

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290054

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いたリン酸化シグナル定量系の構築と薬効予測モニタリングへの応用

研究課題名(英文) Establishment of quantitation method for proteome-based phospho-signaling pathway and its application for prediction of drug effect monitoring

研究代表者

朝長 毅 (Tomonaga, Takeshi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：80227644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在、がん治療の分子標的薬の多くはキナーゼ阻害剤であるが、薬剤感受性の違いや耐性化が問題であり、薬効予測マーカーや耐性化メカニズムの解明が必要である。本研究では、それらのキナーゼの基質のリン酸化レベルを網羅的に定量し、キナーゼ活性を予測することで、薬効予測マーカー探索及び薬剤耐性化のメカニズムの検討を行った。具体的には、肺がん治療に用いられているerlotinibに対する感受性と耐性の肺がん細胞株のリン酸化プロテオーム解析により、薬効予測マーカー候補となるリン酸化タンパク質やキナーゼを同定した。同時に、erlotinib耐性に関するキナーゼ群を同定し、それらの阻害剤を用いた検証に成功した。

研究成果の概要(英文)：Molecular target drugs such as kinase inhibitors for cancer treatment are not uniformly clinically effective, thus sorting the patients that will benefit from the treatments is critical. Moreover, acquired resistance for the drugs is also a critical problem. Therefore, the identification of mechanisms underlying the resistance is urgent need. Systematic quantification of kinase activation is potentially predictive of the response of kinase inhibitors and it can be quantitated by phosphorylation level of their substrates. In this study, we developed a large-scale phosphoproteome quantification method for the kinase substrates and applied for prediction of the kinase activities and drug response. We also examined the mechanism of drug resistance. By the phosphoproteome analysis of several lung cancer cell lines which are sensitive or resistant for the drug currently used in clinic, erlotinib, we identified several phosphoproteins and kinases which are able to predict drug sensitivity.

研究分野：プロテオミクス 分子腫瘍学

キーワード：リン酸化プロテオミクス 薬効予測 EGFR阻害剤 肺がん

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的背景

近年、がんのゲノム解析が進むにつれ、がんが分子生物学的に非常にヘテロな細胞の集団であることが明らかとなり、患者個人に適した個別化医療のニーズがますます重要になってきた。特に最近急速に開発・実用化が進んできた分子標的薬は、従来の抗がん剤に比べ、薬の感受性が人によって異なるため、分子標的薬の有効性や耐性化の予測が必須である。また、分子標的薬は非常に高価であるため、効果の少ない患者に使い続けることは、我が国の医療費を圧迫しかねない。従って、最適な個別化医療を実現する上で、分子標的薬の効果や副作用を予測するためのコンパニオン診断薬が必要だが、現状では一部の薬に限られており、またその予測も十分なものとは言えない。

例えば、大腸がんの分子標的薬セツキシマブは EGFR をターゲットとする抗体医薬であり、その効果予測に KRAS 遺伝子検査が用いられているが、KRAS 遺伝子野生型でも効果のない症例が多く、その原因として、EGFR 以外の増殖シグナル伝達経路が活性化しているためと考えられている (Roock et al. Lancet Oncol. 2010)。同様に、PI3K シグナル伝達経路は PIK3CA 遺伝子の変異によって活性化されると言われているが、実際は変異がなくても活性化する例の方が多い (Taylor et al. Cancer Cell 2010)。このように多くの増殖シグナルの活性化は、一つの遺伝子変異だけに依存するものでなく、mRNA やタンパク質レベルでの変化が原因となりうるが、現在のコンパニオン診断薬の多くは 1 種類の遺伝子変異や発現だけで薬剤の効果予測を行っており、その精度は満足できるものではない。

### (2) 国内外の研究動向および位置づけ

現在、薬剤感受性の指標となるバイオマーカーの探索が盛んに行われているが、その多くが遺伝子変異の網羅的解析である (Garnett et al. Nature 2012, Barretina et al. Nature 2012)。しかし、上述したように遺伝子変異は必ずしも最適な薬効予測マーカーとは言えず、薬剤の直接のターゲットであるタンパク質レベルでのバイオマーカーが必要である。

特に、現在の分子標的薬のターゲットは増殖シグナルパスウェイ上のタンパク質であるため、分子標的薬の効果予測には、増殖シグナルに関わるタンパク質、すなわちリン酸化タンパク質の活性化状態を調べることが重要である。また、個々のリン酸化タンパク質の変化(点)だけでなく、リン酸化タンパク質によるシグナルネットワークの異常を空間的かつリアルタイムに捉える必要があると考える。それができれば、最適な治療法の選択がリアルタイムに可能となり、理想的なコンパニオン診断薬になり得る。本研究で

