。そこで我々は、バイオマーカーが濃縮されて存在すると思われる患部組織や患部近傍の体液、例えば脳神経疾患の髄液などの検体を用いて、iTRAQ法によるバイオマーカー候補タンパク質の探索（discovery）を行った。iTRAQ法によって同定・定量されたタンパク質の中から、各群間で有意な発現の差がみられたタンパク質をバイオマーカー候補として絞り込み、次のステップとしてそれらのバイオマーカー候補タンパク質の検証（verification）を行った。従来は抗体を用いたウエスタンブロットや免疫染色で検証を行っていたが、すべてのタンパク質に対して、特異性の高い抗体が入手でき

るとは限らず、そのために検証ができなかったことがバイオマーカータンパク質の実用化を阻んできた大きな理由の1つである。最近、SRM/MRM法という質量分析計を用いたタンパク質の絶対定量法が確立されたことで、バイオマーカー候補タンパク質の検証が容易に行えるようになった。SRM/MRM法の最大の利点は、どんなタンパク質でも抗体なしで特異的に検出、定量ができるという点である。その結果、これまでよい抗体が入手できないために検証ができなかったバイオマーカー候補タンパク質全てを拾い上げることが可能となった。また、抗体を用いた検証は、通常一度に1つのタンパク質でしかできないが、SRM/MRM法は、一度に数十から百種類のタンパク質の検証を短時間でできることも大きな利点である。我々はこのSRM/MRM法を用いることで、一度に数十～百種類のバイオマーカー候補タンパク質の検証を行っている。この手法で検証できたバイオマーカー候補タンパク質について、最終的にそれらのタンパク質を血中で検出・定量を試みるという戦略を取ることにした。

(1) 膜タンパク質に着目した大腸癌バイオマーカーの探索と検証

良性腫瘍と大腸癌組織（転移なしと転移あり）、それぞれ6検体ずつ合計18検体の大腸癌組織の膜タンパク質画分のiTRAQ-shotgunプロテオーム解析の結果、5,566個のタンパク質が同定され、その中の1,567個のタンパク質は膜貫通ドメインを持つことが推定された。また、Gene Ontology解析の結果、5,287個のタンパク質が注釈付けされ、その中の3,087個（58.4%）は膜タンパク質であることが推定された。同定タンパク質の中から、ポリープ、転移のない癌組織、転移のある癌組織の3群間で発現量の変化する（2.0倍または0.5倍以下、p値0.1以下）バイオマーカー候補タンパク質となる399個の膜タンパク質または細胞外タンパク質を見出した。その中で、診断、創薬のターゲットとなりやすい細胞膜タンパク質や細胞

外分泌タンパク質 105 個に着目し、SRM 法を用いた検証をおこなった。SRM 測定は、105 個の候補タンパク質に特異的な配列を持つ 2 つのペプチドを測定対象としておこなった。その結果、ポリープと癌の間で発現変化の見られたタンパク質 66 個、転移ありなし間で発現変化の見られたタンパク質 17 個について検証ができ、創薬ターゲットとして有望なバイオマーカーと考えられる。また、前者は早期診断、後者は再発や予後予測の有望なバイオマーカーである。

これらのバイオマーカーの診断への応用のためには、なるだけ侵襲なく採取できる血液や尿などの体液中で検出・定量できることが重要である。そこで我々はこれらのバイオマーカー候補タンパク質が血中で検出・定量できるかどうかについて検討した。前述したように、血中でのバイオマーカータンパク質の検出は非常に難しい。なぜならば、血中タンパク質濃度のダイナミックレンジが広く、アルブミン等の量の多いタンパク質が 99% を占めているため、それらのタンパク質に邪魔されてバイオマーカー候補となる微量なタンパク質は検出が難しいためである。従って、それらのバイオマーカー候補タンパク質を検出するためには何らかの前処理法が必要である。そこで我々は、血中の微細小胞であるエクソソームに着目した。なぜならば、エクソソームは細胞から分泌される小器官であり、細胞中にある RNA やタンパク質を含むため、癌細胞中のバイオマーカー候補タンパク質を含んでいる可能性が高いこと、また、エクソソームを分離する際に量の多い血清タンパク質を除くことができるためである。我々は、上述したバイオマーカー候補タンパク質を含む約 100 個のタンパク質が血中エクソソーム中で検出・定量できるかどうか検討した。その結果、これまで 27 個のバイオマーカー候補タンパク質がエクソソーム中で検出でき、約 20 個のタンパク質が大腸癌の進展に伴って変化することを見出した。

今回我々は、SRM/MRM 法を用いることに

より 100 個以上のバイオマーカー候補タンパク質を検証することができた。SRM/MRM 法を用いた大腸癌膜タンパク質の大規模検証の報告は世界で初めてである。これまでの検証は主に抗体を用いたウエスタンブロットや免疫染色法で行っていたが、抗体はタンパク質によっては入手できない場合が多く、また入手できたとしても非特異的反応によって目的のタンパク質の検証が出来ないケースが多々ある。それに比して、SRM/MRM 法はペプチドさえ合成できればほとんどのタンパク質を定量することが可能で、しかも感度、特異性に優れていることが大きな利点である。しかも、数十から百個程度のターゲットペプチドを一度の解析で測定ができることから、マルチマーカー解析に最適である。このような同時マルチマーカー解析は抗体を用いた方法では不可能であり、今回の我々の結果により SRM/MRM 法がバイオマーカー探索に大きな威力を発揮することが明らかとなった。

