

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、われわれは組み替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量が可能であることが示された。これを iSWATH 法と呼称する。また、リン酸化の解析においても iSWATH 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。

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である iMRM 法が完成した。われわれ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、iMRM 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 (iSWATH 法)。今後は、iSWATH 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。

C, D-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

1. 卵巣明細胞腺癌関連タンパク質の検出と創薬標的分子としての有用性の検証

異なる組織型の卵巣癌検体及び培養細胞のタンパク質を蛍光デフェレンスゲル二次電気泳動/MS/MSや iTRAQ/MS/MSを用いて分析した結果、全部で 1,800 種類ほどのタンパク質を検出し、明細胞腺癌で特異的に発現量が変動する 40 種類のタンパク質を同定することができた。

これらの卵巣明細胞腺癌関連タンパク質のうち、変動の特に大きかったアネキシンIV (ANX4) の創薬標的分子としての有用性を検証した。その結果、1) ANX4 は細胞株が異なっても明細胞腺癌であれば、多量に発現している、2) ANX4 mRNA の発現も高まる、3) 転写を制御する遺伝子領域には p53 結合配列がある、4) RNAi により p53 の発現を抑制すると ANX4 の転写活性が明細胞腺癌で低下する、5) RNAi により ANX4 遺伝子の発現を抑制すると、明細胞腺癌細胞の増殖が阻害される、6) 明細胞腺癌の抗癌剤抵抗性が低下する、ことなどが明らかになった。以上の結果から、ANX4 は、創薬標的分子として利用できる可能性があると考えられた。

2. 血漿中の卵巣明細胞腺癌関連タンパク質の検出・同定

ANX4 が診断マーカーとして利用できるかどうかを明らかにするため、卵巣明細胞腺癌の組織や培養細胞における ANX4 の発現変動を患者血漿中でも捉えられるかどうか調べた。まず血漿中の高濃度タンパク質を中空糸膜カラムで除去した後、マイクロボア HPLC によって 7 画分に分けた。そして、トリプシンで消化後、ナノ 2D-LC-ESI-Q/TOF MS によって分析し、タンパク質の同定を試みた。この方法によって 2,000 以上の血漿タンパク質を同定することができた。しかし、目的とするタンパク質の変動を血漿中で検出するこ

とはできなかった。ANX4以外にも9種類の明細胞腺癌関連タンパク質の検出を試みたが癌患者血漿で検出することはできなかった。

3. 培養細胞から分泌される卵巣明細胞腺癌関連タンパク質の検出

質量分析装置を用いて解析した結果、3種類の卵巣癌組織型のグループから全部で280種類のタンパク質を同定した。50%以上が細胞外分泌型もしくは細胞質膜局在型として分類されるタンパク質であった。明細胞腺癌群のみで検出された58種類の中で、種々の組織で広範囲な発現が見られない分泌型のタンパク質が19種類見いだされた。この19種類のタンパク質に関して、様々な卵巣癌細胞株および患者組織における遺伝子発現量をRT-PCR法によって調べた結果、9種類の分泌タンパク質の遺伝子が明細胞腺癌患者組織において有意に発現上昇していることがわかった。

本研究で同定された明細胞腺癌特異的な分泌タンパク質群には、癌細胞の抗癌剤耐性や転移浸潤能との関連性が知られているタンパク質がいくつか含まれていた。これらが明細胞腺癌細胞の抗癌剤耐性にも関与しているかどうか明らかにするために、明細胞腺癌細胞にsiRNAを導入し、タンパク質の発現を抑制した。その結果、TFPI2の発現量を抑制した時に抗癌剤の一種シスプラチンに対する感受性が上昇した。またマトリゲルチャンバプレートを用いた転移浸潤能試験を行った結果、TFPI2のsiRNAを導入した細胞では、浸潤能が亢進することが明らかになった。したがって、このタンパク質は明細胞腺癌細胞の浸潤能を調節している可能性があると考えられた。

4. 培養細胞から分泌される卵巣明細胞腺癌関連タンパク質の診断マーカーとしての有用性の検証

TFPI2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、TFPI2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。

この抗体を用いてサンドイッチELISA法に基づく自動免疫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。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TFPI2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TFPI2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TFPI2の濃度は、年齢、臨床病期に相関は見られなかった。本タンパク質は妊婦胎盤で発現することが知られているため、妊婦血清におけるTFPI2濃度を測定したところ、妊娠月例に伴うTFPI2の増加を検出することができた。これは、構築したELISA測定系がうまく機能していることを示している。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TFPI2(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TFPI2(AUC 0.93)の方が高かった。したがって、TFPI2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。

5. MRMによる卵巣明細胞腺癌バイオマーカー候補タンパク質の検出

抗体を使わないでMRM法による質量分析装置のみで血液中のマーカー候補タンパク質の検出を試みた。しかし、多数のタンパク質を含む血液試料から直接マーカー候補タンパク質を検出することは難しかった。そこで、免疫沈降によってマーカー候補タンパク質を濃縮精製した後、MRMで検出できるかどうか検討した。

まずTFPI2を含む3種類のマーカー候補タンパク質に焦点を当て、当該タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体を作製した。

これらの抗体を用いて免疫沈降を行い、各タンパク質を濃縮精製した。MRM トランジションを設定するための情報を得るために、各タンパク質の免疫沈降産物のトリプシン消化断片を MS(AB5500)にて解析した。得られた MS 情報に基づき、各タンパク質につき、ペプチドイオンを 10 種類、プロダクトイオンを 3 種類選択して、合計 30 通りの MRM トランジションを設定した。その中から、最も強い MRM シグナルが得られるトランジションを 3 種類選び、さらに Q2 の衝突エネルギーの検討を行い、測定メソッドの最適化を行った。まず作成した MRM トランジションを用いて、5 種類の卵巣癌細胞株の培養上清に含まれるマーカー候補タンパク質を測定した。その結果、CCA 細胞群で高い MRM シグナルが得られた。そこで、癌細胞の培養上清を FBS に添加して得られた患者モデル血清 200 μ L を測定したところ、タンパク質によっては 0.5 pg (2.3 pg/mL) レベルで定量できることがわかった。さらに、ヒト標準血清を用いた場合でも同様の結果が得られた。現時点では、免疫沈降法を併用する必要があるが、MRM で血清中の診断マーカーを定量的に解析できる可能性があると考えられた。

上皮性卵巣癌の組織型の中で、卵巣明細胞腺癌は日本での増加傾向が指摘され、他の卵巣癌組織型に比べ予後不良であることから、卵巣明細胞腺癌の診断、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、他の卵巣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。代表的卵巣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。

本研究では、診断マーカーを効率的に検出できるシステムの確立を目指した。まず、疾患関連タンパク質を検出する方法を検討した (平成 19-20 年度)。その結果、本報告に記

した方法によって疾患関連タンパク質の効率的な検出・同定ができることが明らかになった。

卵巣明細胞腺癌組織検体や培養細胞中で特異的に発現が変動するタンパク質が見いだされた。これらのタンパク質は疾患にかなり特異的に発現することや創薬標的分子として有用であることなどが明らかになった (平成 21-22 年度) が、これらのタンパク質の発現変動は、血漿中では捉えることができなかった。癌組織で過剰発現しても組織から血液中に分泌 (放出) されないため、また、分泌されても体内の多量の血液で希釈されてしまうため検出されにくいのではないかと考えられた。

この点を解決するため、培養細胞から分泌される疾患関連タンパク質の分析 (セクリトーム解析) を行うことにした (平成 23-24 年度)。培養細胞から分泌されるタンパク質は、細胞膜タンパク質や細胞外タンパク質が多いと推定される。したがって、生体内の癌組織でも細胞から血液に分泌される可能性が高い、つまり、効率的に診断マーカー候補タンパク質を検出できる可能性が高いと考えられた。

本研究では、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) 他の卵巣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) タンパク質を探索した。その結果、患者血清中で検出できる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することができた。

そこで、検出された診断マーカー候補タンパク質の 1 つ、TFPI2 の臨床的有用性を評価した。ROC 解析の結果から、TFPI2 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。

