

- Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakorn-siripan, D. & Nakayama, K.I., Fukada, Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106-1118 (2013).
21. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A. & Nakayama, K.I. Ablation of fbw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* **23**, 347-361 (2013).
22. Reavie, L., Buckley, S.M., Loizou, E., Takeishi, S., Aranda-Orgilles, B., Ndiaye-Lobry, D., Abdel-Wahab, O., Ibrahim, S., Nakayama, K.I. & Aifantis, I. Regulation of c-Myc ubiquitination controls chronic myelogenous leukemia initiation and progression. *Cancer Cell* **23**, 362-375 (2013).
- F-2. 学会発表
1. Nakayama, K.I., Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Nakayama, K.: Conditional inactivation of Fbxw7 results in a defect in cell cycle exit and tumorigenesis. Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle". (Invited speaker) Cold Spring Harbor, NY.5/18 (2008).
2. Nakayama, K.I.: Cell cycle control during T-cell development. Japan-German Immunology Seminar "International Conference on Immune Regulation in Health and Disease". (Invited speaker) Fukuoka.11/5 (2008).
3. Nakayama, K.I.: Two ubiquitin ligases control cell cycle in stem, progenitor, and differentiated cells. The 2nd Global COE International Symposium joint with the 18th Hot Spring Harbor Symposium of Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University "Stem Cells and Regenerative Medicine". (Invited speaker) Fukuoka.11/9 (2008).
4. Nakayama, K.I.: Two F-box proteins Skp2 and Fbw7 control cell cycle exit and re-entry. ZOMES V: The Fifth International Symposium on the COP9 signalosome, Proteasome, and eIF3: At the interface between signaling & proteolysis. (Invited speaker) Yokohama.11/12 (2008).
5. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by differential proteomics. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. (Invited speaker) Onna, Okinawa, Japan.12/2 (2009).
6. Nakayama, K.I., Yumimoto, K., Matsumoto, M.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship by proteomics: Say good-bye to western blotting. 6th Global-COE International Symposium: New Horizons for Modern Science - Biology and Medicine at the Crossroads. (Invited speaker) Fukuoka.8/19 (2010).
7. Nakayama, K.I.: Comprehensive elucidation of enzyme-substrate relationship in ubiquitylation by differential proteomics: Say good-bye to western blotting. MEXT Priority Research Project "Cell Proliferation Control" International Symposium "Cell Cycle and Cell Differentiation: From A to Z". (Invited speaker) Nagoya.11/6 (2010).
8. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロットティングは要らない?! 第33回日本分子生物学会年会. (パイオニアズレクチャー) 神戸.12/9 (2010).

- | | |
|---|--|
| <p>9. <u>中山敬一</u>: 次世代プロテオミクスによるユビキチンシステムの全貌解明. 第 28 回日本医学会総会. (シンポジウム) 東京.4/9 (2011).</p> <p>10. <u>Nakayama, K.I.</u>, Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomic analysis. Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family". (Invited speaker) Cold Spring Harbor, NY.5/18 (2011).</p> <p>11. <u>Nakayama, K.I.</u>: Road to absolute quantification of all human proteins by large-scale targeted proteomics. The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. (Invited speaker) Onna, Okinawa, Japan.10/26 (2011).</p> <p>12. <u>Nakayama, K.I.</u>: Cell cycle, metabolism, and signal transduction in cancer revealed by next-generation proteomics. 2012 American Association for Cancer Research Annual Meeting. (Invited speaker) Chicago, USA.3/31 (2012).</p> <p>13. <u>Nakayama, K.I.</u>: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. 10th Stem Cell Research Symposium. (Invited speaker) Awaji.5/31 (2012).</p> <p>14. <u>Nakayama, K.I.</u>: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomics analysis. HUPO 2012 11th World Congress. (Invited speaker) Boston, MA.9/12 (2012).</p> | <p>出願番号：特願 2009-169045
出願人 国立大学法人九州大学</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|--|

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

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)

創薬バイオマーカー探索研究基盤の確立とその活用

研究分担者 平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センター センター長
大学院生命医科学研究科 教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

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する。また、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、創薬標的分子あるいは診断マーカーとして利用可能なタンパク質を明らかにする。さらに、質量分析装置を用いた診断マーカーのアッセイ方法を開発する。

B. 研究方法

1. 疾患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ァレンスゲル二次電気泳動/質量分析装置(MS/MS)や iTRAQ/MS/MS を用いて分析した。検出された卵巣明細胞腺癌関連タンパク質の創薬標的分子としての有用性を生化学、分子生物学的方法を用いて検証した。

