

総 説

病態プロテオーム解析の展望 Proteomics toward disease analysis

西村 俊 秀¹⁾ 加藤 治 文²⁾
Toshihide NISHIMURA, Harufumi KATO

¹⁾ 東京医科大学臨床プロテオーム研究寄付講座
Clinical Proteome Center, Tokyo Medical University
²⁾ 東京医科大学外科学第一講座
Department of Surgery, Tokyo Medical University

はじめに

約 30,000 ヒト遺伝子から発現される蛋白質の種類は 200,000 以上ともいわれる。蛋白質の種類と発現量はヒトの状態により大きく変化する。当然、病気が健康かにより異なる。蛋白質は細胞内分子機械の主要な部品として、複合体を形成したり、他の複合体へメッセージを送ったり、細胞分裂を制御したり、組織の成長をコントロールしたり、酸素の運搬や感染を防御したりして、体の主な機能を担っている。

ゲノム解読プロジェクトは、予想外にも一応の早期終結をみたが、ポストゲノムの中心となる蛋白質とその機能の解明はもっと困難なテーマである。ごく最近までは、ある時点で発現している蛋白質全体のスナップショットをとることは不可能と考えられていた。このスナップショットは、“Proteins expressed in complement of genome” という意味の造語として PROTEOME (プロテオーム) と名づけられたのは 1995 年である¹⁾。今日のプロテオーム解析技術の最先端は、ゲノム解読による成果の恩恵を十分に活用できる状況に到達しようとしている。すなわち、ヒト疾患のメカニズム解明や治療に関する臨床研究に適用で

きるレベルにプロテオミクスは進展しており、この臨床プロテオミクスの社会的意義はますます大きくなってきている。本総説では、病態プロテオミクスとその技術的展開につき解説する。

I. 病態プロテオミクスとは

人が病気になったとき、遺伝子にもどってこれらをすぐに変えることは困難である。もちろん、遺伝子治療は幾つかの疾患について新たな光明を投げているが、心臓疾患、精神疾患、感染症、また多くの生活習慣病といわれるような多因子性疾患についてはほぼ無力と思える。遺伝子をどうにかするよりも、疾患メカニズムを担う機械としての蛋白質を制御するほうが論理的である。従って、医療において蛋白質ほど重要な分子は他にはない。

プロテオミクス研究は、発現プロテオミクス (expression proteomics) と細胞マップ・プロテオミクス (cell map proteomics) に大きく分けられる²⁾。発現プロテオミクスは、異なった状態にある組織、細胞、血漿などにおいて発現されている翻訳後修飾を含む蛋白質群の量と種類を定量・比較する。これに対して、細胞マップ・プロテオミクスは、蛋白質相互作用の場所・

2004 年 9 月 16 日受付、2004 年 9 月 22 日受理

キーワード: プロテオーム解析、臨床プロテオミクス、質量分析、インフォマティクス

(別冊請求先: 〒163-0217 東京都新宿区西新宿 2-6-1 新宿住友ビル 17 階 東京医科大学研究寄付講座臨床プロテオームセンター 西村俊秀)

時間変化に関する情報を得るために、オルガネラなどの単位における蛋白質複合体、つまり蛋白質ネットワークを系統的に研究することを主眼においている。

臨床プロテオミクスが立つ最初の地点は、発現プロテオミクスである。発現量が異なる蛋白質の検出同定であり、群間比較が行われる。発現変化の要因は、正常に対する疾患、疾患に対する治療や、同じ癌でも転移性などの疾患関連因子の差異・変化である。検体試料として動物病態モデルにおける組織や培養細胞も基礎研究上に使用することも含むが、その中心は本来ヒト疾患に関する組織であり、臨床試料（バイオプシー、血漿、尿など）である。

臨床プロテオミクス研究を成功裏に実施するには、臨床医との密接な研究体制が必須である。試験デザインとしては、グループ間比較が基本形であり、その差を鋭敏に検出できるデザインが重要である³⁾。観察試験の例としては、症例対照試験 (case-control study) やコホート試験 (cohort study) などがある。前者は、後向き研究 (retrospective study) とも呼ばれる。疾病にかかっているヒトを症例 (case) として選び、症例と性別や年齢などの要因が似たヒトを対照 (case) として疾病の原因となる要因を過去にさかのぼって比較する。コホート試験には、前向き (prospective) と後向き (retrospective) がある。前向き研究では、数万人以上の多人数の集団を5~20年と長期間にわたり追跡調査しなければならない。喫煙と肺癌の関連などが典型的である。従って、臨床プロテオミクスでは、現在は短期的に成果が得られる後向き研究が中心である。後向き研究では、患者の薬剤への暴露を事後的にその状況を調べ、集団の追跡調査を行うことで、副作用の発生を確認し、薬剤投与による副作用のリスク要因を同定する。介入試験としては、最も一般的な治験デザインである並行群間比較 (randomized controlled trial) がある。これは薬剤などの効果を評価するため、被験者を被検薬群と対照薬群に無作為に割り付け、各群を同時並行に指定された期間投与して、比較して薬剤の効果を評価する。また、診断基準についてのグループの定義や関連付ける臨床パラメーターの選択が重要である。グループ内が単一かつ均一にならない場合はグループ内での層別検討が必要となる。プロテオーム解析では時間変化や時間的前後関係が重要となるため試料サンプリングのスキームを確立しておくことが必要である。また、統計的に有意な結果を得るための例数の設定も重要である。

