

201210007A・B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

抗体プロテオミクス技術を駆使した

悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開

平成 24 年度 総括研究報告書

平成 22-24 年度 総合研究報告書

研究代表者 長野一也

平成 25 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

抗体プロテオミクス技術を駆使した

悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開

平成 24 年度 総括研究報告書

平成 22-24 年度 総合研究報告書

研究代表者 長野一也

平成 25 年 5 月

目次

I. 総括研究報告書

I-1. 総括研究報告	1
抗体プロテオミクス技術を駆使した悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開 長野一也	1
I-2. 研究成果の刊行に関する一覧表	8
I-3. 研究成果の刊行物・別刷	9

II. 総合研究報告書

II-1. 総合研究報告	22
抗体プロテオミクス技術を駆使した悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開 長野一也	22
II-2. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
II-3. 研究成果の刊行物・別刷	45

抗体プロテオミクス技術を駆使した悪性中皮腫関連バイオマーカーの探索と創薬への展開

研究代表者 長野一也 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

研究要旨

悪性中皮腫は、1970年頃に頻用されたアスベストの曝露を主要因とする疾患であり、5年生存率は3.7%と極めて予後不良である。また本疾患は、この曝露から40年程遅れて発症することから、現在患者数は急増している。以上の背景から、悪性中皮腫に対する有用な診断法・治療法の開発は国際的緊急課題であるものの、これまで悪性中皮腫の分子マーカーはみつかっていない。そこで本研究では、独自に確立した創薬バイオマーカー蛋白質の迅速探索法である「抗体プロテオミクス技術」により、悪性中皮腫関連マーカーを探索し、分子病態の解明、及び有用な診断法・治療法の開発に資する知見を収集することを目的とする。

上記を達成するために、3年間研究を実施し、以下の成果を得た。

- ① まず、治療薬標的の同定や病態の解明に向け、悪性中皮腫特異性の高い蛋白質を探索すべく、正常中皮細胞と悪性中皮腫細胞のプロテオームを比較し、がん細胞で発現上昇していた15種類の蛋白質を同定した。
- ② 悪性中皮腫に対する治療薬として汎用されているシスプラチン(CDDP)の効果予測マーカーを探索すべく、CDDPの高感受性細胞と低感受性細胞のプロテオーム解析から、8種類の発現変動蛋白質を同定した。
- ③ ①と②で共通して発現変動していた3種類の悪性中皮腫関連バイオマーカー候補蛋白質に対して、ファージ抗体ライブラリからそれぞれモノクローナル抗体を創出した。特に、発現変動率の大きかったAnnexin A4(ANXA4)に対する抗体提示ファージで臨床検体を免疫染色した結果、正常中皮組織に比べ、悪性中皮腫組織で高率に発現していることが明らかとなった。
- ④ また、各種悪性中皮腫細胞におけるCDDPの感受性とANXA4の発現量との相関解析、及び遺伝子工学的な検討から、ANXA4は悪性中皮腫細胞におけるCDDP抵抗性に関わる機能を有していることが示された。

以上、独自の「抗体プロテオミクス技術」を駆使することにより、悪性中皮腫特異性が高く、CDDPの抵抗性に関わる機能をもつANXA4を世界に先駆けて同定した。今後、実際の臨床検体におけるCDDP感受性とANXA4の発現量の相関解析や、抵抗性のメカニズムを明らかにする必要があるものの、本研究事業で得られた知見は、悪性中皮腫患者のCDDPの効果を事前に予測し、治療薬選択のためのCDDP抵抗性マーカー蛋白質としての可能性を示すものである。これらの成果が、予後不良な悪性中皮腫の克服の一助となり、ひいては厚生労働行政に貢献することを切に祈念している。

A. 研究目的

現在、疾患マーカーや創薬ターゲットなどの創薬バイオマーカー蛋白質の同定は、画期的医薬に直結することから、プロテオミクス研究を中心に世界規模で推進されている。しかしながら、当該研究領域からこれまでに医薬品開発にまで至った例は殆どない。それはプロテオーム解析から見出される候補蛋白質の数が多く、この中から有用な分子を絞り込むための基盤技術が未成熟であることに起因している。本観点から研究代表者らは、プロテオーム解析から直接同定・回収される微量な候補蛋白質を、吸着力に優れるニトロセルロース膜に効率よく固相化することで、ファージ抗体ライブラリの中から短期間かつ網羅的にモノクローナル抗体を作製可能な方法論を構築した。これにより、取得した抗体で組織マイクロアレイを免疫染色し、多症例のがん組織が有する臨床情報と各候補蛋白質の発現分布との相関解析から、疾患マーカーや創薬ターゲットなどの創薬バイオマーカー蛋白質となりうる有用な分子を絞り込むことが可能となった。そこで本研究では、創薬バイオマーカー蛋白質を効率よく探索可能な「抗体プロテオミクス技術」を駆使し、未だ本邦の死亡率第一位のがんの中でも、5年生存率が僅か3.7%と極めて予後不良な悪性中皮腫に応用することで、悪性中皮腫関連マーカー蛋白質を探索し、本疾患の分子病態の解明や有用な診断法・治療法の開発に資する知見を収集すると共に、創薬への展開を目指すことを目的とする。

悪性中皮腫は、1970年頃に頻用されたアスベストの曝露を主要因とする疾患であり、曝露から40年程遅れて発症することから、現在患者数は急増している。その一方で、本疾患に対する的確な診断・有効な治療法はなく、分子病態すら殆ど明らかにされていないことから、厚生労働行政にとって政策対応を必要とする疾患である。従って本研究によって得られる成果は、厚生労働行政にとって今後政策的な対

応を必要とする悪性中皮腫に対して、基礎研究・応用研究の両者を発展させると共に、国民の健康増進や医療費削減、産業界の競争力向上等に貢献するものと期待される。

このような背景・目的のもとで、3年間研究を推進し、悪性中皮腫特異性が高く、本疾患で汎用されるCDDPの抵抗性に関わるANXA4を世界に先駆けて同定したので、それら研究成果を報告する。

B. 研究方法

B-1. 細胞培養

悪性中皮腫細胞株(H28、H2052、H2452、H226、MSTO221H)はATCCより購入したものをを用いた。培養には、終濃度10%になるようにFCSを添加したRPMI1640培地を用い、いずれも継代培養してサブコンフルエント状態のものを実験に供した。Human Mesothelial Cells (HMC)はZen-Bioより購入したものをを用いた。培養には、Mesothelial Cell Growth Medium (Zen-Bio)を用い、継代培養してサブコンフルエント状態のものを実験に供した。

