

**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**

**キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測**

**診断法の開発**

**平成25年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 久家貴寿**

**平成26(2014)年5月**

## 目次

I.	総括研究報告	
	キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬 効果予測診断法の開発	
	久家貴寿、朝長毅、足立淳	1
II.	分担研究報告	
	キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に用いる臨床検体の収集	
	松原久裕、星野敢	23
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV.	研究成果の刊行物・別刷	30

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）  
総括研究報告書

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法の開発

研究代表者 久家貴寿 独立行政法人医薬基盤研究所 研究員  
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  
研究分担者 足立 淳 独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

### 研究要旨

抗 EGFR チロシンキナーゼ抗体薬は大腸がんなどの治療薬として用いられている。抗 EGFR 抗体薬の効果予測は、KRAS 遺伝子変異検査によって行われるが、適応患者（KRAS 遺伝子変異無し）と診断されても、依然として 30～40%程度の奏効率である。KRAS 遺伝子変異以外で、抗 EGFR 抗体薬に対する耐性化が生じるメカニズムとしては、EGFR シグナル関連キナーゼの恒常的活性化などが挙げられる。したがって、EGFR 関連キナーゼの活性測定は、抗 EGFR 抗体薬効果予測法の改善策となりうる。本研究の目的は、EGFR 関連キナーゼの活性化状態を、質量解析計を用いて、包括的に解析する技術を開発することであり、キナーゼ活性測定が、抗 EGFR 抗体薬の効果予測診断法となりうるのかを検証することである。前年度は、三連四重極型質量解析計を用いた SRM 法で、キナーゼ活性測定するための基盤技術開発を進めた。本年度は、その測定法のプロトタイプを完成させた。さらに、抗 EGFR 抗体薬に対し異なる感受性を示す大腸癌細胞株の、キナーゼ活性プロファイルを調べた結果、包括的キナーゼ活性測定が抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有効である可能性が示唆された。また、前年度から本年度にかけて、合計 152 検体の大腸癌手術標本を収集した。これらの成果および検体を用いれば、今後、キナーゼ活性測定による抗 EGFR 抗体薬効果予測法の有用性を検証することが可能である。

### その他研究分担者（大腸癌手術標本の収集）

松原久裕：千葉大学大学院 教授  
星野 敢：千葉大学医学部附属病院 助教

### A. 研究目的

抗 EGFR チロシンキナーゼ抗体薬は大腸がんなどのがん治療薬として用いられている。抗 EGFR 抗体薬の効果予測は、EGFR シグナル伝達機構の下流分子 KRAS の遺伝子変異検

査で行われている。KRAS 遺伝子野生型の患者が投薬適応になるが、適応となったとしても依然として 30～40%程度の奏功率である。抗 EGFR 抗体薬は比較的副作用が少ないとされるが、費用が高額であり、不適切な投薬は患者にとっての不利益となる。

KRAS 遺伝子変異以外で、抗 EGFR 抗体薬に対する耐性化が生じるメカニズムとしては、EGFR シグナルに関連するキナーゼの恒常的活性化が挙げられる。EGFR シグナル伝達機構の下流に位置するキナーゼや、EGFR シグナル伝達機構を代替するキナーゼが、抗 EGFR 抗体薬の耐性化に関わる。KRAS 遺伝子変異が抗 EGFR 抗体薬耐性を引き起こすメカニズムも、下流の BRAF キナーゼや Akt キナーゼを活性化することによる。したがって、大腸癌組織においてどのようなキナーゼが活性化状態にあるのかを、包括的に解析することができれば、精度の高い抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能になると期待される。

多くのキナーゼの酵素活性は高次構造レベルで制御されており、その高次構造は活性化ループのリン酸化修飾によって制御されている。そのため、活性化ループのリン酸化修飾はキナーゼの活性化状態を知るためのサロゲートマーカーとなる。

本研究の目的は、三連四重極型質量解析計を用いた SRM 法で、キナーゼ活性化指標リン酸化修飾レベルを包括的に解析する技術を開発することであり、その技術を用いて、包括的キナーゼ活性測定が、抗 EGFR 抗体薬の効果予測診断に応用可能かどうかを検証することである。

## B. 研究方法

### <LC-MS/MS測定>

#### SRM測定

SRM法はショットガンプロテオミクス法とは異なり、特定の標的ペプチドを選択的に検出・定量する技術である。SRM法では標的ペプチドを選択し（第一チャンネル）、それをフラグメント化した後に、さらに特定のフラグメントを選択的に検出する（第二チャンネル）。2段階のフィルター（チャンネル）をかけることで、標的ペプチドを特異的に検出・定量する。したがって、SRM測定を行うためには、標的ペプチド毎にチャンネルを設定する必要がある。

標的ペプチドをフラグメント化すると、数多くのフラグメントイオンが生じる。第二チャンネルとして選択するフラグメントの種類によって、検出できる感度・特異度が異なるため、最適なフラグメントを選択する必要がある。最適なチャンネル設定は、合成ペプチドを実測することで行った。

解析サンプルはタンパク質溶液をトリプシン消化することで作成し、必要に応じて、リン酸化ペプチド濃縮などの処理を行った。リン酸化ペプチドの濃縮はImmobilized metal-ion affinity chromatography( IMAC )法( Narumi et al., 2012, J Proteome Res, 11, 5311-5322 )で行った。解析に用いた質量解析計は三連四重極型 ( TSQ-Vantage, Thermo Scientific社 ) である。

## ショットガンプロテオミクス

ショットガンプロテオミクスは、測定可能な全てのペプチドを、液体クロマトグラフィー（LC）で分離しながら、順次同定（定量）する手法である。タンパク質溶液をトリプシン消化した後に、リニアイオントラップ型質量解析計（LTQ-Orbitrap XLまたはLTQ-Orbitrap Velos、Thermo Scientific社）もしくは四重極型質量解析計（Q-Exactive, Thermo Scientific社）で解析した。

## 安定同位体標識リジン、アルギニンを用いた定量法

安定同位体標識したアミノ酸を含むペプチドは、非標識のペプチドとは質量が異なる。そのため、質量解析計は安定同位体標識したペプチドと、していないペプチドを区別して測定することが可能であり、それらの存在量（イオン強度の積算値）を相対定量することができる。

安定同位体標識したリジン、アルギニンを含む培地で細胞培養した場合は、細胞内の全てのタンパク質を安定同位体標識することができる。安定同位体標識したリジン、アルギニンを使って、ペプチド合成すれば、安定同位体標識ペプチドを作ることができる。

## 手術標本のiTRAQ解析

手術標本の定量的大規模リン酸化プロテオーム解析はiTRAQ試薬を用いて行った（Narumi et al., 2012, J Proteome Res, 11, 5311-5322）。凍結組織標本を粉末状に破碎し、Phase Transfer Surfactants（PTS）法（Masuda et al., 2008, J. Proteome Res, 7, 731-740）で、タンパク質抽出とトリプシン消化を行った。その後、IMAC法でリン酸化ペプチドを濃縮し、iTRAQ試薬でリン酸化ペプチドを標識した。iTRAQ標識したサンプルは強陽イオン交換クロマトグラフィーで30各分程度に分画し、LTQ-Orbitrap XLを用いて解析した。

iTRAQ（4 plex）法では一度に4検体を比較定量することができるが、4検体中の1検体を共通の標準サンプルとすることで、実質的には、検体数の制限無く比較定量解析することが可能である。大腸癌組織およびその周辺非癌部組織、大腸ポリープ（大腸良性腫瘍組織）をそれぞれ6検体ずつ解析し、2000～3000種類程度のリン酸化修飾を定量し、検体間で比較した。定量値は標準サンプルを1とした、相対値で算出した。

## **< 活性型キナーゼのアフィニティー精製 >**

活性型キナーゼのアフィニティー精製は、キナーゼの活性化ループ領域のリン酸化修飾に対する抗体を用いて行った。前年度までにアフィニティー精製に使用可能な抗体を24種類選別している。

アフィニティー精製は変性条件下で行った。細胞や組織のタンパク質抽出物を変性バッファー中で（0.3% SDS、1 mM DTT、1% NP-40を含むPBS）煮沸し、キナーゼの立体構造を破壊した。その後、SDSを3倍希釈してから、プロテインG-磁気ビーズなどを用いて、アフィニティー精製を行った。

### <大腸癌培養細胞株のキナーゼ活性化プロファイリング>

大腸癌培養細胞を抗EGFR抗体薬に対する感受性で分類し、数十種類のキナーゼの活性化状態を調べた。

抗EGFR抗体薬に対する感受性はWST-8試薬を用いた細胞増殖試験で行った。各細胞株を2000-6000個96穴プレートに撒き、0、0.5、5、50 µg/mlのセツキシマブを添加し、コントロール(0 µg/ml)の増殖を1とした時の増殖抑制率を計算した。耐性株に関しては、KRAS G12V変異型、BRAF V600E変異型、それ以外に細分類した。

キナーゼの活性化状態は、各種キナーゼの活性化指標リン酸化修飾に対する抗体を用いたウエスタンブロット法で行った。

### <大腸癌外科的切除標本の収集および倫理面への配慮>

千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科を受診する者のうち、大腸がんと診断された者の外科的切除標本を収集した。研究全般にあたり、平成17年4月1日施行の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。プロトコルは千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査委員会で承認されたもの(課題名:消化管腫瘍における遺伝子・蛋白動態解析研究)を用いた。詳細は松原久裕、星野敢の分担研究報告書に記載した。

大腸癌手術切除標本をプロテオーム解析するにあたっては、独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチセンター研究倫理審査委員会から承認されたプロトコルに従った(課題名:プロテオーム技術を用いた消化器癌、乳癌のバイオマーカー探索研究)。

## C. 研究結果

### <キナーゼ活性化レベル測定技術の開発>

LC-MS/MSを使った、包括的キナーゼ活性化レベル測定法のプロトタイプを2つ完成させた。1つはハイスループット性を重視した方法であり、もう一方は感度などを重視した方法である。

