

いて解析を進めることを検討している。

E. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Nishioka, C., Ikezoe, T., Furihata, M., Yang, J., Serada, S., Naka, T., Nobumoto, A., Kataoka, S., Tsuda, M., Uda, 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).
2. 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).
3. 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).
4. Kotobuki, Y., Tanemura, A., Yang, L., Itoi, S., Wataya-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).

5. Ontsuka, 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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グリコブロテイン *Intestine* **17**(1), 107-109 (2013).

G-2. 学会発表

1. 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; 2012 Mon, Apr 2.

2. Akiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Shinya Matsuzaki, Takuhei Yokoyama, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Kiyoshi Yoshino, Minoru Fujimoto, 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; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012 Tue, Apr 3.
 3. Yang S. Serada, M. Fujimoto, H. Murota, Y. Kotobuki, S. Kitaba, T. Naka, I. Katayama: Periostin, a novel matricellular protein, is required for cutaneous sclerosis in a mouse model of scleroderma. EULAR 2012 Berlin, Germany 6 - 9 June 2012.
 4. 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
 5. Yang, H. Murota, M. Fujimoto, S. Serada, M. Yong, T. Ohkawara, T. Naka, I. Katayama: Up-regulation of interleukin 8 and CXCL1 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.
 6. 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.
 7. Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka: Heterogeneous Nuclear RNP-K Is a Novel Cold-Related Autoantigen in Patients with Raynaud's Phenomenon. International Cytokine 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, in Washington, DC, November 9 -14, 2012. November 12 (ACR 2012 第 78 回米国リウマチ学会議).
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
 - 1) 発明の名称：結核検査用バイオマーカー
出願日：2012/4/3
出願番号：2012-84996
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所
発明者：仲哲治、藤本穰、世良田聡、松本智成
 - 2) 発明の名称：膠原病のレイノー症状を診断する免疫学的手法
出願日：2012/6/22
出願番号：特願 2012-141434
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所
発明者：仲哲治、藤本穰、世良田聡
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

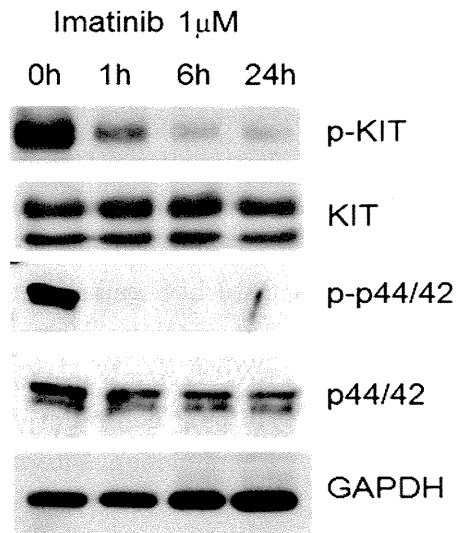


図1. GIST-T1細胞においてimatinib処理によりc-kit及び下流のp44/42 MAPKの活性化が抑制される

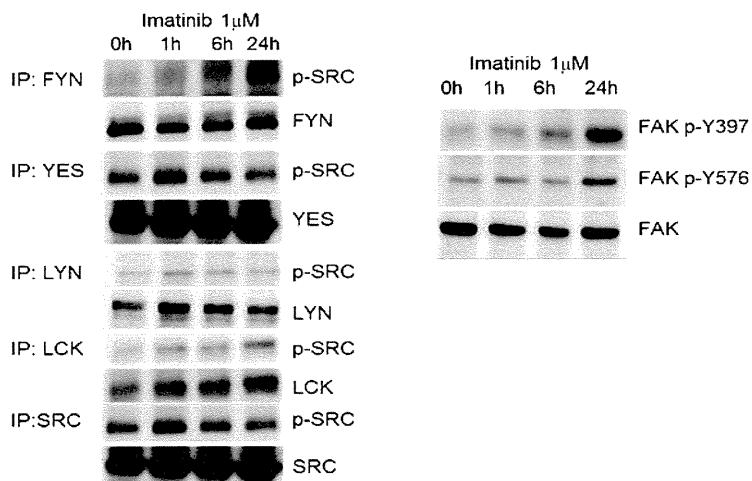


図2. ウェスタンブロット法によるimatinib処理によるチロシンリン酸化レベルの上昇の確認

- A: GIST-T1細胞においてimatinib処理によりSrcファミリーキナーゼの内、Fynのリン酸化が上昇する
- B: GIST-T1細胞においてimatinib処理によりFAKのリン酸化が上昇する

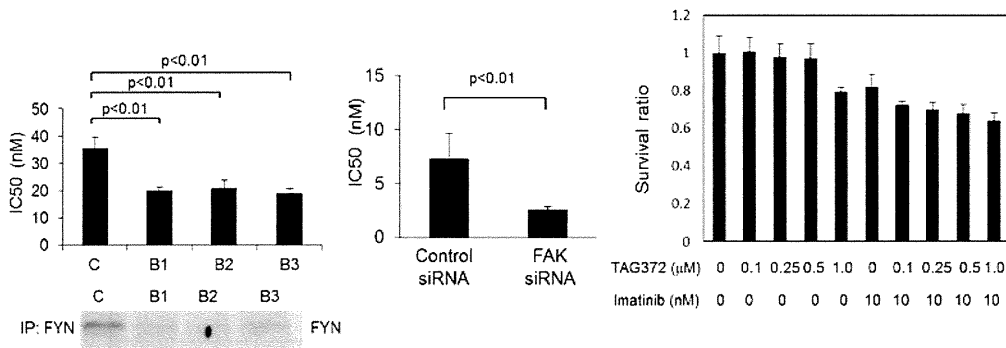


図3. GIST-T1細胞においてFyn及びFAKの発現抑制や活性阻害は imatinibの感受性を高める

- A: FynのshRNA安定発現株はimatinibの感受性が高くなる
- B: FAKのsiRNAによるFAK発現抑制はimatinibの感受性が高くなる
- C: FAKの特異的阻害剤TAG372はimatinibの感受性を高める

