

自己抗体を活用した難治性がんのバイオマーカー探索研究

研究分担者 中村和行 山口大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

難治性がんの病態、治療、予後などの評価には信頼性の高いバイオマーカーの探索が不可欠である。とくにバイオマーカーとなり得る患者血清中の新規タンパク質の高感度検出技術の開発と応用が課題となっている。その基本技術として二次元電気泳動法と質量分析法による網羅的な血清タンパク質の分析が行われ、疾患関連バイオマーカー候補の報告があるが、信頼性の高いものは少ない。本研究では、C型肝炎ウイルス関連肝細胞がんの診断バイオマーカー候補蛋白の探索を行い、候補蛋白としてHSP70を同定し、HSP70を固定化したプロテインチップによる患者血清中のHSP70特異自己抗体価計測技術の開発を行った。さらには、薬剤耐性を獲得した膵臓がん細胞株を用いて、薬剤耐性獲得の診断バイオマーカー候補蛋白としてHSP27を同定し、HSP27の発現抑制による薬剤耐性の解除を明らかにした。

A. 研究目的

ヒトゲノムを構成する全遺伝子の塩基配列が決定され、それらの塩基配列に従ってつくられるタンパク質やペプチドの構造と機能の総合的な評価が重要な研究課題となっている。ヒトの生体内に実在して機能するタンパク質群（プロテオーム）やペプチド群（ペプチドーム）の解析技術の開発と標準化やファクトデータベースの構築が世界的な規模で進められている。ヒトの細胞や組織で実際に産生されて血液や尿などに存在するプロテオームやペプチドームの情報を包括的に利用すれば、医薬品等に利用可能な物質を見出すことができると期待される。さらに、正確な臨床履歴を伴った血液、尿などの体液や組織等に含まれるプロテオームやペプチドームの解析を経時的に実施できれば、有用なバイオマーカーの探索が可能になり、病態や予後の診断および治療評価を正確に行うことができるとともに医薬品等の開発を迅速に進めることができる。しかしながら、プロテオームやペプチドームは多彩な性質を示すとともに刻々と変化し、その濃度差も極めて大きいために、それらを定量的に解析することやリン酸化や糖鎖化等の翻訳後修飾の解析は

依然として困難である。最近、ヒトプロテオーム機構（HUPO）の呼びかけによってバイオマーカー探索等のプロテオーム解析技術の世界標準化や細胞膜結合タンパク質群の網羅的な解析技術の標準化が進められている。^{1) 2)} 本研究では、従来の二次元電気泳動法と質量分析法に加えてPROTEOMEX法やプロテインチップ技術を導入して（図1）C型肝炎ウイルス関連肝細胞がんなどに対する自己抗体を用いてがん部組織のみならず患者血清中のバイオマーカーを特異的かつ系統的に解析することにより、難治性がんの病態や予後の診断ならびに治療の評価、さらには創薬に利用可能なバイオマーカーの発見を目指す研究を行う。（引用文献：1) Bell AW, Deutsch EW, Au CE, Kearney RE, Beavis R, Sechi S, Nilsson T, Bergeron JJ, and HUPO Test Sample Working Group (Nakamura K et al.): A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods* 6(6), 423-430, 2009.2) Chung CM, Nakamura K, and Jordan TW: The AOHUPO Membrane Proteomics Initiative, Fourth Workshop June 2008 Cairns, Australia. *Proteomics* 8(19),

B. 研究方法

山口大学（以後本学）医学部附属病院第二外科で初診時に肝がんの診断を受け治療切除術を施行した症例を対象とした。本学医学部倫理審査委員会で承認を受けた臨床研究に則り、患者等に本研究の内容を十分に説明して同意を得た。まずは、C型肝炎ウイルス（HCV）感染の既往（HCV抗体陽性、B型肝炎ウイルス（HBV）抗原陰性かつ飲酒歴のない）のある患者から通常の治療切除術で摘出された肝細胞がん（HCC）組織（5 mm x 5 mm x 5 mm）を検体とした。

1) 検体からがん部組織と非がん部組織を分別採取し、それぞれの組織から抽出されたタンパク質を試料として、分離範囲を pH 4-7 に絞ったポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法（2-DE）を実施した。得られたがん部と非がん部の 2-DE 泳動像を Progenesis を用いて画像解析し、がん部で優位に増減するタンパク質スポットをゲルから切り出し、トリプシンを用いた in gel digestion 法で得られたペプチド断片を nano-LC-MS/MS（LC-MSD Trap XCT, Agilent Technologies）で質量分析し、SpectralMill-III および Mascot を用いて候補タンパク質の同定を行った。（図 2）

2) PROTEOMEX 法を用いて HCV-HCC 患者から得られたがん部組織タンパク質の 2-DE（分離範囲 pH 3-10）を行った後に分離されたタンパク質群を PVDF 膜に転写し、同一患者の血清を反応させた後にペルオキシダーゼ或いは蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を反応させることにより、患者血清中の自己抗体に特異的に反応するがん部組織由来のタンパク質スポットを検出した。これらのタンパク質スポットを切り出し、質量分析して候補タンパク質の同定を行った（図 3）。

3) 候補タンパク質（例として HSP70 の C-末端領域）を GFP 蛋白と融合させ、その N-末端部に His タグと C-末端部に Cys タグを挿入したベクターを作成して大腸菌内で発現させ

た。産生されたリコンビナント蛋白を His タグに特異的に結合するニッケルビーズで精製した後にダイヤモンド様表面加工した（DLC）チップ基板上のマレイミド基と反応させ、Cys タグのチオール基とカップリング（図 4-1）させて均一な配向性を保ちながら強固に固定化した。さらに、チップ上に固定化した HSP70 を熱処理することで抗原エпитープを露出（図 4-2）させ、このチップに HCV-HCC 患者や他の疾患ならびに正常人から得た血清を反応（図 4-3）させて HSP70 に反応する自己抗体の効率的な検出を行った（図 5 および図 6）。