#### 方法1 キナーゼ活性化指標リン酸化修飾のSRM測定

方法1はハイスループット性を重視した測定法であり、キナーゼの活性化指標リン酸化修飾を質量解析計で検出し、定量する。キナーゼをトリプシンで消化した後に、活性化指標リン酸化修飾を含むリン酸化ペプチドを、三連四重極型質量解析計を用いたSRM法で定量する(図1)。本法は、リン酸化抗体を必要としない点で独創的な手法である。

始めに、我々は、各種キナーゼの活性化指標リン酸化修飾がLC-MS/MSで検出できるかどうかを確認した。我々がこれまでに行った大規模リン酸化プロテオーム解析のデータと、200種類以上の活性化型リコンビナントキナーゼをLC-MS/MS解析した結果を検索したところ、185種のキナーゼの活性化指標リン酸化修飾がLC-MS/MSで検出できることが明らかとなった。

そこで、LC-MS/MSで検出可能な活性化指標リン酸化修飾のうち、41種を選びSRMチ

チャンネルを設定した。また、活性化ループ領域以外のいくつかのリン酸化についても、キナーゼ活性の制御に関わるものを選び SRM チャンネルを設定した（32 種のキナーゼ、42 種のリン酸化サイト）。合計 60 種のキナーゼについて、活性化レベル測定用の SRM チャンネルを設定した。チャンネル設定は、各ペプチドの MS および MS/MS スペクトルに基づいて行った。さらに、全ての標的について、定量を可能にするために、安定同位体標識した内部標準ペプチドを作成した。

次に、大腸癌培養細胞の細胞抽出液を使い、キナーゼ活性化指標リン酸化修飾を SRM 法で検出・定量することを試みた。細胞抽出液をトリプシン消化した後、IMAC 法でリン酸化ペプチドを濃縮し、SRM 測定を行った。その結果、EGFR、c-RAF、CDK1/2、KIT、PDPK1、FGFR1、AMPK、GSK3A、RSK1、FYN、MARK2 などの活性化指標リン酸化修飾を測定することができた（図 2）。しかしながら、感度がまだ十分ではなかったため、現在は、本測定法の高感度化を目的に、測定条件を最適化している。ATP プローブを用いたキナーゼ濃縮法なども、測定の高感度化に有効と考え検討している。

#### 方法 2 . 活性型キナーゼのアフィニティー精製と SRM を組み合わせた測定法

方法 2 では、活性化ループ領域のリン酸化に対する抗体を用いて、活性型キナーゼをアフィニティー精製し、精製した活性型キナーゼの量を SRM 法で定量する（図 3）。前年度には、アフィニティー精製に用いることのできる活性型キナーゼ抗体を 24 種類選定した（図 4）。方法 2 は、活性型キナーゼを濃縮するため、方法 1 よりも高感度である。一方で、リン酸化抗体を必要とする点は方法 1 と比した時にデメリットとなる。

本年度は、アフィニティー精製した活性型キナーゼを LC-MS/MS で定量する一連の技術を確認した。活性型キナーゼをアフィニティー精製し、トリプシン消化した後に、LC-MS/MS で定量する。

活性型 Erk 抗体と活性型 Mek 抗体を用いて LC-MS/MS 解析した例では、Erk ファミリーの 3 種 Erk1, Erk2, Erk7 および Mek ファミリーの 2 種 Mek1, Mek2 の定量が可能であった。それぞれのサブファミリー間で活性化ループのアミノ酸配列が保存されているため、一つの抗体で複数のサブファミリーを精製し、それぞれ別個に定量することができた。セツキシマブ処理した DLD1 大腸癌細胞と、非処理の細胞を解析したところ、セツキシマブ処理による、Erk1, Erk2, Erk7, Mek1, Mek2 の活性低下を確認することができた（図 5A）。LC-MS/MS での定量結果は、活性型キナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法での定量結果と一致した（図 5B）。

活性型 TAOK 抗体を用いた LC-MS/MS 解析では、TAOK1, TAOK2, TAOK3, PDPK1, SLK, STK10 の活性化レベルを一度に定量することができた（図 6A）。これらキナーゼの活性型フォームの量は、セツキシマブ処理による変動を示さなかった。この結果は、活性型 TAOK 抗体を用いたウエスタンブロットの結果と一致した。LC-MS/MS の結果同様に、TAOK、PDPK1 と推測される位置のウエスタンブロットのバンドは、セツキシマブ処理による変動を示さなかった（図 6B）。これらキナーゼの、活性化ループ領域のアミノ酸配列

(リン酸化サイト周辺)は、pS-F-V-G-T あるいは pS-F-I-G-T で共通していた(図 6A)。これらの結果から、同一の活性型キナーゼ抗体で認識されるキナーゼであれば、異なるファミリーでも、LC-MS/MS で同時に定量できることが示された。

アミノ酸配列情報から考えると、24 種の活性型キナーゼ抗体を一度に用いた精製を行えば、40~50 種類以上のキナーゼの活性化レベルを、LC-MS/MS で一度に定量することができると思われる。

### <キナーゼ活性測定による抗 EGFR 抗体薬効果予測に向けた基礎検討>

キナーゼの活性化状態を調べることで、抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能なのかどうかを明らかにするために、基礎的な検討を行った。

#### 検討 1 抗 EGFR 抗体薬感受性および耐性大腸癌培養細胞株のキナーゼ活性プロファイリング

大腸癌培養細胞株 24 種類を、セツキシマブ感受性株と耐性株に分類した(図 7)。耐性株については、KRAS G12V 遺伝子変異と BRAF V600E 遺伝子変異の有無で細分類した。KRAS と BRAF のその他の遺伝子変異、PI3K H1047R 遺伝子変異については、耐性化との関連性が特に見られなかったため、細分類時には考慮しなかった。

セツキシマブ感受性株 5 種、耐性株 13 種(KRAS、BRAF 両野生型、5 種； KRAS G12V 型、3 種； BRAF V600E 型、5 種)からそれぞれタンパク質を抽出し、約 30 種の活性型キナーゼ抗体でウエスタンブロット解析を行った。

BRAF V600E 型細胞では、Mek の明らかに高い活性化が認められ、その他の耐性株の一部でも Mek の高い活性化が認められた(図 8)。活性型 Erk 抗体のウエスタンブロットでは上下 2 本のバンドが検出されたが、上側のバンドの増強が耐性株で見られた(図 8)。これらの結果は、Mek、Erk の活性化状態が抗 EGFR 抗体薬の無効群予測に有用である可能性を示唆している。一方で、感受性株では、PDPK1 の活性化と、Src の活性低下が検出された(図 8)。

以上のことから、抗 EGFR 抗体薬耐性株と感受性株ではキナーゼの活性化状態が異なっていることが示唆された。したがって、キナーゼの活性化状態を包括的に調べることは、抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有用であると考えられる。

#### 検討 2 大腸癌手術標本のリン酸化プロテオーム解析

抗 EGFR 抗体薬効果予測診断には、大腸癌手術標本が検体として用いられる。しかし、術前、術中、術後の様々な条件が、組織検体のタンパク質リン酸化にどのような影響を与えるのか、という点がまだ明らかでない。そこで、まずは、いくつかの手術標本の定量的リン酸化プロテオーム解析を行い、上記問題点について考察した。

無作為に選んだステージ 2 の大腸癌手術標本(癌部および周辺非癌部組織：同一患者)および大腸ポリープ組織(別患者)を、それぞれ 6 検体ずつ定量的大規模リン酸化プロテオーム手法で解析した。その結果、2000~3000 種類のリン酸化修飾の定量値が得られた。



各組織の全体的なリン酸化修飾レベルを把握するために、リン酸化ペプチドの定量値分布を組織間で比較した。中央値やばらつきを比較したところ、非癌部組織とポリープでは、タンパク質の全体的なリン酸化状態に大きな変動は無いと考えられた(図9)。一方で、癌組織では、検体間で、全体的なリン酸化状態が比較的大きく変動している事が示唆された(図9)。

現在のところ、癌組織におけるリン酸化変動の原因は不明である。今回用いた癌組織と非癌部組織は、同一の患者から摘出され、同一の条件で保存されたものである。したがって、癌組織における大きなリン酸化変動は、検体の保存条件などの単純な差異によるものではないと推測される。この癌組織におけるリン酸化修飾変動の原因を理解することは、今後、癌組織のキナーゼ活性化指標リン酸化修飾を解析するうえで重要である。

#### <大腸癌外科的切除標本の収集> (松原、星野が担当)

本年度は、約一年間で82症例の大腸癌手術標本(癌部および周辺非癌部組織)を収集した。そのうちの、23検体は摘出後1時間以内に凍結保存したものである。抗EGFR抗体薬であるセツキシマブもしくはパニツムマブが投与された症例は3例であった。昨年度に収集した70検体と合わせると、2年間で収集した検体数は152となった。そのうち、切除後1時間以内に凍結保存したものは61検体であり、抗EGFR抗体薬投薬症例は9例であった。これらの検体を使って、今後、キナーゼ活性測定による抗EGFR抗体薬効果予測法の有効性を検証する。

#### D. 考察

本研究により、キナーゼの活性化状態をLC-MS/MSで測定する技術のプロトタイプが完成した。大腸癌細胞では、抗EGFR抗体薬感受性株と耐性株でキナーゼ活性プロファイルが異なっていたことから、LC-MS/MSを使った包括的キナーゼ活性測定が抗EGFR抗体薬の効果予測法として有効である可能性が示唆された。

キナーゼ活性はin vitro kinase解析で測定することができるが煩雑であり、簡便には活性化ループのリン酸化レベルで推測される。一般に、活性化ループのリン酸化レベルは、リン酸化抗体を用いた免疫学的手法で測定されているが、我々はその検出法としてLC-MS/MSを用いた手法を新たに提唱した。本研究では、キナーゼの活性化指標リン酸化修飾がLC-MS/MSで測定できることを、リコンビナントキナーゼを使った解析から明らかにした。また、いくつかのキナーゼについては、内在性レベルでも検出できることを証明した。現時点ではまだ感度が十分ではなく、全てのキナーゼの活性化状態を内在性レベルで測定できるとは言えない。感度の改善を目的に、質量解析時のLC条件(1m長分析カラムの使用など)やキナーゼ濃縮法(ATPプローブなど)を含めた前分画法を現在検討中である。