2. 血漿中の疾患関連タンパク質の検出・同定

卵巣明細胞腺癌の組織や培養細胞において見られたタンパク質の発現変動を患者血漿中

でも捉えられるかどうか 2D-LC-ESI-Q/TOF MS を用いて調べた。

3. 培養細胞から分泌される疾患関連タンパク質の検出

卵巣明細胞腺癌細胞株 4 種(OVTOKO, OVISE, OVMANA および OVSAYO)、粘液性腺癌細胞株 2 種(MCAS および RMUG-S)、漿液性腺癌細胞株 2 種(OVSAHO および OVKATE)から分泌されたタンパク質をプロテアーゼ消化後、MS/MS によって解析した。

4. 培養細胞から分泌される疾患関連タンパク質の診断マーカーとしての有用性の検証

培養細胞から分泌された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を免疫学的方法等を用いて検証した。

(倫理面への配慮)

提供者の同意が必要な試料については、同意を得たものを使用した。

C. 研究結果

1. 疾患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ァ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. 血漿中の疾患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疾患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疾患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 (図 1)。

この抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法に基づく自動イムノ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 (図 1C)。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 (図 2C)、

臨床病期（図 2D）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（図 3）。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（図 4）。

5. MRM による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。

D. 考察

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できることがわかった。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。

E. 結論

本研究において、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がわかった。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すことができた。また、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。さらに、質量分析装置を用いて診断マーカーをアッセイできる可能性が生まれた。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Takahashi, E., Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Hirano, H., Kasuga, M. & Kaburagi, Y. Differential proteome

- analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK- A^y mouse model using the iTRAQ technique. *J. Proteomics*, in press.
2. Endoh, K., Nishi, M., Ishiguro, H., Uemura, H., Miyagi, Y., Aoki, I., Hirano, H., Kubota, Y. & Ryo, A. Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis. *Prostate* **72**, 626-37, 2012.
 3. Kimura, A., Kato, Y. & Hirano, H. N-Myristoylation of the Rpt2 subunit regulates intracellular localization of the yeast 26S proteasome. *Biochemistry* **51**, 8856-66 (2012).
 4. Kurata, Y., Kimura, Y., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Okamoto, H., Masaoka, T., Nagoya, H., Araki, K., Moriyama, S., Hirano, H. & Mori, T. Effects of growth hormone on the salmon pituitary proteome. *J. Proteomics* **75**, 1718-31 (2012).
 5. Yoshizawa, T., Shimizu, T., Hirano, H., Sato, M. & Hashimoto H. Structural basis for inhibition of xyloglucan- specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. *J. Biol. Chem.* **287**, 18710-16 (2012).
 6. 荒川憲昭,増石有佑,平野久. 卵巣明細胞腺がん関連タンパク質の発現調節. *生物物理化学* **55**, 5-8 (2011).
 7. Kamita, M., Kimura, Y., Ino, Y., Kamp, R. M., Polavoda, B., Sherman, F. & Hirano, H. N^α-Acetylation of yeast ribosomal proteins: Identification by 2D-DIGE MS/MS and analysis of the effect on proteins synthesis. *J. Proteomics* **74**, 431-41 (2011).
 8. Kato, Y., Kawasaki, H., Ohyama, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Kokubo, T. & Hirano, H. Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics* **188**, 871-882 (2011).
 9. Masuishi, Y., Arakawa, N. & Hirano, H. Wild-type p53 enhances Annexin IV gene expression in ovarian clear cell adenocarcinoma. *FEBS J.* **278**, 1470-83 (2011).
 10. Izumi, N., Yamashita, A., Iwamatsu, A., Kurata, R., Nakamura, H., Saari, B., Hirano, H., Anderson, P. & Ohno, S. AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK family and function in nonsense-mediated mRNA decay. *Sci. Signal* **3**, 1-13 (2010).
 11. Kikuchi, J., Iwafune, Y., Akiyama, T., Okayama, A., Nakamura, H., Arakawa, N., Kimura, Y. & Hirano, H. Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast. *Proteomics* **10**, 2769-79 (2010).
 12. Kimura, Y., Nagata, K., Suzuki, N., Yokoyama, R., Yamanaka, Y., Kitamura, H., Hirano, H. & Ohara, O. Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics* **10**, 3884-95, (2010).
- F-2. 学会発表
1. 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, Hart, G. W., 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病角膜炎に伴うタンパク質への糖 (O-GlcNAc) 修飾の変化, 日本顕微鏡学会第68回学術講演会, つくば, 2012.5.14
 2. Akimoto, Y., Miura, Y., Toda, T., Wolfert, M. A., Wells, L., Boons, G. -J., Hart, G. W., Endo, T. and Kawakami, H. : Detection of O-GlcNAcylated proteins by glycoprote-