C. 研究結果

1. HCV-HCC のバイオマーカー候補タンパク質の同定：従来、2-DE の分離範囲を pH 3-10 で実施し、HSP70 family, glutamine synthetase, arginase および三炭糖の解糖系酵素等が HCV-HCC の組織バイオマーカー候補として同定されていたが、今回は 2-DE の分離範囲を pH 4-7 に絞り、ApoE アイソフォーム（糖鎖化？）と ATP 合成酵素アイソフォーム（リン酸化？）を新たなバイオマーカー候補として同定した。

2. PROTEOMEX 法を用いて自己抗体に反応する HCV-HCC バイオマーカー候補タンパク質の絞り込み：HCV-HCC のがん部組織に特異的に増減するタンパク質群の中からがん患者血清中の自己抗体に特異的に反応するタンパク質として HSP70 と MnSOD および peroxiredoxin が同定された。

3. HSP70 等を用いたプロテインチップによる HCV-HCC 患者血清中の自己抗体の検出：GFP と融合させた HSP70 の C-末端領域を固定化した DLC チップに HCV-HCC 患者血清や正常人血清等を反応させたところ、正常人に比して HCV-HCC 患者の陽性率が有意に高かった。（図 5 および図 6）

4. 自己抗体を用いた難治性がんのバイオマーカー探索：難治性がんとして HCV-HCC の他に、抗がん剤 gemcitabine 耐性の膵臓がん細胞株では HSP27（図 7）や乳癌では抗 cyclophilin A

抗体が新たなバイオマーカー候補として同定された。

5. 治療評価バイオマーカーHSP27の評価：抗がん剤 gemcitabine に対して薬剤耐性を獲得した膵臓がん細胞株 KLM-1R を用いて HSP27 特異的 siRNA による hsp27 遺伝子発現抑制(図8) や小分子化合物 KNK437 による HSP27 の抑制が薬剤耐性を解除することが明らかになった。

D. 考察

今回、従来の二次元電気泳動法と質量分析法(nano-LC-MS/MS)の改良を行うとともに、自己抗体を用いたがん組織特異タンパク質バイオマーカーの高感度検出技術の改良を行い、C型肝炎ウイルス感染に起因する肝細胞癌(HCV-HCC)を中心とする難治性がんの新規バイオマーカー探索を試みた。その結果、糖鎖化 ApoE と ATP 合成酵素アイソフォームなどが新たな HCV-HCC のバイオマーカー候補タンパク質として同定され、抗がん剤 gemcitabine 耐性の膵臓がんでは HSP27 や乳がんでは抗 cyclophilin A 抗体が新たなバイオマーカーとして同定された。さらに、自己抗体を用いたプロテインチップ技術の改良を行い HCV-HCC において HSP70 の C 末端部が有望なバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。HSP70 の C 末端部をチップ表面に固定化して患者血清中の自己抗体を検出すれば、特異的かつ効率的に HCV-HCC の大規模解析が容易となる。特に自己抗体を活用することにより、血清中に含まれる高濃度のタンパク質や混合物を除去する必要がなく、簡便な検診ツールとして有望であると考えられる。

E. 結論

C型肝炎ウイルス感染に起因すると考えられる肝細胞がん(HCV-HCC)の組織特異タンパク質バイオマーカーの探索技術の改良を行い、従来の HSP70, MnSOD, peroxiredoxin に加えて糖鎖化 ApoE および ATP 合成酵素アイソフォームなどを新たなバイオマーカー候補蛋白

として同定した。今後、これらの候補タンパク質の翻訳後修飾を PRC と共同で明らかにしたい。一方、患者血清中の自己抗体を活用した PROTEOMEX 法とプロテインチップ技術の改良を行い、HSP70 の C 末端領域が HCV-HCC の特異バイオマーカー候補として有望であることを明らかにした。さらに、自己抗体を用いた PROTEOMEX 法により乳がんのバイオマーカー候補として抗 cyclophilin A 抗体を同定した。今後、患者血清中の HSP70 特異的な自己抗体を高速かつ高感度に計測するプロテインチップ技術の実用化や難治性膵臓がんの治療標的分子として HSP27 を活用した難治性がんの効率的な治療評価バイオマーカー探索のための高感度解析技術の改良を試みる必要がある。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Takenawa, T., Kuramitsu, Y., Wang, Y., Okada, F., Tokuda, K., Kitagawa, T., Ueyama, Y., Nakamura, K. Proteomic analysis showed down-regulation of nucleophosmin in progressive tumor cells compared to regressive tumor cells. *Anticancer Res.* **33**,153-160 (2013).
2. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Zhang, X., Akada, J., Oka, M., Nakamura, K. Proteomic differential display identifies upregulated vinculin as a possible biomarker of pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* **28**,1845-50 (2012).
3. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Akada, J., Kitagawa, T., Oka, M., Nakamura, K. Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. *Anticancer. Res.* **32**,3219-22 (2012).
4. Kuramitsu, Y., Wang, Y., Taba, K., Suenaga, S., Ryozaawa, S., Kaino, S., Sakaida, I., Nakamura, K. Heat-shock protein 27 plays

