

201207017A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の  
創出に向けた基盤技術研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 25 (2013) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の  
創出に向けた基盤技術研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成 24 (2013) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究 -----	1
山西 弘一	
II. 分担研究報告	
1. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発 -----	22
朝長 毅	
2. 定量的リン酸化プロテオミクス技術の開発と GIST における imanitib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用 -----	33
仲 哲治	
3. コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究 -----	43
角田 慎一	
4. コンパニオン診断薬（薬剤効果予測マーカー）の開発 -----	51
平野 久	
5. タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量 -----	58
山田 哲司	
6. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 -----	63
中山 敬一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	70
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	78

プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究

研究代表者 山西弘一 独立行政法人医薬基盤研究所 研究所長

研究要旨

最適な個別化医療の実現のためには、治療薬（主に分子標的薬）の効果や副作用を予測し、投薬が適切な患者を選定するためのコンパニオン診断薬の開発が急務である。現在は、標的分子の遺伝子変異の有無で薬効予測をしているが、薬が効くと診断されても実際は効かない例が多い。その理由として、遺伝子レベルだけではなく、生体内のタンパク質レベルでの変動が薬効を左右するからである。その中でも特に、生体内のシグナル伝達を担っているタンパク質リン酸化が鍵となる。本研究では、最新のプロテオミクス技術を活用して、リン酸化タンパク質によるシグナルの異常を網羅的に捉え、次世代コンパニオン診断薬を創出することを目的とする。

本年度は、以下の研究を実施したので報告する。

**1. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発：朝長 毅**

リン酸化ペプチド濃縮法や安定同位体標識内部標準ペプチド添加法などを用いた特定のタンパク質リン酸化修飾レベルを SRM/MRM 法で定量する技術を確認した。さらに、キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドを定量するための SRM 測定パラメータリスト作りを進めた。400 種類弱の活性型リコンビナントキナーゼを LC-MS/MS で解析し、その MS/MS データから SRM 測定パラメータリストを作成した。

また、抗 EGFR 抗体薬効果予測法における標的キナーゼを決定するための基礎検討も進めた。大腸癌培養細胞株 24 種類を抗 EGFR 抗体薬感受性株、耐性株に分類し、それら細胞株についてキナーゼ活性化状態のプロファイリングを進めた。抗 EGFR 抗体薬耐性株では Mek や Akt の活性化が検出でき、これらの結果はキナーゼ活性化レベル測定が抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有用であることを示唆した。

**2. 定量的リン酸化プロテオミクス技術の開発と GIST における imatinib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用：仲 哲治**

チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は肺癌、消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor : GIST)、白血病等に対して、画期的治療効果を示すことが報告された。しかし、獲得耐性と共に治療が無効となるため、耐性克服は進行がん患者にとって重要である。GIST 患者のおよそ 20~50%の頻度において、c-kit の 2 次変異を持たず、Imatinib に獲得耐性を示す患者の存在が報告されている。このような GIST 患者においては、Imatinib 作用時、KIT 以外に生存・増殖に関係するタンパク質 (キナーゼ) が GIST 細胞の survival signal となり、バイパス経路として活性化していることが考えられるが、これまで Imatinib 耐性 GIST 患者におけるバイパス経路の解析は報告されていない。従って、survival signal であるバイパス経路を同定することは新規キナーゼ阻害剤の開発、さらにはコンパニオン診断薬の開発につながるものと期待される。

GIST 細胞は Imatinib 処理により全ての細胞が死滅するわけではなく、濃度依存性に腫瘍細胞は死に至るが必ず生細胞が存在する。従って、これら生細胞には GIST 細胞が Imatinib に対する耐性を獲得する以前に、Imatinib 処理に対し抵抗性—survival signals を持っていると考えられる。そこで、Imatinib 暴露前と暴露直後に c-Kit 以外のタンパク質のリン酸化レベルの変動を

検索し、バイパス経路として、細胞の増殖・生存シグナルが活性化している経路を探索した。

まずリン酸化チロシンタンパク質を質量分析計にて網羅的に定量することができる技術の確立を試みた。抗チロシンリン酸化抗体ビーズを用いたチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と iTRAQ 法を組み合わせることで、複数サンプル間におけるチロシンリン酸化レベルを相対定量することが可能となった。本手法により、GIST-T1 細胞に 400nM の Imatinib を 0 時間、1 時間、6 時間、24 時間処理した後に発現変動を示す分子を網羅的に解析した結果、Imatinib 処理 0 時間と比較し、1 時間、6 時間、24 時間後に KIT のチロシンリン酸化が低下する一方で、Fyn, JAK2, Tyk2, FAK のチロシンリン酸化のレベルは、それぞれ 24 時間後に 17.2 倍、5.765 倍、5.64 倍、1.7 倍に上昇していることを明らかにし、ウェスタンブロットでも同様の結果を確認した。この結果を踏まえ、Fyn, FAK に着目し、Imatinib 治療による KIT 阻害に加えこれらをターゲットした治療の可能性を探索した。GIST-T1 細胞に shRNA を組み込み Fyn の発現を抑えた株においては、Imatinib の効果が親株に比べて上昇している結果を得た。さらに、親株に対して、Imatinib に加えて FAK に対する低分子阻害剤(TAG)を加えたダブルットの治療がより効果的であるという結果を得た。これらの結果、Imatinib 感受性の GIST-T1 細胞を用いた *in vitro* での実験結果ではあるが、Imatinib による KIT のキナーゼ活性の阻害により活性化する Fyn および FAK の阻害は、survival signal のバイパスを遮断することで imatinib 耐性を抑制できる可能性が考えられた。すなわち、GIST において imatinib 処理時に活性化する Fyn および FAK を示す細胞は imatinib 耐性のバイパス経路を遮断する治療標的として、コンパニオン診断薬となり得ることが示唆された。

### 3. コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究：角田慎一

本研究では、血液を用いて、がんの薬剤感受性等を予測可能な診断法（体外診断薬）の開発を念頭に、近年、がんをはじめとする各種細胞から生理的機構で分泌され、がん細胞膜蛋白質や miRNA を含有することが近年明かとなってきた膜小胞である exosome に着目し、そのコンパニオン診断薬への応用の可能性を検討している。

