チューブに回収し、200 g、2 分間遠心することで回収した。回収した CTOS を 10%FCS D-MEM, high glucose （sigma）にて懸濁し、表面加工された細胞培養ディッシュ（nunc）で培養した。培養ディッシュに接着した CTOS のみを回収し、CTOS 由来平面培養細胞として実験に供した。

B-3. 抗がん剤の感受性解析

CTOS 由来平面培養がん細胞に対しての抗がん剤の感受性試験は以下の手順で実施した。トリプシンにて剥離した平面培養がん細胞を 96 well plate に 1 x 10^4cells/well の細胞濃度で播種した。24 時間培養後することで細胞をプレートに接着させ、メディウムを CTOS 用の培地に交換した。30μM の濃度を最大濃度として、各分子標的治療薬（imatinib, Gefitinib, Erlotinib）を作用させ、72 時間培養した。培養後、細胞内 ATP 検出試薬（東洋ビーネット）にて生細胞数を検出した。

また、スフェロイド培養した CTOS についての抗がん剤の感受性試験は以下の手順で行った。スフェロイド培養され懸濁状態で浮遊している CTOS を 20μL ずつ 96well に播種し、終容量 100μL で培養した。24 時間培養後の CTOS に対して、上記と同様の操作にて、生細胞数を計測した。

B-4. 膜タンパク質の抽出・精製

培養液中に含まれるタンパク質を除くため、細胞を PBS にて 3 回洗浄した。洗浄後、細胞膜タンパク質をビオチンにてラベル化するために 880 μM Sulfo-NHS-LC-biotin（Thermo Scientific）溶液を添加し、5 分間室温で反応させた。300μL の 1 M Tris-TCl (pH7.4) を添加し、ビオチン化反応を止めた。セルスクレイパーを用いて細胞を培養ディッシュより剥がして回収した。回収後の細胞に対して、Lysis Buffer (2% NP-40, 0.2% SDS, 10mM EDTA in PBS) を添加し、30 分間、氷上で反応させることでタンパク質を可溶化した。可溶化後のサンプルを 14000rpm、15 分間遠心し、溶解しなかった細胞を除去した。回収した上清中のタンパク質を BCA assay にて定量した。

B-5. プロテオミクス解析

400μg のタンパク質に対して、還元アルキル化を行った。タンパク質溶液に対して、終濃度 5mM になるように TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride)を添加した。添加後、室温で１５分間反応させ、その後 95°C で 15 分間反応させた。反応後の溶液を室温に戻し、終濃度 10mM になるようにヨードアセトアミドを添加した。遮光下、室温で 15 分間反応させ、、過量の L-システインを添加することで反応を停止させた。還元アルカリ化したタンパク質溶液に対して、あらかじめ BufferA（1% NP-40, 0.1% SDS in PBS）にて洗浄したストレプトアビジンビーズ（Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare）を添加した。添加後、二時間反応させ、ビオチン化タンパク質を回収した。ビオチン化タンパク質がキャプチャーされたビーズをフィルター濾過し、BufferA にて 3 回、Buffer B（0.1% SDS, 2M NaCl in PBS）にて 2 回洗浄した。洗浄後のサンプルを Digestion Buffer (50 mM Tris-HCl, 1mM $CaCl_2$, pH 8.0)にて 10 回洗浄した。洗浄後のビーズを 80ng/μL のトリプシン溶液にて、一晩反応させ、タンパク質を分解した。分解後のペプチドを、Omix Tip（Agilent）にて回収し、LC-MS/MS（Orbitrap, ThermoFisher Science）にてタンパク質を同定した。

C. 研究結果

C-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。

C-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。

D. 考察

C. 研究結果に記載

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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 Medicine, **2**(6):972-977 (2013).
2. 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**: 969–973 (2013).