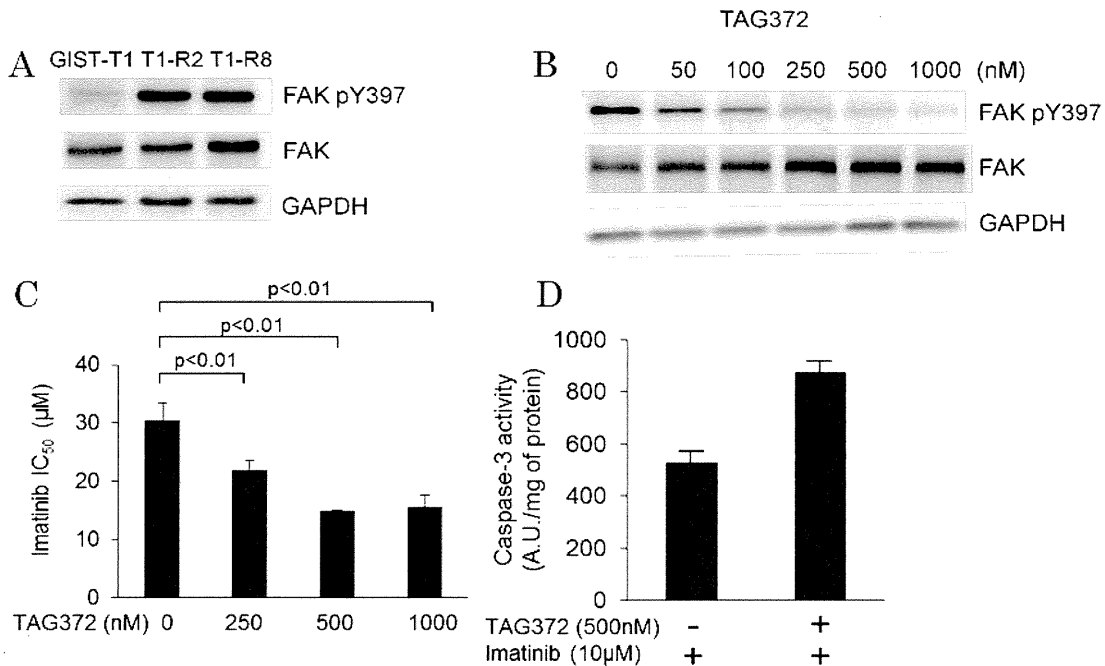


図4. Imatinib耐性GIST-T1細胞株はFAKの活性化が認められ、その阻害はimatinib感受性を高める

- A: imatinib耐性GIST-T1細胞株はFAKの活性化が検出される
- B: imatinib耐性GIST-T1-R2はFAK阻害によりFAKの活性化が低下する
- C: FAKの特異的阻害剤TAG372はimatinib耐性GIST-T1-R2において imatinibの感受性を高める
- D: FAKの特異的阻害剤TAG372はimatinib耐性GIST-T1-R2において アポトーシスを誘導する

表1. iTRAQ解析によるimatinib処理により発現レベルが上昇した
チロシンリン酸化ペプチド

Greater than 1.5-fold increase of phosphorylated peptide at 24 h compared with 0 h						
Accession Number	Sequence	Description	Site	1 h 0 h	6 h 0 h	24 h 0 h
P06241	LIEDNEYTAR	Tyrosine-protein kinase Fyn	Y420	0.845	2.365	3.641
P15880	AFVVAIGDYNGHVGL GVK	40S ribosomal protein S2	Y133	2.138	1.807	2.443
O00401	VIYDFIEK	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	Y256	0.768	1.491	1.978
Q99623	MLGEALSKNPGYIK	Prohibitin-2	Y248	1.446	1.778	1.726
P62829	NLYTISVK	60S ribosomal protein L23	Y38	2.138	1.348	1.679
P18433	VVQEYIDAFSDYAN FK	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha	Y791	1.245	1.098	1.667
P30040	FDTQYPYGEK	Endoplasmic reticulum resident protein 29	Y64	1.804	2.558	1.640
Q05397	YMEDSTYYK	Focal adhesion kinase 1	Y570	1.043	0.893	1.606
A6N128	LDTASSNGYQRPGS VVAAK	Rho GTPase-activating protein 42	Y792	0.599	0.980	1.594
P08758	LYDAYELK	Annexin A5	Y94	1.043	1.399	1.581
P18669	HYGGLTGLNK	Phosphoglycerate mutase 1	Y92	0.930	2.583	1.532