B-2. CDDP感受性試験

各悪性中皮腫細胞株を96 wellプレートに、 5×10^3 cells/well播種し、一晚培養した。翌日、各濃度のCDDPを添加し、24時間後の細胞傷害性をWST-8 assayにより評価した。

B-3. Two dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) 解析

通常培養環境下で培養した各種細胞(悪性中皮腫細胞特異性の高い蛋白質の探索：H28とHMC / CDDP感受性マーカー蛋白質の探索：H28とH2052)をサンプルとして用いた。サンプル各50 μ gをそれぞれ400 pmolのラベル化試薬cy2、cy3、cy5 (GE Healthcare)と氷上で30分間反応させ、その後10

mM Lysineを加え、氷上で10分間静置して反応を停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT、2% pharmalyte (GE Healthcare)、7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS) で450 μ lにメスアップした。一方、蛋白質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化試薬で標識していないサンプルも同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pI 4-7) ストリップ (GE Healthcare) を入れ、oilを重層した。ETTAN IPGPhor (GE Healthcare) を用いて、プレ膨潤を10時間行い、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gelを平衡化buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に浸し、各15分間平衡化を行った。二次元目のSDS-PAGEを行うため、ゲル溶解が可能なSDS-PAGE用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyl-tartardiamide gels) にIPG-gelスリップをセットした。アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE Healthcare) を用いて、2次元電気泳動を行った。ピック用ゲルはDeep Purple Total Protein Stainを用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGEを使用し、スポットピックにはEttan Spot Picker (GE Healthcare) を使用した。抗体作製用の蛋白質抽出には、88 mM NaIO₄を用いて室温で30分インキュベーションし、ゲルを溶解することで蛋白質を抽出した。

B-4. Mass spectrometry (MS) 解析

ゲル片に100 μ lの脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で

10分振盪させた後、脱色液を取り除くことで脱色を行った。続いて200 μ lのacetonitrileを加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器によって乾燥させることで脱水を行った。脱水したゲル片に5 μ lのtrypsin溶液 (20 μ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°Cで16時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1回目は50 μ lの50% acetonitrile / 5% TFA溶液、2回目は50 μ lの80% acetonitrile / 5% TFA溶液、3回目は50 μ lの100% acetonitrile) を加え、3分間ソニケーションし、更に30分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を3回行うことでペプチドを抽出した。このペプチド抽出液を遠心濃縮器によって濃縮し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液5 μ lをnano-LC (EASY-nLC (Bruker Daltonics))にて分離し、各画分のペプチドをESI-Q-TOF MS (maxis (Bruker Daltonics))にて配列の決定並びに、蛋白質同定を行った。なお、ペプチドの同定には、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た。

B-5. ナイーブファージ抗体ライブラリの作製

ナイーブファージ抗体ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを導入した大腸菌 TG1株に50 μ g/ml ampicillin、2% glucose含有2YT培地を加えて250 rpm、37°CでOD₆₀₀ = 0.3~0.6まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37°Cで30分間、250 rpm、37°Cで30分間培養後、2,000 rpmで10分間遠心し、得られたペレットに対して100 μ g/ml ampicillin、50 μ g/ml kanamycin含有2YT培地を添加して6時間培養した。4°C、2,000 rpmで10分間、更に10,000 rpmで15分間遠心し、

回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 μm の Millex-HV フィルター (Millipore)を用いてろ過し、scFv 提示ファージとして回収した。

B-6. メンブランパンニング

ドットプロット装置 (Bio-Dot Microfiltration Apparatus, BioRad) に、あらかじめ TBS に浸したニトロセルロース膜を装着し、可溶化ゲルから回収した各スポット由来の蛋白質溶液 1 μl を TBS にて 100 倍希釈した全量を各 well に添加し、メンブレンに固相化した。blocking buffer (10% skim milk + 25% glycerol) を 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加して、室温で 1 時間静置してブロッキングした。scFv 提示ファージ溶液と blocking buffer とを 9 : 1 で混合し 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間静置してブロッキングしたものを input とし、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加して、室温で 3 時間緩やかに振盪した。0.1% Tween 20/TBS (0.1%TBST)で 10 回と TBS で 1 回洗浄後、100 mM triethylamine を 100 μl 添加して、室温で 30 分間静置した。output ファージ溶液を回収し、それらに 50 μl の Tris-HCl (pH 8.0) を加えて中和した。また、input ファージ及び output ファージの一部を用いてタイターを測定した。output ファージは大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニング output とした。

B-7. Dot Blot ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを大腸菌TG1に感染させ、生じたコロニーを96 wellプレートにピックアップした。各wellが $\text{OD}_{600} = 0.3\sim 0.6$ に達する

まで培養した後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin、2% glucose含有2YT培地で10倍希釈したM13KO7ヘルパーファージ溶液を20 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間静置培養した後、2,000 rpmで10分間遠心し、上清を除去した。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin含有2YT培地を200 μl 加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養し、2,000 rpmで10分間遠心し、回収した上清を以下のスクリーニング実験に供した。一方で2D-DIGE解析から得られた抽出蛋白質をBio-Dot Microfiltration Apparatusを用い、TBSに浸したニトロセルロース膜上に固相化した。各 well に blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を200 μl ずつ添加し、室温で2時間静置してブロッキングを行った。TBSで1回洗浄後、blocking buffer で希釈した精製ファージを200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加し、室温で2時間静置した。0.1%TBSTとTBSで5回洗浄後、blocking bufferで1,000倍希釈したHRP/anti-M13 monoclonal antibodyを200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加した。0.1%TBSTとTBSで3回洗浄後、メンブレンをECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で処理し、LAS-3000を使用して検出・撮影した。

B-8. モノクローナル抗体提示ファージの作製

各抗ANXA4候補抗体が組み込まれたファージミドベクターpCANTAB5Eで形質転換された大腸菌TG1株を凍結グリセロールストックから、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin、2% glucose含有2YT培地が入った96wellプレートに少量加え、250 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。翌日、各群の大腸菌数がプラトーに達したところで、各培養液10 μl を新たに調製した50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin、2% glucose含有2YT培地100 μl に加え、 $\text{OD}_{600} = 0.3\sim 0.6$ まで培養した。上記培地で10倍希釈したM13KO7ヘルパーファージ (Invitrogen) を20 μl ずつ添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間、

静置させることで感染させた。2,000 rpmで15分間遠心し、上清を除くことで得られたペレットに対して100 µg/ml ampicillin、50 µg/ml kanamycin 含有2YT培地を200 µlずつ添加して37 °Cで一晩培養した。翌日、2,000 rpmで15分間遠心して上清を回収し、各抗ANXA4候補抗体提示ファージを調製した。

