201307043A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究

平成25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　米田　悦啓

平成 26（2014）年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究

平成25年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　米田　悦啓

平成 26（2014）年 5 月

目　次

Ⅰ．総括研究報告
プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究 --------1
米田　悦啓

Ⅱ．分担研究報告
1. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発 ----------21
朝長　毅
2. GIST における imatinib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用 ----------31
仲　哲治
3. コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究 ----------36
角田　慎一
4. 卵巣明細胞腺癌、前立腺癌及び肺腺癌薬剤効果予測マーカーの開発 ----------45
平野　久
5. タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量 ----------50
山田　哲司
6. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発 ----------54
中山　敬一

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 59

Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷 ---------- 70

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究

研究代表者　米田悦啓　独立行政法人医薬基盤研究所　研究所長

研究要旨

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

本年度は、以下の研究を実施したので報告する。

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

より多くの細胞内リン酸化タンパク質・リン酸化ペプチドの定量を目指して、網羅的側面とターゲットを絞った側面からの技術的改良を加えた。網羅的リン酸化タンパク質・ペプチド解析法の改良としては、これまでリン酸化ペプチドの濃縮に用いてきた IMAC だけでなく、抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用することにより、従来の 2 倍以上のチロシンリン酸化ペプチドを同定することに成功した。また、IMAC 濃縮後の HPLC 分画法の改良により、１回の実験で 30,000 リン酸化ペプチドの定量に成功した。ターゲットリン酸化プロテオミクスにおいては、細胞内シグナル伝達に関わる主要なキナーゼ・基質のリン酸化ペプチド 287 種類について、SRM/MRM 法を用いた定量法の基礎検討を行った。現在までに 20 種類のリン酸化ペプチドの定量に成功した。

また、副作用予測の鍵となる治療薬の結合タンパク質を、簡易に同定する ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定手法を新規開発した。この手法を用いて、179 個のキナーゼを含む 361 個の ATP 結合タンパク質を測定できることが確認された。さらにこれまで ATP 結合タンパク質として知られていなかった、新規 ATP 結合タンパク質候補 178 個を新たに同定した。

２．GIST における imatinib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用：仲　哲治

チロシンキナーゼ阻害薬（TKI）は肺癌、消化管間質腫瘍（Gastrointestinal Stromal Tumor : GIST）、白血病等に対して、画期的な治療効果を示すことが報告された。しかし、獲得耐性と共に治療が無効となるため、耐性克服は進行がん患者にとって重要である。GIST 患者のおよそ 80%の頻度において、*c-kit* 遺伝子に 2 次変異を有することでイマチニブに獲得耐性を示すことが報告されている。しかしながら、GIST 患者においてイマチニブ投与により *c-kit* 遺伝子 に 2 次耐性を有する獲得耐性がどのような機序により発生するのかについての詳細は解明されていない。イマチニブ投与時における *c-kit* 遺伝子に 2 次変異を有する獲得耐性の機序解明は、その阻害剤を開発することにより、獲得耐性の発生を防ぐ事につながり、さらにコンパニオン診断薬の開発にも結び付くものと期待されるため、重要な課題である。本研究では次世代シーケンサーを用いて GIST における *c-kit* 遺伝子の 2 次変異によるイマチニブ獲得耐性機序の解明を試みた。

GIST 細胞株として、GIST-T1 株を用いて、imatinib 濃度を徐々に増加させることで IC_{50} 値が1,000倍以上に増加したイマチニブ耐性株を樹立した(c-kit 遺伝子に2次変異を有することを遺伝子配列解析より確認済み)。イマチニブ処理前、及び、処理後(49 日)の2次耐性を獲得する前の persistent GIST-T1 細胞、及び、これらのイマチニブ耐性株より DNA を抽出し、次世代シーケンサーによりゲノム DNA の配列を解析した。この結果、GIST-T1 親株に対して、persistent 株ならびに耐性株に新たに出現した共通の遺伝子変異を検討した。

Persistent 株ならびに耐性株に共通に認められる遺伝子変異を 19 個検出した。さらに、イマチニブ耐性株にのみ共通に認められる遺伝子変異を 20 個認めた。これらの遺伝子変異が *c-kit* 遺伝子の 2 次変異と関係している事が示唆された。

また、2 次変異による獲得耐性の機序解明は GIST におけるイマチニブ治療のみならず、肺癌におけるゲフェチニブなど他の分子標的薬に対する獲得耐性の克服にも期待される。すなわち、イマチニブに対する獲得耐性の克服、さらにはコンパニオン診断薬の開発につながるものと期待される。

3．コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究：角田慎一

抗がん剤感受性バイオマーカーに基づくコンパニオン診断薬を開発する際には、臨床予測性に優れた評価系を用いたバイオマーカーの検証が必要となってくる。本観点から当該研究では、がん患者由来の腫瘍組織を生体内での特性を保持した状態で in vitro で培養可能とする技術、CTOS（Cancer Tissue-Originated Spheroid）法が、抗がん剤感受性バイオマーカーの評価系となりうるものと考え、その有用性の評価と評価検証系としての確立を目指している。本年度は、がん細胞の培養法の違いによるプロテオームの変化と抗がん剤感受性に及ぼす影響について解析を試みた。

通常、培養細胞株（セルライン）とプライマリーのがん細胞では、形態や増殖性などの特性に違いがあることが知られている。とりわけ in vitro における細胞の培養は、一般に平面単層培養にて行われるが、がんを含めた体内での組織構造は立体的であることから、培養法の違いが、がん細胞の性質に大きく影響を及ぼすことが示唆される。これらを踏まえ、本研究では、肺がん由来の腫瘍組織を CTOS として培養し、平面培養あるいはスフェロイド培養することで、そこにどのような違いが認められるのか検討した。3 種類の分子標的治療薬（Gefitinib, Erlotinib, Imatinib）に対する感受性を解析したところ、スフェロイド培養と平面培養との違いによって、各抗がん剤（thymidine kinase inhibitor; TKI）に対する感受性が変化することが明らかとなった。また、これらの感受性の違いを生じるメカニズムを調べるための一つの方法としてプロテオミクス解析を実施した。肺がん CTOS と同 CTOS 由来の平面培養がん細胞で細胞膜に発現するタンパク質の違いを解析した結果、約半数のタンパク質が共通して発現する一方で、1/3 程度のタンパク質のタンパク質の発現がダイナミックに変化していた。これらの結果から、抗がん剤感受性バイオマーカー評価系として CTOS の有用性を示唆するものと考えられる。

4．前立腺癌及び肺腺癌薬剤効果予測マーカーの開発：平野　久

前立腺癌アンドロゲン依存性と非依存性前立腺癌細胞のリン酸化タンパク質を網羅的に解析し、癌細胞のアンドロゲン非依存的増殖に係わるリン酸化タンパク質を探索した。その結果、221 のリン酸化ペプチドがアンドロゲン依存性と非依存性前立腺癌細胞間で有意に変動していることが明らかになった。一方、早期に癌を切除した患者のうち、手術後 3 年以内に再発が認められた予後不良群と手術後 3 年以上を経て臨床的に再発を認めていない予後良好群の凍結肺腺癌組織から癌部位のみを回収し、癌細胞特異的に存在するタンパク質を分析した。その結果、予後不良群で発現上昇している 23 種類のタンパク質を見いだした。これらのタンパク質のうち、2 種