G-2. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

H. 知的財産の出願・登録状況

H-1. 特許取得
なし。

H-2. 実用新案登録
なし。

H-3. その他
なし。

I. 研究協力者

鎌田 春彦　医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト
長野 一也　医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト
井上 雅己　医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト
瀧 慎太郎　医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト

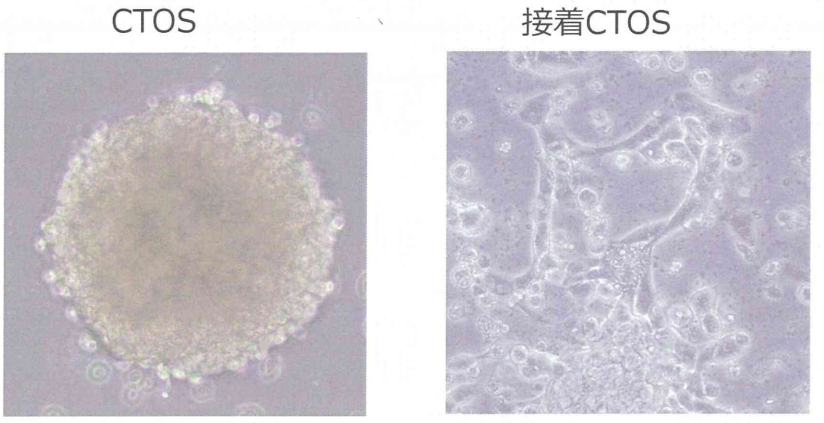


図1　通常培養CTOS（クラスター培養）と平面培養CTOSの位相差顕微鏡像。通常の培養ではCTOSは球状に丸まり、細胞も球形をとどめているが、平面培養することで、細胞は細長く接着する様子が認められた。

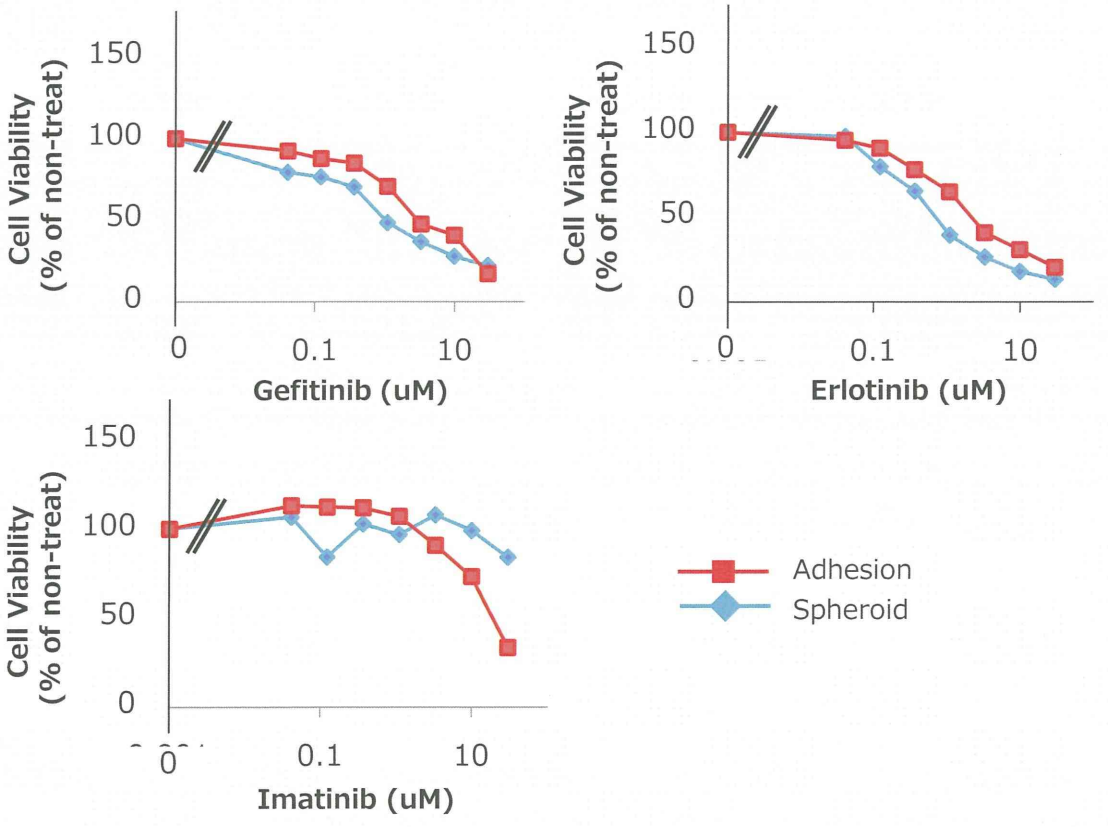


図2　各種分子標的治療薬に対するスフェロイド培養と平面培養での感受性の違い。培養法が異なるCTOSに対して、各分子標的治療薬を添加し、その細胞傷害性について検討した。生細胞数はATP量を指標に解析した。