- the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* **32**, 2295-99 (2012).
5. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Takashima, M., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Tamesa, T., Sakaida, I., Oka, M., Nakamura, K. Identification of four isoforms of aldolase B down-regulated in hepatocellular carcinoma tissues by means of two-dimensional Western blotting. *In Vivo* **25**, 881-620 (2011).
 6. Kuramitsu, Y., Takashima, M., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Tamesa, T., Akada, JK., Wang, Y., Toda, T., Sakaida, I., Okita, K., Oka, M., Nakamura, K. Up-regulation of 42 kDa tubulin alpha-6 chain fragment in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Anticancer Res.* **31**, 3331-6 (2011).
 7. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Ueno, T., Suzuki, N., Yoshino, S., Iizuka, N., Zhang, X., Oka, M., Nakamura, K. Differential expression of up-regulated cofilin-1 and down-regulated cofilin-2 characteristic of pancreatic cancer tissues. *Oncol. Rep.* **26**, 1595-9 (2011).
 8. Yoshida, k., Kuramitsu, Y., Murakami, K., Ryozaawa, S., Taba, K., Kaino, S., Zhang, X., Sakaida, I., Nakamura, K. Proteomic differential display analysis for TS-1-resistant and -sensitive pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res.* **31**, 2103-8 (2011).
 9. Kuramitsu, Y., Zhang, X., Wang, Y., Nakamura, K. Identification of differentially expressed proteins in tumor necrosis factor-alpha-resistant and -sensitive rat hepatoma cells. *Anticancer Res.* **31**, 2059-63 (2011).
 10. Wang, Y., Kuramitsu, Y., Yoshino, S., Takashima, M., Zhang, X., Ueno, T., Suzuki, N., Oka, M., Nakamura, K. Screening for serological biomarkers of pancreatic cancer by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Oncol. Rep.* **26**, 287-92, (2011).
 11. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Zhang, X., Ueyama, Y., Nakamura, K. Two-dimensional gel electrophoresis using immobilized pH gradient strips and Flamingo TM fluorescent gel stain identified non-nuclear proteins possibly related to malignant tumor progression. *Anticancer Res.* **31**, 1259-63 (2011).
 12. Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Mori-Iwamoto, S., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I., Nakamura, K. KNK437 down regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and enhances the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy.* **57**, 12-6 (2011).
 13. Kuramitsu, Y., Baron, B., Yoshino, S., Zhang, X., Tanaka, T., Yashiro, M., Hirakawa, K., Oka, M., Nakamura, K. Proteomic differential display analysis shows up-regulation of 14-3-3 protein sigma in human scirrhou-type gastric carcinoma cells. *Anticancer Res.* **30**, 4459-65 (2010).
 14. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Zhang, X., Tanaka, T., Ueyama, Y., Nakamura, K. Staining with highly sensitive Coomassie Brilliant Blue SeePico™ stain after Flamingo™ fluorescent gel stain is useful for cancer proteomic analysis by means of two-dimensional gel electrophoresis. *Anticancer Res.* **30**:4001-5 (2010).

15. Kuramitsu, Y., Taba, K., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Zhang, X., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. Nakamura, K. Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res.* **30**, 3367-72 (2010).
16. Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. Nakamura, K. Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* **30**, 2539-43 (2010).
17. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Tanaka, T., Zhang, X., Ueyama, Y. Nakamura, K. Proteomic analysis for nuclear proteins related to tumour malignant progression: a comparative proteomic study between malignant progressive cells and regressive cells. *Anticancer Res.* **30**, 2093-9 (2010).
18. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Zhang, X., Tanaka, T., Ueyama, Y., Nakamura, K. Staining with highly sensitive Coomassie Brilliant Blue SeePico™ stain after Flamingo™ fluorescent gel stain is useful for cancer proteomic analysis by means of two-dimensional gel electrophoresis. *Anticancer Res.* **30**, 4001-5 (2010).
19. Kuramitsu, Y., Taba, K., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Zhang, X., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. Nakamura, K. Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res.* **30**, 3367-72 (2010).
20. Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Maehara, S., Maehara, Y., Sakaida, I. Nakamura, K. Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* **30**, 2539-43 (2010).
21. Kuramitsu, Y., Hayashi, E., Okada, F., Tanaka, T., Zhang, X., Ueyama, Y. Nakamura, K. Proteomic analysis for nuclear proteins related to tumour malignant progression: a comparative proteomic study between malignant progressive cells and regressive cells. *Anticancer Res.* **30**2093-9 (2010).
22. Kuramitsu, Y., Miyamoto, H., Tanaka, T., Zhang, X., Fujimoto, M., Ueda, K., Hamano, K., Nakamura, K. Proteomic differential display analysis identified upregulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human differential display analysis identified upregulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human malignant pleural methothelioma cell lines. *Proteomics* **9**, 5078-89 (2009).
23. Kuramitsu Y, Miyamoto H, Tanaka, T, Zhang X, Fujimoto M, Ueda K, Hamano K, and Nakamura K Proteomic differential display analysis identified up-regulated astrocytic phosphoprotein PEA-15 in human differential display analysis identified up-regulated strocytic hosphoproteinPEA-15in human malignant pleural methothelioma cell lines. *Proteomics* **9**(22), 5078-5089 (2009).
24. Hayashi, E., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Zhang, X., Tanaka, T., Uchida, K., Fukuda, T., Furumoto, H., Ueyama, Y., & Nakamura, K. Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 σ protein is upregulated in human oral

- squamous cell carcinoma and dependent on the differential level. *Proteomics-Clin. Appl.*-3(11), 1338-47 (2009).
25. Tamesa, MS., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Maeda, N., Nagashima, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., Oka, M. & Nakamura K Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* 30(12), 2168-81 (2009).
 26. Bell, AW., Deutsch, EW., Au, CE., Kearney, RE., Beavis, R., Sechi, S., Nilsson, T., Bergeron, JJ., & HUPO Test Sample Working Group (Nakamura, K. et al.): A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nature Methods* 6(6), 423-30 (2009).
 27. Mori-Iwamoto, S., Taba, K., Kuramitsu, Y., Ryozaawa, S., Tanaka, T., Maehara, Y., Okita, K., Nakamura, K. & Sakaida, I. Interferon-gamma down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine. *Pancreas* 38(2), 224-6 (2009).
- F-2. 学会発表
1. 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)
 2. 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)
 3. 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 19th-23rd, 2010, Sydney, Australia)
 4. 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)
 5. 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 Proteomics Initiative. (HUPO 8th Annual world Congress, September 26th -30th , 2009, Toronto, Canada)
 6. 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)
 7. 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 19th -20th , 2009, Taipei, Taiwan)
 8. Sugihara K, Kuramitsu Y, Tanaka T, Fujimoto M, Oka M and Nakamura K. : Proteomic analysis of hepato- cellular carcinoma caused by hepatitis C virus.