一方で、活性型キナーゼのアフィニティー精製とLC-MS/MSを使ったキナーゼ活性測定法(方法2)は、リン酸化抗体が必要という点では既存の免疫学的手法と比べたメリットは無い。しかし、ウエスタンブロットやELISAでは区別することのできない類似性の高いキ

ナーゼに関しても、容易に区別して活性測定できる点が LC-MS/MS を用いるメリットの一つである。我々は、活性型 Erk1/2/7、Mek1/2、あるいは TAOK1/2/3 の活性化レベルをサブファミリーごとに測定することに成功した。また、本方法は比較的感度が良い。活性型キナーゼを濃縮することが、測定の高感度化に寄与しており、数十  $\mu\text{g}$  相当の細胞抽出溶液の解析で活性型キナーゼを定量することができている。理論上は、一度に複数の抗体を用いてアフィニティー精製を行えば、一度にたくさんのキナーゼの活性化状態を測定することができるため、ハイスループット性も悪くは無い。現在は複数の抗体を同時に用いたアフィニティー精製法の最適化を進めている。

抗 EGFR 抗体薬感受性および耐性大腸癌細胞株のキナーゼ活性プロファイルにより、いくつかのキナーゼの活性化状態が感受性・耐性と相関することが示唆された。最も顕著な例は、Mek1/2 の活性化についてであり、BRAF V600E 遺伝子変異型（恒常活性型）の耐性株では Mek1/2 の明らかな活性化が示された。この結果は、EGFR シグナル伝達経路において、BRAF が Mek1/2 の直上に位置する分子であることと合致する。感受性株では、PDPK1 の活性化レベルが高く、Src の活性化レベルが低かった。PDPK1 と抗 EGFR 抗体薬耐性との関係は不明であるが、Src 活性に関しては抗 EGFR 抗体薬の耐性化に寄与していると報告されている。これらの結果は、キナーゼ活性を調べれば、分子メカニズムに基づいて、大腸癌細胞を抗 EGFR 抗体薬感受性株、耐性株に選別できることを示唆している。LC-MS/MS を使ったキナーゼ活性測定法で、さらに多くの種類のキナーゼについて活性プロファイルを調べることができるようになれば、より正確な効果予測が可能になると考えている。

臨床的に、抗 EGFR 抗体薬効果予測診断を行う場合、考えられる検体は手術標本である。本研究で行った手術標本の大規模リン酸化プロテオーム解析の結果は、癌組織において、タンパク質の全体的なリン酸化状態が、検体間で大きくばらついていることを示唆していた。これは、個々のキナーゼや個々のホスファターゼの活性変動に起因するとは考えにくく、より大きな、生理的あるいは物理的事象が癌組織で生じていることを示唆している。この解析で用いた検体は厳密な保存条件管理がなされていないため、保存条件が癌組織のリン酸化に影響を与えている事も考えられる。しかし、癌組織と非癌部組織が同一患者の同一組織からセットで採取したものであることを考えると、保存条件が本質的な原因とは考えにくい。前年度と本年度で集めた手術標本は、外科的切除後から凍結保存までの時間が管理（記録）されているので、検体保存の影響に関しては、今後、それらの検体を用いて検討したい。近年では、外科的に摘出した癌組織（癌細胞）を、比較的高い成功率で培養する技術（癌細胞初代スフェロイド、CTOS）が開発されている。CTOS のような初代培養を検体とすれば、安定したキナーゼ活性解析が可能になるかもしれない。

近年では、EGFR に限らず、多くのキナーゼががん治療薬の標的候補になっている。今後、使用可能なキナーゼ標的薬が増えてくれば、がん薬物療法のオーダーメイド化が進むと期待できる。そのオーダーメイド医療で重要となるのが、患者の層別化であり、コンパ

ニオン診断である。癌細胞内のキナーゼ活性の状態で、適切な分子標的薬が選択できるとするならば、LC-MS/MS を用いたキナーゼ活性測定法が薬剤選択手段になるのではないかと期待している。

抗 EGFR 抗体薬の耐性化メカニズムとしては、KRAS、BRAF、NRAS、PI3K などの遺伝子変異が報告されているが、依然として不明な点が多い。LC-MS/MS を用いた包括的なキナーゼ活性測定は、抗 EGFR 抗体薬の耐性化に関わるキナーゼの探索、抗 EGFR 抗体薬耐性化の分子メカニズム解明においても有用なツールになると考えている。さらに、包括的なキナーゼ活性解析は、がん研究だけでなく様々な疾患の研究で応用可能であると期待している。

## E. 結論

抗 EGFR 抗体薬の効果予測を目的として、LC-MS/MS を用いた包括的なキナーゼ活性測定法を開発した。今後、臨床検体を用いた検証により、効果予測精度が証明されれば、全く新しい抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法が誕生すると考えている。

## F. 健康危険情報

特記事項は無い。

## G. 研究発表

### < 論文発表 >

1. Kume H., Muraoka S., Kuga T., Adachi J., Narumi R., Watanabe S., Kuwano M., Kodera Y., Matsushita K., Fukuoka J., Masuda T., Ishihama Y., Matsubara H., Nomura F., and Tomonaga T. (2014) Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* in press.
2. Kuga T., Nie H., Kazami T., Satoh M., Matsushita K., Nomura F., Maeshima K., Nakayama Y., and Tomonaga T. (2014) Lamin B2 prevents chromosome instability by ensuring proper mitotic chromosome segregation. *Oncogenesis* in press.
3. Sano S., Tagami S., Hashimoto Y., Yoshizawa-Kumagaye K., Tsunemi M., Okochi M., and Tomonaga T. (2014) Absolute quantitation of low abundance plasma APL1 $\beta$  peptides at sub fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J Proteome Res* in press.
4. Yamaguchi S., Zhang B., Tomonaga T., Seino U., Kanagawa A., Segawa M., Nagasaka H., Suzuki A., Miida T., Yamada S., Sasaguri Y., Doi T., Saku K., Okazaki M., Tochino Y., and Hirano K. (2014) Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique. *J Lipid Res* in press.
5. Oji Y., Tatsumi N., Fukuda M., Nakatsuka S., Aoyagi S., Hirata E., Nanchi I., Fujiki F., Nakajima H., Yamamoto Y., Shibata S., Nakamura M., Hasegawa K., Takagi S., Fukuda I., Hoshikawa T., Murakami Y., Mori M., Inoue M., Naka T., Tomonaga T., Shimizu Y.,

- Nakagawa M., Hasegawa J., Nezu R., Inohara H., Izumoto S., Nonomura N., Yoshimine T., Okumura M., Morii E., Maeda H., Nishida S., Hosen N., Tsuboi A., Oka Y., and Sugiyama H. (2014) The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor - associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int J Oncol* in press.
6. Matsushita K., Shimada H., Ueda Y., Inoue M., Hasegawa M., Tomonaga T., Matsubara H., and Nomura F. (2014) Non-transmissible Sendai virus vector encoding c-myc suppressor FBP-interacting repressor for cancer therapy. *World J Gastroenterology* in press.
  7. Nakayama Y., Saito Y., Soeda S., Iwamoto E., Ogawa S., Yamagishi N., Kuga T., and Yamaguchi N. (2014) Genistein induces cytokinesis failure through RhoA delocalization and anaphase chromosome bridging. *J Cell Biochem* 115, 763-771.
  8. Liu Y., Sogawa K., Sunaga M., Umemura H., Satoh M., Kazami T., Yoshikawa M., Tomonaga T., Yokosuka O., and Nomura F. (2014) 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.
  9. Hara Y., Kawasaki N., Hirano K., Hashimoto Y., Adachi J., Watanabe S., and Tomonaga T. (2013) Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. *Orphanet J Rare Dis* 8, 197.
  10. Kuga T., Kume H., Kawasaki N., Sato M., Adachi J., Shiromizu T., Hoshino I., Nishimori T., Matsubara H., and Tomonaga T. (2013) A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I alpha and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci* 126, 4721-4731.
  11. Shiromizu T., Adachi J., Watanabe S., Murakami T., Kuga T., Muraoka S., and Tomonaga T. (2013) Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J Proteome Res* 12, 2414-2421.
  12. Aoyama K., Yuki R., Horiike Y., Kubota S., Yamaguchi N., Morii M., Ishibashi K., Nakayama Y., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., and Yamaguchi N. (2013) Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase. *Exp Cell Res* 319, 3251-3268.
  13. Kubota S., Fukumoto Y., Aoyama K., Ishibashi K., Yuki R., Morinaga T., Honda T., Yamaguchi N., Hashimoto Y., Kuga T., Tomonaga T., and Yamaguchi N. (2013) Phosphorylation of KRAB-associated Protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by Nuclear Tyrosine Kinases Inhibits the Association of KAP1 and Heterochromatin Protein 1alpha (HP1alpha) with Heterochromatin. *J Biol Chem* 288, 17871-17883.
  14. Sogawa K., Noda K., Umemura H., Seimiya M., Kuga T., Tomonaga T., Nishimura M., Kanai F., Imazeki F., Takizawa H., Yoneda M., Nakajima A., Tsutsumi M., Yokosuka O., and

- Nomura F. (2013) Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomics Clin Appl* 7, 424-431.
15. Guo F., Hiroshima K., Wu D., Satoh M., Abulazi M., Nomura F., Yoshino I., Tomonaga T., and Nakatani Y. (2013) Prohibitin and its rapidly emerging role as a biomarker of systemic malignancies-reply. *Hum Pathol* 44, 679-680.
16. Matsushita K., Tamura M., Tanaka N., Tomonaga T., Matsubara H., Shimada H., Levens D., He L., Liu J., Yoshida M., and Nomura F. (2013) Interactions between SAP155 and FUSE-Binding Protein-Interacting Repressor Bridges c-Myc and P27Kip1 Expression. *Mol Cancer Res* 11, 689-698.

