

201407035A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 米田 悦啓

平成 27 (2015) 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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 米田 悦啓

平成 27（2015）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 -----23
朝長 毅
2. 卵巣癌におけるシスプラチン耐性克服を目指したコンパニオン診断薬開発への応用 -----35
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 -----47
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 -----53
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 -----57
山田 哲司
6. Fbxw7 の発現低下はトリプルネガティブ乳がんの予後不良と相関し、
プロパゲルマニウム治療に対するコンパニオン診断薬として有用である -----61
中山 敬一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 67

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 82

I. 総括研究報告

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。例えば分子標的薬に関しては、標的分子やその分子の下流のシグナルの遺伝子変異の有無で薬効予測をしているが、それだけでは不十分である。また、従来抗がん剤として用いられてきた化学療法剤については、コンパニオン診断薬は皆無である。

近年、特定の遺伝子変異だけで薬効予測をすることには限界があることが明らかになってきており、ゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなど多角的かつ包括的な解析によるコンパニオン診断薬の開発が必須である。特にタンパク質、その中でもキナーゼは、薬剤ターゲットの中心であり、コンパニオン診断薬の開発には、そのキナーゼの活性化状態を調べる事が重要である。さらに、薬剤耐性に関わる活性化キナーゼが同定できれば、そのキナーゼ阻害剤を用いることで薬剤耐性を克服できる可能性が生まれる。本研究では、最新のリン酸化プロテオミクス技術を活用して、キナーゼ活性化状態を網羅的に捉えることにより、薬剤感受性が予測可能な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。

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、タンパク質、その中でも薬剤の直接のターゲットであるキナーゼの活性化状態を指標とした薬剤感受性予測法（コンパニオン診断薬）の技術開発を行った。一つは、リン酸化タンパク質のハイスループット定量プロテオミクス解析法の構築で、もう一つは大規模リン酸化タンパク質定量によるキナーゼ活性予測法の開発である。

前者に関しては、まず、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、前処理法の改良を行った。具体的には、新たな溶出原理に基づくマイクロ分離手法を開発し、TMT10plex 試薬と組み合わせることで、解析のハイスループット化及び解析深度の両立を試みた。また、従来のリン酸化プロテオーム解析が苦手とするチロシンリン酸化ペプチド定量のための前処理法の改良も行った。後者に関しては、同定されたリン酸化ペプチド（基質）の情報から、キナーゼ活性を予測する手法（KSEA 法：Kinase-Substrate Enrichment Analysis）の開発を行った。

これらの基盤技術を用いて、EGFR 阻害剤であるエルロチニブに耐性・感受性の肺がん培養細胞株それぞれ 4 株、2 株にエルロチニブを添加したときのタンパク質、リン酸化タンパク質の変動および ATP 結合タンパク質の変動について解析した（重層的プロテオーム解析）。その結果、耐性株群において有意に上昇しているタンパク質の阻害剤 46 個を用いて、耐性株の細胞増殖を指標にした耐性克服スクリーニングを行った。46 種類の阻害剤のうち、24 種類の阻害剤は、少

なくとも 1 種類の耐性株において増殖阻害作用を有することを確認した。

2. 卵巣がんにおけるシスプラチン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

卵巣がんは手術技術の向上と奏功率のより高い多剤化学療法レジメンの開発等により予後が改善したが、早期診断が難しことや、抗がん剤自然耐性・獲得耐性により再発が生じるため予後不良な悪性腫瘍である。研究分担者はプロテオミクス手法を用いて、抗がん剤抵抗性である卵巣明細胞腺がん細胞株と抗がん剤感受性である漿液性腺がん細胞株におけるタンパク質発現差解析をした。その結果、明細胞腺がんで有意に高発現を示した蛋白質の 1 つとして Annexin A4(ANXA4)を同定した。ANXA4 は明細胞腺がん細胞株細胞株だけでなく卵巣明細胞腺がん腫瘍組織においても非常に高い発現を示し、ANXA4 陰性細胞株に ANXA4 を強制発現させると、プラチナ製剤に対して耐性獲得する(Kim et al, 2009 IJC)。

本研究では、ANXA4 と抗がん剤耐性との関連およびそのメカニズムを調べるために ANXA4 を発現する明細胞腺がんであり RMG-I 細胞株に shRNA を用いて ANXA4 の発現を安定的にノックダウンさせた細胞株を樹立し、プラチナ製剤の感受性を検討した結果、ANXA4 の発現抑制はシスプラチンおよびカルボプラチンに対する感受性株を有意に高めた。さらに、ANXA4 の deletion mutant 株を作成し、機能領域の解析を行った結果、アネキシンリピートを 1 つでも持っているプラチナ製剤に耐性を示す事、アネキシンリピート内のカルシウムイオン結合部位のアミノ酸を置換し、カルシウムイオン結合能を欠損させることで婦達な製剤に対する耐性が解除されたことから、ANXA4 による抗がん剤耐性にはカルシウムイオン結合能を有するアネキシンリピートが関与していることを明らかにした。シスプラチン処理時に ANXA4 が細胞膜へ移行し、クロールチャネルを制御することで細胞内塩化物イオン濃度を上昇させ、シスプラチン耐性に関与していることを明らかにした。

これらの結果より、腫瘍組織における ANXA4 高発現がシスプラチン耐性のコンパニオン診断薬となり得る可能性が示唆された。

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

分子標的治療薬を有効活用するためには、その薬効が期待される症例を選定するためのコンパニオン診断薬の開発が重要であり、分子標的治療薬の開発と両輪となっている。がんに対する分子標的治療薬のコンパニオン診断は、バイオプシーから得られた組織における標的分子の発現に基づいて判断される場合が多い。しかし、一般にバイオプシーは侵襲性が高く、経時的・頻回検査ができないなどの問題を抱えている。そのため、上記の課題を克服できるような、低侵襲なコンパニオン診断技術の開発が求められている。本観点から、当該研究では、近年、がん細胞から多く分泌されることが報告されている Exosome に着目し、肺がん発症のドライバー遺伝子の 1 つである EML4-ALK 融合遺伝子を血中から検出可能な系の確立を試みた。

本年度は、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の NCI-H2228 細胞と、その対照として EML4-ALK 陰性の NCI-H460 を用い、当該融合遺伝子の検出系の確立と、培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出を図った。その結果、NCI-H2228 細胞の培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出に成功した。今後、血液検査レベルで検出可能な感度としていく必要はあるものの、本結果は血中 Exosome から EML4-ALK 融合遺伝子の存在を検出できる可能性を示しており、これまでのバイオプシーに代わる低侵襲なコンパニオン診断薬の開発への応用が期待される。

4. 卵巣明細胞腺がん、前立腺がん及び肺腺がん薬剤効果予測マーカーの開発：平野 久

卵巣明細胞腺がん(CCA)由来の細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析により、がん抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下していることが明らかになった。また、上皮間葉移行(EMT)を利用して肺腺がん予後予測マーカー候補リン酸化タンパク質を検出することができた。

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

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 26 年度は本技術を用いて、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）の大規模なリン酸化プロファイルを解析した。一部の細胞株で MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)/ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) と mTOR (mammalian target of rapamycin)シグナル伝達経路の強い活性化が見られたが、肝細胞がん由来の細胞株では統計学的に優位に頻度が高かった。肝細胞がんにて特異的な変化と考えられ、本経路の制御が治療となることを示唆した。