(HUPO 8th Annual World Congress,
September 26th-30th, 2009, Toronto,
Canada)

9. 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 (JHUPRO) 大会、2011
年 7 月 28 日-30 日)
10. 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 (JHUPRO) 大会、2009 年 6 月 27
日-28 日、北里大学薬学部、東京)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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)
15. 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-3. 著書

1. 中村和行: 第 3 章臨床資料の取扱および第 4
章解析方法及び技術ならびに第 9 章研究例

8. 肝癌、: 日本臨床プロテオーム研究会編、
『臨床プロテオミクス』金原出版、東京、
2012 年

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし。


3. その他

なし。

H. 研究協力者

藏満保宏、赤田純子、田中寿幸 (山口大学
大学院医学系研究科)

Proteomic Profiling of HCV-HCC

 Yamaguchi University

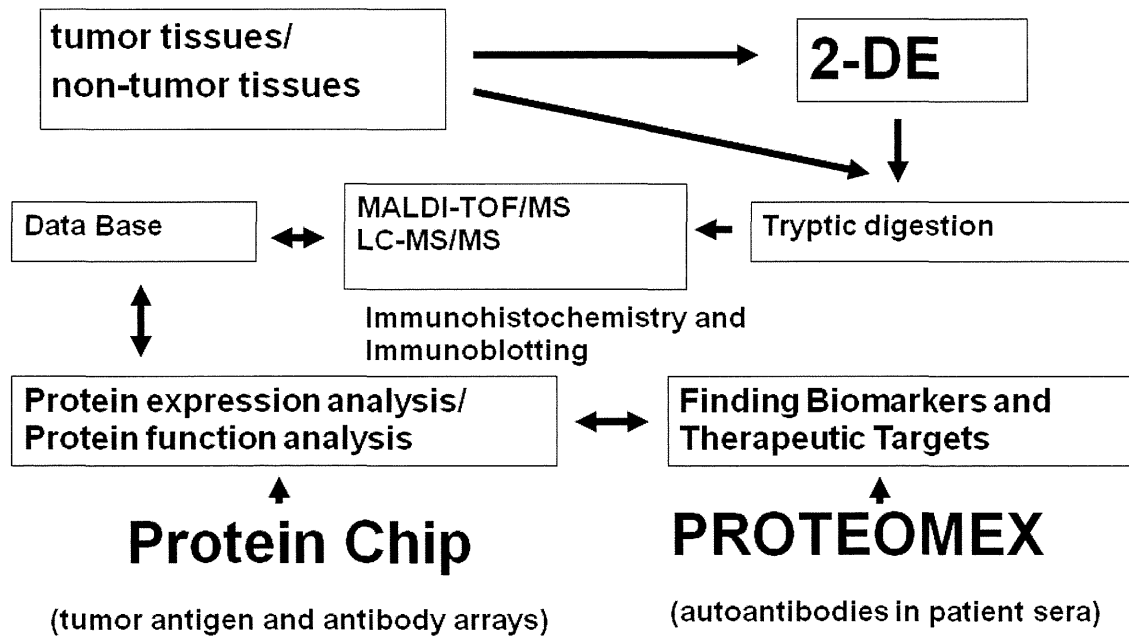
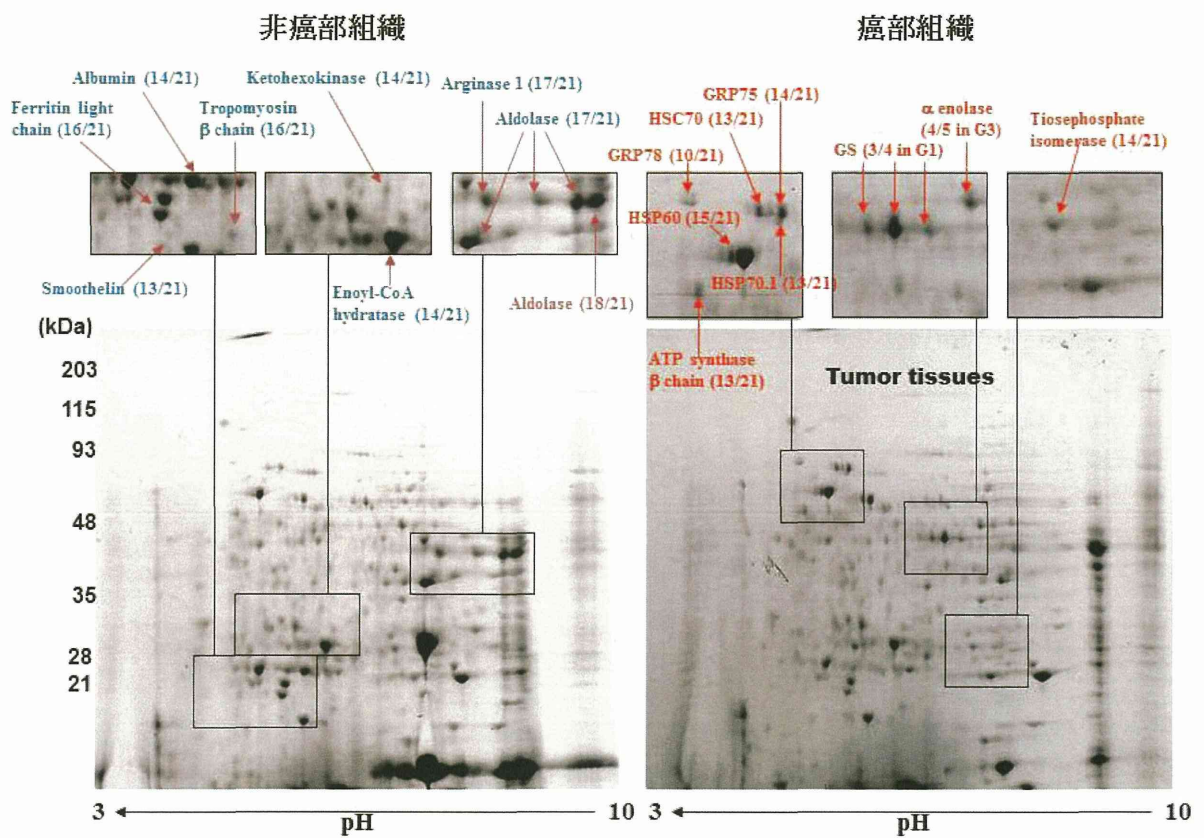


