

201313058B

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

平成23年度～25年度 総合研究報告書

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的

糖鎖構造変動解析システムの構築

研究代表者 植田 幸嗣

平成26年(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的糖鎖構造変動解析システムの構築

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 植田 幸嗣

目 次

I. 総括研究報告

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的糖鎖構造変動解析システムの構築

植田 幸嗣 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 18

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 25

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

平成23年度～25年度総合研究報告書

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的 糖鎖構造変動解析システムの構築

研究代表者 植田幸嗣

独立行政法人理化学研究所 上級研究員

研究要旨:本研究は肺癌の早期診断を可能とする血清腫瘍マーカーを同定し、著しい増加を続ける肺癌死亡数を有意に減少させることを最終目標とする。同目標に対して、細胞の癌化や環境の変化に鋭敏に反応して構造が変化することが知られる糖鎖修飾に着目した「糖鎖標的バイオマーカー」候補は多数同定されるに至っているが、特定の糖鎖付加部位における糖鎖構造の変化を定量的に、かつ多検体を用いてバリデーションできる技術が存在しないため、糖鎖バイオマーカーの臨床、診断応用は長らく停滞していた。この状況を打破するため、質量分析技術を応用して血清タンパク質上の各糖鎖付加部位について、個々に糖鎖構造変化を定量的にモニターできる Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim)法を開発した。

本開発技術を用いて、これまでに同定した肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子に対して多検体検証試験を実施した。本解析により、血中のCD163タンパク質に付加されたN型糖鎖が肺腺癌ステージIIの段階から病期依存的なフコシル化頻度亢進を示し、早期肺癌の存在を示唆する有用なスクリーニングバイオマーカーとなり得ることが分かった。本研究開発により、血中タンパク質の糖鎖変動を標的とする腫瘍マーカーの高速定量評価技術が確立できただけでなく、有効な肺腺癌早期診断マーカー候補としてCD163糖タンパク質の同定に成功した。

A. 研究目的

本邦において肺癌は部位別がん死亡率で第一位を占めており、肺癌の罹患数、死亡者数を減少させることが急務となっている。そのためには喫煙対策などに加え、根治可能なより早い段階で肺癌、またはその前癌病変を発見できる診断技術の開発は重要な位置を占める。現状において肺癌の早期発見には胸部 X 線診断、CT 診断など画像診断技術が主軸となっているが、これらよりも早期に、かつ検査技師の技量にかかわらず腫瘍を発見する技術は現時点では存在せず、本研究で開発する非侵襲的で安価に行える血清質量分析診断法にて初期肺癌の検出やリスク診断までもが可能になれば、それに伴って治療成績は劇的に改善されると期待できる。

研究代表者はこれまで、血清による肺癌の早期診断を目指して様々なグライコプロテオーム解析技術を用い、早期肺癌において糖鎖構造に変化が認められる多数の糖鎖標的マーカー候補の同定を行ってきた。そこで本研究ではそれら全てのマーカー候補糖タンパク質上に付加されている糖鎖の癌性変化を高感度に定量化、統合することによって肺癌を「治療可能な段階で早期に発見すること」、さらには「症状が出る前でのリスクの把握を可能にすること」を目標とする。

B. 研究方法

(1) Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim)法の開発

a. 糖ペプチド標準品の精製

市販品のヒト IgG タンパク質を 8M Urea を含む変性バッファーで溶解させ、還元アルキル化を行った。PD-Miditrap 脱塩カラム (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて重炭酸アンモニウムバッファーに置換した後、トリプシン GOLD (Promega, Madison, WI) で 12 時間消化した。消化後のペプチドサンプルを Oasis HLB カートリッジ (Waters, Milford, MA) で脱塩精製し、次の二次元 HPLC 分画に供した。

4.6 mm x 500 mm Cadenza CD-C18 column (Intakt Corporation, Kyoto, Japan) を用いて、溶媒 A [0.2% TFA]、溶媒 B [75% acetonitrile, 0.1% TFA]、溶媒 B% 5-20 90 分グラジェント、流速 0.6 ml/min の条件で IgG 由来ペプチドの分画を行った。

分取した各フラクションを完全乾燥し、0.1% TFA に再溶解した後、二段階目の 150 mm x 4.6 mm SunShell C18 column (Chromanik Corporation, Osaka, Japan) によるさらなる分画精製を行った。ここでは溶媒 A [0.1% TFA]、溶媒 B [12% acetonitrile, 0.1% TFA]、溶媒 B% 10-90 グラジェントの条件を用いた。分取した各フラクションは乾燥し、以降の実験に供した。

b. 蛍光 HPLC 分析

前項で単離精製した各種糖ペプチド表品の糖鎖構造を確定させるため、2-アミノピリジン蛍光標識法による HPLC 分析を行った。単離糖ペプチドを [0.5U N-glycosidase F (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 0.01% ProteaseMax (Promega, Madison, WI)] 中で 37°C、8 時間

消化を行い、糖鎖をペプチドから切断した。遊離糖鎖をセルロースカートリッジにて濃縮精製、乾燥後、2-アミノピリジンと混合して還元アミノ化反応によるラベル化を行った。

ラベル化糖鎖は MassPREP HILIC μ Elution plate (Waters, Milford, MA) を用いて脱塩精製を行い、Shimpack CLC-ODS column (0.6 x 15 cm) による逆相 HPLC 分析に供した。ここでは溶媒 A [10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH = 3.8)]、溶媒 B [0.5% 1-ブタノールを含む溶媒 A] を用いた。溶媒 B 20% で平衡化を行った後、%B 50 まで 75 分間のグラジェントを作成し、励起波長 320 nm、吸収波長 400 nm で標識糖鎖を測定した。各糖鎖溶出時間は、PA-glucose oligomer (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を利用したグルコースユニット (GU) で補正、構造データベースとの相対比較を行えるようにした。

c. 抗体医薬品 3 種の分析前処理

80 μ g のトラスツズマブ (ハーセプチン)、ベバシズマブ (アバスタチン)、セツキシマブ (アービタックス) をそれぞれ 8M Urea を含む変性バッファーで溶解させ、還元アルキル化を行った後、4 μ g の endoproteinase Lys-C で 37°C、2 時間の消化を行った。この Lys-C 消化物をさらに Trypsin GOLD で 37°C、4 時間消化を行った。最終消化物を Oasis HLB カートリッジにて脱塩を行い、15% acetonitrile で溶出、糖ペプチド画分を回収した。分析に際してはこれを 0.1% 酢酸で 5 倍に希釈したものをを用いた。

d. Multiple Reaction Monitoring (MRM)

