

- 24年5月22日(Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada).
249. 紙田正博、きょう建生、酒井義人、伊藤研悠、渡邊研、原田敦、新飯田俊平、山田哲司、尾野雅哉: 2DICAL を用いた腰部脊柱管狭窄症のプロテオーム解析日本プロテオーム学会 2012年大会平成24年7月27日(日本科学未来館、東京都)
250. Kamita M, Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M: A New Diagnostic Biomarker for Prostate Cancer Patients Detected by 2DICAL., Hupo 2012 11th Annual World Congress. 平成24年9月9日(Hynes Convention Center, Boston, USA)
251. 高倉美智子, 横溝 晃, 紙田正博, 宮永晃彦, 渡辺隆文, 鄭 基晩, 山田哲司, 内藤誠二, 尾野雅哉: PSA グレーゾーン値前立腺癌患者の新規診断マーカー第71回日本癌学会学術総会平成24年9月21日(ホテルロイトン札幌、札幌市).
252. 尾野雅哉: プロテオームのがん診断と治療への応用生命医薬情報学連合大会平成24年10月17日(タワーホール船堀、東京都)
253. きょう建生, 紙田正博, 東 祥子, 伊藤研悠, 酒井義人, 五十嵐文子, 渡辺 研, 山田哲司, 尾野雅哉, 原田 敦, 新飯田俊平: プロテオミクスを基盤とした脊柱管狭窄症肥厚靱帯のタンパク質局在 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 平成23年10月26日(名古屋国際会議場、名古屋市)
254. Ono M, Kamita M, Yamada T: A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL. 9th AACR-JCA Joint Conferences. 平成25年2月22日(Hyatt Regency Maui, Maui, USA)
255. 佐々木一樹, 里見佳典, 高尾敏文, 南野直人: 調節性分泌経路のペプチドミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(平成21年7月、東京)
256. 佐々木一樹, 南野直人: 分泌顆粒内ペプチドの解析から明らかになる世界. 第82回日本生化学会大会シンポジウム「ペプチドの多様性と機能」(平成21年10月、神戸)
257. 尾崎 司, 佐々木一樹, 南野直人: 分泌ペプチドーム解析による新規活性ペプチドの探索. 第62回ペプチド討論会(平成21年11月、小倉)
258. Minamino, N.: How to apply mass spectrometry to heart research., 20th World Congress of the International Society for Heart Research, Kyoto (Japan), May, 2010.
259. 佐々木一樹, 南野直人: ペプチドミクスで明らかにされる生理活性ペプチド分解のプロセス, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、第6回日本臨床プロテオーム研究会, 千葉, 2010年7月.
260. Sasaki, K., Takahashi, N., Satoh, M., M. Yamasaki, M. & Minamino, N.: An approach to identifying endogenous functional peptides in a set of sequence information provided by mass spectrometry., The Fifth International Peptide Symposium, Kyoto (Japan), Dec., 2010.
261. 佐々木一樹, 高橋憲行, 佐藤光男, 山崎基生, 南野直人: セクレトペプチドーム解析に基づく新規生理活性ペプチド探索. 第84回日本内分泌学会学術総会(平成23年4月, 神戸)
262. 尾崎 司, 佐々木一樹, 南野直人: ペプチドーム解析で見出されたインスリン様成長因子結合タンパク質-5由来の新規抗菌ペプチド AMP-IBP5. 第84回日本生化学会(平成23年9月, 京都)
263. N. Minamino: Discovery and function of secreted peptides. Neuroscience 2011,

- Society for Neuroscience Meeting, Symposium: Neuropeptides: From Discovery to Function (平成 23 年 11 月, Washinton DC)
264. 佐々木一樹, 尾崎 司, 南野直人: ラット心筋初代培養系の分泌ペプチド解析による心房性ナトリウム利尿ペプチドのプロセッシング・切断部位の同定. 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (平成 23 年 11 月, 大阪)
265. 南野直人: ペプチドーム探索, 第 9 回 GPCR 研究会 (平成 24 年 5 月, 東京)
266. K. Sasaki, Y. Ueta, N. Minamino: VGF-derived peptides identified by mass spectrometry and their functions. Internatiolnal Symposium: Frontiers in Biologically Active Peptidides, the 3rd Meeting of the Japan Branch of the International Neuropeptide Society (平成 24 年 9 月, 小倉)
267. Ohsawa K, Nakamura Y, Irino, Y, Sanagi T, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S.: Involvement of $\beta 1$ integrin Activation by P2Y12 receptor in microglial Process Extension. The 22th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry / Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Busan, Korea, 8.25, 2009.
268. Ohsawa K, Sanagi T, Irino Y, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S.: P2Y12 receptor-mediated integrin- $\beta 1$ activation regulates microglial process extension induced by ATP. The 29th Naito Conference, Glia World-Dynamic Function of Glial Cells in the Brain-, Kanagawa, 10.6, 2010.
269. Uchino S, Waga C. Asano H, Kohsaka S.: Kinetic study on DNA methylation of autism susceptibility gene, SHANK3, in the developing brain. The 23rd Biennial Meeting of ISN/ESN Joint Meeting. Athens, Greece, 8.28-9.1, 2011.
270. Kotajima H, Nakamura Y, Tsuchiya A, Suzuki E, Uchino S, Kohsaka S.: Ethopharmacological and gene expression analyses in the mouse in response to prenatal exposure to valproic acid. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Kobe, Japan, 9.29-10.2, 2012.
271. 難波隆志, 前川素子, 鈴木恵里, 湯浅茂樹, 内野茂夫, 高坂新一: NMDA 受容体阻害剤の成体海馬神経細胞新生に対する影響. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 7.10, 2008
272. 大澤圭子, 佐柳友規, 中村泰子, 鈴木恵里, 井上和秀, 高坂新一: ミクログリアの形態変化と遊走 —細胞外 ATP による遊走と突起伸長の調節分子機構. 第 52 回日本神経化学大会, 群馬, 6.24, 2009
273. 佐柳友規, 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵里, 青木正志, 割田仁, 糸山泰人, 内野茂夫, 高坂新一: 顔面神経軸索損傷負荷後の ALS モデルラットにおける運動ニューロン脆弱性に関与するミクログリアの機能の解析. 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会, 神戸, 9.4, 2010
274. 大澤圭子, 佐柳友規, 中村泰子, 鈴木恵里, 井上和秀, 高坂新一: アデノシンシグナルによるミクログリアの遊走と突起伸長調節. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学大会, 合同年会, 神戸, 12.8, 2010
275. 松下雄一, 高坂新一, 中嶋一行: ミクログリアによる GDNF の産生/分泌の調節.

