

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム  
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfers:  
Development of Advanced Measurement and Analysis Systems (AMED-SENTAN)

研究開発課題名：(日本語) 自己抗体マーカー探索システムの開発  
(英語) Development of a search system for autoantibody markers

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 研究チーム長 五島直樹  
所属 役職 氏名：(英語) Molecular Profiling Research Center for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial  
Science and Technology, leader, Team, Naoki Goshima

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) アレイ用タンパク質合成  
開発課題名：(英語) Protein synthesis for protein array production  
研究開発分担者 (日本語) 株式会社セルフリーサイエンス 代表取締役社長 尾澤 哲  
所属 役職 氏名：(英語) CellFree Sciences Co., Ltd. President & CEO Satoshi Ozawa  
分担研究 (日本語) エバネッセント波アレイの作製、評価および高感度自己抗体マーカー探索。  
開発課題名：(英語) Optimization and evaluation of evanescent-field fluorescence-assisted protein  
microarray system for highly sensitive detection of serum autoantibodies to tumor-associated proteins as  
biomarkers  
研究開発分担者 (日本語) 北里大学医療衛生学部 教授 佐藤雄一  
所属 役職 氏名：(英語) Department of Molecular Diagnosis, School of Allied Health Sciences, Kitasato  
University, Kanagawa, Japan. Professor. Yuichi Sato.

分担研究 (日本語) 自己抗体測定試料の収集  
開発課題名：(英語) Collection of sample for autoantibody measurement  
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人千葉大学 教授 羽田明  
所属 役職 氏名：(英語) Chiba University, Professor Akira Hata

分担研究 (日本語) 網羅的自己抗体解析の情報解析、マーカー候補自己抗体の絞り込みおよびデータベースシステム整備

開発課題名: (英語) Numerical analysis of comprehensive autoantibody measurement, selection of candidate autoantibody for marker and construction of database system

研究開発分担者 (日本語) 株式会社ダイナコム 開発部 部長 江端俊伸

所属 役職 氏名: (英語) DYNACOM Co., Ltd., General manager, Toshinobu Ebata

分担研究 (日本語) エバネッセント波測定装置の開発、評価

開発課題名: (英語) Development and evaluation of evanescent wave measurement device

研究開発分担者 (日本語) 株式会社レクザム 第1開発部 主任 内山 昇

所属 役職 氏名: (英語) Rexam Co., Ltd., Chief Engineer, Noboru Uchiyama

分担研究 (日本語) ELISA による単一有用自己抗体測定キットの開発およびEN (エバネッセント) 法による自己抗体測定キットの評価

開発課題名: (英語) Development of ELISA measuring the single clinically significant Autoantibody and Evaluation of EN-based Measurement of the Autoantibody