- omics and in situ proximity ligation assay (PLA). 第 14 回国際組織細胞化学会議 (ICHC2012) / 第 53 回日本組織細胞化学会総会, 京都, 2012.2.29
3. 荒川憲昭: セクリトーム解析による新規卵巣癌マーカーの同定と臨床的有用性. 日本電気泳動学会, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾, 2012.8.20
 4. 荒川憲昭: セクリトーム解析による卵巣明細胞腺癌血清マーカーの開発. 北里疾患プロテオーム研究会, 北里大学相模原キャンパス, 相模原, 2012.8.23
 5. Arakawa, N., Ohtake, N., Nomura, A., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F. and Hirano, H.: Secretome Analysis of ovarian cancer cell lines leads to discovery of a novel diagnostic marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. HUPO2012, ハイイツ・コンベンションセンター, ボストン, 2012.9.9
 6. Arakawa, N., Ohtake, N., Nomura, A., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F., and Hirano, H.: Identification of a new biomarker for ovarian clear cell adenocarcinoma by secretome analysis of cancer cell lines. AOHUPO2012, 北京, チャイナ・ナショナル・コンベンションセンター, 2012.5.5
 7. 荒川憲昭, 大竹則久, 野村文子, 森田絵理奈, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: セクリトーム解析による新規卵巣癌血清診断マーカーの探索と同定. JHUPO, 東京, 2012.7.26
 8. 平野 久: たんぱく質のはたらきと病気, 先端医科学研究センター市民講座, 横浜, 2012.4.23
 9. Hirano, H.: Proteomics of co- and post-translational modifications of large protein complexes. 6th Congress of Asia and Oceania Human Proteome Organisation, Beijing, China, 2012.5.7-7
 10. 平野 久: Phos-tag アフィニティ電気泳動と DIGE によって見えるタンパク質のリン酸化状態の変動日本電気泳動学会シンポジウム, 沖縄, 2012.5.11
 11. 平野 久: 卵巣明細胞腺癌に対する創薬標的および診断マーカーの探索 厚生労働科学研究費医薬基盤研究所公開シンポジウム, 東京, 2012.6.7
 12. 平野 久: プロテオーム分析技術の開発、体系化と生命医科学研究への応用 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.26-27
 13. 平野 久: 血液中バイオマーカー探索のプロテオミクス, AB Sciex シンポジウム, 大阪および東京, 2012.8.28 および 8.30
 14. 井野洋子: Phosphoproteomics in androgen-independent prostate cancer, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本未来科学館, 東京都江東区, 2012.07.26-27
 15. 井野洋子: 前立腺癌のアンドロゲン非依存性に関与するリン酸化タンパク質の探索, 第 63 回日本電気泳動学会総会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市, 2012.08.20-21
 16. 井野洋子: Phosphoproteomic analysis of androgen-independent prostate cancer cells, HUPO 11th Annual World Congress, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, 2012.09.09-13
 17. 紙田正博, 木村弥生, 井野洋子, 倉田洋一, 山田哲司, 尾野雅哉, 平野 久: 出芽酵母リボソームタンパク質の N α -アセチル化とそれがタンパク質合成に及ぼす影響, 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 18. Kimura, A., Nomura, A., Kawakami, T., Arakawa, N. and Hirano, H.: Identification of the phosphoproteins implicated in the high malignancy of ovarian clear cell adenocarcinoma using comparative LC-MS/MS-based proteomic approach. 11th annual world congress

- HUPO 2012, Hynes Convention Center, Boston, 2012. 9. 9-13.
19. 木村鮎子, 野村文子, 川上隆雄, 荒川憲昭, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌の悪性度に関わるリン酸化タンパク質の網羅的な解析, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 26-27
 20. 倉田洋一, 木村弥生, 紙田正博, 山中結子, 石川晃代, 岡本裕之, 正岡哲治, 名古屋博之, 荒木和男, 森山俊介, 森 司, 平野 久: サケ脳下垂体プロテオームに対する成長ホルモンの影響, 日本ヒトプロテオーム研究機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 21. 増石有佑, 木村弥生, 平野 久: GPIアンカー型タンパク質の網羅的解析法の開発, Proteomic Analysis of GPI-anchored protein, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 22. 斎藤真奈美, 山下暁郎, 岡山明子, 和田佳行, 平野 久, 島田 勝 質量分析法でヒトパピローマウイルスの感染に関わる細胞因子の同定, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 23. 菅原経継, 木村弥生, 戸田年総, 平野 久: Phos-tag 親和性電気泳動法を用いたヒトプロテオームサブユニットのリン酸化状態の解析 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 27
 24. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鍋木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会, みやこめっせ, 京都, 2012.4.13
 25. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鍋木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
 26. 高橋枝里, 久保田浩之, 本間綾香, 平野 久, 鍋木康志: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 27. 高橋枝里: 血清プロテオーム解析による 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 34 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2011.12.14
 28. 高橋枝里: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
 29. 高橋枝里: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 30. 野村文子, 荒川憲昭, 大胡田慎一郎, 勝山真人, 平野 久: 血管型 NADPH オキシダーゼのレドックスシグナルのプロテオミクス解析, 日本生化学会大会 第 85 回大会, 福岡国際会議場, 福岡, 2012.12.14-16
 31. Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, M., Kondo, Y., Suzuki, Y. and Inoue, N. Proteomic identification of differentially expressed genes during the differentiation from embryonic stem cells of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) to neural stem cells in vitro. 10th Human Proteome Organisation World Congress, Geneva, Switzerland, 2011.9.3-7.
 32. 荒川憲昭: 卵巣明細胞腺がん装薬標的分子, 診断マーカーの探索, 横浜市開港記念会館, 横浜, 第 62 回日本電気泳動学会総会, 2011.11.13
 33. 荒川憲昭, 森田絵理菜, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌のセクレトーム解析, 東京ベイホテル, 浦安, 日本プロテオーム機構 2010 年会, 2010.7.26.