- 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9.18, 2012
276. 信田京子, 是金宏昭, 御園生良子, 能浦真吾, 大植雅之, 宮本泰豪: 大腸癌の癌化に伴う糖脂質の構造変化と生合成関連糖転移酵素の解析糖脂質の構造解析、第 29 回日本糖質学会年会(2009 年 9 月、岐阜)
277. Kazuya Taniguchi, Terumasa Yamada, Yo Sasaki, Kikuya Kato: Genetic and epigenetic aberrations in human multiple hepatocellular carcinoma. 第 100 回米国癌学会 (2009 年 4 月、アメリカ・コロラド)
278. Kimiyoshi Nishitani, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Ken Kodama, Masahiko Higashiyama, Kikuya Kato : Detection of EGFR Gene T790M mutation in Non-Small Cell Lung Cancer using an improved version of the BEAMing technology., 第 68 回日本癌学会総会 (2009 年 10 月、横浜)
279. Kyoko Shida, Hiroaki Korekane, Yasuhide Miyamoto: Identification of a Novel Carbohydrate Tumor Marker Candidate Appropriate for Lewis Negative Individual. 25th International Carbohydrate Symposium, (Tokyo, Japan, 1-6 August, 2010)
280. 宮本泰豪, 信田京子, 能浦真吾, 大植雅之, 高橋秀典, 大東弘明, 石川 治: ルイス型陰性の人に適した新規糖鎖腫瘍マーカー候補の同定、第 69 回日本癌学会総会 (2010 年 10 月、大阪)
281. Jyunji Uchida, Kazuya Taniguchi, Fumio Imamura, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Kikuya Kato : Quantitative detection of the T790M EGFR mutation in circulating tumor DNA of lung cancer patients subjected to EGFR-TKI treatment. 2011 ASCO Annual Meeting (Chicago, UAS, June, 2011)
282. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Kimi Honma, Keita Uchino, Makiko Ono, Masaya Ono, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya: Ribophorin2 stabilizes mutant p53 by suppressing Glycogen Synthase Kinase 3b in breast cancer onset and metastasis. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
283. Yoji Kukita, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Ryo Matoba, Jun-Ya Kato, Noriko Kato, Ikuko Nakamae, Takeshi Kawabata, Ken Kodama, Kikuya Kato: Genomic characterization of familial lung cancer patients using whole exome-sequencing. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10 月, 2011.
284. Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Yoji Kukita, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Fumio Imamura and Kikuya Kato: Quantitative detection of the T790M EGFR mutation in circulating tumor DNA of lung cancer patients subjected to EGFR-TKI treatment. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
285. Manabu Kanemoto, Mitsuaki Shirahata, Kazuya Taniguchi, Yoji Kukita, Yoshiki Arakawa, Susumu Miyamoto, Kikuya Kato: The diagnosis for glioma by IDH1/2 mutation and the correlation with other genetic and epigenetic alteration. 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011 年 10 月、名古屋)
286. Yoji Kukita, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama,

- Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Ryo Matoba, Jun-Ya Kato, Noriko Kato, Ikuko Nakamae, Takeshi Kawabata, Ken Kodama, Kikuya Kato: Genomic characterization of familial lung cancer patients. 12th International Congress of Human Genetics/61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Montreal, Canada, October, 2011)
287. Kazuya Taniguchi, Junji Uchida, Yoji Kukita, Kazumi Nishino, Toru Kumagai, Yuki Akazawa, Takako Okuyama, Jiro Okami, Masahiko Higashiyama, Fumio Imamura and Kikuya Kato: Quantitative detection of the EGFR activating and resistance mutations in plasma DNA of Lung cancer patients. Molecular Targets and Cancer Therapeutics 2011 (San Francisco, USA, November, 2011)
288. 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)
289. 佐藤守, 高野重紹, 石橋真澄, 吉富秀幸, 西村基, 曾川一幸, 松下一之, 賀川真吾, 荷堂清香, 宮崎勝, 野村文夫: ジェムシタビン耐性ヒト膵癌細胞株のプロテオーム解析, 第 9 回日本ヒトプロテオーム機構大会 2011 年 7 月 28 日 朱鷺メッセ(新潟).
290. Noda, K., Kikuti W., Kiyokawa, I., Miura, T., Kojima, R., Katayama, K., Sogawa, K. & Nomura, F. :SERUM FIC5.9 LEVELS AS A PROMISING BIOMARKER FOR DETECTING LIVER PATHOLOGIES, HUPO 10th Annual World Congress, 2011 年 9 月 5 日, Geneva, Swiss.
291. 三橋暁, パストゥラル エロディ, 山崎泰代, リッティエー ショーン, 曾川一幸, 生水真紀夫, 野村文夫, グッデナウ ダイアン: 卵巣癌に特異的な代謝プロファイルの同定, 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日
292. 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. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2011. 2011 年 11 月 5 日 San Francisco, USA.
293. 荒木学会
294. 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)
295. 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)
296. 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 1^{9th}-2^{3rd}, 2010, Sydney, Australia)
297. Zhang X-L, Tanaka T, Kuramitsu Y, Fujimoto M, and Nakamura K.: Proteomic study of endoplasmic reticulum from Jurkat cells during heat stress. (HUPO 8th Annual world Congress, September 26th -30th , 2009, Toronto, Canada)
298. Peng L, Kapp EA, Fenyo D, Kwon MS, Jiang P, Wu S, Jiang Y, Aguilar M, Baker M, Cai Z, Chi PV, Chung M, He F, Nakamura K. Nagi SM, Paik YK, Pan TL, Poon T, Salekdeh GH, Siddiqui NA, Sideshmukh R, srisomsap C, Svasti J, Tyan YC, Dreyer F, Klotz D, McLauchlan D, Rawson P, and Jordan TM.: Strategies for membrane proteomics. The AOHUPO Membrane Protoemics Initiative. (HUPO 8th Annual world Congress, September 26th -30th , 2009, Toronto, Canada)
299. Sugihara K, Kuramitsu Y, Tanaka T, Fujimoto M, Oka M, and Nakamura K.: Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma caused by hepatitis C virus. (HUPO 8th Annual world Congress, September 26th -30th , 2009, Toronto, Canada)
300. Nakamura K. Zhang X, Kaku C, and Fujimoto M.: Invited Lecture, Proteomic profiling of ER fraction from Jurkat cells during heat stress response. (2009TPS International Proteomics Conference and 5th AOHUPO MPI Workshop, June 1^{9th} -2^{0th} , 2009, Taipei, Taiwan)
301. Sugihara K, Kuramitsu Y, Tanaka T, Fujimoto M, Oka M and Nakamura K.: Proteomic analysis of hepatocellular carcinoma caused by hepatitis C virus. (HUPO 8th Annual World Congress, September 26th-30th , 2009, Toronto, Canada)
302. 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)
303. 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)
304. 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)
305. 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)
306. 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)
307. 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)
308. 杉原佳恵, 藏満保宏, 田中寿幸, 岡正朗, 中村和行: 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 (平成20年9月19-20日、松本)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称:「乳がん治療の予後判定方法」
発明者: 朝長 毅、村岡 賢、村上達夫、加藤菊也、宮本泰豪
出願日: 2012年5月23日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-117961 (国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 2) 発明の名称:「大腸癌治療剤」
発明者: 朝長 毅、久家貴寿、久米秀明
出願日: 2012年6月15日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-135619 (国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 3) 発明の名称:「大腸がんの判定方法」
発明者: 朝長 毅、久米秀明
出願日: 2012年12月27日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-274638(国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 4) 発明の名称:「癌が疑われる患者または患者由来の組織の癌部と非癌部との判別方法およびそれに用いる判別試薬」
発明者: 清宮正徳、朝長 毅、宮崎 勝、野村文夫
出願日: 2008年10月14日(国内出願)
出願番号: 特願 2008-264794(国内出願)
出願人: 国立大学法人千葉大学、日東紡績株式会社
特許番号: 特許第 5133842 号
登録日: 2012年11月16日
- 5) 発明の名称: 新規腫瘍マーカーを用いた乳癌の検査方法
発明者: 角田慎一、堤 康央
出願番号: 特願 2009-060706
- 6) 発明の名称: 抗体、乳がんの治療に用いられる医薬組成物、腫瘍検査方法、及び、腫瘍検査用試薬
発明者: 角田慎一、長野一也、堤 康央
出願番号: 特願 2011-57029(PCT/JP2012/001802)
- 7) 発明の名称: 肺腺扁平上皮癌の腫瘍マーカー及び診断キット
発明者: 鎌田春彦、角田慎一、堤 康央

出願番号: 特願 2012-050629.

- 8) 発明の名称: 血管新生誘導分子
出願日: 2009/12/3
出願番号: 特願 2009-275254
出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
発明者: 仲 哲治、世良田聡
- 9) 発明の名称: 創傷治療剤
出願日: 2010年7月1日
出願番号: 特願 2010-151139号
出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
発明者: 寿 順久、世良田聡、仲 哲治
- 10) 発明の名称: 自己免疫疾患検査用バイオマーカー及び検査方法
出願日: 2009年6月9日
出願番号: 特願 2009-138408
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人大阪大学
発明者: 仲 哲治、世良田聡、岸本忠三
- 11) 発明の名称: 結核検査用バイオマーカー
出願日: 2012/4/3
出願番号: 2012-84996
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
発明者: 仲 哲治、藤本穰、世良田聡、松本智成
- 12) 発明の名称: 膠原病のレイノー症状を診断する免疫学的手法
出願日: 2012/6/22
出願番号: 特願 2012-141434
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
発明者: 仲 哲治、藤本穰、世良田聡
- 13) 発明の名称: タンパク質の定量方法
発明者: 中山敬一、松本雅記
出願日: 平成 21 年 7 月 17 日
出願番号: 特願 2009-169045
出願人 国立大学法人九州大学
- 14) 発明の名称: 卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
発明者: 荒川憲昭、増石有佑、山中結子、平野久、川崎博史、平原史樹、宮城悦子
出願者: 横浜市立大学特許番号