臨床プロテオミクス研究を実施する上で考慮すべき前提として、1) 施設内等の倫理委員会承認などの倫理的な配慮、2) 治験に付属する場合などには、GCPやGLPといった法的な規制の遵守、3) 検体採取時におけるインフォームドコンセントの徹底、出来るだけ患者負担の少ない採取法、4) 試料及び解析に使用する臨床データの匿名化による患者プライバシーの保護、5) 試料のプロテオーム解析を行う研究者に対する潜在的感染性、6) 臨床検体の注意深い取り扱いや、採取、採取時処理、凍結、輸送、保管等の手順などを確立などがある。

臨床プロテオミクスから得られる知識は、診断法や治療法に大きな変革をもたらす。新しい蛋白質バイオマーカーを用いて疾患の初期診断法や、加速的な薬物開発、薬物の有効性や毒性の評価がすでに行われている。プロテオミクスには、疾患プロセスを媒介する蛋白質分子同定による、病因解明、疾患検出・診断及び処方技術における現在の限界を克服する大きな期待がある。

II. 病態プロテオミクスの技術的展開

プロテオミクスは、組織や細胞における蛋白質レベルでのダイナミクスを捉えることが可能であるが、技術的にはいまだ挑戦的な課題である。従って、疾患プロテオミクスの複雑な側面を解析するには、異なった技術による多様な戦略の展開が不可欠である。

1. 画像解析に基づく方法

プロテオーム解析は、これまで二次元ポリアクリルアミド・ゲル・電気泳動 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: 2-D PAGE)⁴⁾ に基づくものが主流を占めてきた。最近でも2-D PAGEと質量分析法 (mass spectrometry: MS) を用いて疾患で発現する蛋白質をプロファイリングする研究が行われている⁵⁾。図1に、典型的な解析の流れを示す。心臓疾患は、急性で重篤なものから慢性的に進行するものまで広い病理学的な幅を持っている。研究者が比較のための標準ゲルとして用いられるように、ヒトや他の動物における心筋で発現する蛋白質に関して2-D PAGEのデータベースが構築されている^{6,7)}。心不全に関して心筋のプロテオームのうちほんの少ししかまだ解析されてはいないが、主な変化が心臓のプロテオームに見出されている。また、myosin light chain 2の翻訳後修飾の変化も報告されている。多くの他の疾患においても予想されている機能に関連すると考えられる蛋