本年度は、がん細胞分泌 exosome に関する基礎情報の収集を試みた。2 種類のヒト大腸がん細胞株 SW480 と SW620 の培養上清から遠心分離法にて exosome 調製を試みたところ、粒径 100 nm 程度の exosome を濃縮することができた。質量分析法により、これらがん細胞分泌 exosome 上の蛋白質の同定を試みた結果、exosome マーカーとして知られる分子や、種々のがん関連膜蛋白質が同定された。また、これらの中には、現在、臨床試験が進められているがん抗体医薬の標的でもある Eph receptor A2 など含まれていた。以上の結果から、がん細胞分泌 exosome 上の蛋白質が、がん細胞の特性を反映しうるマーカーになりうることを示唆された。

### 4. コンパニオン診断薬（薬剤効果予測マーカー）の開発：平野 久

消化管間質腫瘍（GIST）細胞株とイマチニブ耐性細胞株から、4,596 種類のリン酸化ペプチド、1,386 種類のリン酸化タンパク質を同定した。GIST 細胞株にイマチニブを投与すると、KIT をはじめとする多種類のタンパク質のリン酸化に変動が見られた。イマチニブの継続投与によってそれらの中にはリン酸化の回復が見られた。また、イマチニブ耐性細胞株では、細胞増殖に係わる受容体型チロシンキナーゼの活性の増大が見られた。これを抑えると耐性細胞株はイマチニブ耐性が低下することがわかった。

### 5. タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量：山田哲司

本研究分担者らは逆相担体がコートされたガラススライドに高密度にタンパク質検体を微量定量スポットする独自のタンパク質マイクロアレイ技術を開発し、血清・血漿タンパク質の定量解析が可能であることを示してきた。本法は従来のイムノブロット法などに比べ格段に感度が

高く、微量なタンパク質検体でも可能なことから、生検組織などの臨床検体に応用が可能と考えられる。

本分担研究では、分子標的治療薬のコンパニオンバイオマーカーを開発する基盤技術として、タンパク質マイクロアレイを用いた網羅的なリン酸化タンパク質のプロファイリングを行うことで、シグナルネットワークの変化を捉える方法の分担開発を行う。

平成24年度はタンパク質マイクロアレイを用いたリン酸化タンパク質の解析技術を確立した。タンパク質のリン酸化は非常に不安定であり、検体の抽出法や保存法に独自の工夫を加えることにより安定した結果が得られるようになった。今後、既存あるいは新規の分子標的治療薬の作用によって変化するタンパク質リン酸化プロファイルを網羅的に解析することで、分子標的治療薬が標的とするシグナル伝達経路を特定し、薬剤の作用を予測できるリン酸化タンパク質を特定する計画である。

## 6. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究：中山敬一

生体内において、ほとんどのタンパク質は多種多様な翻訳後修飾を受けることでその機能を制御されている。特にタンパク質のリン酸化は増殖シグナルなどの細胞内シグナル伝達において決定的な役割を担う可逆的な翻訳後修飾であり、細胞の状況に応じてダイナミックに変化することが知られている。近年、細胞内シグナル伝達において様々な経路が相互作用することによって生じるシグナルの波形パターンが最終的なアウトプットを生み出す可能性が示唆されている。したがって、シグナル伝達機構の本質を理解するためには、その波形パターンに内包される情報のデコードが重要な課題となっている。シグナル伝達を最も定量的に計測する手段として、細胞内リン酸化を網羅的に多点で定量することが極めて重要である。このような観点から、われわれはリン酸化を正確かつ大規模に定量できる手法の開発を行ってきた。本年度は、前年度開発した Phospho-mTRAQ 法を補完する方法論としてノンターゲット定量アプローチである SWATH 法を利用した Phospho-SWATH 法の構築を行い、リン酸化ペプチドを大規模かつ多点での定量に成功した。

## A. 研究目的

最適な個別化医療の実現のためには、治療薬（主に分子標的薬）の効果や副作用を予測し、投薬が適切な患者を選定するためのコンパニオン診断薬の開発が急務である。FDA は 2011 年 7 月に早くもコンパニオン診断薬のドラフトガイダンスを発表し、コンパニオン診断薬の開発推進に対する積極的な姿勢を示している。

既存のコンパニオン診断薬は標的分子の遺伝子変異の有無のみを調べているが、薬が効くと診断されても実際は効かない例が多い。例えば、大腸がんの分子標的薬セツキシマブは EGFR を阻害することでその下流の増殖シグナルを抑えるが、KRAS 遺伝子に変異があるとその下流のシグナルが恒常的に活性化

されるため、EGFR を阻害しても増殖シグナルは抑えられない。そこで KRAS 遺伝子検査を行い、変異のない症例にセツキシマブが投与されているが、その中でも効果が認められるのは約 3 割に過ぎない。その理由として、KRAS 遺伝子野生型でも ERBB2/3 や MET など複数のバイパスシグナル群により、あたかも KRAS 遺伝子変異型と同様に下流のシグナルが活性化されているため、もしくは他の増殖シグナルが活性化されているためと考えられている。そのため、薬効を予測するためには、個々の遺伝子変異だけでなく、上述の未知のバイパスシグナルを調べることが必須である。生体内のシグナル伝達はタンパク質リン酸化が主体であるため、網羅的なリン酸化タンパク質の解析を行えば、どのシグナ

ルが薬効に重要なことを知ることができ、コンパニオン診断薬の創出につながる。このリン酸化タンパク質の解析は遺伝子変異・発現解析では困難で、プロテオミクスでしかできない。さらに、バイパスシグナルを調べることは、薬効予測だけでなく、薬剤耐性のメカニズムや耐性を克服する新規治療薬の開発につながるほか、予想外の副作用予測マーカーの同定が可能となる。

そこで本研究では、最新のプロテオミクス技術を活用して、リン酸化タンパク質によるシグナルネットワーク（面）の異常を網羅的に捉え、次世代コンパニオン診断薬の創出を行うことを目的とする。

## B. 研究方法（各研究分担者の研究方法の項参照）

### C, D. 研究結果および考察

#### C, D-1. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発：朝長毅

##### 1. SRM/MRM 法を用いたリン酸化タンパク質定量法の確立

本法ではキナーゼを酵素消化した後に活性化指標リン酸化ペプチドを SRM 法で定量する。リン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドと比べてイオン化効率が著しく低い。リン酸化ペプチドを LC-MS/MS で測定する場合は、リン酸化ペプチドの濃縮が必要になる。そこで、代表的なリン酸化ペプチド濃縮法である Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC)法を用いた。

