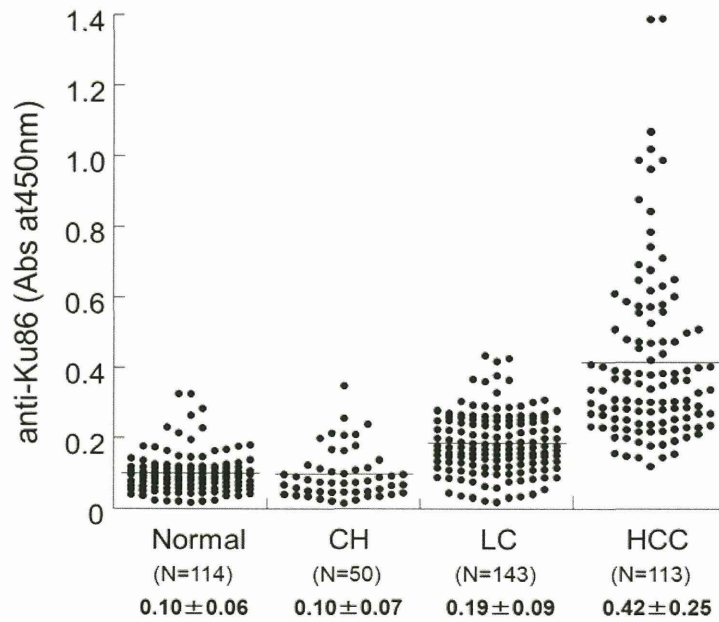
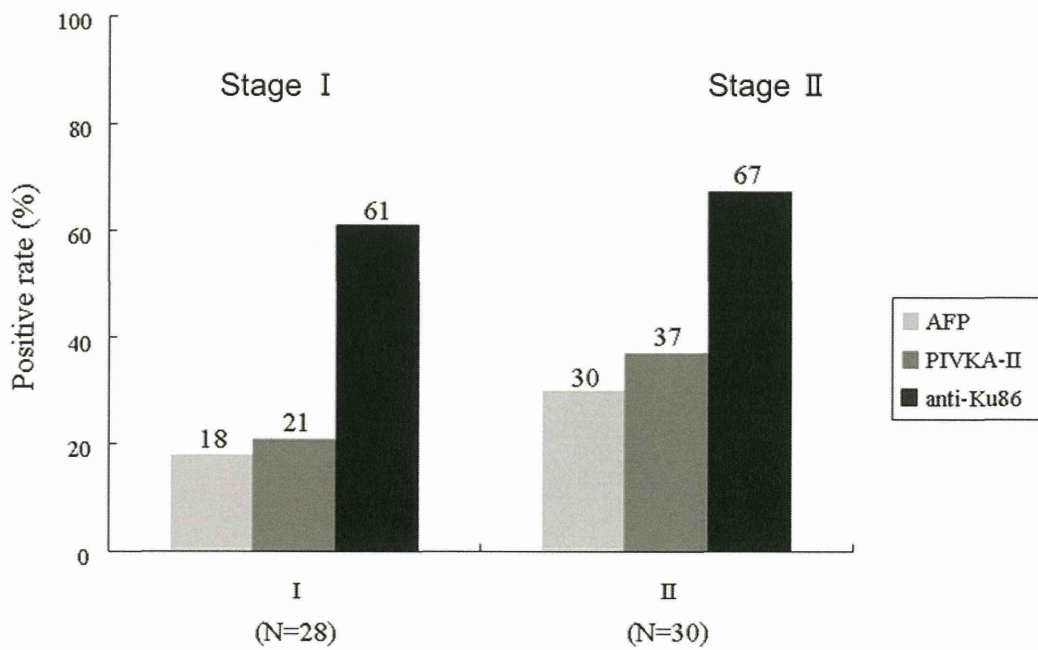


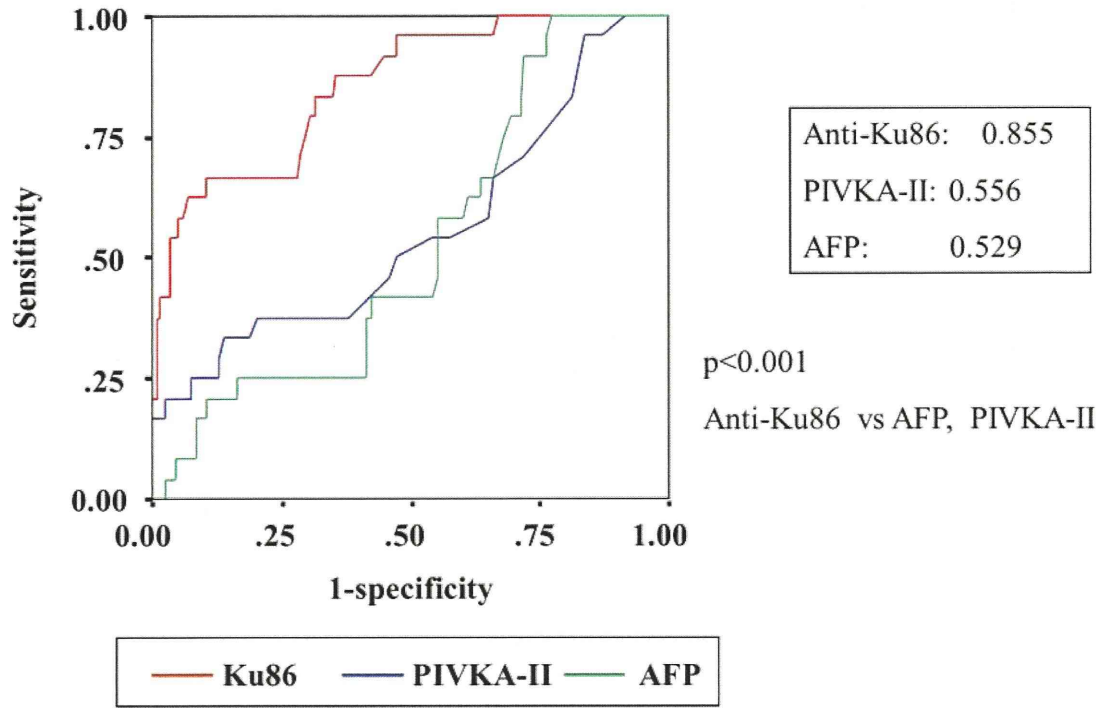
8.



9A.



9B.