一方、血液中の診断マーカー候補タンパク質については、ELISA を用いて検出することができるが、抗体を使わず、ELISA より高感度で質量分析装置だけでアッセイを行うことができれば画期的である。そこで、特定のペプチドを高感度で定量的に検出できる MRM 法を用いて検出してみることにした。しかし、直接、血清を分析しても MRM で診断マーカー候補タンパク質を検出することはできなかった。そこで本研究では、MRM 法によるアッセイ法開発に向けた研究の第一段階として免疫沈降によって血清中のマーカー候補タンパク質を濃縮してから MRM 法で検出してみた。その結果、高感度でマーカー候補タンパク質を検出することがわかった。抗体では、ふつうアイソフォーム、翻訳後修飾タンパク質、選択的スプライシングで生じた異種タンパク質を識別できないが、抗体（免疫沈降）と MRM 法を併用すれば、その識別が可能となる。MRM 法を利用する価値はすでに十分あると考えられた。

本研究で診断マーカーを効率的に検出できるシステムが確立できた。本研究の所期の目的を達成することができたと思われる。

C, D-6. 創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用：尾野雅哉

1. 腎癌血漿バイオマーカーの開発

腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例の 2DICAL 解析で腎癌患者において有意に上昇しているタンパク質 (Fibronectin 1) を発見した。Fibronectin 1 に対する特異抗体が

存在したので Western Blot でその血中濃度が腎癌患者において上昇していることを確認し、さらに、AlphaLISA (パーキンエルマー社) を用い腎癌患者血漿 77 例、健常者血漿 130 例、前立腺癌患者血漿 20 例の Fibronectin 1 の血中濃度を測定し、血漿 Fibronectin 1 濃度が、健常者に比べ腎癌患者で有意に上昇しており ($p=1.87 \times 10^{-7}$)、前立腺癌患者に比べても有意に上昇している ($p=0.0053$) が示された。特に、腎癌の早期のステージ I、II でも、ステージ III、IV と変わらない ROC 曲線を示し、血漿 Fibronectin 1 濃度が早期の腎癌の発見に有用である可能性が示唆された。

以上の結果は、2DICAL が血漿検体からバイオマーカーを探索する手段として、極めて有効であることが立証されたものと考察される。また、今回見出されたタンパク質は古くから知られている物質であり、このような網羅的探索により既存の物質に対して新しい知見を得られる可能性も示唆するものである。

2. 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 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、CAI の血中濃度が他の疾患に比べ、前立腺癌患者で有意に上昇していることが示された。特に PSA 濃度が 4-10 ng/ml を示すグレーゾーンの前立腺癌患者で CAI の血中濃度は上昇しており、PSA との組み合わせによる前立腺癌診断能の向上に役立つ可能性が示唆された。また、10 例の前立腺癌原発巣の CAI の発現を免疫染色により検討したところ、CAI 血中濃度が高い患者において組織での免疫染色の強度が強い傾向にあることが認められた。

3. 肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの開発

肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織の比

較で、151 タンパク質が肝細胞癌で量的高値を示し、非癌肝組織では129 タンパク質が量的高値を示した。量的変動示したタンパク質の生物学的な働きを Gene Ontology terms (Biological Process) に従って分類すると、癌で高値を示したタンパク質は核酸代謝、細胞分裂、細胞周期にかかわるものが認められたのに対し、非癌部肝組織で高値を示したものはアミノ酸、脂質、糖質の代謝にかかわるものが認められ、この結果は癌組織と正常肝組織から予想される細胞機能を正確に反映していると推察された。また、リン酸化ペプチドの量を比較すると、173 リン酸化ペプチドが肝細胞癌で2倍以上の量的高値を示し、非癌肝組織では145 リン酸化ペプチドが2倍以上の量的高値を示した。量的変動示した145 リン酸化ペプチドが由来するタンパク質の生物学的な働きを Gene Ontology terms (Biological Process) に従って分類すると、癌で高値を示したタンパク質は核酸転写、mRNA スプライシング、アポトーシス、細胞分裂が認められたのに対し、非癌部肝組織で高値を示したものは糖代謝、薬物代謝反応にかかわるものが認められた。

この結果はリン酸化ペプチドにおいても癌組織と正常肝組織から予想される細胞機能を正確に反映していると推察された。また、肝細胞癌組織、同一症例非癌部肝組織間で変化の見られたリン酸化ペプチドの中にはこれまでに報告されたことのないものも存在しており、これらのリン酸化ペプチドは肝臓がんのバイオマーカー候補となるだけでなく、肝臓がんの治療標的となる可能性も示唆された。

4. プロテオームリサーチセンターへの2DICALの導入

国立がん研究センターでは、検出ピークは23,640個、選抜マーカー候補は健常者腎癌群間で $TTEST < 0.005$, $iScore > 25$, $Expect < 0.05$ の条件で18ピーク3タンパク質であったが、 $TTEST < 0.005$ を満たしながらタンパク質同定ができなかったピークが194ピークあった。それに対しプロテオームリサーチセンターで

は、検出ピークは25,013個、選抜マーカー候補は健常者腎癌群間で $TTEST < 0.005$, $iScore > 25$, $Expect < 0.05$ の条件で27ピーク8タンパク質であったが、 $TTEST < 0.005$ を満たしながらタンパク質同定ができなかったピークが222ピークあった。国立がん研究センターのデータと比較し、候補ピークはほぼ同数であったが、候補ピークの同定はPRCの方が優れていた。また、同定されたピークを比較すると、PRCのピークの方の質が良かった。未同定ピークに関しては標的MS/MSを行ったが、参照データとの時間のずれがあり、十分な同定が行えなかった。

すでに確立している国立がんセンターでの2DICALでの解析が、プロテオームリサーチセンターでも解析可能であるかという点がこのプロジェクトの重要課題であったが、国立がんセンターとプロテオームリサーチセンターで同一材料を用いた計測を行うことにより、十分可能であることが証明された。なおかつ、2DICALの解析を通して、両者間の違いを明確にでき、今後の対策を講ずることが可能となった。

5. 2DICALのバージョンアップ

2DICALのバージョンアップにより、旧バージョンではピークのテーリング部、同位体を別ピークとみなし、同一ペプチドに対して複数ピークとして扱われる場合があったが、新バージョンではそれらのピークが一つにまとめられ、目視での再確認が基本的に不要となった。また、バージョンアップされた2DICALで肝細胞癌組織54例、同一症例非癌部肝組織52例のデータを解析したところ、同定されたリン酸化ペプチド数が718ペプチドから2,390ペプチドまで増加した。

2DICALは国立がん研究センターが独自に開発してきたプロテオーム解析システムであるため、プロテオームの技術的な進歩に対応して研究期間中にも改善を進めることができた。特に、近年飛躍的に改良された質量分析計を用いることにより、今までは質量分析の測定によるピークとしてしか認識できなかった

た物質の同定効率が飛躍的に増加したため、同定情報をより有効に利用できるシステムの開発が必要になった。本研究期間中に2DICALを完全な形まで改善できなかったのも、その完成は今後の研究課題と考えている。

C, D-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

1. 血漿試料の微量タンパク質、ペプチドの前処理法：

主要タンパク質除去用抗体カラムと各種アフィニティーカラム、限外濾過を組み合わせ、微量タンパク質画分の再現的かつ簡便な濃縮・調製法を検討した。各カラム操作通常の洗浄を行っても、高濃度タンパク質の非特異的吸着による持ち越しが～数%の範囲で認められ、低濃度タンパク質の解析が妨害された。血漿試料では血清に比して同一タンパク質由来のスポット数が多く、各カラム処理で同定タンパク質は増加するが、大幅な増加は困難であった。

限外濾過ユニットは分子量 10,000 カット膜を使用したため、非保持画分中のペプチドの大部分は、分子量 2,500 以下であった。血清、血漿試料の抗体カラムの非吸着画分を限外濾過ユニットで濃縮した非保持画分では、血漿の総ペプチド量は血清の 1/3-1/5 で、検出ペプチド数も 1/4 程度であった。大部分は凝固系タンパク質、補体、リポタンパク質と、アノテーションの無いタンパク質 2 種の断片であった。血清試料では血漿試料由来のほぼ全てのペプチドを含んでいた。

