

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591594

研究課題名（和文）大腸癌化学療法効果の分子生物学的評価のためのタンパク定量解析

研究課題名（英文）Quantitative analysis of protein expression for the evaluation of chemotherapy for colorectal carcinoma

研究代表者

大塚 幸喜 (OTSUKA KOKI)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50316387

研究成果の概要（和文）：

薬剤、ホルモン、放射線、サイトカインなどの刺激入力の種類やその程度に応じて、細胞内蛋白質を主体とした生化学的な連鎖反応が起こる（蛋白ネットワーク）。従って、入力刺激特異的な生化学的連鎖反応の順番を推定することができれば、最終的にその連鎖反応終了後に起こるはずの対象細胞特有の変化を高い確度で予測できることができる。しかしながら、このような時間ごとの変化を捉えるには全蛋白分画を含んだ膨大な数の時系列サンプルが必要であり、従来法では対応が難しかった。我々は、様々な入力刺激に対する細胞内反応蛋白群の時系列データを獲得するため、大量サンプル定量解析に特化したシステム（細胞ライセートマイクロアレイ、以下 RPA）を確立した。RPA の原理はドットフォーマットのウェスタンブロットであるが、我々の開発したシステムでは従来の技術では難しかった細胞溶解液や蛋白質などの高粘稠度サンプルを用いても、サンプルを基板上に高密度集積 (1,500 dot/cm<sup>2</sup>) した定量解析が可能となった。応用の範囲は広く、現在まで①癌細胞パネルを用いた蛋白分子によるプロファイリング、②大腸・卵巣癌の鑑別マーカーの同定、③DNA 障害による蛋白レベルでの変化、④細胞シグナル理論モデルの実験的検証、などを報告してきた。現在我々は RPA の臨床応用を目指して、癌細胞への薬剤添加によるシグナル伝達関連蛋白質の量的変化のパターンが抗癌剤感受性判定に有用であるかを検証している。薬剤というシグナル入力による細胞内蛋白質の量的・質的变化は多様であるが、RPA による蛋白定量モニタリングの結果を用いてシグナル反応の順番決定アルゴリズムを開発した。薬剤 3 種 (5-FU, CDDP, CPT-11) をシグナル入力として大腸癌細胞株 HCT116 に添加した 10 種類の蛋白ネットワークの解析では、どの薬剤でも一定濃度以上で 72 時間以内に細胞周期の停止やアポトーシスが誘導されるが、薬剤の種類、濃度、投与方法などにより、早期の蛋白ネットワーク分子群の反応パターンが異なっていた。RPA による蛋白定量データを蓄積することで、臨床検体の初代培養細胞の蛋白ネットワークを構成する分子の量的および経時変化による抗癌剤感受性予測が可能となると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Anti-cancer agents are generally believed to affect particular parts of molecular networks, resulting in cell cycle arrest or apoptosis, but the molecular targets of most anti-cancer drugs in current use remain unclear. At the protein level, responses may vary depending on drug type, concentration, and mode of administration. To identify which molecular targets are crucial for responses to clinically used drugs, we developed a reverse-phase protein lysate microarray system (RPA) for measuring quantitative protein dynamics induced by drug exposure. For the preliminary experiment, three clinically used drugs, CDDP, 5-FU, and CPT-11, were administered at four different concentrations and with two types of administration (sustained and tentative) to observe protein kinetics in a dose and time-dependent manner. Drug concentrations were at levels that would provide 0, 50, and 100% growth suppression, as determined by prior growth suppression assays. Among the proteins tested to date, p53, p21, CyclinD3 showed a dose-dependent protein expression following 24h-sustained administration for each of these 3 drugs, whereas, in a time course experiment, p53 protein showed a higher expression in response to CDDP and 5-FU exposure in a time-dependent manner, and a fluctuating pattern in response to CPT-11. Tentative administration (3h) resulted in a similar pattern of fluctuation in

p53 protein expression in response to 5-FU and CPT-11, whereas the p53 expression increased in extended period of time in response to CDDP. These results may suggest that protein signaling differs depending on the type of drug and its mode of administration, even if the same phenotypic consequences, such as growth suppression, are induced. We are currently performing a high-resolution dose escalation, as well as time-course studies, to monitor protein kinetics in detail, using RPAs. We believe that a combination of RPA and bioinformatics approaches will allow drug molecular targets to be reliably determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門病学