MRM 分析には 4000QTRAP トリプル四重極型質量分析計 (AB Sciex, Foster City, CA) に Agilent 1200 nano-HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を接続した LC/MS/MS システムを使用した。Nano-HPLC のカラムには 75 μ m x 200 mm ESI sprayer tip packed with 3 μ m C18 resin (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) を用い、溶媒 A [0.1% ギ酸]、溶媒 B [70% acetonitrile, 0.1% ギ酸]、流速 250 nl/min の条件で分離を行った。

4000QTRAP 質量分析計の設定は以下の通りである。2200 V ionization spray voltage; 12 psi curtain gas (N₂); CAD = 4; 70 V declustering potential; 10 V entrance potential; Q1 resolution, HIGH; Q3 resolution, LOW; 2 ms pause in between.

e. データ解析

MRM で得られたデータは MultiQuant version 2.02 (AB Sciex, Foster City, CA) ソフトウェアを用いてプロセッシング、定量解析を行った。

(2) 肺癌糖鎖標的マーカー候補分子の Erexim 法による多検体検証試験

a. 血清サンプルの分析前処理

87 症例 (健常者 14 例、肺腺癌 I 期 10 例、II 期 15 例、III 期 28 例、IV 期 20 例) の血清サンプル各 5 μ l に [10M Urea, 200 mM ammonium bicarbonate] 20 μ l を添加して変性させた後、Dithiothreitol 終濃度 10 mM

を追加して 37°C、30 分間還元反応を行った。さらに Iodoacetamide 終濃度 25 mM を添加し、室温、暗所で 45 分間システイン残基のアルキル化を行った。アルキル化反応を Dithiothreitol 終濃度 10 mM 添加でクエンチし、[50 mM ammonium bicarbonate] 175 μ l、平衡化後の Immobilized Trypsin (Thermo Scientific 社) 10 μ l を順に加えて消化反応を恒温シェイカー内で 37°C、6 時間行った。消化後のペプチドサンプルを C18 固相抽出カートリッジ(スリーエム社)で脱塩精製し、次の質量分析に供した。

b. 質量分析 (Erexim 法)

Erexim法を用いた血清消化物の質量分析には 4000QTRAP トリプル四重極型質量分析計(AB Sciex 社)に Ultimate 3000 RSLC nano flow HPLC (Dionex 社)を接続した LC/MS/MS システムを使用した。ペプチド分離用のカラムには 75 μ m x 150 mm ESI sprayer tip packed with 3 μ m C18 resin (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan)を用い、溶媒 A [0.1% ギ酸]、溶媒 B [70% acetonitrile, 0.1% ギ酸]、流速 250 nl/min の条件で分離を行った。

4000QTRAP 質量分析計の設定は以下の通りである。2200 V ionization spray voltage; 12 psi curtain gas (N₂); CAD = 4; 70 V declustering potential; 10 V entrance potential; Q1 resolution, HIGH; Q3 resolution, LOW; 2 ms pause in between.

第一四重極 Q1 チャンネルには各種バイオマーカー標的糖鎖付加サイトを含んだ糖ペプチドの質量電荷比(m/z)を設定した。ここで、2 分岐糖鎖までの考えられうる全て

の糖鎖構造パターンについてチャンネルを設定し、報告のあるヒト N 型糖鎖構造全種類を定量的にモニターできるようにした。第三四重極 Q3 チャンネルには、N-アセチルグルコサミンフラグメントイオン m/z = 138、N-アセチルグルコサミンイオン m/z = 204、マンノース、またはガラクトースイオン m/z = 163、N-アセチルノイラミン酸イオン m/z = 292、N-アセチルノイラミン酸から水分子が脱離したイオン m/z = 274、ガラクトース+N-アセチルグルコサミンイオン m/z = 366 を設定し、各オキシニウムイオンの Erexim 曲線を描出した。

e. データ解析

前項の質量分析によって得られたデータは MultiQuant version 2.02 (AB Sciex 社)ソフトウェアを用いてプロセッシング、各 MS クロマトグラム面積値を求める定量解析を行った。昨年度に報告した原著論文 (Anal Chem. 2012; 84 (22): 9655) に記載した手法通り、m/z = 138 のオキシニウムイオンを使用して各糖鎖コンポーネントの定量を、その他のオキシニウムイオンの Erexim 曲線パターン解析から糖鎖構造の同定を実施した。

今年度の研究で対象としたコアフコースの付加頻度解析については、検出された全糖ペプチドの MS クロマトグラム面積値合計のうち、コアフコシル化糖鎖が付加されたペプチドの面積値合計が占める割合を算出した。Box plot など解析結果の集計には R ソフトウェア (Version 2.15.1) を使用した。

C. 研究結果

(1) Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim)法の開発

糖鎖構造バリエーション定量化法を開発するにあたって、我々が着目したのが図1に示すオキシニウムイオンである。オキシニウムイオンはあらゆる糖ペプチドの衝突誘起解離 (CID) によって質量分析機内で生じることが知られ、元の糖鎖構造に依存した種類のイオンが観測される。(図2) これらのオキシニウムイオンパターンを定量的にモニターし、かつ衝突エネルギーによる連続的なスキャンを行うことで、ある糖鎖付加部位に結合していた糖鎖構造を構造異性体の区別まで含めて定量化できるようにしたのが Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring Technology (Erexim 法) である。