表2. iTRAQ解析によるimatinib処理により発現レベルが低下した
チロシンリン酸化ペプチド

Less than 0.3-fold reduction of phosphorylated peptide at 24 h compared with 0 h						
Accession Number	Sequence	Description	Site	1 h 0 h	6 h 0 h	24 h 0 h
P10721	IGSVIER	Mast stem cell growth factor receptor Kit	Y747	0.649	0.244	0.291
Q95490	SENEEYYE	Latrophilin-2	Y1350	0.431	0.318	0.256
Q92569	LQEYHSQYQEK	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	Y184	0.433	0.271	0.255
P10721	QEDHAEALYK	Mast stem cell growth factor receptor Kit	Y703	0.560	0.207	0.254
P10721	QISESTNHIYSNLAN CSPNR	Mast stem cell growth factor receptor Kit	Y936	0.445	0.212	0.244
Q92796	RDNEVDGQDYHFV VSR	Disks large homolog 3	Y673	0.556	0.427	0.241
Q5XXA6	STVYEILK	Anoctamin-1	Y251	0.508	0.220	0.235
Q00535	IGEGTYGVVFK	Cyclin-dependent kinase 5	Y15	1.877	0.821	0.232
Q06481	MQNHGYENFTYK	Amyloid-like protein 2	Y755	0.474	-*	0.220
Q95297	INKSESVVYADIR	Myelin protein zero-like protein 1	Y263	0.785	0.249	0.211
Q969M3	QYAGYDYSQQGR	Protein Y1PF5	Y42	0.145	-*	0.195
Q14964	VVQDTYQMIK	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	Y132	1.097	0.464	0.173
Q95297	SESVVYADIR	Myelin protein zero-like protein 1	Y263	0.563	0.169	0.166
Q92569	VQAEDLLYGEKPDGA FLIK	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	Y373	1.186	0.176	0.130
Q96000	YQDLGAYSSAR	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Y143	0.864	0.393	0.122
P16333	LYDLNMPAYVK	Cytoplasmic protein NCK1	Y112	0.651	0.257	0.103
Q12346	NILSSADYVER	Syntaxin-4	Y251	0.179	0.131	0.072
Q8N128	YQYAIDEYYR	Protein FAM177A1	Y162	0.196	0.090	0.055
P10721	VVEATAYGLIK	Mast stem cell growth factor receptor Kit	Y609	0.723	-*	0.023
P10721	DIKDNSNYVVK	Mast stem cell growth factor receptor Kit	Y823	0.164	-*	-*
P53778	QADSEMTGYVVTR	Mitogen-activated protein kinase 12	Y185	1.582	0.888	-*

*: 0 h での iTRAQ レポーターイオン値が有るが、1h, 6h, あるいは 24 h 時点でのレポーターイオン値が 0 であった

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

近年の分子標的治療薬の台頭に伴って、これら分子標的治療薬の薬効や副作用を予測しうるコンパニオン診断薬の開発が求められている。現在、分子標的治療薬のターゲット分子の発現量を評価するためのコンパニオン診断薬を中心に実用化が進んでいるものの、それらは、がんなどの疾患組織の生検組織や手術摘出組織を必要としている。そのため将来的には、より低侵襲な方法や術前での診断が可能なコンパニオン診断薬、およびその診断方法の開発が期待される。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ら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 なども含まれていた。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が示唆された。

A. 研究の背景・目的

抗体医薬を始めとする分子標的治療薬の台頭によって、がんや自己免疫疾患などの難治性疾患の治療成績が格段に向上している。しかし、ゲフィチニブによる副作用（間質性肺炎など）で多数の死亡例が報告されるなど、全ての患者に対して有効かつ安全に適用できる夢の万能薬ではない。この副作用報告に代表されるように、分子標的治療薬の使用にあたっては、標的分子の発現やがんのタイプ、既往歴（ゲフィチニブの場合、間質性肺炎や喫煙歴）などを指標に、副作用のリスクが少なく、効果が認められる患者を予め選別するためのコンパニオン診断薬の重要性が強く認識された。今後、ますます分子標的治療薬の開発・臨床使用が予想される現在、コンパニオン診断薬の果たす意義は大きい。

米国 FDA は 2011 年 8 月、悪性黒色腫の新規治療薬「Zelboraf」(vemurafenib)と、この医薬品の標的である変異型 BRAF たん白質 (BRAF V600E)を検出する診断薬「cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test」を同時認可したことを皮切りに、新薬の承認においては、その薬効を予測するコンパニオン診断薬の同時申請を求めるガイダンスを示し、バイオマーカーを用いた個別化医療に大きく舵を切った。この潮流に、我が国の製薬企業は勿論、医薬品と診断薬の審査体制と許認可体制（担当部局や審議会）も追従せざるをえない状況にある。本邦でも、関節リウマチになどに対する IL-6 受容体を標的とした抗体医薬トシリズムマブに続き、ようやく我が国 2 品目目の ATL に対する抗 CCR4 ヒト化抗体が承認されようとしているが、この申請の際には、

その標的となる CCR4 の発現量を確認する診断薬も同時申請されている。現在のコンパニオン診断薬は、がん組織を用いた診断法が主であるが、世界的にも、低侵襲な方法が期待されており、標的分子に対する抗体を放射ラベルして投与し、PET でイメージングする Immuno-PET 法や、薬効や副作用発現を予測しうる血中バイオマーカーの探索も注目されている。