は、次世代プロテオミクス技術を使って、リン酸化タンパク質シグナルネットワーク全体の変動をリアルタイムにモニターできる薬効予測システムの構築を目指しており、このような研究は世界的に見てもほとんど行われていない。

近年のプロテオミクス、特に翻訳後修飾の解析技術の進歩には目覚ましいものがあり、今や一度に数万種類のリン酸化部位の同定が可能になった。しかし、リン酸化プロテオミクスのバイオマーカーへの応用はほとんど報告がなく、特に薬剤感受性の解析は最近いくつか散見されるのみである (Andersen et al. Sci Transl. Med. 2010, Alcolea et al. Mol Cell Proteomics 2012, Klammer et al. Mol Cell Proteomics 2012)。本研究はこの分野において世界をリードする立場になることが期待できる。

### (3) これまでの研究成果

申請者は平成 13 年度から一貫してがん組織を用いたプロテオーム解析を行い、新しい腫瘍マーカー候補タンパク質を多数同定してきた (Cancer Res 2003, 2005, Clin. Cancer Res 2004, Proteomics 2004, 2006, Hepatology 2008, Ann Surg Oncol 2008, Oncogene 2008, J Proteome Res 2010, Int J Cancer 2010, J Proteomics 2011)。これらの成果は、平成 16 年度より継続して採択された基盤研究や特定領域研究の研究補助金によって行われた (基盤研究 B (平成 16~23 年度)、特定領域研究 (平成 17~21 年度))。さらに、平成 20 年度からは厚労科研費「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」(平成 20~24 年度)の研究拠点として、11 台の次世代質量分析計を駆使して、種々のがん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析を行ってきた。その成果として、iTRAQ 法や SILAC 法を用いた大腸がん、乳がんのバイオマーカー探索および SRM/MRM を用いた大規模なタンパク質、リン酸化タンパク質の定量を行い、特許出願並びに論文発表を行った (Muraoka et al. J Proteome Res 2012a, b, Narumi et al. J Proteome Res 2012, Shiromizu et al. J Proteome Res revised, 日経新聞 2012 年 8 月)。これまで確立した大規模リン酸化プロテオーム解析技術を、薬剤効果予測モニタリングシステムの構築に発展させていくつもりである。

## 2. 研究の目的

(1) リン酸化プロテオミクスと SRM/MRM による定量プロテオミクスを用いて、細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質を抗体を用いずに大規模同時定量するシステムを構築し、細胞内シグナルの活性化状態の全体像をリアルタイムに定量する測定系を確立する。

(2) その測定系を用い、種々の分子標的薬

の薬効予測および耐性化のモニタリングに応用する。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化ペプチドの同定とそのデータベース作製

種々のがん培養細胞を増殖因子 (EGF、TGF、インスリン等) で刺激後、経時的に変化する細胞中のリン酸化タンパク質およびそのリン酸化サイトを質量分析計を用いて同定する。細胞中の微量なリン酸化タンパク質のプロテオーム解析のためには、試料中からリン酸化ペプチドを濃縮して回収する必要があるが、本研究では Fe<sup>3+</sup>イオンとリン酸基の親和性を利用した Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) 法を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行う。また、リン酸化タンパク質発現の経時的変化の解析は、比較したいサンプルをそれぞれ異なる同位体でラベルする SILAC 法を用いて行う。

具体的には、異なる時間増殖因子で刺激した培養細胞を別々の安定同位体標識でラベルし、それぞれの細胞から抽出したタンパク質をトリプシンで消化後、IMAC 法を用いてリン酸化ペプチド濃縮、陽イオン交換クロマトグラフィーで分画し、次世代質量分析計 LTQ-Orbitrap velos LC-MS/MS を用いてリン酸化ペプチドを同定する (研究分担者: 京都大学石濱、研究協力者: 医薬基盤研足立、久家、白水、松原、渡部、渡邊)。同定されたリン酸化ペプチドの中から、増殖シグナルに関与するリン酸化ペプチドを絞り込み、その MS 情報を収集してデータベース化する。

(2) 正確な臨床情報が付加された「高品質な」検体の収集と保存

プロテオーム解析を行う場合、解析の対象となる臨床検体が正確な診断の下に採取され、適切に保存されていることが不可欠である。がん診療を行っている公的病院 (千葉大学附属病院、癌研有明病院) との連携のもと、種々の分子標的薬の効果判定が行われた乳がん、大腸がん症例原発巣の新鮮手術組織検体を収集する。また、それに付随する正確な臨床情報も収集する (研究分担者: 千葉大学松原、連携研究者: 癌研有明病院 長山)。

