

消化器扁平上皮癌の早期診断および分子標的治療のターゲットとなるタンパク質の探索と同定

朝長 毅¹、本村真理¹、野村文夫¹、西森孝典²、島田英昭²、落合武徳²

¹ 千葉大学大学院医学研究院 分子病態解析学

² 千葉大学大学院医学研究院 先端応用外科学

要 旨

生体内での種々のプロセスは一部の例外を除いてほとんどがタンパク質によって制御されているため、発癌のメカニズムを解明し、癌化の根本的要因である因子にターゲットを絞った分子標的治療薬の開発には、癌特異的に発現の変化を示すタンパク質の解析が重要である。さらに、癌の早期発見や病態の把握に有用な血中や尿中のマーカーの検索は遺伝子レベルの解析では困難であり、遺伝子の最終産物であるタンパク質を調べることが必須である。我々は、以下の方法により、消化器扁平上皮癌の診断、治療に有用な可能性のあるタンパク質を同定した。

- (1) プロテオーム解析を用いた食道癌特異的発現タンパク質の網羅的探索
 - (2) 癌化の原因と考えられる染色体不安定性を引き起こすタンパク質の解析
- これらの検討の結果、

- ① 食道癌特異的に発現増大、減少または翻訳後修飾を受けているタンパク質を多数同定した。その中には、細胞間接着に関与するタンパク質も含まれ、癌細胞の浸潤や転移に関わっている可能性が示唆された。
- ② 染色体不安定性を引き起こすタンパク質として、CENP-A や CENP-H などの動原体タンパク質の発現異常が関与していることを見出した。

これら一連の結果は、消化器扁平上皮癌の新しい分子標的治療のターゲットとなるばかりでなく、腫瘍マーカーとして有用である可能性もあり、消化器扁平上皮癌の早期発見、早期治療に大いに貢献できると思われる。

1. プロテオーム解析を用いた食道癌特異的発現タンパク質の網羅的探索

(1) 研究目的

「プロテオーム」は特定の細胞、器官、臓器の中で、翻訳生産されているタンパク質の全セットを意味し、さらに個々のタンパク質の化学構造、総量、発現時期、翻訳後修飾、集合体形成などの高次情報解析の研究分野を「プロテオミクス」と呼ぶ(1,2)。

プロテオーム解析ではまず最初に、細胞、組織などから得られた複雑なタンパク質混合物を分離し、可視化することが求められる。現在のところ、多くのプロテオーム解析の出発点は二次元電気泳動法(2-DE)であり、依然としてタンパク質の分離の中心となっている技術である。それは、この技術が数千のタンパク質を同時に分離する卓越した能力を持つためであり、その二次元展開物を高感度で可視化でき、さらにそれぞれのスポットをゲルから切り出して質量分析計によって容易にタンパク質

を同定できるためである。2-DEで分離されたタンパク質は、質量分析によりペプチドマップを作製するか、または部分アミノ酸配列を決定し、そのデータをもとにゲノム解析で得られたデータベースから同定する(図1)。近年の質量分析計の急速な進歩に伴い、生体試料中の微量なタンパク質の同定も可能になってきており、この手法はますます発展するものと思われる。一方、最近になって、タンパク質分離のための新しい方法が開発されてきている。例えば、チップを基盤とした分離方法(プロテインチップシステム)(3,4)、二次元クロマトグラフィーによる分離^{5,6}、アフィニティータグの利用(7,8)など、二次元電気泳動を用いない手法である。これらの手法は二次元電気泳動法では検出困難な低分子量タンパク質の解析に優れており、特に操作が簡単なプロテインチップシステムは、最近、血清、尿などに存在する疾患マーカーの探索に広く用いられている。我々は、食道癌の手術標本、そしてその検体に対応した血清や尿などの臨床検

体を用い、従来の二次元電気泳動法とその改良法および SELDI 法によるプロテオーム解析を行い、食道癌の診断および治療に有用なターゲットタンパク質を同定することを目的とした。

(2) アガロース二次元電気泳動法および蛍光標識タンパク質発現ディファレンス解析法 (2D-DIGE) を用いた食道癌のプロテオーム解析

2-DE は一次元目に等電点電気泳動を、二次元目に SDS ポリアクリドアミドゲル電気泳動を用いた O'Farrell の方法が一般的で (9)、多数のタンパク質の分離精製に絶大な威力を発揮する。現在、ほとんどの 2-DE の一次元目に固定化 pH 勾配 (Immobilized pH gradient: IPG (10) を利用してタンパク質を等電点の違いによって分離する IPG ゲルが用いられているが、ゲルに添加できるタンパク質の量が限られており、さらに高分子量のタンパク質はこの IPG ゲルに入りにくいという欠点がある。この欠点を補うために、IPG ゲルのかわりにアガロースゲルを等電点電気泳動に用いるアガロースゲル二次元電気泳動が平林らによって提唱された (11)。この方法を用いると、従来の 10 倍以上のタンパク質を添加することができ、また、500kD くらいまでの高分子量のタンパク質も分離できるようになった。我々はこのアガロースゲル二次元電気泳動法を用いて、ヒト大腸癌のプロテオーム解析を行い、癌特異的に発現増大、減少、または翻訳後修飾を受けているタンパク質を多数同定し、報告した (12)。一方、今までは、比較したい 2 種類の検体から抽出したタンパク質は、それぞれ別のゲルに流して、両者を比較するという手法が取られていたが、最近、その 2 種類のタンパク質群を異なる蛍光色素でラベルし、両者を同一のゲルに流して解析する多重蛍光標識タンパク質発現ディファレンス解析法 (2D-DIGE) が開発された (13)。この手法により、従来二次元電気泳動法の欠点といわれてきた再現性や感度が格段に向上し、解析も容易になった。

我々は、このアガロース二次元電気泳動法と 2D-DIGE を組み合わせた agarose 2D-DIGE 法を用い、当大学先端応用外科で体系的に収集された食道癌手術標本 12 症例のプロテオーム解析を行った (14)。各症例の手術標本の癌部と非癌部から切り出した組織からタンパク質を抽出し、それを agarose 2D-DIGE によって分離し、DeCyder™ ソフトウェアを用いて解析した (図 2)。複数の症例の癌部、非癌部で共通して発現の違いのあるスポット約 400 個を検出し、そのうち約 70 個

のタンパク質を選んでそれぞれのスポットをゲルから切り出した (図 3)。切り出したゲル片は、トリブシンによるインゲル消化後、イオントラップ型 LC-MS/MS 装置 (ThermoQuest 社 LCQ-Deca: 北里大学理学部生体分子動力学研究室 前田教授、小寺講師、大石講師との共同研究) にて部分アミノ酸配列を解析後、SEQUEST program を用いてタンパク質を同定した (表 1)。

このうち、enolase 1, E-cadherin, AnnexinA8, Annexin 1, heat shock protein 70, transferrin, vimentin など過去に食道癌組織で発現の変化が報告されているタンパク質がいくつか見られ、今回の我々の解析と一致していた (15-19)。一方、2D-DIGE で発現の差が明らかであり、かつ過去に食道癌との関連を示した報告が無いタンパク質を 15 個選択し、その発現の違いをウエスタンブロットや免疫染色で確認した。その中で、細胞間接着に関与するといわれるタンパク質 X が、正常組織に比べて、癌部でほとんど発現していないことを見出した (14) (図 4, 5)。細胞間接着に関わるタンパク質の機能異常は癌細胞の浸潤や転移を促すと考えられるため、我々の見出したタンパク質も食道癌の浸潤、転移に関与している可能性がある。このタンパク質が細胞の遊走能や転移能と関係があることを実験的に証明できれば、遺伝子治療にも応用可能であると考えられる。