リン酸化ペプチドを実測する方法として、まずは大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、主要なキナーゼ 230 種のうち 186 種類のキナーゼのリン酸化修飾ペプチドが同定された。活性化指標リン酸化修飾に着目した場合、例えば EGFR シグナル伝達関連キナーゼ 28 種類中では 14 種類が同定されていた。

大規模ショットガンプロテオミクスで同定

できなかったキナーゼに関しては、アフィニティー精製したキナーゼあるいは活性型リコンビナントキナーゼの測定で穴埋めする。2つの方法を比較した結果、活性型リコンビナントキナーゼを用いた方が簡便で感度も優れていた。活性型リコンビナントキナーゼを解析する場合はそれらを手に入れる手段が必要であるが、企業との共同研究契約を結ぶことで、400 種類近くのキナーゼを手に入れることができた。これら活性型リコンビナントキナーゼの全てをトリプシン消化、IMAC 精製した後に LC-MS/MS でショットガン解析した。今後、MS/MS 解析データから、SRM 標的配列と測定パラメータを決定しリスト化する予定である。

SRM 法でペプチドを定量する場合、測定間での誤差が生じる場合がある。そこで、安定同位体標識した内部標準ペプチドを添加することで安定して定量する技術確立した (Narumi et al., J. Proteome Res. 2012; Muraoka et al., J. Proteome Res. 2012)。タンパク質消化物に内部標準リン酸化ペプチドを添加してから IMAC リン酸化ペプチド精製し、SRM 測定する。一度に数十種類のターゲットを定量することも可能である。濃度既知の安定同位体標識ペプチドを用いれば SRM 法で絶対定量することも可能である。

平成 24 年度は SRM/MRM 法を用いたリン酸化タンパク質定量法の開発を進めた。SRM 測定パラメータリストを作成する段階が律側となっているが、活性型リコンビナントキナーゼを用いた SRM 測定パラメータ設定が可能になったので、技術開発のペースが増していくと思われる。

リン酸化タンパク質定量に関して SRM/MRM 法と対比する技術は抗体アレイ法などである。SRM 法は、リン酸化抗体を必要としない点、特異性が高い点、一度に多種類のリン酸化タンパク質を定量できる点など抗体アレイ法よりはるかに優れている技術である。今後は、どの程度感度を向上させることができるかが問題となる。それがクリア

できれば、種々の薬剤処理に対して、細胞内シグナルがどう動くかを俯瞰的にみることが可能となり、コンパニオン診断薬の開発や薬剤耐性のメカニズムの解明に貢献できる。

## 2. 大腸癌培養細胞株の抗 EGFR 抗体薬感受性分類とキナーゼ活性化レベルプロファイリング

キナーゼの活性化レベルを測定することで、抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能かどうかを明らかにする必要がある。そのために、大腸癌培養細胞株を抗 EGFR 抗体薬感受性株と耐性株に分類し、それらのキナーゼ活性化レベルのプロファイリングを進めている。大腸癌培養細胞株に抗 EGFR 抗体薬セツキシマブを 0、0.5、5、50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加し、72 時間後に WST-8 試薬を用いて細胞増殖試験を行った。これまでの報告通り、KRAS G12V 変異株や BRAF V600E 変異株はセツキシマブに対し耐性を示した。上記の KRAS、BRAF 遺伝子変異を持たない細胞株では、感受性株と耐性株が混在していた。セツキシマブ感受性株ではセツキシマブ処理により、実際に Erk などの活性化レベルが抑制された。セツキシマブ感受性株、耐性株 (KRAS G12V 変異体、BRAF V600E 変異体、それ以外) について、キナーゼ活性化指標リン酸化抗体を用いた Western blot 解析を進めている。その結果の一例として、BRAF V600E 変異体では Mek1/2 の活性化レベルが上がっており、KRAS G12V 変異体では Akt の活性化レベルが上がっていた。これらの結果はキナーゼ活性化レベルのプロファイリングにより、抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能であることを示唆している。

活性化キナーゼレベルの解析により、KRAS G12V 変異株、BRAF V600E 変異株は Mek や Akt の活性化状態で区別できることが示唆された。上記遺伝子変異体以外の耐性株では Mek と Akt の活性化変動は比較的小さく、別の活性化キナーゼマーカを見出す必要がある。現在、40 種類以上のキナーゼ活

性化指標リン酸化修飾抗体を用いたプロファイリングを進めており、今後新たな活性化キナーゼマーカが見つかることを期待している。新規活性化キナーゼマーカの発見により、遺伝子変異ではできなかった患者選別が可能になると思われる。

## C, D-2. 定量的リン酸化プロテオミクス技術の開発と GIST における imatinib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用：仲 哲治

### 1. iTRAQ 法によるチロシンリン酸化タンパク質の網羅的解析技術の開発と、imatinib により発現差が変動するリン酸化タンパク質の探索

GIST-T1 細胞に 1 $\mu\text{M}$  imatinib を添加前と添加後 1, 6, 24 時間後のタンパク質について、imatinib の標的である KIT のチロシンリン酸化レベルとその下流の p44/42 の活性化をウェスタンブロット法により確認した。その結果、GIST-T1 において、時間依存的に c-KIT、および、p44/42 のリン酸化レベルの低下より、活性化が阻害されていることが確認された。

そこで、imatinib 暴露時に変動するチロシンリン酸化タンパク質のレベルの網羅的な定量解析を行う手法の開発を試みた。方法としては、抗チロシンリン酸化抗体ビーズによるチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と、ポストラベル法として使用されている定量的プロテオーム解析試薬である iTRAQ 試薬を組み合わせることとした。GIST-T1 細胞に 1 $\mu\text{M}$  imatinib を添加前と添加後 1, 6, 24 時間後のタンパク質 40mg を調製し、還元アルキル化・トリプシン消化を行った。抗チロシンリン酸化抗体ビーズによるチロシンリン酸化ペプチドの濃縮時におけるロスの違いがサンプル間でばらつきの原因となることが考えられる。そこで、酵母のエノラーゼタンパク質の配列に由来するチロシンリン酸化ペプチドを合成し、4 種類に等量ずつ加え、質量分析計による測定とデータ解析時に、内部標準ペプチドの発現比率が 1:1 となるように補正した。