類のタンパク質は肺腺癌の増殖や浸潤、遊走に係わっていることが明らかになった。

5．タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量：山田哲司

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

本年度はタンパク質マイクロアレイを用いたリン酸化タンパク質の解析技術を用いて、肝細胞がんの分子標的治療薬ソラフェニブ（商品名：ネクサバール）のコンパニオン診断薬を開発する目的で、23 種の肝がんの細胞株について、リン酸化プロファイルとソラフェニブの薬剤感受性（IC50）の相関解析を行った。ソラフェニブに抵抗性の肝がんの細胞株では mTOR のシグナル伝達系が活性化しており、リン酸化 S6 リボゾームタンパク質がソラフェニブへの抵抗性と相関し、コンパニオン診断薬になる可能性があることを見出した。

6．コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発：中山敬一

本研究では、最新のプロテオミクス技術を利用して、タンパク質の発現量を正確に計測する技術、および各タンパク質上で生じるリン酸化を定量的に計測する技術を開発する。これらのシステムを利用して正常細胞と癌細胞において異なる細胞内ネットワーク構造を見いだし、次世代コンパニオン診断薬を創出に貢献する。

本年度は、主要な細胞内パスウェイを構成する約 1,700 種類のタンパク質を正確に定量するための MRM 法のメソッド構築を行い、正常細胞や癌細胞において代謝経路やシグナル伝達経路の構成要素の絶対定量を実施した。また、リン酸化を時系列で大規模に多点定量するためにデータ非依存分析法である SWATH 法をリン酸化ペプチドの解析に応用することを試みた。さらに、細胞内シグナル伝達の要である Erk 経路を阻害剤で抑制した際の EGF シグナルの変化を詳細に解析し、EGF 刺激によって生じる AKT 活性化経路の振動パターンに Erk 経路が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

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

既存のコンパニオン診断薬は標的分子の遺伝子変異の有無のみを調べているが、薬が効くと診断されても実際は効かない例が多い。例えば、大腸がんの分子標的薬セツキシマブは EGFR を阻害することでその下流の増殖シグナルを抑えるが、KRAS 遺伝子に変異があるとその下流のシグナルが恒常的に活性化されるため、EGFR を阻害しても増殖シグナルは抑えられない。そこで KRAS 遺伝子検査を行い、変異のない症例にセツキシマブが投与されているが、その中でも効果が認められるのは約 3 割に過ぎない。その理由として、KRAS 遺伝子野生型でも ERBB2/3 や MET など複数のバイパスシグナル群により、あたかも KRAS 遺伝子変異型と同様に下流のシグナルが活性化されているため、もしくは他の増殖シグナルが活性化されているためと考えられている。そのため、薬効を予測するためには、個々の遺伝子変異だけでなく、上述の未知のバイパスシグナルを調べることが必須である。生体内のシグナル伝達はタンパク質リン酸化が主体であるため、網羅的なリン酸化タンパク質の解析を行えば、どのシグナルが薬効に重要かを知ることができ、コンパニオン診断薬の創出につながる。このリン酸化タンパク質の解析は遺伝子変異・発現解析

では困難で、プロテオミクスでしかできない。さらに、バイパスシグナルを調べることは、薬効予測だけでなく、薬剤耐性のメカニズムや耐性を克服する新規治療薬の開発につながるほか、予想外の副作用予測マーカーの同定が可能となる。

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

B. 研究方法（各研究分担者の研究方法の項参照）

C, D. 研究結果および考察

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

1. IMAC と抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用したリン酸化ペプチドの網羅的解析（表１）

リン酸化ペプチドの網羅的な定量において、IMAC 濃縮後の HPLC 分画の改良により、約 30,000 個のペプチドの定量化が可能となった。またチロシンリン酸化ペプチドは、全リン酸化ペプチドの１％程度しか存在しないとされているが、IMAC 法に加えて、抗チロシン抗体による免疫沈降法を行うことで、8mg の細胞抽出液を用いた場合、１時間の解析時間で 466 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定が可能となった。これは従来の IMAC 法単独の場合と比較しても２倍の同定率である。さらに過バナジン酸処理でチロシンの脱リン酸化を阻害させることで、1416 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定に成功した。

チロシンのリン酸化は EGFR や Src など、がんの活性化に関与するタンパク質において重要な働きを担っている。しかしその存在量は、全リン酸化タンパク質の 1%程度と著しく低く、質量分析計による網羅的な検出が困難であった。これまでも細胞溶液から、抗チロシン抗体を用いてチロシンペプチドの濃縮は行われてきたが、非特異的に結合された非リン酸プチドの除去のための工程を要し(Mol. Cell.Proteomics 2010, 9, 2162, Mol Cell Proteomics 2005, 4, 721)、細胞溶液や抗体の必要量を増やすことで対処がされてきた。本実験は、IMAC 法と免疫沈降法を併用することにより、従来法よりも精製度が高く(濃縮効率 90%以上)、最小限の細胞溶液や抗体量での解析が可能となった。また本手法は抗チロシン抗体だけではなく、様々なリン酸化ペプチド抗体を用いた濃縮にも応用可能である。今後は種々のリン酸化ペプチドを網羅的に定量化することで、細胞内シグナル活性化状態を俯瞰的に見られるようになることが期待される。

2. SRM/MRM 法を用いたキナーゼ活性化定量法の基礎検討（図３）

過去の論文報告３報以上ある主要なキナーゼおよびその基質のリン酸化サイトは 318 種類あり、また RPPA を用いたリン酸化タンパク質解析のターゲットリン酸化サイトは 261 種類あった。両者で共通したリン酸化サイトも含め全部で 433 種類のリン酸化サイトのうち、我々がこれまで網羅的リン酸化タンパク質解析で同定できた 287 種類のサイトを最終的な SRM/MRM 測定の対象とした。

上記の網羅的リン酸化ペプチドの同定・定量法と比較して、SRM/MRM 法を用いたキナーゼや基質の主要リン酸化サイトの定量は、キナーゼの活性化状態をダイレクトにみることができる。しかし、細胞内の主要キナーゼや基質は非常に微量で、SRM/MRM 法を用いても定量が困難であることが予想される。今後は、どの程度感度を向上させることができるかが問題となる。それがクリアできれば、種々の薬剤処理に対して、細胞内シグナルがどう動くかを俯瞰的にみることが可能となり、コンパニオン診断薬の開発や薬剤耐性のメカニズムの解明に貢献できる。

3. ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定手法の開発（表２）

サンプルは Hela-S3 細胞 lysate 2mg を用いた場合、上記各工程を最適化することによって、2 時間の解析時間で 199 個のキナーゼを同定することが可能になった。従来法と比較して、約 16 倍の同定効率の向上を達成した。さらに ATP を用いたモデル試験では、179 個のキナーゼを含む 361 個の ATP 結合タンパク質を測定できることが確認された。さらにこれまで ATP 結合タンパク質として知られていなかった、新規 ATP 結合タンパク質候補 178 個を新たに同定した。

ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤の標的探索については、ATP プローブを用いる方法以外にも数多くの手法が開発されているが、網羅性、迅速性を有する技術の大半は、リコンビナントキナーゼを使用している（Nat. Biotech. 2012, 29, 1039, Nat. Biotech. 2012, 29, 1046）。これらの技術は有用な情報をもたらすが、全長配列を発現させることが難しく、キナーゼ活性部位のみを発現させたリコンビナントキナーゼも多い。また細胞内では他因子との相互作用、翻訳後修飾等によるダイナミックな制御が行われているが、リコンビナントキナーゼを用いたアッセイ系は、そのようなキナーゼの機能・制御の複雑性を反映していない。一方、本手法は細胞溶解液中の内在性タンパク質を測定対象とするため、細胞内環境をより反映した結果が得られると期待される。さらに本手法ではキナーゼのみならず、その他の ATP 結合タンパク質も対象とするため、より広範囲な副作用予測に適用されることが期待される。今後は、様々な阻害剤を用いて、データを収集・蓄積することで、副作用予測に役立つツールとして発展していくことが期待される。

C, D-2. GIST における imatinib 耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用：仲 哲治

1. 次世代シーケンサー（NGS）によるゲノム DNA 遺伝子変異解析

GIST-T1 細胞に 1μM イマチニブを添加前（GIST-T1）と添加後 49 日目残存している細胞（T1-117）、及びイマチニブ耐性株（T1-R2、T1-R8、T1-R9、T1-RA2）（表１）について、全エキソーム解析を行った。細胞株にイマチニブ投与すると、ほとんどの細胞は細胞死を起こし、ごく一部が生き残る。分子進化の図(図１)に示すように、NGS の結果からは 19 遺伝子変異がイマチニブ処置下に生存する細胞に共通して見られた。GIST T1 細胞株にイマチニブ投与、生き残った細胞化群からイマチニブ耐性株ができるまでに、更に共通の 20 遺伝子変異を確認した。

2. 次世代シーケンサーにより検出された遺伝子変異の、DNA シーケンサーによる確認

次世代シーケンサーにより検出された遺伝子変異について、臨床検体（同一患者での初発切除病変とイマチニブ耐性切除病変）を用いた DNA シーケンサーによる解析により、遺伝子変異の検出を行った。その結果、ISGF10、LOXL4 遺伝子において同一の変異を確認した。

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

1. CTOS の抗がん剤に対する感受性に関する検討

通常、細胞の培養には、表面への細胞接着を促進するための表面加工を施した培養ディッシュなどを利用し、ディッシュの底に接着させた状態で細胞を培養することが殆どである。一方、スフェロイド培養（CTOS）は、生体組織の性質に近い状態で培養可能である。例えば、正常の肝組織由来の細胞を例にとると、これら肝臓由来実質細胞は、平面およびスフェロイドのどちらの形態でも培養が可能であるが、これまでの報告から、スフェロイド培養で培養することで、肝臓の機能が維持されていることが知られている。本研究では、患者の腫瘍組織由来のがん細胞をスフェロイ

ド状に培養出来る方法として開発された CTOS 法を用いた。CTOS の性質として、その調製過程から、繊維芽細胞などの間質組織は取り除かれ、殆どが実質の上皮組織（肺がん由来がん細胞）へと純化されていることが知られている。CTOS をスフェロイド培養する場合と、CTOS 由来がん細胞を平面培養した場合では、細胞に明らかな形態的変化が認められた（図 1）。特に接着させることで、細胞は長細い形態を取り、足を伸ばしたような形態をとる。CTOS は先述のように、がん組織の中に含まれる間質組織は殆ど除かれていることからも、この細胞の形態の違いは、繊維芽細胞のような接着性の高い細胞が増殖したのではなく、上皮細胞が培養法の違いによって形態変化したものと考えられる。この形態の変化が、細胞の性質にどの様な影響を与えているか、その詳細を調べる必要があるものの、少なくとも細胞の培養法の違いによって、細胞の持つ性質に変化が及んでいる可能性が考えられる。

そこで、この培養法の違いが、抗がん剤に対する感受性にどのような影響を与えるのかを検討するために、各培養法にて培養した CTOS に対して、3 種類のチロシンキナーゼ阻害型の分子標的治療薬（Gefitinib, erlotinib, Imatinib）を作用させ、その感受性の違いを検討した。その結果、Imatinib については、接着させることで抗がん剤に対する感受性が上昇する一方、Gefitinib, Erlotinib では、接着させることで感受性が逆に低下する（低濃度では細胞死が誘導しにくい状態）ことが明らかになった（図 2）。このことは、実際に臨床での抗がん剤に対する感受性が、in vitro の培養系では適切に評価できない可能性を示唆しており、抗がん剤の感受性の評価系には、より in vivo に近い状態での培養法が必要であるものと考えられた。

2. CTOS の平面培養とスフェロイド培養の違いに関する検討

上記検討から、スフェロイド培養と平面培養とで、チロシンキナーゼ阻害薬の感受性を含む各種細胞の特性が異なる可能性が示唆された。そこで、この性質の変化のメカニズムを解明することを目的に、細胞のタンパク質発現の違いを検討した。特に、細胞膜に発現するタンパク質については、細胞の形態変化等からもダイナミックに変化している可能性が示唆されたことから、これらの膜タンパク質発現をプロテオミクス解析にて検討することにした。肺がん CTOS のプロテオミクス解析により、948 種類のタンパク質が同定されたが、そのうち約半数の 495 種類のタンパク質が共通して発現していた(図 3, 表 1, 2, 3)。一方、細胞を接着させることで、347 種類のタンパク質が新たに発現することが明らかになった。これらの発現タンパク質の違いについては、他の CTOS でも同様の傾向が認められるかどうかを今後検討する必要があるものの、発現タンパク質がダイナミックに変化していることは極めて興味深いと考えられる。これらの培養の違いによって発現が変化するタンパク質の性質を解析することで、がんの特性やその感受性の違いを説明可能なタンパク質の同定が期待される。

C, D-4.前立腺癌及び肺腺癌薬剤効果予測マーカーの開発：平野 久

1. アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞で特異的に発現するリン酸化タンパク質の検出・同定

アンドロゲン依存性前立腺癌細胞 LNCaP 細胞と非依存性前立腺癌細胞 LNCaP-AI 細胞の増殖を比較した。LNCaP 細胞では、アンドロゲン欠乏培地では増殖速度の低下が認められたが、LNCaP-AI 細胞では低下が見られなかった。また、抗アンドロゲン受容体抗体を用いたウエスタンブロット解析により、LNCaP-AI 細胞におけるアンドロゲン受容体の発現上昇が認められた。