(3) SRM/MRM を用いた細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量法の確立

上記の解析で同定されたリン酸化ペプチドの定量法を確立する。最近、抗体を用いずに、質量分析計を用いた定量法 (SRM/MRM) が開発され、特に抗体作製が難しいリン酸化タンパク質の発現解析に威力を発揮する。

SRM/MRM は、特定の質量の親イオンを選択的に破壊し、生成した娘イオンの中のさらに特定イオンのみを検出するため、複雑なサンプル内から標的とするタンパク質由来のペプチドを高感度に検出することができる。

同定されたリン酸化ペプチドの質量分析計による解析結果から、それぞれのペプチドに対する最適のトランジション (親イオンと娘イオンのペア) を選択し、定量に用いる。また、内部標準として、ターゲットペプチドの安定同位体標識ペプチドを合成し、それを分析対象試料に一定量添加して、内在性ペプチドのピークの面積値と比較することで、ターゲットペプチドの絶対定量が可能である。

申請者は、上記の方法を用いて、乳がん組織中で同定されたリン酸化ペプチドの SRM/MRM を用いた大規模定量系の確立を行ってきた (Narumi et al. J Proteome Res 2012, Shiromizu et al. J Proteome Res revised)。その経験を生かして、細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量系を確立する (研究協力者: 医薬基盤研足立、久家、白水、松原、渡部、渡邊)。

(4) 阻害剤による細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量解析

上述の SRM/MRM を用いたリン酸化シグナルタンパク質の大規模定量法を用い、種々の阻害剤がどのようなシグナルパスウェイを抑制するかを *in vitro* の実験系で調べる。種々のがん培養細胞を阻害剤 (EGFR 阻害剤、TGF 阻害剤、HER2 阻害剤等) で処理後、シグナル伝達に関わるリン酸化ペプチドを SRM/MRM を用いて定量する。例えば、EGFR 阻害剤は大腸がん治療の分子標的薬として用いられているので、EGFR 阻害剤に感受性のある大腸がん培養細胞を EGFR 阻害剤で処理後、リン酸化ペプチドの定量を行い、どのような分子が変動するか調べる (研究協力者: 医薬基盤研 久家、白水、松原、渡邊)。

(5) 薬剤耐性株を用いた薬剤効果予測マーカー群の探索および耐性化のメカニズムの検討

上記で行った解析を各種阻害剤耐性株を用いて行う。適当な耐性株が入手できない場合は、感受性株に長期間阻害剤を処理して、耐性株を作製する。阻害剤処理後の薬剤感受性株と耐性株の網羅的リン酸化プロテオーム解析を行い、耐性化に関わる新規リン酸化タンパク質の探索を行う。以上の解析結果をもとに、薬剤効果予測マーカー群を絞り込む。同時に、耐性化に重要なシグナルパスウェイを絞り込み、耐性化に関わる分子やそのメカニズムについて検討する。具体的には、リン酸化部位特異的抗体での免疫染色による細胞内での局在の観察及びリン酸化部位に変異を加えた遺伝子の導入による薬剤感受性への影響について検討する。(研究分担者: 石濱、研究協力者: 医薬基盤研 久家、白水、渡邊)。

(6) 臨床検体を用いた薬剤効果予測システムの構築

上記の培養細胞株を用いた解析で得られた薬剤効果予測システムは、必ずしも臨床に応用できるとは限らない。そこで、同様の解析をヒト乳がん、大腸がん組織を用いて行う。薬剤の効果判定が行われた症例の原発巣新鮮組織標本から抽出したリン酸化タンパク質を用いて、上述の SRM/MRM を用いたリン酸化シグナルタンパク質量及び網羅的リン酸化プロテオーム解析を行い、薬剤効果予測マーカー群を絞り込む。最終的には、*in vitro* と *in vivo* の結果を融合させることにより、最適な薬剤効果予測システムの構築を目指す。(研究協力者：医薬基盤研 足立、久家、白水、松原、渡部、渡邊)。

バイオプシーサンプル等、解析に必要な量の組織が入手できない場合は、SCID マウスに移植して増殖させたものを解析に用いる。また、検証に必要な症例数が足りない場合は研究分担者、連携研究者の関連病院等の協力を要請する(研究分担者：千葉大学 松原、連携研究者：癌研有明病院 長山)。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化ペプチドの同定とそのデータベース作製

リン酸化ペプチドの網羅的な定量において、IMAC 濃縮後の HPLC 分画の改良により、約 30,000 個のペプチドの定量化が可能となった。

また、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、リン酸化ペプチドの濃縮に、IMAC 法と抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用することで、チロシンリン酸化ペプチドの同定率を上げた。8mg の細胞抽出液を用いた場合、1 時間の解析時間で 466 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定が可能となった。これは従来の IMAC 法単独の場合と比較しても 2 倍の同定率である。さらに過バナジン酸処理でチロシンの脱リン酸化を阻害させることで、1416 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定に成功した。

さらに、リン酸化ペプチド濃縮後の分画法を、HPLC の代わりにイエローチップを用いた簡易分画法を開発した。この方法により、従来約 1 日かかっていた分画を 1 時間に短縮でき、かつ、常時約 15,000 種類のリン酸化ペプチドの定量、また約 500 種類のチロシンリン酸化ペプチドの定量ができる系を確立することができた。

これらの手法を用いて、種々のがん培養細胞を用い、細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質およびそのリン酸化サイトを網羅的に同定した。その結果、1 回の実験で 30,000 リン酸化ペプチドの定量に成功した。また、その MS 情報を収集してデータベースを作成した。

(2) 正確な臨床情報が付加された「高品質

な」検体の収集と保存

また、臨床検体を用いて上記のリン酸化タンパク質の解析を行うために、千葉大学附属病院、がん研有明病院から種々の消化器がん症例原発巣および転移巣約 30 症例の新鮮手術組織検体の収集を行った。

(3) SRM/MRM を用いた細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量法の確立

SRM/MRM を用いた細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量法の確立に関しては、SRM/MRM による細胞内リン酸化タンパク質の定量解析が予想に反して難易度が高かったため、安定同位体標識 TMT10 を用いたショットガンリン酸化プロテオミクスの手法の解析に切り替えた。

(4) 阻害剤による細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量解析

ショットガンリン酸化プロテオミクスを用いて、肺がん、子宮がん細胞株の阻害剤処理後のリン酸化タンパク質の定量を行った。また、その定量結果より、肺がん細胞株ではチロシンキナーゼ阻害剤エルロチニブ処理後の細胞内キナーゼ活性、子宮がん細胞株ではマルチキナーゼ阻害剤であるスタウロスポリン処理後の細胞内キナーゼ活性予測を行った。キナーゼ活性予測は、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)及びキナーゼに対する ATP 結合能を指標にしたキナーゼ活性化予測法に基づいて行った。

その結果、薬剤処理により、各薬剤のターゲットとして知られているキナーゼ活性の低下が認められただけでなく、未知のキナーゼ活性も変化することが確認され、これらのキナーゼ活性の変化が薬剤効果予測マーカーとなる可能性が示唆された(J Proteome Res 2014)。

(5) 薬剤耐性株を用いた薬剤効果予測マーカー群の探索および耐性化のメカニズムの検討

薬剤感受性株と耐性株を用いた薬剤効果予測マーカーの探索および検証を行う目的で、現在肺がん治療に用いられているチロシンキナーゼ阻害剤エルロチニブの薬効予測を行った。その結果、エルロチニブ感受性細胞株と耐性細胞株で発現の異なるリン酸化タンパク質及びそのリン酸化タンパク質のデータから活性が異なると予測されたキナーゼ群が同定された。これらのリン酸化タンパク質やキナーゼ活性は薬剤効果予測マーカーとして有用であると考えられた。

また、上記の解析で、エルロチニブ耐性細胞株で発現の高いリン酸化タンパク質及び活性が高いと予測されたキナーゼは耐性メカニズムに関与していると考えられる。そこ

で、それらのキナーゼに対する阻害剤を用いて、マーカーキナーゼが本当に薬剤耐性に関与しているかどうかの検証を行った。それらの阻害剤を耐性株に用いたところ、いくつかのキナーゼ阻害剤処理によって細胞株の増殖が抑えられた。このことから、それらのキナーゼが肺がん細胞株のエルロチニブ耐性に関与していることが検証できた。

リン酸化プロテオミクスを用いて薬剤効果予測マーカー群の探索、耐性化に関与するキナーゼの同定とその検証に成功した例は世界的にみても初めての成果である。この解析系を臨床検体とくに薬剤耐性症例の組織バイオプシーに応用できれば、画期的な耐性克服治療法の選択が可能になると考えられる。

#### (6) 臨床検体を用いた薬剤効果予測システムの構築

研究計画では、手術組織標本等の臨床検体を用いた解析を予定していたが、手術中の阻血などの操作や摘出から組織採取までの時間などがタンパク質リン酸化に影響を及ぼし、生体内でのリン酸化状態を反映しない可能性が考えられた。そこで、臨床検体を用いた解析を行う前に、臨床検体に近い初代培養細胞を用いて解析することとした。