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-

研究分担者 荒木令江 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

研究要旨

脳神経系腫瘍の薬剤治療標的となりうるバイオマーカーを検索するため、病態組織細胞サンプルを用いた統合プロテオミクスの方法論確立を試みた。分子発現差異解析法である iTRAQ (8Plex) 法、2D-DIGE 法、および DNA array を融合的に用いて同一サンプル群を同時に解析し、得られたすべての情報を統合マイニングすることによって、病態において異常に制御されたシグナル伝達経路を特異的に抽出する方法論を検討した。全てのデータを統合マイニングし、重要分子シグナル群を抽出するための統合マイニング解析プログラム[MANGO(2009 MCP), iPEACH(2013 MCP), 国際特許 PCT/JP2011/58366]を考案し、さらに抽出重要分子群の迅速検証法、siRNA、阻害剤、活性化剤等を用いた生物学的機能解析法、全自動 2 次元電気泳動排出転写装置の開発による迅速検証法の確立などを検討することによって、スタンダードとなりうる一連の統合的方法論の開発を行った。特に悪性グリオーマの薬剤感受性、グリオーマ幹細胞 (GSC) および NF1 病態モデル神経幹細胞の維持と分化に関わる分子群の解析、および検証に応用し、新規の治療ターゲットとして、Vimentin transcriptional activation loop (Nature Med under revision)、GSC-differentiation niche (PLoS ONE 2013 in press)、NF1-Dynein-GR-COX-1 signal (Mol Cell Proteomics 2013)を見出した。又、如何に融合技術によって大量に得られたプロテオームデータを迅速に処理し、重要機能分子群を抽出して検証する方法論が重要かつ有用であるか、創薬の観点から考察した。これらの方法論はすべての疾患・病態の解析はもとより、細胞生物学における基礎的な分子メカニズム情報を得るためのアプローチにも応用でき、蓄積されたデータベースを活用することによって、新しい病態メカニズムの解明や診断や治療のマーカー・創薬開発に重要な基礎情報を得る方法論として有用であると考えられる。

A. 研究目的

病態サンプルを用いて、病態マーカーや創薬の標的となる細胞内異常シグナルネットワークを検索するには、ゲノム解析や mRNA 発現解析、タンパク質の発現解析や特異的翻訳後修飾／相互作用解析などの様々な分子解析結果を統合的に総合評価する事によってはじめて可能となると考えられる。しかし、これらの解析方法論は元来個々に確立されているため、出力されるデータの言語やフォーマットや表示の概念がそれぞれ異なっており、これらを融合して統合的に評価することは現状では困難で

ある。すなわち、複数の装置によって異なる概念で解析を行い、病態組織細胞内においての異常活性を示すタンパク質ネットワークや翻訳後修飾、細胞内タンパク質の相互作用機能等の多くの情報を得たとしても、それを有機的に結びつけて解釈することが簡単にできないのが現状である。そこで本研究では、病態関連分子解析を効率的に進めることができる統合マイニング解析プログラムの考案および、独自開発の全自動 2 次元電気泳動装置を用いた Western Blotting 法 (Auto2D-WB) による迅速検証法の最適化を試み、腫瘍組織細胞の機能

分子メカニズム解析、バイオマーカー検索等に
応用可能かを検討した。

解析対象サンプルとして、まず、ヒト悪性グ
リオーマである退形成乏突起神経膠腫
(anaplastic oligodendroglioma/ astrocytoma:
AO/AOA) に焦点をあてた。悪性グリオーマに
おいて唯一化学療法に感受性を示す 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せず、早期において患者
の化学療法感受性を見極めるマーカーや治療
ターゲットの開発は早急に取り組むべき重要
な課題として近年注目されている。これまでに
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
ないため、今回融合プロテオミクスによる本腫
瘍例の化学療法感受性マーカーおよび耐性メ
カニズムの解析を試みた。次に、悪性グリオ
ーマの薬剤耐性と再発解明の鍵となるグリオ
ーマ幹細胞(GIC)に注目し、グリオーマ幹細胞様
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る治療ターゲット分
子群の解析に応用した。グリオーマ患者組織よ
り単離した GIC の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る検証を行った。
更に、悪性グリオーマの活性化シグナルの中心
的存在である RAS の制御分子である神経線維
腫原因遺伝子 NF1 の欠損神経系細胞を用い
て NF1 病態モデルを作成し、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
出することを試みた。

本研究において、プロテオミクスの融合的ア
プローチ、すなわち同一サンプルの iTRAQ お
よび 2D-DIGE によるプロテオーム解析データ、
および DNA array によるトランスクリプト
ーム解析データのすべてを統合し、統合的マイニ

ングによる解析方法論の確立と、臨床サンプル
および病態モデルへの応用、さらにこれらの検
証法も含めてトータルのシステムとして検討
を行った。解析応用例として、ヒト悪性グリオ
ーマ腫瘍組織細胞に注目し、これらの細胞内で
活性化しているシグナル分子カスケードを
抽出し、関わる分子群の翻訳後修飾を含むい
かなる発現変動と構造変化がグリオーマの悪
性化に関与するかを明らかにすること、即ち、
悪性腫瘍の薬剤耐性メカニズム、がん幹細胞の
分子メカニズム、RAS 制御因子 NF1 の関わる
神経系腫瘍化メカニズムを解明することを目標
とした。さらに、これらの統合的な解析によ
って、病態の治療方針や予後予測をより正しく
診断するための臨床マーカーや、有効な治療
薬を開発するための基礎情報をデータベース化
することを目標にして研究を行った。

B. 研究方法

質量分析を用いた解析には、複数の高感度
タンデム質量分析器 (nano ESI-QqTOF:
QStarElite, QstarPulsari, TripleTOF5600,
MALDI-TOF-TOF:4700,5800, nano ESI-
ionTrapQQQ:4000QTRAP, AB Sciex)、および
付随する nano レベルのクロマトグラフィー装
置 (nanoLC:Ultimate 3000,Dionex, DiNa,
MaL,KYA)、解析ソフト群 (ProteinPilot,
MASCOT, Analyst QS,MRM/MRM pilot,
quant,scheduled, GPS, Progenesis, Decyder,
GeneSpringsGP, MANGO, iPEACH 等) を用
いた。高感度タンデム質量分析器 nanoLC-
ESI-QqTOF、nanoLC-MALDI-TOF-TOF は網
羅的なペプチドの高感度検出および比較定量
/同定用に、さらに nanoLC-ESI-ionTrapQQQ
(QTRAP4000 Applied Biosystems)は高感度
定量用に、それぞれ融合的に組み合わせて使用
した。

高感度同時比較定量解析法として、
iTRAQ(isobaric Tagging for Relative and
Absolute Quantitation)法および検証用に
MRM(Multiple Reaction Monitoring)法を用
いた。又、リン酸化および proteolysis などの

翻訳後修飾発現差異解析に関しては、ProQ-Diamondによる染色法を併用した2D-DIGE法を用いた。mRNA発現解析は、DNA chip (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, affimetrix)を用いた。

検証法の一つとして、独自に開発を行った全自動2次元電気泳動装置を用いたWestern Blotting法 (Auto2D-WB)を用いて、複数個のマーカー分子の同時迅速検出法の最適化を検討した。