(3) プロテインチップシステムを用いた食道癌の腫瘍マーカーの探索

プロテインチップシステムとは、プロテインチップ、質量分析計およびデータ解析コンピュータからなり、原理の基本は田中耕一氏の発明した MALDI-TOF MS と同様である。プロテインチップはアルミ板の表面に、様々な化学的 (ケミカルチップ)、生物学的 (バイオリジカルチップ) 修飾を施したものであり、このチップに生体試料を添加した後、チップ表面に親和性のあるタンパク質のみを分離・捕捉し、選別されたタンパク質群を質量分析計で測定し、分子量と発現量の情報を得るものである (20)。同一チップ上に異なる条件下の生体試料を添加できるので、ある病態下で発現が特異的に変化するタンパク質を健常時と比較解析することが可能である。

我々は、これまでこのプロテインチップシステムを用いて、習慣飲酒の早期診断マーカーを 3 つ同定し、報告した (21)。その技術を用いて、食道癌患者血清と正常人の血清を 20 症例比較検討したところ、腫瘍マーカー候補となりうる低分子量タンパク質 (ペプチド) をいくつか見出した (図 6)。それらのペプチドを精製、同定を試

み、これまでに1種類のペプチドの同定に成功した。現在、そのペプチドの抗体を用いて、食道癌の早期診断に有用な新規腫瘍マーカーになりうるか確認を行っている。

2. 癌化の原因と考えられる染色体不安定性を引き起こすタンパク質の解析

(1) 研究目的

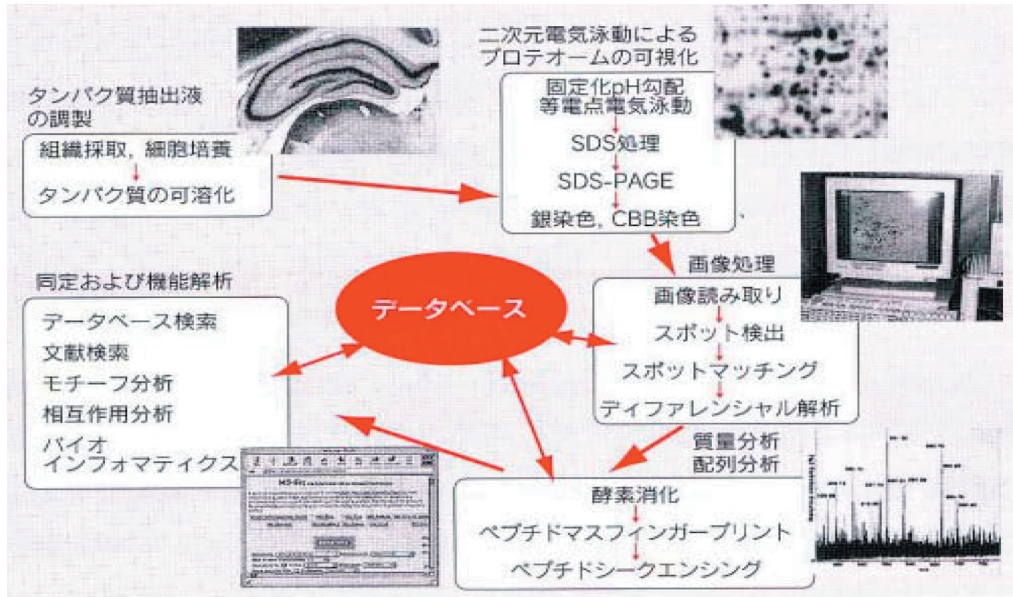
以前より、癌や先天性疾患において染色体の数の異常、欠失、転座など広範囲にわたる染色体の構造異常が知られていたが、最近 FISH の技術の進歩により、今まで知られている白血病だけでなく、多くの固形腫瘍でも染色体数や広範囲な染色体構造異常が見い出された(22-24)。これを称して染色体不安定性と呼ぶが、今ではそれが癌の代名詞にまでなっており、発癌の原因として重要であると考えられている。その染色体不安定性は、主に、細胞分裂時における姉妹染色体の均等分配を保証するメカニズムの破綻によって起こっていることが示唆され、染色体の安定性に、染色体均等分配制御機構が重要な役割を果たしていると考えられる。近年、その染色体均等分配の制御には姉妹染色体対合、染色体凝縮、動原体、セントロソーム、微小管、細胞周期チェックポイント機構など多くの複雑なプロセスが関わっていることが明らかとなったが(図7)、その中でもセントロソームの機能に重要な STK15/BTAK/aurora2 やスピンドルチェックポイントタンパク質 Mad2 や Bub1 などの異常が染色体異数性をもたらす癌化を引き起こすことが最近報告された(25-27)。さらに最近では、癌抑制遺伝子として最もよく知られているものの一つ APC の遺伝子産物が動原体に局在し、その遺伝子の変異は APC タンパク質の局在の異常をもたらす、染色体異数性を引き起こすという報告もなされ、癌化と染色体均等分配制御機構との関わりがますます重要視されてきた(28-30)。そこで我々は、この染色体分配制御機構の異常が染色体不安定性にどのように関与しているか解明することにより、癌の新しい分子標的治療のターゲットを発見することを目的とした。

(2) 動原体タンパク質の発現異常が染色体不安定性を誘発する。

染色体はM期中期に赤道面に並び、後期にいっせいに両極に引っ張られていく。それらの役割を担っているのが紡錘体微小管である。この紡錘体微小管が染色体のセントロメア領域に形成された動原体というタンパク質複合体に付着することにより、染色体が両極に引っ張られる。動原体は電子顕微鏡の観察から三層構造を形成する

ことが分かり、図8に示すようなセントロメアタンパク質(CENP)をはじめとする多数のタンパク質が集積している。これらのタンパク質に異常が起こると姉妹染色体が正常に分配されないことが最近の酵母の研究によって示され、このことから動原体が正常な染色体の分配に必須であることが明らかになった(31-33)。