B-9. Dot Blot ELISAによる特異性評価

AXNA4、Luciferase(Promega)、OVA(Sigma)、BSA(Sigma)をBio-Dot Microfiltration Apparatusを用いて、TBSに浸したニトロセルロース膜上に固相化した。各wellにBlocking buffer (10% skim milk, 25% glycerol) を200 µlずつ添加し、室温で2時間静置することでブロッキングした。TBSで1回洗浄後、Blocking bufferで 5×10^{12} CFU/mlに希釈した精製ファージをそれぞれ200 µl/well添加し、室温で2時間静置した。TBST (0.1% Tween 20を含むTBS) とTBSで5回ずつ洗浄後、Blocking bufferで1,000倍希釈したHRP/mouse anti-M13 monoclonal antibodyを200 µl/well添加した。TBSTとTBSで3回洗浄後、メンブレンをECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で処理し、LAS-3000を使用して検出・撮影した。

B-10. 悪性中皮腫組織マイクロアレイの免疫染色

ヒト悪性中皮腫/正常中皮組織アレイ (US Biomax) をキシレン・エタノールにて脱パラフィン・親水処理を行い、DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO) に浸して、125°Cで30秒、90°Cで30秒処理することで抗原を賦活化した。組織マイクロアレイの一連の染色操作には自動染色処理装置DAKO AutoStainer (DAKO) を使用した。内在性のペルオキシダーゼ処理のため、DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) を5分処理し、更に10% BSAで30分インキュベーションするこ

とでブロッキングした。その後、 1×10^{13} CFU/mlファージを添加し、室温で1時間静置した。TBST (0.05% Tween 20を含むTBS) で5回洗浄後、100倍希釈したMouse anti-M13 monoclonal antibody (GE Healthcare) を添加し、30分静置した。TBST (0.05% Tween 20を含むTBS) で3回洗浄後、ENVISION+ Dual Link, mouse (DAKO) を添加した。TBSTで3回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO) を用いて発色させた。

組織マイクロアレイによる抗原発現のスコア化は、がん細胞での発現分布の割合を2段階で (がん細胞の50%以下の発現を1、がん細胞の50%以上の発現を2)、発現強度を3段階にスコア化し、その合計が2以下で陰性、3以上で陽性と判定した。

B-11. Western Blotting

各種悪性中皮腫細胞株 (H28、H2052、H2452、H226、MSTO221H) と正常中皮細胞 (Human Mesothelial Cells (HMC))、並びに遺伝子工学的に処理された細胞を溶解液により可溶化し、2倍濃度のLaemmli Sample Bufferを等量混合した。終濃度5%となるように2-mercaptoethanolを添加後、95 °Cで5分処理した。各試料を、SDS-PAGE用ゲルに添加し、電気泳動を行い、蛋白質を分離した。その後ゲルをPVDF膜に転写し、10% Block Aceにて室温、1時間インキュベーションすることでブロッキングした。TBSで1回洗浄後、mouse anti-human ANXA4 (Abnova : 1D3)を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で1時間反応させた。TBST (0.05% Tween 20を含むTBS) にて3回洗浄した後、HRP/anti-mouse IgG monoclonal antibodyを添加し、振とうさせながら室温で1時間反応させた。TBSTで3回洗浄後、メンブレンをECL plus Western Blotting Detection Systemで処理し、LAS-3000により検出した。

尚、ANXA4 及び β -actin の発現量は、Image J により各バンドの強度を定量することにより解析した。

B-12. ANXA4 のノックダウン

ANXA4 に対する siRNA (配列: AAGGATATCACAGAAGGATAT)は、Qiagen より購入した。Hyperfect reagent (Qiagen)を用いて、ANXA4 siRNA を ANXA4 が発現する CDDP 抵抗性の H28 細胞にトランスフェクションし、B-2.に従って、CDDP に対する感受性変化を評価した。

B-13. ANXA4 の強制発現

ANXA4 遺伝子を pcDNA3.1 ベクターにクローニングしたプラスミドを、FuGENE HD transfection reagent (Roche)により、H2052 細胞(ANXA4 が低発現で CDDP 感受性株)にトランスフェクションし、B-2.に従って、CDDP に対する感受性変化を評価した。尚、ANXA4-pcDNA3.1 は、(独)医薬基盤研究所免疫シグナルプロジェクト 仲 哲治先生より供与いただいた。

C. 研究結果

C-1. 悪性中皮腫細胞と正常中皮細胞に発現している蛋白質の変動解析

悪性中皮腫特異性の高いバイオマーカー蛋白質を探索するため、まず初代正常中皮細胞HMCに比べて、悪性中皮腫細胞株H28で発現変動している蛋白質の同定を試みた。H28とHMCの細胞溶解液を異なる蛍光色素でラベルし、等電点と分子量の違いにより2次元に蛋白質を展開した。各蛋白質スポットの蛍光強度の差違を解析した結果、1.5倍以上発現変動していた15スポットを見出すことができた (Fig. 1)。

C-2. 悪性中皮腫特異性の高いバイオマーカー候補蛋白質の同定

C-1.で見出した15スポットを2D-DIGEのゲルからピックアップし、トリプシン消化後、LC-TOF/MSにより蛋白質の同定を試みた。MS/MS解析の結果、全ての発現変動蛋白質を同定し、14種類の悪性中皮腫特異的候補蛋白質を見出した (Table 1)。

C-3. 悪性中皮腫細胞株のシスプラチン感受性試験

悪性中皮腫に対する治療薬としては、シスプラチン(CDDP)が汎用されているが、その奏成功率は約20%と低い。その一方で、CDDPは、腎毒性などの副作用を示すため、無効症例へのCDDP投与は患者のQOLを著しく低下させる。従って、薬剤投与前にCDDPの感受性を事前に予測可能なバイオマーカー蛋白質があれば、CDDPの有効性が期待できない症例に対しては、葉酸代謝拮抗薬であるペメトレキセドといった別の悪性中皮腫治療薬へ変更することも可能となり、患者のQOLの向上に貢献しうる。そこで、研究代表者は、CDDPに対して感受性の高い症例を予め判別可能なバイオマーカーの探索を目的に、高感受性細胞と低感受性細胞に発現している蛋白質の変動解析も試みる。本試験に際し、まず悪性中皮腫細胞株の感受性をスクリーニングした。

各悪性中皮腫細胞株 (H28、H2052、H2452、H226、MSTO221H) に各濃度のシスプラチンを添加し、各細胞への感受性をWST-8 assayにより評価した結果、H28が最も感受性が低く、H2052が最も高いことが判明した (Fig. 2)。