(2) 膜タンパク質に着目した乳癌バイオマーカーの探索と検証

MammaPrint によりハイリスク群 (9 検体) とローリスク群 (9 検体) に分類された乳癌患者 18 症例の乳癌組織の膜画分を用いた iTRAQ-shotgun プロテオーム解析により 829 の膜タンパク質、340 の細胞外タンパク質を含む 5,122 種類のタンパク質の同定に成功した。その中でハイリスク群とローリスク群を比較して 2 倍以上の発現の差が見られた 61 種類の膜、細胞外タンパク質をバイオマーカーの候補タンパク質とした。

61 種類の候補タンパク質から SRM/MRM を行える条件を満たした 49 種類のタンパク質において相対定量比較を個々の検体を用いて SRM/MRM により行った。SRM/MRM の定量値は、添加した安定同位体標識ペプチドに対する内在性ペプチドの比により算出し、その定量値をもとにハイリスク群、ローリスク群の有意差検定により比較を行った。その結果、23 種類のタンパク質でハイリスク群とローリスク群で有意差のある発現変動を示し

た。

(3) リン酸化タンパク質に着目した乳癌バイオマーカーの探索と検証

MammaPrint によりハイリスク群 (6 検体) とローリスク群 (6 検体) に分類された 12 症例の乳癌組織のリン酸化プロテオーム解析により 3537 のリン酸化タンパク質、10,438 のリン酸化ペプチドの同定に成功した。この中で 4 セット中 3 セット同定され、両群間で 2 倍以上差がある有意差 ($p < 0.1$) のついたリン酸化タンパク質 103 種類、リン酸化ペプチドは 117 種類存在した。このうち、両群間で差の大きいもの 6 種類、タンパク質レベルで乳癌の予後不良に関与することが報告されているもの 12 種類、そして細胞膜タンパク質のリン酸化タンパク質 2 種類、計 20 種類のリン酸化タンパク質をバイオマーカー候補とした。

20 種類の候補タンパク質から SRM/MRM を行える条件を満たした 16 種類のリン酸化ペプチドを使い、個別検体による SRM/MRM を行った。SRM/MRM の定量値から、各検体におけるリン酸化ペプチドの強度を比較した結果、4 種類のリン酸化サイトについて、有意差が見られた ($p < 0.05$)。また、8 種類のリン酸化サイトについては、差のある傾向が見られた ($p < 0.2$)。残り 4 個のリン酸化ペプチドについては、両群間で有意差が見られなかった。

(4) 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 の定量

アルツハイマー病は脳内への A β 42 の蓄積が原因と考えられている。従って、アルツハイマー病の診断には A β 42 の蓄積量を検出することが有用と考えられるが、A β 42 は脳細胞から体液中に出てこないため、A β 42 の蓄積量を反映するサロゲートマーカーが必要である。A β 42 は細胞膜に存在する β APP タンパク質が BACE と Presenilin/ γ -secretase と呼ばれるタンパク質切断酵素によって生成されるが、 β APP タンパク質類似タンパク質である APLP1 も同様なメカニズムで切断され、

しかもその生成物である APL1 β は細胞外に分泌されることが知られている。大阪大学大河内らはその APL1 β が髄液中で検出できること、また β APP から生成される A β 38、40、42 に対応して APLP1 から APL1 β 25、27、28 が生成されること、さらにアルツハイマー病患者の髄液において APL1 β 28/ total APL1 β 比が健常者と比較して高いレベルで存在しており、新規のアルツハイマー病サロゲートマーカーと成り得ることを報告した。しかし、髄液検査は侵襲が高いため健診には不適であり、血液検査などのより侵襲の低い手段が必要とされている。ところが、血中の APL1 β ペプチドは髄液中にの千分の一以下の極微量にしか存在しないため、抗体を用いた ELISA 法では検出が困難であることが判明した。そこで我々は、前述の SRM/MRM 法を用いて、ヒト血漿中に存在する APL1 β の検出、定量を試みた。

その結果、まだ定量の再現性に問題があるものの、血漿中の APL1 β の定量に成功した。内部標準ペプチド量をもとに算出したところ、内在性 APL1 β 量は 1fmol/ml (数 pg/ml) 以下のレベルであった。また、同一患者の髄液中と血漿中の APL1 β 28/total APL1 β 比はよい相関を示すことが確認できた。fmol/ml レベルの血中タンパク質・ペプチドを検出・定量できたという報告はこれまでになく、世界で初めて達成した超高感度定量レベルである。