- 特許第 5224309 号
登録日：2013.3.22 (国内)
- 15) 発明の名称：卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
発明者：荒川憲昭，増石有佑，山中結子，平野 久，川崎博史，平原史樹，宮城悦子
出願者：横浜市立大学
特許番号：特許第 5224308 号
登録日：2013.3.22 (国内)
- 16) 発明の名称：卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
発明者：荒川憲昭，増石有佑，山中結子，平野 久，川崎博史，平原史樹，宮城悦子
出願者：公立大学法人横浜市立大学
20100222
出願番号：特願 2010-035737
出願日：2010 年 2 月 22 日
- 17) 発明の名称：組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および検査薬
発明者：荒川憲昭，平野 久，宮城悦子，大竹宣久
出願人：公立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社
出願番号：特願 2011-179450
出願日：2011 年 8 月 19 日 国内
- 18) 発明の名称：NDRG 1 タンパク質を標的とした卵巣明細胞腺癌の治療
発明者：荒川憲昭，増石有佑，平野 久
出願者：公立大学法人横浜市立大学
出願番号：特願 2011-178684
出願日：2011 年 8 月 18 日
- 19) 発明の名称：卵巣明細胞腺癌に特異的に発現しているタンパク質とその応用
発明者：荒川憲昭，増石有佑，山中結子，平野久，川崎博史，平原史樹，宮城悦子
出願者：公立大学法人横浜市立大学
出願番号：PCT/JP2011/53497
出願日：2011 年 2 月 11 日
- 20) 発明の名称：電気泳動で分離されたタンパク質を膜フィルターに転写し質量分析する方法
発明者：平野 久，井野 洋子
出願者：公立大学法人横浜市立大学
出願番号：特願
2010-112156(P2010-112156)
出願日：2010 年 5 月 14 日
- 21) 発明の名称：Tumor marker for pancreatic cancer
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日：2011 年 9 月 13 日特許番号：US8017732B2 (米国特許)
- 22) 発明の名称：Novel tumor marker for pancreatic cancer
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日：2012 年 10 月 12 日
特許番号：EP2182061 号 (欧州特許)
- 23) 発明の名称：酸化修飾タンパク質またはポリペプチドに対する高特異性モノクローナル抗体
発明者：能勢 博、橋口朋代、尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日：2009 年 6 月 5 日
特許番号：第 4319700 号
- 24) 発明の名称：液体クロマトグラフィーのデータ補正方法
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日：2012 年 11 月 2 日
特許番号：第 5119405 号
- 25) 発明の名称：修飾 α フィブリノゲンタンパク質またはその免疫原性断片
発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄
特許日：2012 年 11 月 30 日
特許番号：第 5140809 号
- 26) 発明の名称：腫瘍マーカー、それに対する抗体、その検出キット及び検出方法
出願番号：特願 2 0 1 0 - 0 4 1 8 5 9
出願日：2010 年 2 月 26 日
出願人：地方独立行政法人大阪府立病院機構
発明者：宮本泰豪
- 27) 発明の名称：血中 DNA の定量的検出による悪性新生物の病勢の進行を評価する方法

出願番号：特願 2011-109498

出願日：2011年5月16日

出願人：地方独立行政法人大阪府立病院
機構

発明者：加藤菊也、今村文生、谷ロー也
熊谷融、内田純二、西野和美

- 28) 発明の名称：クラスリン重鎖に対する自己抗体の免疫測定方法、それに用いるキット、及びそれを用いた癌判定方法

公開番号：特許公開 2011-107064

出願人：千葉大学・日東紡メディカル(株)
共同出願

- 29) 発明の名称：クラスリン重鎖とその自己抗体との複合体の免疫測定方法、それに用いるキット及びそれを用いた癌判定方法

公開番号：特許公開 2100-117781

出願人：千葉大学・日東紡メディカル(株)
共同出願

- 30) 発明の名称：自己抗体の検出方法

発明者：中村和行 他

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

H. 研究協力者

高尾 敏文 大阪大学蛋白質研究所
教授

山本 格 新潟大学大学院医歯学総合研
究科 教授

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

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

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、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。

A. 研究目的

国際的な新薬開発競争に際して、シーズとなる疾患関連バイオマーカーの発見、知的財産権の確保は、今後のわが国の医薬品産業の発展に不可欠である。そのためには、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、その疾患関連タンパク質の発見にはヒトの血液、尿、組織などの臨床材料を用いた疾患プロテオーム解析が重要である。これまでそれらの材料、特に血液や尿を用いた疾患プロテオーム解析はさかんに行われてきたが、新たなバイオマーカーとなるタンパク質は発見されていない。その大きな理由として、例えば血中のタンパク質濃度のダイナミックレンジは 10^{11} と非常に広く、現在の質量分析計の性

能では量の多いタンパク質しか同定されないためである。近年になり、質量分析計の性能は飛躍的に向上し、微量なタンパク質の検出・同定が可能となったが、それでも血中のタンパク質を網羅的に同定するには程遠い。そのため本研究では、バイオマーカーの探索に用いる試料として、バイオマーカー候補タンパク質が濃縮されている病巣部の試料、たとえば癌の組織や神経疾患の髄液を用いた。

実用化に結びつくバイオマーカーが見つからないもう一つの理由は、探索で見つかったバイオマーカー候補タンパク質を検証する手段が乏しかったからである。従来はその検証作業は抗体を用いたウエスタンブロットや免疫染色で行っていたが、よい抗体が入手できな

いたために、せっかく同定されたバイオマーカー候補タンパク質が検証されずに埋もれてしまった例は多々あったと思われる。近年 SRM/MRM 法と呼ばれる質量分析計を用いた検証方法が開発され、抗体を用いなくても精度よくバイオマーカー候補タンパク質を検証することが可能となった。そこで我々は、SRM/MRM 法を用いて、得られたバイオマーカー候補タンパク質の大規模検証を行った。さらに、その有用性を高めるためには、疾患との因果関係を裏付けるような候補タンパク質の機能の解明も実用化には重要である。そこで我々は、一部のバイオマーカー候補タンパク質についてはその機能解析も試みた。