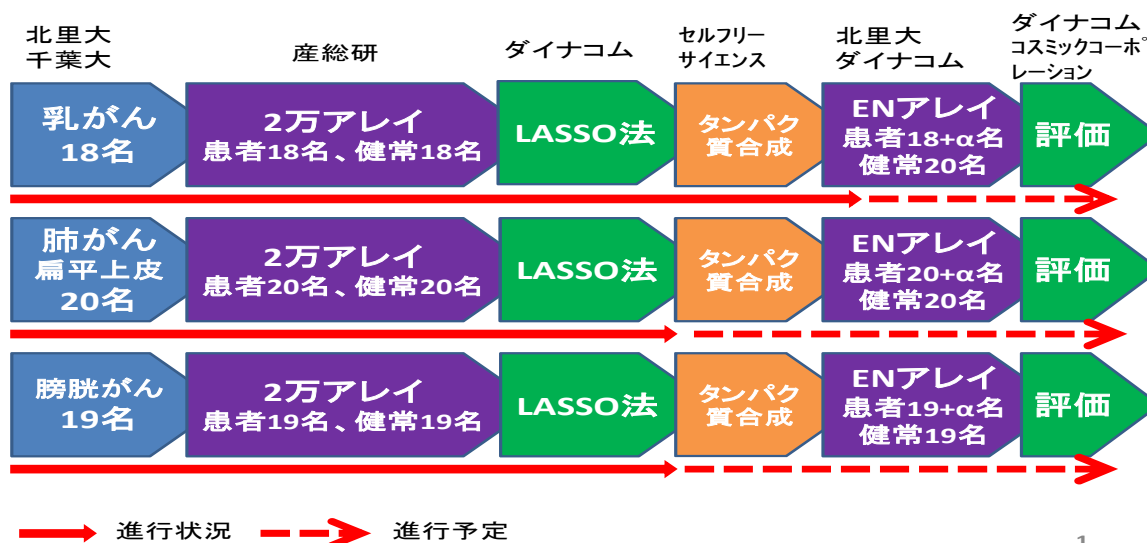
研究開発担当者 (日本語) 池本 圭輔

所属 役職 氏名: (英語) Cosmic Corporation Co., Ltd., Research & Development Sec., Product Planning Dept., Keisuke Ikemoto

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本機器開発プロジェクトでは各チームの達成目標を達成すると、各チームのアクティビティを統合した下記の図に示すように、乳がん、肺扁平上皮がん、膀胱がんの3種がん(下表)について、①血清サンプルの収集、②2万プロテインアレイの作製および測定、③LASSO法解析、④ENアレイ作製および測定、⑤がんマーカー評価を実施している。下図の赤矢印の実線部分が既に完了している過程である。

図1 3種がんの自己抗体解析のチーム連携



1

アレイ用タンパク質合成 (セルフリースサイエンス)

株式会社セルフリースサイエンスでは、高密度プロテインアレイおよびエバネッセント波アレイの作製に使用するタンパク質をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術により調製し、各アレイ開発を担当する代表機関 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) および分担機関 (北里大学、株式会社レクザム) に供給した。

自己抗体マーカー探索システムの開発 (産総研)

HORNET-NX 分注機をピンスポッターとして使用し、1536 ピンをクルードタンパク質溶液とオイルに順に浸漬し、ピン先にオイルで被覆したタンパク質溶液の液滴を形成させることが技術的に可能となった。

コムギ無細胞合成系で合成した約 20,000 種のヒトタンパク質を参画機関のセルフリースサイエンスからクルード液で供給を受け、高密度プロテインアレイ作製法によって SBS 規格プレートの GSH 修飾-aC 基板に 1536 ピンヘッドによってスポットし、14000 タンパク質/SBS 規格プレートの密度でプロテインアレイを作製した。

北里大学で取得されたがん患者 (乳がん、肺がん扁平上皮がん、膀胱がん) の血清、千葉大学で取得された健常人の血清を用いて、高密度な 2 万種プロテインアレイを用いて網羅的な自己抗体プロファイリングの実施を行った。

自己抗体測定試料の収集 (千葉大学)

川崎病罹患者の急性期で標準治療である IVIG 超大量療法を開始する前の血清、合計 70 症例分を提供した。自己抗体測定が開始されているが、試料中に極めてバックグラウンドが高くなる症例の頻度が高いことから、その要因の探索を急いでいる。

エバネッセント波アレイの作製、評価および高感度自己抗体マーカー探索 (北里大学)

エバネッセント波励起蛍光法によるアレイシステムを用いて、乳癌および肺癌患者血清中の腫瘍関連自己抗体の検出を行った。既知、新規腫瘍関連抗原に対する自己抗体が、癌患者血清中に高率に検出された。多種の抗原に対する自己抗体を同時に測定可能な本システムは、癌診断のバイオマーカー検出法として臨床的有用性が期待される。

### 網羅的自己抗体解析の情報解析、マーカー候補自己抗体の絞り込みおよびデータベースシステム整備 (ダイナコム)

Logistic Lasso を適用したマーカー候補探索プログラムを構築し、2 万種タンパク質アクティブアレイからシグナルを検出し、乳癌、肺扁平上皮癌、膀胱癌、川崎病に関するマーカー候補自己抗体を探索した。結果として、疾患ごとに 38 個の候補マーカーの絞り込みを行った。また、本研究で得られるデータを蓄積するデータベースを構築した。