Erexim 法の測定機序を図3に示した。トリプル四重極型質量分析計を用い、第一四重極 (Q1) で目的とする糖ペプチド全体の質量を指定し、特異的に通過させる。第二四重極 (Q2) で CID を行い、糖ペプチドを物理的に開裂させる。続いて第三四重極 (Q3) では、CID で生成したオキシニウムイオンを全て定量的に検出する。ここで、質量が全く同じ糖鎖の構造異性体を区別するため、Q2 での衝突エネルギーを連続的に変化させ、オキシニウムイオンの生成量をモニターする。すなわち、立体構造の違いによるある分岐鎖の「壊れやすさ」を調べることによって、例えば α -1,3 グリコシル結合のガラクトースと α -1,6 グリコシル結合のガラクトースが区別できる。

実際にヒト化モノクローナル抗体由来

のトリプシン消化産物から精製した糖ペプチドを測定した例が図4である。ここでは質量が等しい3種類の糖鎖(構造異性体)を持つペプチドの Erexim 曲線を見ると、それぞれの糖鎖構造でオキシニウムイオンの

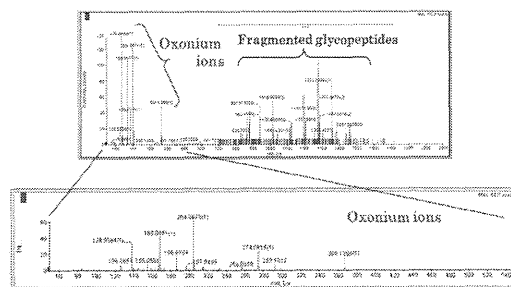
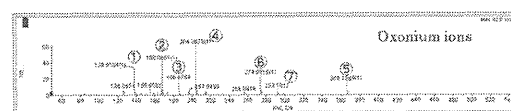


図1 (上段)代表的な糖ペプチドの LC/MS/MS スペクトル。高分子領域にペプチド鎖のフラグメントイオンが、低分子領域には糖鎖由来のフラグメントイオン (オキシニウムイオン) が観測される。(下段) $m/z = 60 - 540$ の拡大図。



- | | | |
|--|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 138.06 = [HexNAc · CH₂O + H]⁺ 2. 168.07 = [HexNAc · 2H₂O + H]⁺ 3. 186.06 = [HexNAc · H₂O + H]⁺ 4. 204.09 = [HexNAc + H]⁺ 5. 366.13 = [HexNAc + Hex + H]⁺ 6. 274.09 = [Neu5Ac · H₂O + H]⁺ 7. 292.09 = [Neu5Ac + H]⁺ | } | <p>HexNAc : GlcNAc or GalNAc
Hex : Man or Gal
Neu5Ac : N-acetyl neuraminic acid</p> |
|--|---|---|

図2 N型糖鎖付加ペプチドの質量分析にて観測される代表的なオキシニウムイオン。GlcNAc: N-アセチルグルコサミン、GalNAc: N-アセチルガラクトサミン、Man: マンノース、Gal: ガラクトース。

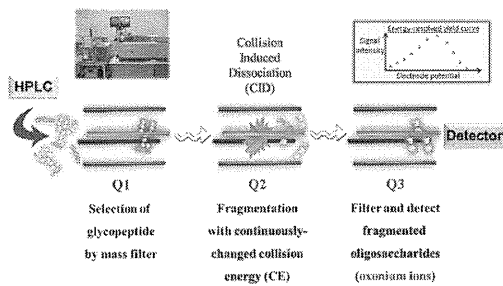


図3 Erexim法の分析機序。語句詳細は本文参照。

衝突エネルギー依存崩壊パターンが異なることが分かる。本技術を使用し、質量、HPLCからの溶出時間、さらにErexim曲線のパターンの3種パラメータを組み合わせることで、最終的に50種類ものN型糖鎖構造を既存抗体医薬品から検出、定量することに成功した。

衝突エネルギースキャンと共に重要な発見であったのが、 $m/z = 138$ の質量を持つ特殊なオキソニウムイオンの定量特性である。このイオンは全てのN型糖鎖が持つ、ペプチド結合部位に存在するN-アセチルグルコサミン残基に由来すると考えられ、いかなる構造の糖鎖が付加されていようと、このオキソニウムイオンの生成量を最大とする衝突エネルギーは糖ペプチド全体の質量に比例し(図5)、かつその時の $m/z = 138$ イオンの生成量は糖鎖の構造に関わらず元の糖ペプチドのモル量に比例する(図6)。

従前の質量分析を用いた糖鎖定量分析には多くの報告があるが、必ず障壁となるのは糖鎖構造依存的なイオン化効率の変化であった。すなわち、付加している糖鎖構造が違えば、糖ペプチドのイオン化効率が

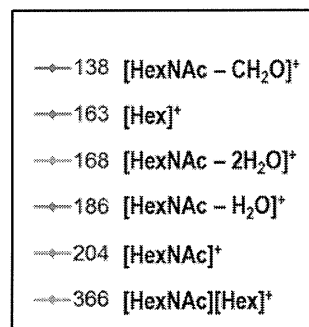
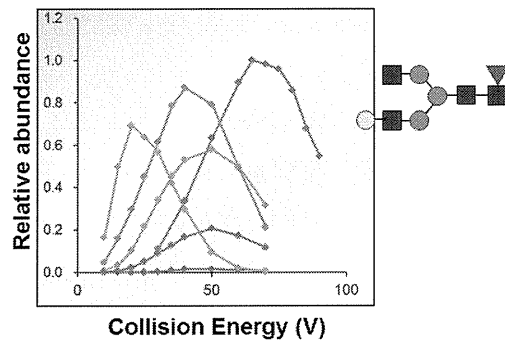
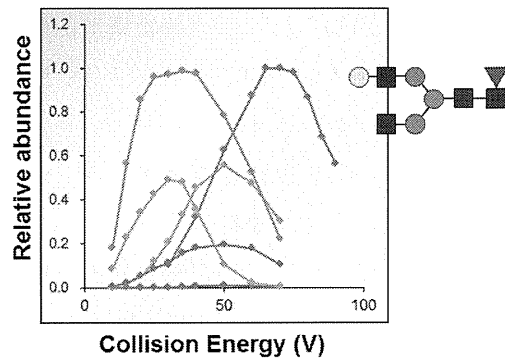
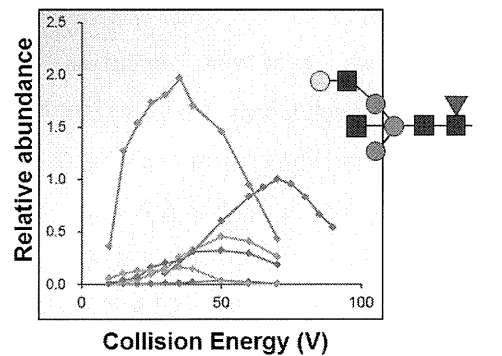