以上の手法を用いて、がん・神経疾患等の診断に有用な新規バイオマーカータンパク質の探索を行った。特に抗体医薬のターゲットとなる膜タンパク質やキナーゼ阻害剤のターゲットとなるリン酸化タンパク質の網羅的探索に力を注いだ。さらに、それらのバイオマーカー候補タンパク質の血液や尿中での検出・定量を試みた。

B. 研究方法

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候補タンパク質の探索

組織中膜タンパク質の iTRAQ 解析

組織検体をホモジュナイザーで破碎し、低速遠心で核や未破碎の細胞を除き、超高速遠心をおこない、その沈殿画分を膜タンパク質画分とした。さらに、上述の PTS 法でペプチドを抽出した。脱塩精製後得られたペプチドサンプルは、iTRAQ 試薬で同位体標識ラベル後、カラム操作により分画し、液体クロマトグラフィー質量分析装置でタンパク質の同定と定量解析を行い、グループ間で有意に発現量に変化するバイオマーカー候補タンパク質を検索した。得られたバイオマーカー候補タンパク質は、SRM 法（後述）、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法を用いて検証した。

組織中リン酸化タンパク質の iTRAQ 解析

ヒト癌組織からのタンパク質抽出には、難溶性画分のタンパク質も抽出するため、界面活性剤を用いた相間移動溶解法(Phase Transfer Surfactant : PTS 法)を用いた。具体的には、デオキシコール酸とラウロイルサルコシン酸を含む溶液で可溶化し、トリプシン消化後、酢酸エチルを加え、酸性条件にすることで質量分析の際に悪影響となる界面活性剤を除き、ペプチド抽出を行った。抽出したペプチドは脱塩処理した後、Fe³⁺をとリン酸基との親和性を利用した Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 法によるリン酸化ペプチドの濃縮を行った。IMAC カラムにより精製されたリン酸化ペプチドを iTRAQ 試薬により安定同位体標識し、陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相カラムによる二次元分画を行った後、LTQ-Orbitrap Velos による質量分析によりリン酸化ペプチドを同定した。

2. SRM/MRM 法によるバイオマーカー候補タンパク質の検証

組織中膜タンパク質の SRM/MRM 定量解析

網羅的な定量解析の結果、発現量の変化するバイオマーカー候補タンパク質について、selected reaction monitoring (SRM)法を用いた検証をおこなった。SRM 法を用いることで、抗体を用いずに、少量のサンプルで一度に数十個の候補タンパク質の検証が可能となった。候補タンパク質に特異的なアミノ酸配列を持つペプチド（トリプシン消化断片）を SRM 測定の対象として 2 種類ずつ選択し、それぞれに対する安定同位体標識ペプチド(SI ペプチド)を合成した。SRM 測定の際は、トリプシン消化した測定サンプルに SI ペプチドを内部標準として一定量添加し、SI ペプチドに対する内在性ペプチドの比を調べることで、候補タンパク質の発現量を定量した。

SRM 測定を行うにあたって、まず SI ペプチド (1ng)をフリーエ変換-リニアイオントラップハイブリッド質量分析計 LTQ orbitrap XL で LC/MSMS 測定した。LTQ orbitrap XL で得られた MSMS スペクトルから、各ペプチドに

つき、強度の大きなプロダクトイオンを 10 個選択した。さらにペプチドの開裂(コリジョン)に使用されるコリジョンエネルギー(CE)を最適化する為、各プロダクトイオンにつき 7 点の CE を設定し、合計 70 個の transition を作成した。その後さらに、SI ペプチドをトリプル四重極型質量分析計 TSQ Vantage により測定し、測定にもっとも適した 3 個の transition を選択した。さらに SRM シグナルの感度、定量性を上げる為、ペプチドの溶出時間の±5 分間のみ測定(Timed SRM)するよう設定した。これらの最適化の後、SI ペプチドと細胞ライセート中の内在性ペプチドを LC/SRM 測定した。その際の LC は、溶媒 A に 2% ACN 0.1%FA、B 溶媒に 90%ACN 0.1%FA を使い、グラジエントは溶媒 B 5%でスタートし、45 分で B 25%まで上げ、5 分の B 95%の洗浄の後、15 分の B 5%の平衡化を行う計 60 分のメソッドを用いた。

血漿中 APL1 βペプチドの SRM/MRM 定量解析

ヒト血漿 1ml に APL1 β 25、APL1 β 27、APL1 β 28 の安定同位体標識ペプチド(SI ペプチド) を添加し、それを buffer (0.1%N-octylglucoside, 140mM NaCl、10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA, SIGMA Protease Inhibitor mix) で 2 倍に希釈し 50k のフィルターで 4℃、80 分間遠心ろ過後、抗 APL1 β抗体と Protein sepharose A ビーズを用いて免疫沈降を行い、20%ACN,0.1%FA で APL1 βペプチドを溶出した。得られたサンプルに対して SRM を行うために、トリプル四重極型質量分析計 TSQ Vantage において、それぞれ 5 つの transition を選択して最適化を行い、最も適した 3 個の transition を最終的な測定に用いた。その transition を使って、APL1β安定同位体標準ペプチドの SRM 測定により検量線を作成し、定量限界(LOQ)と検出限界(LOD)を定めた。その際の LC は、溶媒 A に 2% ACN 0.1%FA、B 溶媒に 90%ACN 0.1%FA を使い、グラジエントは溶媒 B 5%でスタートし、20 分で B 55%まで上げ、5 分の B 95%の洗浄の後、

15 分の B 5%の平衡化を行う計 40 分のメソッドを用いた。

3. バイオマーカー候補タンパク質の機能解析細胞培養

大腸癌培養細胞株 HCT116 と DLD1 細胞は ATCC から購入した。細胞は 5% CO₂ 存在下、10% 牛胎児血清 (Invitrogen) を添加した IMDM 培地 (Invitrogen) で培養した。siRNA の細胞導入は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。