### <学会発表>

#### 招待講演

1. 足立 淳、朝長 毅：ターゲットプロテオミクス～Beyond SRM～．第 86 回日本生化学会大会，横浜，2013 年 9 月 13 日
2. 朝長 毅：質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化への挑戦．第 10 回 千葉疾患プロテオミクス研究会，東京，2013 年 11 月 9 日
3. 朝長 毅：質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化．第 11 回 北里疾患プロテオミクス研究会，神奈川，2014 年 3 月 28 日

#### 一般講演

1. 村岡 賢，久米秀明，西塚 哲，若林 剛，星野 敢，松原久裕，朝長 毅：自己抗体フェージライブラリを用いたスキルス胃癌の診断バイオマーカーの探索．第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013 年 10 月 3-5 日
2. 白水 崇，足立 淳、八木滋雄、朝長 毅：マウス同所移植モデルによる大腸癌高浸潤性細胞のプロテオーム解析．第 72 回日本癌学会学術総会，横浜，2013 年 10 月 3-5 日
3. 久家貴寿，久米秀明，川崎直子，足立 淳，星野 敢，松原久裕，齊藤洋平，中山祐治，朝長毅：大腸癌細胞における FAM83H と casein kinase I $\alpha$  を介したケラチン骨格制御機構の解明．第 36 回日本分子生物学会，神戸，2013 年 12 月 3-6 日
4. 風見隆浩，朝長 毅，川崎直子，佐藤 守，久家貴寿，松下一之，野村文夫：annexin A2 の核内蓄積は coilin を介したセントロメア損傷によって染色体不安定性に関与する．第 36 回日本分子生物学会，神戸，2013 年 12 月 3-6 日
5. 原 康洋，川崎直子，平野賢一，橋本裕希，朝長 毅：ATGL ノックアウトマウス心筋のプロテオーム解析を用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索．第 36 回日本分子生物学会，神戸，2013 年 12 月 3-6 日
6. 久家貴寿，朝長 毅，齊藤洋平，三上俊成，武田泰典，中山祐治：FAM83H 遺伝子変異に起因するエナメル質形成不全症の発症メカニズム研究．日本薬学会第 134 年会，熊本，2014 年 3 月 27-30 日

#### 国際学会

1. Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. Biomarker Discovery for Triglyceride deposit Cardiomyovasculopathy using proteome and transcriptome analysis. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease, Osaka, Japan, 19-20 April, 2013

2. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T. ATP Accessibility Screening (AAS), A High-Throughput and High-Resolution Kinase Analysis Platform for Signaling Research. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
3. Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. Proteomic and transcriptomic analysis of Triglyceride deposit Cardiomyovasculopathy for discovery of novel biomarkers. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
4. Kume H, Muraoka S, Hashimoto Y, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Fukuoka J, Kodera Y, Matsushita K, Matsubara H, Tomonaga T. Discovery and subsequent validation of biomarkers for colorectal cancer by large-scale proteomic analysis and tissue microarray analysis. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
5. Shiromizu T, Adachi J, Yagi S, Hoffman RM, Tomonaga T. Proteomic Analysis of Highly Invasive Colorectal Cancer Cells Established by Orthotopic Xenograft Mouse Model. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
6. Muraoka S, Kume H, Saitoh H, Enomoto Y, Ito Y, Nishizuka S, Wakabayashi G, Hoshino I, Matsubara H, Tomonaga T. Development of High-throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhus Gastric Cancer Biomarker. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
7. Hashiguchi K, Muraoka S, Adachi J, Sato M, Kuga T, Watanabe R, Shiromizu T, Hashimoto Y, Nagano M, Kishida M, Tomonaga T. Quantitative Phosphoproteome Analysis of Cultured Stomach Cancer Cell Lines Aimed at Development of Biomarkers for Prediction of Drug Efficacy. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> annual world congress, Yokohama, Japan, 14-18 Sep, 2013.
8. Sato M, Adachi J, Tomonaga T. Quantitative Proteome Analysis with Isotope Dimethyl Labeling to Identify TGF-beta-mediated Tumor Proteins Using the Metastatic Mouse Breast Cancer Model. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
9. Watanabe R, Hashimoto Y, Kishida M, Matsubara M, Adachi J, Tomonaga T. Phospho-profiling of mTOR inhibitor-treated renal cell carcinoma (RCC) cell lines and its application for drug response-efficacy biomarkers. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
10. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Matsubara H, Tomonaga T. A Novel Mechanism of Keratin Cytoskeleton Organization Through Casein

Kinase I Alpha and FAM83H in Colorectal Cancer: Interactome Analysis of FAM83H. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013

11. Sano S, Tagami S, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M, Tomonaga T. Absolute quantitation of plasma biomarker peptides APL1b for Alzheimer disease at fmol/ml level using SRM. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
12. Nagano M, Kuga T, Adachi J, Tomonaga T. A Kinase Activity-Estimating Method Using LC-MS/MS. Human Proteome Organization (HUPO) 12<sup>th</sup> Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 発明の名称：「大腸癌治療剤」

発明者：朝長 毅、久家貴寿、久米秀明

出願日：2013年6月11日(国際出願)

出願番号：PCT/JP2013/003669

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

##### 2. 発明の名称：「大腸がんの判定方法」

発明者：朝長 毅、久米秀明

出願日：2013年12月11日(国際出願)