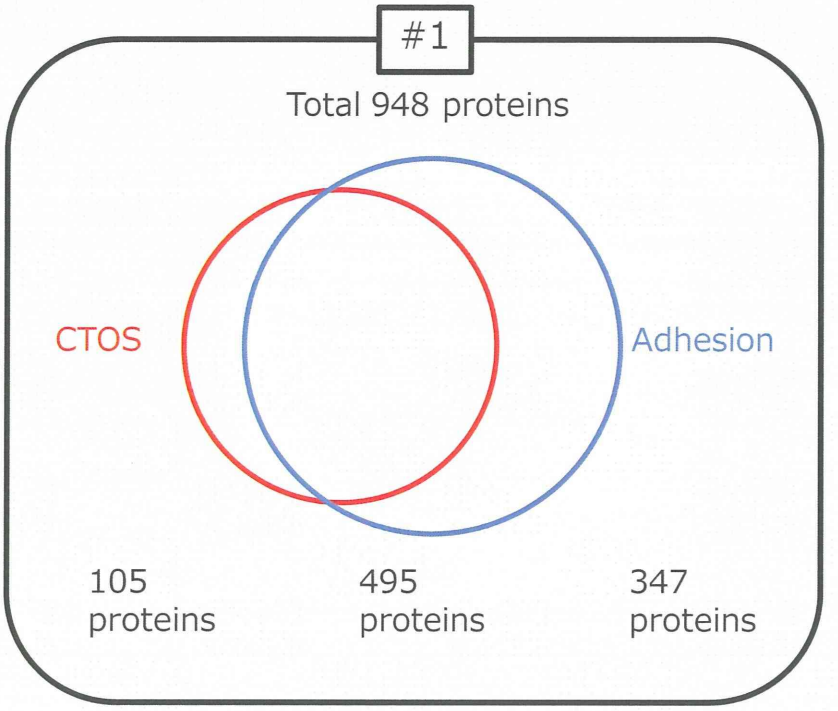


図3　スフェロイド培養と平面培養での膜タンパク質での発現状態の違い。スフェロイドあるいは平面にて培養したCTOSの膜タンパク質の発現の違いをプロテオミクス解析した。総計で948種類のタンパク質が同定されたうち、共通して発現するものは495種類あった。

表1　CTOSとCTOS由来平面培養細胞での共通発現タンパク質（Top10）

Q15149	Plectin
P49327	Fatty acid synthase
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19
P06733	Alpha-enolase
O75369	Filamin-B
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK

表2　CTOSでのみ発現しているタンパク質上位10

P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
P04908	Histone H2A type 1-B/E
Q92928	Putative Ras-related protein Rab-1C
Q16658	Fascin
Q7Z406	Myosin-14
P02647	Apolipoprotein A-I
P52943	Cysteine-rich protein 2
Q04917	14-3-3 protein eta

表3　CTOS由来平面培養細胞でのみ発現しているタンパク質上位10

Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain
P68371	Tubulin beta-4B chain
Q13748	Tubulin alpha-3C/D chain
Q13509	Tubulin beta-3 chain
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2
P02786	Transferrin receptor protein 1
Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B
P40763	Signal transducer and activator of transcription 3
P56192	Methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進事業）
分担研究報告書

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

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

研究要旨

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。

A. 研究目的

A-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

前立腺癌の治療には、男性ホルモンであるアンドロゲンを除去するホルモン療法が有効であるが、ホルモン療法を続けるとアンドロゲン非依存性前立腺癌に進展する場合が少なくない。このアンドロゲン非依存的な細胞増殖のメカニズムはまだ明らかにされていない。そこで、その解明を目指して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の変動を網羅的に解析し、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する。

A-2. 肺腺癌予後予測診断マーカータンパク質の検出・同定

多くの癌は早期に発見し、外科的に切除することにより良好な治療成績が得られるが、早期に癌を切除した患者にも再発や転移を起こす例がある。肺腺癌では早期切除例の約 20%が再発し、予後が悪いため、再発を防ぐ術後療法を必要とする群の予測診断を可能とするバイオマーカーを開発することが望まれている。そこで、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 laser capture microdissection（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ショットガン分析（LC-MS/MS 分析)により検出し、ノンラベル定量解析ソフトで相対定量解析を行った。