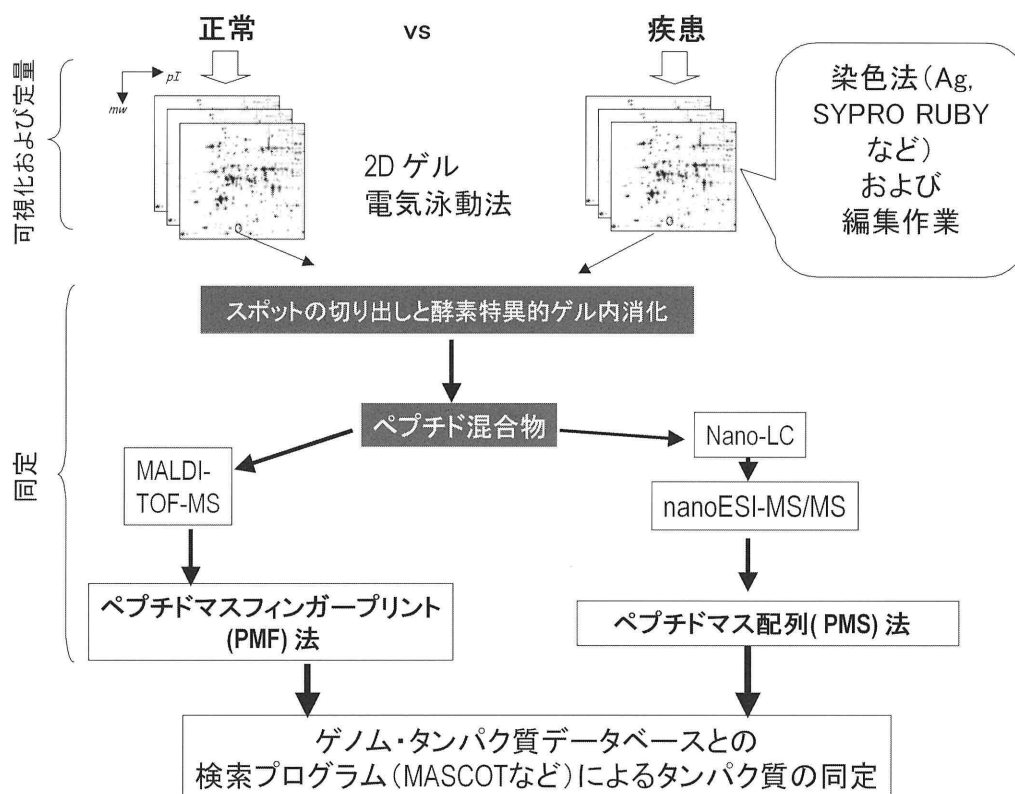


図1 二次元電気泳動法と質量分析法による変動タンパク質同定の流れ。MSは質量分析、MS/MSは、特定のペプチド分子イオンをさらに質量分析計内で分解させ、アミノ酸配列情報をもつ分解イオン群を測定する質量分析法。

白質翻訳後修飾が見出されている^{8,9,10,11,12}。

病態（臨床）プロテオームには高い感度、定量性、高いスループットが必要となることは明確である。2-D PAGEの蛋白質提示能力は、2,000～5,000分子、典型的な蛍光色素や銀染色での検出感度は約100 fmol、膜蛋白質のほとんどが一次元目の固定化pH勾配ゲル(IPG)に可溶化して適用困難、高分子量や低分子量の蛋白質及び酸性及び塩基性蛋白質の解析が困難、また重ね合わせはマニュアル編集を行わなければならないなど、自動化が難しいなど、欠点も多いのが現状である。従って、プロテオーム解析に必要な要件である、出来るだけワイドなスコープで発現蛋白質を一度に探索的に把握し、発現量を高いダイナミックレンジで達成するには、後述する多次元液体クロマトグラフィー(multi-dimensional liquid chromatography: MDLC)^{13,14}を質量分析と直接統合させた解析などの方法論の導入が必須である。

最近では従来の2-D PAGEの欠点である不十分な再現性を解決する方法として、二つの異なった状態における蛋白質発現での違いを明確とするために、それぞれを異なった蛍光色素で染め、これらを混合して差を容易に見出すことが出来るような differential in-gel

electrophoresis (DIGE)¹⁵も行われるようになった。食道癌細胞と正常上皮細胞とに2-D DIGEを適用して、多くの蛋白質が癌細胞で発現上昇及び減少をしていることも見出されている¹⁶。むしろ、ワイドスコープで蛋白質発現を定量比較した後に、絞り込まれた蛋白質に対して抗体により2-D PAGE上で可視し、翻訳後修飾を高分解分離してプロファイリングするには有効である。

分離をせず、組織での発現蛋白質群の検出と局在を直接調べる in situ プロテオームとして in situ imaging mass spectrometry¹⁷も行われるようになってきた。この方法は、凍結された組織のスライスに対してマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix-assisted laser desorption ionization: MALDI)法^{18,19}を適用して、質量分析による画像解析を行うものである。時系列での組織の比較や、特定の蛋白質の局在が可視化できる。これにより異なった癌タイプを識別できることも分かってきた。疾患に特異的な蛋白質の発現が解き明かにされれば、このような分子イオン・イメージング(molecular ion imaging)は、その特定の蛋白質イオン・シグナルのみを検出することにより、病理学的な情報を与える従来の抗体染色法よりはるかに直接的