図 1. プロテオームプロファイリングの流れ

図 2. 二次元電気泳動法と質量分析 (nano-LC-MS/MS) によるC型肝炎ウイルス関連肝細胞癌のプロテオームプロファイリング



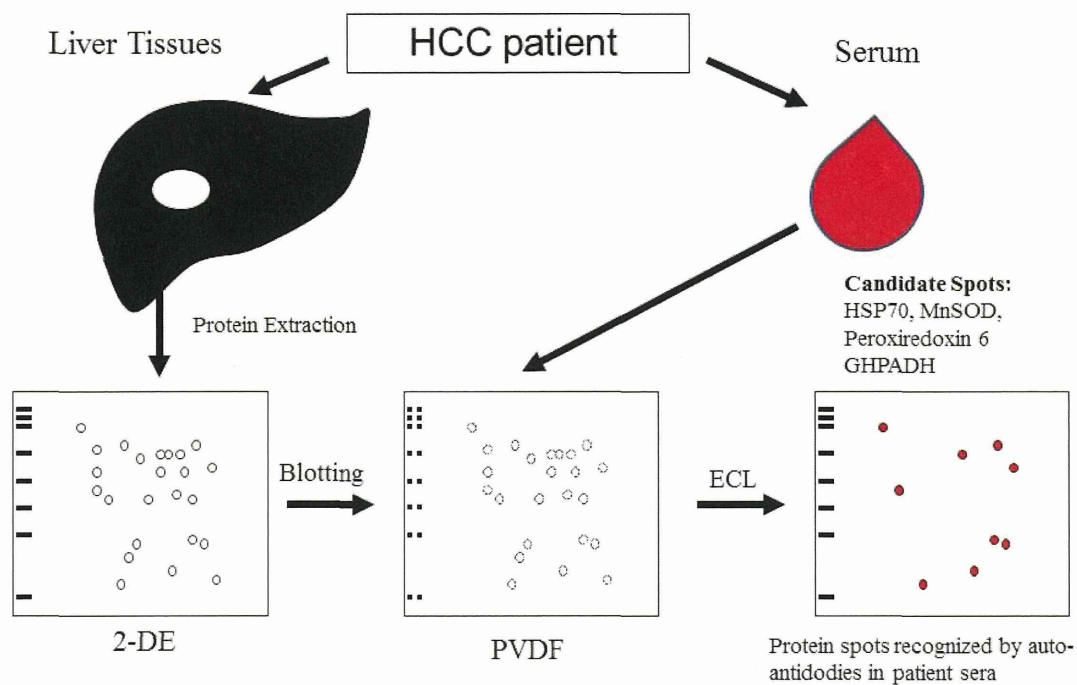


図3. C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患者血清中の自己抗体を用いた癌特異抗原候補タンパク候補の探索 (PROTEOMEX 法)

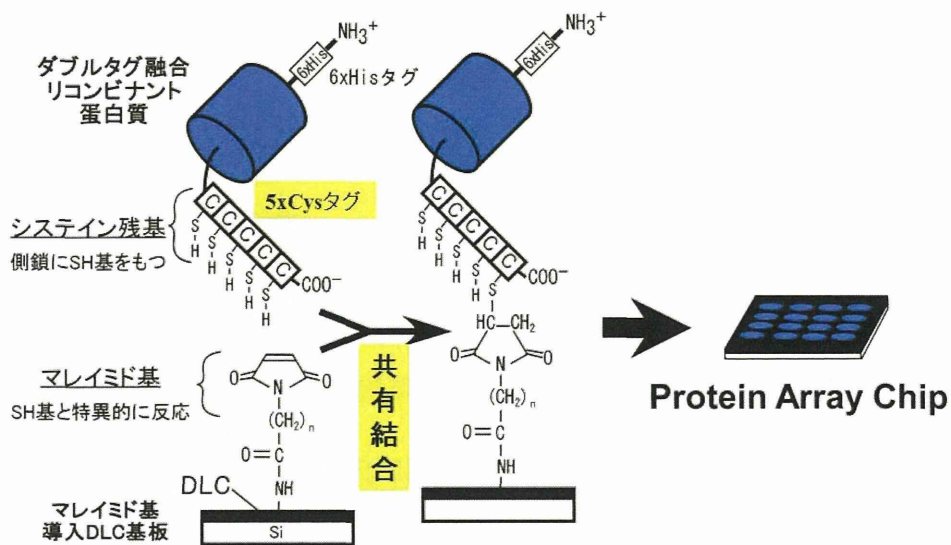
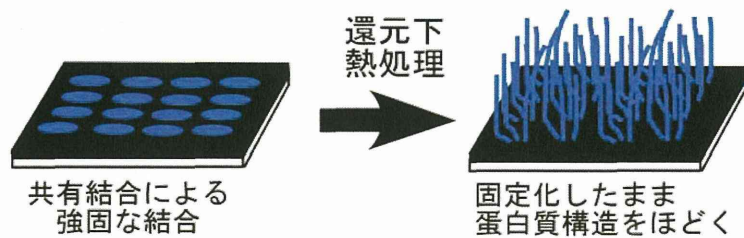