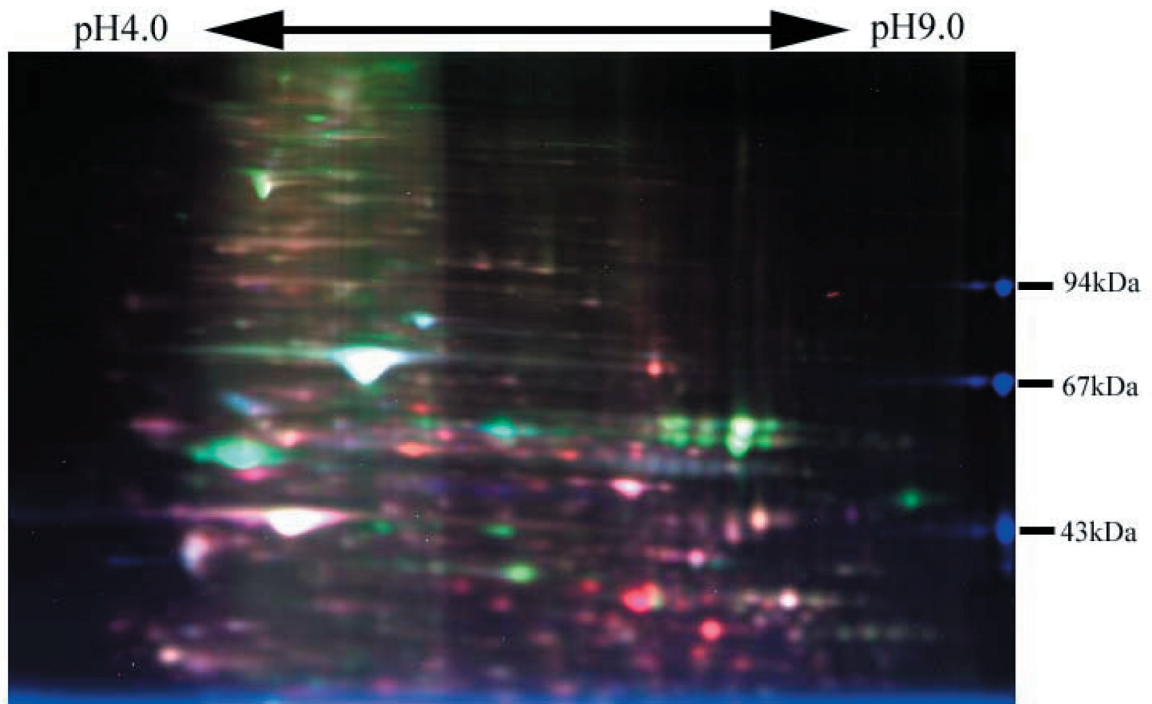
我々はこれまで種々の癌手術標本の癌部、非癌部から抽出したタンパク質を用いて、上述した染色体均等分配の制御機構に関わる因子の発現を調べてきたが、その中で、動原体の核となるタンパク質 CENP-A と CENP-H が、解析した大腸癌組織すべてで発現増大していることを見出した(34,35)(図9)。CENP-A や H は mRNA レベルでも増加していることからこれらの動原体タンパク質の発現増大は転写レベルで起こっていると考えられた(図10)。また、大腸癌組織をそれぞれの抗体(名古屋大学依田博士からの供与)を用いて免疫染色を行ったところ、大腸癌細胞の核では正常な大腸粘膜細胞に比べ、セントロメア独特のドット状シグナルが著明に増加していた(図11,12)。さらに、これらの動原体タンパク質の発現増大が、染色体不安定性の原因であるか調べるために、染色体が正常2倍体を示す大腸癌培養細胞 HCT116 に CENP-A や CENP-H を強制発現させて FISH を用いて染色体数を調べたところ、CENP-A や CENP-H の発現増大が見られた細胞は染色体異数性を示した(図13)。この染色体異数性の原因を調べるために、CENP-A や CENP-H を強制発現させた細胞での M 期染色体上でのそれぞれの局在を調べたところ、CENP-A は染色体全体にわたって存在していたのに対し、CENP-H はセントロメアから消失した(図14)。これらの結果から、セントロメアタンパク質の発現増大はその局在の異常をもたらす、その結果、染色体異数性を引き起こすと考えられた。ヒトの癌組織で、染色体均等分配に直接関わっているタンパク質が発現増大している報告は初めてであり、癌化のメカニズムを理解する上で重要な知見と思われる。以上の結果から、動原体タンパク質の発現異常が癌化の原因であることが示唆され、今後新しい分子標的治療のターゲットとなる可能性があると考えられた。



多種類のタンパク質を二次元電気泳動により分離、可視化し、疾患特異的に発現しているタンパク質を検索する。目的となるタンパク質を質量分析計(MS/MS)により部分アミノ酸配列を決定し、データベース検索からタンパク質を同定する。

ポストシーケンズのゲノム科学3 プロテオミクス 伊藤隆司/谷口寿章編集 より改変

図1. プロテオーム解析の流れ



赤:癌部蛋白>非癌部蛋白 緑:非癌部蛋白>癌部蛋白 白~黄:癌部蛋白≒非癌部蛋白

図2. agarose 2D-DIGE を用いた食道癌のプロテオーム解析

食道癌手術標本の癌部と非癌部からそれぞれタンパク質を抽出し、agarose 2D-DIGE によりタンパク質を分離した。図中赤いスポットは癌部で発現増大しているタンパク質。緑のスポットは癌部で発現減少しているタンパク質。白-黄色は癌部非癌部で発現量の差がないタンパク質。

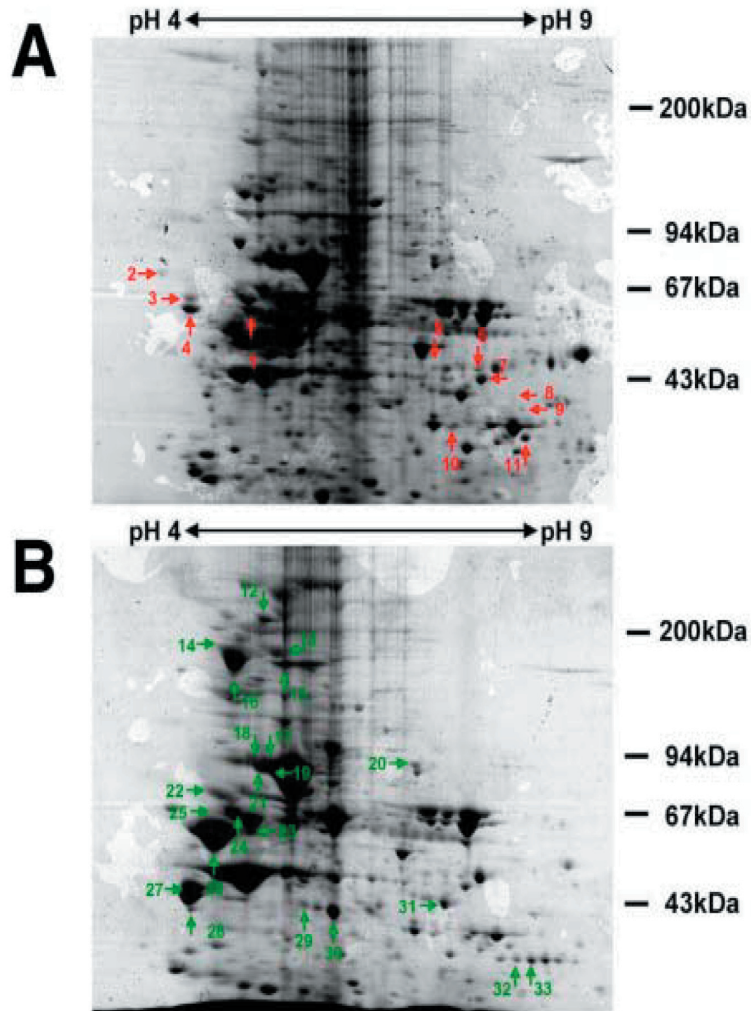


図3. 12例の食道癌症例間で共通して発現の違いの見たタンパク質
 A: 癌部で発現増大しているタンパク質。
 B: 非癌部で発現増大しているタンパク質。
 図は agarose2-DE のクーマシーブルー染色像。