ペプチド量は、希釈血漿を直接、迅速に限外濾過で分離した場合に最少となった。各種カラム操作で減少するペプチドは少なく、補体由来ペプチド、フィブリン断片が処理により急激に増加した。基本的に接触時間、担体量が増加すると、ペプチド量も増加した。プロテアーゼインヒビターカクテルの添加により消化制効果は認められるが完全な抑制は困難であり、特にエキソペプチダーゼの抑制は困難であった。凍結融解においてもペプチド

画量が増加し、低分子量ペプチドの増加がより顕著で、プロテアーゼインヒビターカクテルによりかなりの抑制効果が認められた。

血液については、第 1 期（プロテオームファクトリー）より血清、血漿のいずれが対象として適切かという懸案があった。血液中のタンパク質を反映するのは血漿であるが、各種カラム処理、濃縮操作で補体系、凝固系プロテアーゼなどが必ず活性化され、ペプチド断片がかなり多量に発生した。2 次元電気移動上のスポットも、同一タンパク質由来する部分切断タンパク質などが血漿で多く観測された。また、インヒビターカクテルの添加により部分的に切断は阻害されるが、完全な阻害には程遠く、血清試料以上に厳密な前処理条件の設定が必要であった。一方、カラム担体へのタンパク質の非特異的吸着も想像以上に多く、洗浄などの強化が必要であるが、官能基やリガンドへの親和性に依存するため、限定された強親和性タンパク質であれば低濃度タンパク質の濃縮効果は大きい。これらの結果より微量タンパク質回収の一般的手法の確立は、困難と考えられた。

血清は凝固系関連タンパク質に由来するペプチドが非常に多いため、血液のペプチドーム解析には血漿試料の使用が必須であるが、プロテアーゼ活性化抑制の困難さから、タンパク質とペプチドを一元化して解析することは困難と判断した。そこで、新鮮血漿試料の逆相系担体による抽出法、限外濾過によるタンパク質画分（プロテアーゼ含有）とペプチド画分の分離法を検討したが、後者でも消化抑制は困難で、逆相系担体による血漿試料の直接吸着、抽出法が比較的良好な結果が得られた。プロテアーゼによる分解反応が顕著に現れるペプチド画分では、ペプチドの量や形は刻々と変わるため、疾患と対照の差分析からバイオマーカーを探索することは極めて困難と考えられた。

2. 心血管系培養細胞上清中のタンパク質、ペプチド解析

神経内分泌細胞株について検討を行った結

果、分泌刺激により効率的なペプチドの回収、分析が可能であった。特に TT 細胞では、カルシトニン、グレリン等のホルモン前駆体由来ペプチド、グラニン類やプロセシング酵素由来のペプチドが観測され、細胞内タンパク質由来ペプチドはごく少数であった。質量分析の反復により、最終的には 600 以上の重複の無いペプチドを同定できた。一例として、615 残基の VGF タンパク質が 15 箇所まで一次切断を受け、16 種のペプチドが生成すると推定できた。VGF タンパク質の C 末端部と中央の切断部位を認識する抗体を調製し Western blot 解析を行った結果、VGF タンパク質はラット脳、消化管では、TT 細胞と同じ一次切断を受けることが示され、開発したペプチドの回収、解析法の有用性が示された。

ラット心筋細胞、心臓非心筋細胞では適切な分泌刺激はなく、時間を延長して回収を行った。心筋細胞の壊死により構造タンパク質断片ペプチドが多数に観測されたが、細胞の維持・管理やペプチド回収法の改良により、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が主要ペプチドとして観測できた。心筋細胞で ANP 前駆体由来ペプチドを集中解析した結果、活性型ペプチドである α -ANP が最も多く観測され、次に前駆体 N 末端ペプチドが観測され、前駆体からのプロセシング機序が確認された。 α -ANP 内で切断されたペプチド群からは、既報の α -ANP 分解経路と一致する切断部位が明確に示された。心臓非心筋細胞の大部分は線維芽細胞で、細胞外マトリックス由来ペプチドが主体であったが、アドレノメデュリンや分泌タンパク質由来ペプチドも多数同定された。また、リン酸化やヒドロキシル化(Pro)を受けたペプチドを多数同定することができた。

内分泌系培養細胞より分泌されるペプチド、タンパク質の解析においては、同定ペプチドにより前駆体タンパク質のほぼ全領域をカバーする例が得られ、このタンパク質のプロセ

シング経路の全貌を示すという優れた成果が得られた。他のペプチドでも、一次切断の「痕跡」を残している例が 60-70%の割合で観測された。TT 細胞での切断部位とラット脳、消化管での切断部位が一致したことは、培養細胞の結果が生体での存在様式の推測、バイオマーカー探索へと発展できる根拠を示すものといえる。甲状腺髄様癌において VGF タンパク質が豊富であれば、由来ペプチドの血中濃度がバイオマーカーとして測定意義がある可能性もある。

ラット心筋細胞では、心筋細胞の脆弱性のために細胞構成タンパク質の断片ペプチドが多数に観測された。培養法やペプチド回収法の改良に努めた結果、比較的豊富な ANP 前駆体由来ペプチドでは、前駆体から活性型 α -ANP が生成するプロセシング機序を明示できた。 α -ANP 関連ペプチドの解析では、報告されている Endopeptidase 24.11 による α -ANP の主要分解経路や、その後の 3 箇所の分解的切断が確認できた。前駆体タンパク質から活性型ペプチド、 α -ANP のプロセシング、さらに主要分解ペプチドの生成が同定された事実は、培養細胞を基盤とするバイオマーカー探索法の有用性を明らかにするものである。非心筋細胞においても、細胞内タンパク質由来ペプチドの割合は低く、回収されたペプチドにはアドレノメデュリン、サイトカイン、成長因子等に由来するペプチド、プロホルモン変換酵素による切断を受けたと推定されるペプチドが同定された。これらのペプチドが血中で存在することが確認ができれば、バイオマーカー探索法としての有用性を確立できると期待される。

3. 大分子量ペプチドの構造解析

検討した全ての対象で、低分子量から高分子量、さらにタンパク質へ移行するに従い量的増加が認められた。プロテオーム解析では、酵素消化により 2,000Da 以下の消化ペプチドとして解析するため同定効率は高い。しかし、分子量の大きい生体内ペプチドでは、イオン化効率の低下や類似候補の増加により同

定効率が著しく低下する。問題克服のためには、高精度で高分解能の質量分析スペクトル、情報量の多いタンデム質量分析 (MS/MS) スペクトルの入手が必須で、ETD 法では情報量の豊富な MS/MS スペクトルが得られる場合が多いことが特長であった。培養細胞上清のゲルろ過物について両開裂法を比較した結果、価数で 14 価まで解析可能で、最大で分子量 15,000 Da のタンパク質まで同定できた。CID 法、ETD 法の同定ペプチド数は、約 800 と約 550 (重複なし) であり、同定数では CID 法が勝ったが、分子量 3000 Da 以上のペプチドの割合はほぼ同程度であった。両開裂法の併用により、従来よりも 3-10 倍、構造決定率を増加できた。また、ETD 法はリン酸化などの修飾構造と残基の同定にも有効であった。

高分子量ペプチドはプロセッシング部位などの一次切断構造を保持する割合が高く、バイオマーカーとなる可能性が高い、しかし、技術的な問題のため、一部の豊富な存在するものを除き同定されていなかった。高精度で高分解能の質量分析計と CID と ETD の開裂法の併用により、同定総ペプチド同定数が 1,000 を超え、世界的にも最も網羅性の高いデータとできた。これらの約半数は分子量 3,000Da 以上で、一次切断構造を保持する可能性が大幅に増加した。また、分子量 15,000Da という低分子量タンパク質まで同定可能となったことは、バイオマーカー探索のみならず、トップダウンプロテオミクスへの道を大きく拓くものである。ETD 法はリン酸化はじめとする修飾構造、修飾残基の決定にも有用であり、修飾構造を含んだバイオマーカー探索にも貢献でき、さらなる同定効率の向上を目指したい。

4. 心不全モデル動物のプロテオーム解析

イヌペーシングモデルでは、4 週後、6 週後に左室駆出率が著減し、典型的な頻脈性心不全の形成を確認した。2DICAL 法では、4 週、6 週群でそれぞれ約 40,000 のトリプシン消化ペプチドピークを検出し、約 1 割において有意な変動 (T-Test, $P<0.05$) が認めら