生体サンプルとして、ヒトグリオーマ培養細胞 (U373, U251, A172, U81G)、ヒト腫瘍組織として、Anaplastic oligodendroglioma/astrocytoma (AO/AOA), glioblastoma multiform (GBM) 合計80検体を用いた。ヒト組織は術場にて摘出後、迅速に液体窒素で凍結し保存したものをを用いた。各組織は病理学的観察からその病態を判定するとともに、解析する組織が腫瘍組織の中心部のみであることを確認した。又、FISHを用いて1p, 19qLOHの有無を全てのサンプルに関して解析した。がん幹細胞として、11人の患者由来GBM組織より分離した9つの幹細胞様クローンから、動物移植にて早期に悪性グリオーマを発症するグリオーマ幹細胞GIC03A、GIC03U、GIC07Uを樹立し、又、siRNAによるNF1発現を抑制したNF1病態モデルPC12細胞とコントロール細胞を用いて、FCSまたはNGFによる分化誘導後、経時的にサンプルを調製した。同一のサンプルを同時にタンパク質(iTRAQ、2D-DIGE)とmRNA (DNA array)用に抽出調製して解析に用いた。まず学習セットを選択し全ての解析データをiPEACH(特願2010-81524)を用いて統合し、GO解析GeneSpring GX (Agilent Technologies), ネットワーク解析KeyMolnet (医薬分子設計研究所)を用いた機能解析を行い、抽出された特異的活性化シグナル分子群に対して、各抗体を用いて1D/2D-Western Blotting法、組織免疫染色法、各分子に対するsiRNAおよび阻害剤処理による細胞の抗がん剤 (Temozolomide : TMZ, ACNU, CCNU, Procarbazine, Vincristine等)

の感受性の変化をWST法にて検討した。又、移植によるマウス動物実験には、NOD-scidマウスを用いた。

(倫理面の配慮)

本研究では臨床サンプル(腫瘍組織)よりgenomic DNA、mRNA、タンパク質を抽出し、ゲノム/トランスクリプトーム/プロテオーム解析を検討することから、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究倫理指針」に基づき、熊本大学医学部ヒト遺伝子研究倫理審査委員会の承認を受けている(悪性脳腫瘍の病態解明とそれに基づく治療体系の確立:ゲノム110号、平成22年改訂)。ガイドラインに従い、採取された患者の組織サンプル、遺伝子解析情報を含めすべての検査結果について守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定されない方法でのみ行うことを遵守している。本研究で採取される組織は、治療上必要不可欠な外科的手術によるもののみであり、患者に不利益及び危険性は伴わない。動物実験においては、熊本大学動物実験倫理則に基づいた計画書の承認を得ており、苦痛を伴う実験には極力必要最低数の動物数にて対応し、生存率の測定には頻繁な観察と直前の安楽死によって対応した。

C. 研究結果

統合プロテオミクス解析の概略を図に示す(Fig.1)。

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:PI3-11のデータおよびPI4-7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(特願 2010-81525)。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 (Fig.2)。

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化しつつある。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 2 D-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

i) 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相関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 の化学治療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

進んでいる分子群 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、LOH+U87MG 細胞及び A172 細胞を用いて WB 解析を行った結果、TKRE4 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 TKRE4 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 (Fig.3)。

ii) 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(GIC)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 (Fig.4)。

iii) 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(テータ統合マニック・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 Protein T、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、神経突起伸長障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 (Fig.5)。

D. 考察

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。

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。

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3864分子、発現低下2513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3,198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つ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-Protein T-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。

E. 結論

本研究では、プロテオミクスの高感度かつ high throughput な新技術の融合的アプローチによるプロテオーム解析データ、およびDNAアレイによるトランスクリプトーム解析データを統合するアルゴリズム (iTPEACH/MANGO)を開発することによって、腫瘍組織細胞内で活性化しているシグナル分子群が有効に抽出できることを証明した。又、全自動2次元電気泳動装置を用いたD-western blottingによる検証法を最適化し、翻訳後修飾やスプライシング変化が高感度・迅速に再現性高く詳細に解析できることを示した。本方法論による解析例として、i) 悪性グリオーマの抗がん剤感受性に関わる分子シグナル解析では、Vimentinとその翻訳後修飾に関わる責任酵素群、およびその活性化シグナル分子群による新規のTyrosine Kinase receptor-Vimentin activation loopが抽出され、siRNAおよび阻害剤、活性化剤等の検証実験の結果、これに関わる分子群の発現変動と構造変化が悪性グリオーマの治療抵抗性に大きく関わっていることを明らかにした。ii) ヒトグリオーマ幹細胞GICクローンの血清による分化誘導モデルを用いた解析からは、分化誘導にて変動する分子リストからECM、接着/細胞間コミュニケーション、および細胞膜に関連する分子群を抽出し、細胞および動物を用いた検証実験により、インテグリン α VとFNの発現と相互作用がGICの早期分化に重要であること、これらの阻害剤がGICの分化抑制に有用であり抗がん剤との併用でGICの薬剤耐性を感受性に転ずることが可能であることを示し、GICは自らインテグリンとECMの発現を介して分化を制御する微小環境“分化ニッチ”を形成することを提唱した。iii) NF1病態モデル神経幹細胞の分化異常に関わる分子群の解析では、経時的に分子ネットワークの変動を融合データより抽出した結果、NF1-RAS-MAPK/PI3K-Protein T-mTOR活性化シグナルおよび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検出された。siRNAや阻害剤処理による検証実験から、Protein T

は mTOR 経路の上流分子として Neuro-fibroma 関連腫瘍に優先的に発現する NF1 欠損病態の悪性化マーカーと治療ターゲットとしての可能性を提唱した。又、Dynein IC2-GR-COX-1 シグナルに関しては、NF1 欠損神経幹細胞内において、Dynein IC2-B から IC2-C へのスプライシングとリン酸化の顕著な亢進が認められ、それによって 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、NF1 病態の新たな治療ターゲットとなる可能性を示した。

