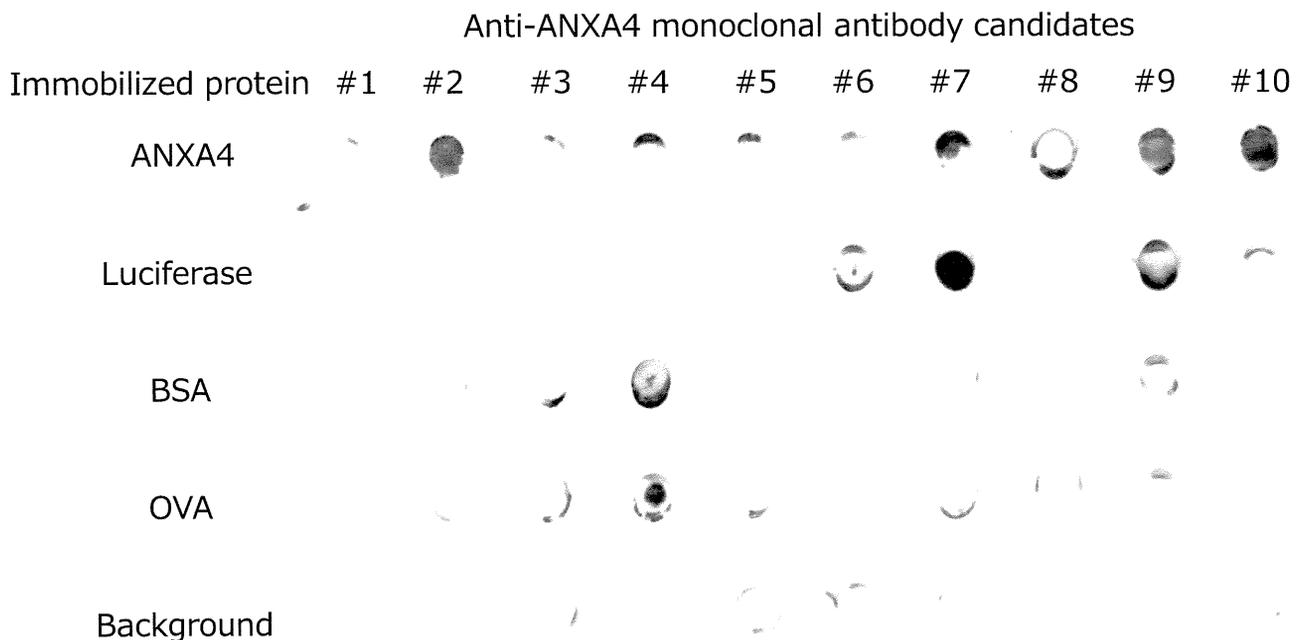


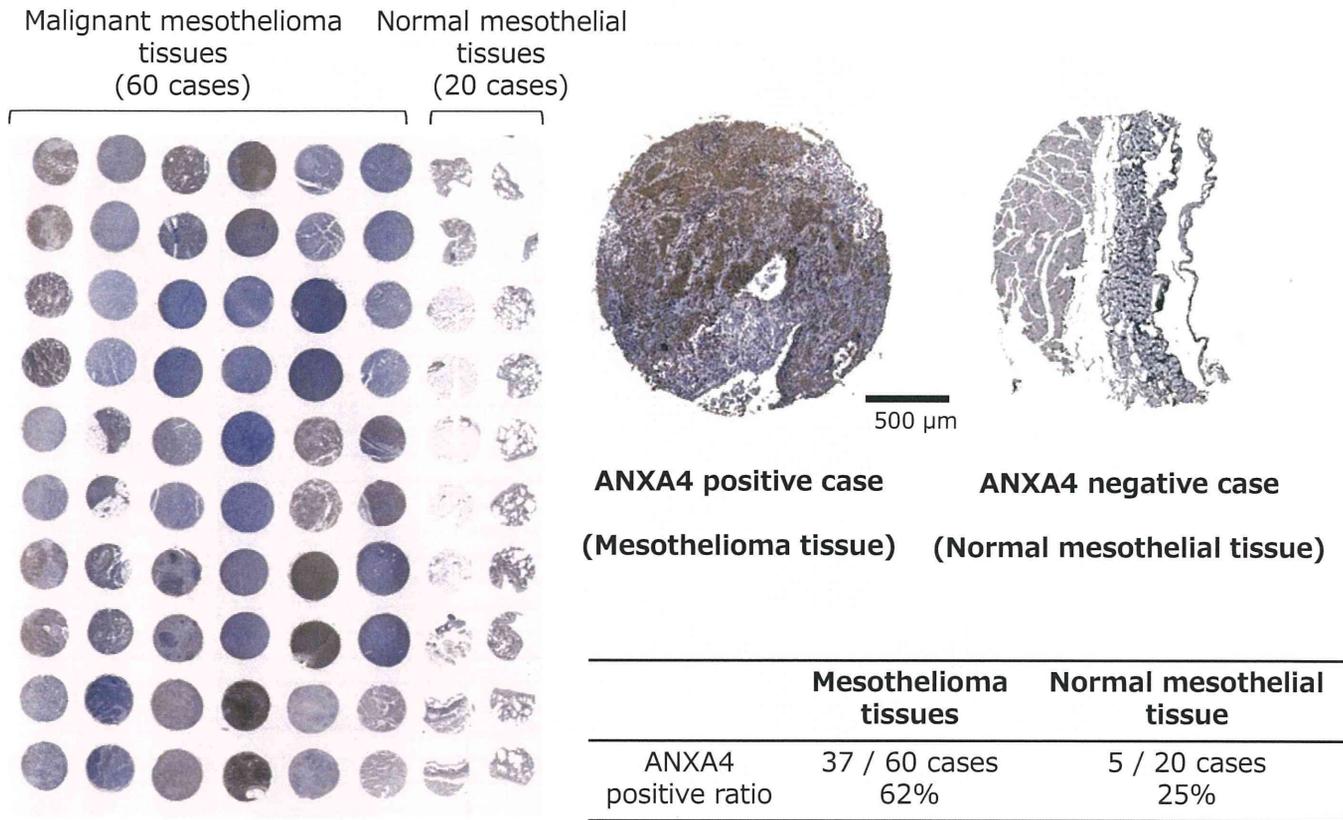
**Fig. 5 Screening of antibody against mesothelioma related candidate proteins by Dot Blot ELISA**

After the fourth panning, the binding properties of the selected phage clones were analyzed by Dot Blot ELISA. The positive clones were indicated by arrows.



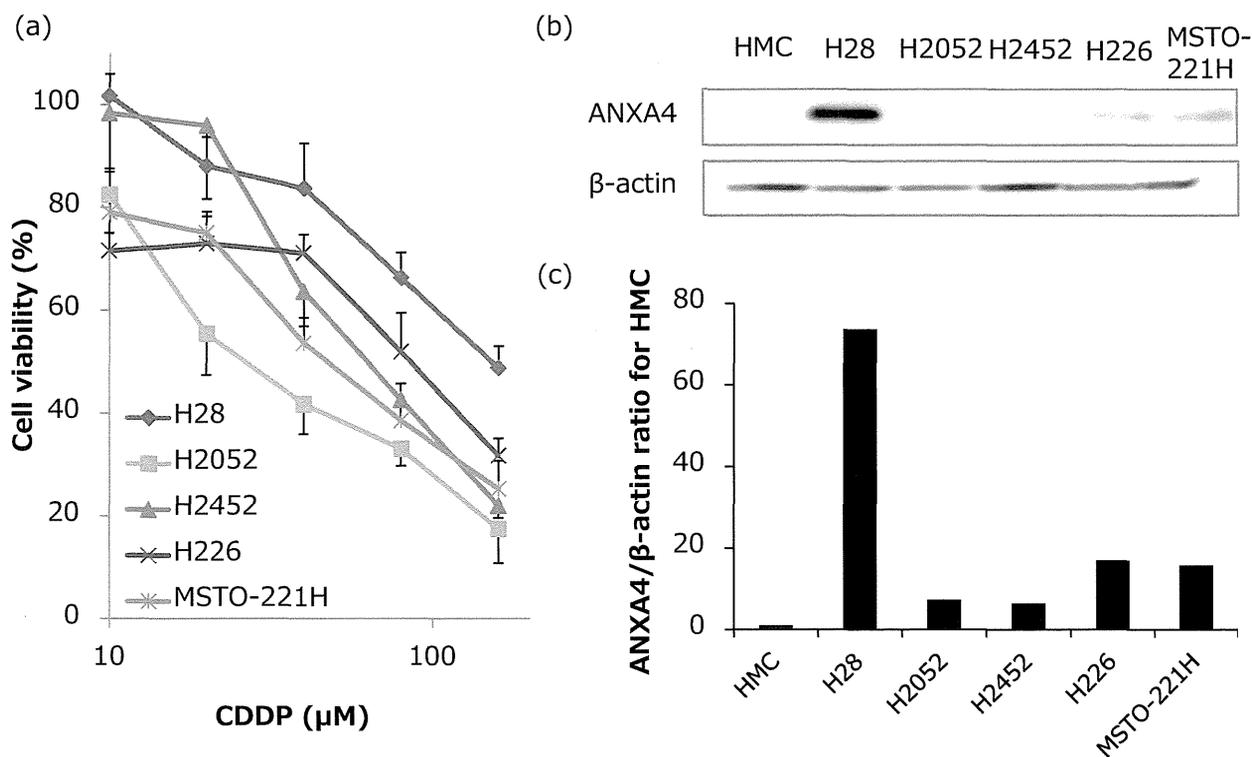
**Fig. 6 Specificity analysis of 10 anti-ANXA4 monoclonal antibody candidates-expressing phage by dot blot ELISA**

Antigen proteins were immobilized on nitrocellulose membrane. Anti-ANXA4 monoclonal antibody candidates-expressing phages ( $1 \times 10^{12}$  CFU) as primary antibody were incubated with each antigen. Binding to each antigen was detected by HRP conjugated anti-M13 antibody.