が、データベースの不整備で同定ペプチド数は通常の 1/3 に止まり、有意な変動を示したタンパク質数は 4 週、6 週群で各 30 程度に止まった。医薬基盤研究所内の PRC グループは、iTRAQ 法を用いて網羅性の高い定量解析を実施し、4 週、6 週群で 800 タンパク質が同定、定量解析され、1.5 倍以上の増加や 2/3 以下の減少を示したタンパク質が約 200 種が検出された。2DICAL 法で変動の認められたほとんどのタンパク質が iTRAQ 法により検出され、同様の変動を示した。増加タンパク質は、細胞骨格・構造系、血液由来、リボゾーム系タンパク質であった。一方、減少タンパク質は、エネルギー代謝系、筋収縮系、情報伝達系の順で、エネルギー代謝酵素やカルシウム制御タンパク質などの変動は、疾患との関連が示唆された。また、複数の酵素や情報伝達系タンパク質でアイソタイプスイッチングが示唆された。

心筋症モデルマウス 4C30 でも重度な心不全状態を確認し、有意な上昇及び減少を示したタンパク質はそれぞれ 186、145 であった。線維化の亢進を示すペリオスチンをはじめとする細胞外マトリックス、細胞膜裏打ち構造や中間系フィラメント、ER ストレス関連タンパク質で上昇が認められた。減少タンパク質の変動は大きく、特に解糖系、TCA 回路、 β 酸化において主要酵素群の減少は顕著であった。筋収縮関連タンパク質にも減少が認められたが、イヌ心不全モデルと共通した変動タンパク質はそれぞれ 60 余りと限定的であった。

イヌ心不全モデルのプロテオーム解析では、情報量が多いため、4 週、6 週ペーシング群で共通して変動しているタンパク質について検討を進めている。しかし、心臓構成細胞に由来する分泌タンパク質で顕著な変動を示すものは見出せていない。一方、心筋細胞の収縮機能関連のタンパク質、エネルギー産生系のタンパク質には大きく減少する例が多く、心筋収縮機能の低下に繋がると推定される。細胞内カルシウム濃度制御系にも異常が発生

している可能性が高く、他の変動と相関について解析を行っている。代謝系酵素や情報伝達系タンパク質のアイソタイプスイッチングについては、抗体などによる定量システムを作り検証していきたい。

心筋症モデルマウスのプロテオーム解析でも、エネルギー産生系が非常に機能低下した状態にあり、別途行ったハムスター心筋症モデルの代謝変化と非常に類似しており、代謝系酵素群の発現低下が極めて顕著で、この減少が病態の発症や基礎代謝変化を誘導する可能性も示唆された。また、ミトコンドリア酵素系の変化より、酸化ストレスの増大も推定される。線維化に関わる細胞外マトリックス、筋収縮関連のタンパク質の変化も認められるが、代謝系タンパク質の変化より軽度であった。代謝系酵素群の変化を血中で測定することは難しいが、産生される代謝物濃度がバイオマーカーとなる可能性についても検討の必要がある。

C, D-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

1. 髄液前処理の検討

プロテオームファクトリーでの検討では、最初の髄液量が 10 ml 必要であるという制約はあるものの、Agilent 抗体カラム (Hu14) で分画し、素通り画分と吸着溶出画分を得て、0.1%SDS、50mM Tris/HCl (pH 8.5) に溶解することで、cICAT 法解析で 311 種類のタンパク質を同定でき、そのうち 294 種は髄液特異的蛋白として同定できていた。髄液 2 ml からの cICAT 法測定を可能にするために、以下の点を検討し、概ねその方法論が確立できた。

(1) プロテアーゼ不活化

プロテアーゼ阻害剤の使用時の同定タンパク数 271、使用しない時は 269 であり、プロテアーゼ阻害剤の使用は不要と判断した。

(2) 抗体カラム

患者髄液プール検体を用いて、抗体カラムの種類を検討した。Agilent の Hu14 では、

235 タンパク数、セプロ社 IgY14LC2 では 281 タンパク数でほぼ同等であったが、血清に多量に存在するタンパク質 66 種類を除去するセプロ社 SuperMix を用いた場合は、総計 21 種類と極端に同定数が減少した。したがって、SuperMix は髄液解析には不適と判断した。

(3) 初期髄液量の適正化

当初は、初期髄液量は 2ml と固定していたが、そのタンパク濃度は 28 mg/dl~108 mg/dl と大きな変動があった。約 60 回の質量分析計での測定の結果を見ると明らかな逆相関 ($R=-0.51$) を認めた。すなわち、初期のタンパク量が多いほど同定タンパク質数が少ないという結果であった。

さらに、質量分析の結果で、アルブミンの total peptide count と同定数を比較すると、アルブミン残量が多いほど同定タンパク数が少ない傾向を認めた ($R=-0.21$)。すなわち、抗体カラムで除去できていないアルブミンなどの血漿に大量に存在しているタンパクが同定タンパク数の低下に寄与していると考えられた。

これら 2 つの結果から、初期量のタンパク量はできるだけ少なくした方がよく、またアルブミン等のタンパク質の除去をさらに徹底させるべきであるということを示唆している。

そこで、初期髄液量を 2 ml という容量ではなく、0.6 mg という重量で統一することに意味があるかないかを調べるために、30 mg/dl の 2 ml (0.6mg と表示) と 60 mg/dl 以上 2ml (2ml と表示) のそれぞれ 10 例で同定タンパク質数を比較したところ、明らかに初期タンパク質量が少ない方 (0.6 mg) が優位に同定タンパク質数が多かった ($p < 0.0001$)。

(4) 抗体カラム処理後のタンパク成分の検討と新たな処理法の導入

初期髄液量を 0.6 mg にすることで一定の効果は得られたが、1 で明らかになった血漿大量タンパクの除去不全に対処するために、トランスフェリン、アルブミン、IgG を除去できるスピнкаラム (GBC カラム、コスモバ

イオ) をこれまでの抗体カラム IgY に加えてみたところ、質量分析結果におけるトランスフェリンとアルブミンの total peptide count が著しく低下し、これらのタンパク質が十分除かれていることが判明した (n=3)。

また、処理前の髄液、抗体カラム IgY のみ、GBC カラムのみ、抗体カラム IgY と GBC スピнкаラムの組み合わせ、さらに IgY と GBC スピнкаラム 2 回処理をしたもので、トランスフェリンの濃度を ELISA 法にて測定した。結果は、抗体カラム IgY+GBC スピнкаラムにて、十分血漿タンパク質の除去ができることが判明した。

この結果を踏まえて、抗体カラム IgY+GBC スピнкаラム 1 回の処理法を採用したところ、同定タンパク数の明らかな増加をみた。

2. 髄液収集に関する検討

(1) 髄液採取体制の整備

担当医が診療上必要な検査として髄液検査を行う場合、主治医の要請に応じ常にコーディネータが髄液検査に立ち会う体制を整備した。コーディネータは研究の説明と同意を得る時点から関与し、採取後はただちに氷冷して臨床検査部へ運搬する。運搬された髄液の一部で細胞数、タンパク量などの一般的な検査を臨床検査部で行い、残りを遠心・分注して、匿名化を行ってのち、TMC バイオリソース管理室の超低温フリーザーに保存する。実際の髄液検体の利用に関しては、プロテオーム研究 (当研究テーマ) に加えて、神経研究所やそれ以外の研究者へ提供される。2011 年 12 月までの集計では、症例数 275 例 (検体数 312 例) となっている。

髄液は中枢神経の様子を鋭敏に反映していると想定され、実際これまでの本研究で脳特異的な数多くのタンパク質が同定されてきている。本研究の目的は血液に比較して少ないタンパク量しかない髄液を対象にするために微量測定系を確立することにあるが、微量であるが故に、その測定結果に影響する種々の要因を調べ、最適な検体採取条件を決めるこ

とは結果の解釈を行う際に重要になる。一方で、髄液採取は、中枢神経疾患の診断や病態把握のための必須の検査法でないため、その採取は容易ではない。しかし今後の疾患研究において髄液は貴重で有望なバイオリソースになることは明らかであり、国立精神・神経医療研究センターでは病院各診療科、臨床検査部と連携して、その採取手順を確立した。特に、研究利用に関する検体の取扱に関しては、トランスレーショナル・メディカルセンター臨床開発部にバイオリソース管理室を設置し、コーディネータの配置、IC 取得、匿名化作業の実施などを一括して行うシステムを構築した。このシステムで採取された研究用髄液はプロテオーム研究ばかりでなく、small RNA 解析やメタボローム研究にも十分利用可能であり、その付加価値は高い。