図4-1. マレイミド基板タンパクチップ技術

マレイミド基板固定化蛋白アレーチップの特徴

- ・ 共有結合により抗原は蛋白質末端で基盤に固定化
- ・ 固定化蛋白質は反応溶液中に配向性をもって裸出
- ・ チップは還元下で熱処理して、余分なマレイミド基をマスクすると共に、固定化蛋白質の立体構造を解く。

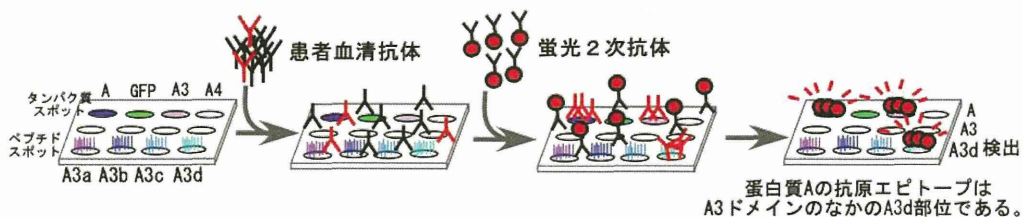


- ・ 内部エピトープに対する特異抗体も検出

図 4-2. マレイミド基板固定化蛋白アレーチップの特徴

アレープロファイリング解析による 多検体、多種抗体の数値化

- ・ アレー上の位置から抗原蛋白質を特定できる。
- ・ 抗原蛋白質全長と共にドメインを分けて発現させ固定化すると抗原エピトープを含むドメインを特定できる。



- ・ 抗体検出量は、固定化蛋白量を同時に蛍光検出して標準化し数値化できる。
- ・ 多数の血清を同時に扱うハイスループット解析が可能。

図 4-3. アレープロファイリング解析による多検体、多種抗体の数値化

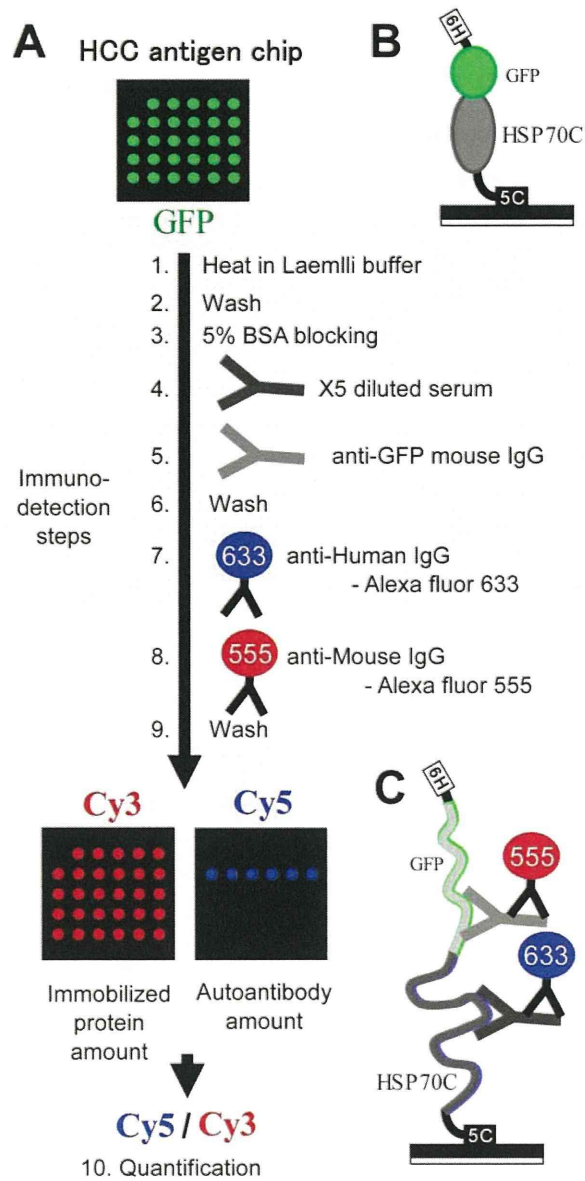


図 5. 肝細胞癌抗原チップを用いた自己抗体検出プロトコル A)検出プロトコル、B) 検出前のチップ蛋白質構造模式図、C) 検出後のチップ蛋白質と抗体結合の模式図