肺がん組織検体約 20 例から樹立した。これらの薬剤効果予測マーカー、薬剤耐性関連キナーゼの探索については、現在進行中である。

#### 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 30 件)

1. Adachi, J., Narumi, R., and Tomonaga, T.\*. (2016) Targeted Phosphoproteome Analysis Using Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM). *Methods Mol Biol* 1394, 87-100. DOI: 10.1007/978-1-4939-3341-9\_7
2. Narumi, R., and Tomonaga, T.\*. (2016) Quantitative Analysis of Tissue Samples by Combining iTRAQ Isobaric Labeling with Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM). *Methods Mol Biol* 1355, 85-101. DOI: 10.1007/978-1-4939-3049-4\_6
3. Kazami, T., Tomonaga, T.\*. (8 人中 7 番目) (2015). Nuclear accumulation of annexin A2 contributes to chromosomal instability by coilin-mediated centromere damage. *Oncogene* 34, 4177-4189. DOI: onc2014345 [pii] 10.1038/onc.2014.345
4. Kubota, S., Tomonaga, T.\*. (8 人中 8 番目) (2015). Role for Tyrosine

Phosphorylation of A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8) in Its Dissociation from Chromatin and the Nuclear Matrix. *J Biol Chem* (IF:4.6) 290, 10891-10904. DOI: M115.643882 [pii] 10.1074/jbc.M115.643882

5. Adachi, J., Tomonaga, T.\*. (6 人中 6 番目) (2014). Proteome-Wide Discovery of Unknown ATP-Binding Proteins and Kinase Inhibitor Target Proteins Using an ATP Probe. *J Proteome Res.* 13:5461-70. doi: 10.1021/pr500845u
6. Kume, H., Matsubara, H., Tomonaga, T.\*. (15 人中 15 番目) (2014). 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, 1471-1484. doi: 10.1074/mcp.M113.037093
7. Sano S., Tomonaga T. (7 人中 7 番目) (2014). Absolute quantitation of low abundance plasma APL18 peptides at sub fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J Proteome Res* 13, 1012-20. DOI: 10.1021/pr4010103
8. Kuga, T., Matsubara, H., and Tomonaga T. (10 人中 10 番目) (2013). A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I alpha and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci* 126, 4721-31. DOI: 10.1242/jcs.129684
9. Kubota, S., Tomonaga T. (12 人中 11 番目) (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. DOI: 10.1074/jbc.M112.437756

[学会発表](計 69 件)

1. 朝長 毅: 定量プロテオミクスの創薬及び個別化医療への応用 第 13 回 神戸ポートアイランド創薬フォーラム 2016 年 1 月 26 日 神戸臨床研究情報センター
2. 朝長 毅: プロテオミクスを用いたバイオマーカー探索と Precision Medicine への応用 第 44 回 京阪泌尿器腫瘍セミナー 2016 年 2 月 8 日 大阪
3. 朝長 毅: 定量プロテオミクスの医療への応用 第 42 回 BMS カンファレンス 2015 年 7 月 6 日~8 日 岐阜グランド

- ホテル
4. 朝長 毅: 定量プロテオミクスを用いた疾患バイオマーカー探索とその医療への応用 日本プロテオーム学会 2015 年会 2015 年 7 月 23 日~24 日 くまもと森都心プラザ
  5. Tomonaga T, Kume H. Verification of predictive biomarker candidates of colorectal cancer metastasis in serum extracellular vesicles by selected reaction monitoring based targeted proteomics. International Extracellular Vesicles Conference, Washington DC, USA, 23-26 April, 2015
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 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
  14. 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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 4 件)

1. 発明の名称:「ペプチド又はタンパク質の分画方法」  
発明者:朝長 毅、足立 淳、宮崎将太  
出願日:2015 年 7 月 3 日  
出願番号:特願 2015-134482  
出願人:ジーエルサイエンス 株式会社 国内
2. 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  
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) 国内
3. 発明の名称:「大腸癌治療剤」  
発明者:朝長 毅、久家豊寿、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 国外
4. 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 国外

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)  
国立研究開発法人医薬基盤研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー  
研究者番号:80227644

##### (2)研究分担者

石濱 泰 (ISHIHAMA, Yasushi)  
京都大学・薬学部・教授  
研究者番号:30439244

松原 久裕 (MATSUBARA, Hisahiro)  
千葉大学・医学研究院・教授  
研究者番号:20282486

##### (3)連携研究者

長山 聡 (NAGAYAMA, Satoshi)  
公益財団法人がん研究会・有明病院消化器外科・医長  
研究者番号:70362499