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

なければならない。

2. 新規大腸癌関連タンパク質 FAM83H の機能解析

FAM83H は歯のエナメル質形成不全症という遺伝病の原因遺伝子として知られているが、我々はこの因子が大腸癌組織において、発現増大していることを見出した。そこで、FAM83H が細胞増殖に関与しているかどうか調べるために、FAM83H siRNA 処理した HCT116 大腸癌培養細胞株の細胞数変化を調べた。10,000 個の細胞を 12 well dish に撒き、2 日後に FAM83H siRNA もしくは control siRNA を導入した。導入後 24、48、72 時間後の細胞数を計測した結果、コントロールの細胞と比較し、FAM83H ノックダウン細胞では細胞増殖が著しく抑制されることが示された。FAM83H ノックダウン細胞ではアポトーシスマーカーである断片化 PARP と断片化 caspase 3 が Western blot 法で検出されたことから、FAM83H は大腸癌細胞の増殖と生存に必要であることが示唆された。また、細胞の運動機能に関連する FAM83H の機能を調べるために、HCT116 細胞の FAM83H をノックダウンし Wound healing 解析を行った。HCT116 に FAM83H siRNA もしくは control siRNA を導入し、その 24 時間後に細胞シートに傷をつけた。その後の細胞シートの動きを顕微鏡でモニタリングした結果、コントロールに比べて FAM83H をノックダウンした場合に細胞シート先端の移動スピードが著しく減少していることが示された。

そのメカニズムを調べるために、プロテオミクスを用いた相互作用解析を行ったところ、FAM83H は複数のケラチンと Casein kinase 1 alpha (CK-1 α) と結合することを見出した。それらのタンパク質が複合体を形成しているかどうか確かめるために、FAM83H、Keratin18、CK-1 α の抗体を用いた免疫染色を行ったところ、それらのタンパク質が共局在していることがわかり、確かに複合体を形成していることが示された。

FAM83H や CK-1 α がケラチンと共局在を示したことから、それらのタンパク質がケラチン細胞骨格を制御することにより大腸癌細胞の浸潤に関わっているのではないかという仮説を立てた。そこで、FAM83H を細胞に過剰発現させたところ、ケラチン繊維の脱重合が認められた。逆に FAM83H をノックダウンするとケラチン繊維の bundling が認められた。CK-1 α のノックダウンでも FAM83H と同様にケラチン繊維の bundling が認められた。このことから、FAM83H がケラチン骨格形成を制御することによって、細胞の浸潤に関わっていることが示唆された。

次に FAM83H と CK-1 α の関係を調べるために、FAM83H を過剰発現またはノックダウンして CK-1 α の局在に対する影響を調べた。まず、FAM83H をノックダウンした時の CK-1 α の局在を調べたところ、CK-1 α がケラチン骨格と共局在しないことが認められた。逆に FAM83H を過剰発現すると、上述した脱重合したケラチン繊維上に FAM83H と CK-1 α が共局在することが分かった。CK-1 α の過剰発現やノックダウンによって FAM83H の局在は変化しないことから、FAM83H が CK-1 α のケラチン繊維への局在を制御することによって細胞骨格形成に関わっていることが示唆された。

このことをさらに確かめるために、FAM83H 過剰発現によるケラチン繊維の脱重合が CK-1 α 依存的であるかどうか調べてみた。FAM83H を過剰発現すると同時に CK-1 α をノックダウンしたところ、CK-1 α が抑制された状態ではケラチン繊維の脱重合は認められなかった。以上の結果から、FAM83H は CK-1 α の局在制御を介してケラチン細胞骨格形成に関わっていることが強く示唆された。また、大腸癌で見られた FAM83H の過剰発現は、CK-1 α のケラチン繊維への局在を阻害することでケラチン繊維の脱重合を引き起こし、大腸癌細胞の遊走・浸潤に関わっていることが示唆された。我々は、in vivo においてもこの仮説を支持する結果を得ており、

FAM83H が新しい大腸癌治療薬のターゲットとなる可能性を有していると考えている。特に FAM83H と CK-1 α の相互作用阻害剤は、新規大腸癌治療薬の有望なリード化合物となると思われる。さらに、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。

C, D-2. 疾患関連蛋白質の解析基盤の研究： 角田慎一

1. 抗体プロテオミクス技術の開発と乳がん 組織特異的バイオマーカー蛋白質の探索

我々はこれまでに、蛋白質の解析に必須のモノクローナル抗体を *in vitro* で作製可能なファージ抗体ライブラリーに着目し、プロテオーム解析で見いだされる疾患関連創薬バイオマーカー蛋白質候補に対して迅速かつ網羅的に抗体を作製可能な方法論「抗体プロテオミクス技術」を開発してきた。これにより、数多くの発現変動蛋白質の中から発現分布などを指標に、有用な蛋白質の効率的な絞り込みが期待される。そこで、本基盤技術の有用性を検証すべく、乳がん細胞と正常乳腺細胞に適用した。新規乳がん関連マーカー蛋白質の探索を目的として、不死化乳腺細胞株 184A1 と乳がん細胞株 SKBR3 の 2D-DIGE 解析を試み、特に発現変動率の大きかった 21 個の spot を見いだした。ピックアップしたゲル片からそれぞれ蛋白質を抽出して MS 解析した結果、全ての蛋白質を同定した。また、残りの抽出蛋白質をニトロセルロース膜へと blot し、Dot Blot を用いたパンニング法を同時に行った。その結果、パンニングを繰り返す度に目的とする抗体が濃縮され、全ての候補に対するモノクローナル抗体を約 2 週間という短期間に単離することに成功した。そこで、これら抗体提示ファージを用いて、多数の乳がん組織・正常乳腺組織が搭載された組織アレイを免疫染色したところ、正常乳腺組織で