6. Fbxw7 の発現低下はトリプルネガティブ乳がんの予後不良と相関し、プロパゲルマニウム治療に対するコンパニオン診断薬として有用である：中山敬一

われわれのリン酸化プロテオミクス技術によって、有名ながん抑制遺伝子産物 Fbxw7 の標的基質として Notch が同定され、さらにその転写活性化標的としてケモカイン CCL2 が同定された。転移のメカニズムは未知の部分が多く残されているが、近年転移巣の周辺環境（転移ニッチ）が転移率や転移巣の増大に大きな役割を果たしているらしいことが突き止められている。われわれは Fbxw7 が転移ニッチで低下すると、ケモカイン CCL2 の分泌が上昇し、その結果として転移ニッチが活性化して、がん転移巣が増大するというものである。本研究では、種々のがんにおいてマウスでの肺転移率を計測したところ、骨髄由来細胞の中の Fbxw7 を欠損させると、顕著に転移率が亢進することを発見した。その効果は Fbxw7 欠損による Notch 蓄積と CCL2 の過剰分泌によることが判明した。そこで CCL2 阻害効果を有する既存薬プロパゲルマニウムをマウスに投与したところ、がん転移の促進は著明に抑制された。ヒト乳がん患者の血液中の Fbxw7 を計ったところ、予後との強い相関があることがわかった。つまりヒトがんにおいて、Fbxw7 が低い患者は予後不良群であり、その転移抑制にはプロパゲルマニウムが有効であること、そしてそのコンパニオン診断薬として Fbxw7 が利用できることが示唆された。

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やその分子の下流のシグナル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。例えば、EGFR 阻害剤は KRAS 遺伝子が野生型の場合はその下流の増殖シグナルを阻害するが、変異型の場合、下流のシグナルの恒常的に活性化が起るため、薬剤耐性となると言われている。しかし実際は、KRAS 遺伝子が野生型でも ERBB や MET など複数のバイパスシグナル群により増殖シグナルが活性化されると、薬剤耐性となる。

近年、特定の遺伝子変異だけで薬効予測をすることには限界があることが明らかになってきており、多角的かつ包括的なコンパニオン診断薬の開発が必須である。そのため、ゲノミクスでは次世代シーケンサーを使った多種類の遺伝子変異解析が試みられているが、技術的、コスト的にまだ問題が多いうえ、遺伝子変異と薬剤感受性との関連性が不明なケースが多い。一方、タンパク質、その中でもキナーゼは、薬剤の直接のターゲットであり、そのキナーゼの活性化状態を調べることで、細胞内のどのシグナル経路が薬剤感受性に重要かが推測でき、有用なコンパニオン診断薬となりうる。さらに、薬剤耐性に関わる活性化キナーゼが同定できれば、そのキナーゼを標的とした阻害剤が有効な治療法になると考えられる。

本研究では、厚労科研費「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」（平成 20～24 年度）等で開発したプロテオーム技術、特に次世代質量分析計を用いた大規模リン酸化タンパク質定量法を活用して、キナーゼ活性化状態を網羅的に捉えることにより、薬剤感受性が予測可能な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。

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. リン酸化タンパク質定量のハイスループット化

リン酸化ペプチドの陽イオン交換カラムによる分離は、従来法と比較して新規溶出剤を用いた場合は、分画間の重複が少なく、結果的にリン酸化ペプチドの同定数が 10,648 個から 14,307 個に増加した。さらに TMT10plex 標識サンプルを用いた場合も同程度の同定数が得られた。

また、TMT10plex とマイクロカラムによる分離の組み合わせは、従来行っていた SILAC 法と HPLC での分離の組み合わせと較べて、必要蛋白量、前処理時間、MS 解析時間、定量可能リン酸化部位、解析コストにおいて大幅に優れており、本研究における合計 36 サンプルの重層的プロテオーム解析を実現可能にした。

これまでのプロテオーム解析は、多くのサンプルを解析しようとする、解析対象タンパク質数は少なくなってしまうというジレンマを抱えていた。本研究では、新たな溶出原理に基づくマイクロ分離手法を開発し、TMT10plex 試薬と組み合わせることで、解析のハイスループット化及び解析深度の両立を成し遂げた。このブレイクスルーは、臨床サンプルにも適用可能であり、がんにとどまらず様々な疾患のプロテオーム解析に貢献すると思われる。

2. チロシンリン酸化ペプチド同定数の向上

大腸がん培養細胞の抽出液を用い、リン酸化チロシンプロテオミクスの条件検討を行った。チロシンリン酸化ペプチドの溶出法、および質量分析計の設定をそれぞれ最適化したところ、従来のプロトコルの約 1.6 倍のチロシンリン酸化ペプチドを同定した。

チロシンキナーゼ活性が細胞のがん化に関与するという報告は多数存在する一方で、リン酸化ペプチド全体に対するその存在量の少なさ

（1%未満）から、質量分析計によるチロシンリン酸化ペプチドの網羅的な検出はこれまで困難

とされてきた。前年度構築したチロシンリン酸化ペプチド濃縮法を踏まえ、今年度はリン酸化ペプチド溶出法、質量分析計の設定を最適化することで、前年度以上の同定数を達成した。今回得られた結果はチロシンリン酸化ペプチドのみならず、その他のリン酸化ペプチドに対しても応用の可能性を秘めており、リン酸化プロテオミクス技術全般に貢献すると思われる。

3. 網羅的リン酸化プロテオミクス情報を活用したキナーゼ活性定量法（KSEA 法）の確立

既存のリン酸化プロテオミクス技術により、数万個を超えるタンパク質リン酸化修飾部位が明らかにされてきた。しかしながら、それら大量のリン酸化修飾を担うキナーゼ自体の活性を推測する事ができず、生理的に意義のあるリン酸化修飾を制御する事は難しかった。

我々が導入、改良した KSEA 法を用いる事で、リン酸化ペプチド定量値というビッグデータからのキナーゼ活性の推測が可能となった。この事は、キナーゼ活性推測値からの分子標的薬のコンパニオン診断ならびに耐性克服薬剤標的としての利用へとつながる成果である。今後、がん組織中におけるキナーゼ活性を患者ごとにプロファイリングしデータベース化することで、キナーゼ網羅的情報（Kinome）の個別化医療への応用が期待される。

4. 重層的プロテオーム解析を用いた肺癌細胞株のエロチニブ耐性克服標的の探索

非小細胞肺癌培養細胞株、PC3、PC9、A549、ABC-1、HLC-1、LK2 に EGFR 阻害剤エロチニブを暴露し、細胞増殖を調べた結果、感受性群（PC3、PC9）、耐性群（A549、ABC-1、HLC-1、LK2）に分別された。重層的プロテオーム解析データおよび活性化キナーゼを予測するインフォマティクス解析法（KSEA 法）のデータをもとに、耐性群において上昇が認められるタンパク質群およびその上流キナーゼについて、その阻害剤 46 種類を用いてスクリーニングを行った結果、24 種類の阻害剤で少なくとも 1 つの耐性株において増殖阻害効果（IC₅₀ 値 < 1 μM）が認められた。