C-4. CDDP高感受性株と低感受性株における発現変動解析とCDDP感受性バイオマーカー候補の同定

悪性中皮腫におけるCDDP感受性バイオマーカー蛋白質の探索・同定を目的に、C-3.において、候補蛋白質を見出すためのCDDP高感受性としてH2052を、低感受性株としてH28をスクリーニングした。

そこで、これら細胞株間で発現変動しているCDDP感受性マーカー候補を同定すべく、2D-DIGE解析を行った (Fig. 3)。その結果、H2052に比べ、H28で2倍以上発現変動していた蛋白質を8種類見出し、全て質量分析により同定した (Table 2)。興味深いことに、この中には、C-2.において、悪性中皮腫細胞で高発現していた3種類の蛋白質 (Annexin A4、Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase、Glutathione transferase omega-1) も含まれており、これら蛋白質がCDDPの感受性にも関与している可能性が考えられた。

C-5. メンブランパンニング法による発現変動蛋白質に対する抗体作製

C-4.で見出したスポットを別途ピックし、過ヨウ素酸で溶解して抗原を調製した。まず、共通して発現変動していた3種類の候補蛋白質に対してナイーブファージ抗体ライブラリを利用して、抗体の作製を試みた。4回のパンニングにより、目的抗原に親和性を有するクローンを100-1,000倍濃縮することができた (Fig. 4)。そこで、4thパンニングのoutputをモノクローン化し、Dot Blot ELISAによりスクリーニングした。その結果、全ての候補蛋白質に対して、結合性を有する複数のクローンを単離することに成功した (Fig. 5)。

C-6. 抗ANXA4抗体候補の特異性評価

C-5.で取得したモノクローナル抗体を用いて、多数の悪性中皮腫・正常中皮組織を免疫染色し、その発現プロファイルから、悪性中皮腫組織に対する特異性を評価するため、解析に使用可能な特異抗体を選定する。まずは、プロテオーム解析で、正常中皮細胞に比較して、悪性中皮腫細胞で最も発現上昇率の大きかったANXA4に対する抗体候補10クローンに関し、等タイトーの精製ファージを各種蛋白質に添加することで各クローンの特異性を評価した。

その結果、#2, 7, 9, 10の4クローンではスクリーニングと同様に、ANXA4に対する結合性が認められたのに対し、#1, 3, 4, 5, 6, 8の6クローンではスクリーニングとは異なり、結合性が認められなかった。これは、スクリーニング時には、大腸菌から産生された培養上清そのままを使用しており、各群間でのファージのタイターが一定していないために、抗原に対して非特異的に吸着し擬陽性になったものと考えられる。また、#7と#9はANXA4のみならず、Luciferaseにも結合性が認められた。ANXA4 (319アミノ酸から成り、分子量は36kDa) とLuciferase (1241アミノ酸から成り、分子量は137kDa) の相同性は12%と低いものの、ANXA4の30番台と120番台付近、280番台に類似の配列が存在するため、#7と#9はこれらの領域を認識する抗体である可能性が考えられた。今後タイター依存性など詳細な検討は詳細な検討は必要なものの、少なくとも、#2と#10は、ANXA4に対して特異性の高いクローンであることが示唆された (Fig. 6)。

C-7. ANXA4の悪性中皮腫/正常中皮組織における発現プロファイル解析

ANXA4の悪性中皮腫特異的マーカーとしての有用性を検証するため、C-6.で見出されたモノクローナル抗体を用い、ANXA4の発現プロファイルを解析した。C-6.でANXA4に対して特異性の高かった#2の抗体提示ファージを用い、数多くの悪性中皮腫組織/正常中皮組織が搭載された組織マイクロアレイを免疫染色したところ、正常中皮組織では25%の症例でANXA4が陽性であったのに対し、悪性中皮腫組織では62%の症例で陽性であり、がん組織で高率に発現していることが明らかとなった。尚、野生型ファージ単独群では陽性例はなく、ファージの非特異的な吸着による染色ではないことを確認している (Data not shown)。以上から、本分子は、悪性中皮腫特異的マーカー候補になりうることを示された

とともに、本疾患に何らかの機能をもっている可能性が考えられた (Fig. 7)。

C-8. 各種悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現量とCDDP感受性の相関解析

ANXA4は、CDDPの感受性の高いH2052に比べ、感受性の低いH28で発現上昇していたことから、研究代表者は、ANXA4とCDDPの感受性の連関を解析するため、各種悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現量とCDDPの感受性の相関を解析した。各種悪性中皮腫細胞株におけるCDDPの感受性についてはC-3.において、下記のように明らかにしている (Fig. 8(a))。

【CDDP感受性(括弧内はIC₅₀)】 H28 (154.5 μ M) < H226 (87.5 μ M) < H2452 (66.0 μ M) < MSTO-221H (49.5 μ M) < H2052 (27.8 μ M)

そこで、各種悪性中皮腫細胞株におけるANXA4の発現量を、Western Blot法により解析し (Fig. 8(b))、デンシトメトリーを用いて定量比較した (Fig. 8(c))。その結果、CDDPに対する感受性が最も低いH28 でANXA4の発現量が最も高く、CDDPの感受性が亢進するにつれて、おおよそANXA4の発現量も低下する傾向が認められた。

C-9. ANXA4のノックダウンによるCDDP感受性の亢進

C-8.にて、各種悪性中皮腫細胞のCDDPに対する感受性とANXA4の発現量が、負に相関する傾向が認められ、CDDPの抵抗性に関連する可能性を示されたため、その関与を明らかにすべく、まず、CDDP抵抗性株であるH28 中のANXA4の発現をノックダウンさせて、CDDPの感受性変化を評価した。

ANXA4に対するsiRNAをH28にトランスフェクションし、ANXA4の発現がノックダウンされていることをWestern Blotにより確認した (Fig. 9 (b))。そのうえで、各濃度のCDDPを添加し、その感受性を

Non-treat群/Control siRNAトランスフェクション群と比較解析した。その結果、対照群と比較して、ANXA4 siRNAトランスフェクション群で有意に感受性が亢進することが明らかとなった (Fig. 9 (a))。

尚、siRNAのトランスフェクションによる細胞傷害がないことを確認している。

C-10. ANXA4の強制発現によるCDDP感受性の低下

ANXA4のCDDP抵抗性への関与を確かめるため、C-9.とは逆に、ANXA4低発現でCDDP感受性の高いH2052にANXA4を強制発現させて、CDDP感受性変化を検討した。ANXA4の蛋白質発現を確認したうえで (Fig. 10 (b))、CDDPに対する細胞傷害性を比較解析した結果、対照群と比較して有意にCDDPに対する感受性が低下した (Fig. 10 (a))。