### エバネッセント波測定装置の開発、評価 (レグザム)

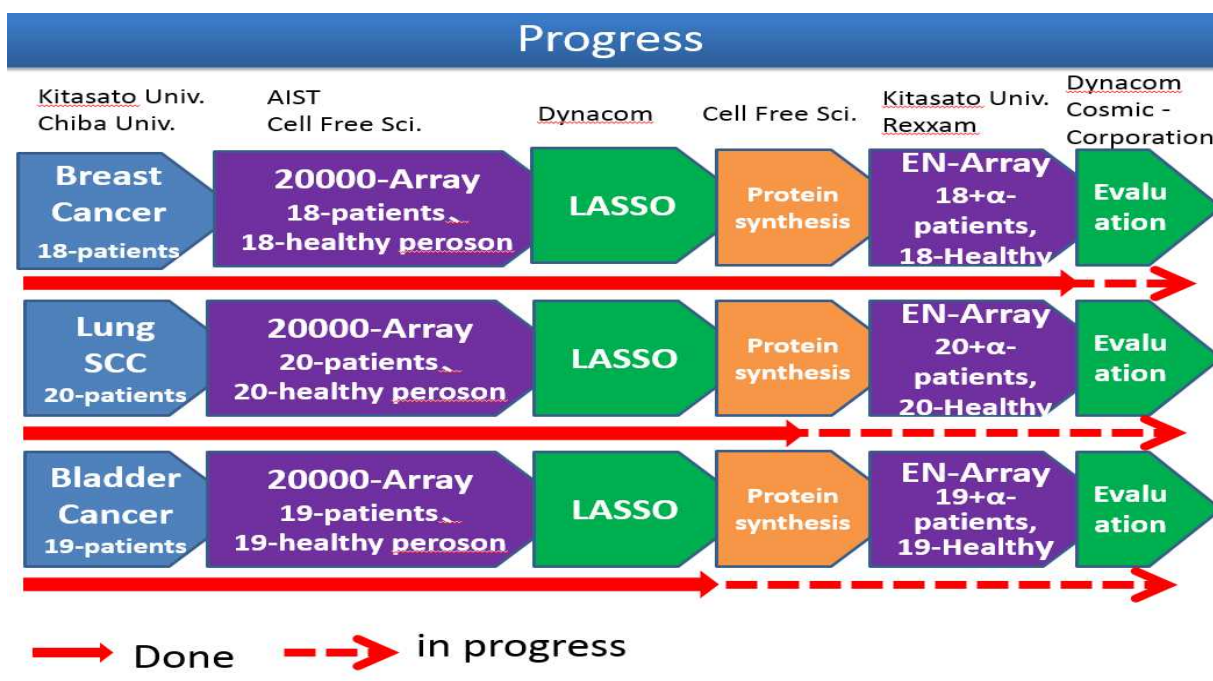
株式会社レグザムは EN 法のスループットを向上する為の取り組みとして、14Well スポット規格の開発・試作を実施した。またエバネッセントスキャナーの本体側について、北里大学における EN 法評価のスピードアップを図る為、14well 規格の自動解析を可能とするソフトウェアを開発すると共に、スキャン時間の短縮を実現した。

### ELISA による単一有用自己抗体測定キットの開発および EN (エバネッセント) 法による自己抗体測定キットの評価 (コスミックコーポレーション)

初年度の研究計画では、弊社は EN (エバネッセント) 法の市場調査、スクリーニングによって得られた自己抗体群の中から、単一で有用な自己抗体 ELISA 法の開発を担っている。従って、上記のスクリーニングが終了していないため、初年度は EN (エバネッセント) 法の市場調査をメインに行った。市場調査には類似特許の検索やスクリーニングで選別された自己抗体マーカーの特許検索も含む。

### 英語版

In this project, when achieving each team's goal, as shown in the figure below, which integrates the activities of each team, (1) collection of serum samples for three types of cancer (breast cancer, lung squamous cell carcinoma, bladder cancer), (2) fabrication and measurement of 20,000 protein-arrays, (3) LASSO method analysis, (4) EN-array fabrication and measurement, and (5) cancer marker evaluation. The solid line part of the red arrow in the figure below is already completed.



### Protein synthesis for protein array production (CellFree Science)

CellFree Science Co., Ltd. prepared proteins used for production of high-density protein arrays and evanescent wave arrays using wheat germ cell-free protein synthesis technology. CFS supplied the proteins to AIST and Kitasato University, Rexxam Co., Ltd..