FAM83H の過剰発現とノックダウン

過剰発現には、FAM83H cDNA を組み込んだ p3XFLAG-CMV-14 ベクターを用いた。ノックダウンにはインビトロジェン社から購入した siRNA を用いた。大腸癌培養細胞株を播種した翌日に、Lipofectamine 2000 または Lipofectamine RNAiMAX を用いて発現ベクターまたは siRNA を導入した。過剰発現については 24 時間後に、ノックダウンについては 48 時間後に各種解析を行った。siRNA の配列は以下のとおりである。

FAM83H siRNA S1

5'-ACACGAAGGCCAUUCUGGAGCAGAU-3'
,
3'-UGUGCUUCCGGUAAGACCUCGUCUA-5'

FAM83H siRNA S2

5'-CAACGCCUUGUACAGCAGCAACCUU-3'
,
3'-GUUGC GGAACAUGUCGUCGUUGGAA-5'

Control siRNA には Medium GC Duplex #2 (Invitrogen) を用いた。

インタラクトーム解析

大腸癌培養細胞株に FLAG 標識した FAM83H 発現ベクターを導入したのち、1% NP-40 を含む可溶化剤で細胞を処理し、タンパク質抽出液を得た。Protein G-Dynabeads に dimethyl pimelimidate でクロスリンクさせた

抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、FAM83H-FLAG とそれに相互作用するタンパク質を精製した。精製したタンパク質群を SDS-PAGE で分離した後、SDS-PAGE ゲルを分子量にしたがって分割し、全てをゲル内消化した後に、LC-MS/MS で解析した。コントロールベクターを用いた対象実験との比較から、FAM83H に特異的に結合するタンパク質群を決定した。

大腸組織中の遺伝子発現解析

千葉大学において、13 名の大腸癌患者から摘出された大腸癌組織とその周辺非癌部組織を解析に用いた。各組織から RNeasy Plus kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。

12 名分の組織検体を用いて Microarray 解析を行った。Total RNA から Gene Chip(R) 3' IVT Express Kit (Affymetrix)を用いて aRNA を作成し、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix)で解析した。226129_at プロブセットの結果から FAM83H の発現量を調べた。

qPCR は 11 名分の組織検体（10 名分は microarray 解析に用いた検体、1 名分は新たな検体）を使って行った。Power CYBR Green 試薬を用いて (Applied Biosystems)、Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System で解析した。FAM83H の qPCR に用いたプライマーの配列は Forward primer 5' -cgacaagtgccgtgtcaacc-3' と Reverse primer 5' -acttcccagtgccgcagtag である。得られた結果を Actin の発現量で補正した。Actin に対するプライマーは Forward 5' -agaaaatctggcaccacacc-3' と Reverse 5' -ggggtgttgaaggctcaaa-3' である。

細胞増殖試験

10000 個の HCT116 細胞を 12 well dish に撒き、2 日後に siRNA を導入し、その後 24、48、72 時間後にトリパンブルー染色法で生細胞の数を計測した。

抗体

用いた一次抗体:抗 PARP 分解物抗体(#5625、Cell Signaling Technology)、抗 Caspase-3 分解物抗体(#9664、Cell Signaling Technology)、抗 FAM83H 抗体 (HPA024604、Sigma)、抗 actin 抗体 (sc-1615、Santa Cruz Biotechnology)、抗ケラチン 18 抗体 (MS-142-P0、Thermo Scientific)、抗ケラチン 8 抗体 (EP1628Y、Epitomics)。

Western blot 解析に用いた二次抗体: HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2020、Santa Cruz Biotechnology)、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (NA934、GE ヘルスケア)。免疫染色に使用した二次抗体: Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa488 標識抗ヤギ IgG 抗体、Alexa594 標識抗マウス IgG 抗体。Alexa 標識抗体は全てインビトロジェン社から購入した。

Western blot 解析

細胞タンパク質の抽出は Laemmli の SDS サンプルバッファーで行った。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写した。Blocking One (ナカライテスク)でブロッキングした後に、一次抗体、二次抗体を順次あてた。ECL 試薬 (GE ヘルスケア)を用いた化学発光法で発光させ、LAS4000(GE ヘルスケア)で検出した。

免疫染色

細胞は-20 度に冷やした 100%メタノールで 1 分間浸すか、30 度に加温した 4%パラホルムアルデヒドに 20 分間浸す事で固定した。パラホルムアルデヒドで固定した場合は PBS に 0.5%Triton X-100 を添加した溶液を用いて細胞膜に穴をあけた。3% 牛血清アルブミンでブロッキングした後に一次抗体、二次抗体を順に反応させた。二次抗体溶液に DAPI を混ぜる事で DNA を共染色した。細胞の観察は共焦点顕微鏡 (LSM710、Zeiss) を用いて行った。

Wound healing assay

HCT116 細胞に siRNA を導入し、24 時間が経過した後に細胞シートに傷をつけ、その直後と 24 時間後の細胞シートの状態を光学顕微鏡下で観察した。細胞シート先端部が傷の内側に向けて移動した距離を測定した。

(倫理面への配慮)

今回の研究に用いたヒト由来試料は全て試料提供機関である国立大学法人千葉大学大学院医学研究院、大阪府立成人病センター、大阪大学大学院医学研究科の倫理審査委員会において承認を得た方法でインフォームドコンセントを取得したものであり、独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンターにおける使用を同審査委員会および医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト倫理審査委員会で承認されたものである。

C. 研究結果

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 (図 1)。

(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 (表 1)。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 (表 1)。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(表 1)。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。

有意な発現変化のみられたタンパク質のうち、ポリープに比べて、転移のない癌組織での発現上昇がみられた例 (図 2A)、転移のない癌組織に比べて、転移のある癌組織での高発現が見られた例 (図 2B)、ポリープよりも転移のない癌組織、さらに転移のない癌組織よりも転移のある癌組織と悪性度が高い癌組織でより高発現している例 (図 2C)、ポリープに比べて転移のない癌組織での発現の低下が示された例 (図 2D)を示す。

新たに見出されたバイオマーカー候補タンパク質のうち、X と Y についてはよい抗体が入手できたため、抗体を用いた検証も行った。X は、N 端部分にシグナル配列または膜貫通ドメインと予想される配列を持つ機能未知のタンパク質で、SRM の検証結果から、癌の悪性化に伴う発現上昇が示された(図 3A)。抗 X 抗体を用いたウェスタンブロットでも癌組織での発現の上昇が確認され(図 3B)、大腸癌組織の免疫組織染色では、X は正常細胞や間質での発現がほとんど認められず、癌細胞で高発現していることが示された(図 3C)。

また、Y は、RR ファミリータンパク質の一つで、その一次構造から 2 回膜貫通型の膜タンパク質と予想される。RR ファミリータンパク質は、細胞内受容体に結合し、その受容体の plasma membrane への移行を促進する機能を持つことが報告され、Y も細胞内膜のトラフィッキングへの関与が示唆されている。また、Y は、プロアポトーシス活性を持ち、その polymorphism (遺伝子多型) と大腸癌発症との関連性も示唆されている。SRM やウェスタンブロットの結果から、Y は、転移のない癌組織に比べて転移のある癌組織で発現が増加していることが示された(図 4A、4B)。また、免

疫組織染色の結果から、Y は癌細胞に高発現していることが示された(図 4C)。

さらに、14 種類の癌組織それぞれ 50 または 100 検体分含む癌組織アレイ(TMA1150)の解析により、大腸癌における X の高発現が多検体で確認されただけでなく、肝臓癌や乳癌でも X の発現が増加していることが示された(図 5A)。また、Y は大腸癌だけでなく、前立腺癌、乳癌でも高発現していることも示された(図 5B)。

以上の解析により、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 (図 6)。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。そのうち 2 つのタンパク質 A、B の例を図 7 に示す。下段の図は内部標準のタンパク量、上段は目的のタンパク量を示している。タンパク質 A、B とともに、健常人、転移のない大腸癌患者に比して、転移のある大腸癌患者で増加していることがわかる。このことから、これらのタンパク質が大腸癌バイオマーカーとして実用化できる可能性が高いと考えられた。

(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 (表 2)。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 (図 8)。その中で、10 個のタンパク質は現在のところ乳癌での論文報告はない。

10 種類の候補タンパク質中で利用できる抗体があった XX と YY のウエスタンブロッティング・免疫組織学染色による検討を行った。XX は、ウエスタンブロッティングの結果よりハイリスク群に比べローリスク群で有意差のある

発現変動が示された (図 9)。YY も同様にウエスタンブロッティングの結果ハイリスク群に比べローリスク群で発現変動が確認され、また免疫組織学染色によっても同様の結果が示された (図 10)。

(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、10438 のリン酸化ペプチドの同定に成功した (表 3)。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 (表 3)。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 (図 11)。

(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 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 (Yanagida K. et al. EMBO Mol. Med. 1223-235, 2009)。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。

図 12 に血漿中 APL1 β の検出、定量のワークフローを示す。当初は APL1 β 抗体による免疫沈降後に SRM/MRM 法を用いて APL1 β の検出を試みたが、免疫沈降は手順が煩雑であるため、免疫沈降をせずに直接血漿中 APL1 β が検出できないか検討した。まず、血漿中に多く含まれるメジャータンパク質をアルブミン吸着カラム Cibacron blue で除去し、その後さらにアセトニトリル沈殿によりメジャータンパク質を除いた。この状態でもまだ残存タンパク質が APL1 β の検出を妨げたため、さらに C18 と SCX 担体を重層させた StageTip を用いて精製した。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。図 13 の下段が内部標準ペプチド、上段が内在性 APL1 β ペプチドである。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 1 fmol/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 (図 14)。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 (図 15)。

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 (図 16)。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 (図 17A)。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 (図 17B)、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 (図 17C)。

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 (図 18)。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 (図 19)。

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 (図 20A)。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 (図 20B)。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 (data not shown)。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 (図 21A)。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 (図 21B)。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 依存性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 (図 22)。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 (図 23)。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。

D. 考察

大腸癌・乳癌バイオマーカー候補膜タンパク質の探索と検証

この研究事業により、我々はバイオマーカーの探索から検証までの一連の大規模解析法を確立することができた。特に、SRM/MRM 法を用いた検証法の確立は、従来の抗体を用いた検証法の弱点と限界を克服したと言っても過言ではない。この手法により、我々は大腸癌と乳癌のバイオマーカー候補膜タンパク質 50-100 個の検証に成功した。さらに乳癌のリン酸化プロテオーム解析の結果、特に抗体では検出が難しいリン酸化タンパク質・ペプチドの検証を SRM/MRM 法で行うことができた。SRM/MRM 法を用いた膜タンパク質やリン酸化タンパク質の大規模検証の報告は世界で初めてである。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。

我々が検証してきたバイオマーカー候補膜タンパク質や細胞外タンパク質は、癌組織の細胞から分泌されることが予想され、血液や尿などの体液で検出できる可能性が高いと考えられたが、前述のように血清・血漿中でのバイオ

マーカーの検出は非常に難しい。そこで我々は、血中のエクソソームに着目してバイオマーカー候補タンパク質の検出を試みた。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。その結果、検出を試みた約 100 個のタンパク質のうち約 4 分の 1 が検出定量でき、そのうち 20 個弱が健常人に比べ癌患者で変化が見られた。これらのタンパク質は非常に有望な大腸癌のバイオマーカーと考えられ、今後さらに検体数を増やして大規模検証する必要がある。また今回エクソソーム中で検出できなかった残りの 4 分の 3 については、分画等の処理をすることで検出が可能になると思われる。