これらの実験の成功により、本方法論は脳腫瘍のみならず、すべての疾患・病態の解析はもとより、細胞生物学における基礎的な分子メカニズム情報を得るためのアプローチにも応用でき、蓄積されたデータベースを活用することによって、新しい病態メカニズムの解明や診断や治療のマーカー・創薬開発に重要な基礎情報を得る方法論として有用であることが示唆された。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- Hirayama, M., Kobayashi, D., Mizuguchi, S., Morikawa, T., Nagayama, M., Wilson, MM., Nambu, NA., Yoshizawa, A., Kawano, S. & Araki, N. Integrated proteomics identified a novel activation signaling of dynein IC2-GR-COX-1 in NF1 disease model cells. *Mol. Cell. Proteomics* **2**(5), 1377-94 (2013).
- Nambu, NA., Midorikawa, U., Mizuguchi, S., Hide, T., Nagai, M., Komohara, Y., Nagayama, M., Hirayama, M., Kobayashi, D., Tsubota, N., Takezaki, T., Makino, K., Nakamura, H., Takeya, M., Kuratsu, J. & Araki, N. Glioma initiating cells form a differentiation niche via the induction of extracellular matrices and integrin alpha V. *PLOS ONE*, in press (2013).
- Shimada, H., Nambu-Niibori, A., Wilson-Morifuji, M., Mizuguchi, S., Araki, N., Mezaki, Y., Senoo, H., Ishikawa, K., Okamoto, O. & Fujiwara, S. Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of three-dimensional cell clusters. *J. Dermatol.* **40**(4), 249-58 (2013).
- Nitta, H., Wada, Y., Kawano, Y., Murakami, Y., Irie, A., Taniguchi, K., Kikuchi, K., Yamada, G., Suzuki, K., Honda, J., Wilson, MM., Araki, N., Eto, M., Baba, H. & Imamura, T. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88). *Clin. Cancer Res.* **19**(8), 1-10 (2013).
- Irie, A., Harada, K., Araki, N. & Nishimura, Y. Phosphorylation by PKD2 at Ser171 of SET reduced its inhibitory effect on PP2A phosphatase in T cells. *PLOS ONE* **7**(12):e51242 (2012).
- Sawanyawisuth, K., Wongkham, C., Riggins, GJ., Wongkham, S. & Araki, N. Possible involvement of cyclophilin a processing in fumagillin-induced suppression of cholangiocarcinoma cell proliferation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, Suppl 137-41 (2012).
- Sawanyawisuth, K., Wongkham, C., Araki, N., Zhao, Q., Riggins, GJ. & Wongkham, S. Serial analysis of gene expression reveals promising therapeutic targets for liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, Suppl:89-93 (2012).
- Khaenam, P., Niibori, A., Okada, S., Jearanaikoon, P., Araki, N. & Limpai boon, T. Contribution of RIZ1 to regulation of proliferation and migration of a liver fluke-related cholangiocarcinoma cell. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**(8), 4007-11

- (2012).
9. 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 (2012).
 10. Silsirivanit, A., Araki, N., Pairojkul, C., Wongkham, C., Narimatsu, H., Kuwahara, K., Wongkham, S. & Sakaguchi, N. A novel serum carbohydrate marker on MUC5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer* **117**(15),3393-403 (2011).
 11. Esaki, K., Terashima, Y., Toda, E., Yoshinaga, S., Araki, N., Matsushima, K. & Terasawa, H. Expression and purification of human FROUNT, a common cytosolic regulator of CCR2 and CCR5. *Protein Expression and Purification.* **77**(1), 86-91 (2011).
 12. Nambu, T., Araki, N. Nakagawa, A., Kuniyasu, A., Kawaguchi, T., Hamada, A. & Saito, H. The contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Cancer Sci.* **101**(1), 137-42 (2010).
 13. Kobayashi, D., Kumagai, J., Morikawa, T., Wilson, M.M., Wilson, A., Irie, A. & Araki, N. An integrated approach of differential Mass Spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival. *Mol. Cell. Proteomics* **8**(10), 2350-67 (2009).
 14. Wongkham, S., Junking, M., Wongkham, C., Sripa, B., Churin, S., & Araki, N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke associated cholangio-carcinoma. *Cancer Sci.* **2009**, **38**(3):249-61 (2009).
 15. Ihara, T., Ishii, T., Araki, N., Wilson, A. & Jyo, A. Silver ion unusually stabilizes the structure of parallel-motif DNA triplex. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(11), 3826-7 (2009).
 16. Motoyama, K., Kameyama, K., Onodera, R., Araki, N., Hirayama, F., Uekama, K. & Arima, H. Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl- α -cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **38**(3), 249-61 (2009).
- F-2. 書籍
1. 荒木令江: 神経線維腫症2型、『皮膚科臨床アセット15』, 金田眞理 編集、中山書店、印刷中、2013年
 2. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる病態メカニズムの解析『創薬のためのタンパク質・プロテオミクス解析』小田吉哉・長野光司 編集 羊土社、東京、2010年 pp182-190
- F-3. 学会発表
1. 荒木令江、南部（新堀）晶子、緑川宇一、水口惣平、小林大樹、平山未央、菰原義弘、秀拓一郎、竹屋元裕、倉津純一: 融合プロテオミクスによるがん幹細胞の分化誘導メカニズムの解析: 日本プロテーム学会 2012年大会日本プロテオーム機構（東京）平成 24年 7月 26日～27日
 2. 小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウィルソン-森藤政代、尹浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江: 融合プロテオミクスによる新規神経線維腫瘍症 I 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、治療標的としての機能解析日本プロテーム学会 2012年大会日

本プロテオーム機構（東京）平成 24 年 7 月 26 日～27 日

3. Araki N, Mizugushi S, Morikawa T, kawano S, Yamaguchi A, Kobayashi D, Hirayama M, Midorikawa U, Nakamura H, Kuratsu J: An integrated proteomics by iPEACH, a new application, identified novel activated signal cascades in chemotherapy resistant malignant gliomas. HUP0 11th Annual World Congress (Boston,US),9-13 September 2012.
4. Kobayashi D, Hirayama M, Komohara Y, Mizuguchi S, Wilson-morifuji M, Ihn h, Takeya M, Kuramochi A, Araki N: Integrated proteomics identified translationally controlled tumor protein as a biological target for neurofibroma and malignant peripheral nerve sheath tumors. HUP0 11th Annual World Congress (Boston,US), 9-13 September 2012.
5. Hirayama M, Kobayashi D, Morikawa T, Nagayama M, Mizuguchi S, Araki N: Analysis of abnormal cellular signals via silencing of NF1 tumor suppressor protein in neuronal cells by integrated proteomics. HUP0 11th Annual World Congress (Boston,US), 9-13 September 2012.
6. 荒木令江、水口惣平、森川 崇、坪田誠之、小林大樹、平山未央、緑川宇一、中村英夫、倉津純一: 融合プロテオミクスによるグリオーマの化学治療予後予測分子ネットワークの解析第 70 回日本癌学会学術総会（札幌）平成 24 年 9 月 19 日～21 日
7. 森藤政代、新堀晶子、水口惣平、小林大樹、荒木令江: ヒト舌癌における HIF-1 α を介した高転移性がん細胞の増殖機構の解析第 70 回日本癌学会学術総会（札幌）平成 24 年 9 月 19 日～21 日
8. 荒木令江: 薬学における融合オミクス解析
- 融合プロテオミクスによる癌の病態システムズバイオロジー、招待講演 生命医薬情報学連合大会 2012 (2012 年日本バイオインフォマティクス学会年会 情報計算化学生物学会 (CBI学会) 年次大会オミクス医療研究会年会) (東京) 平成 24 年 10 月 16 日
9. 荒木令江: プロテオミクスを基盤とした癌のシステムズバイオロジー、和歌山県立医科大学特別公演 (和歌山) 平成 24 年 10 月 19 日
10. 荒木令江: 翻訳後の分子間相互作用をとらえる新しいタンパク質解析技術～融合プロテオミクスによる病態シグナルの検出と創薬への挑戦シンポジウム招待講演新薬理セミナー2012 (熊本) 平成 24 年 11 月 24 日
11. 荒木令江、南部 (新堀) 晶子、緑川宇一、永井美奈子、小林大樹、水口惣平、秀拓一郎、中村英夫、菰原義弘、竹屋元裕、倉津純一: 融合プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞の分化誘導ニッチの解析 第 84 回日本生化学会大会 (福岡) 平成 24 年 12 月 14 日～16 日
12. 小林大樹、平山未央、菰原義弘、水口惣平、ウィルソン森藤政代、尹 浩信、竹屋元裕、倉持朗、荒木令江: 融合プロテオミクスによる新規神経線維腫症 1 型 (NF1) 関連因子 TCTP の同定と、その NF1 腫瘍における機能解析第 84 回日本生化学会大会 (福岡) 平成 24 年 12 月 14 日～16 日
13. 西村宗徳、緑川宇一、長山 慈、小林大樹、平山未央、廣田由夏、村上洋嗣、和田孝浩、今村隆寿、直江秀昭、佐々木裕、鶴沼 豊、荒木令江: 全自動 2 次元電気泳道装置を用いた腫瘍マーカータンパク質の解析第 84 回日本生化学会大会 (福岡) 平成 24 年 12 月 14 日～16 日
14. 山口浩、小林大樹、荒木令江: 腫瘍細胞内ピメンチンの翻訳後修飾およびフラグメント化とその機能解析第 84 回日本生化学会大会 (福岡) 平成 24 年 12 月 14 日～16 日
15. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる癌特