### Development of a search system for autoantibody markers (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

It was technically possible to use a HORNET-NX dispenser as a pinspotter to sequentially immerse 1536 pins in a crude protein solution and oil to form droplets of oil-coated protein solution at pin tip .

Approximately 20,000 human proteins synthesized in a wheat cell-free synthesis system were supplied by crude solution from cell-free science of the participating institution and grown on a SBS standard plate GSH modified aC substrate by a high density protein array method by 1536 pin head , And a protein array was prepared at a density of 14000 protein / SBS standard plate.

Using sera of cancer patients (breast cancer, squamous cell carcinoma of the lung cancer, bladder cancer) acquired by Kitasato University, serum of a healthy person obtained at Chiba University, using a high-density 20,000 protein array Comprehensive autoantibody profiling was performed.

### Collection of sample for autoantibody measurement (Chiba University)

A total of 70 serum samples derived from acute phase of Kawasaki disease patients before the start of intravenous immunoglobulin therapy were provided. We experienced higher background during autoantibody assay with some of those samples. Now we are trying to find out the cause of the phenomenon using clinical data and antibody profile of the samples.

### Optimization and evaluation of evanescent-field fluorescence-assisted protein microarray system for highly sensitive detection of serum autoantibodies to tumor-associated proteins as biomarkers (Kitasato University)

Detection of tumor-associated autoantibodies in sera from breast and lung cancer patients were utilized using an evanescent-field fluorescence-assisted protein microarray system. Autoantibodies against known and novel tumor-associated antigens were detected at high rates in sera from cancer patients compared to healthy controls. This system, which can be detected autoantibodies against various antigens simultaneously, is expected to be clinical usefulness as a biomarker detection system for cancer diagnosis.

### Numerical analysis of comprehensive autoantibody measurement, selection of candidate autoantibody for marker and construction of database system (DYNACOM)

We have developed a computer program using Logistic LASSO (least absolute shrinkage and selection operator) for comprehensive autoantibody analysis.

And, we searched candidate autoantibody markers related to diseases (breast cancer, lung squamous cell carcinoma, bladder carcinoma and Kawasaki disease) to detect signals having high reactivity from 20,000 Human Protein Microarrays by our program.

As a result, we determined about 38 candidate markers for each disease. In addition, we built a web database system to accumulate the data obtained in this study.

### **Development and evaluation of evanescent wave measurement device (Rexxam)**

Rexam Co., Ltd. has developed and prototyped the 14-Well chip for evanescent fluorescent scanning system. It is expected to 2-fold throughput of the experiment. We also developed software that enables automatic analysis of the 14-Well chip, and realized shortening of scanning time.

### **Development of ELISA measuring the single clinically significant Autoantibody and Evaluation of EN-based Measurement of the Autoantibody (Cosmic corporation)**

In the first year's research plan, we are responsible for developing a single, useful autoantibody ELISA method from among the autoantibody group obtained by market research and screening of the EN (evanescent) method. Therefore, since the above screening has not been completed, the first year I mainly conducted the market survey of the EN (evanescent) method. Market research also includes searching for similar patents and patent search of autoantibody markers screened by screening.

### **III. 成果の外部への発表**

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 12 件)

1. Matsui A, Fujimoto J, Ishikawa K, Ito E, Goshima N, Watanabe S, Semba K. Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. FEBS Lett. 2016, 590, 1211-21.
2. Igawa S, Sato Y, Ishihara M, Kasajima M, Kusuhara S, Nakahara Y, Otani S, Fukui T, Katagiri M, Sasaki J, Masuda N. EGFR mutation genotype impact on the efficacy of pemetrexed in patients with nonsquamous nonsmall cell lung cancer. Asian Pac J Cancer Prev 2016, 17: 3249-3253
3. Kawakami T, Ogawa K, Hatta T, Goshima N, Natsume T. Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor. ACS Chem Biol. 2016, 11, 1569-77.
4. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Mitsunaga K, Tanaka A, Nakamura M, Yamakawa T, Furukawa S, Takasaka M, Goshima N, Watanabe A, Okita K, Kawasaki S, Ueno M, Kinoshita S, Masui S. OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Cell Rep. 2016, 15, 1359-68.
5. Yamakawa T, Sato Y, Matsumura Y, Kobayashi Y, Kawamura Y, Goshima N, Yamanaka S, Okita K. Screening of Human cDNA Library Reveals Two differentiation-Related Genes, HHEX and HLX, as Promoters of Early Phase Reprogramming toward Pluripotency. Stem Cells. 2016, 34, 2661-2669.