チロシンリン酸化抗体ビーズを用いたチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と、iTRAQ 法による解析の結果、171 種類のチロシンリン酸化ペプチド(134 種類のチロシンリン酸化タンパク質)が同定された。定量解析の結果、各種サンプルに等量ずつ加えた内部標準ペプチドのばらつきは 25%以下であり、補正を行った。その結果、GIST-T1 細胞に対して、imatinib 処理前と比較して処理後に 11 種類のチロシンリン酸化ペプチド(11 種類のチロシンリン酸化タンパク質)が 1.5 倍以上に上昇する事が明らかになった。一方で、21 種類のチロシンリン酸化ペプチド(15 種類のチロシンリン酸化タンパク質)が 0.3 倍以下に低下する事が明らかになった。

## 2. iTRAQ 法により検出されたタンパク質のチロシンリン酸化の変動のウェスタンブロット法による確認

代表的な結果として、KIT については、Y609, Y703, Y747, Y823, Y936 のチロシンリン酸化の減少が認められた。対照的に、imatinib 処理によって、FYN (Y420) と FAK (Y576) のリン酸化レベルの上昇が検出された。imatinib 処理により FYN (Y420) のリン酸化レベルの上昇はウェスタンブロット法でも確認されたが、その他の Src ファミリーキナーゼのリン酸化レベルの上昇は認められなかった。同様に、imatinib 処理により FAK (Y576) のリン酸化レベルの上昇とともに、iTRAQ 解析では検出されなかったが、FAK の活性化と関係する FAK (Y397) のリン酸化上昇がウェスタンブロット法でも確認された。このことから、iTRAQ 法によるチロシンリン酸化タンパク質の網羅的な解析は抗癌剤処理時に変動するタンパク質のチロシンリン酸化レベルを探索する上で適した手法である事が確認された。

## 3. Fyn のノックダウンにより imatinib 感受性が向上する

GIST-T1 は imatinib 処理によって Fyn 及

び、FAK の活性化が生じる。これらの活性化を抑制することが imatinib の感受性を向上させることにつながるか検討することとした。GIST-T1 において、Fyn の shRNA 安定発現株を樹立する事で、Fyn の発現を持続的にノックダウンさせたクローン B1, B2, B3 及び、コントロールベクター由来のクローン C を樹立した。クローン C に対して、クローン B1, B2, B3 は Fyn の発現が低下していることがウェスタンブロット法で確認された。さらに、これらのクローンに対して imatinib の IC<sub>50</sub> を測定した結果、クローン C に比べてクローン B1, B2, B3 では imatinib の IC<sub>50</sub> が有意に低下していることが確認された。

## 4. FAK のノックダウンにより imatinib 感受性が向上する

続いて GIST-T1 において FAK の siRNA を用いて、FAK の発現をノックダウンさせることが imatinib の感受性を向上させることにつながるか検討することとした。その結果、FAK の siRNA をトランスフェクションさせ、imatinib の IC<sub>50</sub> を測定した結果、コントロール siRNA 処理群と比較して FAK の siRNA 処理群では imatinib の IC<sub>50</sub> が有意に低下することが明らかとなった。さらに、GIST-T1 において FAK 特異的阻害剤である TAG372 を用いて FAK の活性阻害と imatinib を併用すると、imatinib の感受性が高まることが明らかとなった。

## 5. Imatinib 耐性株において FAK の活性化が検出される

GIST-T1 に imatinib を低濃度で暴露して徐々に濃度を高めることにより、GIST-T1R2 と GIST-T1R8 の 2 種類の imatinib 耐性株を樹立した。これらの耐性株においては親株と比較して FAK の恒常的な活性化が検出された。GIST-T1R2 に TAG372 を処理すると濃度依存的な FAK の活性化の阻害が核にされた。そこで、imatinib 耐性 GIST-T1 株において、TAG372 処理が imatinib の感受性を

高めるかどうかを解析した結果、GIST-T1R2 に対して、TAG372 は濃度依存的に imatinib の感受性を高める効果を示すことが明らかとなった。さらに、GIST-T1R2 に対して、TAG372 は imatinib と併用することで、アポトーシスを誘導する事で imatinib 耐性株に対して抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

### C, D-3. コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究：角田慎一

がん細胞から分泌される exosome 上のプロテオームを解析するため、2 種類の大腸がん細胞株 SW480 と SW620 をモデルがん細胞として、その培養上清から exosome の回収・精製を試みた。各培養上清から超遠心を利用して、exosome 画分を濃縮した。exosome は、粒径 100 nm 程の脂質二重膜であり、CD63 といったテトラスパニンファミリーの発現が報告されているため、まず、得られた exosome の物性・特性を解析した。始めに、動的光散乱法により粒子径を測定した結果、各細胞から分泌された exosome の粒子径はいずれも約 100 nm 付近に単一のピークが観察された(平均粒子径は、SW480 で 106 nm、SW620 で 85 nm)。そこで次に、電子顕微鏡観察により、exosome の形状を観察した。その結果、SW480・SW620 とともに、先ほどの動的光散乱法による解析結果と相関し、その粒径は 100 nm 前後であった。さらに、既存の報告と同様、脂質二重膜から構成される粒子状物質であることが示唆された。最後にこれらの粒子が exosome であることを確認するため、exosome マーカーとして知られる CD63 と TSG101 の発現を Western Blot 法にて検証した。その結果、両粒子とも目的の分子量に単一のバンドが観察され、本手法によりがん細胞から分泌される exosome を回収・濃縮できていることが確認された。

そこで次に、これら exosome 上に発現するプロテオームを解析するため、exosome を可溶化液にて蛋白質を抽出し、トリプシン処理

後、質量分析により蛋白質の同定を試みた。その結果、SW480 由来の exosome から 79 種類、SW620 由来の exosome から 144 種類の蛋白質が同定され、48 種類の蛋白質が共通して発現していることが判明した。この中には、exosome マーカーとして知られている CD63 や CD9 といったテトラスパニン分子も含まれており、実験系の有用性が改めて示された。さらに、Eph receptor A2 や Transferin receptor protein 1 などが関連膜蛋白質も同定された。特に、Eph receptor A2 については、そのモノクローナル抗体が固形癌に対する治療薬として臨床試験中で有り、がん細胞から分泌される exosome 上の蛋白質に着目した解析の有用性が示唆された。今後、これら分子のがん組織と血中 exosome 上での発現量の相関を解析すると共に、更に候補蛋白質を増やすことによって、コンパニオン診断薬に資するバイオマーカー蛋白質の同定を推進していく予定である。