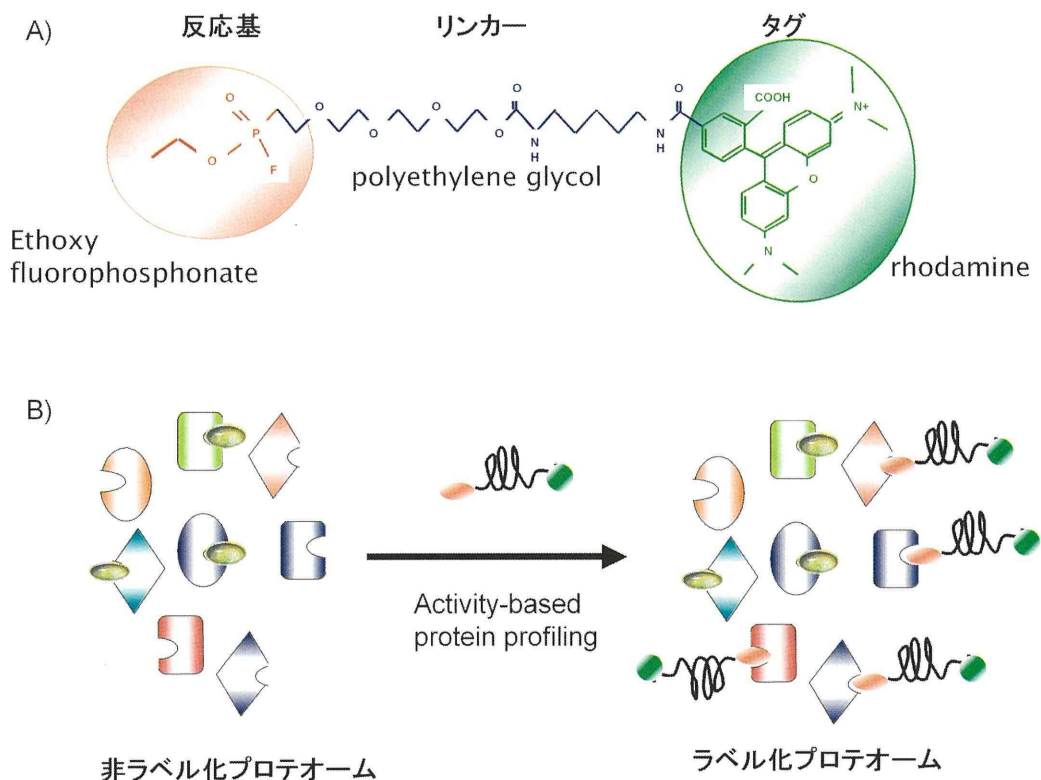


図2 Activity-based 蛋白質プロファイリング。化学プローブを用いて複雑なプロテオームにおける酵素スーパーファミリーの機能状態変化を調べる。A) 化学プローブは、三つの部位から成り立っている。特定の酵素クラスを標的とする反応基、リンカー、活性のある酵素群を“可視化”するタグ。B) 活性のある酵素は開いた活性部位を持ち、不活性体はマーブルが活性部位を塞いでいるように示した。

な証拠を容易に提供できるようになる。

2. Activity-based proteomics

発現プロテオミクスは、疾患などにより発現する蛋白質群を比較定量して、各試料グループに特異的な蛋白質群を同定するのが意図である。2-D PAGE は高分解能で翻訳後修飾も含めて比較は可能とはいえ、かなり制限がある。比較する要素として、特定の修飾を受けている蛋白質や活性を持つ蛋白質群が疾患でどう違うかなど、機能を推定する上では、より詳細な定量比較を行うことも必要である。化学プロテオミクス (chemical proteomics)^{20,21} は、反応基、リンカー、タグからなるプローブをもちいて、いわば化合物のプロテオームに対するスクリーニングを行う概念で、activity-based proteomics (または activity-based protein profiling: ABPP) はそのひとつと考えられる。正常と疾患において、あるクラスの活性をもつ酵素群に限った定量比較に対する試みである。図2は、activity-based proteomics の方法論を模式的に示したものである。酵素スーパーファミリーの機能状態の変化を調べることが可能だ。用いられる化学プローブは、酵素の活性部位と結合する反応部位、リンカー、活性酵素を可視

化できるようなタグからなっている。例は、serine hydrolase クラスの酵素活性部位と反応する ethoxy fluorophosphonate、polyethylene glycol 基のリンカー、タグとして rhodamine からなるプローブを示している。Jessani ら²² は、ヒトの癌細胞セルラインを用いて serine hydrolase の活性プロファイルを横断的に調べ、一連の分泌酵素や膜関連酵素の活性が乳癌かメラノーマかなど腫瘍起源によって分類が可能であることを見出している。特定の serine hydrolase グループの活性が幾つかの腫瘍の浸襲性 (invasive) 癌細胞に共通に発現上昇 (upregulated) していることが分かった。その中に、確立した癌進行マーカーである urokinase や膜関連 hydrolase である KIAA1363 のような酵素も含まれていた^{23,24}。ABPP により、GSTO 1-1、血小板タイプの phosphofructokinase、タイプ II 組織 transglutaminase を含む浸襲性乳癌細胞で発現上昇がある酵素活性が幾つか同定されている²⁵。このように、activity-based proteomics は、ヒト癌細胞の酵素活性の機能と関わるより明確な“証拠”を与える。現在、この分野は急速に進展しており、cysteine protease、protein tyrosine phosphatase、glycosidase などの多様な

酵素クラスに対するプローブの設計が報告されている。さらに、プローブでタグが付いた酵素が、質量分析で“可視化”されれば、広範囲の疾患に関する酵素活性の変動が高い感度をもってモニターできることになる。