- 異的分子の統合的解析荒木令江 産業総合技術研究所セミナー（つくば）平成 25 年 3 月 28 日
16. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる神経系腫瘍の発症メカニズムの解析日本生理学会（盛岡）2010 年 5 月 19 日～21 日
 17. Norie Araki, Souhei Mizuguchi, Takashi Morikawa, Daiki Kobayashi, Masayuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Akiko Niibori, Anthony Wilson, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu: Analysis of cellular signals activated in the tumor tissue related to chemotherapy sensitivity by Integrated Proteomics. 日本ヒトプロテオーム機構 第 8 回大会JHUPO（東京）2010 年 7 月 26 日～27 日
 18. 小林大樹、平山未央、森川崇、水口惣平、長山慈、ウィルソン森藤政代、荒木令江: 統合プロテオミクスによる新規な神経系疾患関連分子群の同定と機能解析日本ヒトプロテオーム機構 第 8 回大会JHUPO（東京）2010 年 7 月 26 日～27 日
 19. 水口惣平、森川崇、坪田誠之、緑川宇一、小林大樹、中村英夫、倉津純一、荒木令江: バイオインフォマティクスと統合プロテオミクスの手法を用いた病態組織細胞内の活性化分子ネットワークの解析日本ヒトプロテオーム機構 第 8 回大会JHUPO（東京）2010 年 7 月 26 日～27 日
 20. 荒木令江: 腫瘍医学教育における最先端基礎研究概念の導入の必要性と展望 42 回日本医学教育学会大会（東京）2010 年 7 月 31 日 38.
 21. A quick cancer proteome validation system by a fully automated 2DE-western blotting device Norie Araki HUP02010 (Human Proteome World Congress Sydney 2010) Sydney, Australia, 19-23 September 2010.
 22. Souhei Mizuguti, Takashi Morikawa, Nobuyuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Akiko Niibori, Daiki Kobayashi, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu, Norie Araki: Integrated proteomics of brain tumor cell signals related to chemotherapy sensitivity. HUP02010 (Human Proteome World Congress Sydney 2010) Sydney, Australia, 19-23 September 2010.
 23. Daiki Kobayashi, Jiro Kumagai, Takashi Morikawa, Mio Hirayama, Anthony Wilson, Masayo Wilson, Norie Araki: A proteomic integrated approach for targeting and elucidating the functions of novel proteins involved in neuronal differentiation and disorders HUP02010 (Human Proteome World Congress Sydney 2010) Sydney, Australia, 19-23 September 2010.
 24. 森藤政代、水口惣平、新堀晶子、小林大樹、森川崇、荒木令江: ヘテロな細胞集団における HIF シグナル伝達を介した転移性癌細胞の発育機構の解明第 69 回日本癌学会学術総会（大阪）2010 年 9 月 22 日～24 日
 25. 荒木令江: 統合プロテオミクスによる腫瘍細胞内活性化シグナル分子群の解析と創薬への応用 第 69 回日本癌学会学術総会ランチョンセミナー招待講演（平成 22 年 10 月 22 日～24 日 大阪）
 26. 荒木令江: 融合プロテオミクス解析による疾患原因タンパク質群の同定方法及び、薬剤効果検出方法 平成 22 年度 JST 九州横断新技術講演会（平成 22 年 12 月 14 日東京）
 27. 平山未央、小林大樹、森川崇、長山慈、緑川宇一、水口惣平、荒木令江: 融合プロテオミクスによる NF1 腫瘍抑制タンパク質の神経系細胞内発現抑制による異常シグナルの解析 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会（神戸）2010 年 12 月 7 日～10 日
 28. 緑川宇一、新堀晶子、水口惣平、新森加納子、丸尾祐二、鶴沼豊、中村眞、荒木令江: プロテオミクスによるグリオーマ幹細胞分化に関する特異的分子群のプロファイリング解析 第 33 回日本分子生物学会大会・第

- 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日
29. Souhei Mizuguti, Takashi Morikawa, Nobuyuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Akiko Niibori, Daiki Kobayashi, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu, Norie Araki: Integrated proteomics of cancer cellular activation signals related to chemotherapy sensitivity. 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日
30. Norie Araki, Uichi Midorikawa, Souhei Mizuguti, Hideki Kinoshita, Nobuyuki Tsubota, Takashi Morikawa, Daiki Kobayashi, Yuji Maruo, Makoto Nakamura: Development of a fully automated 2DE-western blotting system for quick validation and profiling cancer specific proteomes. 第 33 回日本分子生物学会大会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日
31. 荒木令江, 森川崇, 坪田誠之, 緑川宇一, 水口惣平, 小林大樹, 新堀晶子, 中村英夫, 倉津純一: 抗体カクテルと natural protein chip を用いた簡便な病態関連分子群解析法の開発 第 82 回日本生化学会 (神戸) 2009 年 10 月 21 日~24 日
32. 小林大樹, 平山未央, ウィルソン森藤政代, 水口惣平, 長山慈, 森川崇, 新堀晶子, 坪田誠之, 緑川宇一, 荒木令江: プロテオミクス手法による神経系細胞分化に関わる NF1 腫瘍抑制遺伝子関連タンパク質の同定とその役割 第 82 回日本生化学会 (神戸) 2009 年 10 月 21 日~24 日
33. 水口惣平, 森川崇, 坪田誠之, 緑川宇一, 長山慈, 小林大樹, ウィルソンアンソニー, ウィルソン森藤政代, 中村英夫, 倉津純一, 荒木令江: 統合プロテオミクスとバイオインフォマティクスの手法を用いた脳腫瘍の化学治療感受性に関する Vimentin を介した ネットワークの解析 第 82 回日本生化学会 (神戸) 2009 年 10 月 21 日~24 日
34. 南部 健, 濱田哲暢, 荒木令江, 齋藤秀之: A BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 contributes to imatinib-resistance in K562 Cells. (口頭発表) 第 82 回日本生化学会 (神戸) 2009 年 10 月 21 日~24 日
35. ウィルソン政代*, ウィルソンアンソニー, 田代康介, 小林大樹, 新堀晶子, 森川 崇, 荒木令江: A study of molecular mechanisms in heterogeneous cancer development using combined transcriptomic and proteomic analysis. トランスクリプトームとプロテオーム解析を用いた癌細胞ヘテロ集団の発育機構の解明 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2009 年 10 月 1 日~3 日
36. Takashi Morikawa, Nobuyuki Tsubota, Uichi Midorikawa, Daiki Kobayashi, Sohei Muzuguchi, Hideo Nakamura, Junichi Kuratsu, Norie Araki: An integrated proteomics for studying mechanism of chemo-resistance in gliomas. 融合プロテオミクスによるグリオーマの化学治療抵抗性メカニズムの解析 第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2009 年 10 月 1 日~3 日
37. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる疾患関連タンパク質群の解析(招待講演)日本生化学会近畿支部第 15 回支部シンポジウム (大阪) 2009 年 9 月 16 日
38. 小林大樹, 荒木令江: プロテオミクス手法による神経系細胞分化に関わる NF1 腫瘍抑制遺伝子関連タンパク質の同定とその役割 第 33 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (唐津市) 2009 年 9 月 10 日~12 日
39. 緑川宇一, 荒木令江: 全自動 2 次元電気泳動装置を用いた臨床サンプルの 2D- Western 解析 第 33 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (唐津市) 2009 年 9 月 10 日~12 日
40. 荒木令江融合プロテオミクスによるがん研究の最前線とその応用 (招待講演) 同仁化学