図4 3つの質量が等しい構造異性体のErexim曲線。ペプチド部分は表記省略しているがヒトIgG由来の共通配列。

変わってしまうために元の糖ペプチドモル比を反映した糖鎖構造含有率を求めることが不可能であった。これに対し、 $m/z = 138$ イオンの生成量を常に最大化する衝突エネルギーで定量を行う本手法は、酸性糖鎖、中性糖鎖など関係なく精密な相対定量が可能となった。また、図 6 が示すように、検出限界は 30 attomole、ダイナミックレンジは 4 桁を超え、感度、定量レンジ共に十分な性能を有していることも証明することが出来た。

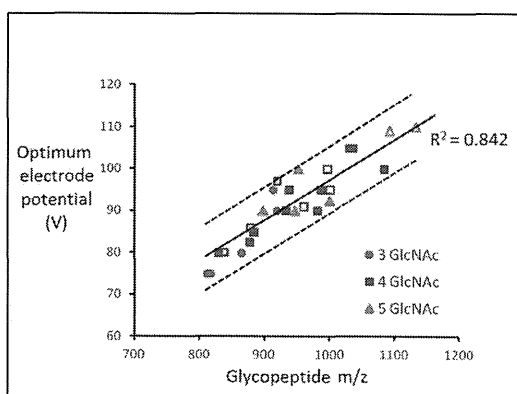


図 5 $m/z = 138$ オキシニウムイオンによる糖鎖構造非依存的定量。

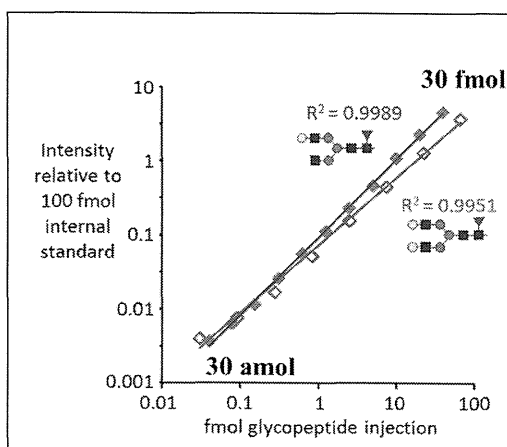


図 6 Erexim 法による糖ペプチド検出感度と定量性の評価。糖鎖構造非依存的に 4 桁以上の定量直線性を示す。

複数の糖タンパク質サンプルで Erexim 法の有効性を評価するため、市販薬である Trastuzumab (ハーセプチン)、Bevacizumab (アバスタチン) の糖鎖構造プロファイルを取得した。本解析では 4 つの異なる製造ロットをそれぞれ 4 バイアルずつ分析に用いた。Erexim 解析の結果、それぞれの抗体医薬品から 49 種類の N 型糖鎖が検出され、興味深いことに同一薬であるにも関わらず、糖鎖構造は製造ロット間で有意に変動していることが明らかになった (図 7)。本結果は新規開発技術の定量信頼性、網羅性を証明しているだけでなく、分析対象とした抗体医薬品の薬効や安全性に関する品質評価法にも追加試験の余地があることを意味している。

さらに、今回の解析では Trastuzumab 上に非ヒト型糖鎖構造である N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) を含んだ糖鎖構造が複数検出された (図 8)。N-グリコシルノイラミン酸は脊椎動物の中でヒトと一部の鳥類のみ持たない酸性糖であるため、これを含む糖タンパク質はヒトの体内で免疫原性を持つ危険がある。全 Trastuzumab 分子中、N-グリコシルノイラミン酸含有糖鎖を持つ分子は合計 0.4% に過ぎなかったが、非ヒト型糖鎖構造を持つモノクローナル抗体が薬品に少量でも含まれているという事実は医薬品の安全性を考える上で大変重要な知見であると言える。その他、非ヒト型糖鎖構造としては、Gal (α -1, 3) Gal 構造を含む糖鎖が両抗体医薬品から検出されている。

以上より、Erexim 法は非常に微量なサンプルから、頻度のごく低い糖鎖構造まで網羅的に定量化できる技術であると証明で

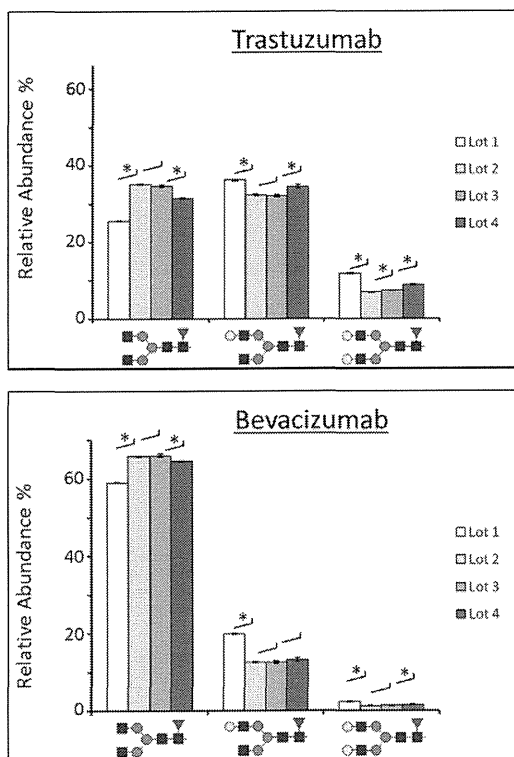


図7 Trastuzumab、Bevacizumab のロット間糖鎖品質安定性試験。代表的な3種の糖鎖構造付加頻度を示す。*: $p < 0.05$ (t検定)。Error bars: 標準誤差 (n = 4)。