血液中には、アルブミンなどの主要蛋白質が多量に存在する一方、バイオマーカーとなりうる蛋白質は微量である。多量に存在する主要蛋白質を除去する前処理法が種々試みられているものの、血清・血漿のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索は困難である。そこで我々は、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、分泌細胞由来の機能性分子を含有することが近年明かとなってきた膜小胞、exosome に着目した。exosome は、血中に多量に存在する主要蛋白質から容易に分離でき、抗体医薬の標的となるがん細胞由来膜蛋白質なども搭載されている。また、がん患者の血液中には、健常人と比べて多くの exosome が存在することも報告されているなど、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有望と考えた。そこで本年度は、がん細胞分泌 exosome 上の蛋白質をプロテオーム解析により同定し、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を検討した。

B. 研究方法

B-1. 細胞

ヒト大腸がん細胞である SW480 と SW620 は、ATCC より購入した。SW480 と SW620 は、10% FCS(Biowest)含有 Leibovitz's L-15 を用いて、37°C で培養した。いずれの細胞も継代培養し、サブコンフルエント状態のものを exosome 調製に供した。

B-2. 培養上清および培養上清由来 exosome の調製

各細胞を培養ディッシュ上で継代培養し、サブコンフルエント状態になったものを PBS で洗浄し、無血清培地 (OptiMEM 培地、Invitrogen) に置換して 72 時間培養した。培養上清を回収し、200 g で 5 分の遠心で細胞を除去し、上清を回収した。次に、上清を 16,000 g で 20 分間遠心分離し、上清を 0.22 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC) でろ過することで細胞デブリス等を除去した。回収した溶液を超遠心機により 140,000 g、70 分遠心分離し、ペレットに PBS を加えて、再度 140,000 g で 70 分遠心分離することで洗浄し、得られたペレットを PBS で懸濁し、exosome 分画として回収した。

B-3. exosome の蛋白質の定量

Exosome のたん白質量の測定は、PBS(pH 7.4)に懸濁した exosome 溶液を Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific)で測定した。

B-4. exosome の粒子径の測定

exosome の粒子径は動的光散乱法で測定した。蛋白質量として 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう PBS で調整した exosome を、Zetasizer Nano-ZS(Malvern Instruments)にて測定した。

B-5. exosome の電子顕微鏡観察

フォルムバル膜を張った銅メッシュグリッドをカーボン蒸着(30 \AA \times 3 回蒸着)した。親水化処理した後、パラホルムアルデヒドで固定した exosome サンプルを 5 μl 載せ 15~20 分吸着した。染色のため 2%酢酸ウラン溶液を添加し、濾紙で余分な溶液を除去した。乾燥させたサンプルメッシュを透過型電子顕微鏡 (HITACHI H-7650) により観察した。

B-6. exosome のプロテオーム解析

SW480 と SW620 の培養上清から精製した exosome を可溶化液にて蛋白質を抽出し、SDS-PAGE により蛋白質を分離した。ゲルを

均等に 8 分画し、切り出したゲル片に脱色液 (25 mM 炭酸水素アンモニウム / 50% アセトニトリル) を 100 μ l 加え、室温で 10 分間振盪した。脱色液を除いた後、200 μ l のアセトニトリル中で 10 分間振盪させ、更に減圧遠心器を用いて脱水した。このゲル片に 5 μ l のトリプシン溶液 (100 μ g/ml Trypsin (Promega) / 50 mM 炭酸水素アンモニウム) をしみこませ、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内のたん白質を消化した。これに抽出液 (50 μ l の 50% アセトニトリル / 0.1% ギ酸溶液) を加え、30 分間振盪して回収した。この操作をあと 2 回 (2 回目は 50 μ l の 80% アセトニトリル / 0.1% ギ酸溶液、3 回目は 50 μ l の 100% アセトニトリルで抽出) 繰り返すことで消化ペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は減圧遠心器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) を用いて精製してサンプル溶液とした。質量分析には LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) を用いた。たん白質の同定には、メチオニン残基の酸化、Iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮し、Mascot search により swiss prot のデータバンクをもとに解析した。

C. 研究結果

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) (Fig. 1 (a))。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 (Fig. 1 (b))。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 (Fig. 1 (c))、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 を可溶性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 (Fig. 1(c) 参照) 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 などがん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。

D. 考察

C. 研究結果に記載

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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).
2. 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).
3. 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. *Neurosci. Lett.* **534**, 85-9 (2013).
4. 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).

G-2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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回日本医用マスペクトル学会年会., 名古屋 (愛知), 2012年10月.

7. 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.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

I. 研究協力者

鎌田春彦	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
向 洋平	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
長野一也	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
井上雅己	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト

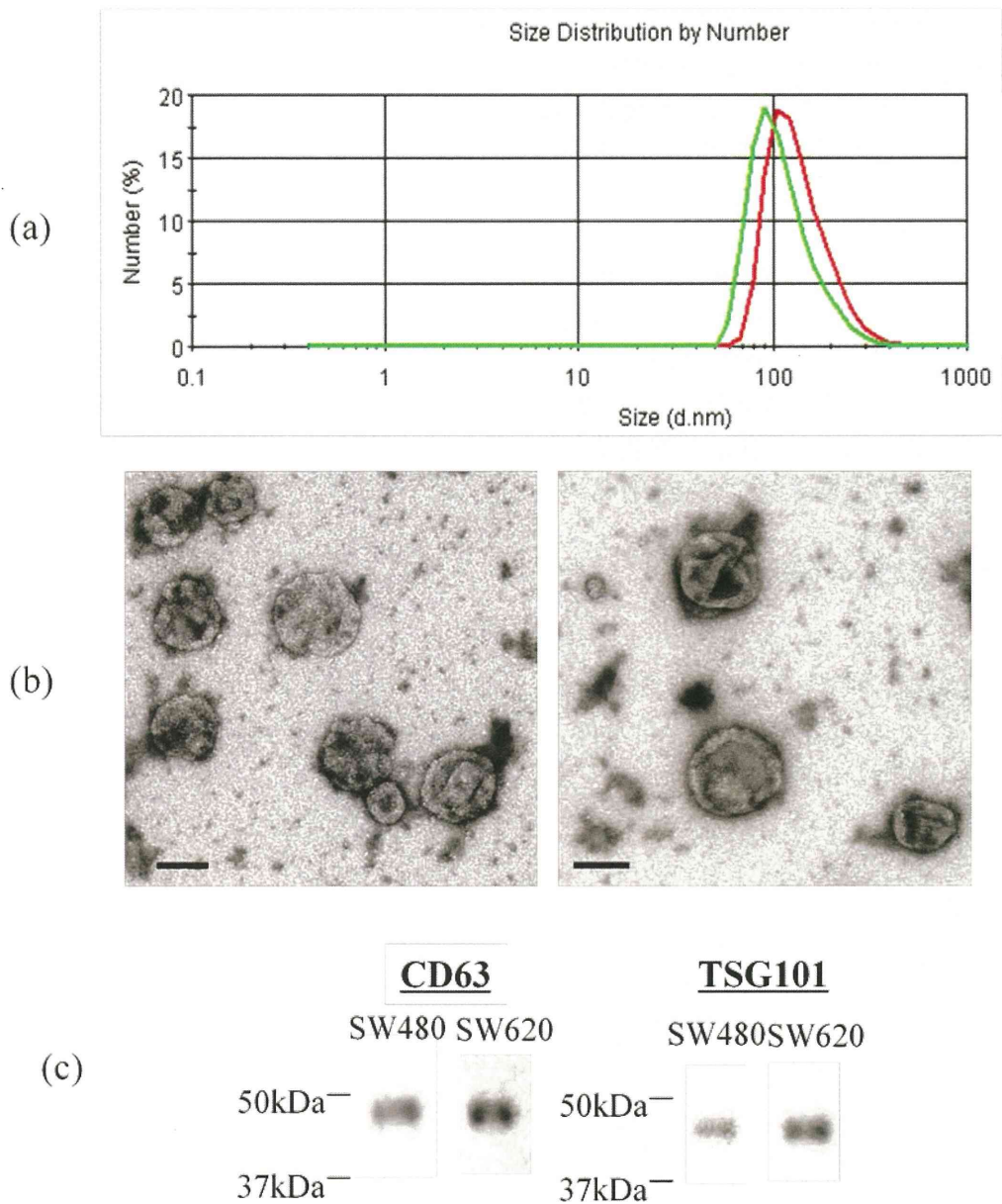


Fig. 1 Characteristics of purified exosomes derived from colon cancer cell lines, SW480 and SW620.

(a) The diameter distribution of purified exosomes derived from colon cancer cell lines (SW480 and SW620). The distribution chart was obtained by zeta potential measurement. The average diameter of purified exosomes derived from SW480 and SW620 was 106 nm and 85 nm, respectively. (b) The TEM images of the exosomes. Left image was the exosome derived from SW480. Right image was exosome derived from SW620. Scale bar: 100 nm. (c) Expression of exosome markers, CD63 and TSG101, in purified exosomes derived from SW480 and SW620. CD63 and TSG101 were detected by western blot.

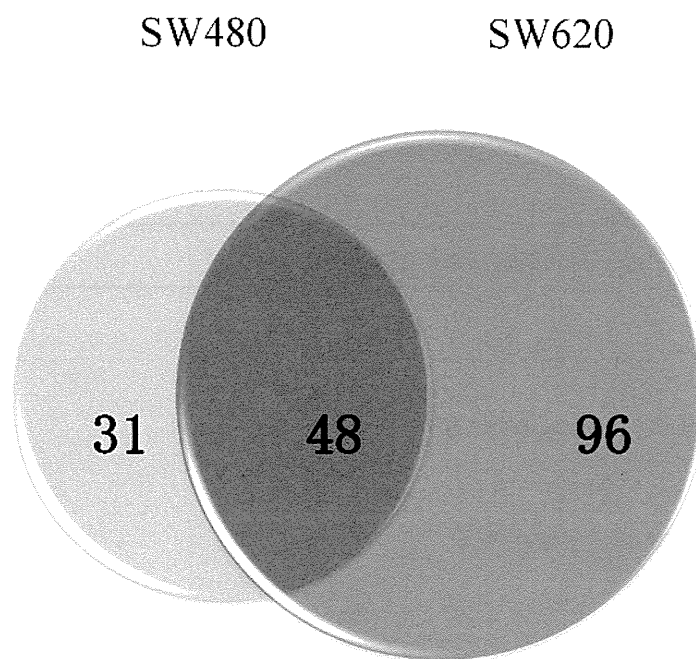


Fig. 2 The number of proteins identified in purified exosomes derived from SW480 and SW620
Overlap of exosomal proteome derived from SW480 and SW620 was shown by Venn diagram.