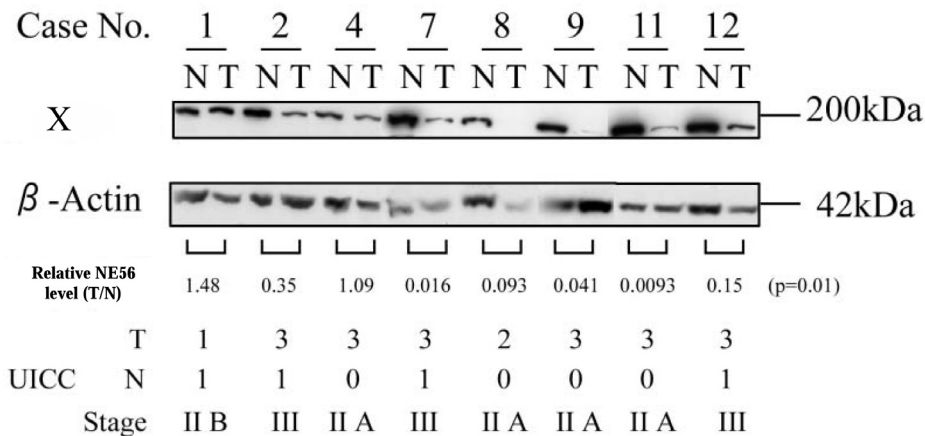


図4. 食道癌組織での X タンパク質の発現減少

食道癌手術標本の癌部と非癌部からそれぞれタンパク質を抽出し、抗 X 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。X は多数の症例で、非癌部に比べて、癌部で発現が低下している。食道癌の進行度は UICC (Union Internationale Contre le Cancer) の TMN 分類に基づいている。

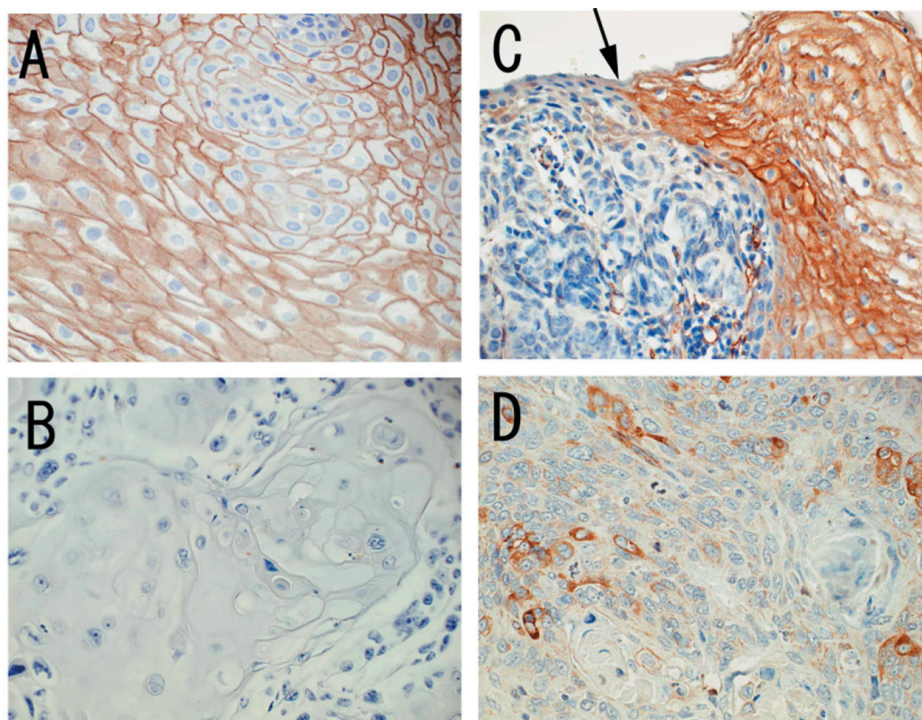


図5. 食道癌組織の抗 X 抗体を用いた免疫染色

食道癌組織の癌部非癌部を抗 X 抗体を用いて免疫染色を行った。X は非癌部では細胞の周囲に局在するのに対して (A)、癌部ではほとんど染色されない (B) か、または一部染色されるが、局在が細胞周囲ではなく細胞質である (D)。(C) X の染色により、癌部非癌部の境界が明瞭に区別できる。

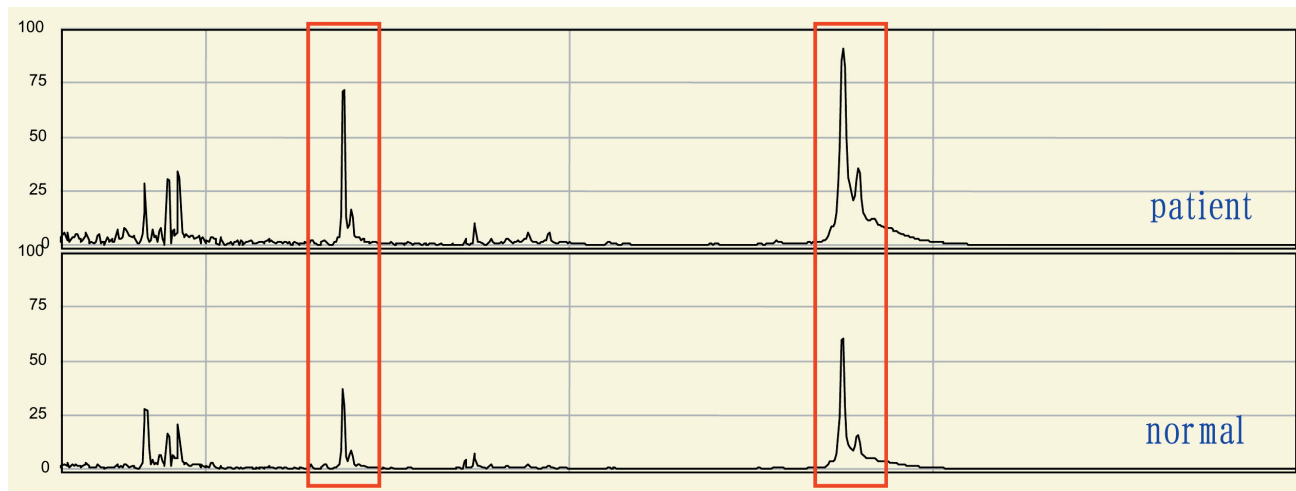


図6. プロテインチップシステムを用いた食道癌腫瘍マーカー候補ペプチドの探索

食道癌患者血清と正常血清をプロテインチップシステムを用いて比較検討した。20 例の患者血清と正常血清を比較した結果、図の赤枠で示したピークが食道癌患者で有意に高値を示しており、食道癌の腫瘍マーカーの可能性が示唆された。