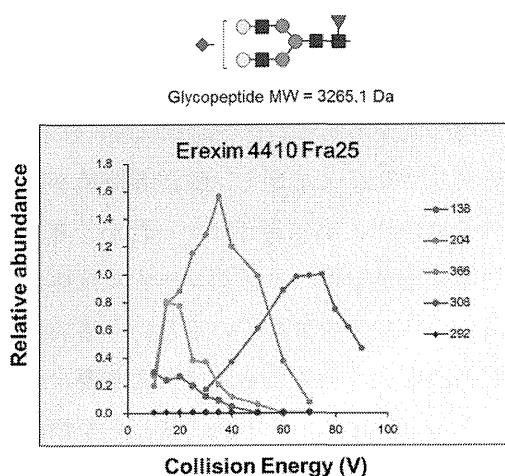


図8 Trastuzumab 上 Neu5Gc 含有糖鎖を示す観測データ。m/z = 308 が Neu5Gc 特異的なオキシニウムイオン。

きた。簡便な前処理と分析の高速性も加えて、癌化に伴う微細な糖鎖構造の変化を再現性良く定量化する技法として大変有効な技術が構築できたと言える。

(2) 肺癌糖鎖標的マーカー候補分子のErexim法による多検体検証試験

前項で開発した Erexim 法を駆使して、肺癌患者血清中にてコアフコースの付加頻度が有意に亢進している糖タンパク質として過去に同定した Haptoglobin、Orosomucoid-1、CD163 について、87 症例から成る検証試験セットを用いて糖鎖構造変化を定量化した。

実際にヒト血清タンパク質の消化物から肺癌糖鎖標的マーカー候補分子である CD163 上の糖鎖構造存在比を定量化したものが図9である。1箇所の糖鎖付加部位に43種類もの糖鎖構造が確認され、最も付加頻度が少ない糖鎖構造では存在率0.00978%まで検出が可能であったことから、定量ダイナミックレンジは4桁以上であると言える。

ここで検出された43種類の糖鎖構造のうち、コアフコースが付加された糖鎖構造の割合を求め、87症例間で比較試験を行った。その結果、図10に示すような病理群間の糖鎖付加変動が検出された。Haptoglobin については付加された2本の糖鎖ともにIII期以上の進行肺腺癌群で有意なタンパク質上フコシル化の亢進が検出された。

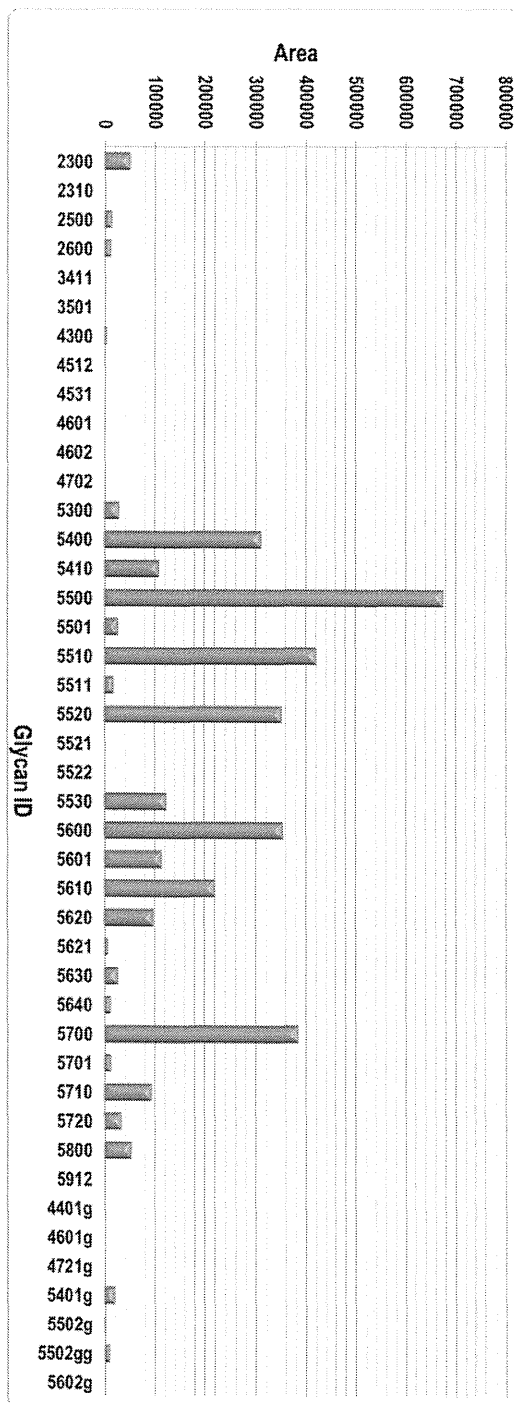


図9 m/z = 138 オキシニウムイオンによる糖鎖構造非依存的定量。4桁の Glycan ID は1桁目からそれぞれ [N-アセチルグルコサミン]、[マンノースまたはガラクトース]、[フコース]、[シアル酸] の付加個数を表す。