以上から、ANXA4は、悪性中皮腫細胞におけるCDDPの抵抗性に関わる機能を有していることが示唆された。

今後、実際の臨床検体を用いて、ANXA4の発現プロファイルとCDDP感受性の相関を後ろ向き/前向きに解析する必要があるものの、本知見は、悪性中皮腫患者のCDDPの効果事前に予測し、治療薬選択のためのCDDP抵抗性マーカーになりうることを初めて明らかにした。また、臨床応用に向けては、CDDP抵抗性のメカニズムを明らかにする必要があると考えられる。ANXA4は、ANXA1~A13のサブタイプが知られているAnnexin Aファミリーの1つであり、カルシウム依存性の細胞膜の調節因子として、恒常性維持に関与していることが知られている。したがって、膜透過・イオン交換反応・エキソサイトーシスなどを介したCDDPの排出による抵抗性獲得などに着眼し、メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。また、本機構が、CDDP特異的なのか、他の白金製剤や他の抗がん剤にも共通しているのか、さらには、悪性中皮腫のみの現象であるのかなど、臨床応用に

向けて、取り組んでいく予定である。本知見が、厚生労働行政に貢献することを祈念している。

D. 考察

C. 研究結果の欄に記載。

E. 結論

当該研究では、悪性中皮腫関連マーカーの探索を目的として、以下の知見を得た。

- 悪性中皮腫細胞株H28と初代正常中皮細胞HMCの2D-DIGE解析により、1.5倍以上発現変動している14種類の悪性中皮腫特異性の高い候補蛋白質を見出し、全て同定した。
- CDDP感受性マーカー蛋白質の探索も合わせて実施するため、CDDPに対する高感受性株(H2052)と低感受性株(H28)をスクリーニングし、これらの中で2倍以上発現変動していた8種類の候補蛋白質を同定した。
- これらの解析結果により、共通して発現変動していた3種類の有望な候補蛋白質(Annexin A4、Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase、Glutathione transferase omega-1)を見いだした。
- 最も悪性中皮腫細胞で発現上昇率の大きかったANXA4に対して、独自のナイーブファージ抗体ライブラリの中から特異抗体を取得し、組織マイクロアレイを免疫染色することで、ANXA4が悪性中皮腫組織に高率に発現する蛋白質であることを明らかにした。
- 各種悪性中皮腫細胞におけるCDDPの感受性とANXA4の発現量との相関解析、及び遺伝子工学的な検討から、ANXA4は悪性中皮腫細胞におけるCDDP抵抗性に関わる機能を有していることを世界に先駆けて明らかにした。

以上、独自の「抗体プロテオミクス技術」を駆使することにより、悪性中皮腫特異性が高く、CDDPの抵抗性に関わる機能をもつANXA4を世界に先駆けて同定した。今後、実際の臨床検体におけるCDDP感受性とANXA4の発現量の相関解析や、抵抗性のメカニズムを明らかにする必要があるものの、本研究事業で得られた知見は、悪性中皮腫患者のCDDPの効果を事前に予測し、治療薬選択のためのCDDP抵抗性マーカー蛋白質としての可能性を示すものである。これらの成果が、予後不良な悪性中皮腫の克服の一助となり、ひいては厚生労働行政に貢献することを切に祈念している。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

① 論文発表 原著論文

1. Yoshida Y., Yamashita T., **Nagano K.**, Imai S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Limited expression of reticulocalbin-1 in lymphatic endothelial cells in lung tumor but not in normal lung., **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 405(4):610-614, 2011.
2. Imai S., **Nagano K.**, Yoshida Y., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Mukai Y., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., **Biomaterials**, 32(1):162-169, 2011.
3. Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., **Nagano K.**,

Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials*, 32: 5498-5504, 2011.

4. 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*, 534:85-89, 2013.
5. Yamashita T., **Nagano K. (*equal contributor)**, 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):140-144, 2012.
6. Yamashita T., Okamura T., **Nagano K. (*equal contributor)**, Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Rho GDP-dissociation inhibitor α is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, 67(3):253-255, 2012.

総説・その他

1. **長野一也** : 創薬バイオマーカー蛋白質の効率的な探索基盤「抗体プロテオミクス技術」の開発., *Drug Delivery System*, 25(4):428-429, 2010.
2. **Nagano K.** : Search for breast cancer-related biomarker proteins for drug discovery., *Yakugaku Zasshi*, 130(12):1701-1706, 2010.
3. **Nagano K.**, Imai S., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : From disease

proteomics to biomarker development - Establishment of antibody proteomics technology and exploration of cancer-related biomarker -, *Yakugaku Zasshi*, 130(4): 487-492, 2010.

② 学会発表

国内学会発表

1. 山下琢矢, **長野一也**, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 今井直, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: 転移の制御を目指した肺がん関連蛋白質の探索., 第26回日本DDS学会学術集会, 大阪(大阪), 2010年6月.
2. 渡邊貴信, **長野一也**, 山下琢矢, 岡村賢孝, 金崎聡一郎, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: 新規乳がん分子標的治療法の開発を目指した Ephrin receptor A10 に対する scFv 抗体の創製., 第26回日本DDS学会学術集会, 大阪(大阪), 2010年6月.
3. 金崎聡一郎, **長野一也**, 山下琢矢, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: Ephrin receptor A10 の新規乳がん創薬標的としての有用性評価., 第26回日本DDS学会学術集会, 大阪(大阪), 2010年6月.
4. **長野一也**, 山下琢矢, 岡村賢孝, 小泉桂一, 済木育夫, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん関連蛋白質 EphA10 および RREB-1 の転移との関連解析., 第19回日本がん転移学会, 金沢(石川), 2010年6月.
5. 渡邊貴信, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 趙秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん関連分子 Ephrin receptor A10 の機能解析とモノクローナル抗体の創製., 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010年10月.
6. **長野一也** : 抗体プロテオミクス技術による創薬バイオマーカーたんぱく質の効率的探索., 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010年10月.
7. 山下琢矢, **長野一也**, 渡邊貴信, 金崎聡一郎, 前田祐香, 趙秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 新規乳がん関連たんぱく質 Ephrin receptor A10 の同定および難治性乳がんに対する創薬ターゲットとしての有用性評価., 第9回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム2010, 京都(京都), 2010年10月.

8. 山下琢矢, **長野一也**, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: ヒトの健康確保を目指したカーボンナノチューブの生体影響評価., 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.
9. 金崎総一郎, **長野一也**, 山下琢矢, 渡邊貴信, 前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 井上雅己, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: Triple negative 乳がんにおける Ephrin receptor A10 の創薬ターゲットとしての可能性., 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.
12. の同定と機能解析., 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.
13. 金崎総一郎, **長野一也**, 山下琢矢, 渡邊貴信, 前田祐香, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 乳がん関連たんぱく質 Ephrin receptor A10 に対する抗体医薬開発に向けた基礎検討., 第 27 回日本 DDS 学会学術集会., 東京(東京), 2011 年 6 月.
14. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 渡邊貴信, 金崎総一郎, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 新規乳がん関連たんぱく質 Ephrin receptor A10 の機能解析と創薬標的としての有用性評価., 第 27 回日本 DDS 学会学術集会., 東京(東京), 2011 年 6 月.
15. **長野一也**, 岡村賢孝, 山下琢矢, 堤 康央, 角田慎一: プロテオミクスによる大腸がん転移関連たんぱく質の探索., 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会., 浜松(静岡), 2011 年 6 月.
16. Yamashita T., **Nagano K.**, Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteomic profiling of proteins associated with metastasis in colorectal cancer cell lines., 第 70 回日本癌学会学術総会., 名古屋(愛知), 2011 年 10 月.
17. 金崎総一郎, **長野一也**, 山下琢矢, 前田祐香, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 腫瘍血管新生に及ぼす Exosome の生理機能の解明., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月.
18. 山下琢矢, **長野一也**, 金崎総一郎, 古屋 剛, 前田祐香, 今井 直, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による肺がん転移関連たんぱく質の探索 - Oxysterol binding protein like 5 及び Calumenin の転移
10. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 渡邊貴信, 金崎総一郎, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 井上雅己, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 乳がんに対する新規創薬ターゲット候補 Ephrin receptor A10 の機能解析., 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.
11. **長野一也**, 今井 直, 山下琢矢, 渡邊貴信, 金崎総一郎, 前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 井上雅己, 趙 秀麗, 阿部康弘, 鎌田春彦, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一: 抗体プロテオミクス技術による肺がんリンパ節転移関連分子との連関解析 -., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月.
19. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎総一郎, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一: 乳がん関連たんぱく質 Eph receptor A10 の機能解析と治療標的としての有用性評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月.
20. Yamashita T., **Nagano K.**, Kanasaki S., Maeda Y., Furuya T., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S.: Membrane proteome analysis of exosomes for lung cancer diagnosis., 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011 年 11 月.
21. 山下琢矢, **長野一也**, 金崎総一郎, 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, 堤 康央, 角田慎一: Exosome 由来膜たんぱく質のプロテオーム解析による新規肺がん血液診断マーカーの探索., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
22. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎総一郎, 古屋 剛, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 新規乳がん分子標的治療薬の開発を目指した Eph receptor A10 の創薬ターゲットとしての有用性評価., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
23. **長野一也**, 岡村賢孝, 山下琢矢, 金崎総一郎, 前田祐香, 古屋 剛, 井上雅己, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 大腸がん転移診断・治療法の開発を目指した転移関連たんぱく質の探索., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
24. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎総一郎, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 新規乳がん分子標的治療薬の開発に

- に向けた Eph receptor A10 に対するモノクローナル抗体の作製., 第 28 回日本 DDS 学会学術集会., 札幌 (北海道), 2012 年 7 月.
25. **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.
 26. 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.
 27. Maeda Y., **Nagano K.**, Yamashita T., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Evaluation of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer., 第 71 回日本癌学会学術集会., 札幌 (北海道), 2012 年 9 月.
 28. **Nagano K.**, Yamashita T., Maeda Y., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., 第 71 回日本癌学会学術集会., 札幌 (北海道), 2012 年 9 月.
 29. 前田祐香, **長野一也**, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 井上雅己, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: Eph receptor A10 を標的とした新規乳がん治療薬開発の試み., 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮 (兵庫), 2012 年 10 月.
 30. 山下琢矢, **長野一也**, 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 回日本医用マススペクトル学会年会., 名古屋 (愛知), 2012 年 10 月.
 31. **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.
 32. 井上雅己, 鎌田春彦, 阿部康弘, **長野一也**, 向洋平, 堤 康央, 角田慎一: TNFR2 シグナル伝達に関わる X-prolyl aminopeptidase 3 の機能解析., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.
 33. 古賀悠里恵, 向 洋平, 井上雅己, **長野一也**, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 抗腫瘍サイトカイン TNF の医薬品化を目指した活性増強型リジン欠損 TNF に対する部位特異的バイオコンジュゲーション., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.
 34. 瀧慎太郎, 鎌田春彦, 前田祐香, **長野一也**, 向洋平, 堤 康央, 角田慎一: 乳がん関連膜たんぱく質 EphA10 を標的とする新規 Bispecific 抗体の創製., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.

国際学会発表

1. **Nagano K.**, Yamashita T., Imai S., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Identification and evaluation of novel breast cancer related biomarker proteins by antibody proteomics technology., 21st Meeting of the European Association for Cancer Research., Oslo (Norway), 26-29 June, 2010.
2. Tsunoda S., **Nagano K.**, Yamashita T., Imai S., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y.: Identification and evaluation of tumor lymphatic endothelial cell-specific proteins by antibody proteomics technology., 21st Meeting of the European Association for Cancer Research., Oslo (Norway), 26-29 June, 2010.
3. **Nagano K.**, Yamashita T., Watanabe T., Kanasaki S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., HUPO2010 World Congress, Sydney (Australia), 19-23 September, 2010.
4. Yamashita T., **Nagano K.**, Watanabe T., Kanasaki S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y.,

- Tsunoda S. : Search for metastasis-related biomarker proteins in colorectal cancer by proteomics and tissue microarray analysis., HUPO2010 World Congress, Sydney (Australia), 19-23 September, 2010.
5. **Nagano K.**, Yamashita T., Watanabe T., Kanasaki S., Maeda Y., Zhao X., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification and evaluation of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., 2010 FAPA CONGRESS, Taipei (Taiwan), 5-8 November, 2010.
 6. Yamashita T., **Nagano K.**, Watanabe T., Kanasaki S., Maeda Y., Zhao X., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification and functional evaluation of RhoGDI as a metastasis-related protein in colorectal cancer., 2010 FAPA CONGRESS, Taipei (Taiwan), 5-8 November, 2010.
 7. Kanasaki S., **Nagano K.**, Yamashita T., Watanabe T., Maeda Y., Zhao X., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression and functional analysis of ephrin receptor A10 in triple negative breast cancer., 2010 FAPA CONGRESS, Taipei (Taiwan), 5-8 November, 2010.
 8. Yamashita T., **Nagano K.**, Watanabe T., Kanasaki S., Maeda Y., Zhao X., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression of Annexin A4 is related to cisplatin-susceptibility in mesothelioma cells., HUPO2011(10th World Congress), Geneva(Switzerland), 4-7 September, 2011.
 9. Kamada H., Abe Y., **Nagano K.**, Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The search for a biomarker of hepatic injury expressed by sinusoidal endothelial cells., HUPO2011(10th World Congress), Geneva(Switzerland), 4-7 September, 2011.
 10. **Nagano K.**, Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Imai S., Abe Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The relationship between oxysterol binding protein like 5 and calumenin during lymph node metastasis., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.
 11. Kanasaki S., **Nagano K.**, Yamashita T., Maeda Y., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Possibility of Ephrin receptor A10 as a drug target in triple negative breast cancer., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.
 12. Maeda Y., **Nagano K.**, Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Functional analysis of a novel breast cancer related protein, ephrin receptor A10., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.
 13. **Nagano K.**, Okamura T., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression of Rho GDP dissociation inhibitor correlates positively with lymph node metastasis in colorectal cancer., EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
 14. 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.
 15. 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.

16. Maeda Y., **Nagano K.**, Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Functional evaluation of Eph receptor A10 as a therapeutic target for breast cancer, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.
17. **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.
18. Kamada H., Inoue M., Abe Y., **Nagano K.**, Hirose K., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Conformational and functional analysis for quality control of protein drugs using ion mobility mass spectrometry, 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto (Japan), 15-21 September, 2012.

尚、下記に本研究の協力研究者を列挙する。

- | | |
|-------|----------------|
| 山下琢矢 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 矢野聖二 | 金沢大学がん研究所 |
| 常山幸一 | 富山大学大学院医学薬学研究部 |
| 堤 康央 | 大阪大学大学院薬学研究科 |
| 角田慎一 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 鎌田春彦 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 向 洋平 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 阿部康弘 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 國丸亜記 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 井上雅己 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 渡邊貴信 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 金崎聡一郎 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 前田祐香 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 古賀悠里恵 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |
| 瀧 慎太郎 | 独立行政法人医薬基盤研究所 |

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

無し

② 実用新案登録

無し

③ その他

無し

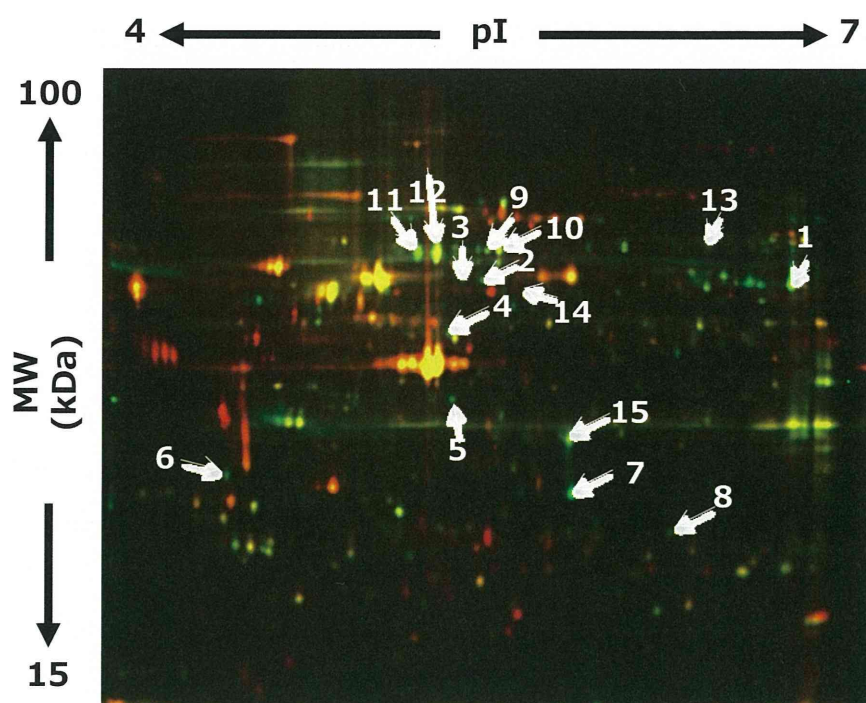


Fig. 1 2D-DIGE image of fluorescently labeled proteins derived from H28 and HMEC. Proteins derived from H28 and HMEC were labeled with cy3 and cy5, and then separated by IEF-PAGE and SDS-PAGE. The spots indicated by arrows are identified proteins by ESI-Q-TOF MS analysis.

Table 1 Identification of mesothelioma related proteins by ESI-Q-TOF MS

Spot #	Protein name	Expression ratio (H28 / HMC)
1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	6.0
2	FK506-binding protein 4	2.7
3	FK506-binding protein 4	2.7
4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	3.5
5	Glutaredoxin 3	3.3
6	Proliferating cell nuclear antigen	3.0
7	Annexin A4	6.5
8	Glutathione transferase omega-1	1.8
9	T-complex protein 1 subunit ϵ	2.5
10	T-complex protein 1 subunit δ	2.2
11	60kDa heat shock protein	3.9
12	Spectrin bata chain, brain 1	3.4
13	Keratin, type I cytoskeletal 10	3.4
14	Keratin, type II cytoskeletal 8	2.6
15	L-lactate dehydrogenase B chain	1.8

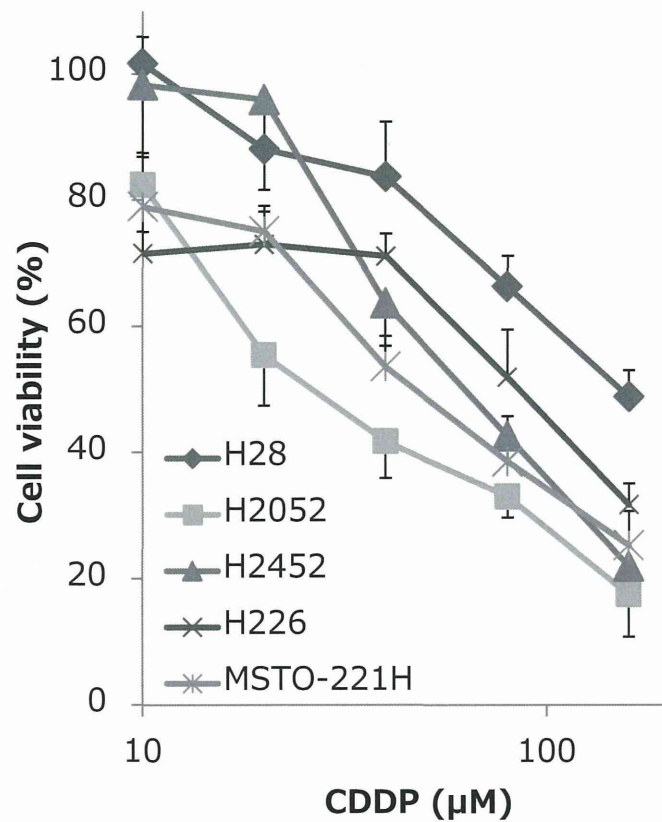


Fig. 2 Cytotoxicity analysis for cisplatin in mesothelioma cell lines

Mesothelioma cell lines, H28, H2052, H2452, H226 and MSTO-221H were incubated with various concentration of cisplatin for 24 hrs. Cytotoxicity of mesothelioma cells was evaluated by WST-8 assay.