Table 1 Exosome-related membrane proteins identified in purified exosomes derived from SW480 and SW620

Identified membrane protein name
CD9
CD63
Neutral amino acid transporter B
Annexin A2
EH domain-containing protein 4
Actin, cytoplasmic 1
Ephrin-B1
Polyubiquitin-C
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1

Table 2 Cancer-related membrane proteins identified in purified exosomes derived from SW480 and SW620

Identified membrane protein name
Ephrin type-A receptor 2
Transferrin receptor protein 1
Folate receptor alpha
Excitatory amino acid transporter 4
Transmembrane protein 2

コンパニオン診断薬（薬剤効果予測マーカー）の開発

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

研究要旨

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。

A.研究目的

消化管間質腫瘍 (GIST: Gastrointestinal stromal tumor) は、主に胃、小腸、大腸などの消化管の粘膜下層に発生する腫瘍である。発症頻度は他のがんに比べ低い。しかし、自覚症状に乏しいため発見が遅れることが多い。GIST は完治が難しく、2 年以内には 40% 以上の GIST 患者に化学療法に対する感受性の低下が見られる。

GIST の発症原因の一つは、膜受容体型チロシンキナーゼ KIT をコードする *c-kit* の機能獲得性突然変異である。GIST 患者の約 90% は、腫瘍組織に変異型 KIT を発現しており、変異型 KIT は恒常的なリン酸化が起きて、チロシンキナーゼ活性の亢進を引き起こす。これに伴って GIST が発症すると考えられている。そのため KIT を分子標的とした薬剤の開発が進められた。イマチニブ (商品名グリベック) は、GIST に対する有効的な治療薬として臨床導入されており、KIT の ATP 結合部位に競合的に結合することにより、KIT の自己リン酸化を抑制することで抗腫瘍効果を発揮する。イマチニブが開発されて以降、GIST は制圧できると期待されていた。しかし、近年、イマチニブに抵抗性を示す GIST 症例が見いだされるようになった。その原因は、*c-kit* の二次変異であることが明らか

かにされた。ところが、最近、*c-kit* の二次変異がないのにイマチニブ抵抗性を示す症例が発見された。現在、この原因の究明が重要な課題になっている。

今年度、本研究では、GIST 由来培養細胞を用いて、この *c-kit* 遺伝子変異に非依存的なイマチニブ抵抗性獲得に係わるタンパク質を明らかにすることを目的とした。特にリン酸化タンパク質に焦点を当てて分析を行った。

B.研究方法

1. 細胞株

GIST, GIST_IM6, GIST_R200 の 3 種類の培養細胞株を用いた。GIST_IM6 細胞株は、GIST 細胞株に 200 nM のイマチニブを投与し、6 時間培養したもの、GIST 耐性細胞株

(GIST_R200) 細胞株は、その親株であるヒト GIST 細胞株をイマチニブの存在下にて長期間培養維持することにより樹立したものである。培養には、20% ウシ胎児血清、0.003% ファンギゾン (GIBCO) を含む RPMI1640-グルタミン酸 (ナカライテスク) 培地を用いた。

2. リン酸化タンパク質の分析

3 種類の細胞株から抽出したタンパク質 100 μg をトリプシンで消化し、C18 逆相カラムを用いて脱塩した後、チタニア担体を用いた金属

アフィニティークロマトグラフィーによりリン酸化ペプチドの濃縮・精製を行った。各細胞で4回、サンプルを調製し、LTQ-OrbiTrap質量分析装置（MS）でトリプシンペプチドを分析した。そして、Progenesis ソフトウェアを用いて定量的に、細胞株間で発現変動の見られるリン酸化タンパク質を検出・同定した。

3. ウェスタンブロッティング

電気泳動を行った試料をポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜へ転写した。PVDF膜をブロッキングワン（ナカライテスク）で1時間浸透後、2種類の一次抗体、すなわち、抗KIT抗体および抗リン酸化KIT抗体（Santa Cruz）を4℃で一晩反応させ、ついでHRP標識された抗IgG抗体（二次抗体）を反応させた。そして、LAS-4000 mini EPUVゲルイメージング装置（フジフィルム）を用いて抗原タンパク質を検出した。

4. RT-PCR

培養細胞から全RNAをAGPC法にて抽出しRNeasy® Micro KIT（QIAGEN）を用いて精製した。PrimeScript™ Reverse Transcriptase（タカラバイオ）を用いて42℃10分または60分間逆転写反応を行った。逆転写反応により得られた試料を用いて、*c-kit* コーディング領域をPCRにて増幅した。逆転写反応を行った試料にSYBR®PrimeScript RT-PCR KIT II（Perfect Real Time）（TaKaRa）を用いて95℃30秒後、95℃5秒、60℃40秒の条件でMx3000P Real-Time QPCR System（Agilent Technology）により定量解析を行った。

（倫理面への配慮）

提供者の同意が必要な試料を使用していない。

C, D. 研究結果及び考察

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（図1）。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（図2A）。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（図2B）。また、ウェスタンブロッティングによって#1タンパク質の量が増えている（図2C）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。

E. 結論

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中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。