タンパク質、リン酸化タンパク質および ATP 結合タンパク質の解析を組み合わせた重層的プ

ロテオーム解析では、各層において数十～300 個程度の感受性と耐性で有意な差を有するコンパニオンマーカー候補が得られた。これらの中から耐性に関わる（耐性克服の標的となる）因子を絞るために、阻害剤スクリーニングを行った結果、CDK、MTOR、Aurora kinase、PLK、MEK、ERK などの既知の耐性克服標的を検出することが出来た。それ以外にもこれまで標的として知られていないヒストン修飾因子も検出された。非小細胞肺癌はもっとも研究されているがんの一つであり、今回は、非小細胞肺癌をモデルとして、我々の構築した重層的プロテオーム解析のみのデータから、コンパニオンマーカーかつ耐性克服標的因子を見つけることが実証できたと言える。今後はその他のがんへの適用が期待される。

C, D-2. 卵巣がんにおけるシスプラチン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. ANXA4 ノックダウン RMG-I 細胞株の樹立

卵巣明細胞腺がんにおいて、ANXA4 を阻害することが抗がん剤感受性の増強となることを証明するため、ANXA4 の shRNA を安定発現させることで、ANXA4 を恒常的にノックダウンさせた RMG-I 細胞株を樹立した。RT-PCR 解析、ウェスタンブロット法により、RMG-I 細胞、コントロールベクター処理株（RMG-I NC7）と比較して、RMG-I-ANXA4shRNA-Y4（Y4）と RMG-I-ANXA4shRNA-R5（R5）ではタンパク質レベルで ANXA4 の発現が抑制されていることが確認された。

2. ANXA4 の発現抑制はシスプラチンとカルボプラチンの感受性を向上させる

これらの 4 つの細胞株について、シスプラチンとカルボプラチンの感受性を解析した。NC7 細胞におけるシスプラチンの IC₅₀(11.2 μM)と比較して、Y4 細胞と R5 細胞ではシスプラチンの IC₅₀ の有意な低下を認めた(Y4 ; 5.8 μM, p<0.01, R5; 5.0 μM, p<0.01)。

同様にカルボプラチンに対する IC₅₀ も NC7 細胞の(130 μM)と比較して、Y4 細胞と R5 細胞において有意な低下を認めた(Y4; 63 μM, p<0.01, R5; 60 μM, p<0.01)。ANXA4 の

発現を抑制させることでシスプラチンとカルボプラチンの IC50 はおよそ半分程度に低下することが判明した。

3. ANXA4 の発現を抑制した RMG-I 細胞は *in vivo* でもプラチナ製剤に対する感受性改善を示す

卵巣明細胞腺がんにおいて、ANXA4 の発現を抑制することが抗がん剤感受性を向上するかどうかを明らかにするため、NC7 と Y4 を ICR nu/nu マウス皮下に移植したゼノグラフトモデルを作成した。細胞を生着させた後、シスプラチンあるいは PBS を週 2 回、腹腔内投与を計 8 回行った。両者において、PBS 投与群における腫瘍の増殖速度は同程度であった。NC7 において、平均腫瘍体積は PBS 投与群で $1,233 (\pm 88.5) \text{ mm}^3$ であるのに対してシスプラチン投与群で $1,246 (\pm 243.8) \text{ mm}^3$ であり、NC7 のゼノグラフトモデルにおいて、シスプラチンによる抗腫瘍効果は認められなかった。

これに対し、Y4 ゼノグラフトモデルにおいて、平均腫瘍体積は PBS 投与群で $1,402 (\pm 126.7) \text{ mm}^3$ であるのに対してシスプラチン投与群で $176 (\pm 28.0) \text{ mm}^3$ であり、Y4 ゼノグラフトモデルにおいて *in vivo* でシスプラチンに対する抗腫瘍効果の改善が認められた。

シスプラチン投与群における 46 日目の NC7 ゼノグラフトモデルにおける計算上の腫瘍体積の減少率は $(3.0 \pm 12.5\%)$ であったのに対して、Y4 ゼノグラフトモデルの減少率は $(72.1 \pm 4.6\%)$ であった。

4. ANXA4 の各種 deletion mutant を安定発現させた NUGC3 株の樹立とプラチナ製剤感受性の解析

ANXA4 は Annexin repeat と呼ばれる 70 アミノ酸から成る配列を 4 つ含んでおり、この Annexin repeat を C 末端から 1 個ずつ削った deletion mutant を 4 つ作成した。Annexin repeat を全てもつ配列を FL、1 つ削った配列を R3、2 つ削った配列を R2、3 つ削った配列を R1 とした。これらを ANXA4 低発現細胞である胃がん細胞株の NUGC3 に遺伝子導入し、安定発現株を作成した。それぞれの細胞株に対して、deletion mutant が安定発現しているこ

とを Western Blotting 法にて確認後、シスプラチンおよびカルボプラチンの感受性を解析した。

シスプラチンの IC50 はそれぞれ NUGC3 親株、コントロール株 (NC-14) と比較して FL-22 株、R3-6 株、R2-13 株、R1-12 株において、約 1.7~2.2 倍と有意に上昇していた。また、カルボプラチンの IC50 も同様に 1.4~1.7 倍と有意に上昇しており、FL のみならず、それぞれの deletion mutant の遺伝子導入によりシスプラチンおよびカルボプラチンの IC50 が上昇しプラチナ感受性低下が誘導されることが示された。

シスプラチン暴露後の細胞内プラチナ濃度を測定したところ、シスプラチン暴露中の細胞内プラチナ濃度およびシスプラチン暴露後、シスプラチンを含まないメディウムで 3 時間培養を行った双方の条件において、コントロール株 (NC-14) と比較して FL-22 株、R3-6 株、R2-13 株、R1-12 株において細胞内プラチナ濃度が有意に低下していることが示された。

5. ANXA4 の deletion mutant である R1 に対して、カルシウムイオン結合部位に point mutation を加えたところプラチナ抵抗性が解除された

ANXA4 の deletion mutant である R1 に対して Annexin repeat のカルシウムイオン結合部位が機能を喪失させる point mutation を加えた配列を作成し、それを R1(E70A) とした。他の deletion mutant を遺伝子導入した手法と同様に NUGC3 R1(E70A)-95 株を樹立し、WB 法にて遺伝子が安定発現していることを確認した。

NUGC3 R1(E70A)-95 株を用いてシスプラチンおよびカルボプラチンの感受性を検討したところ他の deletion mutant 株と異なり、NUGC3 R1(E70A)-95 株はコントロール株 (NC-14) と比較してシスプラチンおよびカルボプラチン双方の IC50 は有意な差を認めず、カルシウムイオン結合部位が機能する R1 と比較すると有意にシスプラチンおよびカルボプラチンの IC50 は低いことが示された。

シスプラチン暴露後の細胞内プラチナ濃度を測定したところ、シスプラチン暴露中の細胞内プラチナ濃度およびシスプラチン暴露後、シスプラチンを含まないメディウムで 3 時間培養を