- 研究所特別講演会（熊本市）2009年9月1日
41. 森加納子, 鹿川 哲史, 森川 崇, 小林 大樹, 坪田 誠之, 緑川 宇一, 柏木 太一, 中尾 光善, 荒木令江, 田賀 哲也: 翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化の運命づけを司る核内分子の探索新日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO) (東京白金 北里大学) 2009年7月27~28日
42. 田中 毅, 木下 英樹, 緑川 宇一, 菅野 三奈子, 楠本 晃司, 松永 貴輝, 後藤 真一, 大木 博, 丸尾 祐二, 鶴沼 豊, 中村 眞, 荒木令江: 全自動2次元電気泳動-ブロッティングシステムの開発 日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO) (東京 北里大学) 2009年7月27~28日
43. 緑川宇一, 坪田 誠之, 森川 崇, 木下 英樹, 丸尾 祐二, 鶴沼 豊, 中村 眞, 荒木令江: 全自動2次元電気泳動装置を用いた臨床サンプルの2D-Western 解析 日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO) (東京 北里大学) 2009年7月27~28日
44. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる悪性腫瘍の化学療法耐性メカニズムの解析An integrated proteomics for studying mechanism of tumor cellular chemo-resistances. (シンポジウム)日本ヒトプロテオーム学会/日本ヒトプロテオーム機構第7回大会(JHUPO) (東京 北里大学) 2009年7月27~28日
45. 荒木令江:「生命のナゾ解きで病気を治す！」(女性研究者による講演会 招待講演)文部科学省女子中高生の理系進路選択支援事業 2009「サイエンス・プロジェクト for 九州ガールズ！」(熊本市熊本大学) 2009年6月26日
46. 荒木令江: 神経線維腫症1の分子病態 Molecular mechanisms related to cellular abnormality in Neurofibromatosis 1. (ワー
- クショップ「神経皮膚症候群研究の進歩」招待講演)第51回日本小児神経学会総会(米子市) 2009年5月28~30日
47. 森川 崇, 坪田 誠之, 緑川 宇一, 長山 慈, 小林大樹, Wilson Anthony, Wilson森藤政代, 中村 英夫, 倉津 純一, 森安 眞津子, 荒木令江: 退形成性乏突起膠腫 (AOG) における化学療法感受性に関連する蛋白質群の機能プロテオーム解析 第9回日本蛋白質科学会年会 (熊本市) 2009年5月20~22日
48. 荒木令江: 融合プロテオミクスによる細胞内疾患関連シグナルの解析 (招待講演)第9回日本蛋白質科学会年会 (熊本市) 2009年5月20~22日
49. Norie Araki: A standard framework of sequential proteomics for cancer research(Keynote Lecture) The 2nd BMB Conference: Biochemistry and Molecular Biology for Regional Sustainable Development (Khon Kaen, Thailand) May 7-8th, 2009.
50. 荒木令江: 最新プロテオーム解析技術の健康化学への応用 日本農芸化学会 2009年度大会(福岡市)2009年3月27日~29日
51. 荒木令江: プロテオミクスによる疾患メカニズム解析と治療標的分子検索への戦略大分大学 平成20年度先端医工学研究センターセミナー (大分県由布市 大分大学) 2009年1月23日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称：胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識するモノクローナル抗体
出願番号：特願 2009-025607
発明者：阪口薫雄、荒木令江、桑原一彦、坂本珠美
出願人：国立大学法人熊本大学、株式会社トランスジェニック
出願日：2009年2月6日出願
- 2) 発明の名称：胆管がん特異的糖鎖エピトープを認識するモノクローナル抗体

- 国際特許；PCT/JP2010-000708、
 発明者：阪口薫雄、荒木令江、桑原一彦
 出願人：国立大学法人熊本大学、
 出願日：2010年2月5日出願
- 3) 発明の名称：融合プロテオミクス解析による疾患原因タンパク質群の同定方法および薬剤効果検出方法、
 出願番号：特願 2010-81524、
 発明者：荒木令江、水口惣平、森川崇、小林大樹、倉津純一、
 出願人：国立大学法人熊本大学
 出願日：2010年3月31日出願、
- 4) 発明の名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法
 出願番号：特願 2010-81525
 発明者：荒木令江、水口惣平、森川 崇、小林大樹、
 出願人：国立大学法人熊本大学
 出願日：2010年3月31日出願
- 5) 発明の名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法
 出願番号：国際特許 PCT/JP2011/58366
 発明者：荒木令江、水口惣平、森川崇、坪田誠之、小林大樹、倉津純一、ウイルソン政代
 出願人：国立大学法人熊本大学
 出願日：2011年3月31日出願
- 6) 発明の名称：融合プロテオミクスによるNF1 特異的タンパク質の同定方法、NF1 特異的タンパク質発現抑制方法、および NF1 特異的タンパク質の腫瘍マーカーとしての使用方法
 出願番号：特願 2011-071110
 出願日：平成 23 年 3 月 28 日
 出願人：国立大学法人熊本大学
 発明者：荒木令江、小林大樹、水口惣平、平山未央
- 7) 発明の名称：融合プロテオミクスによる
- NF1 特異的タンパク質の同定方法、NF1 特異的タンパク質発現抑制方法、NF1 特異的タンパク質の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての使用方法
 出願番号：特願 2012-075242
 出願日：平成 24 年 3 月 28 日
 出願人：国立大学法人熊本大学
 発明者：荒木令江、小林大樹、水口惣平、平山未央
- 8) 発明の名称：統合プロテオミクス解析用データ群の生成方法及び同生成方法にて生成した統合プロテオミクス解析用データ群を用いる統合プロテオミクス解析方法、およびそれを用いた原因物質同定方法
 出願番号：特願 2012-509621
 発明者：荒木令江、水口惣平、森川崇、坪田誠之、小林大樹、倉津純一、ウイルソン政代
 出願人：国立大学法人熊本大学
 出願日：2012年9月11日出願
2. 実用新案登録
 なし
3. その他
 なし。
- H. 研究協力者**
 森川崇、坪田誠之、水口惣平、小林大樹、緑川宇一（熊本大学大学院生命科学研究部腫瘍医学分野）、中村英夫、倉津純一（同脳神経外科学分野）