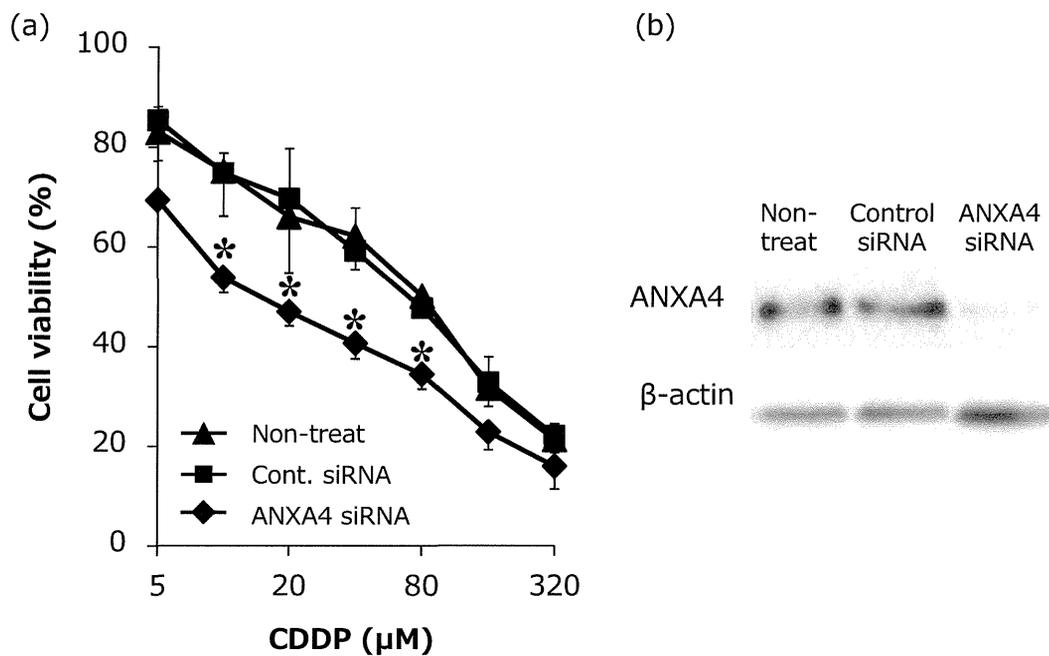
**Fig. 7 ANXA4 expressed ratio in clinical mesothelioma / normal mesothelial tissues**

Tissue microarray with 60 mesothelioma and 20 normal mesothelial tissues was immunostained using anti-ANXA4 antibody-expressing phages (clone #2). Distribution score was scored as 0 (0%), 1 (1– 50%), and 2 (51– 100%) to indicate the percentage of positive cells in all tumor cells present in one tissue. The intensity of the stain (intensity score) was scored as 0 (no signal), 1 (weak), 2 (moderate), and 3 (marked). The cases that sum of distribution score and intensity score was more than 3 score were regarded as positive.



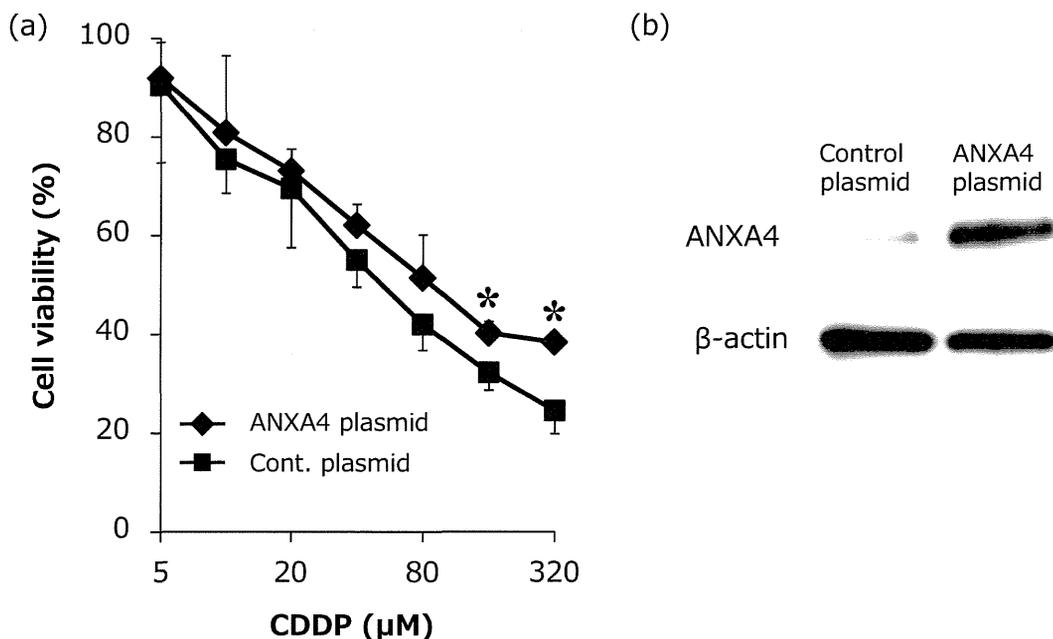
**Fig. 8 Correlation of ANXA4 expression and CDDP susceptibility in malignant mesothelioma cells.**

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 (a). ANXA4 expression level in human primary mesothelial cell, HMC, and mesothelioma cell lines was analyzed by western blotting (b). Intensity of the western blotting images was quantified by densitometry (c).



**Fig. 9 The effect of ANXA4 gene knockdown on CDDP susceptibility in malignant mesothelioma cells.**

Transfection of ANXA4 siRNA into H28 malignant mesothelioma cells confers resistance to CDDP. Cell viability after 36 h treatment of ANXA4 siRNA with different concentrations of CDDP was evaluated by WST-8 assay (a). Expression of ANXA4 was analyzed by western blot analysis (b). Data are shown as means and standard deviations ( $n=4$ ). \* $P < 0.05$  (Control siRNA-treated group vs ANXA4 siRNA-treated group)



**Fig. 10 The effect of ANXA4 gene overexpression on CDDP susceptibility in malignant mesothelioma cells.**

Transfection of ANXA4 siRNA into H2052 malignant mesothelioma cells confers resistance to CDDP. Cell viability after 24 h treatment of ANXA4 plasmid with different concentrations of CDDP was evaluated by WST-8 assay (a). Expression of ANXA4 was analyzed by western blot analysis (b). Data are shown as means and standard deviations ( $n=4$ ). \* $P < 0.05$  (Control plasmid-treated group vs ANXA4 plasmid-treated group)

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 \*equal contributor

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>長野一也</u>	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.	<b>Drug Delivery System</b>	25 (4)	428-429	2010
<u>Nagano K.</u>	Search for breast cancer-related biomarker proteins for drug discovery.	<b>Yakugaku Zasshi</b>	130 (12)	1701-1706	2010
<u>Nagano K.</u> , 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 -	<b>Yakugaku Zasshi</b>	130 (4)	487-492	2010
Yoshida Y., Yamashita T., <u>*Nagano K.</u> , 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.,	<b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b>	405 (4)	610-614	2011
Imai S., <u>*Nagano K.</u> , 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.	<b>Biomaterials</b>	32 (1)	162-169	2011

雑誌 続き \*equal contributor

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., <b>Nagano K.</b> , Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.	Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- $\alpha$ using a phage display system with one-step competitive panning.	<b>Biomaterials</b>	32	5498-5504	2011
Yamashita T., <b>*Nagano K.</b> , 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.	<b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b>	421 (1)	140-144	2012
Yamashita T., Okamura T., <b>*Nagano K.</b> , 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.	<b>Pharmazie</b>	67 (3)	253-255	2012
Takano M., Yamashita T., <b>Nagano K.</b> , Otani M., Maekura K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Tomiya 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.	<b>Neuroscience Letters</b>	534	85-89	2013

# 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

長野 一也

独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト



2005年静岡国立大学薬学部を卒業後、大阪大学大学院薬学研究科博士前期・後期課程(薬剤学分野：中川晋作教授)に進学。2009年4月より(独)医薬基盤研究所プロジェクト研究員(創薬プロテオミクスプロジェクト：堤 康史リーダー)に採用され、本年4月よりバイオ創薬プロジェクト(角田慎一リーダー)で研究に従事。現在に至る。この間、日本学術振興会特別研究員DC1(2007～2008年)、(独)医薬基盤研究所研修生(2005～2008年)。