B. 研究方法

B-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培養細胞であるLNCaP細胞と、LNCaP細胞を長期間アンドロゲン存在下で培養して作製したアンドロゲン非依存性前立腺癌培養細胞(LNCaP-AI 細胞)を試料として用いた。両細胞の増殖を比較し、抗アンドロゲン受容体抗体を用いてウエスタンブロット法によりアンドロゲン受容体の発現変化を調べた。また、両細胞から抽出したタンパク質を還元アルキル化した後、トリプシン消化した。得られたペプチドの中から、リン酸化ペプチドを二酸化チタンビーズを用いて濃

縮精製し、質量分析装置で測定した。得られたデータの比較定量解析では、Progenesis LC-MS Analysis Software を用いて fold change ≧2, ANOVA <0.05, peptide score ≧20 のリン酸化ペプチドを抽出した。

B-2. 肺腺癌予後予測診断マーカータンパク質の検出・同定

早期の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質量分析装置で分析した。得られたデータの比較定量解析には Progenesis LC-MS Analysis Software を用いた。fold change >0.5, ANOVA <0.05, peptide score >30 で解析対象のペプチドを抽出した。また、予後不良群で発現上昇しているタンパク質の中から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定量解析結果の検証を行った。さらに、免疫組織化学的手法を用いてこれらのタンパク質がバイオマーカー候補となる可能性があるかについて検証した。一方、A549 細胞 (human alveolar adenocarcinoma cell line) を用いた siRNA 実験によって 2 種類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かどうか調べた。

(倫理面への配慮)

提供者の同意が得られ、横浜市立大学倫理委員会で承認が得られた試料を使用した。

C, D. 研究結果及び考察

C, D-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。

C, D-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。

E. 結論

1) 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。
2) 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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Hong, F., Liu, B., Mohammad, S., Debbie, R., Han, L. D., Huang X., Zhao, H., Kimura, Y., Hirano, H., Ohara, O. and 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.
2. 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. and 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.
3. Akama, K., Horikoshi, T., Nakayama, T., Otsu, M., Imaizumi, N., Nakamura, M., Toda, T., Inuma, M., Hirano, H., Kondo, Y., Suzuki, Y. and 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**, 601-610, 2013.
4. Arakawa, N., Miyagi, E., Nomura, A., Morita, E., Ino, Y., Ohtake, N., Miyagi, Y., Hirahara, F. and Hirano, H. Secretome-based identification of TFPI2, a novel serum biomarker for detection of ovarian clear cell adenocarcinoma. J Proteome Res. **12**, 4340-4350,2013.
5. Kimura, Y., Kurata, Y., Ishikawa, A., Okayama, A., Kamita, M. and Hirano. H. N-Terminal methylation of proteasome subunit Rpt1 in yeast. Proteomics. **13**, 3167-3174, 2013.
6. Masuishi, Y., Nomura, A., Okayama, A., Kimura, Y., Arakawa, N. and Hirano H. Mass spectrometric identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored peptides. J Proteome Res. **12**, 4617-4626, 2013.
7. Sato, Y., Akitsu, M., Amano, Y., Yamashita, K., Ide, M., Shimada, K., Yamashita, A., Hirano, H., Arakawa, N., Maki, T., Hayashi, I., Ohno, S. and Suzuki A. A novel PAR-1-binding protein, MTCL1, plays critical roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. J Cell Sci.**126,** 4671-4683,2013.

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. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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".
10. 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.
11. 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, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.
12. Yamashita, A., Kurosawa, H., Hirano, H. and Ohno, S. An efficient affinity purification method for interaction proteomics in mammalian cells. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013. 9.14-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1-1.

発明の名称：「卵巣明細胞癌に特異的に発現している蛋白質とその応用」

発明者：荒川憲昭、増石有佑、山中結子、平野久、川崎博史、平原史樹、宮城悦子

特許番号：特許第 5224308 号

登録日：2013 年 3 月 22 日

1-2.