### C, D-4. コンパニオン診断薬（薬剤効果予測マーカー）の開発：平野 久

金属アフィニティークロマトグラフィーで濃縮・精製したリン酸化ペプチドを MS で分析した結果、3 種類の GIST 細胞株から、4,596 種類のリン酸化ペプチド、1,386 種類のリン酸化タンパク質を同定することができた。

検出された 1,386 のタンパク質のうち、約 100 種類のタンパク質は、リン酸化レベルが 4 倍以上変動していることがわかった。その中には、がん細胞の増殖に係わっているとされるチロシンキナーゼ (#1) が含まれていた。このタンパク質のリン酸化レベルは、耐性細胞株で上昇した。RT-PCR で調べたところ、#1 をコードする mRNA の量も耐性細胞株で増大していることがわかった。また、ウェスタンブロットティングによって #1 タンパク質の量が増えていることが明らかになった。従って、転写量が増大し、タンパク質産生量が増えることにより、リン酸化レベルが上昇し

ているものと考えられた。

そこで、イマチニブ投与後、耐性細胞株 R200 に #1 チロシンキナーゼ阻害剤とイマチニブを同時に処理したところ、R200 においてがん細胞の増殖抑制効果が認められた。従って、#1 チロシンキナーゼがイマチニブ耐性に係わっている可能性があると考えられた。

#### C, D-5. タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量：山田哲司

逆相コートガラススライド ProteoChip は自家蛍光を發せず、高感度な蛍光シグナルの検出が可能であった。細胞抽出液の希釈に応じて蛍光シグナルが減弱し、定量性があることが示された。EGF で 10 分間刺激した A431 細胞では 10 倍以上の Shc タンパク質のリン酸化の亢進が検出され、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路の活性化が起きていることが確かめられた。

今回開発した逆相タンパク質アレイ (Reverse Phase Protein Array; RPPA) によるリン酸化タンパク質の定量解析法は多くのリン酸化部位特異的な抗体ライブラリーと組み合わせることで網羅的なリン酸化プロファイルに可能であり、コンパニオン診断薬開発のためのシグナル伝達ネットワーク解析の強力な基盤となるものと考えられる。今後、分子標的薬剤の処理前後で細胞株におけるリン酸化プロファイルの変化の検出や微小な臨床組織検体を用いた基盤の最適化を進める必要がある。

#### C, D-6. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究：中山敬一

##### 1. リン酸化ペプチドの高効率大規模同定

われわれはこれまでに金属イオンキレートクロマトグラフィー (IMAC) を用いてリン酸化ペプチドを高純度で精製できる方法を確立している。本方法をより効率的に行うためにゲル濾過や分取型 SDS-PAGE (Gelfree 法) を用いてタンパク質レベルでの事前分画を行い、

各分画を酵素消化後、リン酸化ペプチドを精製した。得られたリン酸化ペプチドに対して SWATH 法での測定と同様のグラジエント条件 (1 測定 120 min) でデータ依存分析を行った。また、各試料には既に開発している保持時間マーカーをスパイクすることで保持時間情報を元にしたピーク検出の精度向上を図った。得られたデータは MASCOT および ProteinPilot によるデータベース検索によってリン酸化ペプチドの配列を同定した。同定されたリン酸化ペプチドの情報は新たに作成した Phospho-SWATH 用事前情報データベースに格納した。

##### 2. Phospho-SWATH 法の実施

定量計測に用いるサンプルは少量のタンパク質量であることが本方法のメリットである。そこで 200  $\mu\text{g}$  相当の前細胞抽出液をメタノールクロロフォルム沈殿後、酵素消化し、得られた消化物を 100  $\mu\text{l}$  の IMAC ビーズを充填したチップカラムに導入し精製を行った。本チップカラムは C18 メンブランをフリットとして使用しているため、精製後、脱塩処理までを単一カラムで実施できるため微量検体の処理に向いている。得られたリン酸化ペプチドを SWATH 法によるデータ取得を行った。SWATH 法はグラジエント条件や SWATH の測定パラメーターを詳細に検討しより、効率よくリン酸化ペプチドの定量に適した条件を設定した。

リン酸化ペプチドデータベースから、任意のタンパク質のリン酸化ペプチドの情報をダウンロードして、PeakView (ABSciex の SWATH 解析用ソフトウェア) に読み込ませることで SWATH データから目的リン酸化ペプチドの抽出クロマトグラムを得ることができた。検証実験として HeLa 細胞への EGF 刺激後のリン酸化の変化を追跡したところ、EGF 受容体や MAP キナーゼのリン酸化の経時変化を正確に捉えることに成功した。

本年度は phospho-MRM 法の欠点を補完する手法として新たに phospho-SWATH 法を構築した。Phospho-SWATH 法は現時点で

は内部標準を使用していないため、絶対定量は出来ていないが、MRM 測定メソッドを作成することなく簡便に定量情報の取得が可能であることが大きな利点である。また、リン酸化ペプチドの同定作業は事前に一度だけ大規模に行えば良く、量を得ることが困難な試料（臨床検体）に関してはモデル細胞（培養細胞）を用いて事前情報を取得しておけば、実際の検体に関しては少量で定量実施が可能となり、今後のバイオマーカー探索などへの応用に向けて大きなメリットがある。

現時点では得られた SWATH データとリン酸化データベースに格納されたデータのヒモ付には質量分析メーカー提供のソフトウェアを利用しているため、リン酸化ペプチド解析に特有の問題が多数生じており、実用面では未だ不完全である。今後、Phospho-SWATH をより実用化するためのソフトウェアの独自開発が必須であると思われる。

## E. 結論

### E-1. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発：朝長 毅

SRM/MRM 法を用いたリン酸化タンパク質定量法の開発を行った。特に活性化リコンビナントキナーゼを用いて、細胞内主要シグナルを担う 400 種類弱のキナーゼ活性化レベルの SRM/MRM 測定のための検討を行った。