34. 平野 久: 翻訳後修飾のプロテオミクス, 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011.7.28.
35. 平野 久: Phos-tag によるリン酸化蛋白質のショットガン分析, Phos-tag 親和電気泳動, 日本生化学会年会, 京都, 2011.9.24.
36. 平野 久: 創薬標的分子と診断マーカー探索のプロテオミクス, 第 69 回 今堀アイバイオフォーラム, 東京, 2011.10.12.
37. 平野 久: GEヘルスケアDIGE User's Day, 電気泳動によって見えるタンパク質の翻訳後修飾, 東京, 2011.11.10.
38. Hirano, H.: Identification and functional analysis of co- and post-translational modifications of large protein complexes. Korean Human Proteome Organization, 10th Annual Congress, Busan, Korea, 2011.4.1-2.
39. 平野 久, 木村弥生, 菊池有理亜, 岩船裕子, 秋山知子, 岡山明子, 中村浩規, 荒川憲昭: 翻訳後修飾のプロテオミクス, 日本電気泳動学会シンポジウム, 山口大学医学部, 宇部市, 2011.5.9.
40. 木村鮎子, 加藤 悠, 平野 久: 19S複合体サブユニットRpt2 のN-ミリスチル化修飾はプロテアソームの細胞内局在を制御する, パシフィコ横浜, 神奈川, 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16.
41. 木村鮎子, 酒井和徳, 野村文子, 川上隆雄, 荒川憲昭, 平野 久: 非標識定量リン酸化プロテオミクス手法を用いた卵巣明細胞腺癌(CCA)の悪性度に関わるリン酸化タンパク質群の探索, 朱鷺メッセ, 新潟, 日本プロテオーム機構第 9 回大会, 2011. 7.28-30.
42. 木村弥生, 永田佳代子, 石川晃代, 平野 久: 酵母プロテアソームサブユニットのN末端メチル化, 朱鷺メッセ, 新潟, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011.7.28-30.
43. 永田佳代子, 柳澤侑哉, 野村文子, 木村弥生, 佐久間祐司, 宮城洋平, 平野 久: イマチニブ二次耐性GISTのリン酸化プロテオーム解析, 朱鷺メッセ, 新潟, 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011.7.28-30.
44. 野村文子, 荒川憲昭, 山中結子, 勝山真人, 平野 久: 血管型NADPHオキシダーゼの標的タンパク質の解析, 横浜市開港記念会館, 横浜, 第 62 回日本電気泳動学会総会, 2011.11.12-13.
45. 岡山明子, 宮城洋平, 尾下文浩, 梁 明秀, 平野 久: プロテオミクス解析による早期肺腺癌の予後予測マーカー及び治療標的候補分子の発掘, 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011.7.28-30.
46. 柳澤侑哉, 永田佳代子, 野村文子, 木村弥生, 佐久間祐司, 宮城洋平, 平野 久: リン酸化プロテオーム解析によるGISTのイマチニブ二次耐性分子メカニズムの解明, パシフィコ横浜, 神奈川, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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: 特願 2010-035737
 出願日: 2010年2月22日

- 4) 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
出願者：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
出願年月日：2011年8月19日 国内
- 4) 発明の名称：NDRG1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
- 5) 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
- 6) 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

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

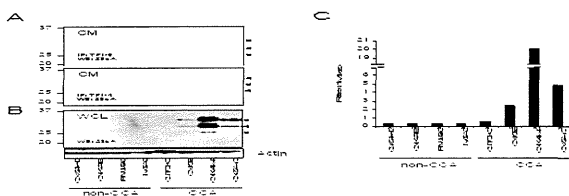


Fig.4 Arakawa et al.