6. Mannen T, Yamashita S, Tomita K, Goshima N, Hirose T. The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL. *J Cell Biol.* 2016, 214, 45-59.
7. Sugiyama Y, Yamashita S, Uezato Y, Senga Y, Katayama S, Goshima N, Shigeri Y, Sueyoshi N, Kameshita I. Phosphorylated TandemBP: A unique protein substrate for protein phosphatase assay. *Anal Biochem.* 2016, 15, 47-53.
8. Hoshi H, Hiyama G, Ishikawa K, Inageda K, Fujimoto J, Wakamatsu A, Togashi T, Kawamura Y, Takahashi N, Higa A, Goshima N, Semba K, Watanabe S, Takagi M. Construction of a novel cell-based assay for the evaluation of anti-EGFR drug efficacy against EGFR mutation. *Oncol Rep.* 2017, 37, 66-76.
9. Ryuge S, Sato Y, Nagashio R, Hiyoshi Y, Katono K, Igawa S, Nakashima H, Shiomi K, Ichinoe M, Murakumo Y, Saegusa M, Satoh Y, Masuda N. Prognostic significance of nestin expression in patients with resected non-small cell lung cancer treated with platinum-based adjuvant chemotherapy; relationship between nestin expression and epithelial to mesenchymal transition related markers. *PLoS One* 2017, 12: e0173886
10. Igawa S, Ryuge S, Ichinoe M, Nakashima H, Otani S, Nakahara Y, Fukui T, Sasaki J, Kubota M, Katagiri M, Murakumo Y, Satoh Y, Sato Y, Masuda N. Impact of EGFR-tyrosine kinase inhibitors on postoperative recurrent non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Oncol Res Treat* 2017, 40: 1-2
11. Maejima H, Kobayashi M, Yanagita K, Hamada Y, Nagashio R, Sato Y, Amoh Y. Valosin-containing protein is a possible sero-diagnostic marker of psoriatic arthritis. *Biomed Res-India* 2017, 28: 442-446
12. Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto K, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakayama KI. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat Methods.* 2017, 14, 251-258.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 脱リン酸化解析用タンパク質基質（リン酸化 TandemBP）の開発，口頭，上里裕樹，山下翔，千賀由佳子，片山将一，五島直樹，茂里康，末吉 紀行，亀下勇，杉山康憲，第 57 回 日本生化学会 中国・四国支部例会，2016/5/28，国内。
2. Sam68 核内構造体は、HNRNPL アダプターを介して 2 つの RNase 感受性サブ構造体が融合してつくられる，ポスター，萬年太郎，山下征輔，富田耕造，五島直樹，廣瀬哲郎，第 39 回分子生物学会年会，2016/12/1，国内。