次に、両細胞のリン酸化タンパク質を網羅的に解析し、アンドロゲン非依存的増殖に関与するリン酸化タンパク質を探索した。その

結果、221のリン酸化ペプチドがアンドロゲン依存性細胞と非依存性細胞の間で有意に変動していることが明らかになった。その中には転写因子であるアンドレゲン受容体のco-activatorタンパク質が含まれていた。このタンパク質のリン酸化状態の変化は、アンドロゲン依存性の違いと関連していると考えられた。このアンドロゲン受容体co-activatorタンパク質のリン酸化状態の違いとアンドロゲン依存的増殖のメカニズムについて解析を進めている。

2. 肺腺癌予後予測診断マーカータンパク質の検出・同定

早期に肺腺癌を切除した患者のうち、手術後3年以内に再発が認められた予後不良群と手術後3年以上を経て臨床的に再発を認めていない予後良好群の凍結肺腺癌組織からLCMを用いて癌部位のみを回収し、癌細胞特異的に存在するタンパク質を分析した。その結果、予後不良群で発現上昇している23種類のタンパク質を見いだした。これらのタンパク質の中から、癌の増殖、転移や再発の関与が報告されている2種類のタンパク質を選択し、ウエスタンブロット法を用いてこれらのタンパク質の発現量が予後不良群で高いことを確認した。一方、免疫組織化学的分析でもこれらのタンパク質の発現量が予後不良群で高いことを認めた。また、A549細胞のsiRNA実験によって、これらのタンパク質が肺腺癌の増殖や浸潤、遊走に係わっていることを明らかにした。これらのタンパク質は、肺腺癌予後予測マーカー候補となると共に、治療標的候補分子となる可能性があると考えられた。

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

肝細胞がんの23種の細胞株についてリン酸化プロファイリングとソラフェニブ感受性（IC50）の相関解析を行い、感受性と最も高い相関を示すリン酸化タンパク質として235と236位のセリン残基がリン酸化したS6リボゾームタンパク質(p-rpS6 S235/236)が同定された(スピアマン相関係数 0.5791, p=0.0044)。p-rpS6 S235/236リン酸化レベルが高くなるに連れてソラフェニブのIC50が高くなることから、p-rpS6 S235/236のリン酸化はソラフェニブ抵抗性の指標となることが予測された。

特異的なp-rpS6 S235/236抗体を用い、台北医科大学(Taipei Medical University)にて、ソラフェニブの治療を受けた肝がん症例の治療前生検試料について免疫組織化学染色を行ったところ、治療効果が見られなかった症例でp-rpS6 S235/236の強い陽性反応が認められた。

本研究において、我々は肝細胞がんにおけるソラフェニブのコンパニオン診断薬候補として235と236位のセリン残基がリン酸化したS6リボゾームタンパク質を見出した。ソラフェニブ抵抗性細胞株ではS6リボゾームタンパク質のリン酸化レベルが高いことから、治療効果の期待できない患者を予測するコンパニオン診断薬となることが期待される。

さらにソラフェニブ抵抗性の細胞株において、S6リボゾームタンパク質が含まれるシグナル経路の上流に位置する分子群や他のシグナル経路の活性化の詳細を調べることで、ソラフェニブの効果が期待できない患者に対して他の分子標的治療薬での治療や多剤併用療法、あるいは新規の分子標的治療薬を開発できる可能性があると考えている。

我々の開発したRPPA法は、がん細胞や組織から抽出したごく微量の試料でタンパク質のリン酸化を正確に効率良く把握できる優れた解析法であることが確認された。よって、今後、がん治療の個別化治療を実現する強力なツールとなる可能性が示唆された。多くのリン酸化部位特異的な抗体ライブラリーと組み合わせることで網羅的なリン酸化プロファイルに可能であり、コンパニオン診断薬開発のためのシグナル伝達ネットワーク解析の強力な基盤となるものと考えられる。

C, D-6. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発：

中山敬一

1. パスウェイ構成タンパク質の絶対定量法の確立

ヒトにおける主要なパスウェイ構成タンパク質のほとんどを網羅したMRMメソッドの構築に成功した。これらのメソッドを用いて任意のタンパク質を容易に絶対定量可能であった（一分析あたり100タンパク質の一斉定量が可能）。特に、多くの代謝酵素やプロテインキナーゼ、アダプター分子などは全く前分画を行うことなく60 minの1次元LC-MRM分析によって検出が可能であった。一部の転写因子等、極めて低発現なタンパク質に関しては、塩基性条件下での逆相クロマトグラフィーで前分画(4分画)することで検出可能となった。このような解析によってシグナル伝達経路の構造を発現量の観点から可視化することが可能であった。

本年度は代謝経路やシグナル伝達経路を中心に大規模な組み換えタンパク質を利用してMRMのための事前情報の取得と、これを利用したMRMメソッド構築と実測を実施した。現在、MRMの測定は100タンパク質/1hのスループットであり、今後、検体数が増えた際にはより高速な測定法の開発が求められる。そのためにはMRMによるタンパク質絶対定量結果を更にデータベース化することで、感度や特異性の高いMRM-transitionを経験的に縮約し、高効率なMRMメソッドに成熟される必要がる。また、MRM法を実施する上で最大の問題点は得られた大量のクロマトグラムを精査して、定量値に変換する作業であり、既存のソフトウェアではこの作業の効率が極めて悪いため、独自の自動定量ソフトウェア環境を整備する必要がある。それがクリアできれば、種々の薬剤処理に対して細胞内経路の発現量状態がどのように変化しているかを正確に捉えることが可能となり、コンパニオン診断薬の開発や薬剤耐性のメカニズムの解明に貢献できる。

2. データ非依存分析によるリン酸化の時系列定量解析法（SWATH法）の確立

SWATH法では前もってLC-MS/MSによるスペクトルライブラリー構築が必要である。そこで、EGF等で刺激を加えたHeLa細胞から大容量IMACによってリン酸化ペプチドを精製し、分画後、LC-MS/MS解析により18000以上のリン酸化ペプチドを同定し、リン酸化ペプチドMS/MSスペクトルライブラリーを構築した。Erk経路の阻害剤であるU0126存在下および非存在下で、様々な時間（0，3.75, 7.5, 15, 30, 60 min）EGF刺激を施したHeLa細胞のリン酸化SWATHデータを取得した。各SWATHデータからMS／MSスペクトルライブラリーを用いて各リン酸化ペプチドの特異的MS/MSクロマトグラムを抽出することでEGF刺激に伴うリン酸化変動の時系列定量データを得ることが可能であった。これらの結果から、AKT基質のリン酸化が阻害剤非存在下では時間軸に沿って増減を繰り返すことが判明した。一方、このAKT活性の振動はErk経路阻害によって抑制され、Erk経路がAKTの活性下パターンを制御している可能性が示唆された。