Orosomuroid-1 に関しては 5 箇所の糖鎖付加部位について糖鎖構造の定量データが得られたものの、肺腺癌の早期診断に有効と考えられるフコシル化変動は確認できなかった。CD163-Asn105、Asn140、Asn1027 上糖鎖については、II 期以上の肺腺癌患者でコアフコース付加頻度の有意な亢進が観察され、かつ病期依存的な付加頻度上昇が認められた。

D. 考察

従来の糖鎖解析技術では血清から目的の糖タンパク質を単離し、さらに糖鎖を酵素的に切断、最終的に多段階 HPLC か MALDI-TOF 型質量分析装置にて糖鎖構造の検証を行うしかなく、多症例の分析は到底不可能であったが、本開発技術で初めて糖鎖マーカーの多検体検証試験が可能となった。また、従来法の MALDI-TOF 型質量分析装置を用いた手法ではダイナミックレンジが 2 桁未満であったため、同レンジが 4 桁を超える Erexim 法は劇的な検出感度、定量性の向上を達成したと言える。

3 年計画の最終年度である本年度までに、本研究開始時に予定していた (1) 新規糖鎖構造変動高速定量技術の開発、および (2) それを使用した既同定の肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子の多検体検証試験、の双方を完了することができた。さらに、本研究計画終了後に予定していた体外診断機器開発に向けたソフトウェア開発、質量分析計開発も民間企業と連携してすでに開始しており、Erexim 法自体は抗体医薬品をはじめとするあらゆるバイオ医薬品の

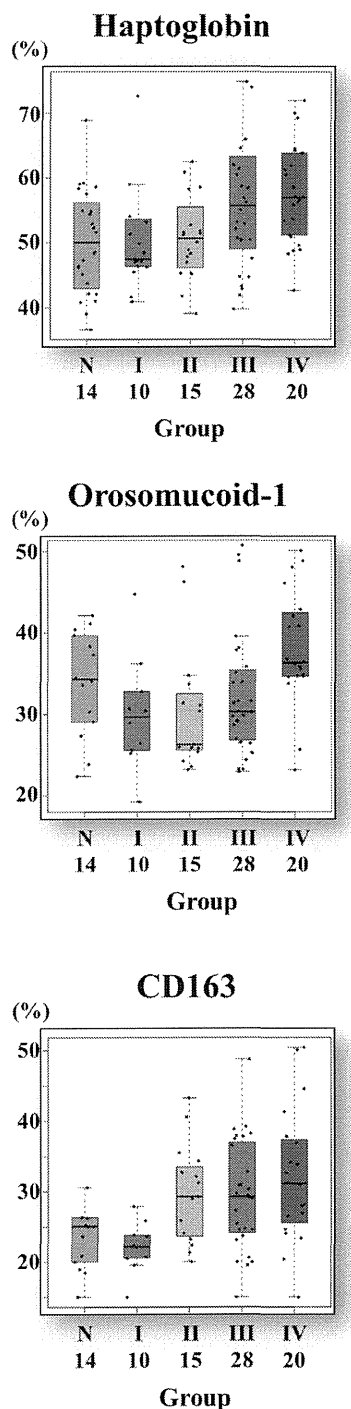


図 10 87 症例を使用した肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子 3 種に対する検証試験。縦軸：コアフコシル化頻度。横軸：病理群と症例数。N：健常者、I～IV：肺腺癌ステージ I～IV。

品質評価試験、開発支援受託事業として実用化と普及が進んでいる。以上の進捗状況から鑑みて、当初想定された成果以上の診断薬化研究としての進展と幅広い医薬分野への波及効果が得られたと言える。

E. 結論

今後は本年度の検証試験で新規肺腺癌早期診断マーカーとして決定した CD163 タンパク質について、Erexim 法を応用した質量分析診断技術による体外診断薬化を目指す。質量分析技術の診断応用は、2013 年 8 月に病原微生物の一斉診断法として FDA の認可を受けた VITEK MS をはじめ、今後急速に進展していくことが予想される。これは 200 種類以上の菌種を 1 分析で検出できる VITEK MS 法に代表されるように、最新の質量分析装置では数十～数百の生体物質を短時間で同時定量することが可能になったことによる。

Erexim 法は世界初のマルチサイト（複数の糖鎖付加部位）糖鎖構造一斉定量技術であるので、CD163 以外にも検証試験を進める肺癌早期診断バイオマーカー候補から診断能の高いターゲットをできるだけ多く選出し、より高精度で多角的な肺癌の診断が可能な診断機器製造を目指す。検査項目が増えても質量分析に要する時間は 20 分程度であり、かつ抗体など高価な検査試薬は必要としないので大変安価でもある。最終的に非侵襲的で安価に行える血清診断にて初期肺癌の検出やリスク診断までもが可能になれば、肺癌による死亡率は劇的に改善されると期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperonin complex formation.

G. Toyokawa, M. Yoshimatsu, M. Nakakido, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, H. S. Cho, K. Ueda, Y. Maehara, Y. Nakamura, and R. Hamamoto
Cancer letters
2014, in press.

2. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.

T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, K. Ueda, and Y. Nakamura
International journal of oncology
2014; 45 (1); 147-56.

3. Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6).

M. Unoki, A. Masuda, N. Dohmae, K. Arita, M. Yoshimatsu, Y. Iwai, Y. Fukui, K. Ueda, R. Hamamoto, M. Shirakawa, H. Sasaki, and Y. Nakamura
The Journal of biological chemistry
2013; 288 (9); 6053-62.

4. Plasma Low-Molecular-Weight

Proteome Profiling Identified Neuropeptide-Y as a Prostate Cancer Biomarker Polypeptide.

K. Ueda, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Toyama, K. Tamura, M. Furihata, R. Takata, S. Akamatsu, M. Igarashi, M. Nakayama, T. A. Sato, O. Ogawa, T. Fujioka, T. Shuin, Y. Nakamura, and H. Nakagawa
Journal of proteome research
2013; 12 (10); 4497-4506.

5. Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.