(2) 標準髄液の検討

標準として用いる髄液は一定である必要がある。そのために、当初は米国より髄液を購入しプールして用い、その後は神経内科もしくは脳神経外科から大量に提供される正常圧水頭症患者の髄液をプールして用いた。標準髄液間の相違については、最低 5 回の測定を行いペプチド毎の換算表を用いて補正した。

正常対照の髄液を常に保有し、各測定の際に標準として用いる事は不可能である。そのために、米国 Vital 社から検査後残余髄液を購入してプールし、約 100 回分の測定に供する量を確保した。これをプール患者髄液や個々の患者髄液の測定の際に標準として用いたところ、250~340 のタンパクを同定できたもののばらつきが大きかった。その後、神経内科および脳神経外科から供給される正常圧水頭症患者の大量の髄液をプールして標準とすることにし、標準髄液間のペプチドのばらつきは両群での測定を最低 5 回は行い換算表を作成し、補正をかけることで解析に用いる事ができるようにできた。

(3) 髄液採取後の室温保存の影響

髄液採取後の室温放置時間によって、量が増加したタンパク群、量が減少したタンパク

群があり、24 時間放置で検出ができなくなったタンパク群も存在した。さらに、神経特異的なタンパク質である TUJI, pY100 やシグナル伝達物質である AKT、Fyn についてウェスタンブロットを行い、3 時間、24 時間と室温放置する時間に応じてタンパク量が減少することを確認した。

採取後の処理は、タンパク組成に大きな影響を与える可能性がある。採取直後に氷冷して運搬し、遠心後直ちに -80°C に保存した場合に比べて、3 時間の室温放置、24 時間の室温放置で増加したり、減少したり、さらには 24 時間放置後には検出ができなくなるタンパク質群を知ることができた。これらの情報は今後各疾患患者髄液を用いた解析結果の解釈に重要な情報となる。

(5) 髄液採取時の食事の影響

同一患者の前日 22 時以降絶食(朝食抜き、午前 10 時採取)と昼食後(午後 2 時採取)の髄液タンパク質を比較したところ、同定できた約 550 種のタンパク質のうち、2 倍以上の変動を示したものは 75 種(13.6%)で、そのうち 64 種(変動したタンパク質の 85%)が絶食時に低下していた。1.7 倍以上の変動にすると 142 種(25.8%)にもなり、そのうち 128 種(変動したタンパク質の 90%)が低下していた。絶食により全体の 25%ものタンパク質が 6 割以下の量に減少していたことになる。

絶食にして採取した髄液を用いている論文を目にしたことから、食事の影響に関して調べてみた。一例の結果であっても、同定できた約 550 種のタンパク質の約 25%が食事で増加する(絶食で低下する)ということを見出した。この事実は、被験者数を増加させて検討を行うことでさらにその意味が確実になるとともに、髄液タンパク質の日内変動を調べる研究へと発展できる可能性がある。

C, D-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

1. 新規糖鎖腫瘍マーカー

3000 以上のクローンを ELISA にてスクリーニングし、11 種類の陽性クローンが得られた。2 種類が IgM で 9 種類が IgG であった。これらのクローンは、合成糖脂質の ELISA においては、ST1H の異性体である ST2H、SLe^x、SLe^a は認識しなかった。免疫組織化学を用いて、これらのクローンをさらに検討した。サンプルには、ST1H の発現が確認されているルイス型陰性の大腸癌組織、正常大腸組織を用いた。これらの凍結切片を作成し、11 種類のハイブリドーマの上清と反応させ、通常の ABC 法にて発色させた。その結果、どのクローンからも陽性シグナルを得ることができなかった。さらに、2 種類の抗体については sandwich ELISA の系を確立した。ST1H の発現が確認できた大腸癌を反応させたが、免疫組織法と同様に、陽性反応は認められなかった。

膵臓癌、前立腺癌の糖脂質の構造解析を実施している際に、N 型糖鎖のシアル酸(Neu5Ac)付加遊離糖鎖が正常細胞にはほとんど認めないが、癌細胞には蓄積されていることを見出した。5 種類の糖鎖を検出、構造決定した。その結果すべて complex-type の N 型の遊離糖鎖であり、NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1 が最も多く、ついで NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1 が多かった。前立腺癌ではこれら 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。中でも、骨転移を伴った 1 症例では、転移巣、原発巣ともに、KDN 付加された糖鎖が糖脂質の量を超える量が蓄積していた。Neu5Ac 付加された糖鎖と同様に、KDN が α 2-6 結合で付加された糖鎖が主で、最も多いものの構造は KDN α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1 で、次に、KDN α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1

が多く認められた。

ST1H は、DU-PAN-2 と同様に、Lewis 陰性の人に適した腫瘍マーカーとなる可能性がある。ST1H の腫瘍マーカーとしての臨床応用の可能性を検討するために、ST1H を認識する単クローン抗体を作成し、その特異性などを検討した。作成された 11 種類のクローンは、合成された糖脂質を用いた ELISA では、ST1H に対して極めて高い特異性を有している。しかし、免疫組織学や組織を使った ELISA では、陽性反応が得られなかった。以上のことは、得られた抗体の実用性が乏しい可能性を示唆する。今後は、免疫源の変更も含めた、抗体作成、スクリーニング法の変更を検討する必要がある。膵臓癌と前立腺癌では Neu5Ac 付加された N 型の遊離糖鎖、さらに前立腺癌では、今まで報告されていなかった KDN 付加された N 型の遊離糖鎖が多量に蓄積していた。今後はこれらのマーカーとしての有効性を検討する必要がある。

2. 血液中腫瘍由来 DNA 解析

BEAMing による解析結果。活性化変異は全 44 症例中 32 例 (72.7%, 95%CI 58.0-83.6%)、耐性変異は治療後増悪症例 23 例中 10 例 (43.5%, 96% CI 2.5-53.4%) 検出できた。耐性患者の約半数でこの変異が検出されるため、成功率は 90%近いといえる。

次世代シーケンサーによる解析結果。検出限界は exon 10 deletion と L858R が 0.01% 以下、L861Q が 0.01%、T790M が 0.05% であった。後ろ向き検体 155 症例 (内血漿 145 症例) を解析したところ、肺生検で exon 19 del が検出された症例 72 症例中 44 症例 (61.6%)、L858R が検出された 44 症例中 32 症例 (57.1%)、L861Q が検出された 6 症例中 3 症例に検出された。Exon 19 del と L858R の重複変異は 14 例、生検結果と異なっていた症例は 3 例のみであった。T790M は 26 例に認められた。

血漿中 EGFR 変異に関しては、BEAMing と次世代シーケンサーともに実用化に向け

て有望な結果が得られた。すでに前向き試験での検証に進んでも良い結果と考えられ、次世代シーケンサーを用いた方法で多施設による前向き検証試験を開始している。

C, D-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

1. 血清ペプチドーム解析におけるサンプル調整の至適条件に関する検討

血清・血漿バイオマーカー候補を多施設の多数検体を用いてバリデーションを行う場合は検体採取とプロセッシング、保存の条件を一定にすることが求められる。を対象とした 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の検討では Bruker Daltonics 社の ClinProt™ システムを用いた。血清検体は健康人ボランティア 7 名 (男性 5 名、女性 4 名、29 歳～47 歳) から採取したものである。早朝空腹時に採血し、1 時間室温で静置した後、1,500G で 10 分間遠心し、分注・保存した。再現性に加えて、プレアナリシス変動要因として血清を遠心分離するまでの時間の影響、凍結融解の回数について検討した。血清ペプチドームプロファイルに最も大きな影響を与えたのは clotting time、すなわち採血から血清分離までの時間であった。複数の施設で採取された血清試料を用いた検討の場合は、絶食の有無、採血から血清分離までの時間、保存条件などにより影響を受けるマーカーが少なくないことを考慮すべきである。