3. 臨床スケールでの多次元蛋白質プロファイリング

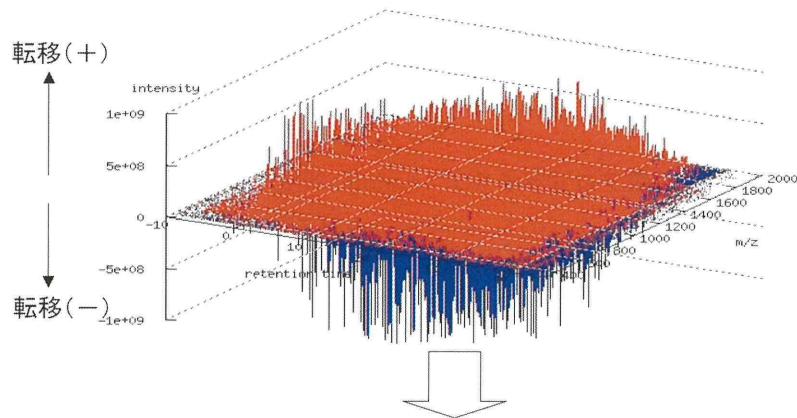
2D-PAGEは複雑な蛋白質群を高い分離能によって視覚的に比較する上で有効であるが、多くの試料を再現性良く処理するような、自動化やハイスループット化が本質的に困難である。これに対して「ゲル・プロテオミクスを超える方法論“Beyond gel proteomics”」として、液体クロマトグラフ法(LC)の積極的な導入が展開されてきた。一般的なアプローチとしては、ゲル内消化試料を含め、分画・精製した蛋白質群を可溶化して消化後、得られるペプチド混合物をLC/MSに直接導入し、試料中の蛋白質同定を行うものである。質量分析器の格段の感度向上、アミノ酸配列情報を与えるタンデム質量分析法であるMS/MS測定を含めたスキンスピードの高速化に伴う分析時間軸の分解能の向上、高感度化のための低流速に対応したLCにおけるクロマトグラフィー分解能の向上などにより、LC/MSの分析分離能が飛躍的に改善された。これに伴い、生体試料などの複雑な蛋白質混合試料も蛋白質分画することなく全消化後、LC/MSによる一斉解析の可能性も示唆された。さらに蛋白質消化後のペプチド断片数や分析対象のダイナミックレンジによって、クロマトグラフィーの多次元化が考案され、そこで用いる分離モードはイオン交換や逆相など、これまでいくつかの組み合わせが検討されてきた。Yatesらは²⁶⁾、強カチオン交換(strong cation exchange: SCX)と逆相カラム(reverse phase column: RP)から構成される二次元LCを用いて、蛋白質複合体を消化して得られるペプチド混合物を分画しMSに導入する方法(2D-LC/MS/MS)を報告した。彼らは、この手法を75種類の蛋白質からなる酵母リボソームに適用し、構成蛋白質の約80%を検索・同定した。また、tandem affinity purification(TAP)法²⁷⁾で精製した蛋白質群を同様に2D-LC/MS/MSを用いて一度に解析するという手法も報告されており、多次元LCに基づく“beyond gel proteomics”が現実化しつつある。これらを含め、全自動ハイスループット化の可能性を有する多次元LCシステムにも多くの技術的な課題が指摘されているが、特に汎用性に欠けているのが現状で

あった。筆者らは、臨床スケールに対応できる汎用性のあるハイスループットなプロテオーム解析システムの開発を目指し、SCXおよびキャピラリー逆相(cRP)カラムを用いた高分解能二次元LCとナノエレクトロスプレーイオン化(nano-electrospray ionization: NSI)インターフェイスを装備したイオントラップ型質量分析計から構成され、定量を可能とする臨床スケールでの全自動多次元蛋白質プロファイリング(clinical-scale multi-dimensional quantitative protein profiling)システム²⁸⁾を構築した。多次元LCシステムの基盤となる二次元目以降のシステムは、一次元分離のみの低流速逆相クロマトグラフィー(MAGIC2002またはParadigm MS4、Michrom BioResources社)とNSIインターフェイス(AMR社)を装備したイオントラップ型質量分析計(ThermoFinnigan LTQ、Thermo Electron社)から構成される。低流速逆相クロマトグラフィー(cRPLC)は、カラムに内径0.15-0.2mmのマイクロカラムを用い、流速1.0-2.0(L/min、移動相はNSI-LC/MSで汎用の0.1%ギ酸水溶液とアセトニトリルを適用し、それら二液のグラジエント溶出法を用いる。カラム長とグラジエント勾配は、試料に応じた条件を選択する。試料は自動試料注入装置(HTS PAL、CTC Analytics社)を用いてカラムに付される前にオンラインのトラップカートリッジに供される。ここで試料の脱塩・濃縮処理が施された後、バルブの切り替えと同時に分析が開始される。カラムより溶出された試料はNSIイオン化され直接的に質量分析計に導入される。この大規模解析システムの他の構成要素として、前処理である蛋白質可溶性システム、自動液中消化ロボットがあり²⁹⁾、独自アルゴリズムによるインフォーマティクス・ツールにより多次元データを統合し、定量比較を可能にしている。

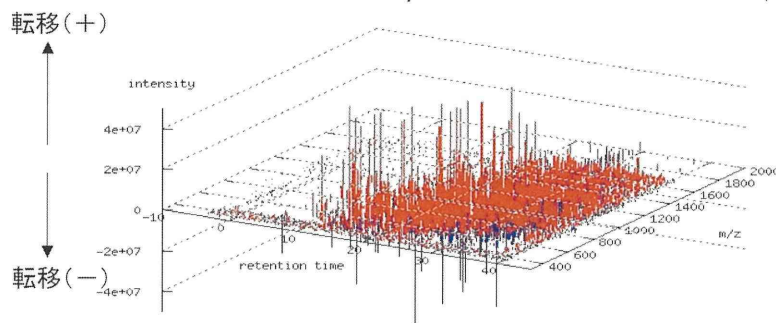
さらに、各液体クロマトグラフィーの最適化により、汎用のHPLCと同等の操作性を確保し、高分解能なピーク半値幅4-6秒での高速分析系(fast quantitative protein profiling)(10-12分)の開発を行っている。全自動で1時間に5-6試料、96試料の解析が約16-20時間で、高い分離能と感度(femto-mole: 10-15)を保持したまま可能になると考えている³⁰⁾。