は発現が認められず、乳がん組織にのみ発現が認められた乳がん特異的な蛋白質を多数同定することに成功した。この中には、TRAIL-R2 のように、既に乳がんなどでの関与が指摘されている既知の蛋白質の他にも、RREB1 や Eph receptor A10(EphA10) のように、乳がんとの関連が知られていない興味深い蛋白質も含まれていた。本結果は、候補蛋白質を網羅的にバリデーションした故に得られた知見であり、本技術の有用性を示唆するものである。

EphA10 は、チロシンキナーゼ型の Eph receptor ファミリーの 1 つである。近年、EphA2 や EphB4 などのファミリー分子が、がんの発症・増殖・転移などの悪性形質に関与することが報告され、EphA2 に対するモノクローナル抗体が臨床試験中であるなど、Cancer biology や創薬の観点から Eph receptor ファミリーが注目されている。しかしながら、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、ほとんど何も明らかにされていない機能未知蛋白質である。そこで、EphA10 が乳がんの新たな分子標的治療薬のターゲットになりうるか、発現分布の観点から有用性を評価した。まず、様々な臨床情報を有した症例のがん組織を免疫染色し、EphA10 の発現分布と各パラメータとの相関を解析した。その結果、EphA10 は、リンパ節転移陽性症例、並びにステージの進行に伴って有意にその発現割合が高くなることを mRNA・蛋白質レベルで明らかにした。したがって、詳細な機能解析は必要なものの、EphA10 は乳がんの悪性化に関わる重要な蛋白質の 1 つであることが示唆された。また、既存の分子標的治療薬のターゲットとの発現の相関を解析したところ、Her2 陰性症例や、難治性の TNBC 症例にも発現が認められた一方で、正常組織では精巣以外で発現が認められなかったことから、有効な治療法のない症例に対する新たな治療薬標的になりうることが示唆された。

2. 抗体プロテオミクス技術による転移関連バイオマーカー蛋白質の探索と評価

さらに、抗体プロテオミクス技術の汎用性を検証すべく、がんの重要な予後決定因子である転移に関連する蛋白質の同定を試みた。高転移性肺がん細胞株 RERF-LC-KJ と低転移性の肺がん細胞株である RERF-LC-KJ、さらに正常気管上皮細胞に対して、まず、2D-DIGE 解析によって肺がん細胞特異的かつ転移に関連する蛋白質候補を探索した。その結果、16 種類の候補蛋白質を同定する一方で、これら全てに対し、モノクローナル抗体の創製に成功した。そこで転移に関する臨床情報のある肺がん組織及び正常肺組織が搭載された組織アレイを免疫染色した結果、正常組織に比較して肺がん組織で高率に発現し、リンパ節転移陰性症例に比べて陽性症例で発現の高い Oxysterol binding protein like 5(OSBPL5)と Calumenin(CALU)を見いだした。これら蛋白質の機能を解析するため、強制発現・ノックダウン細胞を用いて *in vitro* invasion assay を試みた。その結果、両蛋白質共に、強制発現細胞で浸潤性が亢進し、ノックダウンにより浸潤性が抑制され、両蛋白質が浸潤促進を一因として、転移陽性症例で有意に発現していた可能性が考えられる。以上より、抗体プロテオミクス技術は、汎用性の高い基盤技術である可能性が示された。

3. *In vivo* biotinylation 法による腫瘍血管特異的蛋白質の同定と分子標的治療薬の開発

In vivo biotinylation 法は、① *in vivo* におけるタンパク質の発現状態をそのまま反映していること、②腫瘍血管に発現するために、がん組織への浸透性を考慮せずに利用できること、③正常血管と比較するため、腫瘍血管特異抗原が同定される可能性が高いこと、④抗体医薬の分子標的として有用性が高い膜蛋白質を効率良く精製できることなど、数多くの利点が挙げられる。そこで、本技術を用いて、腫瘍血管特異的な創薬ターゲット蛋白質を同定し、新規分子標的治療薬開発の可能