2. Differential solubilization (DS) 法による血清ペプチドの調整

DS 法による抽出物を 0.1% TFA に溶解後、逆相 HPLC により 60 分画に fractionation した後、各分画を MALDI-TOF MS (UltraFlex II, Bruker Daltonics) により解析した。従来法に比し、低分子量蛋白質やペプチドの抽出効率が良好であり、高存在量の 4 つのペプチドの抽出効率の定量的比較にお

いても DS 法が最も優れていた。本法で最も期待されるのはアルブミンやグロブリンなどのいわゆる abundant proteins と結合している低分子量蛋白質やペプチドを回収できることである。そこで同一血清 10 μ l 中のペプチドを 3 種類のペプチド抽出法およびアルブミン/IgG 除去法により処理したのちに分析した。その結果、アルブミン/IgG 除去法では検出されていないピークが多数検出できていることが確認された。

3. MALDI-TOF MS による慢性血栓塞栓肺高血圧症患者血清のプロテオーム・ペプチドーム解析

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (以下 CTEPH) は、肺動脈内が器質化した血栓により閉塞し肺高血圧症を呈する疾患である。平成 18 年度の日本の治療給付対象者はおよそ 800 人と比較的まれな疾患であり、女性に多いとされる。CTEPH の初発症状は労作時の息切れや動悸、胸痛など非特異的なものであり、診断に至るためにはまずこの疾患を疑うことが必要である。CTEPH を疑った場合には、まず肺血流シンチグラフィを施行し、血流欠損を認める場合には、更に CT や MR angiography および肺血管造影検査、右心カテーテル検査を行い、診断に至る。しかしこれら各種検査の特殊性、高コスト、侵襲の高さなどから、簡便な血清マーカーの開発が望まれている。そこで、MALDI-TOF MS による血清ペプチドの網羅的解析を行い、CTEPH 診断のための新規血清マーカー探索を行った。

MALDI-TOF MS を用いて作成された、探索群の CTEPH 患者と健常対照者血性のペプチドプロファイルの比較において、14 ペプチドのピーク強度で有意差を認めた。CTEPH 患者血清で、6 つのピーク強度が増強、8 つのピーク強度が減弱を示した。検証群でも有意差の再現性が確認できたのは 4 ペプチドであった ($m/z2970$, $m/z2989$, $m/z7760$, $m/z9262$)。うち、2 つのピーク ($m/z2970$, $m/z2989$) は CTEPH 患者血清で増強を認め、

残りの 2 つ ($m/z7760$, $m/z9262$) は減少した。

検証群で確認された 2 群間で有意差を認める 4 つのペプチドのピーク強度について、CTEPH 患者を健常対象者から鑑別する有効性の評価のために ROC 解析を行った。その結果 $m/z2989$ のペプチドが最も高い AUC を示した。カットオフ値 61.0 μ mol/L とすると感度 0.51、特異度 0.82 であった。そこで AutoFlex® II 質量分析計のリフレクトロンモードを用いて $m/z2989$ のペプチドの同定を行ったところ、フィブリノゲン A α 鎖の断片であることが判明した。アミノ酸配列は KMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSR PV であった。

4. Three-Step プロテオーム解析による新規飲酒マーカーの探索と検証

習慣飲酒量を反映するいわゆる飲酒マーカーとして血清 γ -GTP, 糖鎖欠損トランスフェリンなどがよく知られているが、感度・特異度において十分とは言えない。そこで血清の abundant proteins の除去後に HPLC による分画を行い、各フラクションの SDS-PAGE を行う Three-Step プロテオーム解析により新たな飲酒マーカーの探索を試みた。独立行政法人国立病院機構久里浜アルコール症センターに治療目的で入院したアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用いた。入院までの飲酒量はすべての症例でエタノール換算 100g/日以上であった。新規飲酒マーカーの健診レベルの飲酒量評価として、財団法人柏戸記念財団ポートスクエア柏戸クリニックの人間ドック受診者男性 18 名の血清検体を用いた。飲酒量は、エタノール換算 0 g/日が 6 名、20-50 g/日が 6 名、60 g/日以上が 6 名であった。すべての患者から同意を得た上で行った。

その結果、 $p < 0.05$ と有意な違いを 27 バンドでみられた。24 バンドが入院時検体において入院 8 週後検体に比して増加していたのに対し、3 バンドでは入院時に比し、入院 8 週後に増加した。Mann-Whitney test により $p < 0.01$ と有意に発現量の違いが見られた 6

バンドを同定した結果、入院時に増加していたバンドは、Alpha2-HS glycoprotein (M.W. 35641, pI 5.20, Mascot Score 112, Sequence coverage 8%)、Apolipoprotein A- I (M.W. 28061, pI 5.27, Mascot Score 1049, Sequence coverage 70%)、Glutathione peroxidase 3 (M.W. 25489, pI 8.20, Mascot Score 82, Sequence coverage 6%)、Heparin cofactor II (M.W. 57034, pI 6.41, Mascot Score 161, Sequence coverage 5%)、Pigment epithelial-derived factor (M.W. 46300, pI 5.84, Mascot Score 491, Sequence coverage 22%) であり、入院後 8 週間に増加したバンドは、Apolipoprotein C-III (M.W. 8759, pI 4.72, Mascot Score 118, Sequence coverage 24%) であった。これらのうち Pigment epithelial-derived factor (PEDF) のタンパク質発現量変化とアルコール性肝障害との関連性は報告されていないので、PEDF に関してさらに検討した。飲酒マーカー探索に用いたアルコール性肝硬変男性患者 8 名の入院時、断酒 8 週間後の血清検体を用い、PEDF の蛋白発現量変化をウェスタンブロット法で検証した。入院時と断酒 8 週間後では、 7.68 ± 0.15 vs 6.08 ± 0.16 ($p < 0.05$) と有意な違いが認められた。入院時の γ -GTP は 2 症例で正常域にとどまり、いわゆる non-responder と考えられたが、これら 2 症例においても変化が認められた。

5. 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

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。GCF のプロテオーム解析はアガロース二次元電気泳動法を用いたゲルベースの方法及びショットガン法によった。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動法で比較した。GCF に高発現している 8 つのスポットを検出した。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、酸化ストレスに関与するタンパク質 SOD1 および抗菌ペプチド DCD が同定された。

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関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。このことから GCF には歯周疾患に関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関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、免疫係に関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。

6. 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

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、また高額の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。

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。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。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。

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。

C, D-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

1. プロテオミクス解析情報統合プログラム

iPEACH の開発と応用

統合プロテオミクス解析のために作成した統合プログラム iPEACH によって自動的に解析ファイルを統合する一連の方法論を開発した。すなわち、解析対象グループの発現差異解析によって得られた遺伝子(DNA array)とタンパク質群(iTRAQ : ESI-Qq-TOF と MALDI-TOF-TOF による両解析データ、2D-DIGE;pI 3-11 のデータおよび pI 4-7 のデータ)のそれぞれの同定分子群の全ての情報を含むリストを読み込み、アクセッションを統合したファイルを作成する。このファイルには gene description(分子の定義や機能情報)、染色体位置情報、統合プロテオミクスにおける解析法[DNA microarray, iTRAQ (MALDI-MS), iTRAQ (ESI-MS/MS), 2D-DIGE 等], Gene Ontology annotation, タンパク質翻訳後修飾の有無と頻度 (2D-DIGE で同定された修飾スポットの情報)などが付与されている。又、統合ファイルのデータの内、それぞれの分子に重み付けを行い(iPEACH Intex)、優先順位をつけ、同一タンパク質でもタンパク質の翻訳後修飾が併せて確認されるものを注目すべき分子として自動的に上位にランクするアルゴリズムを用いている。更に自動的に有意と評価して閾値を設定し、閾値以下の変動分子を解析対象から外すようにマスクした後、GO 解析や KeyMolnet 等の分子ネットワーク解析に直接利用することが出来るように整形済みテキストとして統合ファイルを出力することができる。今回のオリジナル解析データの一元化ファイルにおいては 30,000 個の分子情報を対象とし、その中から統計学的に定量性が有意なもの約 20,000 分子を抽出した。