ひとりの患者の組織または血漿試料に対する多次元プロファイリング解析で多数のLC-MSまたはLC-MS/MSデータが産出される。これらを束ねて、ひとつの試料に対してひとつのm/z-retention time-intensityからなる多次元マップデータを作成し、各々

A) 全36サンプルのLC-MSプロファイルを重ね合わせた結果(データ点数: 37,114)



B) 転移(+, -)群間に t 検定(両側検定) $p \leq 0.005$ で有意な差がある5,889データ点数



C)

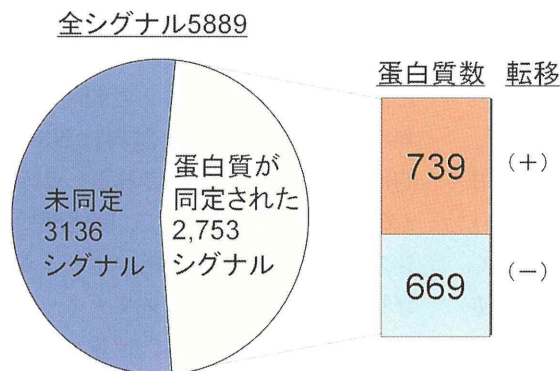


図3 A) 全36症例試料のLC-MSプロファイルをi-OPALによってアライメントしたもの。リンパ節転移陽性症例、陰性症例を合わせて37,114のシグナルが検出された。B) リンパ節転移陽性症例、陰性症例間で二群間比較し、統計学的に有意な差 ($p \leq 0.005$) で各群に特異的なシグナルが5889点検出された。C) MS/MSからの既存検索によりこのうち同定が確認できたシグナルは2,753で、この時点で既存検索同定で確認出来なかったのが3,136シグナルであった。

が比較可能となるためには、イオン強度に関する規格化や非線形に変動する時間軸に沿ったアライメントを行う必要がある。筆者らは、この困難な課題をi-OPAL (internal standard guided optimal profiling alignment の略称) という独自インフォマティクス・アルゴリズム (国際特許出願) により克服し、膜蛋白質を含め、40,000分子イオン以上のシグナルの定量的解

析から統計的に有意なシグナルを選択し、臨床的に意味のある蛋白質群を探索・同定することを可能とした。

東京医科大学外科学第一講座 (加藤治文教授) と共同で行われた初期肺腺癌のリンパ節転移関連蛋白質の探索研究を紹介する。腫瘍径2cm以下の初期原発性肺腺癌36症例 (リンパ節転移陽性15症例、リンパ

節転移陰性 21 症例) を用い、多次元蛋白質プロファイリングを実施した³¹⁾。図 3 は、全 36 症例試料の LC-MS プロファイルを重ね合わせ (alignment) を示している。リンパ節転移陽性症例、陰性症例を合わせて 37,114 のシグナルが検出された。通常、蛋白質 1 分子から消化され検出されるペプチドは平均 5 本前後の分子イオン・シグナルとして検出されるので、少なくとも 7,000 以上の蛋白質数に相当する。リンパ節転移陽性症例、陰性症例間で二群間比較し、統計学的に有意な差 ($p \leq 0.005$) で各群に特異的なシグナルが 5,889 点検出された。MS/MS から検索により同定が確認できたシグナルは 2,753 であった。同定されている蛋白質のうち、リンパ節転移陽性群に属する蛋白質は 739 個で、陰性群に属する蛋白質は 669 個であった。既存の検索では同定が確認出来なかった 3,136 シグナルは、新規の蛋白質修飾あるいは新規の蛋白質を含むと考えられ、リンパ節転移にとって重要な新規の蛋白質の同定と将来的な創薬のターゲットが存在する可能性がある。既知蛋白質群の中には、リンパ節転移陽性症例において Tenascin³²⁾, Integrin $\alpha 6$ ³³⁾, Laminin $\gamma 2$ ³⁴⁾, Epidermal Growth Factor-Receptor (EGF-R)³⁵⁾, c-erbB-2³⁶⁾ 等の発現が有意に検出され、リンパ節転移陰性症例において Integrin $\alpha 3$ ³⁷⁾, Interleukin $\alpha 12$ ³⁸⁾ 等の発現が有意に検出された。これら蛋白質群は、これまでの肺癌研究において、癌の浸潤転移、抑制あるいは予後不良との関連が報告されている分子である。