行った双方の条件において、コントロール株 (NC-14) と比較して R1(E70A)-95 株は細胞内プラチナ濃度に有意差を認めなかった。

6. ANXA4 の deletion mutant である R1 に対して、カルシウムイオン結合部位に point mutation を加えたところ in vivo においてもプラチナ抵抗性が解除された

In vitro の解析に用いた NUGC3 細胞株のコントロール株 (NC-14)、FL-22 株、R1-12 株、R1(E70A)-95 株を使用し、in vivo におけるプラチナ感受性を検討した。それぞれの細胞株を各細胞株 6 匹ずつの ICR ノードマウスに皮下移植を行い、PBS を 1 週間に 1 度腹腔内投与する群とシスプラチン 3mg/kg/body を 1 週間に 1 度腹腔内投与する群の合計 2 群を作成し、シスプラチン投与後 3 週間観察を行った。コントロール株 (NC-14) が $96.5 \pm 1.3\%$ 、R1(E70A)-95 株が $87.8 \pm 11.4\%$ の腫瘍増殖抑制を認めたが、FL-22 株、R1-12 株では腫瘍増殖がそれぞれ $48.5 \pm 11.7\%$ 、 $37.7 \pm 9.8\%$ であり腫瘍増殖抑制がコントロール株 (NC-14) や R1(E70A)-95 株と比較し有意に低下していた。

これらの結果は同時に、コントロール株 (NC-14) と R1(E70A)-95 株の腫瘍増殖に有意な差を認めない結果を示しており、カルシウムイオン結合部位に point mutation を加えることでプラチナ抵抗性が解除された in vitro の結果が、in vivo においても同様であったことが示された。

7. 細胞内 Cl⁻濃度の上昇は、シスプラチン耐性と関連している

ANXA4 のプラチナ耐性のメカニズムとして、シスプラチン暴露後の Cl⁻濃度が上昇しているのではないかと仮説をたて、シスプラチン暴露後の Cl⁻濃度の解析を行った。コントロール株 (NC-14)、FL-22 株、R1-12 株、R1(E70A)-95 株を使用し、シスプラチン 100 μ M を 30 分暴露したのち、MQAE の蛍光強度を測定することで細胞内の Cl⁻濃度を推察した。MQAE 蛍光強度はシスプラチン暴露前の 0 分の値と 30 分後の比を解析した。解析結果は FL-22 株 (1.12 ± 0.03)、R1-12 株 (1.12 ± 0.01) あり、コントロール株 (NC-14) (1.06 ± 0.01)、R1(E70A)-95 株

(1.06 ± 0.02) と比較して有意に高い値であった。

Cl⁻濃度とシスプラチン耐性とは関連があると報告されており、ANXA4 の deletion mutant 株ではシスプラチン暴露後の Cl⁻濃度が上昇することでプラチナ耐性が誘導されているのではないかと考えられた。また、Ca 結合部位に mutation を加え無機能化した R1(E70A)-95 株ではコントロール株と比較し有意差がなく、シスプラチン暴露後の細胞内 Cl⁻濃度の上昇と Annexin repeat に存在するカルシウムイオン結合部位との関連が示唆された。

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. モデル細胞株における EML4-ALK 融合遺伝子の検出

血中 Exosome 中で、EML4-ALK 融合遺伝子の存在を解析する系を確立するため、EML4-ALK 陽性のモデル細胞として NCI-H2228 を選択した。また、その対照として EML4-ALK 陰性のモデル細胞に NCI-H460 を用いた。まず、これら細胞における EML4-ALK 融合遺伝子の有無と検出系を確立するため、各細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により解析を試みた。その結果、NCI-H2228 細胞では、PCR サイクル数依存的に EML4-ALK 融合遺伝子が増幅されたのに対し、NCI-H460 細胞では、EML4-ALK 融合遺伝子のバンドは観察されなかった。以上の結果から、既存の報告通り、NCI-H2228 細胞は EML4-ALK 融合遺伝子陽性で、NCI-H460 細胞は陰性であることが確認された。また、EML4-ALK 融合遺伝子を検出可能な RT-PCR の条件が設定できた。

2. EML4-ALK 陽性・陰性細胞株の培養上清中 Exosome の精製と融合遺伝子の検出解析

上記の条件検討の結果をもとに、NCI-H2228 細胞と NCI-H460 細胞から分泌される Exosome 中の EML4-ALK 融合遺伝子の解析を試みた。まず、両細胞の培養上清から、超遠心法により、Exosome 画分を精製し、その特性を評価した。電子顕微鏡で観察した結果、既存の報告通り、両画分には 100 nm 前後の球状の粒子が数多く存在していた。さらに、Exosome マ

ーカーとして知られている TSG101 の発現を WB で解析したところ、両画分ともに、TSG101 の発現が確認された。これらの結果から、本手法によって Exosome が回収・精製できていることが示唆された。

そこで、両細胞から分泌された Exosome 中の EML4-ALK 融合遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。その結果、NCI-H2228 細胞から分泌された Exosome では、EML4-ALK 融合遺伝子が増幅されたのに対し、NCI-H460 細胞由来 Exosome では、バンドは検出されなかった。以上の検討から、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の細胞から分泌される Exosome には、当該融合遺伝子が含有されていることが示唆された。

3. 担がんモデルマウスの血中 Exosome からの融合遺伝子の検出解析

上記の結果から、EML4-ALK 陽性のがん細胞から分泌される Exosome を血中から回収することで、がん組織における EML4-ALK 融合遺伝子の存在を解析できる可能性が示されたため、両細胞を移植したゼノグラフトモデルマウスを作製し、血中からの当該融合遺伝子の検出を試みた。心臓より採血した血液から血漿を調製し、超遠心法により、Exosome 画分を回収した。また、Cell Free RNA の影響も解析するため、超遠心した上清も回収し、それぞれから cDNA を合成した。RT-PCR により、EML4-ALK 融合遺伝子の検出を試みた結果、NCI-H2228 細胞のゼノグラフトモデルマウスの血液から回収した Exosome 画分では EML4-ALK 融合遺伝子が増幅されたのに対し、上清画分では融合遺伝子の増幅は検出されなかった。また、NCI-H460 細胞のゼノグラフトモデルマウスの血液から回収した Exosome 画分および上清画分はいずれも当該融合遺伝子のバンドは観察されなかった。

4. 重層的プロテオーム解析を用いた肺がん細胞株のエルロチニブ耐性克服標的の探索 (図 5)

非小細胞肺がん培養細胞株、PC3、PC9、A549、ABC-1、HLC-1、LK2 に EGFR 阻害剤エルロチニブを暴露し、細胞増殖を調べた結果、感受

性群 (PC3、PC9)、耐性群 (A549、ABC-1、HLC-1、LK2) に分別された。重層のプロテオーム解析データおよび活性化キナーゼを予測するインフォマティクス解析法 (KSEA 法) のデータをもとに、耐性群において上昇が認められるタンパク質群およびその上流キナーゼについて、その阻害剤 46 種類を用いてスクリーニングを行った結果、24 種類の阻害剤で少なくとも 1 つの耐性株において増殖阻害効果 (IC50 値 < 1 μ M) が認められた。

タンパク質、リン酸化タンパク質および ATP 結合タンパク質の解析を組み合わせた重層のプロテオーム解析では、各層において数十~300 個程度の感受性と耐性で有意な差を有するコンパニオンマーカ候補が得られた。これらの中から耐性に関わる (耐性克服の標的となる) 因子を絞るために、阻害剤スクリーニングを行った結果、CDK、MTOR、Aurora kinase、PLK、MEK、ERK などの既知の耐性克服標的を検出することが出来た。それ以外にもこれまで標的として知られていないヒストン修飾因子も検出された。非小細胞肺がんはもっとも研究されているがんの一つであり、今回は、非小細胞肺がんをモデルとして、我々の構築した重層のプロテオーム解析のみのデータから、コンパニオンマーカかつ耐性克服標的の因子を見つけることが実証できたと言える。今後はその他のがんへの適用が期待される。

C, D-4. 卵巣明細胞腺がん、前立腺がん及び肺腺がん薬剤効果予測マーカーの開発 : 平野 久

1. 卵巣明細胞腺がん診断マーカーの開発

昨年度、がん抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下していることを明らかにした。この結果を基に、特異性抗体を用いた免疫沈降と三連四重極型質量分析装置を用いた MRM 法によってリン酸化及び非リン酸化ペプチドの同時定量を行ったところ、CCA では非 CCA 細胞株と比べて Brg1 のリン酸化レベルが 10%以下にまで低下していることが明らかになった。一方、CCA の症例において高頻度 (約 50%) の遺伝子変異が報告されている ARID1A については、CCA 細胞株でも同程度の頻度で欠失が見られることを免疫ブロット解析により確認した。これに対し、

ARID1A のリン酸化修飾レベルには CCA 及び非 CCA 細胞株間で有意差が見られないことが MRM 法によって確認された。これらの結果から、CCA の約半数では ARID1A の欠失が、残り半数の CCA では Brg1 のリン酸化レベル低下が生じており、このことが ARID1A・Brg1 を主要構成因子とする SWI/SNF クロマチン再構成複合体のがん抑制機能の低下を招き、CCA の悪性化を引き起こしている可能性があると考えられた。

2. 肺がんの予後予測マーカー及び治療標的候補分子の探索

TGF- β を上皮培養細胞に添加したところ、E-カドヘリンのような細胞接着因子が減少し、細胞の線維化が起こった。従って、TGF- β によって EMT が誘導されていると考えられた。

次に、TGF- β によって EMT を誘導した培養細胞と誘導していない A549 培養細胞間のタンパク質チロシンリン酸化修飾の量的変化を調べた。その結果、94 の発現変動チロシンリン酸化タンパク質を検出した。そして、特に発現が増加する 3 種類のタンパク質を見いだした。MRM 定量解析の結果、これらのタンパク質は、早期肺腺がん組織の予後良好、不良と相関して変動することが確認された。従って、これらのチロシンリン酸化タンパク質は、予後予測診断マーカーとして利用でき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

95 種の細胞株で 180 種のリン酸化タンパク質の発現を解析する大規模なシグナル伝達プロファイリングを実施することが可能であった。mTOR シグナル伝達経路は比較的多くのがん種で共通に活性化していたのに対し、MAPK シグナル伝達経路の活性化は一部の腫瘍細胞に限られることが分かった。さらに、これら 2 つのシグナル伝達経路のいずれか、あるいは両方が活性化しているのは統計学的に有意に肝細胞がん由来の細胞株で高頻度であった。

我々は昨年度までに RPPA 技術を用いて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た。このように多くのリン酸化部位特異的な抗体ライブラリーと RPPA の組み合わせで網羅的なタンパク質リン酸化解析が可能であり、コンパニオン診断薬開発にも貢献するものと考えられる。

RPPA 法は、がん細胞や組織から抽出したごく微量の試料でシグナル伝達タンパク質のリン酸化を正確に効率良く把握できる方法であるのみならず、様々なシグナル伝達経路の活性化を網羅的にプロファイリングできる優れた解析法であることが、今年度の研究によって確認された。

特定のシグナル伝達分子に注目するのではなく、シグナル伝達経路全体の活性化を解析することで、新たな治療戦略が同定されるものと期待される。さらに、症例ごとに活性化したシグナル伝達経路が明らかになれば、個別化されたがん治療に発展できる可能性がある。

C, D-6. Fbxw7 の発現低下はトリプルネガティブ乳がんの予後不良と相関し、プロパゲルマニウム治療に対するコンパニオン診断薬として有用である：中山敬一

後述するように、骨髄由来細胞の Fbxw7 量の低下ががん患者の予後不良と相関することから、われわれはヒト病態を反映するようなマウスモデルを構築した。まず骨髄細胞特異的な Fbxw7 欠損マウスを作製し、尾静脈からメラノーマ細胞 (B16F10) を移植した。その結果、コントロールマウスと比べて Fbxw7 欠損マウスでは肺転移が亢進し、がん移植後早期に死亡した。Lewis 肺がん細胞や B16F1 メラノーマ細胞移植実験でも、Fbxw7 欠損マウスでは同様の転移亢進を示した。また E0771 乳がん細胞を乳腺周囲脂肪体へ同所性移植した実験では、原発巣の大きさには影響はなかったが、Fbxw7 欠損マウスで肺への転移が著明に亢進していた。このとき、転移が検出されるタイミングに変化はなかったが、肺転移数の上昇および転移巣のがん細胞の増殖の亢進が共に観察された。

このがん転移亢進が真に骨髄由来細胞中の Fbxw7 低下による影響であるかを調べるために、Fbxw7 欠損骨髄を移植したマウスに B16F10 メラノーマ細胞を移植してみたところ、骨髄移植マウスにおいてもがん細胞の肺転移亢進がみられた。逆に、骨髄特異的 Fbxw7 欠損マウスに野生型マウスの骨髄を移植したマウスでは、がん転移の亢進は見られなかった。以上より、骨髄細胞内の Fbxw7 低下ががん転移亢進の原因であると結論付けた。

Fbxw7 はこれまで主にがん細胞の中での機能および変異が研究されてきたため、非細胞自律的な役割については何ら手がかりがなかった。そこでまず、転移巣にどのような骨髄細胞が集積しているかを調べるため、様々なマーカー抗体で転移初期における転移巣の免疫染色をおこなった。その結果、免疫抑制機能を持つことが知られる monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs) が、がんニッチに特に多く集積していることを発見した。

また、がん移植前後でのマウス血中のサイトカインの変動を調べた結果、様々な液性因子の変動がみられたが、その中から単球・マクロファージの強力な遊走因子である CCL2 が Fbxw7 欠損マウスで増加していることに注目した。CCL2 は炎症性ケモカインの 1 つであり、以前から腫瘍随伴マクロファージのリクルートを介して、がんの増殖や血管新生を促進する機能が知られていた。近年では腫瘍または宿主から分泌される CCL2 ががん転移を促進することが報告され、にわかに注目を集めている。がん移植前の時点ですでに Fbxw7 欠損マウスの血中 CCL2 濃度はコントロールマウスのそれより高く、E0771 乳がん細胞を移植したマウスではさらに上昇することを見出した。ヒト患者においても、血中 Fbxw7 mRNA 量と CCL2 タンパク質量との間に負の相関があることがわかった。

上述の 2 つの結果から、Fbxw7 欠損マウスでは CCL2 の上昇を介したがんニッチへの Mo-MDSC のリクルートが転移を促進する可能性が考えられた。この仮説を検証するため、われわれはがん移植マウスに CCL2 レセプター (CCR2) のアンタゴニストであるプロパゲルマニウムを投与を試みた。その結果、Fbxw7 欠損マウスにおけるがん転移の亢進が著明に抑制

され、また、がんニッチに集積する Mo-MDSCs の数も減少した。以上より、Fbxw7 の欠損による血中 CCL2 上昇が、Mo-MDSC の転移ニッチへのリクルートを促し、がん転移を促進させていることが明らかになった。

次に、がん転移を促進させる CCL2 の分泌源の特定を試みた。CCL2 を分泌する骨髄由来細胞として主に単球細胞と間葉系ストローマ細胞が知られているため、まず単球細胞を含む骨髄球系列特異的なノックアウトマウスを作製したが、このマウスは末梢血中の CCL2 上昇もメラノーマ移植によるがん転移亢進も示さなかった。

一方、骨髄由来間葉系ストローマ細胞 (Bone-marrow derived mesenchymal stromal cells: BMSCs) を精製すると、Fbxw7 の欠損依存的に CCL2 の転写、分泌が上昇することが確認された。この細胞とメラノーマ細胞との共移植実験をおこなうと、野生型 BMSCs との共移植に比べ、Fbxw7 欠損 BMSCs との共移植によりメラノーマ細胞の肺転移が亢進した。この転移亢進は CCL2 ノックダウンにより野生型レベルまで抑制されたことから、Fbxw7 欠損 BMSCs は CCL2 依存的に転移を亢進させると結論付けた。

Fbxw7 は SCF 型ユビキチンリガーゼの構成因子であり、Fbxw7 の欠損により基質分子の蓄積が予想される。実際に、Fbxw7 欠損 BMSCs では、既知の基質である c-Myc や Notch1 の蓄積がみられた。このうち、Notch1 の過剰発現により CCL2 の転写亢進がみられた。実際に Notch1 のコファクターである Rbp-Jκ と Fbxw7 の二重欠損マウスでは、Fbxw7 単独欠損で見られたがん転移亢進がみられなくなり、血中の CCL2 濃度もコントロールレベルまで抑制された。一方、c-Myc と Fbxw7 の二重欠損マウスでは、このような変化は見られなかった。これらの結果から、BMSCs における Fbxw7 低下は Notch1 の分解異常を引き起こし、蓄積した Notch1 が CCL2 の転写、分泌を亢進させ、Mo-MDSCs の転移ニッチへのリクルートを上昇させた結果、がん転移が亢進するというモデルを提唱した。

乳がん患者 400 名の末梢血中の Fbxw7 mRNA 量を測定したところ、Fbxw7 mRNA 量は患者によって 10,000 倍程度の差があり、予

期せぬことに、末梢血中の Fbxw7 低値群は高値群よりも有意に予後不良であることを発見した。特にトリプルネガティブ(ER-PgR-HER2-) のがん患者において、この傾向が顕著に見られた。末梢血中にはごく微量のがん細胞が存在することが知られているが、本実験に使用した末梢血サンプル中のがん細胞の頻度は約 0.003% であり、この僅かな細胞が全体の Fbxw7 mRNA 量に影響を与えているとは考えづらい。また Fbxw7 免疫染色により、末梢血 Fbxw7 量はがん細胞の Fbxw7 量よりもがんニッチ細胞（その多くが骨髄由来細胞であることが知られている）の Fbxw7 量と強い相関がみられた。このことは骨髄由来細胞内の Fbxw7 量の高低ががんの予後を規定していることを示唆している。

以上のことをまとめると、乳がん患者（特にトリプルネガティブ乳がん）において、Fbxw7 低値群は予後が悪いが、プロパゲルマニウム投与によって、それが改善することがマウス実験によって示された。一方で、Fbxw7 高値群は予後が良く、特にプロパゲルマニウム治療を要しないことが理論的に推察される。このように Fbxw7 の発現量は、プロパゲルマニウム治療に対するコンパニオン診断薬として実際に利用できることが示唆された。

プロパゲルマニウムは既に B 型肝炎治療薬として既に市販されている薬物であり（商品名：セロシオン）、約 20 年にわたってヒトに投与されてきた実績を有する。本研究の成果は、ドラッグリポジショニングとしてがん転移抑制剤としてのプロパゲルマニウムの有効性を示唆するものである。しかしプロパゲルマニウムは CCL2 の作用を抑制して転移を阻害するため、Fbxw7 低値群でしか有効性がないことが推察される。そこで患者の層別化のために Fbxw7 の発現量がコンパニオン診断薬として利用されることが予想される。今後は臨床応用を目指して、Fbxw7 測定系の開発を行っていくと共に、乳がん以外のがん種についても同じような結果が得られるかどうかを検討していく予定である。

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、プロテオーム解析の前処理法の改良により、リン酸化タンパク質解析のハイスループット化及び解析深度の両立を成し遂げた。また、リン酸化タンパク質プロテオームデータから、活性化キナーゼを予測するインフォマティクス解析法（KSEA 法）の開発を行った。さらに、非小細胞肺癌培養細胞を用いて、タンパク質、リン酸化タンパク質および ATP 結合タンパク質の解析を組み合わせた重層的プロテオーム解析により、エルロチニブ感受性マーカーおよびエルロチニブ耐性克服標的候補となる多くのキナーゼを同定することに成功した。

E-2. 卵巣がんにおけるシスプラチン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

プラチナ製剤耐性における ANXA4 の機能ドメインを解明する事に成功した。さらに、ANXA4 の発現抑制がプラチナ製剤感受性を高めることにつながることから、卵巣がん組織における ANXA4 の発現量を解析することがプラチナ製剤のコンパニオン診断薬となり得る事が示唆された。

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

低侵襲な次世代コンパニオン診断法の開発に向け、近年、がん細胞から多く分泌されることが報告されている Exosome に着目し、肺がん発症のドライバー遺伝子の 1 つである EML4-ALK 融合遺伝子を血中から検出可能な系の確立を試みた。本年度は、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の NCI-H2228 細胞と、その対照として EML4-ALK 陰性の NCI-H460 を用い、当該融合遺伝子の検出系の確立と、培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出を図った。その結果、NCI-H2228 細胞の培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出に成功した。今後、血液検査レベルで検出可能な感度を求めていく必要はあるものの、本結果は血液から EML4-ALK 融合遺伝子の存在を検出できる可能性を示しており、これまでのバイオプシーに代わる低侵襲なコンパニオン診断

薬の開発に資する知見と考えられる。

E-4. 卵巣明細胞腺がん、前立腺がん及び肺腺がん薬剤効果予測マーカーの開発：平野 久

CCA 由来の細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析により、がん抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下していることが明らかになった。今後、これらのタンパク質が診断マーカーとして利用できるかどうか検証する必要がある。

EMT を利用して肺腺がん予後予測マーカー候補チロシンリン酸化タンパク質を検出した。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

95 種のがん細胞株で、180 種の代表的なシグナル伝達タンパク質のリン酸化を解析し、統計学的な解析で肝細胞がん特異的なシグナル伝達系の活性化を見出すことが可能であった。