出願番号：PCT/JP2013/007292

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

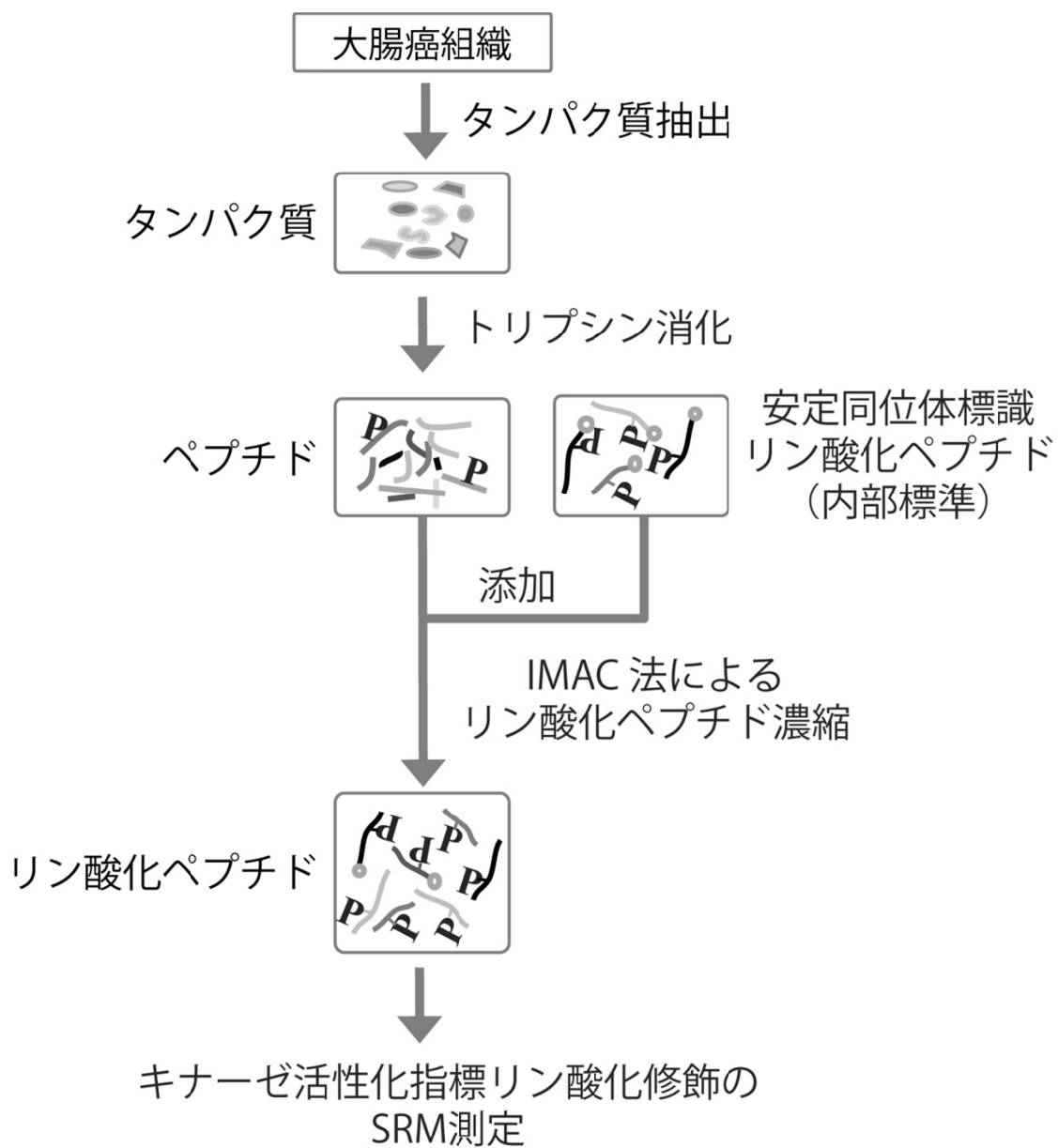


図 1. キナーゼ活性化指標リン酸化修飾の SRM 測定の流れ



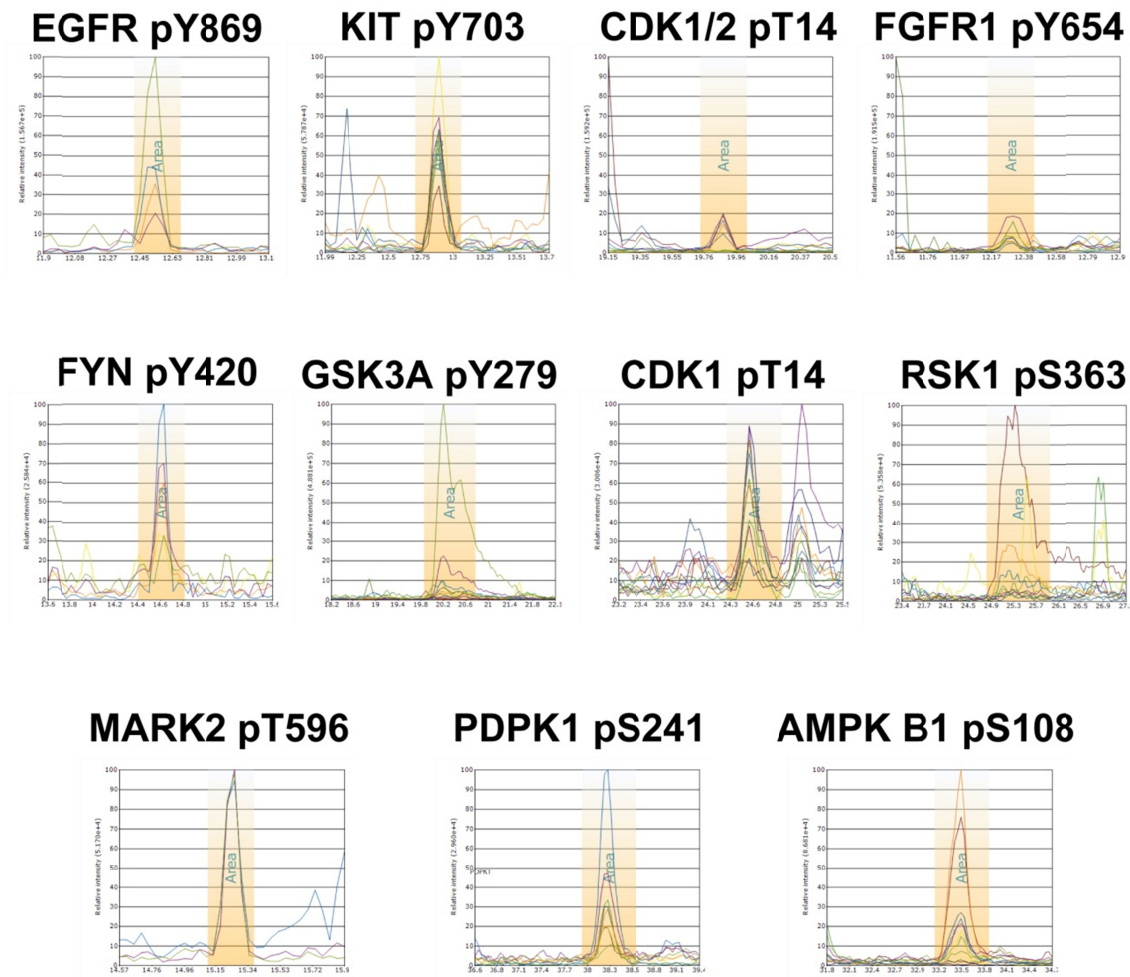


図 2. キナーゼ活性化指標リン酸化修飾のSRM 測定例

DLD1 大腸癌培養細胞株からタンパク質を抽出し、トリプシン消化後、リン酸化ペプチドをIMAC法で濃縮した。その後、三連四重極型質量解析計を用いたSRM法で60種のキナーゼの活性化指標リン酸化修飾を測定した。そのうちの11種類が検出可能であった。縦軸：MSのイオン強度、横軸：LCの時間、面積：ペプチドの存在量。それぞれに4種のチャンネルを設定し測定した。

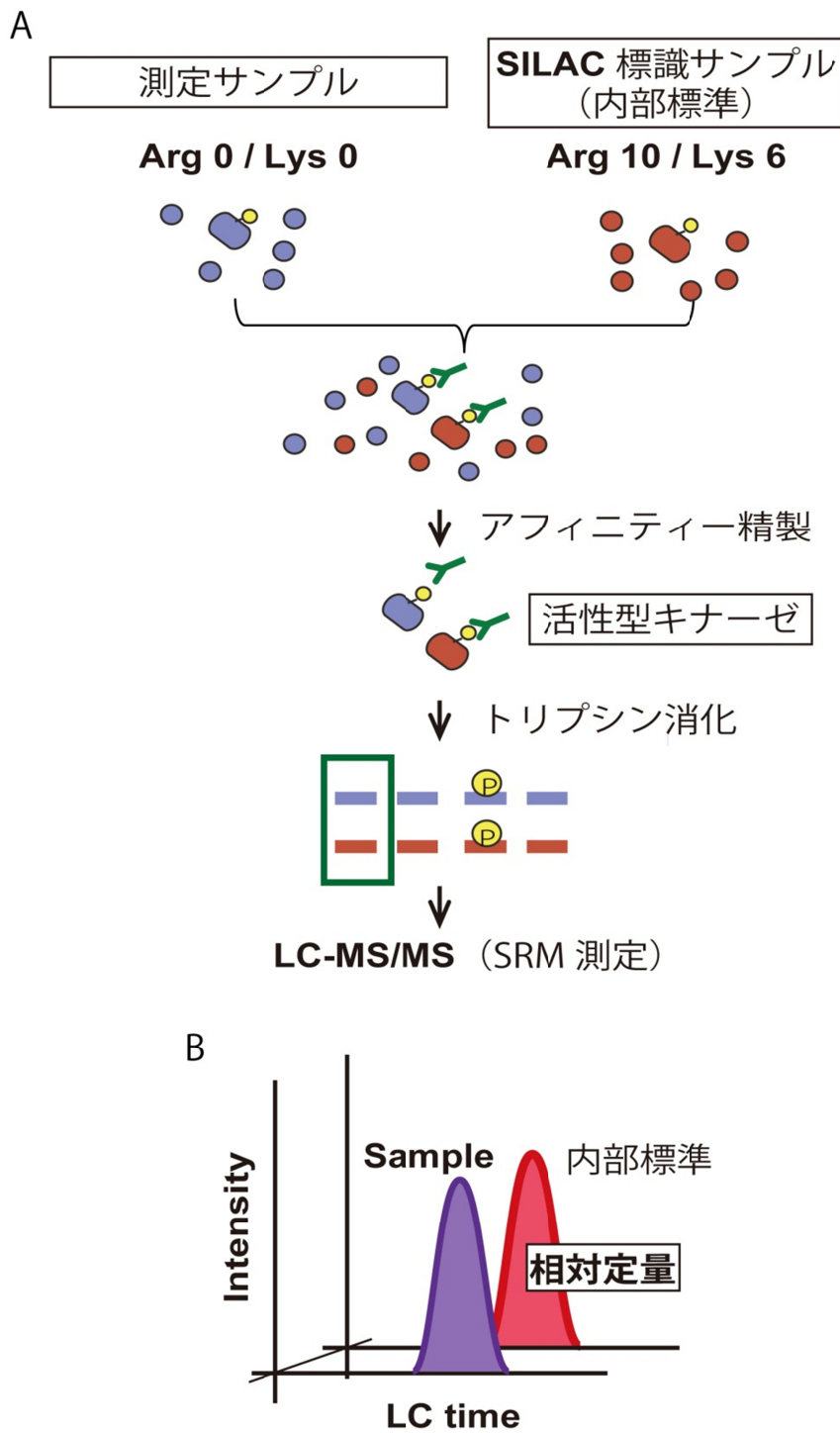


図 3. 活性型キナーゼのアフィニティー精製を利用したキナーゼ活性測定法の流れ  
 A. 測定サンプルに SILAC 標識したタンパク質溶液を添加し、活性型キナーゼ抗体でアフィニティー精製を行う。活性型キナーゼをトリプシンで消化し、特定のペプチドを SRM 法で定量する。B. 縦軸：MS のイオン強度、横軸：LC の保持時間、面積：ペプチドの存在量。内部標準サンプルとの相対面積値を計算することで、測定サンプル中の活性型キナーゼの量を定量する。

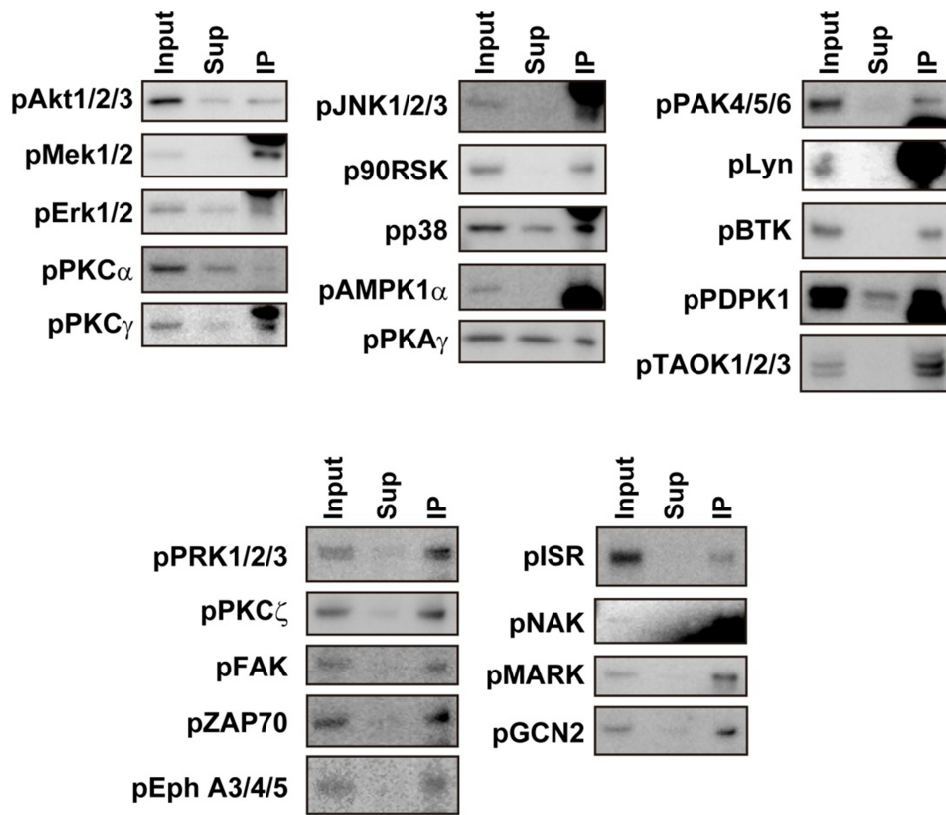


図 4. 活性化型キナーゼ抗体によるアフィニティー精製

活性化型キナーゼをアフィニティー精製し Western blot 解析を行った。免疫沈降前 (Input) と後 (Sup) の細胞抽出液、免疫沈降ビーズ (IP) に存在する活性化型キナーゼの量を比較した。24 種類の抗体がアフィニティー精製に使用可能であることが示された。一部の免疫沈降ビーズフラクションでは免疫沈降に用いた抗体のバンドが検出されている。

**A**

kinase	Cetuximabによる活性変動	kinase	Cetuximabによる活性変動
MEK1	0.32	ERK1	0.10
MEK2	0.43	ERK2	0.21
		ERK7	0.13