筆者らのプロファイリング技術戦略は、単なるカタログ作りではなく、単なる疾患などのパターン・ディスカバリー (pattern discovery) でもない。多次元プロテオーム解析による定量的な解析から統計的に有意なシグナル、すなわち、意味のある蛋白質群を抽出・評価するものである。現在の東京医科大学臨床プロテオームセンターでの学内プロジェクトとして、肺癌、乳癌、甲状腺癌、大動脈瘤、糖尿病網膜症などの研究も実施しており、医療や創薬への貢献を目指している。

おわりに

ほとんどの市場にある薬剤は蛋白質の機能に対するインヒビション等による制御を達成することで病態を改善する。効果のある薬剤や治療法は、蛋白質がどのように疾患で動いているかという知識なしでは手に入れることは望めない。蛋白質がどう機能するか分からなければ、薬剤がどう疾患を改善するかは理解

できない。従って、病態プロテオミクスによって直接ヒト疾患の解析から開発された分子標的薬剤は、治療対象の疾患に高い有効性を示すだろう。FDA と NCI の Clinical Proteomics Program では、乳癌と卵巣癌について、腫瘍細胞で既存の癌治療薬がどのように疾患関連蛋白質を標的としているか調べている^{39,40)}。乳癌の場合、予後のよくない患者では細胞生存を促進する蛋白質 AKT の活性型が多いことを見つけている。トラスツズマブ (trastuzumab) を処方すると、活性型 AKT の相対量は変化し、多くの腫瘍細胞死が観測された。細胞増殖に関する分子などを標的とする薬物、例えば、イマチニブメシレート (imatinib mesylate) やゲフィチニブ (gefitinib) で処方についても研究が行われている。疾患の現場である臓器組織における疾患関連蛋白質群の動きと血漿プロテオミクスとを直接・間接に関連づけることが出来れば、薬物のレスポンス・ノンレスポンス、著効、重篤な副作用をもつような患者集団を分類することも正確となり、また初期診断による予後の良い治療の実現など患者個人に有益な情報を提供することが実現できる。

謝 辞

本稿を作成する上で、東京医科大学臨床プロテオームセンターの荻原淳助教授、藤井清永講師、川上隆雄講師、川村猛助手、安養寺久栄助手、メディカル・プロテオスコープ社の秋元信吾博士、金澤光洋氏に多くの助言を頂いた。また、東京医科大学外科学第一講座平野隆講師には初期肺腺癌の共同研究でご尽力を頂いた。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nature. Proteomics, transcriptomics: What's in a name? Nature **402**: 715, 1999.
- 2) Blackstock W, Nishimura T, Fujita Y: Proteome Analysis in Pharmaceutical Industries. Protein, Nucleic Acid and Enzyme **43**: 2214-2221, 1998
- 3) Rothman KJ, Greenland S: Modern Epidemiology, 2nd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Company, Philadelphia, 1998
- 4) O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem **250**: 4007-4021, 1975
- 5) 西村俊秀、川上隆雄、安養寺久栄: II-2 発現プロファイリングの基本技術: タンパク質の分離と同定。生命科学のための最新マスペクトロメトリー (ゲノム創薬をめざして) (原田健一・田口 良・橋本 豊編) 講談社サイエンティフィック、講談社