統合的に行うプロテオミクス解析の利点は、蛋白質自体の量的変動(iTRAQ など)と、蛋白質の mRNA レベルでの発現変動(DNA マイクロアレイ、qRT-PCR など)、および蛋白質の翻訳後修飾を含めた変化(2D-DIGE など)が同時に情報として取得できることである。一方で、統合プロテオミクスの解析結果

を扱う上での問題点として、個別の複数のプロテオーム解析(2D-DIGEやiTRAQ)相互、およびトランスクリプトーム解析(DNAマイクロアレイ)の結果の書式に共通性がなく、比較や統合が困難であること、そして、膨大な数の分子を解析するため、解析結果から有意な情報を抽出する効率的な方法論が確立されていないこと等があげられる。我々が開発したiPEACHおよびMANGOはこれらの問題を解決するため、それぞれの生データから同定された分子のすべての言語を統一し、翻訳後修飾情報や定量値、染色体情報、GOなどを紐づけした情報を網羅させ、重みづけと優先順位を付加した統合一元化ファイルを自動的に作成することができる。

2. 融合プロテオミクスの検証ツールとしての全自動2次元電気泳動-Western Blottingの最適化

組織・細胞内で発現されている何万というタンパク質を2次元電気泳動で分離してそのままチップ化するという構想が実現しつつある。高分子領域や塩基性領域などのタンパク質に対して不得意である点を除いては、現状のプロテオーム解析法の中で、もっとも定量的に再現性よく数千のタンパク質を修飾構造の違いも含めて分離できる方法論として2次元電気泳動に注目した。我々は再現性よくhigh throughputに作成するための自動化2次元電気泳動装置を開発した。これによって、今まで一週間近くかかっていた2D-Western blottingによる検証実験が3-4時間以内に終了するようになった。カクテル化した数種類のターゲット分子に対する抗体を用いて、Auto-2D-Western Blotting法によって、病態サンプルを解析し、翻訳後修飾やスプライシングを含むタンパク質の発現パターンから同定分子群の治療予後予測マーカー及び治療ターゲットとしての可能性の検討が迅速、簡便、高感度に可能となり、今回、腫瘍組織細胞の活性化シグナルの検証実験に用い、それぞれの検体にその前処理法とプログラムを最適化し、その有用性を証明した。

3. 統合プロテオミクス解析を用いたGO解析とネットワーク解析による脳神経系腫瘍組織細胞内活性化シグナルの抽出とバイオマーカー/治療ターゲット分子としての絞り込み、生物学的検証

(1) 抗がん剤感受性に関わる悪性グリオーマ組織細胞内活性化シグナルの解析

悪性グリオーマにおいて唯一化学療法に感受性を示すヒト悪性グリオーマである退形成乏突起神経膠腫(anaplastic oligodroglioma/astrocytoma:AO/AOA)は、現在のところ明確に予後を予測できる簡便な診断マーカーは存在しない。唯一、AO/AOAの染色体1番短腕部(1p)と19番長腕部(19q)の片アレル欠失(LOH)と化学療法感受性の関連性が報告されているが、化学療法感受性との因果関係を詳細に説明できる特定の遺伝子などの情報は全く報告されていない。理由として、ゲノム上の欠失が必ずしも遺伝子の欠失と関連しない転座の可能性や、あるいは、欠失した遺伝子群を介して間接的に化学療法耐性メカニズムに作用している他の遺伝子の関与等が考えられ、詳細なAO/AOAの化学療法感受性のメカニズムをゲノムや遺伝子レベルのみで結論を出すには限界があるため、今回の融合プロテオミクスを検討することにした。1p/19q LOH+及び1p/19q LOH-のAO/AOA組織間でiPEACH解析の後、有意に発現変動していると評価された分子群のリスト内で、1p/19q LOH-で発現が亢進している分子群139に焦点を当て解析を行った。一元化統合ファイル(iPEACHで作成)を用いたGO解析および細胞内シグナルネットワーク解析を行い、これらの分子メカニズムの相互作用機序を推察した。1p/19q LOH-AO/AOAにおいて特異的に発現が増加していた分子に注釈付けられているGO termの中で、GO解析により統計的に有意に関連が見られたGO termは、Regulation of gene expression ($p = 2.57E-08$, Biological process)、Regulation of transcription ($p = 5.36E-07$, Biological process)、DNA binding ($p = 2.86E-07$,

Molecular function) など遺伝子の発現調節に関与するものが多く、抗がん剤抵抗性の細胞内で特異的に活性化しているシグナルが、抗がん剤感受性に関わる分子の転写活性を制御している可能性が示唆された。関連活性化分子シグナルを抽出するため KeyMolnet ソフトウェアを用いてネットワーク図を検索すると、興味深いことに、1p/19q のローカスに位置する分子群が多数ネットワーク上に抽出され、特に最上流に Tyrosine Kinase receptor (TKRE4) および Cdc42、その下流で活性化する Vimentin リン酸化に関わる ProteinZ kinase(PKZ)、Vimentin の断片化に関わる CalpainSS(calpain small subunit)等を介する TKRE4-vimentin 間の分子ネットワークが グリオーマ組織における抗癌剤感受性に重要である可能性が高いことが示唆された。患者由来組織(合計 36 検体, LOH- : 18 検体, LOH+ : 18 検体)、LOH-培養グリオーマ細胞である U373 細胞及び U251 細胞、LOH+U87MG 細胞及び A172 細胞を用いて WB 解析を行った結果、TRKE4 から Vimentin に繋がる分子群は LOH-群の組織/細胞にて有意な上昇を示した。特に組織細胞の Vimentin の発現が LOH-群において顕著に上昇すると同時に、特徴的な Vimentin 分解フラグメントにおいても有意な増加がみとめられた。1p/19q の LOH+/-と Vimentin/TKRE4 の発現量の有無が生存に及ぼす影響を 51 人の AO/AOA サンプルについて統計的に解析したところ、Vimentin および TKRE4 の高発現群の生存率がこれらの低発現群に比べて有意に低くなることが判明し、Vimentin および TKRE4 の有無は LOH の有無と同様に予後判定の指標に成り得ることがわかった。さらに、Vimentin の分解フラグメントの上昇と生存率低下にも相関がみられ、Vimentin の増加とその分解は AO/AOA における抗がん剤感受性低下と関連性があることが判明した。興味深いことに、TKRE4-Vimentin シグナルの活性化で N 末端側 Vimentin フラグメントは核移行し

TRKE4 の転写活性を上昇させること、この一連の反応が PZK 阻害剤、Calpain 阻害剤で阻害された事、siRNA を含む各種阻害剤を用いた細胞および動物実験によって抗がん剤耐性のグリオーマが感受性に転ずる現象等が観察され、以上を考え合わせると、TKRE4-Vimentin activation loop の活性化に関わる一連のシグナルが LOH-の悪性グリオーマ細胞内で活性化し、これが抗がん剤の耐性機序のひとつであるということが判明した。

(2) 悪性グリオーマ幹細胞分化制御マーカーおよび治療標的分子群の解析

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。グリオーマ幹細胞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認められた。細胞生物学的な検証実験の結果、integrin α Vとfibronectinをコアとする分化に関わるニッチ成分がGICの増殖と分化誘導に関わっており、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、神経系腫瘍(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。

(3) 神経系腫瘍抑制遺伝子NF1異常による病態のマーカータンパク質及び治療標的分子群の解析

神経線維腫症1型(NF1)は、多発性神経線維腫や骨形成不全、悪性腫瘍、学習障害を始め多彩な病態を示す遺伝性疾患である。原因遺伝子産物ニューロフィブロミンは、Ras-GAP相同領域を有し、細胞内シグナル伝達の重要な調節因子と考えられている。これまでに、ニューロフィブロミンの発現低下に伴い活性化されたRas-MAPK pathwayを介した異常な細胞増殖や神経系細胞分化異常が大きくNF1病態に関与していることが知られているが、多彩なNF1の病態メカニズムの解明には全く至っておらず、本病態の病態マーカーや根治療法は存在しない。ニューロ

フィブロミンの発現低下に起因すると思われる様々な所見が多々報告されていることから、ニューロフィブロミンには、更なる未知の機能が存在することが推測されている。本研究では、ニューロフィブロミンの神経系細胞内機能とその欠損による細胞増殖や分化異常の機構を明らかにするため、NF1病態モデルPC12細胞を用いた融合プロテオミクス法によって、神経細胞様分化過程において病態細胞内で起こる異常なシグナルネットワークを網羅的に分子レベルで抽出し、得られた結果から治療ターゲットとなる分子群の絞り込みを行い、詳細な細胞生物学的検証を行った。