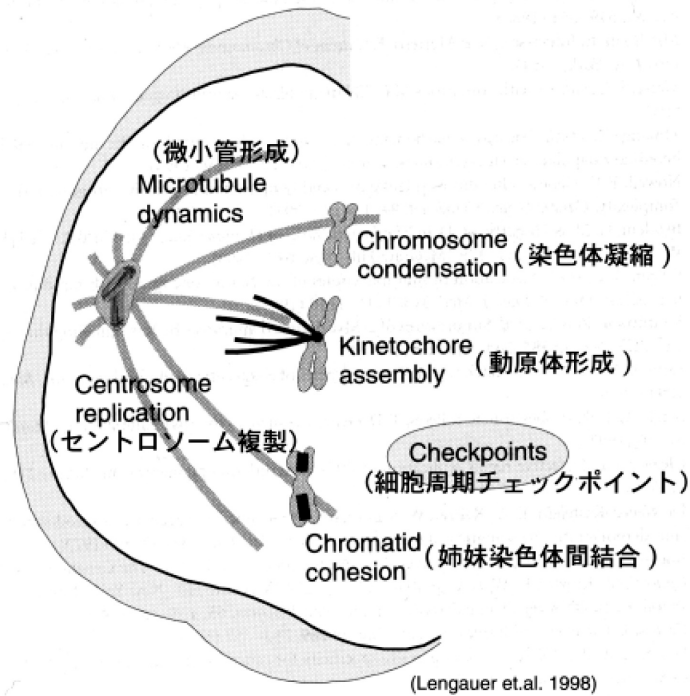


図 7. 染色体安定性に関わる細胞内プロセス

染色体を安定に維持させるためには、染色体が均等に分配されなければならない。その染色体均等分配の制御には姉妹染色体対合、染色体凝縮、動原体形成、セントロソーム複製、微小管形成などの細胞内プロセスと、それらがうまく働いているかどうか監視するチェックポイント機構が重要な役割を担っている。

Structure of kinetochore

(Cheeseman et al. JCB 2002, Westermann et al. 2004)

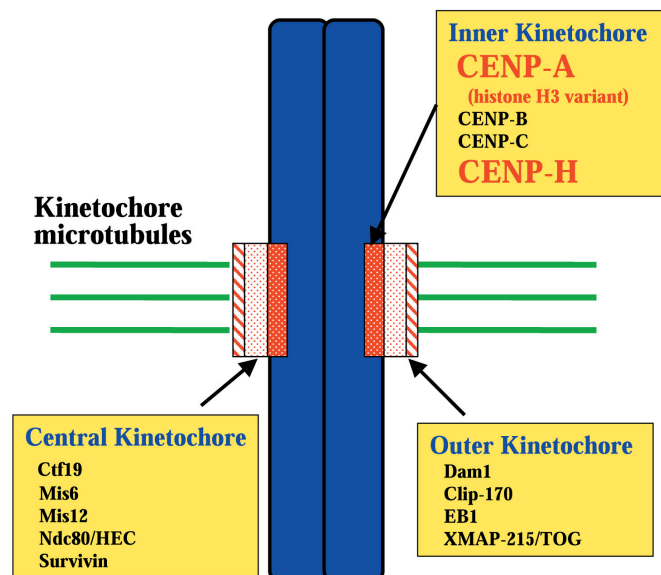


図 8. セントロメア、動原体の構造

染色体のセントロメア領域は、顕微鏡によって一時狭窄部位として観察されるところで、特異なDNA塩基配列を有することを特徴とする。電子顕微鏡観察によって、このセントロメアの表層には、外層 (outer)、中間層 (central)、内層 (inner) の三層構造からなる動原体が形成されており、セントロメアタンパク質 (CENP) をはじめとする多数のタンパク質が集積していることが知られている。

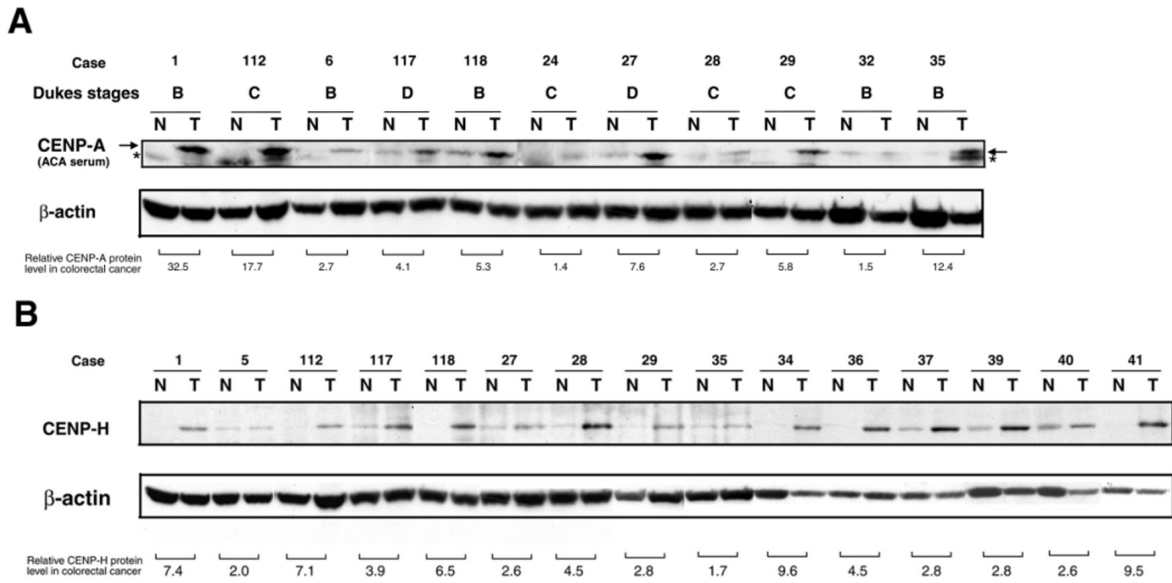


図9. 大腸癌組織でのCENP-A、CENP-Hタンパク質の発現増大

大腸癌手術標本の癌部と非癌部からそれぞれタンパク質を抽出し、抗セントロメア抗体(ANA血清)および抗CENP-H抗体を用いてウエスタンブロットを行った。癌部非癌部におけるCENP-Aの発現(A)とCENP-Hの発現(B)を示す。CENP-A、CENP-H両者とも、ほとんどの症例で癌部での発現が高いことが分かる。