大腸癌培養細胞株の抗 EGFR 抗体薬感受性株と耐性株で種々のキナーゼの活性化レベルを測定した。その結果、耐性株ではこれまで耐性の原因と考えられていた Mek と Akt の活性化以外の原因が耐性化に関与していることが示唆された。

### E-2. 定量的リン酸化プロテオミクス技術の開発と GIST における imatinib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用：仲哲治

チロシンリン酸化ペプチドの濃縮と iTRAQ 法により、チロシンリン酸化ペプチド

の網羅的定量法を確立した。本手法により、GIST における imatinib 獲得耐性のバイパス経路として Fyn と FAK の活性化の関与を明らかにした。GIST の imatinib 獲得耐性に Fyn、および、FAK が創薬標的分子、および、コンパニオン診断薬となり得る可能性が示唆された。

今回、GIST 細胞株を使用した。細胞株よりも癌の性質を保持している事で知られている GIST 患者より調製した Cancer Tissue-Originated Spheroids (CTOS) を用いて解析を進めることを検討している。

### E-3. コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究：角田慎一

コンパニオン診断薬開発に適うバイオマーカー蛋白質を探索する対象として、がん細胞から分泌される exosome 上の膜蛋白質に着目して解析した。その結果、現在、臨床試験中の抗体医薬の標的である Eph receptor A2 を同定することができ、コンパニオン診断薬に応用しうるバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

### E-4. コンパニオン診断薬(薬剤効果予測マーカー)の開発：平野 久

今年度の研究で、GIST 細胞株から、4,596 種類のリン酸化ペプチド、1,386 種類のリン酸化タンパク質を同定した。GIST 細胞株にイマチニブを投与すると、KIT をはじめとする多種類のタンパク質のリン酸化に変動が見られた。イマチニブの継続投与によってそれらの一部にはリン酸化の回復が見られた。また、イマチニブ耐性株では、細胞増殖に係わる受容体型チロシンキナーゼの活性の増大が見られた。これを抑えると耐性株はイマチニブ感受性を示した。このことから、このタンパク質は、薬剤効果を予測するバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えられた。

### E-5. タンパク質マイクロアレイ等を用いた

## リン酸化タンパク質定量：山田哲司

ガラス基板上に細胞や組織のタンパク抽出液をアレイ化し、蛍光色素と独自の増感技術を用いて抗体との反応を検出する逆相マイクロアレイ法をリン酸化タンパク質の発現解析に応用し、ウエスタン法に必要とされる1/10,000以下の微量な試料でリン酸化タンパク質を網羅的かつハイスループットに解析できる基盤を確立した。

## E-6. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究：中山敬一

新規リン酸化定量プロテオーム解析法である Phospho-SWATH 法を開発した。さらに、実際に Phospho-SWATH 法を用いて、EGF 刺激に伴う大規模なリン酸化の定量情報取得に成功した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Shiromizu, T., Adachi, J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S. & Tomonaga, T. Identification of Missing proteins in the neXtProt database and unregistered phosphopeptides in the PhosphoSitePlus database as part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.*, in press (2013).
2. Muraoka, S., Kume, H., Adachi, J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T., Ishihama, Y. & Tomonaga, T. In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein list. *J. Proteome Res.* **12**, 208-13 (2013).
3. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K. & Tomonaga, T. A Strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-22 (2012).
4. Muraoka, S., Kume, H., Watanabe, S., Adachi, J., Kuwano, M., Sato, M., Kawasaki, N., Kodera, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Miyamoto, Y., Kato, K. & Tomonaga, T. A strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 4201-10 (2012).
5. Nishioka, C., Ikezoe, T., Furihata, M., Yang, J., Serada, S., Naka, T., Nobumoto, A., Kataoka, S., Tsuda, M., Udaka, K. & Yokoyama, A. CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. *Int. J. Cancer.*, in press (2012).
6. Yokoyama, T., Enomoto, T., Serada, S., Morimoto, A., Matsuzaki, S., Ueda, Y., Yoshino, K., Fujita, M., Kyo, S., Iwahori, K., Fujimoto, M., Kimura, T. & Naka, T. Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int. J. Cancer* **132**(2), 472-84 (2013).
7. Yang, L., Serada, S., Fujimoto, M., Terao, M., Kotobuki, Y., Kitaba, S., Matsui, S., Kudo, A., Naka, T., Murota, H. & Katayama, I. Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma *PLoS One.* **7**(7):e41994. (2012)
8. Kotobuki, Y., Tanemura, A., Yang, L., Itoi, S., Wabaya-Kaneda, M., Murota, H.,

- Fujimoto, M., Serada, S., Naka, T. & Katayama, I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(2): 219-30. (2012)
9. Otsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway S J, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 21(5), 331-6. (2012)
  10. Serada, S., Fujimoto, M., Terabe, F., Iijima, H., Shinzaki, S., Matsuzaki, S., Ohkawara, T., Nezu, R., Nakajima, S., Kobayashi, T., Plevy, S E., Takehara, T. & Naka, T. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 18(11):2169-79. (2012)
  11. Iwahori, K., Suzuki, H., Kishi, Y., Fujii, Y., Uehara, R., Okamoto, N., Kobayashi, M., Hirashima, T., Kawase, I. & Naka, T. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer. *Tumour Biol.* 33(4), 1141-9. (2012).
  12. 世良田聡, 藤本穰, 仲哲治: Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. 潰瘍性大腸炎の疾患活動性マーカーとしての血清ロイシンリッチアルファ2グリコプロテイン *Intestine* 17(1), 107-109 (2013).
  13. Yamashita, T., Okamura, T., Nagano, K., Imai, S., Abe, Y., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer. *Pharmazie*, 67(3), 253-255 (2012).
  14. Yamashita, T., Nagano, K., Kanasaki, S., Maeda, Y., Furuya, T., Inoue, M., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Itoh, N., Abe, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S. Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421(1), 140-4 (2012).
  15. Takano, M., Yamashita, T., Nagano, K., Otani, M., Maekura, K., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Tomiyama, T., Mori, H., Matsuura, K., Matsuyama, S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neuroscience Letters* 534:85-9 (2013).
  16. 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(4):473-477, 2012.
  17. Kohda, K., Kakegawa, W., Matsuda, S., Yamamoto, T., Hirano, H. & Yuzaki, M. Gating of LTD by  $\delta 2$  glutamate receptors-a new mechanism by coordinated interaction between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E948-957 (2013).
  18. Satake, T., Otsuki, K., Banba, Y., Suenaga, J., Hirano, H., Yamanaka, Y., Ohno, S. and Hirai, S. -I. The interaction of Kinesin-1 with its adaptor protein JIP1 can be regulated via proteins binding to the JIP1-PTB domain. *BMC Cell Biology* 14, 12 (2013).
  19. Takahashi, E., Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Hirano, H., Kasuga,