図1 抗TFPI2抗体による卵巣癌細胞株TFPI2の発現解析

A, 培養上清中のTFPI2の免疫沈降/ウエスタンブロット; B, 全細胞抽出液中のTFPI2のウエスタンブロット; C, 自動ELISA装置による培養上清中のTFPI2の測定

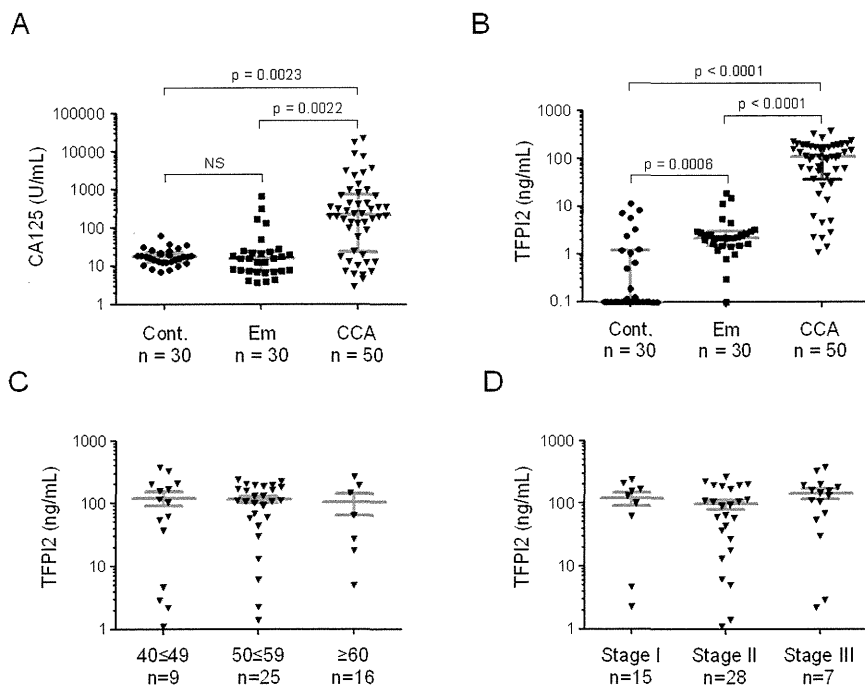


図2 抗TFPI2抗体を用いた自動免疫アッセイ計によるTFPI2の発現解析

A, 子宮内膜症(Em)と卵巣明細胞腺癌(CCA)患者血清におけるCA125の発現量; B, 子宮内膜症(Em)と卵巣明細胞腺癌(CCA)患者血清におけるTFPI2の発現量; C, 卵巣明細胞腺癌患者の年齢とTFPI2の発現量の関係; D, 卵巣明細胞腺癌の進行とTFPI2の発現量の関係

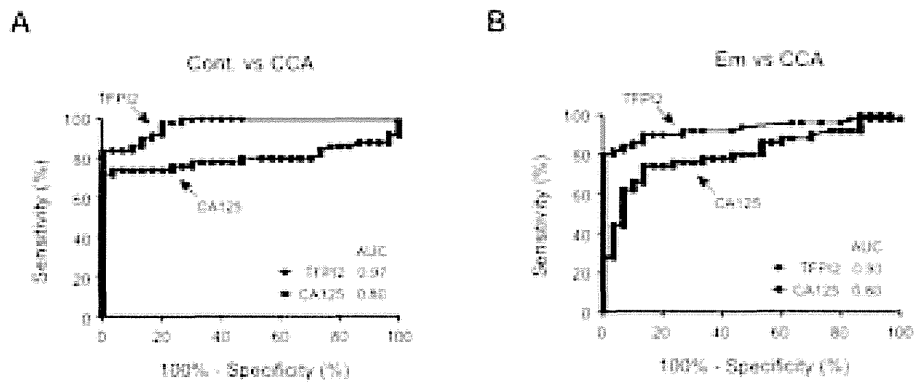


図3 TFPI2 と CA125 の ROC 曲線

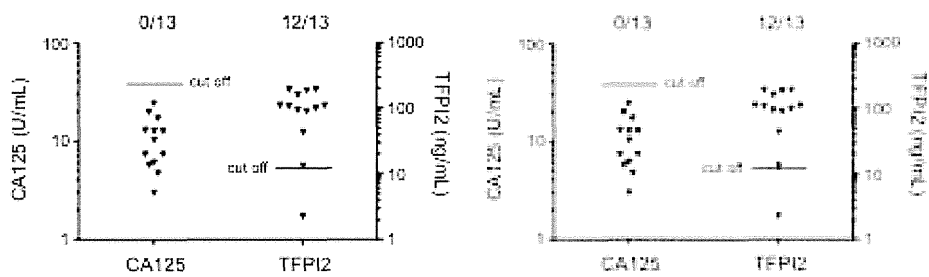


図4 CA125 陰性の卵巣明細胞腺癌患者における血清 TFPI2 の量
CA125 が陰性の患者でも TFPI2 は高値を示す。

2DICAL による微量たんぱく質解析技術の研究

研究分担者 尾野雅哉 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

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。

A. 研究目的

2DICAL は国立がん研究センターが開発したプロテオーム解析技術であるが、従来では検出不能であった微量たんぱく質をプロテオームリサーチセンター、国立がん研究センターが所有する最新の質量分析計と 2DICAL を用いて解析し、多数の臨床検体からさまざまな疾患の新規バイオマーカー開発を行うことが本プロジェクトの目的である。