SWATH法によるリン酸化の多点定量解析法は確立でき、主要なリン酸化に関しては非常に再現性高く定量解析を行うことが可能となった。SWATH法はMRMのように事前に測定メソッドを見たいペプチド毎に作成する必要がなく、非常に迅速に測定が可能な反面、感度面で少々の不安が残る。特に、低発現（あるいは低リン酸化）のペプチドの関してはライブラリー中には同定されているが、SWATH法ではクロマトグラムのピークが検出されないものも多く、特定のペプチド配列を確実に計測する必要があるリン酸化プロテオミクスのツールとしては大きな問題である。

これは、リン酸化ペプチドが液体クロマトグラフィー中で使用されている金属パーツと相互作用するために極度のテーリングや吸着

を起こしていることが大きな原因であると考えられる。今後、各パーツのイナート材質化などを図り、より高感度な分析ができるような改良を加える必要がある。これらの問題点をクリアできれば、リン酸化ペプチドのSWATH解析は薬剤等のシグナル伝達に与える影響を時系列で詳細に追跡することができる重要なツールとなり得る。

E. 結論

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

本年度は、網羅的リン酸化タンパク質解析手法の改良を行い、リン酸化タンパク質の同定数を飛躍的に向上させることに成功した。また、SRM/MRM法を用いて、細胞内シグナルを担う主要リン酸化タンパク質の定量のための準備を行った。さらに、キナーゼ阻害剤の副作用予測に有用と思われるATP拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定法の開発に成功した。

E-2. GISTにおけるimatinib耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用：仲哲治

次世代シーケンサーにより、GIST-T1親株と比較して、イマチニブ耐性株にて遺伝子変異を有する分子を複数種類検出した。これらの一部においては、イマチニブ処理早期においても遺伝子変異が検出されており、イマチニブ処理時におけるc-kit遺伝子の2次変異と直接関係している可能性がある。現在、c-kit遺伝子の2次変異とこれらの分子との関係を解析している段階である。

E-3. コンパニオン診断薬開発のための基盤技術に関する研究：角田慎一

次世代コンパニオン診断に向けたバイオマーカーの探索・評価系の確立に向け、がん組織スフェロイド培養（CTOS）の応用に関する基礎検討を行った。本年度は、培養法の違いによる抗がん剤に対する感受性の差異、及び培養法の違いによる発現タンパク質の比較解析を行った。その結果、スフェロイド培養したCTOSとCTOS由来平面培養がん細胞では、分子標的治療薬（チロシンキナーゼ阻害剤）に対する感受性が変化していること、また、この感受性の違いは、細胞で発現するタンパク質の違いであることが示唆された。CTOSは、肺がんのみならず、大腸がんなど多くのがん種で高率に調製可能であることから、CTOSを用いた抗がん剤に対する感受性の評価、さらにコンパニオン診断に資するバイオマーカーの同定のためのツールとして極めて有用であると考えられる。

E-4.前立腺癌及び肺腺癌薬剤効果予測マーカーの開発：平野　久

前立腺癌アンドロゲン非依存的増殖に係わっている可能性の高いリン酸化タンパク質が検出された。今後、これらのタンパク質のアンドロゲン非依存的増殖における役割を明確にする必要がある。また、このタンパク質が薬剤効果予測マーカーとして利用できるかどうか検討することが重要である。

肺腺癌予後予測マーカー候補タンパク質が検出された。今後、これらのタンパク質が薬剤効果予測マーカーとして利用できるかどうか検討する必要がある。

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

肝細胞がんにおけるソラフェニブのコンパニオン診断薬候補として235と236位のセリン残基がリン酸化したS6リボゾームタンパク質(p-rpS6 S235/236)を見出した。

E-6. コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発：中山敬一

ヒト細胞内に存在する主要経路を構成するタンパク質を精密に絶対定量するためのMRMメソッドを大規模に作成すると共に、リン酸化ペプチドのSWATH解析法による時系列定量計測法を構築した。これらの手法を

組み合わせは、様々な細胞の差異をタンパク質の量的および質的変化の両面からタンパク質レベルで記述することが可能であり、コンパニオン診断薬創出に大いに貢献できると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Kume, H., Muraoka, S., Kuga, T., Adachi, J., Narumi, R., Watanabe, S., Kuwano, M., Kodera, Y., Matsushita, K., Fukuoka, J., Masuda, T., Ishihama, Y., Matsubara, H., Nomura, F., and Tomonaga, T. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysisand subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarrayanalysis. Mol. Cell Proteomics, in press.
2. Kuga, T., Nie, H., Kazami, T., Satoh, M., Matsushita, K., Nomura, F., Maeshima, K., Nakayama Y. & Tomonaga, T. Lamin B2 prevents chromosome instability by ensuring proper mitotic chromosome segregation. Oncogenesis, in press.
3. Sano, S., Tagami, S., Hashimoto, Y., Yoshizawa-Kumagaye, K., Tsunemi, M., Okochi, M., & Tomonaga, T. Absolute quantitation of low abundance plasma APL1β peptides at sub fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. J. Proteome Res., in press.
4. Yamaguchi, S., Zhang, B., Tomonaga, T., Seino, U., Kanagawa, A., Segawa, M., Nagasaka, H., Suzuki, A., Miida, T., Yamada, S., Sasaguri, Y., Doi, T., Saku, K., Okazaki, M., Tochino, Y. & Hirano, K. Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique. J. Lipid Res., in press.
5. Oji,, Y., Tatsumi, N., Fukuda, M., Nakatsuka, S., Aoyagi, S., Hirata, E., Nanchi, I., Fujiki, F., Nakajima, H., Yamamoto, Y., Shibata, S., Nakamura, M., Hasegawa, K., Takagi, S., Fukuda, I., Hoshikawa, T., Murakami, Y, Mori, M, Inoue, M., Naka, T., Tomonaga, T., Shimizu, Y., Nakagawa, M., Hasegawa, J., Nezu, R., Inohara, H., Izumoto, S., Nonomura, N, Yoshimine, T., Okumura, M., Morii, E., Maeda, H., Nishida, S., Hosen, N, Tsuboi, A, Oka, Y. & Sugiyama H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. Int. J. Oncol., in press.
6. Matsushita, K., Shimada, H., Ueda, Y., Inoue, M., Hasegawa, M., Tomonaga, T., Matsubara, H. & Nomura, F. Non-transmissible Sendai virus vector encoding c-myc suppressor FBP-interacting repressor for cancer therapy. World J. Gastroenterol., in press
7. Liu, Y., Sogawa, K., Sunaga, M., Umemura, H., Satoh, M., Kazami, T., Yoshikawa, M., Tomonaga, T., Yokosuka, O. & Nomura, F. Increased concentrations of Apo A-I and Apo A-II fragments in the serum of patients with hepatocellular carcinoma by magnetic beads-assisted MALDI-TOF mass spectrometry. Am. J. Clin. Pathol. **141**, 52-61 (2014).
8. Hara, Y., Kawasaki, N., Hirano, K., Hashimoto, Y., Adachi, J., Watanabe, S. & Tomonaga T. Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. Orphanet J. Rare Dis. **8**, 197 (2013).
9. Kuga, T., Kume, H., Kawasaki, N., Sato, M., Adachi, J., Shiromizu, T., Hoshino, I., Nishimori, T., Matsubara, H. & Tomonaga, T. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I alpha and FAM83H in colorectal cancer. J. Cell Sci. **126**, 4721-31 (2013).
10. Aoyama, K., Yuki, R., Horiike, Y., Kubota, S.,

Yamaguchi, N., Morii, M., Ishibashi, K., Nakayama, Y., Kuga, T., Hashimoto, Y., Tomonaga, T. & Yamaguchi N. Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase. Exp. Cell Res. **319**, 3251-68 (2013).