大学在学中から現在に至るまで一環として、創薬に適う分子の探索とその応用研究に携わってきた。特に、元静岡国立大学副学長 辻 邦郎先生のご指導の下で実施した生理活性物質の探索・同定研究と、医薬基盤研究所に国内留学していた際に堤 康史先生からご指導いただいた疾患関連蛋白質の探索・同定研究を通じて習得した“技術や考え方”は、現在の研究基盤となっている。また、大阪大学大学院在学中に中川晋作先生からご指導賜ったDDS研究のいろはを生かし、プロテオーム解析から見いだした有用な蛋白質を創薬に展開させたいと考えている。趣味は、野球やスキー等スポーツ全般。

(ながの かずや)

幼いころより医療を通して人の役に立ちたいと願い、薬学部の門を叩いた筆者ではあったが、漠然と患者を救えるような薬を創りたいということ以外、具体的なビジョンをもっていたわけではなかった。そんな学部生のころ、薬の体内動態を自在に制御しようとするDDSが研究されていることを知り、「そんなことが可能なんだ」と心を熱くしたことをいまでも覚えている。化学療法による強い副作用に耐えながらの闘病者を身近で見てきた筆者にとっては、「これが実現すれば、副作用なく治療効果を引き出すことが可能なため、患者さんにとっては夢のような技術だ」という想いでいっぱいとなった。とりわけ、いまだ研究段階と思いついてきたDDSが、抗体医薬やポリエチレングリコール化製剤として、すでに実際の臨床現場で使われていることを知ったときは大きな感銘を受けた。

以来、DDS研究に魅せられ現在に至っており、下記に分子標的治療薬の開発等を目指して取り組んできた研究の一端をご紹介させていただく。

## プロテオミクス研究の現状

近年の分子標的治療薬の台頭も相俟って、その標的となる“創薬ターゲット”や的確な診断を可能とする“疾患マーカー”等の創薬バイオマーカーの探索研究は、臨床・創薬開発の現場において大きな注目を集めており、現在、さまざまな手法によって熾烈な国際競争が繰り広げられている。なかでも、生命活動を直接担っている「蛋白質」の質的・量的・時空間的な解析(プロテオミクス)を用いたアプローチに大きな期待が寄せられている。

プロテオミクスによって有用な蛋白質を同定するためには、まず、対

照試料と比較して疾患試料で発現変動している候補蛋白質を質量分析により同定し、そのうえで、見いだされた候補蛋白質の機能や有用性を検証する必要がある。このなかで候補蛋白質の同定に関しては、近年の質量分析機器の進展等に伴って、その数とスピードは飛躍的に進歩した<sup>1)</sup>。しかし、候補蛋白質のバリデーションに関しては、同定した蛋白質を一つ一つ評価していくか、各研究者の興味や経験からトライ・アンド・エラーで解析せざるをえないのが現状であり、同定できる蛋白質の数が増えた分だけこの検証過程が律速となっている。そのため、プロテオミクス研究から医薬品開発へと展開できた例はほとんどない<sup>2)</sup>。いっても過言ではない。これは、蛋白質の発現分布や機能解析に必須のツールである抗体を、数多くの候補蛋白質に対して手に持つことが困難であることに起因している。

近年、試薬メーカー等により多種類の抗体が提供されつつあるが、興味深い蛋白質であるほど、抗体は市販されておらず、とりわけ、詳細な解析に必須となるモノクローナル抗体は、多くの場合、みずから作製する必要がある。しかし、従来のハイブリドーマによるモノクローナル抗体作製法では、①1つの抗原に対して抗体を作製するにさえ、数カ月以上もの時間を費やさなければならぬ。さらに、②プロテオミクス研究の汎用法である二次元電気泳動のゲルから直接得られる蛋白質は概して微量なため、動物への免疫を必要とする本方法では、遺伝子のクローニングや大腸菌等での蛋白質発現・精製といった過程も経なければならず、数十から数百もの候補蛋白質に対応することはきわめて困難であった。

# 若手研究者のひろば

Development of antibody proteomics technology for efficient screening of biomarker proteins

Kazuya Nagano

National Institute of Biomedical Innovation, Laboratory of Biopharmaceutical Research

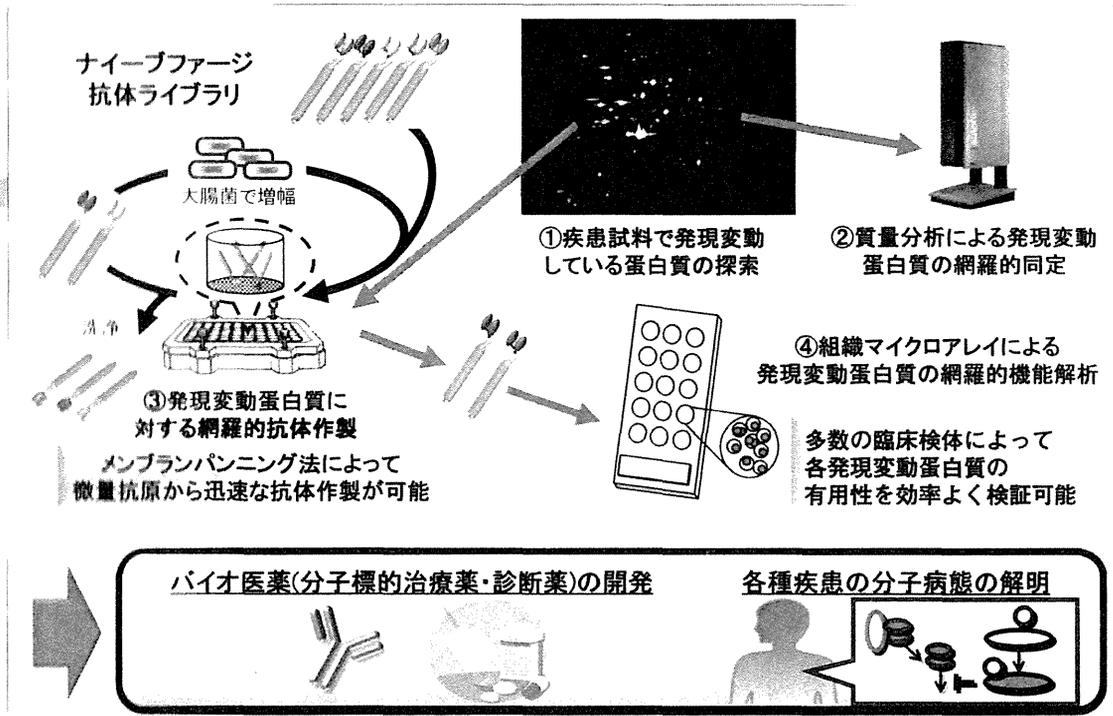


図1 抗体プロテオミクス技術による創薬バイオマーカー蛋白質の探索とバイオ医薬の開発

## 抗体プロテオミクス技術の開発

このような背景から、「上記の問題点を解決しうる方法論として、筆者らは「抗体プロテオミクス技術」の開発を進めてきた(図1)。

まず、前者の問題点に対して筆者らは、*in vitro*でモノクローナル抗体を作製可能なファージ抗体ライブラリに着目した。研究に取りかかった当時、有用で自由に使うことのできるライブラリがなかったため、Kabat抗体データベース等を参考にV遺伝子増幅用のプライマーセットを新たに設計することで、独自のナイーブファージ抗体ライブラリの作製を試みた。その結果、20億種類以上もの抗体多様性を有するライブラリの構築に成功し、各種蛋白質に対するモノクローナル抗体を約2週間取得できることを実証した<sup>1)</sup>。

そこでつぎに、後者の問題点を解決すべく、筆者らは蛋白質の吸着力にすぐれたニトロセルロース膜を抗原蛋白質の固相担体に利用することで、微量抗原からであっても目的ク

ローンを選別可能な方法を確立した。これにより、0.5 ngもの微量抗原からでも抗体を作製することができるようになり、プロテオーム解析から回収されるngオーダーの蛋白質にも対応可能となった。

さらに筆者らは、生命現象や疾病メカニズムの解明、的確な診断・有効な治療薬開発に適う創薬バイオマーカーを絞り込むためのツールとして、組織マイクロアレイ(TMA)に着目した。TMAは多症例の臨床組織切片が1枚のスライドガラスに搭載されたもので、目的抗原に対する抗体で免疫染色すれば、1度の解析で、多数の症例における発現プロファイルを取得でき、さらに、Clinical Stage等の各症例が有している臨床情報との相関も解析することが可能となる<sup>2)</sup>。筆者らは、種々の条件検討の結果、ファージ発現型抗体を用いて、免疫染色が可能であることを見いだしており、これらの技術を組み合わせることによって、最短1カ月でプロテオーム解析から

有用なバイオマーカー蛋白質をハリデーションすることが可能となった。

現在、産官学連携のもと、乳がんや悪性中皮腫等、がんをはじめとする各種疾患に本技術を適応し、疾患特異的な蛋白質や、リンパ節転移、抗がん剤耐性に関与するいくつかの興味深い分子を見いだすことに成功している。今後、これら創薬バイオマーカー候補蛋白質による診断薬・分子標的治療薬の開発を目指していきたいと考えている。

## 文献

- 1) Yates JR et al. : Annu Rev Biomed Eng 11 : 49-79, 2009.
- 2) Imai S et al. : Biol Pharm Bull 29 : 1325-1330, 2006.
- 3) Nagano K et al. : Pharmazie 64 : 238-241, 2009.
- 4) Camp RL et al. : J Clin Oncol 26 : 5630-5637, 2008.