1. 研究開始当初の背景

わが国では、近年生活様式の西洋化により大腸癌罹患率が年々漸増している。1997 年度の大腸癌による死亡数は 49,739 人（全悪性新生物における 12.1%）、大腸癌の年間罹患数は 79,404 人（128.6 人/人口 10 万対）であった。2015 年のがん罹患患者数の推計では、大腸癌（結腸癌+直腸癌）患者は約 17 万人におよび、胃癌、肺癌を抜いて第 1 位となると予測されている。大腸癌の治療において主流となる治療法は外科手術であり、1995～1998 年度症例の大腸癌全国登録によると、stage I および II、IIIa、IIIb の 5 年生存割合は、結腸癌で 90.6%および 83.6%、76.1%、62.1%、直腸癌で 89.3%および 76.4%、64.7%、47.1% である。このように根治切除が可能な大腸癌の治療成績は、他の固形癌より良好な成績である。一方、切除不能あるいは再発大腸癌に対しては 5-FU(5-fluorouracil)、CPT-11(irinotecan)、L-OHP(oxaliplatin)を併用し、3 剤使い切ることで生存期間の延長をもたらし、生存期間の中央値は 20 ヶ月を超えるまでになった。現在国内では、それら key drug 3 剤の併用療法である FOLFOX(5-FU+leucovorin+L-OHP) と FOLFIRI(5-FU+leucovorin+CPT-11) が標準治療とされ、最近ではそれに分子標的薬である bevacizumab を加えた治療法が登場しさらなる生存期間の延長が期待されている。しかし、これら治療法は残念ながら全て海外のエビデンスに基づいたものであり、投与方法、投

与量の設定がはたして日本人に最適なものかどうかは不明である。使用される薬剤の種類と、投与量の探索的な評価、検証は臨床試験(Clinical trial)が用いられている。第一相試験では、安全性の評価つまり最大耐容量(maximum tolerated dose)と投与量規定毒性(Dose limiting toxicity)が決定される。第二相試験では、その薬剤の癌に対する抗腫瘍効果が評価される。第三相試験では、評価の最終段階である従来の治療法との比較検討が行われる。この様に、使用薬剤の決定、評価はヒトを対象とした許容量の判定により行われており、必ずしも生物学的な根拠があるわけではない。本申請では、大腸癌細胞株を対象に複数の薬剤を違う濃度で組み合わせた際に、蛋白レベルでどのような差が表れるかを検証し、臨床的に用いられる薬剤投与方法に生物・薬理的な指標を加え、客観的な治療法選択の根拠を示し、最終的には患者個々に合った治療法の確立を目指した。

原法の逆相蛋白ライセートアレイ(RPA)は 2001 年に Paweletz らにより、微量のサンプルから特定の蛋白質の定量を可能にする方法として報告された(Paweletz, Oncogene, 2001)。原理は、ドット方式のウェスタンブロットであり、細胞溶解液(以下ライセート)を直径数百ミクロンのドットとしてニトロセルロース膜などにブロットし、抗原特異的な一次抗体を用いて蛋白の相対的な量を測定するものである。RPA 作成に用いられるマイクロアレイヤーのスループット・再現性な

どを飛躍的に改善させるため、本申請の研究協力者である西塚らは米国マサチューセッツ州のオーションバイオシステムズ社(以下ABS社)との共同研究を開始した。現在まで、いくつかの細胞に対するストレス・刺激に対しての分子応答をRPAによって定量的に観察、独自に開発したこれらの解析アルゴリズムを用いて、いくつかの細胞シグナルに関する定量的解析を終了している(Nishizuka et al. J Proteome Res, 2008)。既に述べた高次データを扱うことに特化しているため、複数の薬剤の様々な濃度の組み合わせで変化する蛋白の挙動を検証することに優れたシステムである。大腸癌の化学療法には5種類の薬剤が承認されているが、多剤併用の濃度決定の客観的な根拠や薬剤抵抗性のメカニズムは明らかになっていなかった。薬剤反応の生物・薬理学的な検証は臨床効果を説明するためにも必須であるという認識が現われてきており、RPAの特性は非常に有効であると考えられるようになった。

RPAにより得られるデータには実験的および臨床的なアプローチによりその解析・検証がなされる。前者としては今までに発表された文献およびデータベースから細胞の分子シグナリングにおける分子応答マップ(MRPD、後述)を作成し、薬剤の反応に対して最も因果関係がありそうな分子(群)を選定する。この分子標的の理論的同定作業は網羅的な実験データがあって初めて可能となるものであり、シグナリング研究における強力なデータベースまたいわゆる *in silico* シミュレーションの格好のリファレンスとなる。後者としては、これらの標的分子の検証実験は盲目的に行うには余りにも膨大な労力・資金を要することから、RPAシステムを用いた試験管内データは、薬剤の分子標的同定に必要な不可欠な検証実験の大幅な効率化を図ることが出来ると期待される。

## 2. 研究の目的

薬剤に対する細胞内分子の反応はリン酸化などの生化学的な連鎖反応により引き起こされており、系として目的とする結果を導く方向に調整される。従って、一見薬剤によって誘導されたように見える分子レベルでの事象も、実際には表現型や薬剤への感受性とは因果関係は薄いという可能性がある。よりの確にその事象の意味するところを理解するのに高次データの解析が必要となってくる。高次データとは、ある細胞の一薬剤・一濃度・一時点の反応のデータを取るのではなく、それらを組み合わせたデータのことである(Nishizuka and Spurrier, Curr Opin Biotech, 2008)。これらからは、時間・薬剤濃度といった変数に影響される分子の動態を見ることが出来、標的をよりの確に同定す

ることが出来るようになると考えられている。様々なシグナル伝達物質が同定されているが、薬剤の標的分子同定を目的として網羅的に分子動態を観察することは、技術的な面からも非常に困難であった。この現状に対し、本申請の研究分担者である西塚らは大量のサンプルを処理でき、蛋白レベルでの定量を可能とする、高次データの取得・解析に特化したシステム(超高密度逆相蛋白マイクロレイ、以下RPA)を確立した。

高次データの解釈のために以下の方法を取る。第一段階は複数の薬剤の synergetic effect を想定した癌関連蛋白シグナル伝達経路の高次データ(後述)の獲得とする。データを可視化し、時間・濃度の関数として統計・数学的処理を行う。第二段階としては、予測される蛋白の挙動を図式化したもの(モレキュラーリアクションプレディクションディスプレイ、MRPD、後述)を作成し、常微分方程式などの数式の製作を含めた理論的推測がどの程度可能であるかを検討する。第三段階として、その理論的推測を基にして標的を絞り、臨床検体での蛋白発現レベルを免疫染色にて検討、臨床的意義を検討する。

## 3. 研究の方法

蛋白発現を薬剤反応に対する大腸癌細胞の高次データとして定量的に捉え、既知のシグナル伝達経路と比較し、関連シグナルについて検討することで薬剤に特異的に反応する分子(群)を同定することが骨子となる。はじめに細胞株を用いて代表的シグナル経路に動的挙動が見られる薬剤の濃度、暴露時間、および薬剤添加後の時間を決定し、それらの条件から高次データの獲得するために薬剤添加後の経過時間ごとの物理的に可能な最小インターバルでのサンプル採取を行う。これらのサンプルをABS社と共同で開発したマイクロレイヤーを用いてRPAを作製、特異抗体によるシグナル検出を行う。定量的に計測された蛋白発現を時間・薬剤濃度などの変数ごとの関数として解析する。既知のシグナル伝達経路と比較することにより時系列データからは反応の順番を、薬剤濃度に対する反応の違いからはその強さを高い確度で推定することが可能となる。

本申請の研究計画は2年に分ける以下の4つの段階とした。

1. 細胞生物学的予備実験 大腸癌細胞株(HCT116, HT-29, CACO-2, LoVo)に承認済薬剤(5-FU, leucovorin, L-OHP, CPT-11, bevacizumab)によるシグナルの変化を試験管内の表現型と比較するために、対数スケールでの濃度差と短時間(8時間以内)と長時間(48時間)の殺細胞効果をMTTアッセイで確認する。規定時間内での殺細胞効果が0%および100%の濃度を含む4種類の薬剤濃度を決

め、さらにウェスタンブロットにて、ストレス反応性、細胞周期関連およびアポトーシス関連蛋白群の変化について動的挙動が見られるか確認する。薬剤濃度・暴露時間の組み合わせで殺細胞効果および蛋白の動的挙動が見られたものを、RPAによる網羅的解析の対象となるものと判定し、その条件を細胞ごとの「適正ウィンドウ」とする。

2. RPA 適正ウィンドウの決定には3-5程度の時系列サンプルが採取されるのに対し、RPAの作製には同じ濃度条件下で10-20の時系列サンプルが採取される。細胞は時間ごとにペレットとして回収され、PinkBuffer(文献2)で溶解、384穴マイクロプレート内で段階希釈されプリントされるまで-80度で凍結保存される。RPAはスライド毎に一種類の一次抗体とインキュベートされTSA(チラミッドシグナル増幅)法にてその特異的抗原が検出される。二段階希釈により得られる総蛋白濃度と特異抗原のシグナルの相関からDI25解析アルゴリズムにより適正レンジが抽出され、時間・濃度・細胞毎のデータとして可視化・処理される。

3. RPA データおよびMRPDに基づく薬剤による影響分子部位の推定 分子ごとの反応の量的ピークの時間帯を観察することにより、細胞シグナルの反応の順番を、また薬剤濃度による反応からは、個々の反応の速度を推定することが出来る。これらを的確に行うために、文献検索に基づく分子反応予測を簡素に図案化したディスプレイを作成し、データ解釈時のナビゲーターとする(MRPD、モレキュラーアクションプレディクションディスプレイ)。複数の細胞株から得られる高次データから、特定の分子(群)が薬剤特異的に反応していれば、その分子(群)が何らかの因果関係を有している可能性がある。しかしながら、反応を示した分子(群)が必ずしも薬剤標的であるとの確証は無く、それが標的分子の阻害された結果によるものなのか、二次的な反応の集積によるものなのかを判別しておく必要がある。MRPDを用いて、反応した分子(群)の挙動が理論的な挙動に合致するかを確認しながら、影響分子部位を推定する。

5. 標的分子検証実験 影響分子部位をある程度絞り込むことにより、効率的な検証実験が可能となる。どのような分子が標的として推定されるのかにもよるが、siRNAによるノックアウトまたは相同組み換えによる遺伝子ノックアウト株を用いた実験系を最終目標とし、標的分子が関連していると推測される細胞シグナルを変化させ、その上で同じ薬剤の殺細胞効果の変化を観察する。また、試験管内の薬剤反応性のデータをもとに、薬剤ごとの最も相関がありそうな分子の免疫組織染色・DNAシーケンスなどの化学療法後の手術・バイオプシー検体でもよく保存されて

いる情報についての検索を行う。データについては抗癌剤反応性・非反応性の2群に分類し、contingency tableを用いた検定を行う。

#### 4. 研究成果

大腸癌細胞株(HCT116)に対するシスプラチン・塩酸イリノテカン・5-フルオロウラシルの50%細胞増殖抑制濃度より、感受性があることが確認できた。細胞増殖抑制試験にて決定された濃度を用いFACSを行ったところ、持続投与では濃度が高くなるほど細胞周期停止が誘導され、時間が長くなるとアポトーシス誘導が誘導される傾向を認めた。一過性投与では、CDDPおよびCPT-11と同様の現象を認めたが、5-FUでは終末像に変化を認めなかった。また、Western Blottingでは、薬剤投与条件にて発現蛋白の傾向が異なることを確認し、同実験条件が適切であることの根拠とした。前述した702サンプルに、マイクロアレイヤーのピンによるドットの偏りがないことを検証するための58サンプル(mix lysate)を加えた計760サンプルに対し、10回の2倍希釈を行い、スライド上にレプリカとして2回ずつのドットを行った。結果、20×50mmのニトロセルロース膜上に100・1のドットが15,200プリントされる高密度デザインとなった。以上から、同様の細胞増殖抑制の程度を示す薬剤においても、そこに至る分子経路や細胞周期の状態が異なっていることが確認された。薬剤投与後の分子プロファイルを詳細に検討することで、より精度の高い薬剤効果や感受性予測が可能となることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計26件)

1) Laparoscopy-Assisted Jejunal Resection for Leiomyoma Preoperatively Diagnosed as Jejunal Gastrointestinal Mesenchymal Tumor by Double-Balloon Endoscopy: Report of a Case. Shioi Y, Sasaki A, Otsuka K, Koeda K, Ikeda K, Wakabayashi G. Nihon Gekakei Rengo Gakkaishi (Journal of Japanese College of Surgeons) (査読・有) 33(2):155-159, 2008

2) Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis. Spurrier B, Ramalingam S, Nishizuka S. Nature Protoc (査読・有) 3(11):1-13, 2008

3) Protein and lysate array technologies in cancer research. Spurrier B, Honkanen P, Holway A, Kumamoto K, Terashima M, Takenoshita S, Wakabayashi G, Austin J, Nishizuka S. Biotechnol Adv. (査読・有)

26(4):361-9, 2008

4) Endoscopic thyroidectomy by the breast approach: a single institution's 9-year experience. Sasaki A, Nakajima J, Ikeda K, Otsuka K, Koeda K, Wakabayashi G. *World J Surg.* (査読・有) 32(3):381-5, 2008

5) DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. Kato K, Maesawa C, Itabashi T, Fujisawa K, Otsuka K, Kanno S, Tada H, Tatemichi Y, Kotani K, Oikawa H, Sugai T, Wakabayashi G, Masuda T. *International Journal of Oncology* (査読・有) 35(3):467-476, 2009

6) Endoscopic Subtotal Thyroidectomy: The Procedure of Choice for Graves' disease?. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Obuchi T, Kurihara H, Wakabayashi G. *World J Surg.* (査読・有) 33(1):67-71, 2009

7) DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. Kato K, Maesawa C, Itabashi T, Fujisawa K, Otsuka K, Kanno S, Tada H, Tatemichi Y, Kotani K, Oikawa H, Sugai T, Wakabayashi G, Masuda T. *Int J Oncol.* (査読・有) 35(3):467-476, 2009

8) Ten-year experience of totally laparoscopic liver resection in a single institution. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Takahara T, Nishizuka S, Wakabayashi G. *Br J Surg.* (査読・有) 96(3):274-9, 2009

9) CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. Habano W, Gamo T, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. *Int J Oncol.* (査読・無) 34(4):1085-1091, 2009

10) Laparoscopy-assisted pylorus-preserving gastrectomy: operative techniques and assessment of postoperative motor function by cine-MRI. Koeda K, Baba S, Takahashi M, Chiba T, Nakajima J, Nishizuka S, Sasaki A, Wakabayashi G. *8th International Gastric Cancer Congress Proceedings* (査読・無) 1(1):51-55, 2009

11) Laparoscopic surgery for splenic artery aneurysm. Obuchi T, Sasaki A, Nakajima J, Nitta H, Otsuka K, Wakabayashi G. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* (査読・有) 19(4):338-340, 2009

12) Multiple lesions of adenocarcinoma with extensive dysplasia in long-segment Barrett's esophagus treated with thoracoscopic surgery: a case report. Iwaya T, Kimura Y, Nishizuka S, Uesugi

N, Noda Y, Kimura T, Koeda K, Maesawa C, Ikeda K, Sasaki A, Wakabayashi G. *esophagus* (査読・有) 6(4):201-204, 2009

13) Quantitative assessment of gene methylation in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia using methylation-specific DNA microarray. Tamura G, So K, Miyoshi H, Honda T, Nishizuka S, Motoyama T. *Pathol Int* (査読・有) 59(12):895-899, 2009

14) Multifactorial Regulation of E-Cadherin Expression: An Integrative Study. Reinhold WC, Reimers MA, Lorenzi P, Ho J, Shankavaram UT, Ziegler MS, Bussey KJ, Nishizuka S, Ikediobi O, Pommier YG, Weinstein JN. *Mol Cancer Ther* (査読・有) 9(1):1-16, 2010

15) Risk Factors for Early Postoperative Small Bowel Obstruction After Colectomy for Colorectal Cancer. Nakajima J, Sasaki A, Otsuka K, Obuchi T, Nishizuka S, Wakabayashi G. *World J Surg.* (査読・有) (34):1086-1090, 2010

16) Risk Factors for Early Postoperative Small Bowel Obstruction After Colectomy for Colorectal Cancer. Nakajima J, Sasaki A, Otsuka K, Obuchi T, Nishizuka S, Wakabayashi G. *World J Surg.* (査読・有) (34):1086-1090, 2010

17) Concomitant laparoscopic splenectomy and cholecystectomy. Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Kimura Y, Obuchi T, Wakabayashi G. *Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques* (査読・有) 20(2):66-68, 2010

18) Tailored laparoscopic resection for suspected gastric gastrointestinal stromal tumors. Sasaki A, Koeda K, Obuchi T, Nakajima J, Nishizuka S, Terashima M, Wakabayashi G. *Surgery* (査読・有) 147(4):516-520, 2010

19) Influence of body fat in cancer patients on residual content of used fentanyl matrix patches. Chiba T, Kimura Y, Takahashi H, Tairabune T, Nagasawa Y, Mori K, Yonezawa Y, Sugawara A, Kawaguchi S, Kawamura Hi, Nishizuka S, Kudo K, Fujiwara K, Ikeda K, Wakabayashi G, Takahashi K. *Palliative Care Research* (査読・有) 5(2):206-212, 2010

20) Laparoscopy-assisted major liver resections employing a hanging technique: the original procedure. Nitta H, Sasaki A, Fujita T, Itabashi H, Hoshikawa K, Takahara T, Takahashi M, Nishizuka S, Wakabayashi G. *Ann Surg* (査読・無) 251(3):450-453, 2010

- 21) Primary retroperitoneal spindle cell liposarcoma: pathological and immunohistochemical findings. Shioi Y, Hasegawa T, Otsuka K, Fujisawa K, Itabashi T, Kimura T, Wakabayashi G, Mue Y, Uesugi N, Sugai T. *Pathol Int.* (査読・有) 60(6):472-476, 2010
- 22) Influence of body fat in cancer patients on residual content of used fentanyl matrix patches. Chiba T, Kimura Y, Takahashi H, Tairabune T, Nagasawa Y, Mori K, Yonezawa Y, Sugawara A, Kawaguchi S, Kawamura H, Nishizuka S, Kudo K, Fujiwara K, Ikeda K, Wakabayashi G, Takahashi K. *Palliative Care Research* (査読・無) 5(2):206-212, 2010
- 23) sults of laparoscopic sleeve gastrectomy as a single stage bariatric procedure in Japanese patients. Sasaki A, Umemura A, Nishizuka S, Nakajima J, Uesugi N, Wakabayashi G. *Asian Journal of Endoscopic Surgery* (査読・有) 3(4):180-184, 2010
- 24) aracterization of clinically-used anticancer agents by quantitative cellular and molecular assay platforms (細胞分子生物学的定量アッセイを用いた承認済抗癌薬反応特性の解析). Ishida K, Nishizuka S, Noda H, Matsuo T, Otsuka K, Wakabayashi G. *岩手医学雑誌* (査読・有) 62(5):363-375, 2010
- 25) racterization of clinically-used anticancer agents by quantitative cellular and molecular assay platforms (細胞分子生物学的定量アッセイを用いた承認済抗癌薬反応特性の解析). Ishida K, Nishizuka S, Noda H, Matsuo T, Otsuka K, Wakabayashi G. *岩手医学雑誌* (査読・有) 62(5):363-375, 2010
- 26) aroscopy-assisted appendectomy through an umbilical port in children. Fukuzawa T, Mizuno M, Nakajima J, Nishizuka S, Otsuka K, Nitta H, Kashiwaba M, Koeda K, Sasaki A, Wakabayashi G. *Asian Journal of Endoscopic Surgery* (査読・有) 4:11-15, 2011

[学会発表] (計 30 件)

- 1) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 秋山 有史, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 直腸癌に対する腹腔鏡下手術に求められる視野展開, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008 年 5 月 15 日, 長崎ブリックホール
- 2) 西塚 哲, Spurrier Brett, Peter Honkanen, John Austin, 若林 剛: 蛋白定量解析に基づく薬剤標的分子の同定, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008 年 5 月 15 日,

長崎ブリックホール

- 3) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 潰瘍性大腸炎に対する機能温存を目指した腹腔鏡下大腸亜全摘術の試み, 第 33 回日本外科系連合学会学術集会, 2008 年 6 月 12 日, 東京ベイホテル東急
- 4) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 秋山 有史, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 膜解剖を意識した直腸癌に対する腹腔鏡下手術, 第 63 回日本消化器外科学会総会, 2008 年 7 月 16 日, 札幌プリンスホテル
- 5) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 秋山 有史, 佐々木 章, 若林 剛: 腹腔鏡下低位前方切除におけるピットフォール, 第 21 回日本内視鏡外科学会総会, 2008 年 9 月 2 日, パシフィコ横浜
- 6) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 秋山 有史, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 開胸手術既往症例に対する腹腔鏡下大腸癌手術, 第 63 回日本大腸肛門病学会, 2008 年 10 月 17 日, ホテル日航東京
- 7) Nishizuka S, Wakabayashi G: Experimental validation of theoretical protein network models by quantitative lysate microarrays, 第 67 回日本癌学会, 10 月, 2008 年 10 月 28 日, 名古屋国際会議場
- 8) 大塚 幸喜: 進行大腸癌に対する腹腔鏡下手術の成績と課題, 第 46 回日本癌治療学会, 2008 年 10 月 30 日, 名古屋国際会議場
- 9) Nishizuka S: Predicting anti-cancer drug sensitivity by high-dimensional quantitative protein monitoring of cellular signal transduction, 2nd Annual BIT Life Science PepCon-2009, 2009 年 4 月 3 日, COEX Convention Center
- 10) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 秋山 有史, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 超音波凝固切開装置とバイポーラ鉗子を用いた安全で効率的な結腸癌に対する腹腔鏡下リンパ節郭清の手技, 第 109 回日本外科学会, 2009 年 4 月 4 日, マリンメッセ福岡
- 11) Nishizuka S, Noda H, Ishida K, Iwaya T, Wakabayashi G: Development of in vitro chemotherapy-resistant model system based on their protein kinetics in response to drug exposure, 100th American Association for Cancer Research, 2009 年 4 月 21 日, Colorado Convention Center
- 12) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 藤澤 健太郎, 木村 聡元, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 右側進行結腸癌に対する D3 郭清の腹腔鏡下手術の利点とピットフォール, 第 64 回日本消



化器外科学会, 2009年7月16日, 大阪国際会議場

13) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: Stage IV 大腸癌に対する腹腔鏡下手術の現状と成績, 第47回日本癌治療学会学術集会, 2009年10月22日, パシフィコ横浜

14) Nishizuka S, Noda H, Ishida K, Matsuo T, Iwaya T, Wakabayashi G: Protein kinetic analysis of an in vitro chemotherapy-resistant cell population in response to drug exposure, 第68回日本癌学会, 2009年10月2日, パシフィコ横浜

15) 西塚 哲, 石田 和茂, 野田 宏伸, 松尾 鉄平, 岩谷 岳, 木村 祐輔, 大塚 幸喜, 新田 浩幸, 柏葉 匡寛, 肥田 圭介, 佐々木 章, 水野 大, 池田 健一郎, 若林 剛: ライセートアレイによる蛋白質定量を用いた癌細胞薬剤反応の評価, 第47回日本癌治療学会学術集会, 2009年10月23日, パシフィコ横浜

16) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 藤井 大和, 若林 剛: 潰瘍性大腸炎に対する腹腔鏡下大腸全摘術の手技の工夫, 第64回日本大腸肛門病学会, 2009年11月7日, 福岡国際会議場

17) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 藤井 大和, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 腹腔鏡下低位前方切除術の手技とピットフォール, 第71回日本臨床外科学会, 11月, 2009, 京都

18) 大塚 幸喜: 一般演題 大腸・肛門悪性・症例報告⑥, 第22回日本内視鏡外科学会, 2009年12月4日, 京王プラザホテル

19) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 佐々木 章, 若林 剛: 腹腔鏡下大腸(重)全摘術に対するEnSealの使用経験, 第22回日本内視鏡外科学会, 2009年12月4日, 京王プラザホテル

20) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 藤井 大和, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 佐々木 章, 池田 健一郎, 若林 剛: 腹腔鏡下低位前方切除術のピットフォールと対処法, 第22回日本内視鏡外科学会, 2009年12月4日, 京王プラザホテル

21) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 藤澤 健太郎, 細井 信之, 船渡 治, 秋山 有史, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章, 若林 剛: 音声入り未編集ビデオを用いた腹腔鏡下大腸癌手術の外科教育, 第110回日本外科学会, 2010年4月9日, 名古屋国際会議場

22) 西塚 哲, 石田 和茂, 松尾 鉄平, 野田 宏伸, 岩谷 岳, Toni Hollway, Lynn Young, 若林 剛: 臨床検体由来の細胞機能情報解析, 第110回日本外科学会, 2010年4月9日, 名古屋国際会議場

23) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 西塚 哲, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章, 若林 剛: 下部直腸癌に対する腹腔鏡下低位前方切除術の定型化した術野展開, 第65回日本消化器外科学会, 2010年7月15日, 下関市民会館

24) 西塚 哲, 若林 剛: 定量生物学の癌治療への応用, 第18回日本消化器関連学会週間(JDDW2010), 2010年10月15日, パシフィコ横浜

25) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 加藤 久仁之, 西塚 哲, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章, 若林 剛: 腹腔鏡下結腸左半切除の手術手技-脾結腸曲授動のコツ-, 第8回日本消化器外科学会大会(JDDW2010), 2010年10月16日, パシフィコ横浜

26) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 箱崎 将規, 加藤 久仁之, 木村 聡元, 藤澤 健太郎, 細井 信之, 船渡 治, 秋山 有史, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章, 若林 剛: audio visual educationによる腹腔鏡下大腸癌手術の標準化, 第23回日本内視鏡外科学会, 2010年10月18日, パシフィコ横浜

27) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 加藤 久仁之, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章, 若林 剛: Harmonic と EnSeal を駆使した効率的な腹腔鏡下大腸全摘, 第23回日本内視鏡外科学会, 2010年10月20日, パシフィコ横浜

28) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 箱崎 将規, 加藤 久仁之, 木村 聡元, 西塚 哲, 木村 祐輔, 新田 浩幸, 肥田 圭介, 水野 大, 佐々木 章, 若林 剛: 直腸癌に対する安全な腹腔鏡下 TME / TSME の手技, 第72回日本臨床外科学会, 2010年11月22日, パシフィコ横浜

29) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 箱崎 将規, 加藤 久仁之, 木村 聡元, 梅邑 晃, 細井 信之, 藤澤 健太郎, 秋山 有史, 若林 剛: 弾む! 大腸手術-僕らの歩んだラパロスコピックサージェリー-腹腔鏡下大腸手術が上手になりたい!, ランチョンセミナー1-6, 第65回日本大腸肛門病学会, 2010年11月26日, アクトシティ浜松

30) 大塚 幸喜, 板橋 哲也, 木村 聡元, 箱崎 将規, 加藤 久仁之, 若林 剛: ピットフォールの経験から得た腹腔鏡下低位前方切除術の定型化, 第65回日本大腸肛門病学会, 2010年11月27日, アクトシティ浜松

〔図書〕(計2件)

1) 西塚 哲: ライセートアレイ、パイオチップ実用化ハンドブック、167-174、金子周一・堀池靖浩編、エヌティーエス、東京、2011/05/10

2) 西塚 哲：その他の検出技術-発色法、バイオチップ実用化ハンドブック、167-174、金子周一・堀池靖浩編、エヌティーエス、東京、2011/05/10

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：タンパク質サンプルの大規模収集法

発明者：西塚 哲

権利者：西塚 哲

種類：特許

番号：特願 2008-254746

出願年月日：平成 20 年 9 月 30 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://surgery.iwate-med.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 幸喜 (OTSUKA KOKI)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50316387

### (2) 研究分担者

若林 剛 (WAKABAYASHI GO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：50175064

西塚 哲 (NISHIZUKA SATOSHI)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50453311

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：