K. Ueda
Proteomics Clin Appl
2013; 7 (9-10); 607-617.

6. The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination.

M. Kogure, M. Takawa, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, K. Ueda, R. Ibrahim, T. Tsunoda, M. Sugiyama, Y. Atomi, Y. Nakamura, and R. Hamamoto
Neoplasia
2013; 15 (11); 1251-61.

7. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell

leukemia.

M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Utsunomiya, Y. Nakamura, H. Nakagawa, Y. Yamano, and K. Ueda
Blood
2013; 121 (21); 4340-7.

8. Quantitative structural characterization of local N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies by energy-resolved oxonium ion monitoring.

A. Toyama, H. Nakagawa, K. Matsuda, T. A. Sato, Y. Nakamura, and K. Ueda
Analytical chemistry
2012; 84 (22); 9655-62.

9. Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway.

C. Tanikawa, M. Espinosa, A. Suzuki, K. Masuda, K. Yamamoto, E. Tsuchiya, K. Ueda, Y. Daigo, Y. Nakamura, and K. Matsuda
Nature communications
2012; 3; 676.

10. Histone lysine methyltransferase SETD8 promotes carcinogenesis by deregulating PCNA expression.

M. Takawa, H. S. Cho, S. Hayami, G. Toyokawa, M. Kogure, Y. Yamane, Y. Iwai, K. Maejima, K. Ueda, A. Masuda, N. Dohmae, H. I. Field, T. Tsunoda, T. Kobayashi, T. Akasu, M. Sugiyama, S. Ohnuma, Y. Atomi, B. A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto
Cancer research
2012; 72 (13); 3217-27.

11. Identification of a novel oncogene, MMS22L, involved in lung and esophageal carcinogenesis.

M. H. Nguyen, K. Ueda, Y. Nakamura, and Y. Daigo
International journal of oncology
2012; 41 (4); 1285-96.

12. Critical function for nuclear envelope protein TMEM209 in human pulmonary carcinogenesis.

T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, K. Ueda, and Y. Nakamura
Cancer research
2012; 72 (16); 4110-8.

13. Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer.

S. Chung, H. Suzuki, T. Miyamoto, N. Takamatsu, A. Tatsuguchi, K. Ueda, K.

Kijima, Y. Nakamura, and Y. Matsuo
Oncotarget
2012; 3 (12); 1629-40.

14. A comprehensive peptidome profiling technology for the identification of early detection biomarkers for lung adenocarcinoma.

K. Ueda, N. Saichi, S. Takami, D. Kang, A. Toyama, Y. Daigo, N. Ishikawa, N. Kohno, K. Tamura, T. Shuin, M. Nakayama, T. A. Sato, Y. Nakamura, and H. Nakagawa
PLoS One
2011; 6 (4); e18567.

15. Deglycosylation and label-free quantitative LC-MALDI MS applied to efficient serum biomarker discovery of lung cancer.

A. Toyama, H. Nakagawa, K. Matsuda, N. Ishikawa, N. Kohno, Y. Daigo, T. A. Sato, Y. Nakamura, and K. Ueda
Proteome Sci
2011; 9; 18.

16. C12orf48, termed PARP-1 binding protein, enhances poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity and protects pancreatic cancer cells from DNA damage.

L. Piao, H. Nakagawa, K. Ueda, S. Chung, K. Kashiwaya, H. Eguchi, H. Ohigashi, O.

Ishikawa, Y. Daigo, K. Matsuda, and Y. Nakamura
Genes Chromosomes Cancer
2011; 50 (1); 13-24.

2. 学会発表 国際会議

1. Proteome-wide Profiling of Serum Exosomes Identified CD91 as an Exosomal Biomarker For Lung Adenocarcinoma.

K. Ueda
ISEV Workshop On EV Proteomics and Lipidomics
2014; Feb. 3 (Melbourne, Australia).

2. Current State of Early Detection Biomarker Development for Cancer in Japan.

K. Ueda
US-Japan Joint Meeting on Biomarkers for Early Cancer Detection
2014; Feb. 10 (NIH, Bethesda, MD).

3. Development of glycoproteomic technologies and identification of glycan-targeting tumor markers.

K. Ueda
HUPO 2013, 12th World Congress
2013; Sep. 18 (Yokohama).

4. Evaluating the biosimilars: Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring (Erexim) technology for the analysis of N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies.
K. Ueda, A. Toyama, T.A. Sato, Y. Nakamura, and H. Nakagawa
HUPO 2012, 11th World Congress 2012; Sep. 11 (Boston, MA).
5. A focused proteomics technology QUEST-MS identified a novel plasma prostate cancer biomarker polypeptide complementing PSA test.
K. Ueda, A. Tatsuguchi, K. Tamura, T. Shuin, T.A. Sato, M. Nakayama, Y. Nakamura, and H. Nakagawa
American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012 2012; Mar. 31 (Chicago, IL).
6. Quantitative proteome profiling of cerebrospinal fluid to identify potential diagnostic markers for human T-cell leukemia virus type 1 associated myelopathy. .
M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, Y. Yamano, Y. Nakamura, H. Nakagawa, and K. Ueda
HUPO 2012, 11th World Congress 2012; Sep. 11 (Boston, MA).
7. Quantitative proteome profiling of CD4+CD25+CCR4+ T-cells to identify potential therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL) and Human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy (HAM)
M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Utsunomiya, Y. Yamano, Y. Nakamura, H. Nakagawa, and K. Ueda
American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012 2012; Mar. 31 (Chicago, IL).
8. Carbohydrate-targeting biomarker discovery for pancreatic cancer by integrating label-free quantification and Isotopic Glycosidase Elution and labeling on Lectin-column chromatography (IGEL).
K. Ueda, N. Senkoji, A. Ohsawa, H. Takahashi, O. Ishikawa, S. Hirano, H. Yamaue, N. Mizuno, K. Yamao, K. Hanada, T. A. Sato, M. Nakayama, Y. Nakamura, and H. Nakagawa
HUPO 2011, 10th World Congress 2011; Sep. 6 (Geneva, Swiss).
9. Glycoproteomic profiling technology IGEL allowed viewing quantitative human serum glycome, leading to identification of early stage pancreatic cancer biomarkers.
K. Ueda, H. Nakagawa, N. Saichi, A. Ohsawa, H. Takahashi, O. Ishikawa, S.