3. リンカー設計およびタンパク質翻訳過程の至適化による試験管内進化技術 (cDNA ディスプレイ法) の改良と抗 VEGF-3 本指ペプチドの創製, ポスター, 久保泰, Mohammed Naimuddin, 多田耕平, 大橋澄子, 平家勇司, 五島直樹, 第 39 回分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
4. 網羅的遺伝子発現解析による神経堤細胞への直接転換に関係する転写因子の同定, 口頭, 本橋力, 渡邊奈月, 河村徳人, 中武悠樹, 洪実, 五島直樹, 國貞隆弘, 第 39 回分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
5. 自己抗体を利用した腫瘍マーカー候補タンパク質の獲得, 口頭, 佐藤雄一, 第 67 回日本電気泳動学会 (第 55 回児玉賞受賞講演), 2016/8/27, 国内.
6. Reverse-phase protein array 法を用いた血清診断マーカーの探索, ポスター, 柳田憲吾, 萩生田大介, 朽津有紀, 井上航, 松本梨沙, 龍華信一郎, 三枝信, 村雲芳樹, 長塩亮, 鉢村和男, 佐藤雄一, 第 67 回日本電気泳動学会, 2016/8/27, 国内.
7. 癌幹細胞化させた微小乳頭肺腺癌細胞株を用いたプロテオーム解析, ポスター, 長塩亮, 萩生田大介, 朽津有紀, 柳田憲吾, 鉢村和男, 佐藤雄一, 第 67 回日本電気泳動学会, 2016/8/27, 国内.
8. ランダム免疫法で作製された単クローン性抗体の血清診断マーカーとしての有用性の検討, ポスター, 松本梨沙, 土屋紅緒, 柳田憲吾, 長塩亮, 萩生田大介, 朽津有紀, 井上航, 鉢村和男, 佐藤雄一, 第 67 回日本電気泳動学会, 2016/8/26, 国内.
9. ガラス基板を用いた Reverse-Phase Protein Array 法による肺癌関連マーカーの探索, ポスター, 萩生田大介, 柳田憲吾, 長塩亮, 鉢村和男, 龍華慎一郎, 佐藤雄一, 第 67 回日本電気泳動学会, 2016/8/26, 国内.
10. 膀胱癌新規バイオマーカーとしての Cytoskeleton-associated protein 4 の有用性, ポスター, 鈴木杏奈, 柳田憲吾, 服部学, 松本和将, 岩林正嗣, 長塩亮, 佐藤雄一, 第 67 回日本電気泳動学会, 2016/8/26, 国内.
11. 抗体作製を基盤とした肺癌の診断並びに予後予測マーカーの獲得, 口頭発表, 長塩亮, 日本プロテオーム学会 2016 年大会 (奨励賞受賞講演), 2016/7/29, 国内.
12. RPPA 法による腫瘍マーカー候補のスクリーニング, ポスター, 萩生田大介, 長塩亮, 鉢村和男, 柳田憲吾, 斎藤慶汰, 龍華慎一郎, 佐藤雄一, 第 105 回日本病理学会, 2016/5/12, 国内.
13. ショットガン・プロテオミクス法による肺腺癌由来細胞の膜タンパク質の解析, ポスター, 萩生田大介, 長塩亮, 鉢村和男, 柳田憲吾, 斎藤慶汰, 龍華慎一郎, 佐藤雄一, 第 105 回日本病理学会, 2016/5/12, 国内.
14. 肺癌における TTF-1 の細胞質局在と予後因子としての有用性について, ポスター, 長塩亮, 柳田憲吾, 萩生田大介, 鉢村和男, 土屋紅緒, 蔣世旭, 村雲芳樹, 佐藤雄一, 第 105 回日本病理学会, 2016/5/14, 国内.
15. 肺腺癌における上皮-間葉移行を標的とした血清診断マーカーの獲得, ポスター, 土屋紅緒, 蔣世旭, 長塩亮, 村雲芳樹, 佐藤雄一, 第 105 回日本病理学会総会, 2016/5/14, 国内.



(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソース，口頭，五島直樹，再生医療プログラム間連携のための情報交換会，2016/5/31，国内.
2. 再生医療のための細胞システム制御遺伝子発現リソース，ポスター，福田枝里子，鍵和田晴美，高坂美恵子，再生医療プログラム間連携のための情報交換会，2016/5/31，国内.
3. 生体防御系を解析し、体の状態をモニタリングする，ポスター，五島直樹，福田枝里子，鍵和田晴美，福井一彦，堀本勝久，テクノブリッジフェア関西 2016，2016/12/6，国内.
4. 再生医療におけるヒトタンパク質発現リソースの役割～分化誘導から移植免疫まで～，口頭，五島直樹，プロジェクト研究成果報告会，2016/12/9，国内.
5. プロテインアレイによるリン酸化活性のプロファイリング，ポスター，鍵和田晴美、高坂美恵子，福田枝里子，五島直樹，堀本勝久，LS-BT，2017/1/31，国内.

(4) 特許出願

1. 特許出願について

No	出願番号	出願日	発明の名称	出願人名
3	特願 2016-133111	2016.07.05	プロテインタグ、タグ化タンパク及びタンパク精製方法	国立研究開発法人産業技術総合研究所