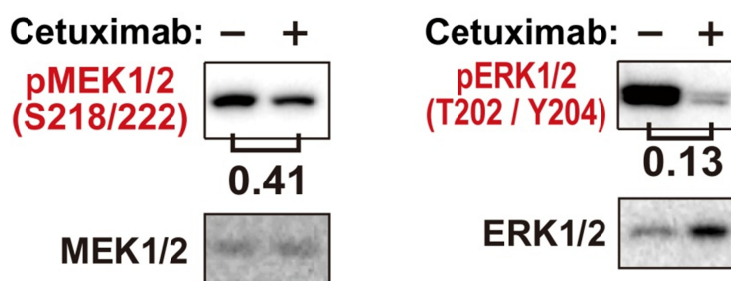
**B**

図5. 活性化型キナーゼ精製とLC-MS/MSを用いたキナーゼ活性測定

A. セツキシマブ処理したDLD1細胞と、処理していないDLD1細胞のErkおよびMekの活性化を測定した。各細胞からタンパク質を抽出し、安定同位体標識した標準サンプルを添加した。その後、活性化型Mek抗体、活性化型Erk抗体を用いたアフィニティー精製を行い、トリプシン消化した後に、LC-MS/MSで活性化型Mekおよび活性化型Erkの量を定量した。各種キナーゼについて、セツキシマブ処理による活性変動値を計算した。B. セツキシマブ処理したDLD1細胞と、処理していないDLD1細胞のウェスタンブロット解析を行った。質量解析を用いた定量とは異なり、ウェスタンブロットではサブファミリーを区別して定量することはできなかった。

**A**

kinase	Cetuximab による活性変動	Activation loop
TAOK1	1.00	adfgsasma <span style="color:red">span</span> <sup>*</sup> <span style="color:red">sv</span> gtpy
TAOK2	1.12	gdfgsasima <span style="color:red">pan</span> <sup>*</sup> <span style="color:red">sv</span> gtpy
TAOK3	1.23	adfgsasma <span style="color:red">span</span> <sup>*</sup> <span style="color:red">sv</span> gtpy
PDPK1	1.12	tdfgtakvl <span style="color:red">speskqaran</span> <sup>*</sup> <span style="color:red">sv</span> gtaq
SLK	1.06	adfgvsakn <span style="color:red">trtiqrrd</span> <sup>*</sup> <span style="color:red">sv</span> figtpy
STK10	0.99	adfgvsakn <span style="color:red">lktlqkrd</span> <sup>*</sup> <span style="color:red">sv</span> figtpy

**B**

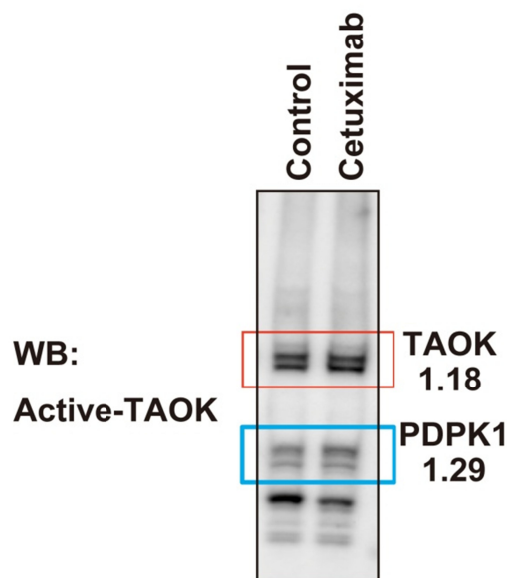


図6. 活性化型TAOKの活性測定

A. セツキシマブ処理したDLD1細胞と、処理していないDLD1細胞のTAOK活性を測定した。活性化型TAOK抗体を用いたアフィニティー精製を行い、精製物をLC-MS/MS解析した。TAOK1/2/3、PDPK1、SLK、STK10の活性を測定することができた。それぞれのキナーゼ毎に、セツキシマブ処理による活性変動値を示した。TAOK1/2/3、PDPK1、SLK、STK10の活性化ループ領域のアミノ酸配列を右に示した。リン酸化部位（\*）の後に続くアミノ酸配列が類似していた。

B. セツキシマブ処理したDLD1細胞と、処理していないDLD1細胞をウエスタンブロット解析した。TAOKとPDPK1と予測される位置に、バンドが検出された。

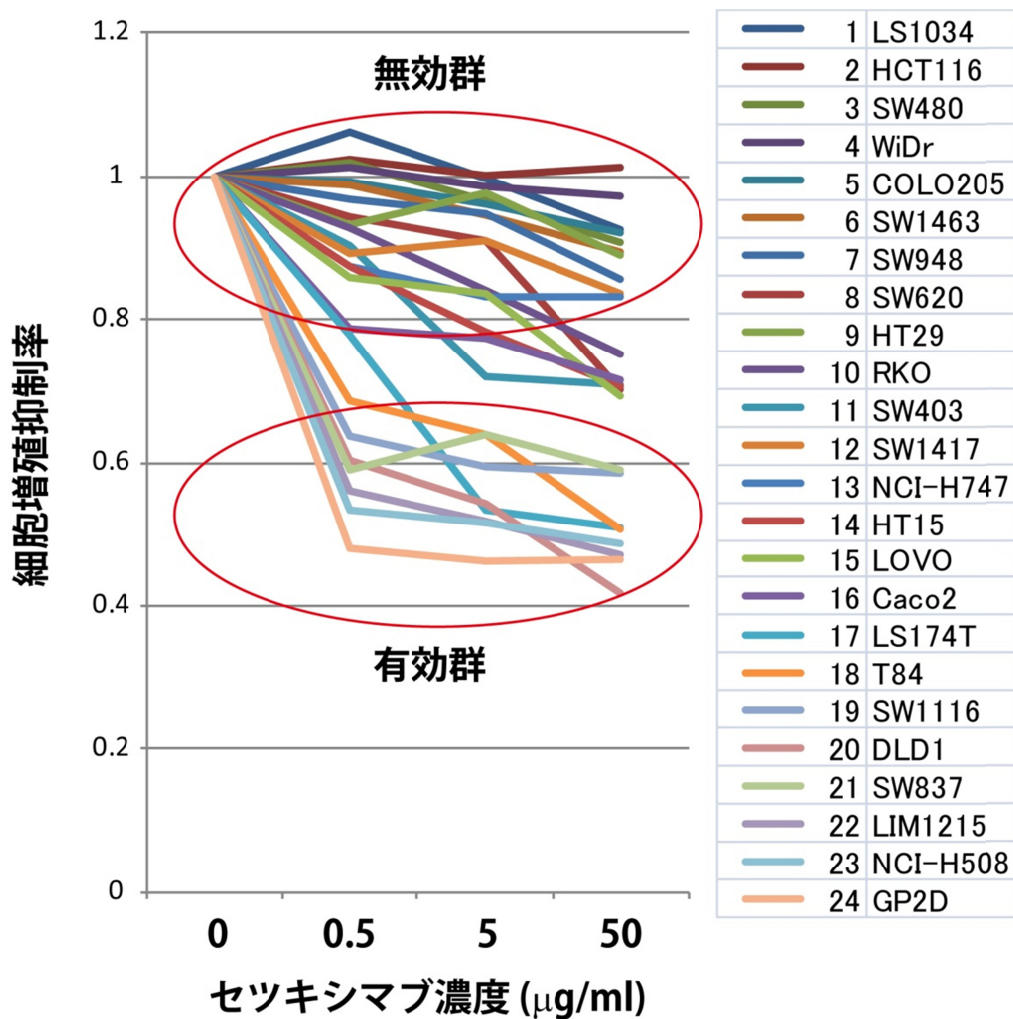


図7. 大腸癌培養細胞株のセツキシマブ感受性分類  
 24種の大腸癌培養細胞株をセツキシマブ (0, 0.5, 5, 50 μg/ml) で処理し、72時間後にWST-8試薬を用いて細胞増殖を調べた。セツキシマブを添加していない場合 (0 μg/ml) の増殖レベルを1とした時の、増殖レベルをプロットした。