- M. and Kaburagi, Y. Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK-A<sup>y</sup> mouse model using the iTRAQ technique. *J. Proteomics*, in press.
20. 木村弥生, 野村文子, 井野洋子, 小原 收, 平野 久: Phos-tag アガロースおよび質量分析装置を用いたリン酸化ペプチドのショットガン分析. *生物物理化学* **56**, s25-28 (2012).
  21. 木村弥生, 永田佳代子, 平野 久, 小原 收. 二次元 Phos-tag 親和性電気泳動. *生物物理化学*. **56**, s21-24 (2012).
  22. Makuuchi, Y., Honda, K., Osaka, Y., Kato, K., Kojima, T., Daiko, H., Igaki, H., Ito, Y., Hoshino, S., Tachibana, S., Watanabe, T., Furuta, K., Sekine, S., Umaki, T., Watabe, Y., Miura, N., Ono, M., Tsuchida, A. & Yamada, T. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci.*, in press.
  23. Ohtomo, R., Mori, T., Shibata, S., Tsuta, K., Maeshima, AM., Akazawa, C., Watabe, Y., Honda, K., Yamada, T., Yoshimoto, S., Asai, M., Okano, H., Kanai, Y. & Tsuda, H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod. Pathol.*, in press.
  24. Fukushima, S., Yoshida, A., Honda, K., Maeshima, AM., Narita, Y., Yamada, T., Shibui, S. & Tsuda, H. Immuno-histochemical actinin-4 expression in infiltrating gliomas: association with WHO grade and differentiation. *Brain Tumor Pathol.*, in press.
  25. 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**(2):753-62 (2013).
  26. 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**(2), 103-9 (2013).
  27. Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S.W., Nakayama, K.I., Nakayama, K. & Lo, K.W. Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene* **31**, 1975-1987 (2012).
  28. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T. & Nakayama, K.I. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis. *J. Proteome Res.* (2012).
  29. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa, A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Liu, N., Niida, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Yamamoto, T. & Kitagawa, M. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One* **7**, e36249 (2012).
  30. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H. & Kitagawa, M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBO J.* **31**, 2365-77 (2012).
  31. Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y.,

- Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K., Flores, L.G., Shao, Y., Hazle, J.D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M.C., Nakayama, K.I. & Lin, H.K. The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis. *Cell* **149**, 1098-111 (2012).
32. Fukushima, H., Matsumoto, A., Inuzuka, H., Zhai, B., Lau, A.W., Wan, L., Gao, D., Shaik, S., Yuan, M., Gygi, S.P., Jimi, E., Asara, J.M., Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Wei, W. SCF(Fbw7) modulates the NFkappaB signaling pathway by targeting NFkappaB2 for ubiquitination and destruction. *Cell Rep.* **1**, 434-43 (2012).
33. Ellman, M.B., Kim, J.S., An, H.S., Kroin, J.S., Li, X., Chen, D., Yan, D., Buechter, D.D., Nakayama, K., Liu, B., Morgan, S. & Im, H.J. The pathophysiologic role of the protein kinase Cdelta pathway in the intervertebral discs of rabbits and mice: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Arthritis Rheum.* **64**, 1950-1959 (2012).
34. Grim, J.E., Knoblaugh, S.E., Guthrie, K.A., Hagar, A., Swanger, J., Hespelt, J., Delrow, J.J., Small, T., Grady, W.M., Nakayama, K.I. & Clurman, B.E. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2160-67 (2012).
35. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* **32**(15):1921-32.(2012).
36. Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Tanaka, F., Sato, T., Toh, H., Sudo, T., Iwaya, T., Tanaka, Y., Onoyama, I., Kuwano, H., Nakayama, K.I. & Mori, M. Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **41**, 253-9 (2012).
37. Kita, Y., Nishiyama, M. & Nakayama, K.I. Identification of CHD7(S) as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7(L). *Genes Cells* **17**, 536-47 (2012).
38. Hoshi, H., Hao, W., Fujita, Y., Funayama, A., Miyauchi, Y., Hashimoto, K., Miyamoto, K., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, H., Yoshida, S., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T., Sano, M., Fukuda, K., Ohsawa, I., Ohta, S., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Toyama, Y. & Miyamoto, T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2015-23 (2012).
39. Okita, Y., Matsumoto, A., Yumimoto, K., Isoshita, R. & Nakayama, K.I. Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation. *Genes Cells* **17**, 768-77 (2012).
40. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 285-92 (2012).
41. Cremasco, V., Decker, C.E., Stumpo, D., Blackshear, P.J., Nakayama, K.I.,



- Nakayama, K., Lupu, T.S., Graham, D.B., Novack, D.V. & Faccio, R. Protein kinase C-delta deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2452-63 (2012).
42. Saita, S., Shirane, M. & Nakayama, K.I. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.* **4**, 1410 (2013).
43. Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K.I. & Fukada, Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106-18 (2013).
44. 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**, 347-61 (2013).
45. 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**, 362-75 (2013).
46. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J.*, in press. (2013).
1. 平野 久: プロテオミクス, 高山光男, 早川滋雄, 瀧浪欣彦, 和田芳直編, 現代質量分析学, 化学同人, 京都, p. 293-304, (2012).
2. Ino, Y., Kazamaki, R. and Hirano, H. On-membrane identification of gel-resolved proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). In: *Modern Methods in Protein Chemistry* (Tschesche, H. ed.) Walter De Gruyter, Berlin, p.113-126, 2012.
3. 木村弥生, 平野久: LC/MS/MS による疾患プロテオーム解析, 試料分析講座 タンパク質分析(日本分析化学会編), 丸善出版 (2012).