## 抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカーの探索とその評価

長野 一也

## Search for Breast Cancer-related Biomarker Proteins for Drug Discovery

Kazuya NAGANO

*Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation,  
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan*

(Received July 5, 2010)

The identification of biomarkers is a promising approach for the diagnosis and effective therapy of cancer. In particular, disease proteomics is a potentially useful method for identifying such biomarkers. However, very few biomarker proteins for drug development have been discovered using this approach. The main difficulty is to efficiently select potential biomarkers from the many candidate proteins identified by the proteomics approach. To circumvent this problem, we have developed “antibody proteomics technology” that can screen for biomarker proteins by isolating antibodies against each candidate in a rapid and comprehensive manner. Here, we applied “antibody proteomics technology” to breast cancer-related biomarker discovery and evaluated the utility of this novel technology. Cell extracts derived from breast tumor cells (SKBR3) and normal cells (184A1) were analyzed by two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) to identify proteins over-expressed in the tumor cells. Candidate proteins were extracted from the gel pieces, immobilized onto a nitrocellulose membrane using a dot blot apparatus and then used as target antigens in scFv-phage enrichment and selection. Following this *in vitro* phage selection procedure, scFvs binding to 21 different over-expressed proteins in tumor cells were successfully isolated within several weeks. The expression profiles of the identified proteins were then determined by tissue microarray analysis using the scFv-phages. Consequently, we identified three breast tumor-specific proteins. Our data demonstrates the utility of an antibody proteomics system for discovering and validating tumor-related proteins in pharmaceutical proteomics. Currently, we are analyzing the functions of these proteins to use them as diagnostic markers or therapeutic targets.

**Key words**—biomarker protein; antibody proteomics; phage antibody library; tissue microarray

## 1. はじめに

近年、医療の個別化・最適化の高まりも相まって、各種疾患治療薬の標的となり得る“創薬ターゲット”や、的確な診断を可能とする“疾患マーカー”といった創薬バイオマーカーの探索研究が、臨床や創薬研究現場において大きな注目を集めており、熾烈な国際競争が繰り広げられている。中でも、生命現象の直接の担い手である「タンパク質」に着目し、疾患状態におけるタンパク質の質的・量的・時空間的变化を網羅的に解析しようとする疾患プロテオミクスのアプローチに大きな期待が寄せられている。疾患プロテオミクスによる創薬バイオマーカータン

パク質の同定は、対照試料と比較して疾患試料で発現変動しているタンパク質を質量分析法により網羅的に同定し、その上で、見い出された候補タンパク質の機能を解析することで、その有用性をバリデーションし、絞り込むことになる。このようなプロセスの中で、候補タンパク質の同定に関しては、近年の質量分析装置の高性能化等に伴って、その数とスピードは飛躍的に進歩し、一度の解析で数十、数百といった発現変動タンパク質の同定が可能となっている。<sup>1)</sup>しかし、候補タンパク質のバリデーションに関しては、同定したタンパク質を1つ1つ評価するか、各研究者の興味や経験からトライ・アンド・エラーで解析せざるを得ないのが現状であり、同定されるタンパク質の数が増えた一方で、この検証と絞り込みの過程が創薬研究における律速となっている。そのため、プロテオミクス研究から医薬品開発にまで展開できた例はほとんどないといっても過言

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト  
(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8)  
e-mail: knagano@nibio.go.jp

本総説は、平成21年度日本薬学会近畿支部奨励賞(生物系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

ではない。これは、タンパク質の発現分布や機能解析に必須のツールである抗体を、数多くの候補タンパク質に対して手にすることが困難であることに起因している。近年、試薬メーカー等により多種類の抗体が提供されつつあるが、興味深いタンパク質であるほど、抗体は市販されておらず、とりわけ、詳細な解析に必須となるモノクローナル抗体は、多くの場合、自ら作製する必要がある。しかし、モノクローナル抗体作製の常法であるハイブリドーマ法では、①1つの抗原に対して抗体を作製するのにさえ、数ヵ月以上もの時間と多大な労力を費やさなければならない。さらに、②プロテオミクス研究の汎用法である二次元電気泳動のゲルから直接回収できるタンパク質は概して微量（数 100 ng 以下）であるため、動物への免疫を必要とする本方法では、遺伝子のクローニングやリコンビナントタンパク質の発現・精製といった過程を経なければならない。数十、あるいは数百種類も同定されてくる候補タンパク質に対応することは極めて困難である。

本観点から筆者らは、上記課題を克服し、創薬バイオマーカータンパク質の探索から、バリデーション・絞り込みまでを迅速に効率よく行い得る創薬基盤技術、「抗体プロテオミクス技術」を確立した。本稿では、抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカータンパク質の探索の試みについて紹介させて頂く。

## 2. 抗体プロテオミクス技術の開発

まず、数多くの候補タンパク質に対してハイスループットに抗体を作製するため、筆者らは、*in vitro* でモノクローナル抗体を作製可能なナイーブファージ抗体ライブラリに着目した。ナイーブファージ抗体ライブラリは、生体が有する多様なレパートリーの抗体 Fv 領域を、リンカーペプチドにより一本鎖化した scFv の形でファージ表面に発現させたライブラリである。研究に取りかかった当時、有用で自由に使うことのできるナイーブファージ抗体ライブラリがなかったため、抗体 V 遺伝子を網羅的に増幅可能とする PCR プライマーセットを独自に設計することで、マウス由来ナイーブファージ抗体ライブラリの作製を試みた。その結果、20 億種類以上ものレパートリーを有する抗体ライブラリの構築に成功し、各種タンパク質に対する特異的抗体発現ファージを約 2 週間で単離できること

を実証した。<sup>2,3)</sup> そこで続いて、抗原としてリコンビナントタンパク質を別途作製することなく、二次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE) ゲルから回収されるナノグラムオーダーのタンパク質を直接用いて、抗体を取得し得る方法論の確立を試みた。筆者らは、抗原タンパク質の固相化担体として、タンパク質の吸着力に優れたニトロセルロース膜を利用し、ドットプロット装置上でファージ抗体ライブラリの選別操作を行ったところ、わずか 0.5 ng の微量抗原からでも目的抗体を単離することが可能であることを明らかとした (メンブランバニング法)。以上のプロセスにより、二次元電気泳動法によるプロテオミクス解析で同定される候補分子に対して、*in vitro* で迅速に抗体を取得し得る方法を確立することができた。本方法により抗体を取得できれば、タンパク質レベルでの様々な機能解析が可能となる。そこで筆者らは、多数の臨床サンプルで候補分子の有用性を効率よくバリデーションし、真に有用な創薬バイオマーカーを絞り込むためのツールとして、組織マイクロアレイ (TMA) に着目した。TMA は多症例の臨床組織切片が 1 枚のスライドガラスに搭載されたもので、目的抗原に対する抗体で免疫染色すれば、1 度の解析で、多数の症例における発現プロファイルを取得でき、さらに、各症例が有している様々な臨床情報との相関も解析することが可能となる。<sup>4)</sup> 種々の条件検討の結果、ファージ発現型抗体を用いて、TMA の免疫染色が可能であることを見い出しており、これらの技術を組み合わせることによって、最短 1 ヶ月程度で、プロテオーム解析から有用なバイオマーカータンパク質の絞り込みまでを達成することが可能となった。

以上、疾患サンプルの 2D-DIGE 法による発現変動タンパク質の同定から、抗体の網羅的作製、さらに多数の臨床サンプルでのバリデーションまでを迅速かつ効率よく完了できるシステムを、われわれは「抗体プロテオミクス技術」と名付けた。具体的なプロセスとしては、Fig. 1 で示すように、①疾患サンプルとしてがん細胞株等を用い、健常組織由来細胞株を対照として、2D-DIGE により発現変動タンパク質を探索する。②電気泳動後のゲルから回収される数 100 ng 以下のタンパク質の一部を使用して質量分析法によりタンパク質を同定する。③一方で、一部のタンパク質をニトロセルロース膜上に固

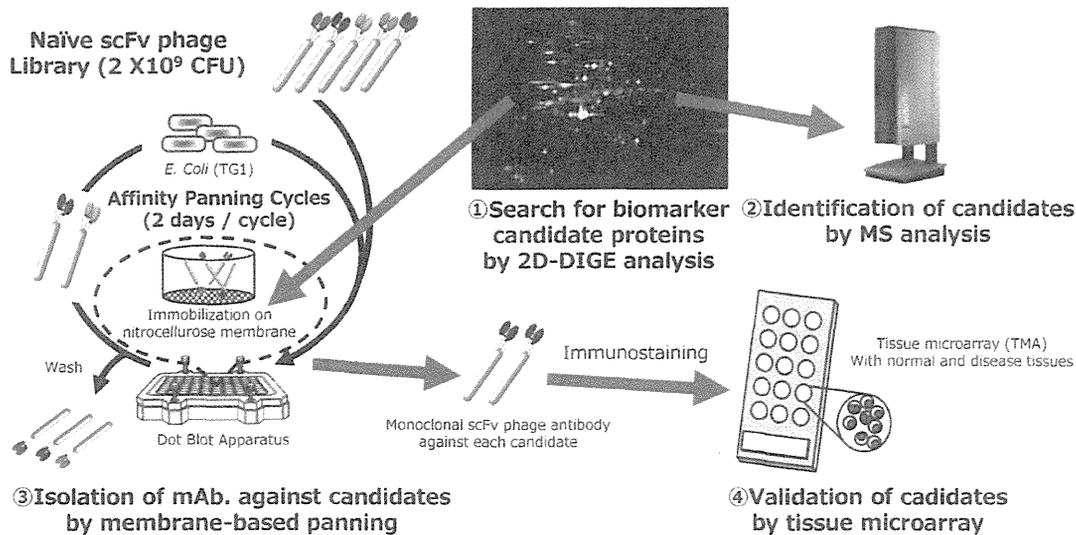


Fig. 1. Schematic Illustration of Antibody Proteomics Technology

Monoclonal antibodies against many differentially expressed proteins could be rapidly created by applying naive phage scFv library to proteomics study, and these candidates could be effectively validated by tissue microarray.