一方、リン酸化タンパク質は細胞内シグナル伝達の主役であり、このシグナル伝達因子の網羅的定量が可能となれば、生命現象や疾患発症メカニズムの解明、新薬の開発につながる。特にがんの増殖シグナルの解明は、新規抗癌剤開発に非常に重要である。近年の分子標的薬の登場で患者の予後が飛躍的に改善したが、現在の分子標的薬に対して、薬が効く人効かない人がいること、最初は効いていても耐性ができてしまうなどの問題があるため、今後薬効を正確に予測できるバイオマーカーや耐性を克服するための新薬のターゲット分子の探索が必要になってくることは間違いない。それらの探索にリン酸化タンパク質の定量技術は威力を発揮すると思われる。

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 定量

我々は、血清タンパク質の前処理法について、検討に検討を重ねた結果、免疫沈降法を用いずに血漿中に 1 fmol/ml の濃度で存在する APL1 β の検出、定量に成功した。これも世界初の成果である。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かなければならない。

大腸癌新規創薬ターゲットタンパク質 FAM83H の機能解析

我々は、FAM83H が大腸癌の新しい創薬ターゲット候補タンパク質となることを見出した。大腸癌細胞において FAM83H は中間系フィラメント骨格構築を制御していることが明らかとなり、その制御を介して細胞分裂/増殖や細胞運動を促進している事が示された。その FAM83H の細胞増殖・運動の亢進は CK-1 α を介していることから、FAM83H と CK-1 α の相互作用を阻害する薬が開発できれば、大腸癌の増殖・転移を抑制することが大いに期待される。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。

E. 結論

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。また、アルツハイマー病のサロゲートマーカー APL1 β の超高感度定量の実現に成功した。さらに、一部の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、新規大腸癌治療薬のターゲット候補因子 FAM83H と CK-1 α を見出した。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Shiromizu, T., Adachi, J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S. & Tomonaga, T. 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.
2. Muraoka, S., Kume, H., Adachi, J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T., Ishihama, Y. & Tomonaga T. In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. *J. Proteome Res.* **12**, 208-13 (2013).
3. Sogawa, K., Noda, K., Umemura, H., Seimiya, M., Kuga, T., Tomonaga, T., Nishimura, M., Kanai, F., Imazeki, F., Takizawa, H., Yoneda, M., Nakajima, A., Tsutsumi, M., Yokosuka, O. & Nomura, F. 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.
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. Integrated view of the human chromosome X-centric proteome project. *J. Proteome Res.* **12**, 58-61 (2013).
5. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaj, H., Kato, K. & Tomonaga T. A Strategy for large-scale phospho-proteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-22 (2012).
6. 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. 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).
7. 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**, 1803-15 (2012).
8. Yoshida, Y., Nameta, M., Kuwano, M., Zhang, Y., Bo, X., Magdeldin, S., Cui, Z., Fujinaka, H., Yaoita, E., Tomonaga, T. & Yamamoto, T. Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. *Proteomics Clin. Appl.* **6**, 412-7 (2012).
9. Uebi, T., Itoh, Y., Hatano, O., Kumagai, A., Sanosaka, M., Sasaki, T., Sasagawa, S., Doi, J., Tatsumi, K., Mitamura, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawamura, T., Okumura, M., Nakae, J., Takikawa, H., Fukusato, T., Koura, M., Nish, M., Hamsten, A., Silveira, A., Bertorello, AM., Kitagawa, K., Nagaoka, Y., Kawahara, H., Tomonaga, T., Naka, T., Ikegawa, S., Tsumaki, N., Matsuda, J. & Takemori, H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS One.* **7**, e37803 (2012).
10. Nomura, F., Sogawa, K., Noda, K., Seimiya, M., Matsushita, K., Miura, T., Tomonaga, T., Yoshitomi, H., Imazeki, F.,

- Takizawa, H., Mogushi, K., Miyazaki, M. & Yokosuka, O. 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).
11. Matsushita, K., Kajiwara, T., Tamura, M., Satoh, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Yoshimoto, R., Ito, A., Kubo, S., Natsume, T., Levens, D., Yoshida, M. & Nomura, F. 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).
 12. Kimura, K., Ojima, H., Kubota, D., Sakumoto, M., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Kosuge, T. & Kondo, T. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. *J. Proteomics* **78**, 362-73 (2012).
 13. 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* 623190 Epub (2012).
 14. 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* 108609 Epub (2012).
 15. Kajiwara, T., Matsushita, K., Itoga, S., Tamura, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Habara, Y., Matsuo, M. & Nomura F. SAP155-mediated c-myc suppressor FBP-interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues. *Cancer Sci.* **104**, 149-56 (2012).
 16. Hosako, M., Muto, T., Nakamura, Y., Tsuta, K., Tochigi, N., Tsuda, H., Asamura, H., Tomonaga, T., Kawai, A. & Kondo, T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J. Proteomics* **75**, 833-44 (2012).
 17. 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**, 1282-8 (2012).
 18. 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 (2012).
 19. Sugihara, Y., Taniguchi, H., Kushima, R., Tsuda, H., Kubota, D., Ichikawa, H., Sakamoto, K., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Fujita, S. & Kondo, T. Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J. Proteomics.* **75**, 5342-55 (2012).
 20. Abulaizi, M., Tomonaga, T., Satoh, M., Sogawa, K., Matsushita, K., Kodera, Y., Obul, J., Takano, S., Yoshitomi, H., Miyazaki, M. & Nomura, F. The