- 79-100, 2002
- 6) Li XP, Pleissner KP, Regitz-Zagrosek V, Salnikow J, Jungblut P: A two-dimensional electrophoresis database of rat heart proteins. *Electrophoresis* **20**: 891-897, 1999
 - 7) Evans G, Wheeler CH, Corbett JM, Dunn MJ: Construction of HSC-2DPAGE: a two-dimensional gel electrophoresis database of heart proteins. *Electrophoresis* **18**: 471-479, 1997
 - 8) van der Velden J, Klein LJ, Zaremba R, Boontje NM, Huybregts MAJM, Stooker W, Eijnsman L, de Jong JW, Visser CA, Visser FC, Stienen GJM: Effects of Calcium, Inorganic Phosphate, and pH on Isometric Force in Single Skinned Cardiomyocytes From Donor and Failing Human Hearts. *Circulation* **104**: 1140-1146, 2001
 - 9) Arrell DK, Neverova I, Fraser H, Marban E, van Eyk JE: Proteomic Analysis of Pharmacologically Preconditioned Cardiomyocytes Reveals Novel Phosphorylation of Myosin Light Chain 1. *Circ Res* **89**: 480-487, 2001
 - 10) Ping P, Zhang J, Pierce Jr WM, Bolli R: Functional Proteomic Analysis of Protein Kinase C Signaling Complexes in the Normal Heart and During Cardioprotection. *Circ Res* **88**: 59-62, 2001
 - 11) Heinke MY, Wheeler CH, Chang D, Einstein R, Drake-Holland A, Dunn MJ, dos Remedios CG: Protein changes observed in pacing-induced heart failure using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 2021-2030, 1998
 - 12) Westbrook JA, Yan JX, Wait R, Welson SY, Dunn MJ: Zooming-in on the proteome: very narrow-range immobilised pH gradients reveal more protein species and isoforms. *Electrophoresis* **22**: 2865-2871, 2001
 - 13) Giddings JC: Concepts and comparisons in multidimensional chromatography. *J High Res Chromatogr* **10**: 319-323, 1987
 - 14) Wall DB, Kachman MT, Gong S, Hinderer R, Parus S, Misek DE, Hanash SM, Lubman DM: Isoelectric Focusing Nonporous RP HPLC: A Two-Dimensional Liquid-Phase Separation Method for Mapping of Cellular Proteins with Identification Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem* **72**: 1099-1111, 2000
 - 15) 平野 穰: 注目のプロテオミクスの全貌を知る! (磯辺俊明、高橋信弘編) 実験医学別冊、羊土社 16-23, 2002
 - 16) Zhou G, Li H, DeCamp D, Chen S, Shu H, Gong Y, Flaig M, Gillespie JW, Hu N, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin III E F, Zhao Y: 2D Differential In-gel Electrophoresis for the Identification of Esophageal Scans Cell Cancer-specific Protein Markers: *Mol Cell Proteomics* **1**: 117-124, 2001
 - 17) Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Stoeckli: Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Med* **7**: 493-496, 2001
 - 18) Tanaka K, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T: Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry* 185-188, 1987
 - 19) Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**: 2299-2301, 1988
 - 20) Borodovsky A, Ovaia H, Kolli N, Gan-Erdene T, Wilkinson KD, Ploegh HL, Kessler BM: Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chem Biol* **9**: 1149-1159, 2002
 - 21) Greenbaum D, Baruch A, Hayrapetian L, Darula Z, Burlingame A, Medzihradsky KF, Bogyo M: Chemical approaches for functionally probing the proteome. *Mol Cell Proteomics* **1**: 60-68, 2002
 - 22) Jessani N, Liu Y, Humphrey M, Cravatt BF: Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10335-10340, 2002
 - 23) Konecny G, Untch M, Arboleda J, Wilson C, Kahlert S, Boettcher B, Felber M, Beryt M, Lude S, Hepp H, Slamon D, Pegram M: Her-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res* **7**: 2448-2457, 2001
 - 24) Bouchet C, Spyrtos F, Martin PM, Hacene K, Gentile A, Oglobine J: Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br J Cancer* **69**: 398-405, 1994
 - 25) Adam GC, Sorensen EJ, Cravatt BF: Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype. *Nat Biotechnol* **20**: 805-809, 2002
 - 26) Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd.: Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**: 242-247, 2001
 - 27) Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B: A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030-1032, 1999
 - 28) Fujii K, Nakano T, Kawamura T, Usui F, Bando F, Wang R, Nishimura T: A multi-dimensional protein profiling technology and its application to human plasma proteome. *J Proteome Res* in press.
 - 29) Kawakami T, Nishimura T: *Tecan Journal Edition* 3-November, pp. 6-8, 2003
 - 30) 藤井清永他; 第174回液体クロマトグラフィー研究懇談会、東京理科大学薬学部、野田、2004
 - 31) 未公開データ

- 32) Soini Y, Paakko P, Nuorva K, Kamel D, Linnala A, Virtanen I, Lehto VP: Tenascin immunoreactivity in lung tumors. *Am J Clin Pathol* **100**: 145-150, 1993
- 33) Patriarca C, Alfano RM, Sonnenberg A, Graziani D, Cassani B, de Melker A, Colombo P, Languino LR, Fornaro M, Warren WH, Coggi G, Gould VE: Integrin laminin receptor profile of pulmonary squamous cell and adenocarcinomas. *Hum Pathol* **29**: 1208-1215, 1998
- 34) Moriya Y, Niki T, Yamada T, Matsuno Y, Kondo H, Hirohashi S: Increased expression of laminin-5 and its prognostic significance in lung adenocarcinomas of small size. *Cancer* **91**: 1129-1141, 2001
- 35) Pavelic K, Banjac Z, Pavelic J, Spaventi S: Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma. *Anticancer Res* **13**: 1133-1137, 1993
- 36) Micke P, Hengstler JG, Ros R, Bittinger F, Metz T, Gebhard S, Beeh KM, Oesch F, Buhl R: c-erbB-2 expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* **92**: 474-479, 2001
- 37) Barr LF, Campbell SE, Bochner BS, Dang CV: Association of the decreased expression of alpha3beta1 integrin with the altered cell: environmental interactions and enhanced soft agar cloning ability of c-myc-overexpressing small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **58**: 5537-3345, 1998
- 38) Kasprzak A, Przewozna M, Surdyk-Zasada J, Zabel M: The expression of selected neuroendocrine markers and of anti-neoplastic cytokines (IL-2 and IL-12) in lung cancers. *Folia Morphol (Warsz)* **62**: 497-479, 2003
- 39) Fisher Wilson J: The Promise of Disease Proteomics: Faster Detection, Diagnosis, and Drug Development. *Ann Int Med* **40**: 317-319, 2004
- 40) Service RF: PROTEOMICS. A Sharper Focus *Science* **302**: 1318, 2003