相化し、24億種類の抗体レパートリーからなるナイーブファージ抗体ライブラリにより、目的とするタンパク質に対して高親和性抗体クローンをスクリーニングする。④得られたファージ抗体とTMAによる発現プロファイリングにより、候補タンパク質の創薬バイオマーカーとしての有用性を多数の臨床サンプルでバリデーションする。

本技術は、多数の発現変動タンパク質の中から真に価値のある『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット』の候補を、効率よくバリデーションし、絞り込むことができる唯一の方法であり、創薬研究に極めて有用な基盤技術になるものと考えられる。そこで以下では、本技術の有用性検証を目的として、乳がんの創薬ターゲットタンパク質、あるいは悪性度診断のための疾患マーカータンパク質の同定を試みた。

### 3. プロテオーム解析による乳がん関連タンパク質の同定と網羅的な抗体作製

不死化乳腺細胞株 184A1 から調製したタンパク質を対照サンプルに、乳がん細胞株 SKBR3 から調製したタンパク質を疾患サンプルとして 2D-DIGE 解析を行った。定量的解析により発現変動レベルの大きかった 21 個の spot について、ゲルを切り出し、ゲルを溶解することによりタンパク質を回収した。回収したタンパク質の一部を用いて質量分析により解析 (PMF 及び MS/MS) したところ、すべてのスポットのタンパク質を同定することができた

Table 1. Identification of Differentially-expressed Proteins in Breast Cancer Cells by MALDI-TOF/MS

Spot#	Protein name	MW (kDa)	pI	Expression ratio (folds) [cancer/normal]
1	Splicing factor YT521-B	85	5.9	6
2	IkappaBR	63	5.5	6
3	SPATA5	76	5.6	7
4	Skin aspartic protease	37	5.3	0.1
5	Beta actin variant	42	5.3	15
6	TRAIL-R2	48	5.4	18
7	Cytokeratin 18	48	5.3	12
8	TRAIL-R2	48	5.4	16
9	RREB1	52	5.3	10
10	Cytokeratin 7	51	5.4	23
11	Cytokeratin 18	48	5.3	13
12	Cytokeratin 7	51	5.4	24
13	FLJ31438	53	5.5	35
14	Cytokeratin 7	51	5.4	36
15	PAK65	55	5.7	8
16	Cytokeratin 8	54	5.5	32
17	Cytokeratin 8	54	5.5	72
18	XRN1	54	5.8	8
19	Jerky protein homolog-like	51	6.0	22
20	EPH receptor A10	32	5.7	9
21	Glutathione S transferase	23	5.4	0.02

(Table 1). また、回収したタンパク質の一部を用いて、メンブランパンニング法によりファージ抗体の単離を試みた。その結果、すべてのタンパク質に対して親和性を有するファージ抗体を単離すること

ができた。ファージ抗体の単離に要した期間は約2週間であり、2D-DIGEによるプロテオーム解析から同定・回収される微量で多種類のタンパク質を直接抗原として使用し、それらに対する抗体を迅速に取得可能な方法論であることが確認できた。

#### 4. 組織マイクロアレイ解析による乳がん関連マーカータンパク質の絞り込み

候補タンパク質に対する抗体を手にすることができれば、様々な機能解析が可能となる。そこで、得られたファージ発現型抗体を用いて、がん組織マイクロアレイを免疫染色し、同定されたタンパク質の発現プロファイリングを試みた。189症例の乳がん組織と15症例の正常の乳腺組織が搭載されたTMAを用いて、ファージ発現型抗体にて染色した。その結果、SPATA5, Beta actin variant, FLJ31438, PAK65, XRN1に関しては正常乳腺組織においても、がん組織においてもほとんど発現は認められなかった。一方、カスパーゼカスケードの活性化を介したアポトーシス誘導性の受容体であるTNF-related apoptosis-inducing receptor 2 (TRAIL-R2)は約60%、細胞骨格を構成する中間径フィラメント構成タンパク質であるCytokeratin 8は約70%、機能がほとんど知られていないチロシンキナーゼ型受容体であるEPH receptor A10 (EPHA10)は約50%の症例で共通して発現していたが、正常乳房組織での発現は認められなかった (Table 2)。現在、乳がんでは汎用されている抗体医薬トラスツズマブの標的分子Her-2が約30%の陽性率であることを考慮すると、これら3種類のタンパク質は、乳がんの優れた創薬ターゲットになり得るものと期待される。また、Her-2陽性あるいは陰性症例において、これら候補タンパク質の発現を調べたところ、Her-2陽性患者のうち、TRAIL-R2あるいはEPHA10は、約77%あるいは62%の割合で発現しており、これら分子のうち、いずれかが発現している割合は約87%の症例であった。一方、Her-2陰性の症例においても、約70%の症例がTRAIL-R2あるいはEPHA10いずれかに陽性であった [Fig. 2(A)]。現在臨床で、抗Her-2抗体が乳がんに対する画期的な治療薬として汎用されているが、TRAIL-R2とEPHA10も細胞膜タンパク質であることから、抗Her-2抗体が適用されないHer-2陰性症例に対する新規創薬ターゲットになり得るものと期待される。また、

Table 2. Validation of Biomarker Candidates by Tissue Microarray with Breast Cancer and Normal Tissues

Protein name	Positive rate of identified proteins	
	Normal breast tissues	Breast cancer tissues
Her-2	0/15 cases (0%)	53/189 cases (28%)
IkappaBR	3/15 cases (20%)	22/189 cases (12%)
SPATA5	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
Beta actin variant	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
TRAIL-R2	0/15 cases (0%)	119/189 cases (63%)
RREB1	1/15 cases (7%)	83/189 cases (44%)
FLJ31438	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
PAK65	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
Cytokeratin 8	0/15 cases (0%)	137/189 cases (73%)
XRN1	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
Jerky protein homolog-like	0/15 cases (0%)	0/189 cases (0%)
EPH receptor A10	0/15 cases (0%)	93/189 cases (49%)

Her-2陽性症例においても、抗Her-2抗体による治療を続けるうちに耐性が生じることが問題になっていることから<sup>5,6)</sup> そのような患者に対しても有用な創薬ターゲットになり得るものと期待される。

続いて、上記候補分子の発現と臨床情報との相関解析を試みた。その結果、Cytokeratin 8とEPHA10の発現は、乳がんの病期の進行と有意な相関が認められた [Fig. 2(B)]。したがって、Cytokeratin 8やEPHA10は乳がんの進行に関連するタンパク質であり、悪性度を客観的に予測・評価し得る診断マーカーになり得るものと考えられる。近年、TRAIL-R2は、がんの新たな分子標的として抗体医薬の開発が進んでおり<sup>7,8)</sup> またCytokeratin 8はがんの悪性度に係わることが報告されている<sup>9,10)</sup> 以上の結果は、抗体プロテオミクス技術が、多種類の発現変動タンパク質の中から、有用なマーカータンパク質を迅速かつ効率的に絞り込むことが可能な極めて有用な創薬基盤技術であることを示すものである。