RNA干渉(siRNA)法を用いたNF1発現抑制によって、神経系細胞PC12に及ぼすNGFによる分化誘導への影響を解析し、生じた表現形の細胞内責任シグナル分子群を、iPEACH(データ統合マイニング法)を用いた融合プロテオミクスによって詳細に検討した。siRNAによりNF1発現を抑制したPC12は、神経突起伸長が経時的に阻害され、細胞骨格系の制御異常、運動能の亢進が観察された。NF1発現抑制細胞およびコントロール細胞より蛋白質およびmRNAを抽出し、iTRAQ、DNA array、2D-DIGEを組み合わせた融合プロテオミクスにより3,198分子群を定量的に同定し、NF1発現抑制細胞で有意に経時的発現変動した97分子のクラスター解析、および活性化分子ネットワークを検索した結果、細胞膜におけるカルシウムポンプ、カドヘリン、インテグリンやそれらの制御因子、およびProteinT、14-3-3、galectin3、GRシグナルに関わる分子ネットワークが、NF1ノックダウン細胞内でNGF刺激後経時的に変動していることが明らかとなった。その中でまず、新規mTOR調節因子Protein Tとその上流下流ネットワークに注目した。Protein TはNF1欠損神経系腫瘍細胞において、タンパク質合成系の要と成るmTOR経路の上流分子として顕著に上昇しており、各種NF1病態組織染色にて悪性のNeurofibroma関連腫瘍に優先的に染色されること、Protein Tの発

現抑制によって、未分化細胞が正常な分化状態へと誘導され、細胞増殖が抑制されることが判明した。これらのことから、Protein T を介した幹細胞維持及びアポトーシス調節、NF1 病態に関連する腫瘍の悪性化、特に末梢神経鞘腫瘍(MPNST)の発症に関わる可能性を示唆した。更に神経分化に焦点を当てて詳細なネットワークの関連づけを行ったところ、Dynein IC2、GR、COX-1 の一連の特異的活性化シグナルネットワークが抽出された。このシグナル経路に関わる各分子群の siRNA や阻害剤処理による検証実験の結果、NF1 発現抑制細胞では、Dynein IC2-B から IC2-C へのスプライシングとリン酸化の亢進によって GR の核輸送が誘導され、その結果 COX-1 の発現を亢進させて NF1 の病態と関わっていることが判明した。興味深いことに、NF1 欠損 PC12 細胞において、この COX-1 の過剰発現を抑制したところ、神経突起伸長阻害が回復して分化異常が正常化することが判明し、NF1 病態の新たな治療ターゲットとなることが示唆された。神経線維腫症 I 型で生じる神経系分化異常を始めとした多彩な症状の発症は、これらのシグナルの制御異常に関与している可能性が考えられた。またこのシグナル経路の抑制は、新たな治療ターゲットとなる可能性がある。特に COX-1 は現在鎮痛剤等で治療に使われているが、NF1 モデル細胞で特徴的な表現形である神経突起の退縮を有意に回復させたことから、今後 NF1 の治療において細胞の分化に焦点を当てた有用なターゲットになる可能性が示唆された。

本研究では、脳神経系腫瘍サンプルを用いた統合プロテオミクスの方法論を考案し、これを用いて抗がん剤耐性に関わって発現量と修飾構造を変動させるタンパク質群と、その機能変化に関わる責任分子群を介した細胞内シグナルネットワークを抽出することを試みた。これによって、悪性腫瘍における抗がん剤治療抵抗性メカニズムの一端を明らかにするとともに、治療ターゲットや臨床マーカー、創薬への基礎情報を得ようとした。

今回のグリオーマ AO/AOA 組織サンプルを用いたオリジナル解析データの一元化ファイルにおいては、30,000 個の分子情報を対象とし、その中から統計学的に有意な 16287 分子を抽出し、さらに 1p/19q LOH+ 及び 1p/19q LOH- の腫瘍組織間で有意に発現変動していると評価された分子群 139 個に焦点を当てて解析を行った。グリオーマ幹細胞を用いた解析では、21,857 分子リストから、経時的に変動する全ての分子群を広く融合して発現増加 3,864 分子、発現低下 2,513 分子に焦点をあてた。又、NF1 発現抑制神経幹細胞モデルでは、proteomics および DNA array 両方で定量的に同定された 3198 分子群から有意に経時的発現変動した 97 分子に焦点をあてた。これらの結果、単独のプロテオミクスのみあるいは DNA アレイのみでは得る事のできなかった新規の細胞内シグナルが、全ての情報を統合マイニングし網羅的に評価して解析することで非常に興味深い分子群に抽出できることが判明した。絞り込みを行ったシグナルに関しては、ひとつひとつ念入りに阻害剤や活性化剤や siRNA などを用いて細胞レベルの検証を行う必要があるが、高い絞り込みを行っているため、これらが予想通りに証明できる可能性が高くなる。今回我々が試みた解析において抽出された新規の細胞内活性化シグナル、TKRE4-Vimentin activation loop、GSC-differentiation niche、NF1-ProteinT-Dynein-GR- COX-1 signal に関しては、すべての検証実験において有意であったことから、これらのシグナルの病態マーカー/ターゲットとしての可能性は高い。病態サンプルは量が限られているため、できる限りの情報を最大に生かす必要性があり、iPEACH/MANGO によって統合したすべてのデータファイルをデータベース化することによって様々なメタ解析に再利用することも可能である。加えて、独自開発の Auto-2D-Western Blotting 法は、短時間且つ簡便に検体を解析し、翻訳後修飾を含む発現パターンから同定分子群の治療予後予測マー

カー及び治療ターゲットの検証にことが本研究であきらかとなり、これらの一連の方法論は、患者の治療抵抗性を感受性に転ずるための治療ターゲットや予後予測バイオマーカーとして可能性の高い候補分子群の抽出に有用であると考えられる。

C, D-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

1. HCV-HCC のバイオマーカー候補タンパク質の同定

従来、2-DE の分離範囲を pH 3-10 で実施し、HSP70 family, glutamine synthetase, arginase および三炭糖の解糖系酵素等が HCV-HCC の組織バイオマーカー候補として同定されていたが、今回は 2-DE の分離範囲を pH4-7 に絞り、ApoE アイソフォーム(糖鎖化?) と ATP 合成酵素アイソフォーム(リン酸化?) を新たなバイオマーカー候補として同定した。

2. 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 および peroxiredoxin が同定された。

3. HSP70 等を用いた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 チップに HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させたところ、正常人に比して HCV-HCC 患者の陽性率が有意に高かった。

4. 自己抗体を用いた難治性がんのバイオマーカー探索

難治性がんとして HCV-HCC の他に、抗がん剤 gemcitabine 耐性の膵臓がん細胞株では HSP27 や乳癌では抗 cyclophilin A 抗体が新たなバイオマーカー候補として同定された。

5. 治療評価バイオマーカー HSP27 の評価

抗がん剤 gemcitabine に対して薬剤耐性を獲得した膵臓がん細胞株 KLM-1R を用いて HSP27 特異的 siRNA による hsp27 遺伝子発現抑制や小分子化合物 KNK437 による HSP27 の抑制が薬剤耐性を解除することが明らかになった。

今回、従来の二次元電気泳動法と質量分析法 (nano-LC-MS/MS) の改良を行うとともに、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、C 型肝炎ウイルス感染に起因する肝細胞癌 (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た。その結果、糖鎖化 ApoE と ATP 合成酵素アイソフォームなどが新たな HCV-HCC のバイオマーカー候補タンパク質として同定され、抗がん剤 gemcitabine 耐性の膵臓がんでは HSP27 や乳がんでは抗 cyclophilin A 抗体が新たなバイオマーカーとして同定された。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。

E. 結論

E-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

本研究事業において、バイオマーカーの探索から検証までのワークフローを確立した。その手法を用いて、新規大腸癌バイオマーカー膜タンパク質約 80 個、新規乳癌の予後予測マーカー約 20 個を同定・検証した。一部の大腸癌バイオマーカー候補タンパク質につ