性を検証した。A20 リンパ腫移植マウスに対してビオチン化試薬を環流して、血管に発現する蛋白質をラベル化した。転移巣のがん血管がラベル化されていることを確認したうえで、この組織からビオチン化タンパク質を回収し、質量分析により蛋白質同定を行うと共に、DeepQuantER にて定量解析を行った。その結果、発現量が上昇していた蛋白質の中で、同定された上位の蛋白質 8 種類を選択した。各候補蛋白質に対する抗体を用いて、移植したがん組織に対して免疫染色を行ったところ、これまでに報告のある腫瘍関連抗原である Transferrin Receptor や Endoglin などの発現は低かったのに対して、BST-2 や EMILIN-1 などは、血管に対して特異的かつ高い発現量を示すことが明らかとなった。そこで、BST-2 に対してさらなる検討を進めたところ、BST-2 は正常の組織(脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、リンパ節、腎臓、小腸、腎臓さらに筋肉)では発現が認められなかった。そこで、BST-2 抗体を用いた抗体療法の可能性を検証した。Ramos、DoHH-2、SU-DHL-4 細胞をマウスに移植し、BST-2 の発現を確認したうえで、抗 BST-2 抗体を投与し、腫瘍血管集積性及び腫瘍増殖抑制効果を評価した。その結果、抗 BST-2 抗体は腫瘍血管に集積し、皮下移植した腫瘍の増殖抑制効果が観察された。最後に、ヒトのリンパ腫組織(非ホジキンリンパ腫、播種性大 B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ腫など)における BST-2 の発現を免疫染色により検証した結果、いずれの組織においても BST-2 が発現していることが明らかとなった。今回同定された BST-2 は TypeII の膜糖蛋白質であり、ミエローマ細胞に高発現することが知られていた。本研究では、ミエローマのみならず、その血管にも発現していることを明らかにし、BST-2 に対する抗体が腫瘍増殖抑制効果を持っていたことから、リンパ腫に対する新しい創薬ターゲットとして、抗体医薬品の創製に期待が寄せられる。

4. がん細胞分泌 Exosome に着目した新規肺がんバイオマーカー蛋白質の探索

Exosome は、細胞・組織から分泌される直径 100 nm ほどの小胞であり、近年、ドナー細胞由来の蛋白質や miRNA を内包・安定化して、遠隔のレシピエント細胞に情報を伝達する新たな因子として注目されている。健常者に比較してがん患者で血中 Exosome 量が増大することも報告されており、がんにおける Exosome の役割解明、並びにがん関連マーカーとしての利用が期待されている。そこで、正常細胞から分泌される Exosome 由来の蛋白質と比較して、がん細胞から分泌される Exosome でユニークに発現している蛋白質を同定し、創薬バイオマーカー蛋白質としての有用性評価を試みた。初代ヒト正常肺胞上皮細胞 (HPAEPiC) とヒト肺がん細胞株 (HARA、HARA-B、A549) の培養上清から調製した Exosome を精製し、質量分析により各 Exosome のプロテオームを比較解析した。その結果、HPAEPiC 由来 Exosome に比べ、がん細胞 (HARA、HARA-B、A549) 由来 Exosome で共通して高発現していた 109 種類の蛋白質を同定した。これらの中には、膜蛋白質であって、これまで Exosome 上での発現が報告されていない新規の創薬バイオマーカーとなりうる候補 (Eph receptor A2 (EphA2)、Contactin-1 (CNTN1)) もあった。そこで、これらの肺がんバイオマーカー蛋白質としての有用性を検証するため、組織アレイにて発現プロファイルを解析したところ、両蛋白質とも正常肺組織では染色されなかったのに対し、肺がん組織で発現していることが明らかとなった (EphA2 : 68%、CNTN1 : 21%)。また、病理学的組織型による発現差異を解析した結果、EphA2 は多くの組織型の肺がんが発現していたのに対し、CNTN-1 は非小細胞肺がんの中で、肺腺扁平上皮がんにおいて、約 90% (10 症例中 9 症例が陽性) の患者が発現していることが判明した。肺腺扁平上皮がんの症例数は少ないものの、予後不良であることが報告されている。従って、

CNTN-1 は肺がんの中でも難治性の肺腺扁平上皮がんの可能性を示すバイオマーカー蛋白質として有用であることが示唆された。

C, D-3. プロテオミクス手法による癌の創薬標的分子探索 : 仲 哲治

1. 卵巣明細胞腺癌薬剤耐性分子の同定と抗癌剤耐性機序の解析

(1) 2D-DIGE 法による卵巣明細胞腺癌と卵巣漿液性腺癌細胞間のタンパク質発現解析

2D-DIGE 法を用いて卵巣明細胞腺癌細胞株 (OVISE) と卵巣漿液性腺癌細胞株 (OVSAHO) の間におけるタンパク質発現差を解析した。OVISE にて高発現を示したタンパク質 (8spot)、及び、OVSAHO にて高発現を示すタンパク質 (6spot) について、それぞれ対応するスポットを銀染色を行ったゲルより切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化法を行い、ペプチドを抽出した。得られたペプチドサンプルを質量分析計 (LC-MS/MS (LCQ)) にて解析を行い、MASCOT サーチエンジンにてデータベースサーチを試みた。その結果、卵巣明細胞腺癌において、グルタチオン S トランスフェラーゼなど解毒に関するタンパク質も発現上昇が認められたが、卵巣明細胞腺癌に高発現するタンパク質として Annexin A が同定された。Annexin A4 はカルシウムイオン依存的にリン脂質二重膜に結合する細胞内タンパク質であり、細胞膜の透過性やエンドサイトーシス、エクソサイトーシスに関係することが報告されており、抗癌剤の細胞内取り込みなどに関係していることが考えられた。