#### G-3. 学会発表

1. 朝長 毅: 最近のプロテオミクス技術の進歩とがん研究への応用. 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 千葉, 2012 年 4 月 14 日
2. 朝長 毅: 真のバイオマーカーの発見を目指して. 第 10 回日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
3. 朝長 毅: 疾患プロテオミクスの基礎と Human Proteome Project. 第 19 回日本遺伝子診療学会, 千葉, 2012 年 7 月 26-28 日
4. 朝長 毅: プロテオミクスを用いた新規腫瘍マーカーの探索と実用化. 第 32 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 札幌, 2012 年 9 月 18 日
5. 足立淳, 久家貴寿, 白水崇, 橋口一成, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012 年 9 月 6-9 日
6. 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 橋口一成, 鳴海良平, 渡邊史生, 桑野晶喜, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅,

#### G-2. 書籍

- 高田穰, 朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
7. 村上達夫, 久家貴寿, 足立淳, 白水崇, 宮本泰豪, 加藤菊也, 石飛真人, 稲治英生, 小寺義男, 朝長毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM/MRM によるヒト乳癌組織の検証法. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
  8. 足立淳, 久家貴寿, 白水崇, 久米秀明, 村岡賢, 橋口一成, 鳴海良平, 渡邊史生, 桑野晶喜, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: DNA 損傷初期応答シグナル解析から創薬標的の探索へ. 第 10 回北里疾患プロテオーム研究会, 神奈川, 2012 年 8 月 23 日
  9. 足立淳, 久家貴寿, 白水崇, 久米秀明, 村岡賢, 中山敬一, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
  10. 村上達夫, 久家貴寿, 足立淳, 白水崇, 中山敬一, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長毅: ヒト乳がん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM をベースにした検証法. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
  11. Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T, Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T: Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network. Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) 6<sup>th</sup> congress, Beijing, China, 5-7 May, 2012.
  12. Adachi J, Kuga T, Shiromizu T, Kume H, Muraoka S, Hashiguchi K, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T: Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling. HUPO2012 11<sup>th</sup> World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.
  13. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y Tomonaga T: ATP Accessibility Screening (AAS), a high-throughput and high-resolution kinase analysis platform for signaling research. 2<sup>nd</sup> Copenhagen Bioscience Conference, Copenhagen, Denmark, 2-5 December, 2012.
  14. Satoshi Serada, Yorihisa Kotobuki, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama, Tetsuji Naka: Quantitative proteomic analysis of tumor growth associated proteins in cutaneous malignant melanoma. 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; Mon, Apr 2, 2012.
  15. Akiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Shinya Matsuzaki, Takuhei Yokoyama, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Kiyoshi Yoshino, Minoru Fumimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka: Annexin A4 induces chemoresistance for multiple drugs in ovarian clear cell carcinoma. 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Mar 31-Apr 4, 2012, Chicago, Illinois Philadelphia (PA): AACR; 2012Tue, Apr 3.
  16. Yang L. Serada, M. Fujimoto, H. Murota, Y. Kotobuki, S. Kitaba, T. Naka, I. Katayama: Periostin, a novel extracellular matrix protein, is required for cutaneous sclerosis in mouse model of scleroderma. EULAR 2012 Berlin,

- Germany, 6 - 9 June 2012.
17. Satoshi Serada, Tsuyoshi Takahashi, Maiko Urase, Minoru Fujimoto, Emi Harada, Toshiro Nishida, Tetsuji Naka: Quantitative phospho-proteomic analysis of gastrointestinal stromal tumors associated with imatinib resistance 定量的リン酸化プロテオーム解析による消化管間質腫瘍のイマチニブ耐性因子の探索, 第 10 回日本ヒトプロテオーム学会 2012 年 7 月 26 日 (木) ・ 27 日 (金) 会場 日本科学未来館 7 階
  18. Yang, L. Murota, M. Fujimoto, S. Serada, M. Yong, T. Ohkawara, T. Naka, I. Katayama: Up-regulation of interleukin 8 and CXC chemokine ligand 1 by cold stimulation in human dermal microvascular endothelial cells: A role in winter ulceration and cold urticaria. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September, Geneva- Switzerland.
  19. Yong Mei, M. Fujimoto, T. Ohkawara, L. Yang, S. Serada, S.-I. Tsunoda, T. Naka: Interleukin (IL)-6 deficiency does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutation. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September, Geneva- Switzerland.
  20. Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka. : Heterogeneous Nuclear RNP-K is a Novel Cold-Related Autoantigen in Patients with Raynaud's Phenomenon. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, Geneva- Switzerland 2012., September 11-14., ACR/ARHP Annual Meeting, Washington, DC, November 9-14, 2012.
  21. Kamada H., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Nagano K., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Detection of drug-target proteins on tumor-derived exosomes by ELISA using anti-CD81 antibodies, EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
  22. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Furuya T., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Distribution and functional analysis of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer, The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS 2012), Quebec (Canada), 15-18 July, 2012.
  23. Nagano K., Yamashita T., Kamada H., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Katayama S., Yoshioka Y., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteome analysis of lung cancer cell-derived exosomes for discovery of diagnostic biomarkers, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.
  24. 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: がん個別化医療のためのシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索., 第 28 回日本 DDS 学会学術集会., 札幌 (北海道) , 2012 年 7 月.
  25. 鎌田春彦, 山下琢矢, 長野一也, 前田祐香, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央, 角田慎一: がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索., 日本プロテオーム機構 第 10 回大会, 東京(東京), 2012 年 7 月.
  26. 山下琢矢, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 糟谷史代, 堤 康央, 角田慎一: exosome由来膜タンパク質のプロテオーム解析による

- 新規肺がんバイオマーカーの探索., 第 37 回日本医用マスメクトル学会年会., 名古屋 (愛知), 2012 年 10 月.
27. 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 向 洋平, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: プロテオミクスによるシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索と評価., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.
  28. 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, Hart, G. W., 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病角膜症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
  29. 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 glycoproteomics 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
  30. 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
  31. 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
  32. 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, ハインツ・コンベンションセンター, ボストン, 2012.9.9
  33. 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
  34. 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
  35. 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
  36. 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
  37. 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
  38. 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
  39. 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
  40. 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
  41. 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
  42. 井野洋子: 前立腺癌のアンドロゲン非依存性に関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