11. Kubota, S., Fukumoto, Y., Aoyama, K., Ishibashi, K., Yuki, R., Morinaga, T., Honda, T., Yamaguchi, N., Hashimoto, Y., Kuga, T., Tomonaga, T. & Yamaguchi, N. Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1alpha (HP1alpha) with heterochromatin. J. Biol. Chem. **288**, 17871-83 (2013).
12. Sogawa, K., Noda, K., Umemura, H., Seimiya, M., Kuga, T., Tomonaga, T., Nishimura, M., Kanai, F., Imazeki, F., Takizawa, H., Yoneda, M., Nakajima, A., Tsutsumi, M., Yokosuka, O. & Nomura, F. Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. Proteomics Clin. Appl. **7**, 424-31 (2013).
13. Guo, F., Hiroshima, K., Wu, D., Satoh, M., Abulazi, M., Nomura, F., Yoshino, I., Tomonaga, T. & Nakatani, Y. Prohibitin and its rapidly emerging role as a biomarker of systemic malignancies-reply. Hum. Pathol. **44**, 679-80 (2013).
14. Matsushita, K., Tamura, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Levens, D., He, L., Liu, J., Yoshida, M. & Nomura, F. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression. Mol Cancer Res. **11**, 689-98 (2013).
15. Matsuzaki, S., Enomoto, T., Serada, S., Yoshino, K., Nagamori, S., Morimoto, A., Yokoyama, T., Kim, A., Kimura, T., Ueda, Y., Fujita, M., Fujimoto, M., Kanai, Y., Kimura, T. & Naka, T. Annexin A4- conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. Int. J. Cancer **134**, 1796-809 (2014).
16. Shimada, K., Serada, S., Fujimoto, M., Nomura, S., Nakatsuka, R., Harada, E., Iwahori, K., Tachibana, I., Takahashi, T., Kumanogoh, K., Kishimoto, T. & Naka, T. The molecular mechanism underlying anti-proliferative effect of SOCS-1 in non-small cell lung cancer cells. Cancer Sci. **104**, 1483-91 (2013).
17. Sadaoka, T., Serada, S., Kato, J., Hayashi, M., Gomi, Y., Naka, T., Yamanishi, K. & Mori, Y. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. J. Virol. **88**, 188-201 (2014).
18. Umegaki-Arao, N., Tamai, K., Nimura, K., Serada, S., Naka, T., Nakano, H. & Katayama, I. Karyopherin alpha2 is essential for rRNA transcription and protein synthesis in proliferative keratinocytes. PLoS One. Oct 3; **8**(10):e76416 (2013).
19. Takahashi, T., Serada, S., Ako, M., Fujimoto, M., Miyazaki, M., Nakatsuka, R., Ikezoe, I., Yokoyama, A., Taguchi, T., Shimada, K., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y., Naka, T. & Nishida, T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. Int. J. Cancer **133**(11), 2737-43 (2013).
20. Nishioka, C., Ikezoe, T., Furihata, M., Yang, J., Serada, S., Naka, T., Nobumoto, A., Kataoka, S., Tsuda, M., Udaka, K., & Yokoyama, A. CD34(+) /CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. Int. J. Cancer **132**(9), 2006-19 (2013).
21. Nagano, K., Kanasaki, S., Yamashita, T., Maeda, Y., Inoue, M., Higashisaka, K., Yoshioka, Y.,

Abe, Y., Mukai, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients. Cancer Med. **2**(6), 972-7 (2013).

22. Yamashita, T., Kamada, H., Kanasaki, S., Maeda, Y., Nagano, K., Abe, Y., Inoue, M., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Katayama, S., Inoue, M. & Tsunoda S. Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis. Pharmazie **68**, 969–73 (2013).
23. Hong, F., Liu, B., Mohammad, S., Debbie, R., Han, L. D., Huang X., Zhao, H., Kimura, Y., Hirano, H., Ohara, O. & Udono, H. Mapping the client network of a major mammalian endoplasmic reticulum heat shock protein 90 reveals its roles in innate immunity, Wnt signaling and organ development. Mol. Cell. Proteomics, in press.
24. Kudoh, A., Takahama, S., Sawasaki, T., Ode, H., Yokoyama, M., Okayama, A., Ishikawa, A., Miyakawa, K., Matsunaga, S., Kimura, H., Sugiura, W., Sato, H., Hirano, H., Ohno, S., Yamamoto, N. & Ryo, A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. Retrovirology, **11**, 9 (2014).
25. Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, M., Hirano, H., Kondo, Y., Suzuki, Y. & Inoue, N. Proteomic identification of differentially expressed genes during differentiation of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) embryonic stem cells to astrocyte progenitor cells in vitro. Biochim. Biophys. Acta **1834**, 601-10 (2013).
26. Arakawa, N., Miyagi, E., Nomura, A., Morita, E., Ino, Y., Ohtake, N., Miyagi, Y., Hirahara, F. & Hirano, H. Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. J. Proteome Res. **12**, 4340-50 (2013).
27. Kimura, Y., Kurata, Y., Ishikawa, A., Okayama, A., Kamita, M. & Hirano. H. N-Terminal methylation of proteasome subunit Rpt1 in yeast. Proteomics **13**, 3167-74 (2013).
28. Masuishi, Y., Nomura, A., Okayama, A., Kimura, Y., Arakawa, N. & Hirano H. Mass spectrometric identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored peptides. J. Proteome Res. **12**, 4617-26 (2013).
29. Sato, Y., Akitsu, M., Amano, Y., Yamashita, K., Ide, M., Shimada, K., Yamashita, A., Hirano, H., Arakawa, N., Maki, T., Hayashi, I., Ohno, S. & Suzuki, A. A novel PAR-1-binding protein, MTCL1, plays critical roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. J. Cell Sci.**126**, 4671-83 (2013).
30. Masuda, M., Chen, WY., Miyanaga, A., Nakamura, Y., Kawasaki, K., Sakuma, T., Ono, M., Chen, CL., Honda, K. & Yamada, T. Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling. Mol. Cell Proteomics, 2014 Mar 18 [Epub ahead of print].
31. Kobayashi, E., Satow, R., Ono, M., Masuda, M., Honda, K., Sakuma, T., Kawai, A., Morioka, H., Toyama, Y. & Yamada, T. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma. Oncology **86**(2), 94-103 (2014).
32. Noro, R,, Honda, K., Tsuta, K., Ishii, G., Maeshima, AM., Miura, N., Furuta, K., Shibata, T., Tsuda, H., Ochiai, A., Sakuma, T., Nishijima, N., Gemma, A., Asamura, H., Nagai, K. & Yamada, T. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. Ann. Oncol. **24**(10), 2594-600 (2013).
33. Makuuchi, Y., Honda, K., Osaka, Y., Kato, K., Kojima, T., Daiko, H., Igaki, H., Ito, Y., Hoshino, S., Tachibana, S., Watanabe, T.,

Furuta, K., Sekine, S., Umaki, T., Watabe, Y., Miura, N., Ono, M., Tsuchida, A. & Yamada, T. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradio- therapy. Cancer Sci. **104**(8) 1045-51 (2013).

34. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. Oncogene **32**, 1921-32 (2013).
35. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. EMBO J. **32**, 970-81 (2013).
36. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Onoyama, I., Imaizumi, K. & Nakayama, K.I. F-box and WD repeat domain-containing-7 (Fbxw7) protein targets endoplasmic reticulum-anchored osteogenic and chondrogenic transcriptional factors for degradation. J. Biol. Chem. **288**, 28488-502 (2013).
37. Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T. & Nakayama, K.I. Substrate binding promotes formation of the Skp1-Cul1-Fbxl3 (SCF^{Fbxl3}) protein complex. J. Biol. Chem. **288**, 32766-76 (2013).
38. Zhao, H., Bauzon, F., Fu, H., Lu, Z., Cui, J., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Locker, J. & Zhu, L. Skp2 deletion unmasks a p27 safeguard that blocks tumorigenesis in the absence of pRb and p53 tumor suppressors. Cancer Cell **24**, 645-59 (2013).
39. Ohnishi, T., Shirane, M., Hashimoto, Y., Saita, S. & Nakayama, K.I. Identification and characterization of a neuron-specific isoform of protrudin. Genes Cells **19**, 97-111 (2014).
40. Lu, Z., Bauzon, F., Fu, H., Cui, J., Zhao, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Zhu, L. Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity. Nat. Commun. **5**, 3463 (2014).
41. Hashimoto, Y., Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T. & Nakayama, K.I. Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. J. Biol. Chem., in press.
42. Matsumoto, A., Takeishi, S. & Nakayama, K.I. p57 regulates T cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. Blood, in press.

G-2. 著書・総説

1. 日本プロテオーム学会編, プロテオミクス辞典, 講談社, 東京, 2013.
2. 平野 久 プロテオーム解析―タンパク質の網羅的解析で何がわかるか 化学と工業 **67**(2), 128-31, (2014).

G-3. 学会発表

1. 足立 淳、朝長 毅：ターゲットプロテオミクス～Beyond SRM～. 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 13 日
2. 朝長 毅：質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化への挑戦. 第 10 回 千葉疾患プロテオミクス研究会, 東京, 2013 年 11 月 9 日
3. 朝長 毅：質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化. 第 11 回 北里疾患プロテオミクス研究会, 神奈川, 2014 年 3 月 28 日
4. 村岡 賢, 久米秀明, 西塚 哲, 若林 剛, 星野 , 松原久裕, 朝長 ：自己抗体ファージライブラリを用いたスキルス胃癌の診断バイオマーカーの探索 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013 年 10 月 3-5 日
5. 白水 崇、足立 淳、八木 滋雄、朝長 毅：マウス同所移植モデルによる大腸癌高浸潤性細胞のプロテオーム解析 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013 年 10 月 3-5

日

6. 久家 貴寿, 久米 秀明, 川崎 直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原 久裕, 齊藤 洋平, 中山 祐治, 朝長 毅:大腸癌細胞における FAM83H と casein kinase Iα を介したケラチン骨格制御機構の解明 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日
7. 風見 隆浩, 朝長 毅, 川崎 直子, 佐藤 守, 久家 貴寿, 松下 一之, 野村 文夫 : annexin A2 の核内蓄積は coilin を介したセントロメア損傷によって染色体不安定性に関与する 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日
8. 原 洋, 川崎直子, 平野賢一, 橋本裕希, 朝長 : ATGL ノックアウトマウス心筋のプロテオーム解析を用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索. 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日
9. Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. Biomarker Discovery for Triglyceride deposit Cardiomyovasculopathy using proteome and transcriptome analysis. The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease, Osaka, Japan, April 19-20, 2013
10. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T. ATP Accessibility Screening (AAS), A High-Throughput and High-Resolution Kinase Analysis Platform for Signaling Research. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
11. Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. Proteomic and transcriptomic analysis of Triglyceride deposit Cardiomyovasculopathy for discovery of novel biomarkers. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
12. Kume H, Muraoka S, Hashimoto Y, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Fukuoka J, Kodera Y, Matsushita K, Matsubara H, Tomonaga T. Discovery and subsequent validation of biomarkers for colorectal cancer by large-scale proteomic analysis and tissue microarray analysis. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
13. Shiromizu T, Adachi J, Yagi S, Hoffman RM, Tomonaga T. Proteomic Analysis of Highly Invasive Colorectal Cancer Cells Established by Orthotopic Xenograft Mouse Model. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
14. Muraoka S, Kume H, Saitoh H, Enomoto Y, Ito Y, Nishizuka S, Wakabayashi G, Hoshino I, Matsubara H, and Tomonaga T. Development of High-throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhous Gastric Cancer Biomarker. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
15. Hashiguchi K, Muraoka S, Adachi J, Sato M, Kuga T, Watanabe R, Shiromizu T, Hashimoto Y, Nagano M, Kishida M, Tomonaga T. Quantitative Phosphoproteome Analysis of Cultured Stomach Cancer Cell Lines Aimed at Development of Biomarkers for Prediction of Drug Efficacy. Human Proteome Organization (HUPO) 12th annual world congress, Yokohama, Japan, 14-18 Sep, 2013.
16. Sato M, Adachi J, Tomonaga T. Quantitative Proteome Analysis with Isotope Dimethyl Labeling to Identify TGF-beta-mediated Tumor Proteins Using the Metastatic Mouse