#### 5. おわりに

本稿では、筆者らが確立した「抗体プロテオミクス技術」と、その応用例について紹介した。本技術

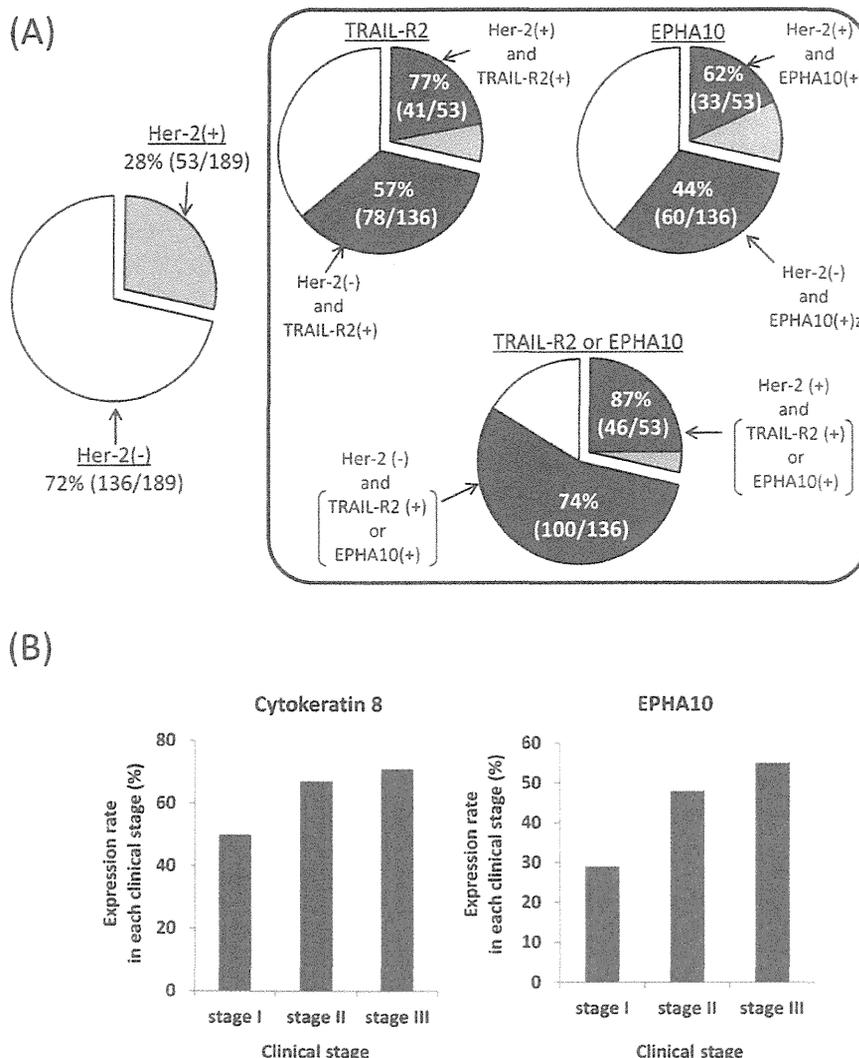


Fig. 2. Correlation Analysis between the Expression Profile of Biomarker Candidates and Clinical Information

(A) The expression rate of drug target candidates, TRAIL-R2 and EPHA10, in Her-2 positive and negative cases. The expression of Her-2 in 28% of breast tumor cases describes gray. The expression of each candidate in Her-2 positive and negative cases describes black. (B) The expression rate of diagnosis marker candidates, Cytokeratin 8 and EPHA10, in each clinical stage (stage I; n=14, stage II; n=87, stage III; n=86).

により乳がんの創薬バイオマーカータンパク質の探索を試みた結果、有望な候補分子として、TRAIL-R2, Cytokeratin 8, EPHA10を絞り込むことができた。中でもTRAIL-R2, EPHA10は、乳がんに対する新たな治療薬のターゲットになり得ることが期待される。現在、これら分子の詳細な機能解析を進めるとともに、抗体医薬の開発を目指した研究を進めている。今後、抗体プロテオミクス技術が、わが国の創薬研究に貢献することを願っている。

**謝辞** 本研究は、独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクトチーフリーダー・大阪大学

薬学研究科毒性学分野教授堤 康央先生、独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクトリーダー角田慎一先生を始めとする、研究室のメンバー諸氏の多大な協力を得て成されたものであり、この場をお借りして御礼を申し上げます。また本研究の遂行にあたり、ご指導ご助言を賜りました富山大学医学部附属病院外科病理学講座教授福岡順也先生、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授中川晋作先生、同助教向 洋平先生、に感謝の意を表します。なお本研究は、文部科学省科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究事業の

支援を受けて実施したものです。

#### REFERENCES

- 1) Yates J. R., Ruse C. I., Nakorchevsky A., *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **11**, 49–79 (2009).
- 2) Imai S., Mukai Y., Nagano K., Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nomura T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1325–1330 (2006).
- 3) Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Pharmazie*, **64**, 238–241 (2009).
- 4) Camp R. L., Neumeister V., Rimm D. L., *J. Clin. Oncol.*, **26**, 5630–5637 (2008).
- 5) Nahta R., Yu D., Hung M. C., Hortobagyi G. N., Esteva F. J., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 269–280 (2006).
- 6) Mehta K., Osipo C., *TheScientificWorldJournal*, **9**, 1438–1448 (2009).
- 7) Plummer R., Attard G., Pacey S., Li L., Razak A., Perrett R., Barrett M., Judson I., Kaye S., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Calvert H., de Bono J., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 6187–6194 (2007).
- 8) Camidge D. R., Herbst R. S., Gordon M. S., Eckhardt S. G., Kurzrock R., Durbin B., Ing J., Tohny T. M., Sager J., Ashkenazi A., Bray G., Mendelson D., *Clin. Cancer Res.*, **16**, 1256–1263 (2010).
- 9) Wolff J. M., Borchers H., Brehmer B. Jr., Brauers A., Jakse G., *Urol. Int.*, **60**, 152–155 (1998).
- 10) Fukunaga Y., Bandoh S., Fujita J., Yang Y., Ueda Y., Hojo S., Dohmoto K., Tojo Y., Takahara J., Ishida T., *Lung Cancer*, **38**, 31–38 (2002).

疾患プロテオミクスからバイオマーカーの創出へ  
—抗体プロテオミクス技術の確立とがん関連マーカーの探索—

長野一也,<sup>a</sup> 今井 直,<sup>a</sup> 中川晋作,<sup>b,c</sup> 角田慎一,<sup>\*,a,b,c</sup> 堤 康央<sup>a,b,c</sup>

From Disease Proteomics to Biomarker Development  
—Establishment of Antibody Proteomics Technology and  
Exploration of Cancer-related Biomarkers—

Kazuya NAGANO,<sup>a</sup> Sunao IMAI,<sup>a</sup> Shinsaku NAKAGAWA,<sup>b,c</sup>  
Shin-ichi TSUNODA,<sup>\*,a,b,c</sup> and Yasuo TSUTSUMI<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmaceutical Proteomics (LPP), National Institute of Biomedical Innovation (NiBio),  
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, <sup>b</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and <sup>c</sup>The Center for  
Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University,  
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 31, 2009)

Molecular biomarkers are keys to the development of new diagnostic protocols and therapies. Recently, significant research effort has been devoted to the development of these biomarkers using various approaches. Perhaps the most promising approach is disease proteomics. This method involves analyzing and identifying changes in the expression pattern at the protein level in the diseased condition (disease-related proteins) by using two-dimensional differential gel electrophoresis analysis (2D-DIGE). In the case of disease proteomics, hundreds of candidate disease-related proteins can be identified at a time. Therefore, how to pick the really valuable proteins up from a number of candidate drug targets is the most important issue to be solved worldwide. Here, we introduce a novel approach, termed “antibody proteomics”, which addresses this issue. Using antibody proteomics it is possible to identify a variety of disease-related proteins by 2D-DIGE and simultaneously prepare monoclonal antibodies to these proteins by using a phage antibody library. The advantage of this technology is that the target proteins are identified in a high-throughput manner. Our approach relies on the fact that tissue microarray analysis can evaluate the relationship between disease-related proteins and disease progression, based on clinical and pathological information. In this review, we discussed the development and application of antibody proteomics and gave an overview of future work.

**Key words**—antibody proteomics; molecular biomarker; disease proteomics; phage antibody library

## 1. はじめに

近年のプロテオミクス関連技術の進展に伴って、がんを始めとする各種病態を的確に診断するための“疾患バイオマーカー”や“創薬ターゲットあるいは医薬品シーズ”等を探索し、医薬品開発への展開を目指す創薬プロテオミクス研究に大きな期待が寄

せられ、熾烈な国際的競争が繰り広げられている。<sup>1)</sup> 欧米各国では既に、2000年頃から大量の国家予算を投じ、メガファーマやバイオベンチャーをも巻き込んで、創薬プロテオミクス研究に大規模着手しており、本邦でも厚生労働省所管の国家プロジェクト等により現在研究が推進されているところである。しかし残念ながら、世界的にみても、創薬プロテオミクス研究から医薬品開発にまで展開できた例はいまだ乏しいのが現状である。それは、疾患の発症や悪化の際には数十から数百種類以上のタンパク質が発現変動しており、これらの中から本当に価値のある『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ』の候補となるタンパク質を絞り込む

<sup>a</sup>独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8),

<sup>b</sup>大阪大学大学院薬学研究科(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6), <sup>c</sup>大阪大学臨床医工学融合研究教育センター(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

\*e-mail: tsunoda@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS6で発表したものを中心に記述したものである。

プロセスが不可欠であるが、それを可能とする技術基盤が圧倒的に不足していることに起因している。有用な候補タンパク質を絞り込むには、数多くの発現変動タンパク質の機能・局在、及び病態との関連解析が必要であり、そのためのツールとして、個々のタンパク質に対するモノクローナル抗体を得ることが必須である。しかし、抗体作製には、わずか一種類のタンパク質に対してですら、組換えタンパク質の作製、マウス等の動物への免疫、ハイブリドーマの作製とスクリーニング等のステップが必要であり、半年から数年を要してしまうため、プロテオミクスで見出される数十から数百種類以上の候補タンパク質に対してモノクローナル抗体を作製することは不可能といってもよい。これは、プロテオミクス研究に限らず、ゲノミクス・トランスクリプトミクスといった創薬を志向したオミクス研究全般に当てはまることであり、オミクス創薬のスループットを大きく制限する要因となっている。また、抗体創製の課題を克服できたとしても、『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット/医薬品シーズ』の候補タンパク質が絞り込まれた後には、多数の臨床検体を用いて、候補タンパク質の発現と病態との関連をバリデーションしなければならない。しかし、このバリデーションのプロセスに関して、膨大な数の臨床検体に対して、時間と労力を消費しながら解析せざるを得ないのが現状である。したがって、上記問題を克服し、創薬バイオマーカータンパク質を効率よく絞り込み、バリデーションを行い得る基盤技術の確立は、わが国の現在及び今後の創薬研究にとって緊急の課題である。