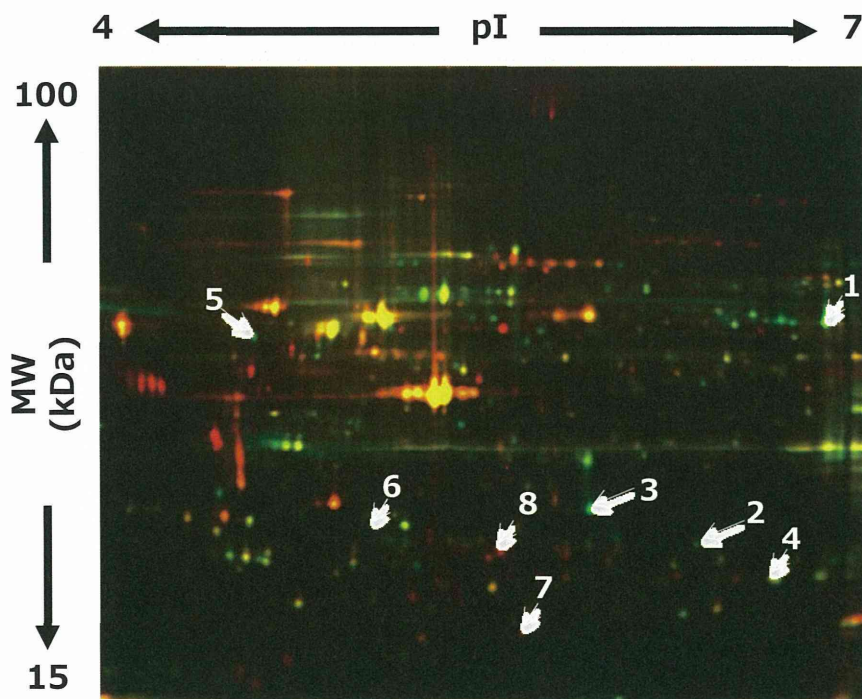


Fig. 3 2D-DIGE image of fluorescently labeled proteins derived from H28 and H2052 cells.

Proteins derived from high and low-susceptible mesothelioma cells (H2052 and H28) were labeled with cy3 and cy5, and then separated by IEF-PAGE and SDS-PAGE. The differentially-expressed spots in H28 were indicated by allows and identified by ESI-Q-TOF MS analysis.

Table 2 Identification of differentially-expressed proteins in H28 cells compared to H2052

Spot #	Accession	Protein name	pI	MW (kDa)	Expression ratio (H28/N2052)
1	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	6.4	59.3	21.0
2	P78417	Glutathione S-transferase omega-1	6.2	27.6	7.4
3	P09525	Annexin A4	5.6	35.9	3.6
4	P30041	Peroxiredoxin-6	6.0	25.0	3.5
5	Q09028	Histone-binding protein RBBP4	4.7	47.7	3.0
6	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	5.7	36.6	2.9
7	P32119	Peroxiredoxin-2	5.7	21.9	0.03
8	Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	5.5	28.8	0.13

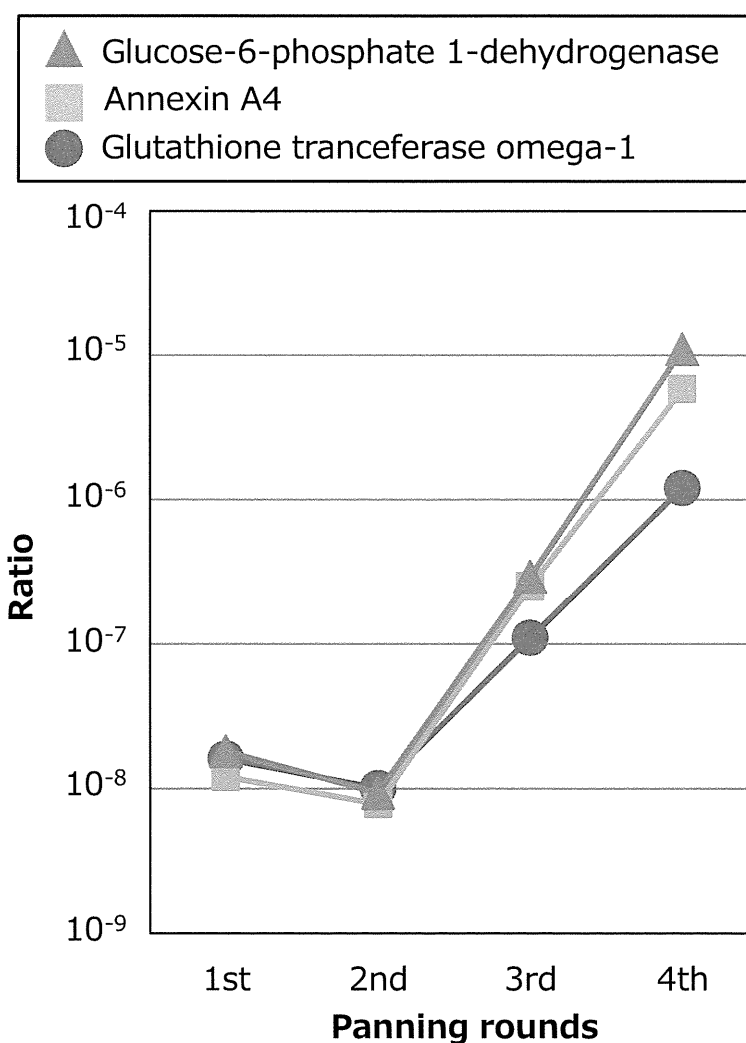


Fig. 4 Enrichment of Antibodies to mesothelioma related candidate proteins by membrane panning

Enrichment of the desired clones was performed by membrane panning. The ratio of phage titer at each panning round was plotted. The ratio was calculated as follows: (titer of the output phage)/(titer of the input phage).