F. 健康危険情報

（総括研究報告書に記載）

G. 研究発表

G-1. 論文発表

（原著論文）

1. Kohda, K., Kakegawa, W., Matsuda, S., Yamamoto, T., Hirano, H. and Yuzaki, M. The $\delta 2$ glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E948-957 (2013).
 2. Satake, T., Otsuki, K., Banba, Y., Suenaga, J., Hirano, H., Yamanaka, Y., Ohno, S. and Hirai, S. 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).
 3. 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^y mouse model using the iTRAQ technique. *J. Proteomics*, in press.
- (著書・総説)
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, 東京, 2012.
 4. 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).
 5. 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).
- G-2. 学会発表
1. 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, Hart, G. W., 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病角膜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
 2. Akimoto, Y., Miura, Y., Toda, T., Wolfert, M. A., Wells, L., Boons, G. -J., Hart, G. W., Endo, T. and Kawakami, H.: Detection of O-GlcNAcylated proteins by glycol-proteomics and in situ proximity ligation assay (PLA). 第 14 回国際組織細胞化学会議 (ICH2012) / 第 53 回日本組織細胞化学会総会, 京都, 2012.2.29
 3. 荒川憲昭: セクリトーム解析による新規卵巣癌マーカーの同定と臨床的有用性. 日本電気泳動学会, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾, 2012.8.20
 4. 荒川憲昭: セクリトーム解析による卵巣明細胞腺癌血清マーカーの開発. 北里疾患プロテオーム研究会, 北里大学相模原キャンパス, 相模原, 2012.8.23
 5. Arakawa, N., Ohtake, N., Nomura, A., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F. and Hirano, H.: Secretome Analysis of ovarian cancer cell lines leads to discovery of a novel diagnostic marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. HUPO2012, ハインツ・コンベンションセンター, ボストン, 2012.9.9
 6. Arakawa, N., Ohtake, N., Nomura, A., Morita, E., Miyagi, E., Hirahara, F., and Hirano, H.: Identification of a new biomarker for ovarian clear cell adenocarcinoma by secretome analysis of cancer cell lines. AOHUPO2012, 北京, 中

- ヤイナ・ナショナル・コンベンションセンター、2012.5.5
7. 荒川憲昭, 大竹則久, 野村文子, 森田絵理奈, 宮城悦子, 平原史樹, 平野 久: セクリトーム解析による新規卵巣癌血清診断マーカーの探索と同定. JHUPO, 東京, 2012.7.26
 8. 平野 久: たんぱく質のはたらきと病気, 先端医科学研究センター市民講座, 横浜, 2012.4.23
 9. Hirano, H.: Proteomics of co- and post-translational modifications of large protein complexes. 6th Congress of Asia and Oceania Human Proteome Organisation, Beijing, China, 2012.5.7-7
 10. 平野 久: Phos-tag アフィニティ電気泳動と DIGE によって見えるタンパク質のリン酸化状態の変動日本電気泳動学会シンポジウム, 沖縄, 2012.5.11
 11. 平野久: 卵巣明細胞腺癌に対する創薬標的および診断マーカーの探索 厚生労働科学研究費医薬基盤研究所公開シンポジウム, 東京, 2012.6.7
 12. 平野 久: プロテオーム分析技術の開発、体系化と生命医科学研究への応用 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.26-27
 13. 平野 久: 血液中バイオマーカー探索のプロテオミクス, AB Sciex シンポジウム, 大阪および東京, 2012.8.28 および 8.30
 14. 井野洋子: Phosphoproteomics in androgen-independent prostate cancer, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本未来科学館, 東京都江東区, 2012.07.26-27
 15. 井野洋子: 前立腺癌のアンドロゲン非依存性に関するリン酸化タンパク質の探索, 第 63 回日本電気泳動学会総会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市, 2012.08.20-21
 16. 井野洋子: Phosphoproteomic analysis of androgen-independent prostate cancer cells. HUPO 11th Annual World Congress, Hynes Convention Center, Boston. Massachusetts, 2012.09.09-13
 17. 紙田正博, 木村弥生, 井野洋子, 倉田洋一, 山田哲司, 尾野雅哉, 平野 久: 出芽酵母リボソームタンパク質の Na⁺-アセチル化とそれがタンパク質合成に及ぼす影響, 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 18. Kimura, A., Nomura, A., Kawakami, T., Arakawa, N. and Hirano, H.: Identification of the phosphoproteins implicated in the high malignancy of ovarian clear cell adenocarcinoma using comparative LC-MS/MS-based proteomic approach. 11th annual world congress HUPO 2012, Hynes Convention Center, Boston, 2012. 9. 9-13
 19. 木村鮎子, 野村文子, 川上隆雄, 荒川憲昭, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌の悪性度に関わるリン酸化タンパク質の網羅的な解析, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 26-27
 20. 倉田洋一, 木村弥生, 紙田正博, 山中結子, 石川晃代, 岡本裕之, 正岡哲治, 名古屋博之, 荒木和男, 森山俊介, 森 司, 平野 久: サケ脳下垂体プロテオームに対する成長ホルモンの影響, 日本ヒトプロテオーム研究機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 21. 増石有佑, 木村弥生, 平野 久: GPI アンカー型タンパク質の網羅的解析法の開発 Proteomic Analysis of GPI-anchored protein, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 22. 斎藤真奈美, 山下暁郎, 岡山明子, 和田佳行, 平野 久, 島田 勝: 質量分析法でヒトパピローマウイルスの感染に関わる細胞因子の同定, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 23. 菅原経継, 木村弥生, 戸田年総, 平野 久: Phos-tag 親和性電気泳動法を用いたヒトプロテオームサブユニットのリン酸化状態

- の解析 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 27
24. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鏑木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会, みやこめっせ, 京都, 2012.4.13
25. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野 久, 鏑木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
26. 高橋枝里, 久保田浩之, 本間綾香, 平野 久, 鏑木康志: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
27. 高橋枝里: 血清プロテオーム解析による 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 34 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2011.12.14
28. 高橋枝里: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
29. 高橋枝里: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
30. 野村文子, 荒川憲昭, 大胡田慎一郎, 勝山真人, 平野 久: 血管型 NADPH オキシダーゼのレドックスシグナルのプロテオミクス解析, 日本生化学会大会 第 85 回大会, 福岡国際会議場, 福岡, 2012. 12. 14-16
- 発明者: 荒川憲昭, 平野 久, 宮城悦子, 大竹宣久
出願人: 公立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社
出願番号: 特願 2011-179450
出願年月日: 2011 年 8 月 19 日 国内
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称: 組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および検査薬

表1 3種類のGIST細胞株で同定されたリン酸化ペプチド及びリン酸化タンパク質の数

	リン酸化タンパク質	リン酸化ペプチド
GIST	1,329	4,599
IM6	1,147	3,351
R200	1,067	3,134
計 (非重複)	1,086	3,203

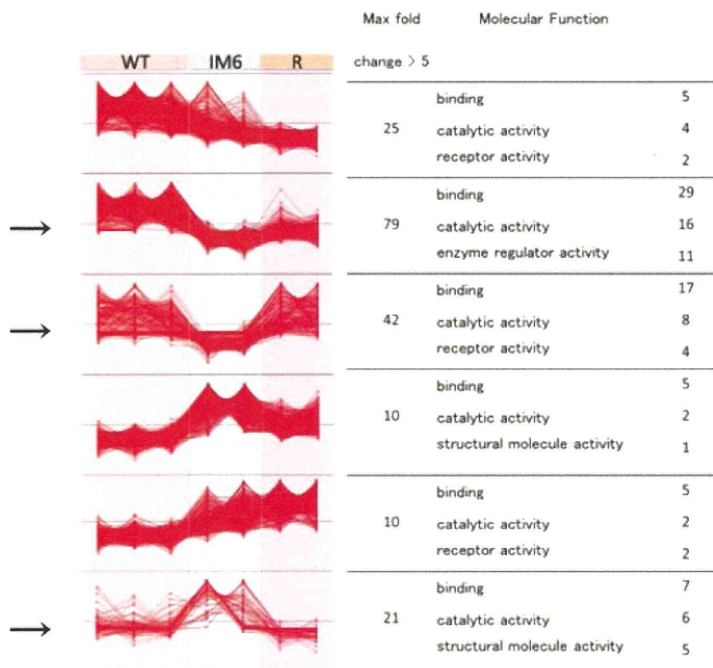


図1 3種類のGIST細胞株におけるリン酸化タンパク質の発現量

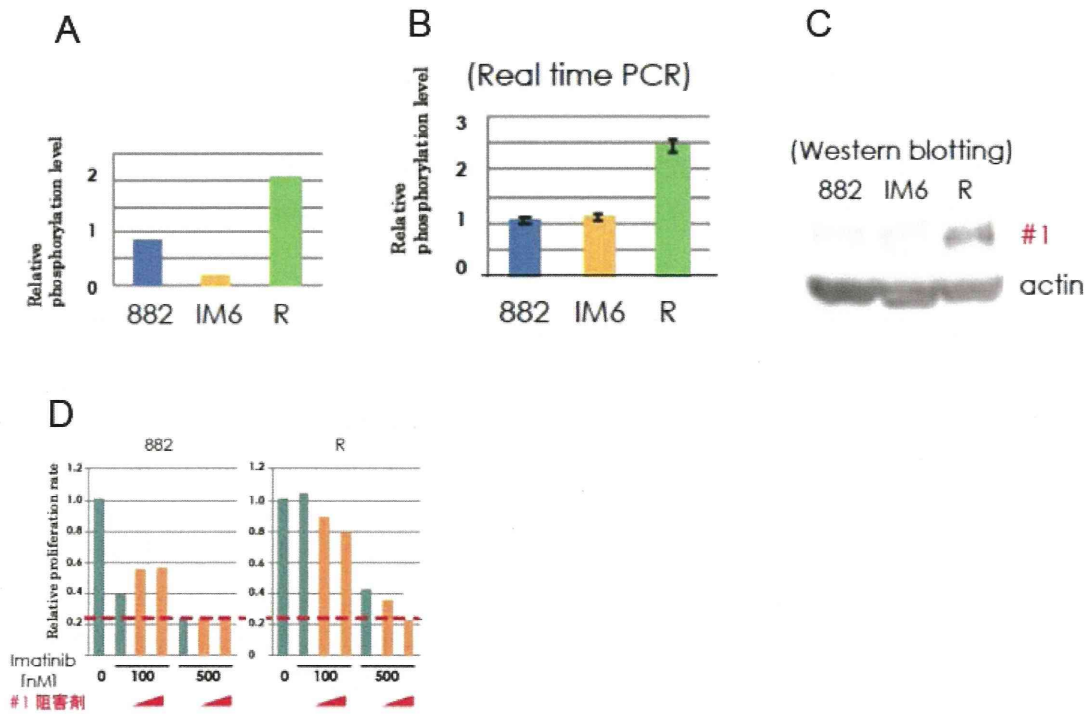


図2 がん細胞の増殖に関連する受容体型チロシンキナーゼ#1の変動

A, リン酸化レベルの変動； B, mRNAの変動； C, タンパク質量の変動； D, #1に対する阻害剤の細胞増殖への影響