Fig. 1, Strategy of the integrated proteomics

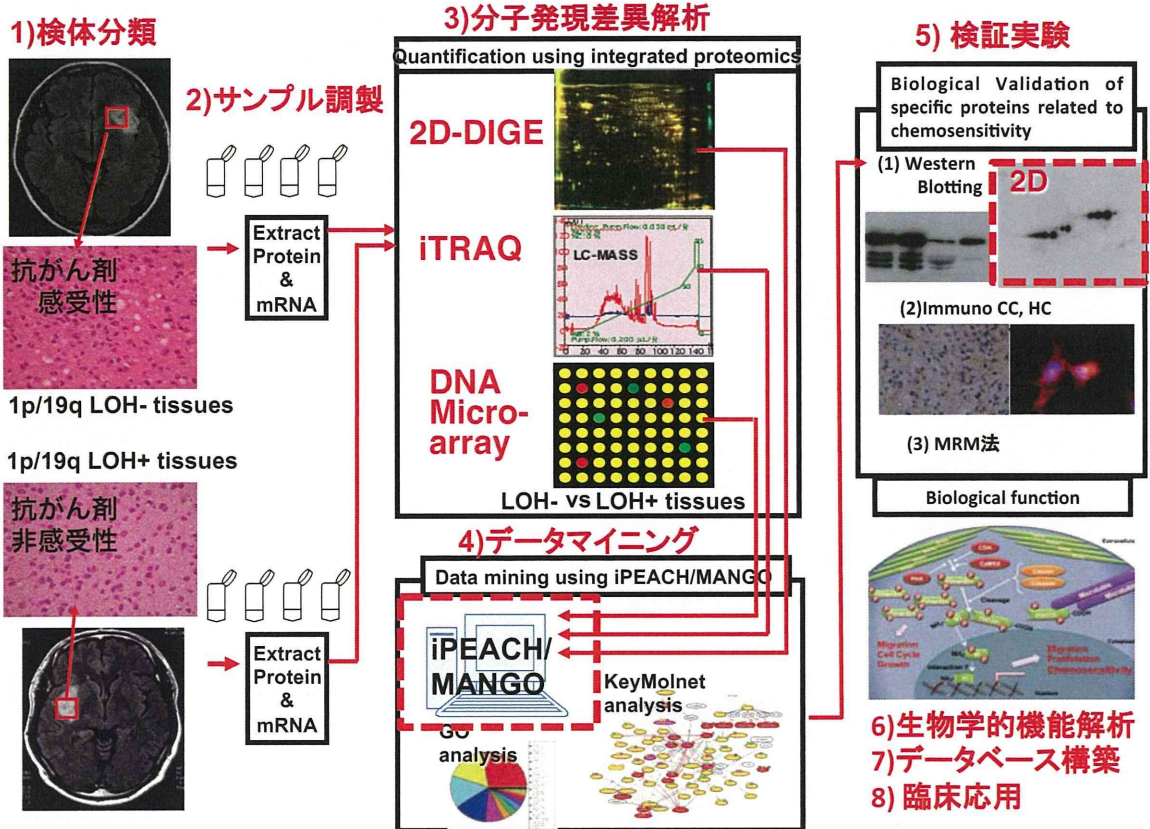


Fig. 2, The integrated proteomics data mining system by iPEACH and MANGO

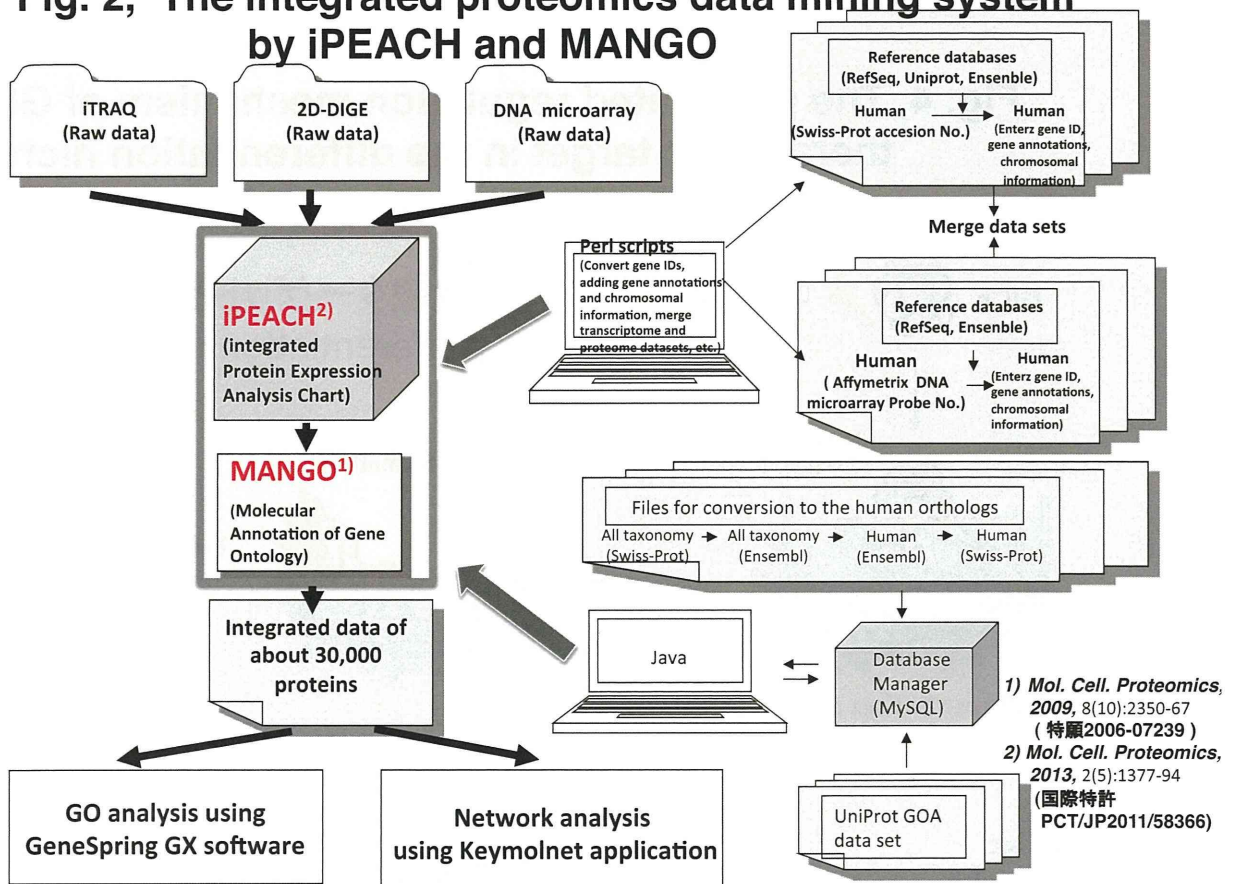
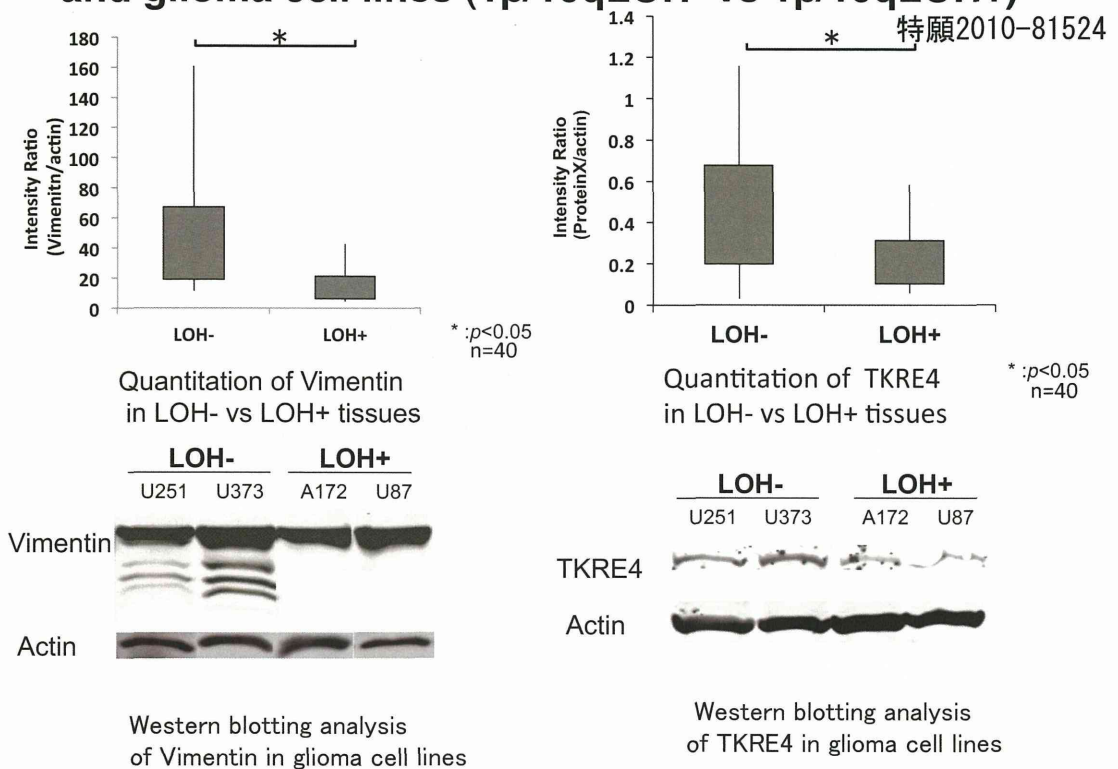


Fig. 3, Vimentin and TRKE4 expressions in AO/AOA tissues and glioma cell lines (1p/19qLOH- vs 1p/19qLOH+)