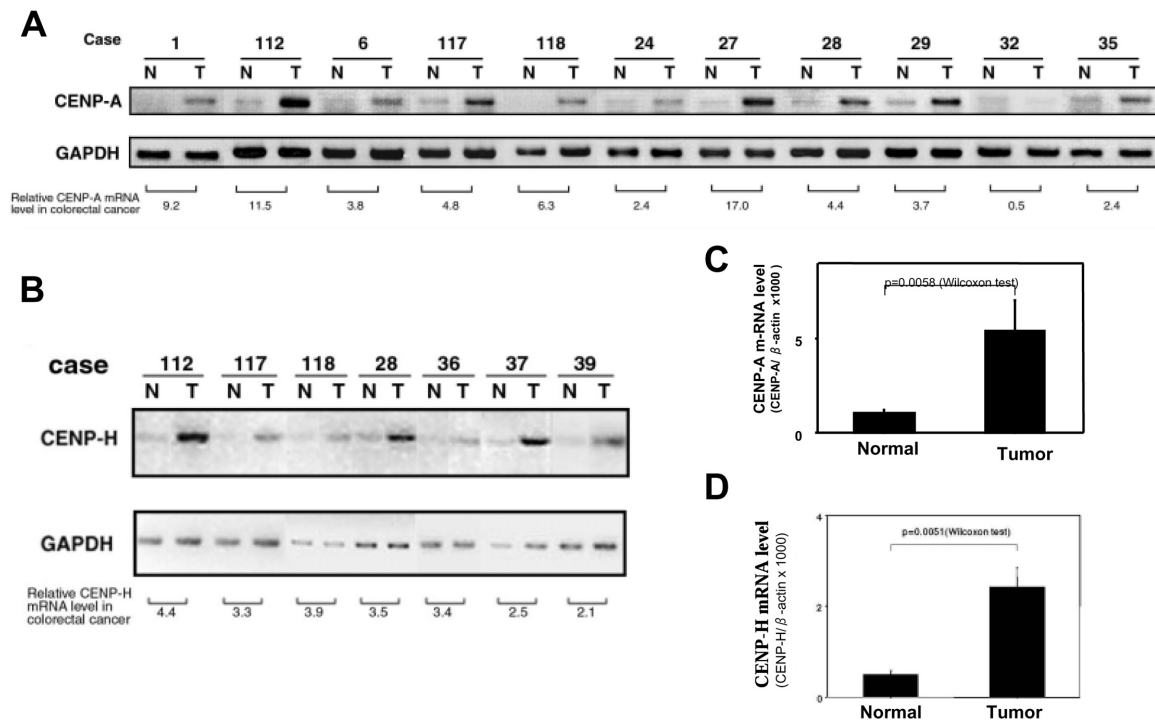


図10. 大腸癌組織でのCENP-A、CENP-Hの転写レベルでの発現増大

大腸癌手術標本の癌部と非癌部からそれぞれ total RNA を抽出し、RT-PCR (A, B)、real-time quantitative RT-PCR (C, D)を用いて mRNA 量の測定を行い、癌部と非癌部で比較した。CENP-A、CENP-H いずれも、ほとんどの症例で癌部での mRNA 量の増加が見られた。

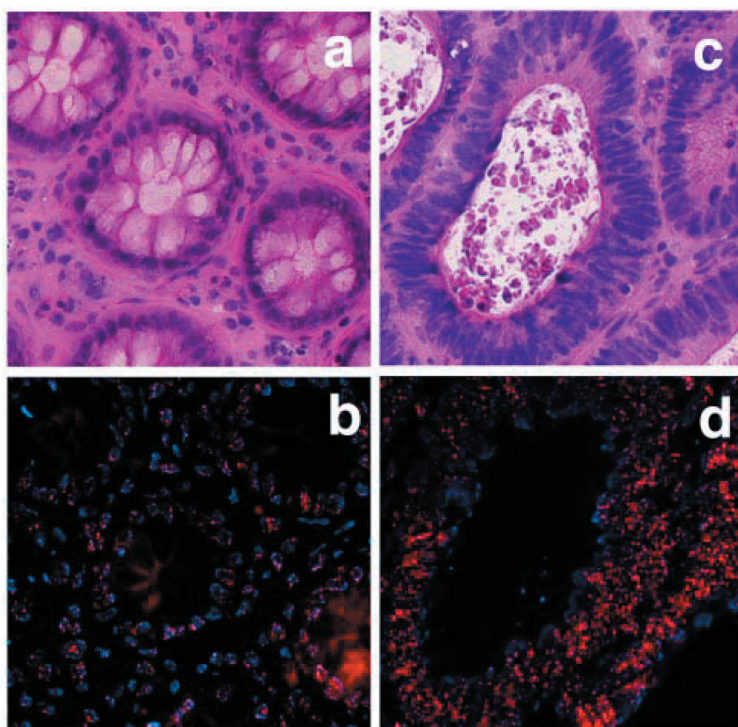


図 11. 大腸癌組織の抗 CENP-A 抗体を用いた免疫染色

大腸癌組織の癌部非癌部を抗 CENP-A 抗体を用いて免疫染色を行った。非癌部に比べて、癌部ではセントロメア独特のドット状シグナルが著明に増加していた。(a) (b) 非癌部、(c) (d) 癌部、(a) (c) HE 染色、(b) (d) 抗 CENP-A 抗体を用いた免疫染色。

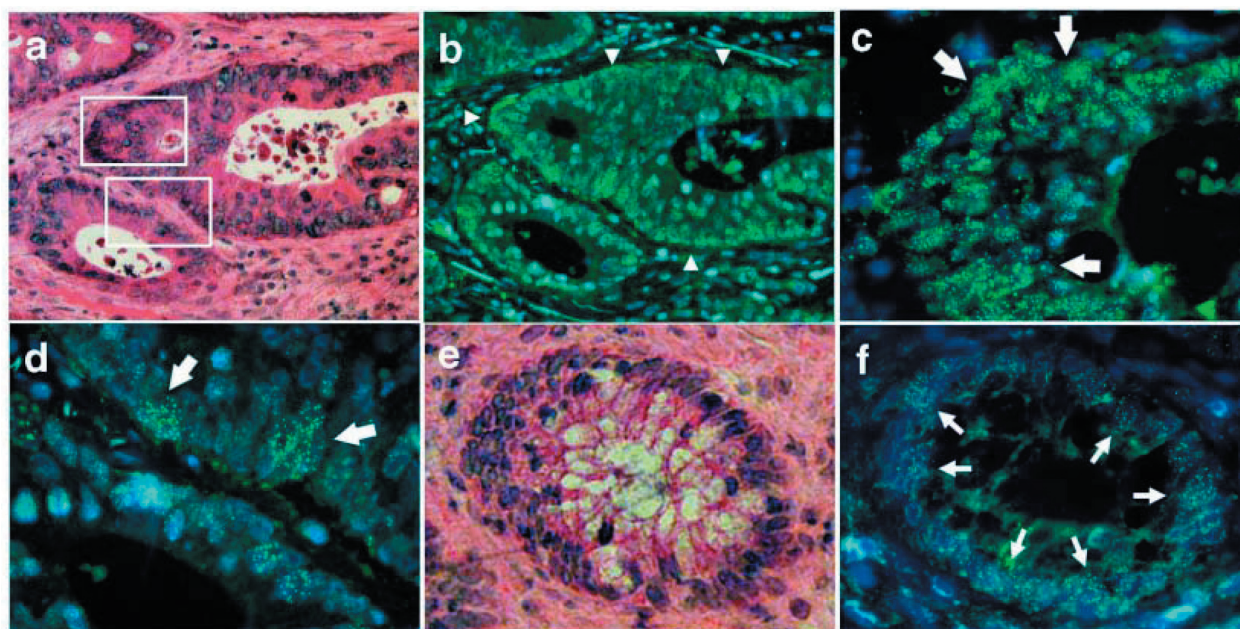


図 12. 大腸癌組織の抗 CENP-H 抗体を用いた免疫染色

大腸癌組織の癌部非癌部を抗 CENP-H 抗体を用いて免疫染色を行った。非癌部に比べて、癌部ではセントロメア独特のドット状シグナルが著明に増加していた。(a) (b) (c) (d) 癌部、(e) (f) 非癌部、(a) (e) HE 染色、(b) (c) (d) (f) 抗 CENP-H 抗体を用いた免疫染色。(c) (d) は (a) の白枠の部分の免疫染色の拡大図。