発明の名称：「卵巣明細胞癌に特異的に発現している蛋白質とその応用」

発明者：荒川憲昭、増石有佑、山中結子、*平野*
久、川崎博史、平原史樹、宮城悦子
特許番号：特許第 5224309 号
登録日：2013 年 3 月 22 日

2. 実用新案登録
　なし

3. その他
　なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告

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

研究分担者　山田哲司　国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野　分野長
研究協力者　増田万里　国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野主任研究員

研究要旨

がんの個別化医療の実現のためには、特定の治療薬の効果や副作用を治療開始前に予測し、投与が適切あるいは不適切な症例を選定する必要がある。本研究課題ではこのような個別化医療のためのコンパニオン診断薬の開発を最終的な目標として、分子標的治療薬が標的とするリン酸化タンパク質のプロファイリングを行い、シグナルネットワークの変化を網羅的に捉える基盤技術の開発を行うことを目的とする。

本研究分担者らは逆相担体がコートされたガラススライドに高密度にタンパク質検体を微量定量スポットする独自のタンパク質マイクロアレイ技術を開発し、血清・血漿タンパク質の定量解析が可能であることを示してきた。本法は従来のイムノブロット法などに比べ格段に感度が高く、微量なタンパク質検体でも可能なことから、生検組織などの臨床検体に応用が可能と考えられる。

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

平成２５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。

A．研究目的

特定のシグナル伝達分子を標的としたがん分子標的治療薬の開発が進み、効果をあげている。さらに効果が期待できる可能性の高い患者をあらかじめコンパニオン診断薬を用いて絞り込むことできれば、より個々の症例に適した薬剤を選択する最適化医療が期待されている。

今まで有効な全身療法がなかった切除不能な進行肝がん患者にたいし、マルチキナーゼ阻害薬ソラフェニブ（ネクサバール）の国際第３相臨床試験の結果が 2007 年の米国臨床腫瘍学会（ASCO）において発表され、投与群では全生存期間中央値で約 3 カ月延長効果が示された。この結果をもとに我が国においても 2009 年５月にソラフェニブの肝細胞がんへの適応が認可された。

ソラフェニブの標的分子は Raf キナーゼ、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-B、KIT、FLT-3、RET とされているが、作用機序の詳細はいまだ不明な点が多く、治療効果をあら

かじめ予測できるコンパニオン診断薬が存在せず、適切な患者の選択に至っていないのが現状である。

ネクサバールの治療にかかる医療費は非常に高額であり、高額の医療費負担や無用な副作用を避けるためにも早急なコンパニオン診断薬の開発が求められている。細胞内におけるタンパク質のリン酸化はシグナル伝達タンパク質の多くの機能を制御しており、がん細胞においてシグナル伝達系の逸脱した活性化が、がん細胞の異常な増殖やアポトーシスに対する抵抗性に関与していることが知られている。よって、タンパク質のリン酸化の状態を把握することは、新たな治療薬の標的分子及び薬剤感受性マーカーの開発に繋がることが期待される。

B． 研究方法

平成２４年度にはガラス基板に細胞や組織から得られたタンパク試料をアレイ化し、様々な抗体を用いて発現の検出を行う逆相マイクロアレイ法（Reverse Phase Protein Array; RPPA）をリン酸化タンパク質の検出に応用し、リン化タンパク質を網羅的かつ high-throughput に検出する基盤を確立した。この基盤技術を用いて、95 のがん細胞株（肝細胞がん 23 株、卵巣がん 16 株、胃がん 15 株、大腸がん 9 株、すい臓がん 9 株、肺がん 8 株、骨肉腫 8 株、口腔がん 7 株）を培養し、これらの細胞抽出液からなる高密度タンパクアレイ(3,072 spots/slide, <100pg lysate/spot)を作製し、NCI-Nature のデータベースに登録されている 120 のシグナル経路に含まれる分子について 180 個のノードタンパク質のリン酸化に特異的抗体を用い、リン酸化タンパク質のプロファイリングをおこなった。更に、リン酸化プロファイリングが得られた肝細胞がんの 23 細胞株についてソラフェニブの薬剤感受性（IC50）を測定し、リン酸化プロファイリングとの相関解析を行い、ソラフェニブ感受性予測マーカーの探索を試みた。

（倫理面への配慮）

本年度は培養細胞を用いた研究に限定しており、「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」等の対象外である。

C． 結果

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。

D． 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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].
2. 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).
3. 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).
4. Makuuchi Y, Honda K, Osaka Y, Kato K, Kojima T, Daiko H, Igaki H, Ito Y, Hoshino S, Tachibana S, Watanabe T, Furuta K, Sekine S, Umaki T, Watabe Y, Miura N, Ono M, Tsuchida A, Yamada T. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. Cancer Sci. **104**(8):1045-51 (2013).