Breast Cancer Model. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013

17. Watanabe R, Hashimoto Y, Kishida M, Matsubara M, Adachi J, Tomonaga T. Phospho-profiling of mTOR inhibitor-treated renal cell carcinoma (RCC) cell lines and its application for drug response-efficacy biomarkers. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
18. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Matsubara H, Tomonaga T. A Novel Mechanism of Keratin Cytoskeleton Organization Through Casein Kinase I Alpha and FAM83H in Colorectal Cancer: Interactome Analysis of FAM83H. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
19. Sano S, Tagami S, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M, Tomonaga T. Absolute quantitation of plasma biomarker peptides APL1b for Alzheimer disease at fmol/ml level using SRM. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
20. Nagano M, Kuga T, Adachi J, Tomonaga T. A Kinase Activity-Estimating Method Using LC-MS/MS. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
21. Maiko Ako, Tsuyoshi Takahashi, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Yasuaki Miyazaki, Kazuki Shimada, Takayuki Ikezoe, Takahiro Taguchi, Yukinori Kurokawa, Makoto Yamasaki, Hiroshi Miyata, Kiyokazu Nakajima, Shuji Takiguchi, Masaki Mori, Yuichirou Doki, Tetsuji Naka, Toshirou Nishida. New findings of kinase switch in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis.104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 09, 2013; Washington, DC
22. Akiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Shinya Matsuzaki, Kousuke Hiramatsu, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Masami Fujita, Takuhei Yokoyama, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura. Functional domain of Annexin A4: which domain is indispensable for chemoresistance to platinum drugs? 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 09, 2013; Washington, DC
23. Shinya Matsuzaki, Akiko Morimoto, Satoshi Serada, Takuhei Yokoyama, Toshihiro Kimura, Eiji Kobayashi, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Masami Fujita, Takayuki Enomoto, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 09, 2013; Washington, DC
24. Tsuyoshi Takahashi, Maiko Ako, Satoshi Serada, Takahiro Taguchi, Yukinori Kurokawa, Makoto Yamasaki, Hiroshi Miyata, Kiyokazu Nakajima, Syuji Takiguchi, Masaki Mori, Yuichirou Doki, Tetsuji Naka, Toshirou Nishida. The analysis of kinase resistance in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic methods. 第 72 回日本癌学会 パシフィコ横浜 2013 年 10 月 3 日
25. Akiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura. Functional domain of Annexin A4:Which domain is indispensable for chemoresistance to platinum drugs? 第 72 回日本癌学会 パシフィコ横浜 2013 年 10 月 5 日

26. Nagano K., Maeda Y., Kanasaki S., Yamashita T., Inoue M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Evaluation of a novel breast cancer-related protein, Eph receptor A10 for targeting therapy., 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
27. Kamada H., Yamashita T., Inoue M., Nagano K., Katayama S., Mukai Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteomic analysis of tumor-derived exosomes derived from cultured human lung cancer cell as tumor biomarkers., HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
28. Mukai Y., Yoshikawa M., Okada Y., Tsumori Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird W.C., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S.: Phage display-based high throughput screening to identify cell-internalizing monoclonal antibodies for antibody-drug conjugates., 12th HUPO World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
29. Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Higashisaka K., Yoshioka Y., Inoue M., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Search for biomarker proteins related to cisplatin-susceptibility in malignant mesothelioma., HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama (Japan), 14-18 September, 2013.
30. Nagano K., Maeda Y., Yamashita T., Inoue M., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Anti-EphA10 monoclonal antibody is a potential therapy against EphA10 positive breast cancer., AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston (USA), 19-23 October, 2013.
31. Kamada H., Yamashita T., Inoue M., Nagano K., Katayama S., Mukai Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteome profiling and detecting method of lung cancer cell-derived exosomes as tumor biomarkers, AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston (USA), 19-23 October, 2013.
32. Taki S., Kamada H., Maeda Y., Nagano K, Mukai Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Development of EphA10/CD3 bispecific tandem scFv as a drug candidate against breast cancer., AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston (USA), 19-23 October, 2013.
33. 長野一也, 山下琢矢, 井上雅己, 阿部康弘, 向 洋平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 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: Annexin A4 の同定., 第 60 回日本生化学会近畿支部例会., 吹田（大阪）, 2013 年 5 月.
34. 瀧 慎太郎, 鎌田春彦, 井上雅己, 前田祐香, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一 : 乳がん関連たんぱく質 EphA10 を標的とした tandem scFv 型 bispecific 抗体の開発., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都（京都）, 2013 年 7 月.
35. Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Anti-tumor effect of a monoclonal antibody directed against EphA10, a novel breast cancer marker candidate., 第 72 回日本癌学会学術総会., 横浜（神奈川）, 2013 年 10 月.
36. 長野一也, 前田祐香, 金崎聡一郎, 渡邉貴信, 山下琢矢, 井上雅己, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 向 洋平, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 新規乳がん関連蛋白質 Eph receptor A10 に対するモノクローナル抗体のゼノグラフトモデルマウスでの評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本（熊本）, 2014 年 3 月.

37. 瀧 慎太郎, 鎌田春彦, 井上雅己, 長野一也, 向 洋平, 堤 康央, 角田慎一: EphA10 と CD3 を認識する新規 Bispecific 抗体 (EphA10/CD3)の創製と T 細胞活性化に関する考察., 日本薬学会第 134 年会., 熊本（熊本）, 2014 年 3 月.
38. Arakawa, N., Miyagi, E., Nomura, A., Morita, E., Masuishi, Y., Ino, Y., Ohtake, N., Myoba, S., Miyagi, Y, Hirahara, F. and Hirano, H. Secretome-based identification of novel serum biomarkers for ovarian clear cell adenocarcinoma. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
39. Ino, Y., Ishikawa, A., Nomura, A., Kajiwara, H. and Hirano, H. Phosphoproteome analysis of Lotus japonicus seeds. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
40. Kimura, A., Nomura, A., Kawakami, T., Arakawa, N. and Hirano, H. Quantitative variation of protein components and their phosphorylations in the SWI/SNF chromatin remodeling complex associated with high malignancy of ovarian clear cell adenocarcinoma. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
41. Kimura, Y., Kurata, Y., Ishikawa, A., Okayama, A., Kamita,M. and Hirano, H. N-Terminal modification of proteasome subunit Rpt1 in yeast. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013. 9.14-18.
42. Kurata, Y., Kimura, Y., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Okamoto, H., Masaoka, T., Nagoya, H., Araki, K., Moriyama, S., Mori, T. and Hirano, H. Effects of growth hormone on the salmon pituitary proteome. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013. 9.14-18.
43. Morishita, S., Ikoma, K., Nomura, A., Taki, K., Ono, T., Murakoshi, M., Sugiyama, K., Hirano, H. and Nishino, H. Potent lipolytic action of lactoferrin: Elucidation of the lipolytic action mechanism in mature adipocytes, using proteomic approach. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
44. Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Kimura, Y., Nagashima, Y., Ryo, A. and Hirano, H. Proteomic analysis for discovering therapeutic targets and prognostic markers for early-stage lung adenocarcinoma. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013. 9.14-18.
45. Sakaguchi, D., Nakagiri, Y., Taguchi, H., Moriwaki, S. and Hirano, H. Proteomic analysis of Stratum corneum of human scalp. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
46. Sasaki, Y., Ishikawa, A., Kawakami T., Hirano, H. and Goshima, Y. Proteomics of axons during presynapse formation using the novel culture method "Neuron ball culture".
47. Taguchi, H., Sakaguchi, D., Moriwaki, S. and Hirano, H. Proteome profiling of epidermal differentiation proteomics of axons during presynapse formation using the novel culture method "Neuron ball culture". Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
48. Takahashi, E., Unoki-Kubota, H., Okumura, A. and Hirano, H. iTRAQ-based quantitation and validation by multiple reaction monitoring to identify diabetes-related biomarkers in sera from KK-Ay diabetes mice. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress,