

- membrane proteomic analysis of human tissue samples and subsequent verification using SRM/MRM The 13th HUPO World Congress Post Congress Workshop, Segovia, Spain, 9 September, 2014.
7. 原 康洋、佐野聖三、橋本祐希、川崎直子、平野賢一、鈴木 朗、山口知是、朝長 毅: ATGL ノックアウトマウス心筋のプロテオーム解析. 第 12 日本プロテオーム学会, つくば, 2014 年 7 月 17 日-18 日.
  8. 足立 淳、橋口一成、佐藤三佐子、橋本裕希、深水和菜、朝長 毅: StageTip を用いた新規分画法により、プロテオーム解析・リン酸化プロテオーム解析の深さと簡易性の両立を図る. 日本プロテオーム学会 2014 年会, つくば, 2014 年 7 月 17 日-18 日.
  9. 村岡 賢、佐藤彩子、久米秀明、橋口一成、足立 淳、橋本裕希、深水和菜、朝長 毅: スキルス胃癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2014 年会, つくば, 2014 年 7 月 17 日-18 日.
  10. 松下一之、佐藤守、朝長 毅、野村文夫: Interactions between SF3b1(SAP155) and FUSE-binding protein-interacting repressor (FIR) coordinates c-Myc and P27Kip1 expression revealed by GeLC-MS analysis. 日本プロテオーム学会 2014 年会, つくば, 2014 年 7 月 17 日-18 日.
  11. 久米秀明、橋本裕希、村岡 賢、松原久裕、朝長 毅: 血中膜小胞画分のプロテオーム解析による大腸癌バイオマーカータンパク質の探索. 日本プロテオーム学会 2014 年会, つくば, 2014 年 7 月 17 日-18 日.
  12. Adachi, J. & Tomonaga, T.: Kinome and ATPome-wide selectivity profiling of ATP-competitive kinase inhibitors 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014 年 9 月 25-27 日.
  13. 村岡 賢、久米秀明、橋口一成、足立 淳、朝長 毅: Large-scale membrane proteome analysis in scirrhous gastric cancer cell. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014 年 9 月 25-27 日.
  14. 松下一之、北村浩一、バハテヤリ ラヒムトラ、星野忠次、岩間厚志、島田英昭、朝長 毅、久保秀司、野村文夫: 急性 T 細胞性白血病発症における c-myc 遺伝子転写抑制因子 FIR のスプライシングの意義. 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014 年 9 月 25-27 日.
  15. 久保田翔、森井真理子、青山和正、幸龍三郎、山口弘美、久家貴寿、朝長 毅、山口憲孝、山口直人: AKAP8 のチロシンリン酸化を介したクロマチンとの結合阻害. 第 37 回日本分子生物学会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日.
  16. 風見隆浩、朝長 毅、川崎直子、佐藤守、久家貴寿、松下一之、野村文夫: Annexin A2 の核内蓄積は coilin を介したセントロメア損傷によって染色体不安定性に関与する. 第 37 回日本分子生物学会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日.
  17. 福留久美子、阿部雄一、本庄雅則、藤木幸夫: D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) の細胞内局在異常による細胞毒性. 第 37 回日本分子生物学会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日.
  18. 阿部雄一、土方誠、朝長 毅: リン酸化プロテオミクス解析による C 型肝炎ウイルス増殖に重要なウイルスタンパク質リン酸化修飾の網羅的探索. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.
  19. Hara, Y., Sano, S., Hashimoto, Y., Kawasaki, N., Suzuki, A., Yamaguchi, S., Hirano, K. & Tomonaga, T.: Quantitative proteomic analysis of hearts from adipose triglyceride lipase knockout mice. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyo-vasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease, Tokyo, Japan, 14 March, 2015.
  20. Tomonaga, T. & Kume, H.: Identification of predictive biomarker candidates of colorectal cancer metastasis in serum extracellular vesicles based on membrane quantitative proteomics of cancer tissues. Australasia Extracellular Vesicles Conference, Kerns, Australia, 20 November, 2014.

21. Tomonaga, T. & Kume, H.: Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring. Human Proteome Organization (HUPO) 13th Annual World Congress, Madrid, Spain, October 5-8, 2014.
22. Adachi, J., Hashiguchi, K., Sato, M., Fukamizu, K. & Tomonaga, T.: Simplified and minimized fractionation using StageTips for in-depth proteome and phosphoproteome analysis. Human Proteome Organization (HUPO) 13th Annual World Congress, Madrid, Spain, October 5-8, 2014.
23. Takahashi Y., Fujimoto, M., Serada, S. & Naka, T.: Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a potential disease activity marker under IL-6 suppression in autoimmune arthritis. ACR/ARHP Annual Meeting, November 14-19, Convention & Exhibition Center, Boston, Massachusetts, Boston, 2014.
24. Takemoto, N., Matsumoto, T., Serada, S., Fujimoto, M. & Naka, T.: Leucine-rich  $\alpha 2$  glycoprotein promotes TGF $\beta$ 1- induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines. ICIS annual meeting, October 26-29, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, 2014.
25. Ohkawara, T., Fujimoto, M., Serada, S. & Naka, T.: Measurement of serum leucine-rich alfa-2 glycoprotein, a novel disease activity biomarker in rheumatoid arthritis for the detection of biologic-associated tuberculosis. EULAR2014, Paris, June 11-14, 2014.
26. Nagano, K., Kanasaki, S., Kamada, H., Yamashita, T., Mukai, Y., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S.: Function of tumor cell-derived exosomes during angiogenesis. 第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 熊本(熊本), 2014年11月.
27. 藤本龍洋, 及川 優, 木村弥生, 平野 久, 山本 林, 大隅良典: 出芽酵母を用いたオートファゴソーム膜のプロテオーム解析, 日本分子生物学会, 2014. 11. 25-27.
28. 生駒桂子, 倉田洋一, 井野洋子, 木村弥生, 小野知二, 村越倫明, 杉山圭吉, 平野 久, 西野輔翼: プロテオミクスを活用した脂肪細胞におけるラクトフェリン結合タンパク質の同定, 日本プロテオーム学会, 2014 年会 2014. 7. 17-18.
29. 生駒桂子, 倉田洋一, 井野洋子, 木村弥生, 小野知二, 村越倫明, 杉山圭吉, 平野 久, 西野輔翼: ラクトフェリンの脂肪分解促進作用に関与する脂肪細胞表層局在タンパク質の同定, 日本ラクトフェリン学会, 2014. 11. 8.
30. 石川智弘, 木村弥生, 平野 久, 東 昌市: MMP-7により切断修飾を受ける細胞表層タンパク質の同定, 日本病態プロテアーゼ学会, 2014. 8. 8-9.
31. 平野 久: 分析技術の発達により見えてきた翻訳後修飾異常と疾患 日本医用マススペクトル学会, 2014. 10. 16-17.
32. 平野 久: トランスレーショナルリサーチと産学連携, International Symposium for Life Design and Engineering, パシフィコ横浜, 2014. 3. 7.
33. 平野 久: イノベーション創出をめざすプロテオミクスのこれから, 新潟大学第9回 頭脳循環プロジェクト・シンポジウム「生体試料のマイクロプロテオミクス研究基盤の確立による疾患の病因・病態の解明」 新潟大学, 2014.3.31.
34. 平野 久: タンパク質翻訳後修飾の網羅的な解析とその役割, 第14回 日本蛋白質科学会 年会, 横浜産業貿易センター, 2014.6.25.
35. Hirano, H., Okayama, A., Masuishi, Y., Ino, Y., Kimura, A., Kimura, Y., Arakawa, N. & Toda, T.: Recent advance in clinical proteomics of protein post-translational modifications. 7th Asia and Oceania Human Proteome Organization Congress, Bangkok, 2014. 8. 6-8.
36. 木村鮎子, 荒川憲昭, 平野 久: MRM 法による卵巣明細胞腺癌細胞株特異的な SWI/SNF

- クロマチン再構成複合体因子 Brg1 のリン酸化レベル低下の解析, 日本ヒトプロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
37. 木村鮎子, 荒川憲昭, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌細胞株特異的なクロマチン再構成因子 Brg1 のリン酸化レベル低下, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014. 11. 25-27.
  38. 木村弥生: 質量分析装置を用いた翻訳後修飾解析, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
  39. 増石有佑, 木村弥生, 平野 久: GPI アンカー型 タンパク質の網羅的解析法の開発, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
  40. Masuishi, Y., Kimura, Y. & Hirano, H.: Strategies for The Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Sites Using TiO<sub>2</sub> based affinity purification., 7th Asia and Oceania Human Proteome Organization Congress, Bangkok, 2014. 8. 6-8.
  41. 持田啓佑, 及川 優, 木村弥生, 平野 久, 大隅良典, 中戸川 仁: 選択的オートファジーによる小胞体の分解機構, 日本分子生物学会, 2014. 11. 25-27.
  42. 得津奏子, 菅原経継, 井野洋子, 倉田洋一, 木村弥生, 平野 久: ヒト 26S プロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析, 日本電気泳動学会総会, 2014. 10. 24-25.
  43. 山本 林, 鈴木 翔, 藤岡優子, 木村弥生, 平野 久, 野田展生, 大隅良典: オートファジー関連タンパク質のリン酸化による機能制御, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
  44. Masuda, M. & Yamada, T.: Potential combination therapy with mTOR and MAPK inhibitors for HCC patients refractory to sorafenib. 4TH GLOBAL REVERSE PHASE PROTEIN ARRAY WHORKSHOP, Oct. 24-25, 2014, Paris, France.
  45. Yamada T.: Predictive significance of ACTN4 in early-stage NSCLC. 2014 CHICAGO MULTIDISCIPLINARY SYMPOSIUM IN THORACIC ONCOLOGY, Oct. 30-Nov. 1, 2014 ,Chicago, IL.
  46. Yamada T. & Masuda M.: Combinational Genome and Proteome Survey of Hepatocellular Carcinoma. 26th EORTC-NCI-AACR SYMPOSIUM ON MOLECULAR TARGETS AND CANCER THERAPEUTICS, Nov. 18-21, 2014, Barcelona, Spain.
  47. Yamada, T.: Cancer Biomarker Discovery by Antibody-based Proteomics. TPS2014, Nov. 18-21, 2014, Taipei, Taiwan.
  48. Yamada, T.: Array-based Signaling Pathway Profiling for Cancer Therapy Personalization. JAPAN-US WORKSHOP FOR INNOVATIVE CANCER BIOMARKER DEVELOPMENT March. 24, 2014, Tokyo, Japan.
  49. 中山敬一: がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法. 第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京, 2/28, 2015.
  50. 中山敬一: がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. 第 3 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 福岡, 2/21, 2015.
  51. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. 第 13 回群馬大学大学院医学系研究科・大学院生によるワークショップ「未来を切り拓く医学研究」, 前橋, 2/13, 2015.
  52. 中山敬一: 次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. 第 45 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「がんの多様性に応じた研究・治療 — 創薬のパラダイムシフト —, 東京, 1/13, 2015.
  53. 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 年来のがんの謎を解く. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡, 11/23, 2014.
  54. Nakayama, K.I.: Deep and absolute quantification of human proteome unveils a global landscape of cancer metabolism. The 4th Japan-France Cancer Workshop, Kyoto, 11/19, 2014.
  55. 中山敬一: がんにおける二つの謎: がん幹細胞

- 胞とワールブルグ効果. 第 134 回山口県医師会生涯研修セミナー, 山口, 11/9, 2014
56. Nakatsumi, H., Matsumoto, M. and Nakayama, K.I.: Nutrition signal induces inflammation via the mTOR-FOXK1-CCL2 pathway. The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka, 11/8, 2014.
  57. Muto, Y., Nishiyama, M., Moroishi, T. and Nakayama, K.I.: Role of the ubiquitin ligase FBXL5 controlling iron metabolism in hematopoietic stem cells. The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka, 11/7, 2014.
  58. Takeishi, S., Matsumoto, A. and Nakayama, K.I.: Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction to leukemic stem cells through altered niche regulation. The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka, 11/7, 2014.
  59. Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K. and Nakayama, K.I.: FBXL12- mediated degradation of ALDH3 is essential for the exit program from the stem cell state. The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka, 11/7, 2014.
  60. 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年来のがんの謎を解く. 第23回長崎障害者支援再生医療研究会, 長崎, 11/4, 2014.
  61. 中山敬一: 癌幹細胞の理解と制御: 癌を完治させる治療戦略. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9/26, 2014.
  62. 中山敬一: 次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 9/25, 2014.
  63. 中山敬一: ユビキチンリガーゼFBXL5による鉄代謝制御とその破綻. 第38回鉄バイオサイエンス学会学術集会, 仙台, 9/6, 2014.
  64. 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年来のがんの謎を解く. 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会, 宮崎, 8/21, 2014.
  65. 中山敬一: がんの完治に向けた次世代型アプローチ. 第50回姫路市医師会夏期大学, 姫路, 7/27, 2014.
  66. 中山敬一: 医学研究に貢献する最先端分析技術. 九州プロサーチオープニングセミナー, 福岡, 7/26, 2014.
  67. 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年来のがんの秘密を解き明かす. 第7回KAITEKI Forum, 東京, 7/8, 2014.
  68. 中山敬一: 全タンパク質の絶対定量によるがん代謝シフトの解明. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6/25, 2014.
  69. 松本雅記, 中津海洋一, 中山敬一: リン酸化定量プロテオミクスによるシグナル伝達研究. 第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜, 6/25, 2014.
  70. Takeishi, S., Matsumoto, A. and Nakayama, K.I.: Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction on leukemia stem cells through altered micro-environmental regulation. The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka, 5/31, 2014.
  71. Nakayama, K.I.: FBXL12 targets ALDHs for degradation in trophoblast stem cells to induce differentiation. The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka, 5/31, 2014.
  72. 中山敬一: 次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. 生命科学系3分野がん・ゲノム・脳支援活動合同シンポジウム, 東京, 5/27, 2014.
- 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: 「大腸がんの転移検出法」  
 発明者: 朝長 毅、久米秀明  
 出願日: 2014 年 5 月 28 日(国際出願)  
 出願番号: 特願 2014-110293

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、塩  
野義製薬(株)

3. その他  
なし。

1-2.

発明の名称：「悪性腫瘍の治療薬」  
発明者：仲 哲治、世良田聡、藤本 穰、豊  
浦雅義、庄屋雄二  
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所  
出願番号：特願 2013-272084  
出願日：2013 年 12 月 27 日  
国際出願番号：PCT/JP2014/006456  
出願日：2014 年 12 月 25 日

1-3.

発明の名称：「食道がんのマーカーおよびそ  
の利用」  
発明者：仲 哲治、世良田聡、藤本 穰、豊  
浦  
雅義、庄屋雄二  
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所  
出願番号：特願 2013-272085  
出願日：2013 年 12 月 27 日  
国際出願番号：PCT/JP2014/006455  
出願日：2014 年 12 月 25 日

1-4.

発明の名称：「 $\alpha$ -アクチニン-4 遺伝子のコピ  
ー数を指標とした卵巣癌の予後予測の補助方  
法及び予後判断のためのキット」  
発明者：本田一文、山田哲司、洪橋説雄、稲  
沢譲治、井本逸勢、津田均、山本宗平、高野  
政志  
出願日：2008 年 7 月 2 日  
出願番号：特願 2013-128520  
登録日：2015 年 2 月 20 日  
特許番号：5696320 号  
出願人：公益財団法人ヒューマンサイエンス  
振興財団

1-5.

発明の名称：「癌の処置のための方法」  
発明者：中山敬一、三森功士  
出願日：2014 年 12 月 26 日  
出願番号：特願 2014-266001  
出願人：国立大学法人九州大学

2. 実用新案登録  
なし。

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
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 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

#### 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ことが重要である。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。

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。

#### 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こるため、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

### B-1. 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(図 1、図 2、表 1)

コンパニオンマーカーの探索段階では、薬剤に感受性・耐性を有するサンプルをできるだけ多く用いて、サンプルの個体差に左右されずに感受性・耐性を見分けることができる普遍的なマーカー候補を見つけるのが理想である。しかしこれまでのプロテオーム解析は、解析試料と

解析深度の両立は困難であり、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。そこで本研究ではまずこのジレンマ解消のための新たな解析法の構築に取り組んだ。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。

マイクロ分離手法の開発では、DLD-1 細胞抽出液(総蛋白量 2 mg)から Fe-IMAC 法で濃縮したリン酸化ペプチドを陽イオン交換カラムで分画する際に、塩を用いた一般的な溶出法と、本研究で開発した、新規溶出剤(特許申請中)を用いた方法でそれぞれステップワイズ溶出(7 分画)して同定数を比較し、新規溶出剤の効果を確認した(図 2)。さらに、TMT10plex 試薬を標識したペプチドに対しても、新規溶出法が有効であることを確認した。

### B-2. チロシンリン酸化ペプチド濃縮法の改良

前年度開発した IMAC 法+抗チロシン抗体による免疫沈降によるチロシンリン酸化ペプチド濃縮法(pY-IP)に関して、更に基礎検討を進めた。具体的にはリン酸化ペプチド溶出・質量分析の各工程の最適化を行うことで、短時間により多くのリン酸化チロシン同定を試みた。

### B-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(図 3)

上記の解析で得られたリン酸化ペプチド(基質)の定量情報から、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。まず、リン酸化タンパク質データベース PhosphositePlus の Kinase-Substrate 情報から、定量データが得られたリン酸化ペプチド(基質)の責任キナーゼを割り出した。それぞれのキナーゼは複数の基質をリン酸化することが知られているので、その複数の基質のリン酸化レベルの情報から、責任キナーゼの活性を推測した。

### B-4. 非小細胞肺癌培養細胞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 阻害剤エルロチニブを暴露し、WST-8 試薬を用いた細胞増殖試験により、感受性群、耐性群に分別した。続いて、各細胞にエルロチニブ 100 nM 0 時間（未処理）、6 時間、24 時間暴露後、細胞を回収し -80 °C で凍結保存した。これらのサンプルを、プロテオーム、リン酸化プロテオーム、ATP 結合タンパクプロテオーム（前年度に開発済）の 3 種類のプロテオーム解析に供した。

プロテオーム解析は、タンパク質を変性・トリプシン消化後に 1 サンプルあたり 2.5 µg 分を TMT 試薬で標識し、各サンプルを混合後、C18-SCX StageTip で分画した。リン酸化プロテオーム解析は、タンパク質を変性・トリプシン消化後に 1 サンプルあたり 500 µg 分を使用して、Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC)法を用いてリン酸化ペプチドを濃縮した。続いて TMT 試薬で標識し、各サンプルを混合後、C18-SCX StageTip で分画した。ATP 結合タンパクプロテオームは、細胞溶解液中（総タンパク質 1 mg）にエルロチニブを 0 nM、100 nM、1 µM 添加したサンプルを ATP プローブで標識し、変性・トリプシン消化後に標識ペプチドをストレプトアビジンビーズで濃縮した。

各プロテオーム解析用に前処理したサンプルを、LC-MS/MS (Ultimate3000、Q-exactive) に供し、データ解析は Maxquant、Perseus を用いて行った。またリン酸化プロテオームデータを上記(B-3)の KSEA 法を用いて解析し、活性化キナーゼの予測を行った。

各プロテオーム解析で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、WST-8 試薬を使用した細胞増殖試験を行い、耐性株の増殖を阻害する阻害剤のスクリーニングを行った。その際、阻害剤単剤と阻害剤とエルロチニブを併用した場合についてそれぞれ試験した。

## C. 研究結果

### C-1. リン酸化タンパク質量のハイスループット化（図 1、図 2、表 1）

図 2 に示すように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。

表 1 に示すように、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。

### C-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（図 4）。

### C-3. 重層的プロテオーム解析を用いた肺癌細胞株のエルロチニブ耐性克服標的の探索（図 5）

非小細胞肺癌培養細胞株、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。以下に重層的プロテオーム解析結果を記す。

Total proteome 定量対象 5,458 タンパク質

未処理 感受性群/耐性群で有意に増加（2 倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下） 84

未処理 感受性群/耐性群で有意に減少（2 倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下） 42

6 時間処理 感受性群/耐性群で有意に増加（2 倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下） 90

6 時間処理 感受性群/耐性群で有意に減少（2 倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下） 58

24 時間処理 感受性群/耐性群で有意に増加（2 倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下） 90

24 時間処理 感受性群/耐性群で有意に減少

(2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 68

Phospho proteome 定量対象 12,577 リン酸化サイト

未処理 感受性群/耐性群で有意に増加 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 165

未処理 感受性群/耐性群で有意に減少 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 144

6時間処理 感受性群/耐性群で有意に増加 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 145

6時間処理 感受性群/耐性群で有意に減少 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 152

24時間処理 感受性群/耐性群で有意に増加 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 183

24時間処理 感受性群/耐性群で有意に減少 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 234

ATP 結合タンパクプロテオーム 定量対象 21,017 リン酸化サイト

未処理 感受性群/耐性群で有意に増加 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 275

未処理 感受性群/耐性群で有意に減少 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 209

100nM 処理 感受性群/耐性群で有意に増加 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 280

100nM 処理 感受性群/耐性群で有意に減少 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 224

1  $\mu$ M 処理 感受性群/耐性群で有意に増加 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 271

1  $\mu$ M 処理 感受性群/耐性群で有意に減少 (2倍以上の変動かつ  $p$  値 0.01 以下) 265

KSEA 法の結果を図 6 に示す。上記重層的プロテオーム解析で、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  $< 1 \mu$ M) が認められた。

## D. 考察

### D-1. リン酸化タンパク質定量のハイスループット化

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。

### D-2. チロシンリン酸化ペプチド同定法、チロシンキナーゼ活性化推測法の基礎検討

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。

### D-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。

### D-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

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ク候補が得られた。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ク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。

## E. 結論

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、非小細胞肺がん培養細胞を用いて、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ク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。

## 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- $\beta$ -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 $\beta$  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., Chaibayrit, 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).

## G-2. 学会発表

(招待講演)

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 membrane proteomic analysis of human tissue samples and subsequent verification using SRM/MRM The 13th HUPO World Congress Post Congress Workshop, Segovia, Spain, 9 September, 2014.

(一般講演)

1. 原 康洋、佐野聖三、橋本祐希、川崎直子、平野賢一、鈴木 朗、山口知是、朝長 毅: ATGL ノックアウトマウス心筋のプロテオーム解析. 第 12 回日本プロテオーム学会、つくば、2014 年 7 月 17 日-18 日.
2. 足立 淳、橋口一成、佐藤三佐子、橋本裕希、深水和菜、朝長 毅: StageTip を用いた新規分画法により、プロテオーム解析・リン酸化プロテオーム解析の深さと簡易性の両立を図る. 日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月 17 日-18 日.
3. 村岡 賢、佐藤彩子、久米秀明、橋口一成、足立 淳、橋本裕希、深水和菜、朝長 毅: スキルス胃癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月 17 日-18 日.
4. 松下一之、佐藤守、朝長 毅、野村文夫: Interactions between SF3b1(SAP155) and FUSE-binding protein-interacting repressor (FIR) coordinates c-Myc and P27Kip1 expression revealed by GeLC-MS analysis. 日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月 17 日-18 日.
5. 久米秀明、橋本裕希、村岡 賢、松原久裕、朝長 毅: 血中膜小胞画分のプロテオーム解析による大腸癌バイオマーカータンパク質の探索. 日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月 17 日-18 日.
6. Adachi, J. & Tomonaga, T.: Kinome and ATPome-wide selectivity profiling of ATP-competitive kinase inhibitors 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日.
7. 村岡 賢、久米秀明、橋口一成、足立 淳、朝長 毅: Large-scale membrane proteome analysis in scirrhous gastric cancer cell. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日.
8. 松下一之、北村浩一、バハテヤリ ラヒムトラ、星野忠次、岩間厚志、島田英昭、朝長 毅、久保秀司、野村文夫: 急性 T 細胞性白血病発症における c-myc 遺伝子転写抑制因子 FIR のスプライシングの意義. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日.
9. 久保田翔、森井真理子、青山和正、幸龍三郎、山口弘美、久家貴寿、朝長 毅、山口憲孝、山口直人: AKAP8 のチロシンリン酸化を介したクロマチンとの結合阻害. 第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日.
10. 風見隆浩、朝長 毅、川崎直子、佐藤守、久家貴寿、松下一之、野村文夫: Annexin A2 の核内蓄積は coilin を介したセントロメア損傷によって染色体不安定性に関与する. 第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日.
11. 福留久美子、阿部雄一、本庄雅則、藤木幸夫: D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) の細胞内局在異常による細胞毒性. 第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月 25-27 日.
12. 阿部雄一、土方誠、朝長 毅: リン酸化プロテオミクス解析による C 型肝炎ウイルス増殖に重要なウイルスタンパク質リン酸化修飾の網羅的探索. 第 62 回日本ウイルス学会

学術集会, 横浜、2014 年 11 月 10-12 日.

野義製薬(株)

(国際学会)

1. Hara, Y., Sano, S., Hashimoto, Y., Kawasaki, N., Suzuki, A., Yamaguchi, S., Hirano, K. & Tomonaga, T.: Quantitative proteomic analysis of hearts from adipose triglyceride lipase knockout mice. The 3<sup>st</sup> International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease, Tokyo, Japan, 14 March, 2015.
2. Tomonaga, T. & Kume, H.: Identification of predictive biomarker candidates of colorectal cancer metastasis in serum extracellular vesicles based on membrane quantitative proteomics of cancer tissues. Australasia Extracellular Vesicles Conference, Kerns, Australia, 20 November, 2014.
3. Tomonaga, T. & Kume, H.: Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring. Human Proteome Organization (HUPO) 13th Annual World Congress, Madrid, Spain, October 5-8, 2014.
4. Adachi, J., Hashiguchi, K., Sato, M., Fukamizu, K. & Tomonaga, T.: Simplified and minimized fractionation using StageTips for in-depth proteome and phosphoproteome analysis. Human Proteome Organization (HUPO) 13th Annual World Congress, Madrid, Spain, October 5-8, 2014.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
発明の名称: 「大腸がんの転移検出法」  
発明者: 朝長 毅、久米秀明  
出願日: 2014 年 5 月 28 日(国際出願)  
出願番号: 特願 2014-110293  
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所、塩

2. 実用新案登録  
なし。

3. その他  
なし。

## I. 研究協力者

|        |                          |
|--------|--------------------------|
| 石濱 泰   | 京都大学大学院薬学研究科             |
| 足立 淳   | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 原 康洋   | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 久米 秀明  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 白水 崇   | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 渡部 亮介  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 橋口 一成  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 阿部 雄一  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 佐野 聖三  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 橋本 裕希  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 岸田 真里菜 | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 長野 麻衣子 | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 深水 和菜  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |
| 佐藤 彩子  | 医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト |

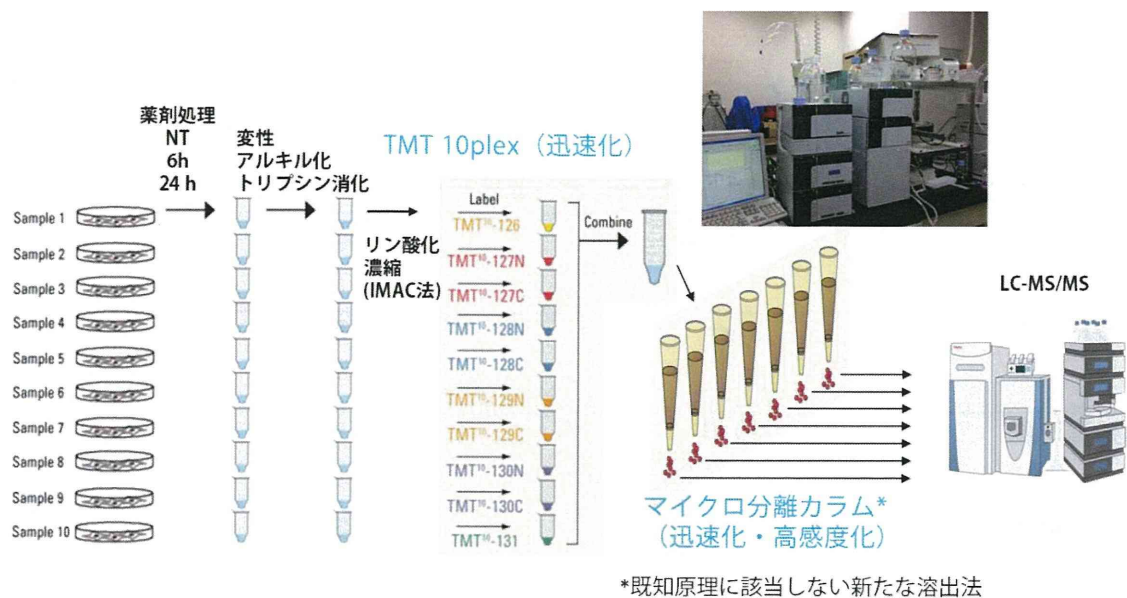


図1 リン酸化タンパク質のハイスループット定量プロテオミクス解析法の構築

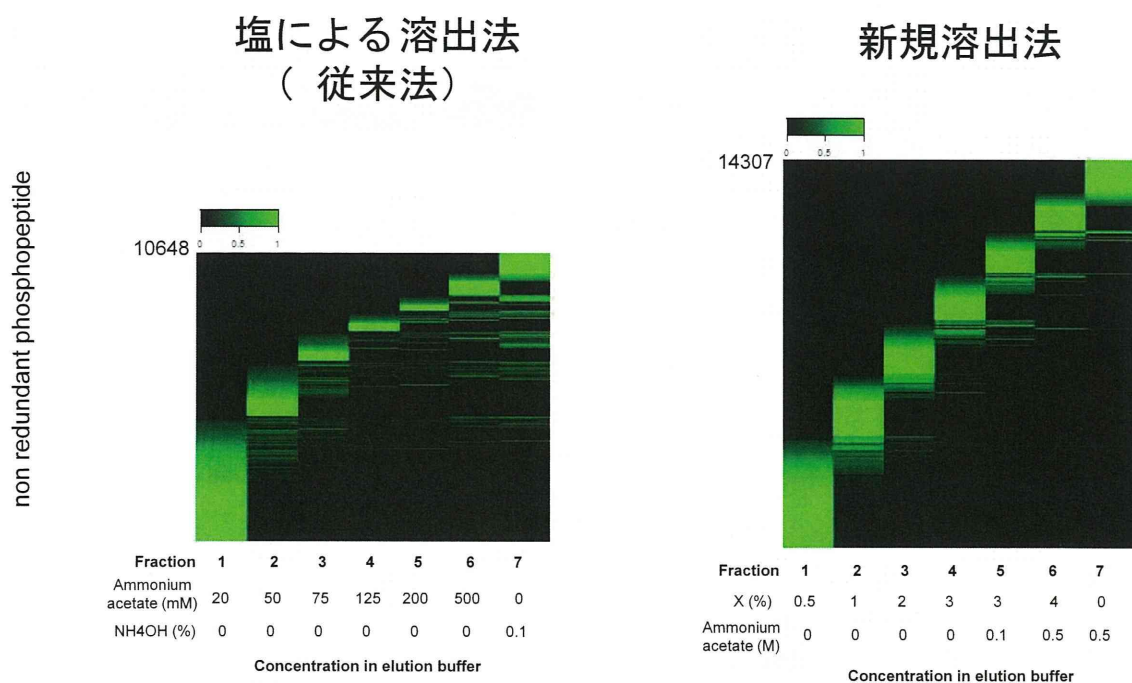


図2 リン酸化ペプチドの陽イオン交換カラム分画における新規溶出法の検討

表 1 10 試料のリン酸化プロテオーム解析における従来法と新手法の比較

|            | 従来法        | 新手法       |
|------------|------------|-----------|
| タンパク量      | 5 mg       | 0.5 mg    |
| 前処理時間      | 10 日       | 2 ~ 3 日   |
| MS 解析時間    | 20 日       | 1 日       |
| 定量可能リン酸化部位 | 約 10,000   | 約 15,000  |
| 解析コスト      | 2400,000 円 | 200,000 円 |

| Phospho-Proteomics    |           |           |
|-----------------------|-----------|-----------|
| リン酸化ペプチド定量値(〜20,000個) |           |           |
| リン酸化ペプチド              | 患者由来細胞    | コントロール    |
| PRTQ <b>S</b> (p)PGGC | 2.5 x e^6 | 1.1 x e^4 |
| KRIT <b>S</b> (p)PLME | 3.1 x e^5 | 4.4 x e^5 |
| QPQQ <b>S</b> (p)PAAA | 7.8 x e^4 | 2.1 x e^5 |
| VNTF <b>S</b> (p)PEGR | 6.9 x e^5 | 9.3 x e^5 |

リン酸化プロテオミクスで得られた基質(リン酸化ペプチド)情報から、解析サンプル中におけるキナーゼ活性を予測する手法

| PhosphoSitePlus                   |
|-----------------------------------|
| Kinase-Substrate(KS)情報<br>(8308個) |
| CDK1: PRTQ <b>S</b> (p)PGGC       |
| ERK1: SRTG <b>S</b> (p)QEGT       |
| PKC: VNTF <b>S</b> (p)PEGR        |

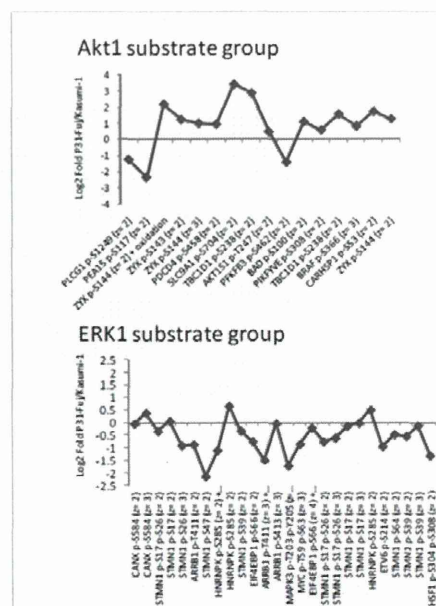


図 3. 網羅的リン酸化プロテオミクス情報を活用したキナーゼ活性定量法 (KSEA 法) の確立

| プロトコル           | 溶出液          | MSMS Top数 | MSMS Injection Time | リン酸化チロシン数 |
|-----------------|--------------|-----------|---------------------|-----------|
| 従来型             | 1% H3PO4     | 12        | 120 msec            | 625       |
| 改良型 No.1        | 1% H3PO4     | 6         | 240 msec            | 875       |
| 改良型 No.2        | 500mM K2HPO4 | 6         | 240 msec            | 792       |
| 改良型 No.1 + No.2 |              |           |                     | 1049      |

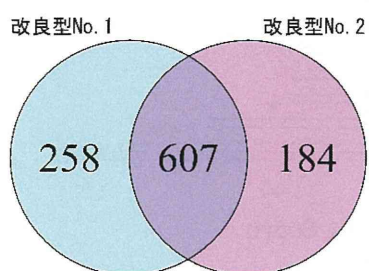
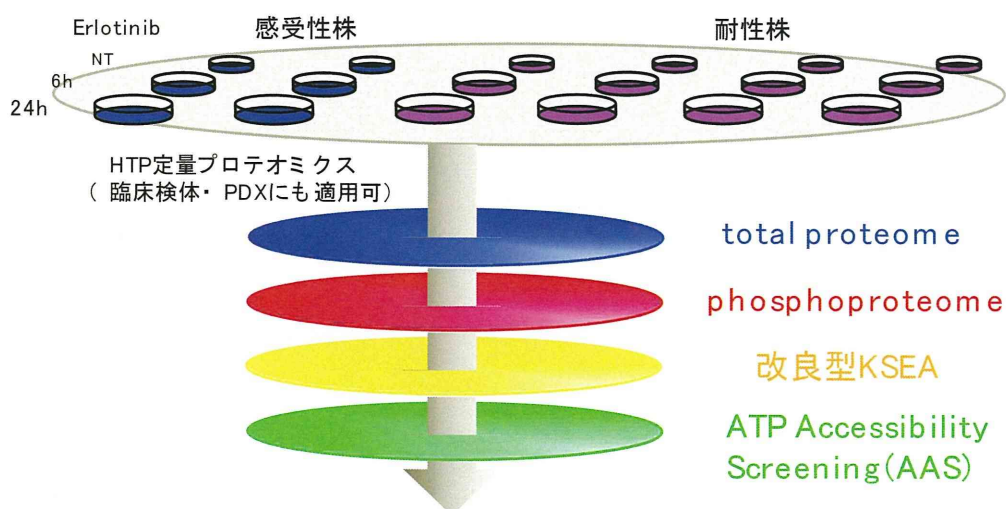


図4 チロシンリン酸化ペプチド同定数の向上



46種類の阻害剤による耐性克服効果のスクリーニング

図5. 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

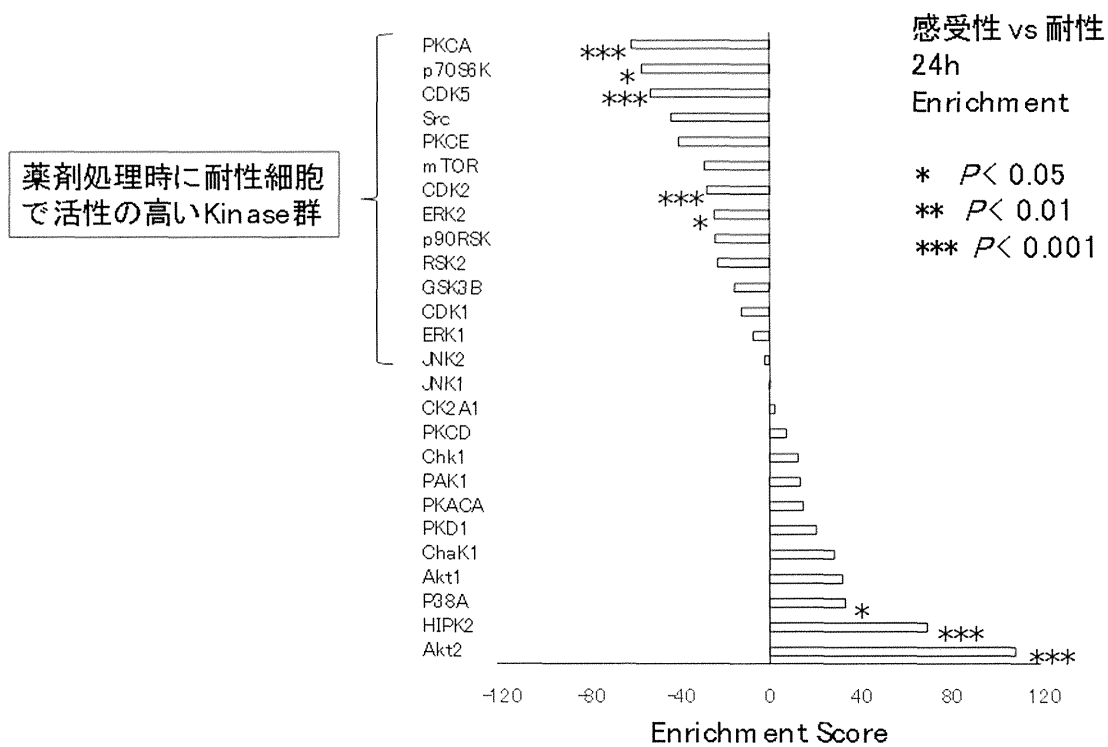


図6 KSEA 法によって活性化が予測されたキナーゼ群

## 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

研究分担者 仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部  
免疫シグナルプロジェクト プロジェクトリーダー

### 研究要旨

卵巣癌は手術技術の向上と奏効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、抗癌剤自然耐性・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、抗癌剤抵抗性である卵巣明細胞腺癌細胞株と抗癌剤感受性である漿液性腺癌細胞株におけるタンパク質発現差解析をした。その結果、明細胞腺癌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は明細胞腺癌細胞株細胞株だけでなく卵巣明細胞腺癌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と抗癌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癌であり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による抗癌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。

### A. 研究目的

本研究では卵巣明細胞腺癌に高発現し、プラチナ製剤耐性と深く関係する蛋白質であるAnnexin A4 (ANXA4)を阻害することが抗癌剤感受性を向上させることにつながることを証明し、プラチナ製剤耐性機序の解明とプラチナ製剤に対するコンパニオン診断薬としての開発を目的とした。

### B. 研究方法

#### (1) 細胞

RMG-I(ヒト卵巣明細胞腺癌)、NUGC3(ヒト胃癌細胞株)はJCRBより入手した。細胞はRPMI1640培地に10%ウシ血清(FBS)(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)、1% penicillin-streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を添加したものを使い、5% CO<sub>2</sub>の37°Cインキュベーターで培養した。

#### (2) ANXA4 ノックダウン細胞株の樹立

ANXA4 ノックダウンRMG-I細胞株を樹立するため、RMG-I細胞はLipofectamine

2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)を用いて市販の ANXA4 short hairpin RNA をコードする plasmid(shRNA ANX4, plasmid KH06928N, SABiosciences [Qiagen], Frederick, MD, USA) をトランスフェクションし、600 µg/ml の Geneticin (Invitrogen)を用いることでセクションした。2つの RMG-I-ANXA4shRNA クローンを樹立し、Y4 と R5 と名付けた。コントロールとして、空ベクターをトランスフェクションし、クローン NC7 を樹立した。

### (3) ANXA4 mutant 細胞株の樹立

pcDNA3.1-ANXA4 を鋳型として、全長の ANXA4 cDNA を KOD plus(Toyobo Co. Ltd., Osaka, Japan)と下記のプライマーを用いて(forward 5'-TTGACCTAGAGTCATGGCCA-3', reverse 5'-ATCATCTCCTCCACAGAGA-3'), PCR 法により増幅し、pcDNA3.1/V5-His-TOPO に挿入し、V5 と 6× His tag が C 末端に融合する発現ベクターを作成した。更に、ANXA4 deletion mutants を作成するために、アネキシンリピートを C 末端から 1 つずつ欠失した図 3a に示した変異体の作成を行った(R3, R2, R1 と名付けた)。Forward primer は前述と同じものを使用し、reverse primers は下記のものを使用した R3 5'-TATAGCCAGCAGAGCATCTT-3', R2 5'-CAGAGACACCAGCACTCGCT-3', R1 5'-CATCCCCACAATCACCTGCT-3' 続いて、R1 について、カルシウムイオン結合部位にアミノ酸変異を入れる事でカルシウムイオンと結合出来なくした変異体(E70A)を、KOD-Plus-Mutagenesis kit (Toyobo)を用いて作成した。

作成した cDNA は pIRES2AcGFP vector (Clontech, Palo Alto, CA)の *Bgl* II と *Eco* R I 部位に挿入した。全長及び変異型の ANXA4 遺伝子を NUGC3 細胞に遺伝子導入することで安定発現株を樹立し、FL-12, R3-6, R2-13, R1-12, R1(E70A)-95、空ベクター導入細胞は NC-14 と名付けた、

### (4) 細胞増殖アッセイ

RMG-I NC7 と RMG-I ANXA4 Y4 と RMG-I ANXA4R5 は RPMI1640 medium + 10% FBS に懸濁し、1500 cells/well の密度で 96-well plates (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA) にまき、48, 72, 96 時間、培養した。それぞれの時間において WST-8 assay (Cell Counting Kit-SF; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)により、細胞の増殖を microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, A, USA).を用いて測定した。

### (5) ウェスタンブロッティング

細胞は RIPA buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1x phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)and 1x protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque))に溶解し、遠心分離(13,200 rpm, 4°C, 15 min)し、遠心上清を回収した。タンパク質の濃度は bovine serum albumin (BSA) を標準物質として、DC Protein Assay kit (Bio-Rad)を用いて定量した。

抽出したタンパク質は 5-20% gradient SDS-PAGE ゲル(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて分離し、PVDF 膜(Millipore, Bedford, MA, USA)に転写した。PVDF 膜を 1% BSA in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST)で 1 時間振とうすることでブロッキングし、goat polyclonal anti- ANXA4 antibody (sc-1930; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、にて 1 次抗体反応を室温で 1 時間行った。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) あるいは HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences UK, Buckinghamshire, UK) で 1 次抗体反応を室温で 1

時間行った。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回洗浄し、enhanced chemiluminescence (ECL) reaction system (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA)により、シグナルを検出した。ローディングコントロールとして、anti-GAPDH antibody (Santa Cruz Biotechnology)を 1 次抗体として用いた。

#### (6) IC<sub>50</sub> 測定

RMG-I、RMG-I NC7、RMG-I-ANXA4-Y4、RMG-I-ANXA4-R5 の 4 つの細胞について、RPMI1640 medium + 10% FBS+1% penicillin-streptomycin に懸濁し、1,500 cells/well の密度で 96-well plates (Costar, Corning Inc., Corning, NY, USA) にまき、24 時間培養し、様々な濃度の抗癌剤(0-300  $\mu$ M カルボプラチン、0-50  $\mu$ M シスプラチン)に暴露させ、72 時間後に生存している細胞を WST-8 assay により測定し細胞増殖が 50%抑制される抗癌剤の濃度を決定した。

#### (7) 細胞内プラチナ定量

全長 ANXA4 導入細胞(FL-22)、ANXA4 欠失遺伝子導入細胞クローン (R3-6, R2-13, R1-12 and R1[E70A]-95)およびコントロール細胞(NC-14)を 150mm ディッシュで 80% コンフルエントまで培養した。細胞を 100  $\square$ Mシスプラチンで 60 分間、37°C で培養し、PBS で 2 回洗浄あるいは、シスプラチンを含まない RPMI 1640 培地(10%血清含有)で 3 時間培養し、細胞を回収した。細胞内プラチナ量は Agilent 7500ce 誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS; Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて測定した。

#### (8) In vivo での抗癌剤感受性アッセイ

ICR (out-bred Institute of Cancer Research strain) nu/nu mice マウス(4 週齢メス)の皮下に RMG-I、RMG-I NC7、RMG-I-AnxA-Y4 を  $2.5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ l (PBS:マトリゲル=1:1)で移植した。ANXA4

変異株(NC-14, FL-22, R1-12 or R1(E70A))は  $1.0 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ l (PBS:マトリゲル=1:1)を皮下移植した。移植後 7 日目にマウスを 2 群に分け、PBS あるいは 3 mg/kg のシスプラチンを週 2 回の頻度で 4 週間投与した。腫瘍体積は長径 x 短径 x 高さより計算した。薬剤投与終了 4 週後に腫瘍重量を計測した。

#### (9) 細胞内塩化物イオン濃度測定

[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> は Cl<sup>-</sup> indicator である N-ethoxy-carbonylmethyl-6-methoxyquinolinium bromide (MQAE; Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて測定した。MQAE の蛍光強度は[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> と負に相関する。ANXA4 変異株 (NC-14, FL-22, R1-12 or R1(E70A)-95)は 35mm ディッシュに 20%コンフルエントにまで培養し、10 mM MQAE を含む培地で 4 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境でインキュベートした。薬剤処理直後に蛍光強度の測定を Biozero BZ-9000 (Keyence, Tokyo, Japan)を用いて行った。励起波長は 380/50 nm のフィルター、蛍光は 510/40 nm のフィルターを用いた。データは BZ-II Analyser (Keyence)を用いて解析し、測定 0 分時点と 30 分時点の比率を示した。

#### (10) 統計解析

統計解析は One-way ANOVA test と Dunnett テストにより群間の有意差検定を行った。p<0.05 を統計的に有意と判定した。

### C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

### D. 結果・考察

#### (1) ANXA4 ノックダウン RMG-I 細胞株の樹立

卵巣明細胞腺癌において、ANXA4 を阻害することが抗癌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。