本観点から筆者らは、上記課題を克服し、創薬バイオマーカータンパク質を効率よく絞り込み、バリデーションを行い得る創薬基盤技術、「抗体プロテオミクス技術」を確立し、疾患マーカーや創薬ターゲットタンパク質の探索を進めている。本稿では、抗体プロテオミクス技術による乳がん関連バイオマーカータンパク質の探索の試みについて紹介する。

## 2. 抗体プロテオミクス技術

プロテオミクスによる発現変動タンパク質の網羅的探索には、2次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析が汎用されている。そこで、2D-DIGE解析から同定・回収される微量で多種類の発現変動タンパク質に対して、網羅的なモノクローナ

ル抗体の創製を実現するため、*in vitro*で抗体を作製可能なファージ抗体ライブラリに着目した。筆者らは、これまで独自にノウハウを確立してきたファージ表面提示法を駆使することにより、<sup>2,3)</sup>理論上あらゆる抗原に対する抗体を含んだナイーブファージ抗体ライブラリを独自に開発し、様々な抗原タンパク質に対して、最短2週間でモノクローナル抗体を作製することに成功している。<sup>4)</sup>また、微量抗原からでも抗体を単離できるように、抗原タンパク質の固相担体として、タンパク質の吸着能に優れるニトロセルロース膜を用いたファージ抗体ライブラリの濃縮法(メンブランパンニング法)を開発した。本方法を用いることで、わずか0.5 ngのタンパク質を得ることができれば、目的のファージ抗体を単離可能となった。一方で筆者らは、もう一つの課題であった候補タンパク質のバリデーション法に対して、組織マイクロアレイを用いた発現プロファイリングに着目した。組織マイクロアレイとは、多数の臨床組織切片を1枚のスライドガラス上に搭載したものであり、抗体を用いて免疫染色を行うことにより、目的タンパク質の発現プロファイルを一挙に取得でき、さらに各症例にリンクした種々の臨床情報との相関解析が可能である。

以上、疾患サンプルの2D-DIGE法による発現変動タンパク質の同定から、抗体作製と多数の臨床サンプルでのバリデーションまでのプロセスを、迅速かつ効率よく完了できるシステムを「抗体プロテオミクス技術」と称している。具体的なプロセスとしては、Fig. 1で示すように、①疾患サンプルとしてがん細胞株等を用い、健常組織由来細胞株を対照として、2D-DIGEにより発現変動タンパク質を探索する。②電気泳動後のゲルから回収される数100 ng以下のタンパク質の一部を使用して質量分析法によりタンパク質を同定する。③一方で、一部のタンパク質をニトロセルロース膜上に固相化し、24億種類の抗体レパートリーからなるナイーブファージ抗体ライブラリにより、目的とするタンパク質に対して高親和性抗体クローンをスクリーニングする。④得られたファージ抗体と組織マイクロアレイによる発現プロファイリングにより、多数の臨床サンプルでのバリデーションを行う。本技術は、多数の発現変動タンパク質の中から本当に価値のある『疾患バイオマーカーや創薬ターゲット』の候補を、効率

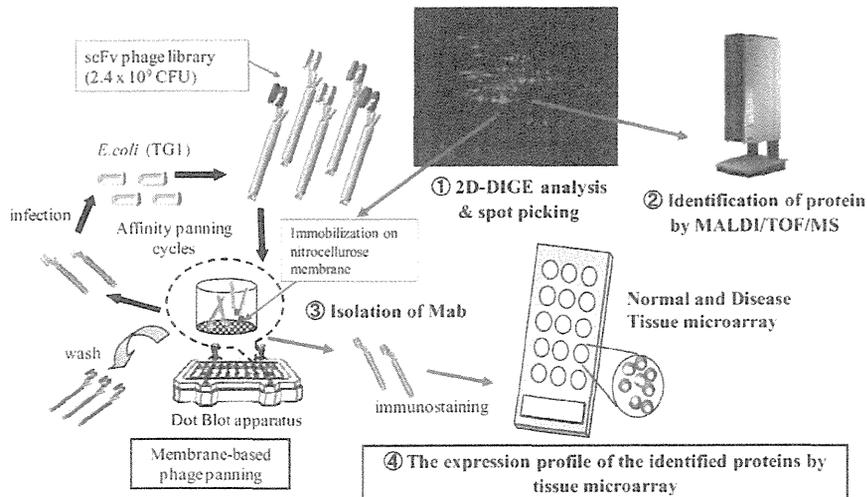


Fig. 1. Schematic Illustration of Antibody Proteomics Technology

Monoclonal antibodies against many differentially expressed proteins could be rapidly created by applying naive phage scFv library to proteomics study, and these candidates could be effectively validated by tissue microarray.

よく絞り込み・バリデーションできる唯一の方法であり、創薬プロテオミクス研究に極めて有用な基盤技術になるものと考えられる。

そこで以下に、本技術の有用性評価を目的として、乳がんの創薬ターゲットタンパク質、あるいは悪性度診断のためのマーカータンパク質の同定を試みた。

### 3. プロテオーム解析による乳がん関連タンパク質の同定と網羅的な抗体作製

不死化乳腺細胞株 184A1 から調製したタンパク質を対照サンプルに、乳がん細胞株 SKBR3 から調製したタンパク質を疾患サンプルとして 2 次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE) 解析を行った。定量的解析により発現変動レベルの大きかった 21 個の spot について、ゲルを切り出し、ゲルを溶解することによりタンパク質を回収した。回収したタンパク質の一部を用いて質量分析 (MS) により解析 (PMF 及び MS/MS) したところ、すべてのスポットのタンパク質を同定することができた (Table 1)。また、回収したタンパク質の一部を用いて、メンブランパンニング法によりファージ抗体の単離を試みた。その結果、21 種類すべてのタンパク質に対して親和性を有するファージ抗体を単離することができた。ファージ抗体の単離に要した時間は約 2 週間であり、2D-DIGE によるプロテオーム解析から同定・回収される微量で多種類のタンパク質を直接抗原として使用し、それらに対する抗体

Table 1. Identification of Differentially Expressed Proteins in Breast Cancer Cells by MALDI-TOF/MS

spot	protein name	MW	pI	cancer/normal
# 1	splicing factor YT521-B isoform 1	84649	5.9	Up 6-fold
# 2	IkappaBR	62872	5.5	Up 6-fold
# 3	SPATA5 protein	75580	5.6	Up 7-fold
# 4	skin aspartic protease	36938	5.3	Down 11-fold
# 5	beta actin variant	41694	5.3	Up 15-fold
# 6	TRAIL-R2	47820	5.4	Up 18-fold
# 7	cytokeratin 18	47305	5.3	Up 12-fold
# 8	TRAIL-R2 (Death receptor 5)	47820	5.4	Up 16-fold
# 9	RREB1 protein	51563	5.3	Up 10-fold
# 10	keratin K7 type II epithelial	51333	5.4	Up 23-fold
# 11	keratin 18	48029	5.3	Up 13-fold
# 12	keratin K7 type II epithelial	51333	5.4	Up 24-fold
# 13	FLJ31438 protein	52992	5.5	Up 35-fold
# 14	Keratin type II cytokeletal 7	51312	5.5	Up 36-fold
# 15	hPAK65	54880	5.7	Up 8-fold
# 16	Cytokeratin 8	53529	5.5	Up 32-fold
# 17	Keratin type II cytokeletal 8	53540	5.5	Up 72-fold
# 18	XRN1 protein	53784	5.8	Up 8-fold
# 19	Jerky protein homolog-like	50678	6.0	Up 22-fold
# 20	EPH receptor A10	32130	5.7	Up 9-fold
# 21	glutathione transferase	23159	5.4	Down 53-fold

を迅速に取得可能な方法論であることが確認できた。

### 4. 組織マイクロアレイ解析を用いた乳がん関連マーカータンパク質の探索

タンパク質に対する抗体を手にすることができれば、様々な機能解析が可能となる。そこで、得られ

たファージ抗体を用いて、がん組織アレイの免疫染色を行い、同定されたタンパク質の発現プロファイリングを試みた。189 症例の乳がん組織と 15 症例の正常の乳腺組織が搭載された組織マイクロアレイを用いて、ファージ抗体にて染色した。その結果、SPATA5 protein, Beta actin variant, FLJ31438 protein, HPAK65, XRN1 protein に関しては正常乳腺組織においても、がん組織においてもほとんど発現は認められなかった。一方、EPH receptor A10 (EPHA10) は約 50%, TRAIL-R2 は約 60%, Cytokeratin 8 は約 70% の症例で高発現しており、一方で正常乳房組織での発現は認められなかった (Table 2)。現在、乳がんマーカーとして臨床で汎用されている Her-2 が約 30% の陽性率であることを考慮すると、これら 3 種類のタンパク質は、乳がんの優れた創薬ターゲットになり得るものと期待される。また、Her-2 陽性あるいは陰性症例において、これら候補タンパク質発現を調べたところ、Her-2 陽性患者のうち、TRAIL-R2 あるいは EPHA10 は、約 77% あるいは 62% の割合で発現しており、両者の発現を合わせると約 87% の症例で発現していた。一方、Her-2 陰性の症例においても、約 70% の症例が TRAIL-R2 あるいは EPHA10 いずれかに陽性であった [Fig. 2(A)]。現在臨床で、Trastuzumab (Her-2 を標的とした抗体医薬) が乳がんに対する画期的な抗体医薬として汎用されているが、TRAIL-R2 と EPHA10 も細胞膜タンパク質