(2) Annexin A4 の発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株 (OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株 (OVSAHO, OVKATE) に対して Annexin A4 の発現をリアルタイム PCR 法及び、ウェスタンブロット法にて解析した結果、Annexin A4 は mRNA レベル、タンパク質レベル共に卵巣漿液性腺癌に比べ、卵巣明細胞腺癌にて特異的に高発現を示した。

(3) 卵巣癌患者組織における AnnexinA4 の発現解析

卵巣明細胞腺癌(CCC)、卵巣漿液性腺癌(SAC)、卵巣類内膜癌(endometrioid adenocarcinoma)、卵巣粘液性腺癌(mucinous cystadenocarcinoma)患者組織126検体について免疫組織化学染色にて Annexin A4 の発現を解析した。その結果、Annexin A4 の発現が卵巣漿液性腺癌に比べ卵巣明細胞腺癌にて高発現していた。この結果を確認するため、凍結手術組織よりタンパク質を抽出し、Annexin A4 の発現をウェスタブロット法にて解析した結果、Annexin A4 の発現は確かに卵巣漿液性腺癌に比べ、卵巣明細胞腺癌で特異的に高発現を示していた。

(4) AnnexinA4 安定発現株の作成とカルボプラチンの IC₅₀ 測定

卵巣明細胞腺癌にて高発現している Annexin A4 が抗癌剤耐性と関係することを明らかにするため、抗癌剤感受性である卵巣漿液性腺癌に Annexin A4 遺伝子発現ベクター、及びコントロールとして空ベクターを導入し、安定発現株を樹立した。Annexin A4 安定発現株と空ベクターのクローンについて、細胞増殖アッセイキット(Cell Counting Kit-8 (Dojindo))を用いてカルボプラチンに対する IC₅₀ 値を用いてアッセイした結果、コントロール株では 23 μ M であるのに対し、Annexin A4 安定発現株では 42 μ M と、Annexin A4 を強制発現させると抗癌剤に対して耐性を誘導することが明らかになった。

(5) AnnexinA4 安定発現株における抗癌剤の細胞内取り込み、細胞外排出に関する実験

Annexin A4 安定発現株が誘導するカルボプラチン耐性機序を明らかにするため、Annexin A4 が細胞膜の透過性を制御する分子であることから、カルボプラチンの細胞内取り込み、及び細胞外への排出に関する実験を行った。細胞内カルボプラチン量はプラチナを測定することで定量した。Annexin A4

安定発現株、及び、コントロール細胞について 2mM のカルボプラチンで 1 時間処理した後、細胞内プラチナ量を定量した結果、細胞内に蓄積したプラチナ量はコントロール細胞株と比べ Annexin A4 安定発現株にて有意に低下を示した。このことから Annexin A4 の強制発現は細胞内への抗癌剤取り込みを抑制することが示唆された。さらに、Annexin A4 安定発現株、及び、コントロール細胞について 2mM のカルボプラチンで 1 時間処理した後、抗癌剤を含まない培地で 6 時間培養した後、細胞内に残存したカルボプラチン量を測定した結果、コントロール細胞群では 6 時間の培養で細胞内の抗癌剤の排出に有意な差は見られなかったが、Annexin A4 安定発現株では抗癌剤を含まない培地で 6 時間培養することで細胞内に残存したカルボプラチン量が有意に低下した。このことから、Annexin A4 は細胞内に取り込まれたカルボプラチンの細胞外排出にも関与する事が示唆された。

2. 子宮内膜癌の抗体医薬標的分子の探索

(1) iTRAQ 法による子宮内膜癌細胞表面膜タンパク質の定量的プロテオーム解析

網羅的なタンパク質発現解析の結果、364 個のタンパク質が同定された。これらの中で、細胞膜貫通ドメインを有する分子が 160 個同定された。正常子宮内膜細胞と比較して、7 種類の子宮内膜癌細胞株の内、4 種類の癌細胞株にて 2 倍以上に高発現する細胞表面膜タンパク質として 15 個同定した。これらの中には既に論文で子宮内膜癌に高発現することが知られているタンパク質である、L1 cell adhesion molecule (L1CAM)が含まれていた。今回、我々が行った解析の結果、これまで子宮内膜癌に高発現することが報告されていないタンパク質として BST2 を同定した。

(2) RT-PCR および FACS による癌抗原発現の解析

同定された BST2 について、特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法により BST2 が正常子宮内膜細胞では発現せず、子宮内膜癌細胞

胞株に発現していることを確認した。さらに、BST2 について、特異的な抗体を用いて FACS(fluorescence-activated cell sorter)にて解析を行った。その結果、BST2 が実際に癌細胞表面に発現していることを確認した。これらの結果、iTRAQ 法により同定された結果と相関した結果が得られており、正常子宮内膜細胞ではなく、子宮内膜癌細胞表面に特異的に高発現することが明らかとなった。