G-2. 学会発表

1. Masuda M, Honda K, Yamada T. Genomic and proteomic profiling of signaling pathways targeted by a multi-kinase inhibitor, sorafenib. AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR) ANNUAL MEETING 2013 April 6–10, 2013 (Washington DC, USA)
2. Yamada T, Masuda M, Chen W-Y, Chen C-L, Honda K. Phosphoprotein profiling with high-density fluorescence protein microarray reveals a predictor of response to the multi-kinase inhibitor sorafenib. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY (ASCO) ANNUAL 2013 MEETING May 31–June 4, 2013 (Chicago, USA)
3. Honda K, Yamada T, et al. Rapid biomarker validation by high-density plasma protein array. 3RD REVERSE-PHASE PROTEIN ARRAY GLOBAL WORKSHOP Nov 12–13, 2014 (Kobe, Japan)
4. Masuda M, Yamada T, et al. Phospho-profiling of signaling pathways targeted by a multi-kinase inhibitor, sorafenib. 3RD REVERSE-PHASE PROTEIN ARRAY GLOBAL WORKSHOP Nov 12–13, 2014 (Kobe, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

H-1. 特許取得

なし。

H-2. 実用新案登録

なし。

H-3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発

研究分担者　中山　敬一　九州大学生体防御医学研究所　主幹教授

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、生体内のタンパク質レベルでの量的あるいはリン酸化などの質的変化が遺伝子レベルの変化から正確に予測できないからである。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

細胞癌化の主要な原因は細胞増殖制御機構の破綻であると考えられているが、細胞の活発な増殖状態が即、癌化を意味するわけではない。すなわち、細胞の癌化には活発な増殖状態に加えて、様々な細胞機能の変化が関与している。近年、p53 や Ras など癌関連遺伝子が代謝経路に直接的に関わることが示されるなど、細胞癌化機構の理解が新たな局面を迎えている。癌関連遺伝子の変異に端を発する癌化シグナルは、様々なパスウェイに働きかけ、最終的な細胞癌化状態を生み出していると考えられるが、その実態はほとんど不明である。発癌あるいは癌の維持機構の裏側には未だ知られていない複雑な事象が潜んでおり、これらの解明が癌治療の標的発見に直結すると考えられる。細胞癌化過程のような複雑な生命現象を理解するためには、個々のタンパク質に着目した詳細なボトムアップ的解析だけでは不十分であり、細胞癌化において生じる変化を細胞内ネットワークの挙動として定量的に可視化し、細胞癌化ネットワークを解き明かす必要がある。そのためには正確なタンパク質発現絶対量計測が必須であるが、既存のプロテオーム解析法では不可能である。そこで、われわれは質量分析計による超高感度定量技術、MRM (Multiple-Reaction Monitoring) 法とヒト組み換えタンパク質リソース (25,000 遺伝子) とを組み合わせることで、これまで不可能とされてきた全タンパク質の絶対定量を可能とする画期的なプロテオーム解析法（情報基盤 MRM 法： iMRM）を考案した。

本研究では、iMRM 法を用いて細胞内パス

ウェイ構成タンパク質を一斉定量するためのMRMメソッドの構築を実施し、正常細胞および各種癌原遺伝子の導入によって癌化した細胞を対象に、代謝やシグナル伝達などの複雑な細胞内ネットワーク構成要素の網羅的精密定量を行う。さらに、細胞内リン酸化の経時変化を詳細に追跡するために、データ非依存分析法である SWATH 法と高純度リン酸化ペプチド精製法を組み合わせた新たなリン酸化定量技術を構築し、正常細胞と癌細胞における細胞内シグナル伝達の差異を明らかにする。