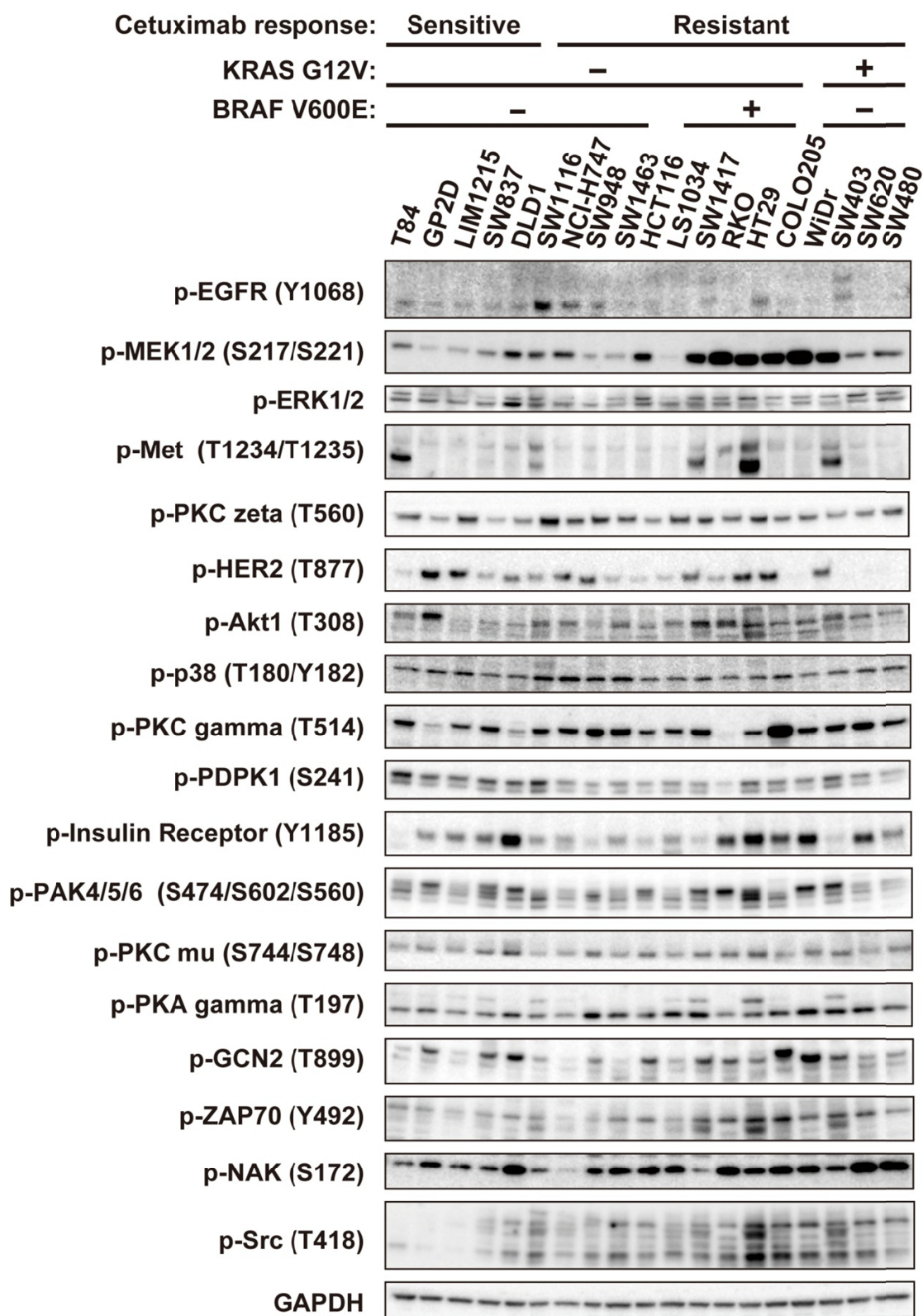


図 8. セツキシマブ耐性、感受性大腸癌細胞株のウエスタンブロット解析  
 各種大腸癌細胞株を活性化型キナーゼ抗体を用いたウエスタンブロットで解析した。

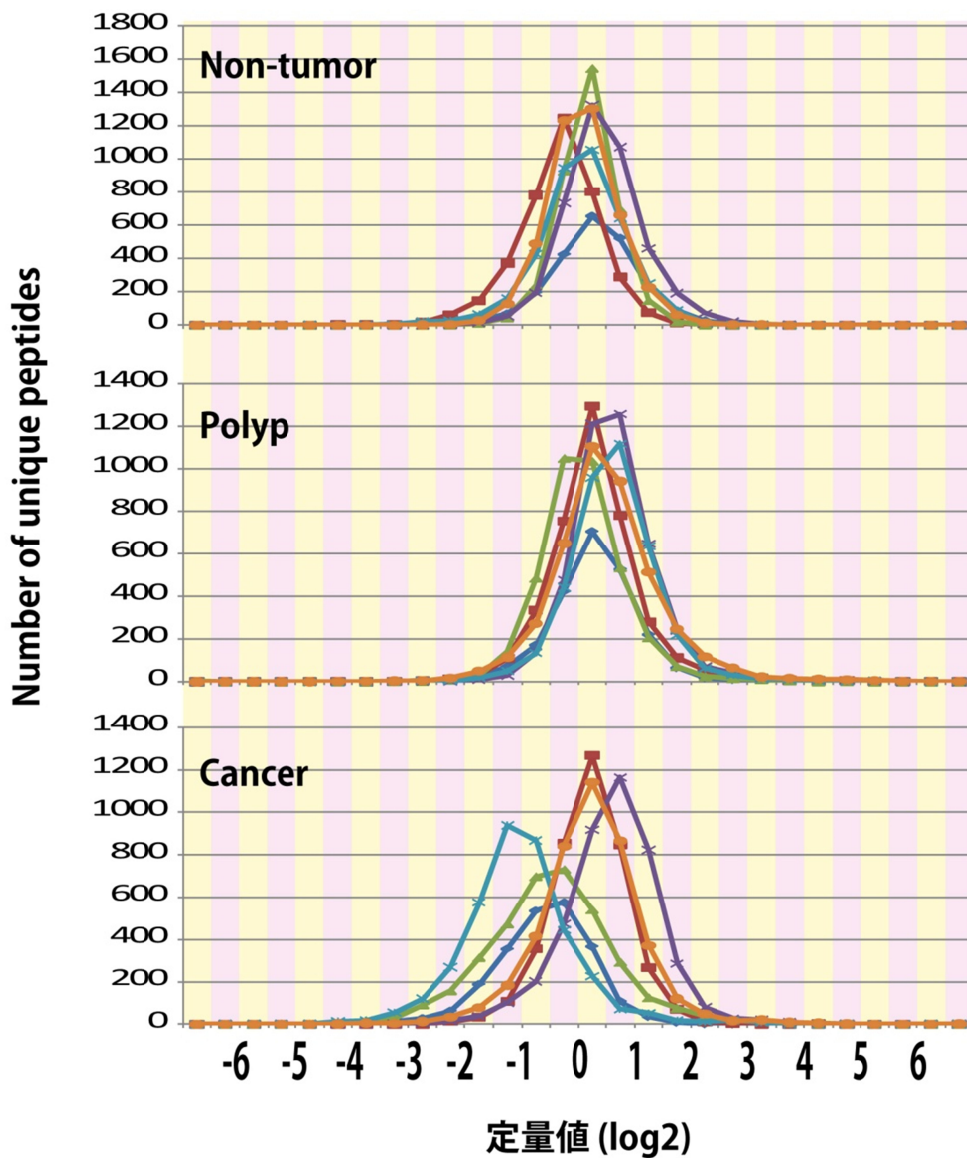


図 9. 大腸組織の大規模リン酸化プロテオーム解析

大腸癌組織 (cancer) とその周辺非癌部 (non-tumor)、および大腸ポリープをそれぞれ 6 検体ずつ定量的大規模リン酸化プロテオーム手法を用いて解析した。得られた 2000~3000 種類のリン酸化ペプチドの定量値の分布を各組織ごとにプロットした。



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）  
分担研究報告書

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測法の検証に必要な臨床  
検体の収集

研究分担者

松原久裕 千葉大学大学院医学研究院 教授  
星野敢 千葉大学医学部附属病院消化器外科学 助教

研究要旨

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による、抗 EGFR 抗体薬効果予測法の検証に必要な臨床検体を 82 検体収集した。

**A. 研究目的**

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法で、抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能かどうかを検証するために必要となる臨床検体を収集した。

**B. 研究方法**

臨床検体の収集・保存

千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科を受診する者のうち、検査結果から消化管腫瘍と診断された者の外科的切除標本を収集した。

タンパク質の安定性やキナーゼの活性化指標リン酸化修飾を維持すること目的に、標本は可能な限り 1～2 時間以内に凍結保存した。切除後から凍結までの間は、生理食塩水を含ませたガーゼに包んだ状態で、低温下（4℃）で保存した。

倫理面への配慮

< 研究対象となる個人の人権の擁護 >

研究対象患者には、人権擁護について明確に記した文書で説明を行った。特に下記の 2 点に配慮した。

1. 試料提供に同ずるか否かは対象者の自由意思であり、試料提供しない場合でも不利益を受けない。
2. いったん同意した場合でも不利益を受けることなく、いつでも撤回することができる。

本研究は、平成 17 年 4 月 1 日施行の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査委員会で承認されたプロトコル（課題

名：消化管腫瘍における遺伝子・蛋白動態解析研究）に従って行われた。

<対象者に理解を求め同意を得る方法>

患者本人に対し文書を用いて以下の項目を説明し、自由意思に基づく文書による同意を受けた。

- 1．研究概要
- 2．研究の意義・目的
- 3．研究の方法
- 4．費用について
- 5．個人情報の保護
- 6．予測される結果について、遺伝子解析結果・研究計画の開示について
- 7．研究成果の公表について
- 8．試料などの他の研究への利用について
- 9．研究協力することによる利益と不利益
- 10． 遺伝カウンセリングについて
- 11． 問い合わせ等の連絡先

<個人情報の保護の方法>

患者の個人情報が外部に洩れることのないように厳重に管理した。試料は個人情報管理者及び分担管理者を設け、連結可能匿名化することにより研究者に患者の特定ができないようにした。

## C. 研究結果

約一年間の間に 82 症例の大腸癌切除標本（癌部および周辺非癌部組織）を収集した。そのうち、23 検体は 1 時間以内に凍結保存した。抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブもしくはパニツムマブが投与された症例は 3 例であった。また、本研究においては、報告すべき倫理的問題事象は発生しなかった。

## D. 結論

昨年度に収集した 70 検体と合わせると、2 年間で収集した検体数は 152 となった。そのうち、切除後 1 時間以内に凍結保存したものは 61 検体であり、抗 EGFR 抗体薬投薬症例は 9 例であった。これらの検体を用いることで、キナーゼ活性化レベル測定による、抗 EGFR 抗体薬効果予測法の初期的検証を行う事ができる。