B. 研究方法

1. 腎癌血漿バイオマーカーの開発

バイオマーカー開発に用いた腎癌症例群 20 例、健常者群 20 例の平均年齢はそれぞれ 62.25 歳、65.95 歳で、両群間で年齢のへだたりがないように調整した。腎癌症例の病期は 1a 期 11 例、1b 期 5 例、2 期 1 例、3a 期 2 例、3b 期 1 例であった。血漿は ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit（血漿免疫除去キット）を用いて前処理し、albumin、IgG、IgA、IgM、IgD、transferrin、fibrinogen、haptoglobin、 α 1-acid glycoprotein、 α 2-macroglobulin、apolipoprotein A-I、apolipoprotein A-II、apolipoprotein B、ceruloplasmin、 α 1-antitrypsin、complement C1q、

complement C3、complement C4、plasminogen、prealbumin の 20 の血中に豊富に存在するたんぱく質を除去し、質量分析計には QTOF Ultima（ウォーターズ社）、液体クロマトグラフィーにはナノフロンティア LC（日立ハイテクノロジー社）を用い、データを採取し、2DICAL にてバイオマーカー候補を選別した。選別された腎癌血漿バイオマーカー候補たんぱく質（Fibronectin 1）には既存の抗体があったため、Western Blot によって血中量を確認し、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 例での検討を行った。

2. 前立腺癌血漿バイオマーカーの開発

東レ中空糸膜を用いた分画法による前処理を行い、低分子量タンパク質（ ~ 3 nm）を選択的に分画し、前立腺癌血漿 25 例、健常者血漿 15 例を 2DICAL で解析したところ、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、CAI の血中濃度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 例で測定した。また、10 例の前立腺癌原発巣を CAI による免疫染色でその発現

を確認した。

3. 肝臓癌診断治療に有用なバイオマーカーの開発

肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発のために、2DICALを用いて肝細胞癌および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った。肝細胞癌組織 54 例、同一症例非癌部肝組織 52 例を可溶化し、トリプシン処理を施した試料と、同試料から HAMMOC 法を用いてリン酸化ペプチド濃縮を行った試料を作成した。それぞれの試料を質量分析計で計測して、2DICALにて解析した。

4. プロテオームリサーチセンターへの2DICALの導入

2DICALのシステム一式がプロテオームリサーチセンターに導入され、腎癌血漿 20 例、健常者血漿 20 例の解析を行った。腎癌患者血漿は九州大学大学院医学研究院泌尿器科学分野との共同研究で収集されたもので、国立がん研究センターでは QTOF Ultima、プロテオームリサーチセンターでは SynaptHDMS G1 を質量分析計として用い、各症例 2 回ずつ測定した。両者計 160 測定データを 2DICAL で解析した

5. 2DICAL のバージョンアップ

多くの質量分析計に対応し、解析速度を向上させるために 2DICAL のバージョンアップを行った。セントロイドピークを使用したスペクトルデータの簡略化、ピーク検出手順の変更と簡略化、アライメント処理の簡略化を行うことにより、ピーク検出時間が旧バージョンの 1/5 に短縮された。また、オービトラップ、TripleTof5600 などの精密質量分析計に対応するため測定実測値を出力可能とし、質量精度を向上させた。ピーククオリティ、S/N のパラメータを追加することにより擬陽性ピークを除去し、同位体ピーク判定も改善させた。さらに、質量分析計でアノテーション情報が十分に利用できない点を改善するために、タンデムマス(MS/MS)のアノテーションデータをすべて拾い上げるアルゴリズム

を加えた。

C. 研究結果

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 (Fibronectine 1) を発見した。Fibronectine 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 Fibronectine 1 の血中濃度を測定し、血漿 Fibronectine 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 ($p=0.0053$) ことが示された。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 Fibronectine 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。本内容は学術論文として公表した

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。本内容は学術論文として公表した。

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、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 25013 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。

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は不要となった。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。

D. 考察

2DICAL を用いて血漿腎癌バイオマーカーとして Fibronectin 1 を、前立腺癌バイオマーカーとして Carbonic Anhydrase I を探索し、多数検体を用いてそれぞれの物質が腎癌患者血漿、前立腺癌患者血漿で上昇していることを検証し、学術論文として公表した。これは 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。

平成 23 年度より開始した肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発は、これま

での血液からの解析と異なり組織からのプロテオーム解析であったが、癌組織と正常肝組織の比較で得られた結果は予想される細胞機能を正確に反映したものであった。平成 25 年度は、この組織を利用しリン酸化に特化した解析を行ったが、癌組織と正常肝組織間で差のあるリン酸化ペプチドにおいても予想される細胞機能を正確に反映したものであった。さらに、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。