B. 研究方法

B-1. パスウェイ構成タンパク質の絶対定量法の確立

ヒト正常線維芽細胞に複数の癌原遺伝子を発現させることで細胞癌化を誘導することができる。これら正常細胞と癌細胞の細胞内ネットワークの違いをタンパク質発現量で詳細に知るために、代謝経路やシグナル伝達経路など細胞内パスウェイを構成する約 1,700 種類のタンパク質の MRM 測定メソッドを構築した。パスウェイ構成タンパク質は KEGG データベースから抽出し、対応する組み換えタンパク質を小麦胚芽抽出物を用いた in vitro 合成系で作製・精製を行った（各タンパク質はすべて SDS-PAGE で純度および濃度を検定した）。これらを酵素消化後、mTRAQΔ4 にて標識し、LC-MS/MS (QqTOF 型質量分析計)による MS/MS スペクトルの取得を実施した。得られたスペクトルを MASCOT 検索によって各 MS/MS スペクトルの帰属を行い、データベースに格納した。MS/MS スペクトルから MRM メソッドを構築し、同組み換えタンパク質消化物に対して MRM 計測を実施し、感度および特性の高い MRM-transition の選定を行った。ヒト正常線維芽細胞とその癌化細胞およびいくつかのヒト癌細胞株からタンパク質を抽出し、酵素消化後、mTRAQΔ0 で標識し、検体試料を得た。これらの検体に mTRAQΔ4 標識組み換えタンパク質消化物を混合し、MRM の測定を実施した。

B-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の確立

細胞内に存在するシグナル伝達経路の主要構成分子が次々に同定されてきたが、これらのシグナル伝達分子郡が如何に特異的な細胞応答を生み出すかは、ほとんど理解されていない。細胞内シグナル伝達において多くのタンパク質がリン酸化を介して下流にシグナルを伝えており、タンパク質のリン酸化はシグナル伝達素子と見なすことができる。

細胞内シグナル伝達経路の動作原理の解明のためには、リン酸化状態の網羅的かつ詳細な時系列データを正確に取得することが必要である。近年、リン酸化ペプチド精製技術と高感度質量分析計を組み合わせることでタンパク質のリン酸化の網羅的解析が可能となったが、大規模かつ高精度な定量データの取得には未だ技術的ハードルが高い。本研究では次世代型の定量プロテオミクス技術である MS データ非依存分析法である SWATH 法と高純度リン酸化ペプチド精製法を組み合わせることで、リン酸化の多点定量データ取得を可能とする解析プラットフォームを構築した。

C. 研究結果

C-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。

C-1. データ非依存分析によるリン酸化の時系列定量解析法の確立

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 18,000 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。

D. 考察

D-1. パスウェイ構成タンパク質の絶対定量法の確立

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/1 h 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ある。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。

D-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の確立

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

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

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. and Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. Oncogene **32**, 1921-1932 (2013).
2. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. and Gotoh, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. EMBO J. **32**, 970-981 (2013).
3. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Onoyama, I., Imaizumi, K. and 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**, 28488-28502 (2013).
4. Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T. and Nakayama, K.I. Substrate binding promotes formation of the Skp1-Cul1-Fbxl3 (SCF^{Fbxl3}) protein complex. J. Biol. Chem. **288**, 32766-32776 (2013).
5. Zhao, H., Bauzon, F., Fu, H., Lu, Z., Cui, J., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Locker, J. and Zhu, L. Skp2 deletion unmasks a p27 safeguard that blocks tumorigenesis in the absence of pRb and p53 tumor suppressors. Cancer Cell **24**, 645-659 (2013).
6. Ohnishi, T., Shirane, M., Hashimoto, Y., Saita, S. and Nakayama, K.I. Identification and characterization of a neuron-specific isoform of protrudin. Genes Cells **19**, 97-111 (2014).
7. Lu, Z., Bauzon, F., Fu, H., Cui, J., Zhao, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I. and Zhu, L. Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity. Nat. Commun. **5**, 3463 (2014).
8. Hashimoto, Y., Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T. and Nakayama, K.I. Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. J. Biol. Chem. in press. (2014).
9. Matsumoto, A., Takeishi, S. and Nakayama, K.I. p57 regulates T cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. Blood in press. (2014).

G-2. 学会発表

（招待講演）

1. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの秘密に迫る. 第 5 回お茶の水 Hematology セミナー, 東京, 2013 年 4 月 17 日
2. 中山敬一: 次世代プロテオミクスによる癌代謝と細胞周期の統合的理解：90 年来の謎に挑む. 第 17 回日本がん分子標的治療学会, 京都, 2013 年 6 月 13 日
3. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが解き明かすがんの秘密. 第 40 回佐島シンポジウム, 仙台, 2013 年 6 月 14 日
4. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新地平：90 年来のがんの秘密に挑む. 第 40 回 BMS コンファレンス, 宮崎, 2013 年 7 月 8 日