(3) 癌抗原候補分子の癌組織での発現の検証

BST2 について、手術組織に対し免疫組織化学染色法を行うことで、細胞株でなく、癌組織における、癌抗原候補分子の発現について評価した。その結果、BST2 について、正常子宮内膜組織よりも子宮内膜癌組織において有意に高発現することが判明した。特に BST2 については正常組織での発現が低く、癌組織での発現レベルが高いことと、細胞表面に発現していることから、抗体医薬品の標的として有用性が高いものと考えられた。

(4) 癌抗原候補分子に対する抗体を用いた ADCC、CDC アッセイ

BST2 が正常子宮内膜細胞と比較して子宮内膜癌細胞株に特異的に高発現することから、BST2 に対する抗体が創薬標的となり得る可能性がある。BST2 は癌細胞の増殖と直接関係しないが、BST2 は ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)や CDC(complement-dependent cytotoxicity)を介してを抗体医薬の標的と成り得る可能性が示唆された。ADCC アッセイを行った結果、抗 BST2 抗体は BST2 陽性細胞に対して細胞障害活性を示すことが判明した。CDC アッセイについても、抗 BST2 抗体は BST2 陽性細胞に対して細胞障害活性を示すことが明らかとなった。

(5) *In vivo*における抗 BST2 抗体による抗腫瘍効果

*In vivo*における抗 BST2 抗体による抗腫瘍効果を明らかにするため、BST2 陽性細胞である子宮内膜癌細胞(HEC88/nu 及び SNG-II)を SCID マウスの皮下に 5×10^6 個ず

つ移植させた。その後、PBS 投与群、isotype control IgG 投与群、抗 BST2 抗体の 3 群に分け、週 2 回の頻度で 4 週間投与を行った。腫瘍体積を測定した結果、抗 BST2 抗体投与群では PBS 投与群、及び control IgG 投与群のいずれに対しても *in vivo*での腫瘍の増殖に対して有意な阻害効果を示した。これらの結果、抗 BST2 抗体は子宮内膜癌細胞に対し優れた抗腫瘍効果を示すため、優れた治療薬と成り得る可能性が高いと考えられる。

さらに、抗 BST2 抗体が *in vivo*において ADCC を介して抗腫瘍効果を示すことを証明するため、NK 細胞が欠失し、ADCC を示さない免疫不全マウスである NOD/SCID マウスを用いて *in vivo*での抗 BST2 抗体による抗腫瘍効果を検討した。BST2 陽性細胞である子宮内膜癌細胞(HEC88/nu)を NOD/SCID マウスの皮下に 5×10^6 個移植した。その後、PBS 投与群、isotype control IgG 投与群、抗 BST2 抗体の 3 群に分け、週 2 回の頻度で 4 週間投与を行った。腫瘍体積を測定した結果、抗 BST2 抗体投与群において有意な抗腫瘍効果は認められず、PBS 投与群、及び control IgG 投与群のいずれも腫瘍の増殖が同程度に認められた。これらの結果、抗 BST2 抗体は *in vivo*において ADCC を介して子宮内膜癌細胞に対し優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

3. 悪性黒色腫の創薬標的分子の探索

(1) iTRAQ 法による悪性黒色腫における定量的プロテオーム解析

Melanoma *in situ*、及びその正常皮膚組織、invasive melanoma、及びその正常皮膚組織より抽出したタンパク質に対して iTRAQ 標識と質量分析計を用いて、網羅的なタンパク質発現解析を行った。その結果、1,062 個のタンパク質が同定され、1,036 個のタンパク質が定量情報を有していた。正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において 15 倍以上に高発現するタンパク質が 30 個、0.25 倍以下に低発現するタンパク質を 67 個検出した。悪性黒色腫で高発現する事が知られて

いるタンパク質である S100 という分子が、正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において高発現する事が認められた。興味深いことに Periostin というタンパク質が正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において 25.703 倍、正常皮膚組織と比較して melanoma *in situ* で 4.434 と高発現することが確認された。

(2) 悪性黒色腫における Periostin の発現解析

Invasive melanoma において iTRAQ 法により検出された Periostin の発現差を確認するため、同じ抽出サンプルを用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、Periostin は invasive melanoma にて高発現し melanoma *in situ* ではわずかに発現が認められたが、正常皮膚組織では発現が認められなかった。続いて、19 例の invasive melanoma 組織における Periostin の発現を免疫組織化学線初期右方にて解析した。その結果、Periostin は 19 例の invasive melanoma すべてにおいて発現が認められた。Periostin の発現は invasive melanoma の間質に局在し、メッシュ状の構造を示していた。これらの結果、iTRAQ 解析により Periostin が invasive melanoma において高発現することがウェスタンブロット法、免疫組織化学染色法により確認されたことにより、Periostin がタンパク質レベルで invasive melanoma にて高発現する事が証明された。

(3) Periostin は悪性黒色腫細胞でなく皮膚線維芽細胞(NHDFs)より産生される

3 種類の悪性黒色腫細胞株(Mewo, G-361 and VMRC-MELG)より抽出したタンパク質を用いて Periostin の発現をウェスタンブロットで評価した。しかしながら Periostin の発現はこれらの細胞において検出されなかった。Periostin は悪性黒色腫組織にて高発現していることから、Periostin の発現には悪性黒色腫と皮膚線維芽細胞(NHDFs)の相互作用が必要なのではないかと考えた。そこで、NHDFs と Mewo、G-361、あるいは

VMRC-MELG を共培養し、RT-PCR 法とウェスタンブロット法により Periostin の発現を解析した。Periostin の発現は共培養したときにおいてのみ検出された。また、共培養の時間依存性に Periostin がタンパク質レベルで培養上清中に検出されることが確認された。Periostin の産生源を調べるため、NHDFs に対して、CFSE で蛍光標識した Mewo を 48 時間共培養し、セルソーターで NHDFs と Mewo に分離した。Periostin の mRNA レベルでの発現を RT-PCR にて解析した結果、Periostin は NHDFs においてのみ発現されていることが明らかとなった。

(4) TGF β 1 と TGF β 3 の mRNA 発現は悪性黒色腫細胞と共培養した NHDFs において検出される

NHDFs と悪性黒色腫細胞の共培養は Periostin の発現誘導に効果的であるが、共培養により Periostin の発現がどのように誘導されるか不明である。悪性黒色腫細胞による可溶性因子の影響を調べるため、NHDFs を Mewo 及び G-361 の培養上清で刺激し、Periostin の発現を解析したが、Periostin の発現誘導は認められなかった。NHDFs における Periostin の発現誘導因子を調べるため、Periostin の発現を誘導することが知られているサイトカインである TGF- β 1, 3, IL-4, and IL-13 の発現解析を行った。NHDFs と悪性黒色腫細胞株との共培養により IL-4 と IL-13 の発現に変化は認められなかったが。一方で、NHDFs と悪性黒色腫細胞株を共培養した際において、TGF- β 1 と TGF- β 3 の mRNA レベルでの発現が共培養後の NHDFs において有意に上昇することが明らかとなった。これらの結果、NHDFs と悪性黒色腫細胞株との共培養は NHDFs からの TGF- β 発現に重要であることが明らかとなった。

(5) 悪性黒色腫は Periostin 受容体である integrin α β 3 と integrin α β 5 を発現する

Integrin α β 3、integrin α β 5、integrin α β 4 は Periostin の受容体である事が知られ

ているため、悪性黒色腫細胞株におけるこれら分子の発現をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、MewoとG-361において、integrin $\alpha\beta 3$ と integrin $\alpha\beta 5$ の発現が確認された。一方で、integrin $\alpha 6\beta 4$ の発現は悪性黒色腫細胞株において検出されなかった。

(6) 遺伝子組み換えヒト Periostin は悪性黒色腫の増殖を促進する

悪性黒色腫における Periostin の機能を解析するため、遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて悪性黒色腫細胞株に対する増殖への影響を解析した。悪性黒色腫の増殖は遺伝子組み換えヒト Periostin を添加することでコントロール群よりも有意な増殖促進作用が認められた。悪性黒色腫に対する遺伝子組み換えヒト Periostin による増殖促進作用は integrin $\alpha\beta 3$ 、及び integrin $\alpha\beta 5$ に対する中和抗体の両方の存在下で抑制されたことから、悪性黒色腫において integrin $\alpha\beta 3$ と integrin $\alpha\beta 5$ が Periostin の受容体として機能している事が確認された。

悪性黒色腫細胞に対して 100 ng/ml の濃度で遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて刺激を行った結果、Akt(Ser473)と p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)のリン酸化が検出された。一方で、悪性黒色腫細胞における遺伝子組み換えヒト Periostin を介した細胞増殖促進作用は LY294002(phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase 阻害剤)により阻害されなかったが、U0126(MAPK 阻害剤)で抑制された。これらの結果、悪性黒色腫において Periostin は integrin/p44/42MAPK 経路を介して細胞増殖を促進することが示唆された。

(7) Periostin 欠損マウスにおいて、悪性黒色腫の増殖は抑制される

In vivo における Periostin による悪性黒色腫の増殖への影響を明らかにするため、免疫不全マウスである Rag2 欠損マウスと Periostin 欠損マウスを交配することで Periostin/Rag2 欠損マウスを樹立した。Periostin/Rag2 欠損マウス、およびコントロールとして Rag2 欠損マウスの皮下に Mewo

細胞を移植し、腫瘍増殖の経過を観察した。その結果、Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて腫瘍の増殖速度が抑制されることが明らかとなった。

免疫組織化学染色法により Ki-67 陽性細胞の数が Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて有意に少なかったことから、細胞周期レベルで増殖が抑制されていることが判明した。また、筋線維芽細胞のマーカーである α SMA の発現についても Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて低下していることが認められた。

C, D-4. 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：中山敬一

われわれは独自に作成した 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 (iMRM 法) 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、iMRM 法の欠点を補う手法として iSWATH 法の導入を検討した。iSWATH 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