すでに確立している国立がんセンターでの 2DICAL 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。

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ため、その完成は今後の研究課題と考えている。

E. 結論

2DICAL を用いた血漿バイオマーカーの探索、および、多数検体での検証に成功し、本事業での研究成果を上げることができた。

今後、バイオマーカーとして実用化するためには、臨床の現場で測定を行い、その有用性についての最終的判断が下せるデータを獲得していかなければならない。また、肝臓癌の診断治療に有用なバイオマーカーの開発を行うことにより、組織検体を用いたバイオマーカー開発とともに、リン酸化ペプチドを利用した新規の診断治療にかかわるバイオマーカーの開発が重要な研究課題となっていくことが明らかになった。本研究期間に 2DICAL のバージョンアップも行なわれ、今後、微量タンパク質の解析がさらに進み、より有用なバイオマーカーが開発されることが期待される。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Matsubara, J., Ono, M., Honda, K., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Shoji, A., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S., and Yamada, T. Survival prediction for pancreatic cancer patients receiving gemcitabine treatment. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 695-704 (2010).
2. Satow, R., Shitashige, M., Jigami, T., Honda, K., Ono, M., Hirohashi, S., and Yamada, T. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in *Xenopus* axis formation. *J. Biol. Chem.* **285**, 26289-94 (2010).
3. Shitashige, M., Satow, R., Jigami, T., Aoki, K., Honda, K., Shibata, T., Ono, M., Hirohashi, S., and Yamada, T. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res.* **70**, 5024-33 (2010).
4. Matsubara, J., Honda, K., Ono, M., Tanaka, Y. N., Kobayashi, M., Jung, G., Yanagisawa, K., Sakuma, T., Nakamori,

- S., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Tsuchida, A., Shimahara, M., Yasunami, Y., Chiba, T., Hirohashi, S., and Yamada, T. Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 160-71 (2011).
5. Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Futamura, M., Miyamoto, T., Yoshida, M., Ono, M., Ichinose, S., and Arakawa, H. Possible Existence of Lysosome-Like Organella within Mitochondria and Its Role in Mitochondrial Quality Control. *PLoS ONE* **6**, e16054 (2011).
 6. Murakoshi, Y., Honda, K., Sasazuki, S., Ono, M., Negishi, A., Matsubara, J., Sakuma, T., Kuwabara, H., Nakamori, S., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Shimahara, M., Yasunami, Y., Ino, Y., Tsuchida, A., Aoki, T., Tsugane, S., and Yamada, T. Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci.* **102**, 630-8 (2011).
 7. Ito, H., Honda, K., Satow, R., Arai, E., Shitashige, M., Ono, M., Sakuma, T., Sakano, S., Naito, K., Matsuyama, H., Yamada, T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. *Jpn J Clin Oncol.* **41**, 847-53 (2011).
 8. Matsubara, J., Honda, K., Ono, M., Sekine, S., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Sakuma, T., Nakamori, S., Sata, N., Nagai, H., Ioka, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Tsuchida, A., Shimahara, M., Yasunami, Y., Chiba, T., Yamada, T. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 2195-203 (2011).
 9. Yokomizo, A., Takakura, M., Kanai, Y., Sakuma, T., Matsubara, J., Honda, K., Naito, S., Yamada, T., Ono, M. Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Biomark* **10**, 175-83 (2012).
 10. Miyamoto, T., Kitamura, N., Ono, M., Nakamura, Y., Yoshida, M., Kamino, H., Murai, R., Yamada, T., Arakawa, H. Identification of 14-3-3gamma as a MIEAP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Sci Rep* **2**, 379 (2012).
 11. Ono, M., Kamita, M., Murakoshi, Y., Matsubara, J., Honda, K., Miho, B., Sakuma, T., Yamada, T. Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL: 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Int J Proteomics* **2012**, Article ID 897412 (2012).
 12. 尾野雅哉、紙田正博、松原淳一、村越雄介、山田哲司. プロテオミクス解析システム 2DICALを用いたがんバイオマーカー開発. *細胞* **44**, 46-49 (2012).
 13. Fukawa, T., Ono, M., Matsuo, T., Uehara, H., Miki, T., Nakamura, Y., Kanayama, H., Katagiri, T. DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas. *Cancer Res* **72**, 5867-77 (2012).
 14. Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y.,

- Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Imada, K., Oda, Y., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S., Ono, M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol* **2012**, Article ID 768190 (2012).
15. 尾野雅哉、紙田正博、松原淳一、山田哲司. プロテオーム解析によるがん診断と治療への道. *分子消化器病* **9**, 71-6 (2012).
 16. Nakano, T., Matsushima-Hibiya, Y., Yamamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Fukuda, H., Ono, M., Takamura-Enya, T., Kinashi, H., Totsuka, Y. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon* **63**, 55-63 (2013).
 17. Honda, K., Ono, M., Shitashige, M., Masuda, M., Kamita, M., Miura, N., Yamada, T. Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine *Jpn J Clin Oncol* **43**, 103-9 (2013).
 18. Yoneyama, T., Ohtsuki, S., Ono M., Ohmine, K., Uchida, Y., Yamada, T., Tachikawa, M., Terasaki, T. Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J Proteome Res* **12**, 753-62 (2013).
2. 尾野雅哉、松原淳一、本田一文、山田哲司: 血漿・血清プロテオミクス解析による診断、副作用、予後マーカーの開発, 小田吉哉, 長野光司 編: 創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析. 東京, 羊土社, pp90-96, 2010
 3. 尾野雅哉: 腫瘍マーカー温故知新, 丸義朗編: *がん転移 臨床と研究の羅針盤*. 東京, 学研メディカル秀潤社, pp22-26, 2010
 4. 山田哲司, 尾野雅哉, 本田一文: *がん (腫瘍) マーカー*, 渋谷正史, 湯浅保仁 編: *がん生物学イラストレイテッド*. 東京, 羊土社, pp 318-324, 2011
 5. 尾野雅哉、松原淳一、山田哲司: 血漿を用いた膵癌早期マーカー探索, 中村和行, 西尾和人, 西村俊秀 編: *臨床プロテオミクス, バイオマーカー探索から個別化医療へ*. 東京, 金原出版, pp338-340, 2012.

F-2. 書籍

1. 尾野雅哉、松原淳一、根岸綾子、山田哲司: 2DICALを用いた疾患バイオマーカー探索, 中山敬一, 松本雅記 監修: *細胞工学別冊 明日を拓く新次元プロテオミクス*. 東京, 学研メディカル秀潤社, pp122-130, 2009.

F-3. 学会発表

1. 尾野雅哉、紙田正博、五十嵐文子、山田哲司: 2DICALによる定量プロテオミクス日本プロテオーム学会 2011 年大会、シンポジウム 6 定量プロテオミクス、平成 23 年 7 月 29 日 (朱鷺メッセ、新潟市)
2. 紙田正博、五十嵐文子、きょう建生、酒井義人、伊藤研悠、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 2011 年大会平成 23 年 7 月 28, 29 日 (朱鷺メッセ、新潟市)
3. 尾野雅哉: 2DICALを用いた疾患関連蛋白質の探索法と臨床研究への応用第 15 回薬物動態談話会セミナー平成 23 年 8 月 25 日 (ホテルコスモスクエア国際交流センター、大阪市)
4. 尾野雅哉: プロテオームを活用した最先端がん研究第 10 期第 2 回バイオファインンスギルドセミナー平成 23 年 9 月 9 日 (バイオフロンティアパートナーズ特別講堂、東京都)

5. Ono M, Kamita M, Ikarashi A, Negishi A, Matsubara J, Yamada T.: Identifying new therapeutic The discovery of molecular targets for cancer diagnosis and therapy by a proteome platform - 2DICAL.第 70 回日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 5 日(名古屋国際会議場、名古屋市)
6. Yamada T, Honda K, Masuda M, Shitashige M, Ono M.:Identifying new therapeutic targets for personalized medicine.第 70 回日本癌学会学術総会平成 23 年 10 月 5 日(名古屋国際会議場、名古屋市)
7. 尾野雅哉: 2DICALによる新規がんマーカー探索第 11 回バイオメディカル研究会平成 23 年 10 月 28 日(都市活力研究所、大阪市)
8. 尾野雅哉: プロテオーム解析技術 2DICALを用いた新規がん診断・治療法の開発 神戸大学大学院グローバルCOE 平成 23 年度神戸大学大学院先端医学シリーズ 平成 23 年 10 月 31 日(神戸大学大学院医学研究科、神戸市)
9. Shitashige M, Honda K, Masuda M, Ono M, Yamada T.: Targeting the WNT signaling pathway France–Japan Symposium on Cancer Research 2011 平成 23 年 11 月 1 日(フランス大使館、東京都)
10. 尾野雅哉: プロテオーム解析技術 「2DICAL」を基盤とした質量分析計による新しいがん診断・治療法の開発メタボロミクス/プロテオミクスセミナー平成 23 年 11 月 8 日(千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市)
11. 尾野雅哉: プロテオーム解析技術 「2DICAL」を基盤とした質量分析計による新しいがん診断・治療法の開発メタボロミクス/プロテオミクスセミナー平成 23 年 11 月 10 日(ホテルラフォーレ東京、東京都)
12. Sakuma T, Ono M, Kuwabara H, Banno M, Kamita M, Yamada T: Wonder 3: A new computer algorithm for modified protein identification utilizing MS3 multi-tandem mass spectrum. 60th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics平成 24 年 5 月 22 日 (Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada).
13. 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)
14. 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)
15. 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).
16. 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)
17. 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)