## E. 研究発表

### < 論文発表 >

1. Fujishiro T, Shuto K, Hayano K, Satoh A, Kono T, Ohira G, Tohma T, Gunji H, Narushima K, Tochigi T, Hanaoka T, Ishii S, Yanagawa N, Matsubara H. Preoperative hepatic CT perfusion as an early predictor for the recurrence of esophageal squamous cell carcinoma: Initial clinical results. *Oncol Rep*, 2014, 31: 1083-1088.
2. Tachimori Y, Ozawa S, Fujishiro M, Matsubara H, Numasaki H, Oyama T, Shinoda M, Toh Y, Udagawa H, Uno T. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan, 2005. *Esophagus*, 2014, 11: 1-20.
3. Tachimori Y, Ozawa S, Fujishiro M, Matsubara H, Numasaki H, Oyama T, Shinoda M, Toh Y, Udagawa H, Uno T. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan, 2006. *Esophagus*, 2014, 11: 21-47.
4. Yusup G, Akutsu Y, Mutallip M, Qin W, HU X, Komatsu-Akimoto A, Hoshino I, Hanari N, Mori M, Akanuma N, Isozaki Y, Matsubara H. A COX-2 inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 2014, 44: 1146-1152.
5. Sazuka S, Katsuno T, Nakagawa T, Saito M, Saito K, Maruoka D, Matsumura T, Arai M, Miyauchi H, Matsubara H, Yokosuka O. Fibrocytes Are Involved in Inflammation as well as Fibrosis in the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Dig Dis Sci*, 2014, 59: 760-768.
6. Akanuma N, Hoshino I, Akutsu Y, Murakami K, Isozaki Y, Maruyama T, Yusup G, Qin W, Toyozumi T, Takahashi M, Suito H, Hu X, Sekino N, Matsubara H. MicroRNA-133a regulates the mRNAs of two invadopodia-related proteins, FSCN1 and MMP14, in esophageal cancer. *Br J Cancer*, 2014, 110: 189-198.
7. Akutsu Y, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Narushima K, Hanaoka T, Tochigi T, Semba Y, Qin W, Matsubara H. S-1 Monotherapy as Second- or Third-Line Chemotherapy for Unresectable and Recurrent Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2013, 84: 305-310.
8. Matsushita K, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Levens D, He L, Liu J, Yoshida M, Nomura F. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression. *Mol Cancer Res*, 2013, 11: 689-698.
9. Akutsu Y, Matsubara H. Lymph node dissection for esophageal cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 61: 397-401.
10. Takeshita N, Hoshino I, Mori M, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Komatsu A, Jitsukawa M, Matsubara H. Serum microRNA

- expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2013, 108: 644-652.
11. Yokota H, Hoshino I, Sugamoto Y, Fukunaga T, Fujimoto H, Matsubara H, Uno T. Internal hernia associated with colostomy after laparoscopic abdominoperineal resection. *Clin Imaging*, 2013, 37: 590-592.
  12. Hoshino I, Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. *Surg Today*, 2013, 43: 467-478.
  13. Kajiwara T, Matsushita K, Itoga S, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Habara Y, Matsuo M, Nomura F. SAP155-mediated c-myc suppressor far-upstream element-binding protein-interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues. *Cancer Sci*, 2013, 104: 149-156.
  14. Akutsu Y, Uesato M, Shuto K, Kono T, Hoshino I, Horibe D, Sazuka T, Takeshita N, Maruyama T, Isozaki Y, Akanuma N, Matsubara H. The overall prevalence of metastasis in t1 esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective analysis of 295 patients. *Ann Surg*, 2013, 257: 1032-1038.
  15. Akanuma N, Hoshino I, Akutsu Y, Shuto K, Shiratori T, Kono T, Uesato M, Sato A, Isozaki Y, Maruyama T, Takeshita N, Matsubara H. Primary esophageal adenocarcinoma arising from heterotopic gastric mucosa: report of a case. *Surg Today*, 2013, 43: 446-451.
  16. Hyano K, Miura F, Amano H, Toyota N, Wada K, Kato K, Sano K, Takeshita K, Aoyagi T, Shuto K, Matsubara H, Asano T, Takada T. Correlation of apparent diffusion coefficient measured by diffusion-weighted MRI and clinicopathologic features in pancreatic cancer patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2013, 20: 243-248.
  17. Isozaki Y, Hoshino I, Akutsu Y, Akimoto A, Akanuma N, Takeshita N, Maruyama T, Matsubara H. Role of IGF1BP4 and IGF-I expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus*, 2013, 10: 79-85.
  18. Usui A, Akutsu Y, Kano Y, Shuto K, Sakata H, Yoneyama Y, Ikeda N, Oide T, Matsubara H. Diffusely infiltrative squamous cell carcinoma of the esophagus presenting diagnostic difficulty: report of a case. *Surg Today*, 2013, 43: 794-799.
  19. Ikeda N, Akutsu Y, Shuto K, Tohma T, Matsubara H. Tracheal compression by the gastric tube in esophageal cancer with ankylosing spondylitis and an analysis of the mediastinal condition in 84 cases of esophagectomy: report a case. *Surg Today*, 2013, 43: 1071-1074.
  20. Imanishi S, Shuto K, Aoyagi T, Kono T, Saito H, Matsubara H. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging For Predicting and Detecting the Early Response to Chemoradiotherapy of Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Dig Surg*, 2013, 30: 240-248.

21. Sazuka S, Katsuno T, Nakagawa T, Saito M, Saito K, Maruoka D, Matsumura T, Arai M, Miyauchi H, Matsubara H, Yokosuka O. Fibrocytes Are Involved in Inflammation as well as Fibrosis in the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Dig Dis Sci*, 2013, 59: 760-768.
22. Saito S, Harada Y, Morodomi Y, Onimaru M, Yoshida K, Kyuragi R, Matsubara H, Yonemitsu Y. Ex Vivo Generation of Highly Purified and Activated Natural Killer Cells from Human Peripheral Blood. *Hum Gene Ther Methods*, 2013, 24: 241-252.
23. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Nishimori T, Matsubara H, Tomonaga T. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I $\alpha$  and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci*, 2013, 126:4721-4731.
24. Tokita K, Seimiya M, Matsushita K, Tomonaga T, Onodera K, Ohki S, Tanizawa T, Uesato M, Shimada H, Matsubara H, Nakatani Y, Nomura F. Clathrin heavy chain is a useful immunohistochemical marker for esophageal squamous intraepithelial neoplasia. *Esophagus*, 2013, 10:193-198.
25. Maruyama T, Uesato M, Akutsu Y, Hoshino I, Semba Y, Takeshita N, Akanuma N, Isozaki Y, Horibe D, Mori M, Kono T, Shuto K, Matsubara H. High-resolution impedance manometric findings after surgery for epiphrenic diverticulum. *Esophagus*, 2013, 10: 223-229.
26. Fujishiro T, Shuto K, Shiratori T, Kono T, Akutsu Y, Uesato M, Hoshino I, Murakami K, Imanishi S, Tochigi T, Yonemori Y, Matsubara H. A case report of pulmonary tumor thrombotic microangiopathy (PTTM) caused by esophageal squamous cell carcinoma. *Esophagus*, 2013, 10: 247-251.

<学会発表>

1. 松原久裕. Staging of Esophageal Cancer from point of view in Japanese Classification of Esophageal Cancer, Japan Esophageal Society, 10th edition、第 67 回日本食道学会学術集会, 2013 年 6 月, 大阪.
2. 松原久裕. 千葉大学バイオバンクの立ち上げ、千葉大学 COE スタートアップシンポジウム「戦略的臨床検体活用による消化器癌研究拠点」特別シンポジウム, 2013 年 3 月, 千葉.
3. 松原久裕. 右開胸・開腹による 3 領域リンパ節郭清を伴う胸部食道癌手術、第 68 回日本消化器外科学会総会, 2013 年 7 月, 宮崎.
4. 松原久裕. 進行食道癌に対する治療戦略、日本放射線腫瘍学会第 26 回学術大会, 2013 年 10 月, 青森.
5. 星野敢, 阿久津泰典, 河野世章, 上里昌也, 村上健太郎, 栃木透, 小倉由起子, 高橋理彦, 渡邊裕樹, 松原久裕. 肥満症例における食道アカラシア根治術、第 26 回日本内視鏡外科学会総会, 2013 年 11 月, 福岡
6. 星野敢, 竹下修由, 松本泰典, 阿久津泰典, 村上健太郎, 赤沼直毅, 磯崎由佳, 丸山哲

- 郎，豊住武司，水藤広，高橋理彦，関野伸史，松原久裕．新規バイオマーカーとしての血中 circulating microRNA の有用性、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月，京都。
7. 星野敢，阿久津泰典，河野世章，上里昌也，村上健太郎，松原久裕．消化器外科エキスパート養成を目的とした新教育システムの構築、第 75 回日本臨床外科学会総会、2013 年 11 月，愛知
  8. 星野敢，丸山哲郎，松原久裕．消化器癌腹膜播種の病態解明と新治療戦略 ICG 含有リポソームを用いた審査腹腔鏡の有用性の基礎的検討、第 21 回日本消化器関連学会週間、2013 年 10 月，東京。
  9. 星野敢，阿久津泰典，遠藤悟史，赤沼直毅，磯崎由佳，丸山哲郎，竹下修由，豊住武司，鈴木孝禎，松原久裕．食道扁平上皮癌におけるヒストン脱メチル化酵素阻害による誘導遺伝子の検討、第 67 回日本食道学会学術集会、2013 年 6 月，大阪。
  10. 星野敢，阿久津泰典，竹下修由，豊住武司，河野世章，上里昌也，赤沼直毅，磯崎由佳，丸山哲郎，松原久裕．遺伝子，microRNA 発現情報に基づく食道癌個別化治療への取り組み、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月，宮崎
  11. 星野敢，阿久津泰典，遠藤悟史，赤沼直毅，磯崎由佳，丸山哲郎，竹下修由，豊住武司，鈴木孝禎，松原久裕．食道扁平上皮癌細胞株におけるヒストン脱メチル化阻害剤誘導遺伝子の検討、第 72 回日本癌学会総会、2013 年 6 月，大阪。
  12. 星野敢，磯崎由佳，竹下修由，赤沼直毅，丸山哲郎，豊住武司，阿久津泰典，村上健太郎，遠藤悟史，松原久裕．エピゲノム機構に基づく新たな診断・治療法の開発、第 113 回 日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月，福岡。

## F. 知的財産権の出願・登録状況

< 公開 >

1. 発明の名称：リポソーム複合体。  
発明者：岡本芳晴、田村裕、菅波晃子、林秀樹、真殿智行、松原久裕、豊田太郎。  
国際公開日：平成 25 年 4 月 11 日  
国際公開番号：WO2013/051732
2. 発明の名称：近赤外線波長特性を利用した非侵襲性医療装置  
発明者：岡本芳晴、田村裕、菅波晃子、豊田太郎、林秀樹、真殿智行、松原久裕  
公開日：平成 25 年 11 月 14 日  
公開番号：特開 2013-230211
3. 発明の名称：内視鏡用の穿刺針（届出時：内視鏡下ドリル式組織採取針）  
発明者：上里昌也、松原久裕  
出願日：平成 25 年 11 月 1 日  
出願番号：特願 2013-228683 号

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌（関連が強いものの一部）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
久家貴寿 足立淳 朝長毅 他	Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project.	J Proteome Res	12	2414-2421	2013