Nat Med under the revision 特願2010-81524

Fig. 4, The postulated regulation mechanism of GICs as a therapeutic target in the differentiation niche

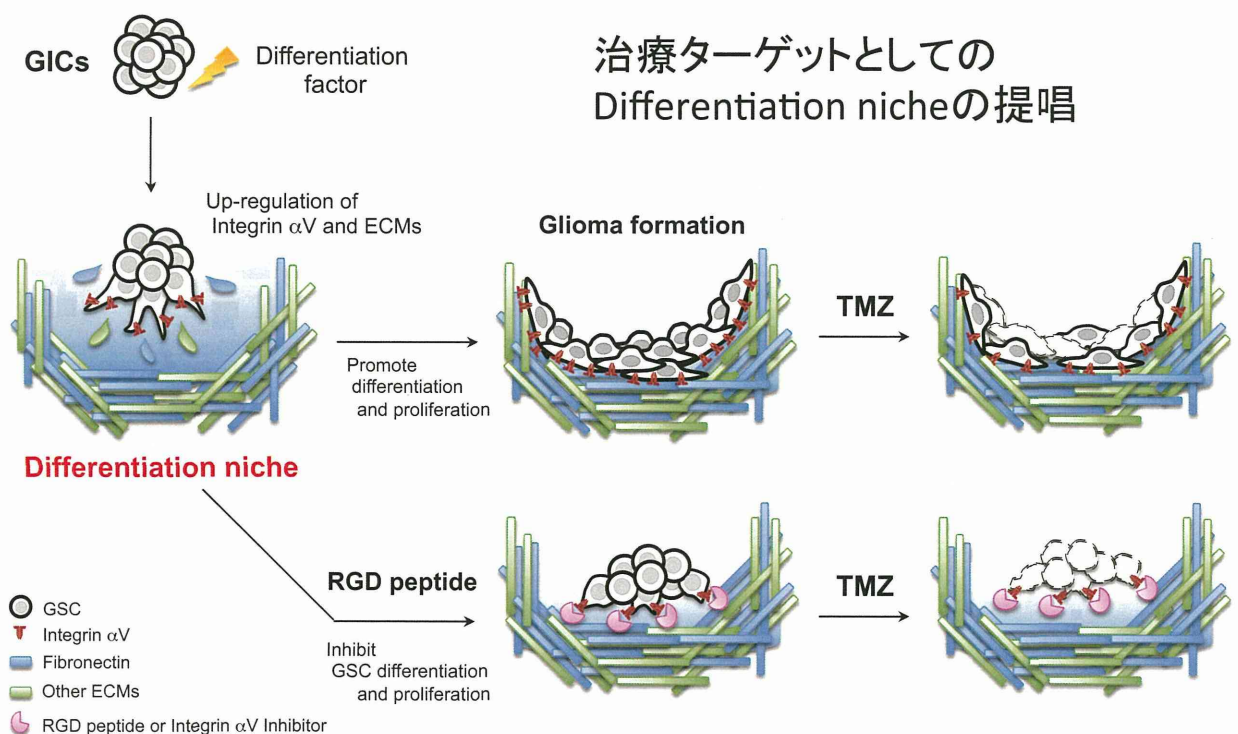


Fig. 5, A novel activation of “Dynein IC2-GR-Cox-1 signaling” was found in NF1-KD cells