であることから、Trastuzumab が無効な症例に対する新規治療標的になり得るものと期待される。また、Her-2 陽性症例においても、Trastuzumab による治療を続けるうちに耐性が生じることが問題になっていることから、<sup>5-7)</sup> そのような患者に対しても有効な治療標的になり得るものと期待される。

続いて、上記候補分子の発現と病期との相関を解析したところ、Cytokeratin 8 と EPHA10 の発現は乳がんの病期の進行と有意な相関が認められた [Fig. 2(B)]。したがって、Cytokeratin 8 や EPHA10 は乳がんの進行に関連するタンパク質であり、悪性度を客観的に予測・評価し得る診断マーカーになり得るものと考えられる。

近年、TRAIL-R2 は、がんの新たな分子標的として抗体医薬の開発が進んでおり、<sup>8-10)</sup> また Cytokeratin 8 はがんの悪性度に係わることが報告されている。<sup>11-13)</sup> 以上の結果は、抗体プロテオミクス技術が、多種類の発現変動タンパク質の中から、有用なマーカータンパク質を迅速かつ効率的に絞り込むことが可能な極めて有用な創薬基盤技術であることを示すものである。

##### 5. おわりに

本稿では、われわれが確立した『抗体プロテオミクス技術』によって、迅速に創薬バイオマーカータンパク質の候補として、TRAIL-R2, Cytokeratin 8, EPHA10 を絞り込むことができた。中でも TRAIL-R2, EPHA10 は、既存の乳がんマーカータンパク質 Her-2 に替わる新たな創薬ターゲットタンパク質になり得ることが示唆された。現在、これら分子に対するより詳細な機能解析を進めるとともに、抗体医薬の開発を目指して研究を行っている。今後、抗体プロテオミクス技術が、世界に遅れをとるわが国の抗体医薬等の創薬研究に貢献することを願っている。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、組織マイクロアレイ解析の御指導を賜りました富山大学医学部附属病院・福岡順也博士に感謝の意を表します。なお本研究では、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究 (No. 20015052)、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B 一般 (No. 21390046)、厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業 (No. H19-医薬―一般

Table 2. Validation of Biomarker Candidates by Tissue Microarray with Breast Tumor and Breast Normal Tissues

protein name	positive rate of various antigens	
	normal tissue	breast cancer tissue
Her-2	0/15 (0%)	53/189 (28.0%)
IkappaBR	3/15 (20.0%)	22/189 (11.6%)
SPATA5 protein	0/15 (0%)	0/189 (0%)
Beta actin variant	0/15 (0%)	0/189 (0%)
TRAIL-R2	0/15 (0%)	119/189 (63.0%)
RREB-1	1/15 (6.7%)	83/189 (43.9%)
FLJ31438 protein	0/15 (0%)	0/189 (0%)
HPAK65	0/15 (0%)	0/189 (0%)
Cytokeratin 8	0/15 (0%)	137/189 (72.5%)
XRN1 protein	0/15 (0%)	0/189 (0%)
Jerky protein homolog-like	0/15 (0%)	0/189 (0%)
EPHA10	0/15 (0%)	93/189 (49.2%)

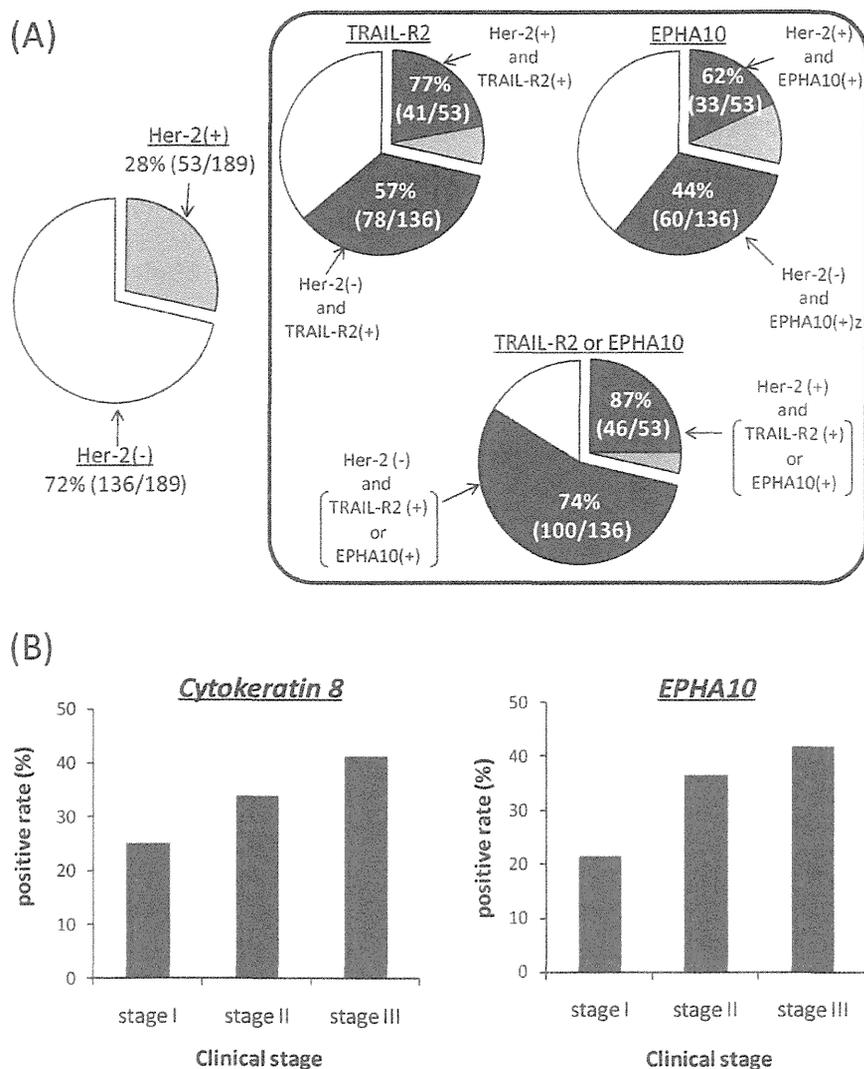


Fig. 2. Correlation Analysis between the Expression Profile of Biomarker Candidates and Clinical Information

(A) The expression rate of drug target candidates, TRAIL-R2 and EPHA10, in Her-2 positive and negative cases. The expression of Her-2 in 28% of breast tumor cases describes gray. The expression of each candidate in Her-2 positive and negative cases describes black. (B) The expression rate of diagnosis marker candidates, Cytokeratin8 and EPHA10, in each clinical stage.

-010), 厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究 (HS) 事業 (No.KHC1017), 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業: 創薬バイオマーカー探索研究事業 (No.H21-バイオ-指定-005), 及び財団法人永井記念薬学国際交流財団の支援を受けて実施されたものです。ここに深謝申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Hanash S., *Nature*, **422**, 226-232 (2003).
- 2) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546-552 (2003).
- 3) Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Tani M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandenberg P., Aggarwal B. B., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y., *J. Biol. Chem.*, **283**, 998-1007, (2008).
- 4) Imai S., Mukai Y., Nagano K., Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nomura T., Tsutsumi Y.,

- Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1325–1330 (2006).
- 5) Nahta R., Esteva F. J., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **53**, 186–190 (2004).
- 6) Nahta R., Yu D., Hung M. C., Hortobagyi G. N., Esteva F. J., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 269–280 (2006).
- 7) Amar S., Moreno-Aspitia A., Perez E. A., *Breast Cancer Res. Treat.*, **109**, 1–7 (2008).
- 8) Vannucchi S., Chiantore M. V., Fiorucci G., Percario Z. A., Leone S., Affabris E., Romeo G., *Oncogene*, **24**, 2536–2546 (2005).
- 9) Plummer R., Attard G., Pacey S., Li L., Razak A., Perrett R., Barrett M., Judson I., Kaye S., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Calvert H., de Bono J., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 6187–6194 (2007).
- 10) Tolcher A. W., Mita M., Meropol N. J., von Mehren M., Patnaik A., Padavic K., Hill M., Mays T., McCoy T., Fox N. L., Halpern W., Corey A., Cohen R. B., *J. Clin. Oncol.*, **25**, 1390–1395 (2007).
- 11) Fukunaga Y., Bandoh S., Fujita J., Yang Y., Ueda Y., Hojo S., Dohmoto K., Tojo Y., Takahara J., Ishida T., *Lung Cancer*, **38**, 31–38 (2002).
- 12) Wolff J. M., Borchers H., Brehmer B. Jr., Brauers A., Jakse G., *Urol. Int.*, **60**, 152–155 (1998).
- 13) Ditzel H. J., Strik M. C. M., Larsen M. K., Willis A. C., Waseem A., Kejling K, Jensenius J. C., *J. Biol. Chem.*, **277**, 21712–21722 (2002).