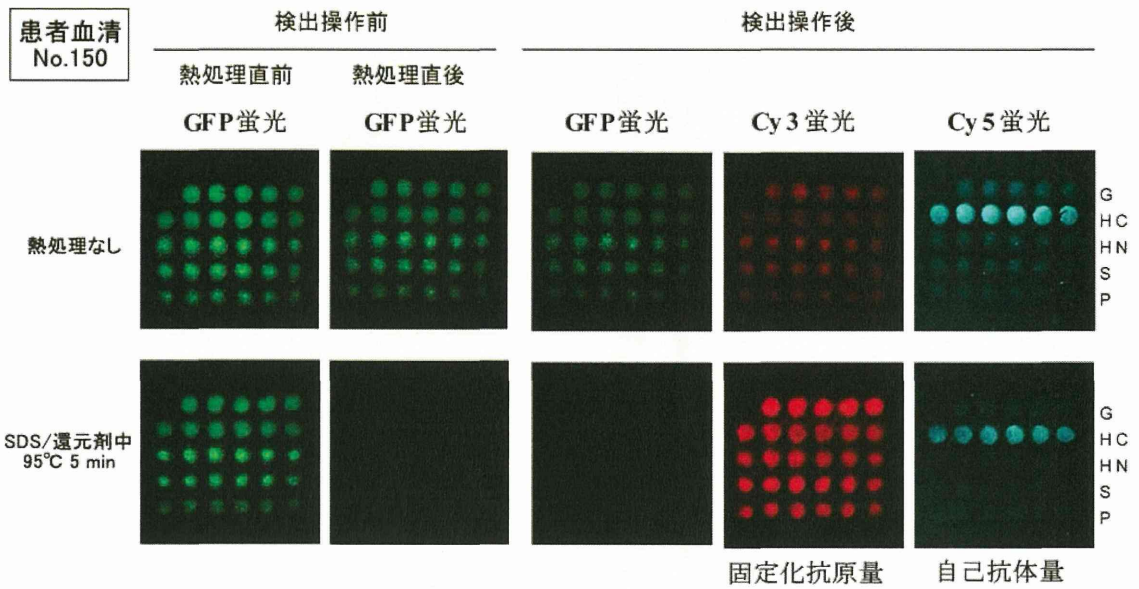


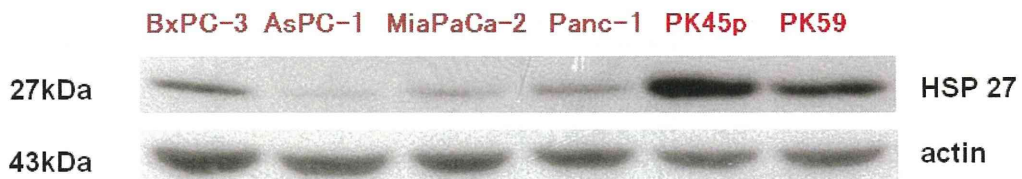
図 6. マレイミド基板抗原蛋白チップの 熱処理の効果 蛍光顕微鏡下での観察結果を示す。熱処理により、GFP 蛍光が消失し、GFP 抗体検出が向上した。自己抗体検出は維持され、バックグラウンドは低下した。

The cytotoxicity of gemcitabine to the cells was evaluated by MTT assay

cell line	MiaPaCa-2	Panc-1	BxPC-3	AsPC-1	PK45p	PK59
IC50 μ g/ml	6.81	8.07	6.67	1.05	417.45	294.72