E-6. Fbxw7 の発現低下はトリプルネガティブ乳がんの予後不良と相関し、プロパゲルマニウム治療に対するコンパニオン診断薬として有用である：中山敬一

ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は、がんを高率に変異が見つかるがん抑制遺伝子産物であり、細胞増殖を促すタンパク質の分解を誘導する。今までその研究はがん細胞自体における役割に限られていた。今回われわれは、Fbxw7 ががん周囲の骨髄由来細胞からの CCL2 分泌を抑制し、がん転移を抑制していることを突き止めた。さらに既存薬プロパゲルマニウムが CCL2 の作用を阻害することによってがん転移を抑制すること、そして Fbxw7 の発現量がトリプルネガティブ乳がんに対するプロパゲルマニウム治療のコンパニオン診断として利用できることを実証した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Sato, M., Matsubara, T., Adachi, J., Hashimoto, Y., Kishida, M., Yang, Y., Wakefield, LM. & Tomonaga, T. Differential proteome analysis identifies TGF- β -related pro-metastatic proteins in a 4T1 murine breast cancer model. PLoS One, in press (2015).
2. Adachi, J., Kishida, M., Watanabe, S., Hashimoto, Y., Fukamizu, K. & Tomonaga, T. Proteome-wide discovery of unknown ATP-binding proteins and kinase inhibitor target proteins using an ATP Probe. J. Proteome Res. 13, 5461-70 (2014).
3. Kazami, T., Nie, H., Satoh, M., Kuga, T., Matsushita, K., Kawasaki, N., Tomonaga, T. & Nomura, F. Nuclear accumulation of annexin A2 contributes to chromosomal instability by coilin-mediated centromere damage. Oncogene, in press (2014).
4. Kubota, S., Morii, M., Yuki, R., Yamaguchi, N., Yamaguchi, H., Aoyama, K., Kuga, T., Tomonaga, T. & Yamaguchi, N. Role for tyrosine phosphorylation of A-kinase anchoring protein 8 (AKAP8) in its dissociation from chromatin and the nuclear matrix. J. Biol. Chem., in press (2015).
5. 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. & Tomonaga, T. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis. Mol. Cell. Proteomics 13, 1471-84 (2014).
6. Sano, S., Tagami, S., Hashimoto, Y., Yoshizawa-Kumagaye, K., Tsunemi, M., Okochi, M. & Tomonaga, T. Absolute quantitation of low abundance plasma APL1 β peptides at sub-fmol/mL level by

- SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J. Proteome Res.* 13, 1012-20 (2014).
7. 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 intestine by an in situ perfusion technique. *J. Lipid Res.* 55, 905-18 (2014).
 8. 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).
 9. Matsumoto, K., Ikeda, M., Matsumoto, T., Nagashio, R., Nishimori, T., Tomonaga, T., Nomura, F., Sato, Y., Kitasato, H. & Iwamura, M. Serum periplakin as a potential biomarker for urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 9927-31 (2014).
 10. Matsumoto, K., Ikeda, M., Sato, Y., Kuruma, H., Kamata, Y., Nishimori, T., Tomonaga, T., Nomura, F., Egawa, S. & Iwamura, M. Loss of periplakin expression is associated with pathological stage and cancerspecific survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Biomed. Res.* 35, 201-6 (2014).
 11. Matsushita, K., Kitamura, K., Rahmutulla, B., Tanaka, N., Ishige, T., Satoh, M., Hoshino, T., Miyagi, S., Mori, T., Itoga, S., Shimada, H., Tomonaga, T., Kito, M., Nakajima-Takagi, Y., Kubo, S., Nakaseko, C., Hatano, M., Miki, T., Matsuo, M., Fukuyo, M., Kaneda, A., Iwama, A. & Nomura, F. Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53-dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. *Oncotarget*, in press (2015).
 12. 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.* 20, 4316-28 (2014).
 13. 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 tumorassociated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int. J. Oncol.* 44, 1461-9 (2014).
 14. Tun, A.W., Chaiyarit, S., Kaewsutthi, S., Katanyoo, W., Chuenkongkaew, W., Kuwano, M., Tomonaga, T., Peerapittayamongkol, C., Thongboonkerd, V. & Lertrit, P. Profiling the mitochondrial proteome of Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) in thailand: down-regulation of bioenergetics and mitochondrial protein quality control pathways in fibroblasts with the 11778G>A mutation. *PLoS One* 9, e106779 (2014).
 15. 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* 3, e94 (2014).
16. Furukawa, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Tanemura, M., Tomimaru, Y., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Nonaka, Y., Takamatsu, S., Shinzaki, S., Kumada, T., Satomura, S., Ito, T., Serada, S., Naka, T., Mori, M., Doki, Y., Miyoshi, E. & Nagano, H. Clinico-pathological significance of leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 in sera of patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 44, 93-98 (2015).
 17. Yang, L., Fujimoto, M., Murota H., Serada, S., Fujimoto, M., Honda, H., Yamada, K., Suzuki, K., Nishikawa, A., Hosono, Y., Yoneda, Y., Takehara, K., Imura, Y., Mimori, T., Takeuchi, T., Katayama, I. & Naka, T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology (Oxford)* 54, 349-58 (2015).
 18. Kawabata, A., Serada, S., Naka, T. & Mori, Y. Human herpes- virus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J. Gen. Virol.* 95, 2769-77 (2014).
 19. Azuma, K., Serada, S., Takamatsu, S., Terao, N., Takeishi, S., Kamada, Y., Naka, T. & Miyoshi, E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glyco-proteomic analyses. *J. Proteome Res.* 13, 4869-77 (2014).
 20. Morimoto, A., Serada, S., Enomoto, T., Kim, A., Matsuzaki, S., Yokoyama, T., Takahashi, T., Ueda, Y., Yoshino, K., Fujita, M., Fujimoto, M., Kimura, T. & Naka, T. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium-dependent manner. *Oncotarget* 5, 7776-87 (2014).
 21. Kotobuki, Y., Yang, L., Serada, S., Tanemura, A., Yang, F., Nomura, S., Kudo, A., Izuhara, K., Murota, H., Fujimoto, M., Katayama, I. & Naka, T. Periostin accelerates human malignant melanoma progression by modifying the melanoma microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 630-9 (2014).
 22. 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., Takag,i 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.* 44, 1461-9 (2014).
 23. Yang, L., Murota, H., Serada, S., Fujimoto, M., Kudo, A., Naka, T. & Katayama, I. Histamine contributes to tissue remodeling via periostin expression. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2105-13 (2014).
 24. 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).
 25. 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).
 26. Ota, M., Serada, S., Naka, T. & Mori, Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles

- and released into the extracellular environment. *Microbiol. Immunol.* 58, 119-25 (2014).
27. Nagano, K., Yamashita, T., Inoue, M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y. & Tsunoda, S. Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 545-9 (2014).
 28. Nagano, K., Maeda, Y., Kanasaki, S., Watanabe, T., Yamashita, T., Inoue, M., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Abe, Y., Mukai, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers. *J. Controlled Release* 189, 72-9 (2014).
 29. Kamada, H., Taki, S., Nagano, K., Inoue, M., Ando, D., Mukai, Y., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Generation and characterization of a bispecific Diabody targeting EPH receptor A10 and CD3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 8-12 (2015).
 30. Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y. & Noda, NN. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 513-21 (2014).
 31. Imanishi, T., Ishihara, C., Badr Mel, S., Hashimoto-Tane, A., Kimura, Y., Kawai, T., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Taniguchi, S., Noda, T., Hirano, H., Brombacher, F., Barber, G. N., Akira, S. & Saito, T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat. Commun.* 5, 3566 (2014).
 32. Ino, Y., Ishikawa, A., Nomura, A., Kajiwar, H., Harada, K. & Hirano, H. Phosphoproteome analysis of *Lotus japonicus* seeds. *Proteomics* 14, 116-20 (2014).
 33. Kimura, A., Arakawa, N. & Hirano, H. Mass spectrometric analysis of the phosphorylation levels of the SWI/SNF chromatin remodeling/tumor suppressor proteins ARID1A and Brg1 in ovarian clear cell adenocarcinoma cell lines. *J. Proteome Res.* 13, 4959-69 (2014).
 34. Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., Matsuda, M., Murayama, A., Kato, T., Hirano, H., Endo, Y., Lemon, S.M., Wakita, T., Sawasaki, T. & Suzuki, T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- α in infectious virus production. *J. Virol.* 88, 7541-55 (2014).
 35. Matsunaga, S., Kawakami, S., Matsuo, I., Okayama, A., Tsukagoshi, H., Kudoh, A., Matsushima, Y., Shimizu, H., Okabe, N., Hirano, H., Yamamoto, N., Kimura, H. & Ryo, A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 for generation and characterization of monoclonal antibody. *Front Microbiol.* 5:208 (2014).
 36. Nagata, K., Kawakami, T., Kurata, Y., Kimura, Y., Sakuma, Y., Nagata, T., Miyagi, Y. & Hirano, H. Augmentation of multiple protein kinase activities associated with secondary imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors as revealed by quantitative phosphoproteome analysis. *J. Proteomics* 115, 132-42 (2014).
 37. Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Nakamura, Y., Nagashima, Y., Akimoto, K., Ryo, A. & Hirano, H. Proteomic analysis of proteins related to prognosis of lung adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* 13, 4686-94 (2014).
 38. Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H. & Ohsumi, Y. Atg13 HORMA domain

- recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 3350-5 (2014).
39. Miyanaga, A., Masuda, M., Tsuta, K., Kawasaki, K., Nakamura, Y., Sakuma, T., Hisao, H., Gemma, A. & Yamada, T. Hippo pathway gene mutations in malignant mesothelioma revealed by RNA and targeted exon sequencing. *J. Thorac. Oncol.*, in press (2015).
 40. Fukumoto, M., Kurisu, S., Yamada, T. & Takenawa, T. α -Actinin 4 enhances colorectal cancer cell invasion by suppressing focal adhesion maturation. *Plos One.*, in press (2015).
 41. Okamoto, N., Suzuki, H., Kawahara, K., Honda, K., Miura, N., Hirashima, T., Tamiya, M., Morishita, N., Shiroyama, T., Tanaka, A., Tani, E., Hamaguchi, M., Kitani, M., Yamada, T. & Kawase, I. The alternatively spliced actinin-4 variant as a prognostic marker for metastasis in small-cell lung cancer. *Anticancer Res.* 35, 1663-7 (2015).
 42. Kamita, M., Mori, T., Sakai, Y., Ito, S., Gomi, M., Miyamoto, Y., Harada, A., Niida, S., Yamada, T., Watanabe, K. & Ono, M. Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. *Proteomics*, in press (2015).
 43. Watanabe, T., Ueno, H., Watabe, Y., Hiraoka, N., Morizane, C., Itami, J., Okusaka, T., Miura, N., Kakizaki, T., Kakuya, T., Kamita, M., Tsuchida, A., Wilber, H., Yamada, T. & Honda, K. *ACTN4* copy number as a predictive biomarker for chemoradiotherapy of locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 112, 704-13 (2015).
 44. Masuda, M. & Yamada, T. Signaling pathway profiling by reverse-phase protein array for personalized cancer medicine. *Biochim Biophys Acta.* 1854, 651-657 (2015).
 45. Tanaka, N., Yamashita, T., Yamamoto, S., Matsunobu, T., Tsuda, H., Honda, K., Yamada, T., Tamai, S. & Shiotani, A. Histological growth pattern of and α -actinin-4 expression in thyroid cancer. *Anticancer Res.* 34, 3157-63 (2014).
 46. Watabe, Y., Mori, T., Yoshimoto, S., Nomura, T., Shibahara, T., Yamada, T. & Honda, K. Copy number increase of *ACTN4* is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma. *Cancer Med.* 3, 613-22 (2014).
 47. Masuda, M., Chen, WY., Miyanaga, A., Nakamura, Y., Kawasaki, K., Sakuma, T., Ono, M., Chen, CL., Honda, K. & Yamada, T. Alternative mammalian target of rapamycin (mTOR) signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 1429-38 (2014).
 48. Yamada, T. Reverse phase protein array: a tool for signaling pathway profiling in the era of genome resequencing. *Dig. Dis. Sci.* 59, 895-6 (2014).
 49. Matsukawa, S., Morita, K., Negishi, A., Harada, H., Nakajima, Y., Shimamoto, H., Tomioka, H., Tanaka, K., Ono, M., Yamada, T. & Omura, K. Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 3, 349-61 (2014).
 50. Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K. & Nakayama, K.I. F-box protein Fbxw7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner. *J. Clin. Invest.* 125, 621-35 (2015).
 51. Adachi, S., Homoto, M., Tanaka, R., Hioki, Y., Murakami, H., Suga, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Hatta, T., Iemura, S. & Natsume, T. ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway. *Nucleic Acids Res.* 42,

- 10037-49 (2014).
52. Saita, S., Shirane, M., Ishitani, T., Shimizu, N. & Nakayama, K.I. Role of the ANKMY2-FKBP38 axis in regulation of the Sonic hedgehog (Shh) signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 289, 25639-54 (2014).
 53. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K. & Nakayama, K.I. MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24. *Mol. Cell. Biol.* 34, 3321-40 (2014).
 54. Yugi, K., Kubota, H., Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., Funato, Y., Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T. & Kuroda, S. Reconstruction of insulin signal flow from phospho- proteome and metabolome data. *Cell Rep.* 8, 1171-83 (2014).
 55. Kitagawa, K., Shibata, K., Matsumoto, A., Matsumoto, M., Ohhata, T., Nakayama, K.I., Niida, H. & Kitagawa, M. Fbw7 targets GATA3 through cyclin-dependent kinase 2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* 34, 2732-44 (2014).
 56. Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Shinohara, T. Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 8826-31 (2014).
 57. Moroishi, T., Yamauchi, T., Nishiyama, M. & Nakayama, K.I. HERC2 targets the iron regulator FBXL5 for degradation and modulates iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 289, 16430-41 (2014).
 58. Matsumoto, A., Takeishi, S. & Nakayama, K.I. p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. *Blood* 123, 3429-39 (2014).
 59. Hashiguchi, T., Oyamada, A., Sakuraba, K., Shimoda, K., Nakayama, K.I., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y. & Yamada, H. Tyk2-dependent bystander activation of conventional and nonconventional Th1 cell subsets contributes to innate host defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 192, 4739-47 (2014).
 60. 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.* 289, 12946-61 (2014).
- G-2. 著書・総説**
1. 木村 鮎子, 平野 久 「9 章. 疾患研究における翻訳後修飾の解析」医学のあゆみ 251, 「疾患研究に応用されるプロテオーム解析」医歯薬出版, 東京, 2014.
- G-3. 学会発表**
1. 朝長 毅: 質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の医療への応用 第 10 回日本臨床プロテオーム研究会、東京、2014 年 5 月 10 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 (医療への応用) 第 14 回日本蛋白質科学会、神奈川、2014 年 6 月 25 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創薬への応用を目指して 第 12 回日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月 17 日.
 4. 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 (医療への応用) レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会、宮崎、2014 年 8 月 22 日.
 5. 朝長 毅: 定量プロテオミクスの医療への応用 第 150 回 質量分析関西談話会、大阪、2015 年 3 月 14 日.
 6. Tomonaga, T.: Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by