Hirano, H. Yamaue, M. Mizuno, K. Yamao,
K. Hanada, M. Nakayama, T. A. Sato, and
Y. Nakamura

American Association for Cancer
Research, 102nd Annual Meeting 2011
2011; Apr. 3 (Orlando, Florida).

10. Proteomic profiling of HTLV-1
infected T-cells for the Identification
of potential biomarkers and therapeutic
targets for HTLV-1 associated
myelopathy/ tropical spastic
paraparesis and adult T-cell leukemia.

K. Ueda, M. Ishihara, A. Ohsawa, N.
Senkoji, N. Araya, T. Sato, A.
Utsunomiya, Y. Yamano, Y. Nakamura, and
H. Nakagawa

The 15th International Conference on
Human Retrovirology: HTLV and Related
Viruses

2011; June. 7 (Leuven, Belgium).

国内会議

1. がんの早期発見に挑む質量分析
計.

K. Ueda

よこはまサイエンスカフェ 2014

2014; Jan. 19 (横浜市立中央図書館).

2. 癌化に伴う血中エクソソームタン
パク質の質的量的変化.

K. Ueda

第 36 回日本分子生物学会

2013; Dec. 5 (Yokohama, Japan).

3. 質量分析が明らかにする癌特異的
エクソソーム表面抗原.

K. Ueda

Exosomes as Diagnostic Markers in Cancer
(株式会社ダイアログセミナー)

2013; Nov. 25 (品川).

4. Erexim 法を用いた抗体医薬品糖
鎖構造の高速定量評価.

K. Ueda

BioJapan 2013

2013; Oct. 11 (Yokohama, Japan).

5. 大規模サンプル解析のための最先
端プロテオーム情報処理基盤.

K. Ueda

第 86 回日本生化学会

2013; Sep. 13 (Yokohama, Japan).

6. Proteomic Identification of
Tumor-derived Exosome Biomarkers.

K. Ueda

第 72 回日本癌学会学術総会

2013; Oct. 3 (Yokohama, Japan).

7. Development of pancreatic
cancer biomarkers by focused proteomics

- technologies.
- K. Ueda
第 71 回日本癌学会学術総会
2012; Sep. 20 (Sapporo, Japan).
8. 最先端プロテオミクスによる HTLV-1 関連疾患バイオマーカーの探索.
K. Ueda
第 33 回 日本臨床薬理学会学術総会
2012; Nov. 31 (Okinawa, Japan).
9. 血中エクソソーム腫瘍マーカー探索のためのプロテオミクス.
K. Ueda
第 3 回 癌研セミナー
2012; Oct. 22 (Tokyo, Japan).
10. 新規肺癌早期診断マーカー同定のための血中エクソソーム定量プロテオームプロファイリング.
K. Ueda
第 4 回 RNAi 研究会
2012; Sep. 1 (Hiroshima, Japan).
11. A focused proteomics technology QUEST-MS identified a novel plasma prostate cancer biomarker polypeptide complementing PSA test.
K. Ueda
第 10 回 日本ヒトプロテオーム学会 2012 年大会
2012; Jul. 26 (Tokyo, Japan).
12. Erexim 法を用いた抗体医薬糖鎖構造の高速定量評価.
K. Ueda
第 10 回 日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム
2012; Nov. 30 (Tokyo, Japan).
13. 脳脊髄液プロテオームプロファイリングによる HAM/TSP 重症度指針マーカーの同定.
M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, Y. Yamano, Y. Nakamura, H. Nakagawa, and K. Ueda
2012 年 HTLV-1 研究会
2012; Aug. 26 (Tokyo, Japan).
14. Quantitative proteome profiling to identify biomarkers for Human T-lymphotropic virus type-1 associated disease.
M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Utsunomiya, Y. Yamano, Y. Nakamura, H. Nakagawa, and K. Ueda
第 71 回日本癌学会学術総会
2012; Sep. 20 (Sapporo, Japan).
15. Serum biomarker identification by quantitative focused proteomics technologies.
K. Ueda, M. Ishihara, H. Takahashi, O.

Ishikawa, S. Hirono, H. Yamaue, N. Mizuno, K. Yamao, K. Hanada, T. Kimura, M. Gotoh, N. Araya, T. Sato, A. Utsunomiya, Y. Yamano, Y. Nakamura, and H. Nakagawa
第 70 回日本癌学会学術総会
2011; Oct. 4 (Nagoya, Japan).

16. 定量フォーカストプロテオミクスを用いた新規腫瘍マーカーの開発.
K. Ueda
平成 23 年度 第 3 回 基盤研セミナー
2011; Nov. 22 (Osaka, Japan).

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

(1) 肺癌マーカー補体 C 3 d g 分子及び肺癌マーカーの分析方法
発明者：植田幸嗣、遠山敦彦、佐藤孝明
出願番号：特願 2011-201380
出願日：2011/09/15
出願国：日本
出願国：PCT(2012/3/19)

(2) ヒト T リンパ球向性ウイルス I 型関連疾患検出用ポリペプチドとその利用
発明者：植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久
出願番号：特願 2012-189318
出願日：2012/8/29
出願国：日本

(3) 糖鎖構造の解析方法
発明者：植田幸嗣、遠山敦彦
出願番号：特願 2012-197908
出願日：2012/9/7
出願国：日本

(4) 前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、および検査キット
発明者：植田幸嗣
出願番号：特願 2013-061094
出願日：2013/3/22
登録日：2013/12/13
特許第 5429725 号
出願国：日本

(5) 肺癌の検出方法および検出キット
発明者：植田幸嗣
出願番号：特願 2013-251548
出願日：2013/12/04
出願国：日本