gemcitabine感受性株

gemcitabine耐性株



Mori-Iwamoto S et al. Int J Oncol. 2007

図 7. ヒト膵臓癌細胞株のゲムシタビン耐性株と HSP27 の発現。

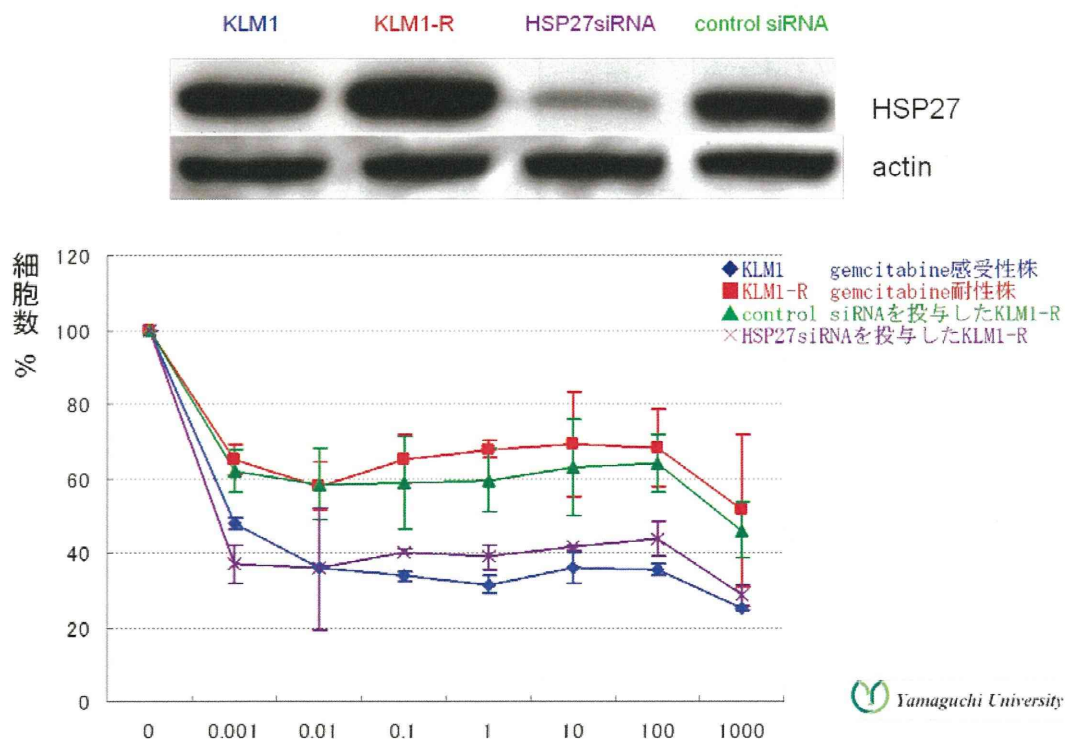


図 8. ヒト膵臓癌細胞株の siRNA を用いた HSP27 発現抑制とゲムシタビン耐性の解除。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
朝長 毅 (朝長 毅, 小寺義男)	血清・血漿バイオマーカー探索のための新しい前処理法の開発	小田吉哉, 長野光司	創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析.	羊土社	東京	2010	90-96
平野 久	プロテオミクス	高山光男, 早川滋雄, 瀧浪欣彦, 和田芳直	現代質量分析学	化学同人	京都	2012	293-304
同上 (Ino, Y., Kazamaki, R. & Hirano, H.)	On-membrane identification of gel-resolved proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS)	Tschesche, H.	Modern Methods in Protein Chemistry	Walter De Gruyter	Berlin, Germany	2012	113-126
同上 (木村弥生, 平野 久)	LC/MS/MSによる疾患プロテオーム解析	日本分析化学会編	試料分析講座 タンパク質分析	丸善出版	東京	2012	
同上 (Stephani-Kosin, K., <u>Hirano, H.</u> & K. B.M.)	Proteomic analysis of Duchenne muscular dystrophy (DMD)	Tschesche, H.	Modern Methods in Protein Chemistry	Walter De Gruyter	Berlin, Germany	2012	235-248
尾野雅哉 (松原淳一, 山田哲司)	血漿を用いた膀胱癌早期マーカー探索	中村 和行, 西尾 和人, 西村俊秀	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	金原出版	東京	2012	338-340
尾野雅哉 (山田哲司, 本田一文)	がん(腫瘍)マーカー	渋谷正史, 湯浅保仁	がん生物学イラストレイテッド	羊土社	東京	2011	318-324
尾野雅哉	腫瘍マーカー温故知新 pp, 2010	丸 義朗	がん転移臨床と研究の羅針盤	学研メテ イカル秀 潤社	東京	2010	22-26
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	創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析.	羊土社	東京	2010	90-96

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	細胞工学別冊 明日を拓く新 次元プロテオ ミクス	学研メテ ィカル秀 潤社	東京	2009	122-130
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	小田吉哉, 長野光司	創薬のための タンパク質・ プロテオミク ス解析	羊土社	東京	2010	182-190
同 上	神経線維腫症 2 型	金田眞理	皮膚科臨床ア セット15	中山書店	東京	2013	印刷中
中村和行	第 3 章臨床資料の 取扱および第 4 章 解析方法及び技術 ならびに第 9 章研 究例	日本臨床プロ テオーム 研究会	臨床プロテオ ミクス8. 肝癌	金原出版	東京		2012

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
朝長 毅 (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		2013
同 上	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
朝長 毅 野村文夫 (Tomonaga, T. & 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	2013
朝長 毅, 中山敬一 平野 久, 荒木令江 (Tomonaga, T., Nakayama, K., Hirano, H. & Araki, N.)	Integrated view of the human chromosome X-centric proteome project.	J. Proteome Res.	12	58-61	2013

朝長 毅 中山敬一 (Tomonaga, T. & Nakayama, K.I.)	Strategy for large-scale phospho-proteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples.	J. Proteome Res.	11	5311-22	2012
朝長 毅 加藤菊也 宮本泰豪 (Tomonaga, T., Kato, K. & Miyamoto, Y.)	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
朝長 毅 野村文夫 (Tomonaga, T. & Nomura, F.)	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
同 上	Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser micro-dissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins.	Proteomics Clin. Appl.	6	412-7	2012
同 上	Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice.	PLoS One	7	e37803	2012
同 上	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
同 上	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

朝長 毅 (Tomonaga, T.)	Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. J. Proteomics	J. Proteomics	78	362-73	2012
朝長 毅 野村文夫 (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	2012	ID: 623190 (Epub)	2012
同 上	Identification of a novel biomarker for biliary tract cancer using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.	Int. J. Proteomics	2012	ID: 108609 (Epub)	2012
同 上	SAP155- mediated c-myc suppressor FBP- interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues.	Cancer Sci.	104	149-56	2012
朝長 毅 (Tomonaga, T.)	Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser micro-dissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker.	J. Proteomics	75	833-44	2012

朝長 毅 野村文夫 (Tomonaga, T. & Nomura, F.)	Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: its expression and possible clinical significance.	Hum. Pathol.	43	1282-8	2012
同 上	Combined proteomic analysis of liver tissue and serum in chronically alcohol-fed rats.	Alcohol Clin. Exp. Res.	37	E79-87	2012
朝長 毅 (Tomonaga, 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
朝長 毅 野村文夫 (Tomonaga, T. & Nomura, F.)	The application of a three-step proteome analysis for identification of new biomarkers of pancreatic cancer.	Int.J.Proteomics	2011	ID: 628787 (Epub)	2011
同 上	An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer.	Int. J. Cancer	128	1018-30	2011
同 上	Adhesion molecule periplakin is involved in cellular movement and attachment in pharyngeal squamous cancer cells.	BMC Cell Biol.	12	41	2011

朝長 毅 (Tomonaga, T.)	The measurement of a fibrinogen alpha C-chain 5.9kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution.	Clin. Chim. Acta	412	1094-9	2011
角田慎一 (Tsunoda, T.)	Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	421	140-4	2012
同 上	Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer.	Pharmazie	67	253-5	2012
同 上	Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., Biomaterials.	Biomaterials	32	162-9	2011
同 上	In vivo biotinylation of the vasculature in B cell lymphoma identifies BST-2 as a target for antibody-based therapy.	Blood	115	736-744	2010
鎌田春彦	抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術	薬学雑誌	132	473-477	2012
仲 哲治 (Naka, T.)	CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells.	Int. J. Cancer	In press		2013