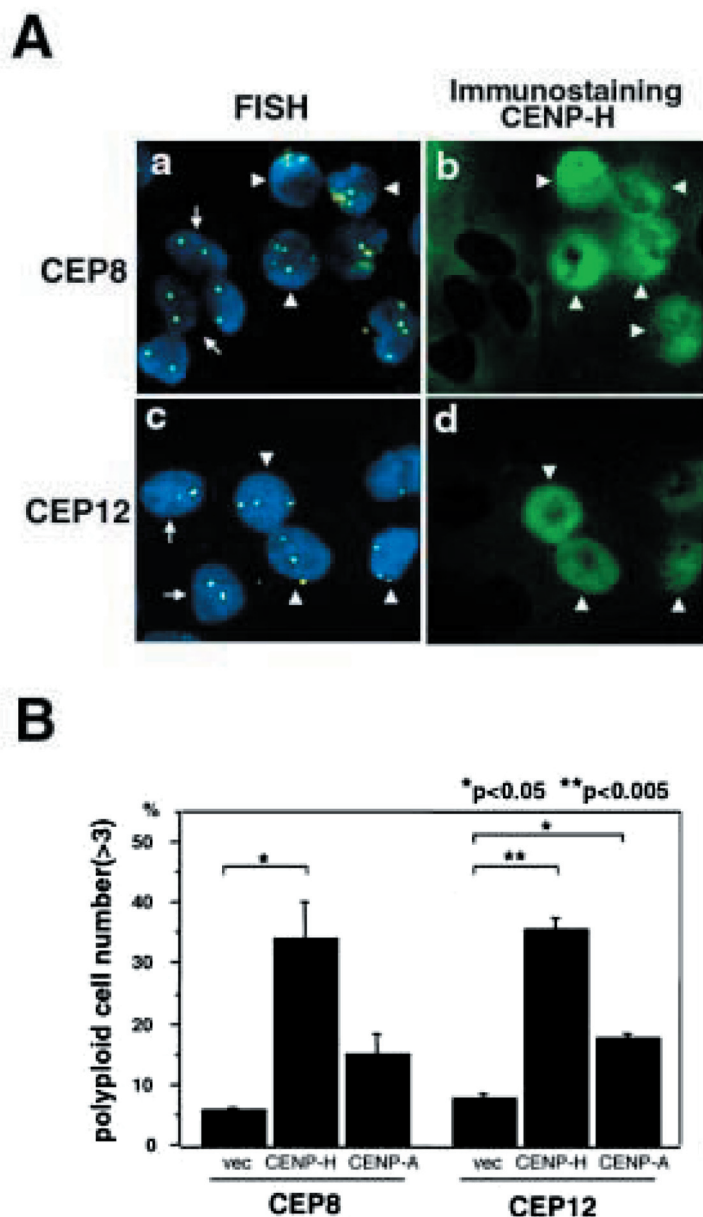


図 13. CENP-A、CENP-H の強制発現による染色体異数性の誘導

染色体が正常 2 倍体を示す大腸癌培養細胞 HCT116 に CENP-A や CENP-H を強制発現させ、それらのタンパク質が強発現した細胞をそれぞれの抗体を用いた免疫染色で確認した。同時に、8, 12 番染色体のセントロメアプローブを用いて FISH を行った。(A) CENP-H が強発現している細胞では染色体異数性が認められる (矢頭)。一方、CENP-H が強発現していない細胞では染色体は正常 2 倍体を示している (矢印)。(a) (c) FISH, (b) (d) 抗 CENP-H 抗体による免疫染色。(B) CENP-A や CENP-H が強発現している細胞での染色体異数性を示す割合。CENP-H の強制発現により、30% 以上の細胞が染色体異数性を示した。一方、CENP-A が強発現している細胞での染色体異数性の割合は 10-20% にとどまった。

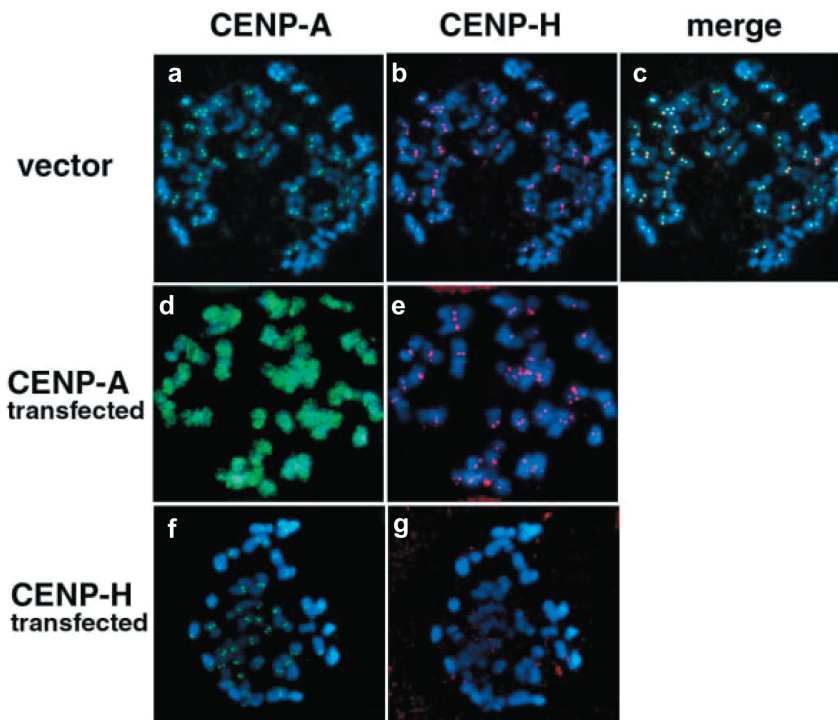


図 14. CENP-A、CENP-H の強制発現による M 期染色体上で異所性の局在

CENP-A や CENP-H を強制発現させた HCT116 細胞の M 期染色体を、抗 CENP-A、CENP-H 抗体を用いて免疫染色を行った。(a) (b) (c) ベクターを transfection した細胞の M 期染色体、(d) (e) CENP-A を強発現させた細胞の M 期染色体、(f) (g) CENP-H を強発現させた細胞の M 期染色体。ベクターを transfection した細胞では CENP-A、CENP-H ともセントロメアに局在するのに対して、CENP-A を強発現させた細胞では、CENP-A は M 期染色体全体に局在した。一方、CENP-H を強発現させた細胞の M 期染色体では CENP-H はほぼ完全にセントロメアから消失した。

表 1. 食道癌組織で発現増大、減少のみられるタンパク質

Protein spot No. ^a	Protein identification	Database accession No. ^b	SEQ score ^c	Coverage (%) ^d	Fold increase ^e
Protein increased in tumor tissue					
1	vimentin	gi 2119204 pir A25074	70.0	19.1	2.27
2	nuclear autoantigenic sperm protein isoform 1	ref NP_751896.1	83.9	5.6	2.97
3	keratin 6	ref NP_775109.1	135.1	25.0	2.28
4	calreticulin precursor	ref NP_004334.1	190.8	34.1	2.36
5	enolase 1	ref NP_001419.1	214.6	35.5	2.42
6	ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2	gi 21903482 sp P22695	145.5	31.3	1.77
7	phosphoglycerate kinase 1	ref NP_000282.1	182.3	37.6	1.77
8	DnaJ (Hsp40) homolog	ref NP_006136.1	125.1	23.2	2.25
9	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	ref NP_002128.1	108.7	27.0	2.1
10	Crystal Structure Of Recombinant Human Fibrinogen Fragment	gi 24987624 pdb 1LT9 B	95.7	32.9	1.95
11	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	ref NP_002128.1	202.6	49.9	2.1
Protein increased in adjacent normal mucosa					
12	X	gi 14195005 sp O60437	242.0	17.3	1.96
13	vinculin	gi 24657579 gb AAH39174.1	202.1	21.9	2.53
14	myosin heavy chain nonmuscle form A	gi 625305 pir A61231	156.8	9.1	2.52
15	caldesmon 1 isoform 1	ref NP_149129.1	71.8	7.9	2.75
16	smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM1	ref NP_002465.1	133.6	8.9	6.2
17	annexin VI	gi 113962 sp P08133	129.4	22.3	3.25
18	heat shock 70kDa protein 8	ref NP_694881.1	78.0	17.6	2.51
19	alpha-fetoprotein	gi 27692693 gb AAH41789.1	135.1	22.3	2.05
20	transferrin	ref NP_001054.1	183.3	21.8	1.72
21	dnaK-type molecular chaperone HSPA1L - human	gi 2119712 pir A29160	125.5	22.0	1.78
22	alpha-1-antitrypsin precursor	gi 1703025 sp P01009	207.6	35.9	2.3
23	desmin	gi 6686280 sp P17661	103.5	23.4	2.15
24	procollagen-proline	ref NP_000909.2	146.3	30.7	1.43
25	alpha-1-antitrypsin precursor	gi 1703025 sp P01009	120.8	29.2	2.3
26	keratin 13, type 1	gi 71526 pir KRH03	185.9	38.2	3.2
27	tropomyosin	gi 7441391 pir T08796	160.3	42.2	3.45
28	beta tropomyosin	gi 6573280 gb AAF17621.1	109.8	25.3	3.45
29	annexin A8	ref NP_001621.1	83.1	27.2	1.59
30	annexin I	ref NP_000691.1	193.5	38.2	1.99
31	aldolase A	gi 229674 pdb 1ALD	85.6	18.2	2.93
32	calponin 1, basic	ref NP_001290.2	78.0	30.6	2.86
33	calponin 1, basic	ref NP_001290.2	118.0	36.4	3.41

^aProtein spots were described in Fig.1

^bReference for protein identification

^cSEQUEST score of candidate proteins. The quality of the candidates were carefully judged as described in Material and Methods.

^dSequence coverage of MS/MS analysis of protein

^eIntensity of spots in 2D-DIGE gel of 12 matched samples (tumor tissue vs normal tissue) was measured by DeCyder™ software.

文 献

1. 安楽泰宏：ゲノムサイエンスの推進とプロテオーム・プロテオミクス研究の役割 プロテオーム解析法（磯辺俊明、高橋信弘編）、羊土社、東京、2000、14-15.
2. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL and Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16: 1090-1094, 1995.
3. Merchant M and Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 21: 1164-1177, 2000.
4. Nelson RW, Nedelkov D and Tubbs KA. Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. *Electrophoresis*. 21: 1155-1163, 2000.
5. Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM and Yates JR. 3rd Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 17: 676-682, 1999.
6. Opiteck GJ, Ramirez SM, Jorgenson JW and Moseley MA. 3rd Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of over-expressed proteins and proteome mapping. *Anal Biochem*. 258: 349-361, 1998.
7. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH and Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 17: 994-999, 1999.
8. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M and Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 17: 1030-1032, 1999.
9. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 250: 4007-4021, 1975.
10. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R and Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 6: 317-339, 1982.
11. Oh-Ishi M and Hirabayashi T. Comparison of protein constituents between atria and ventricles from various vertebrates by two-dimensional gel electrophoresis. *Comp Biochem Physiol B*. 92: 609-617, 1989.
12. Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Shimada H, Ochiai T and Nomura F. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res*. 10: 2007-2014, 2004.
13. Unlu M, Morgan ME and Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 18: 2071-2077, 1997.
14. Nishimori T, Tomonaga T, Matsushita K, Satoh M, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Nomura F, Matsubara H, Shimada H, and Ochiai T. Proteomic analysis of primary esophageal cancer reveals downregulation of a membrane-associated protein. submitted.
15. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S and Takeichi M. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol*. 139: 17-23, 1991.
16. Paweletz CP, Ornstein DK, Roth MJ, Bichsel VE, Gillespie JW, Calvert VS, Vocke CD, Hewitt SM, Duray PH, Herring J, Wang QH, Hu N, Linehan WM, Taylor PR, Liotta LA, Emmert-Buck MR and Petricoin EF. 3rd Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. *Cancer Res*. 60: 6293-6297, 2000.
17. Hopwood D, Moitra S, Vojtesek B, Johnston DA, Dillon JF and Hupp TR. Biochemical analysis of the stress protein response in human oesophageal epithelium. *Gut*. 41: 156-163, 1997.

18. Burt ME, Stein TP, Schwade JG and Brennan MF. Whole-body protein metabolism in cancer-bearing patients. Effect of total parenteral nutrition and associated serum insulin response. *Cancer*. 53: 1246-1252, 1984.
19. Gal AA, Martin SE, Kernen JA and Patterson MJ. Esophageal carcinoma with prominent spindle cells. *Cancer*. 60: 2244-2250, 1987.
20. Weinberger SR, Dalmasso EA and Fung ET. Current achievements using ProteinChip Array technology. *Curr Opin Chem Biol*. 6: 86-91, 2002.
21. Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K, Ohashi T, Nezu M, Sunaga M, Kondo N, Iyo M, Shimada H and Ochiai T. Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics*. 4: 1187-1194, 2004.
22. Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 396: 643-649, 1998.
23. Pihan GA and Doxsey SJ. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol*. 9: 289-302, 1999.
24. Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol*. 12: 82-88, 2000.
25. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR and Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*. 20: 189-193, 1998.
26. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ and Plowman GD. A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J*. 17: 3052- 3065, 1998.
27. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392: 300-303, 1998.
28. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK and Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol*. 3: 429-432, 2001.
29. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH and Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*. 3: 433-438, 2001.
30. Green RA and Kaplan KB. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol*. 163: 949-961, 2003.
31. Saitoh S, Takahashi K and Yanagida M. Mis6, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. *Cell*. 90: 131-143, 1997.
32. Goshima G, Saitoh S and Yanagida M. Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes Dev*. 13: 1664-1677, 1999.
33. Takahashi K, Chen ES and Yanagida M. Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science*. 288: 2215-2219, 2000.
34. Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, Oohashi T, Shimada H, Ochiai T, Yoda K and Nomura F. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res*. 63: 3511-3516, 2003.
35. Tomonaga T, Matsushita K, Ishibashi M, Nezu M, Shimada H, Ochiai T, Yoda K and Nomura F. Centromere protein H is upregulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy. *Cancer Res*. in press.