

200909008A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

難治がんの創薬バイオマーカー探索研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成22(2010)年 5月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

難治がんの創薬バイオマーカー探索研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 22 (2010) 年 5 月

別添 2 (目次)

I. 総括研究報告

- 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 1
山田哲司

I I. 分担研究報告

1. 肝細胞がんの創薬バイオマーカーの同定 5
山田哲司
2. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 1 1
金井弥栄
3. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 1 7
近藤格
4. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 2 2
中山敬一
4. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究 3 2
工藤雅文、竹内雅博

I I I. 研究成果の刊行に関する一覧表 3 6

I V. 研究成果の刊行物・別刷 3 8

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）総括研究報告

「疾患関連創薬バイオマーカー探索研究」

	氏名	所属	職名
研究代表者	山田哲司	国立がんセンター研究所化学療法部	部長

研究要旨

本研究では、難治がんの外科切除標本を用い、質量分析・蛍光二次元電気泳動・エクソンアレイなどのゲノム・プロテオームの手法で大規模な定量発現解析と機能解析を行い、がん細胞の生存・増殖に必須な膜タンパク質・酵素・シグナル伝達経路などを同定し、これらの分子（分子経路）の機能を阻害する化合物・抗体医薬を開発することを目的としている。本年度は肝細胞がんの治療標的探索のため、エクソンアレイを用いた遺伝子発現と siRNA をもちいた複合解析、エクソンごとの発現解析によるスプライスバリエーション解析、蛍光二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析で肝細胞がんの治療標的を探索した。肝細胞がんにて特異的に発現し、肝細胞がん細胞の増殖に必須な分子を同定することができた。さらに DNA メチル化プロファイリングに基づく膵がんの存在診断・予後診断指標、質量分析を用いてリン酸化タンパク質を定量する Phospho-mTRAQ 法技術の基盤を確立した開発した。

研究分担者

金井弥栄 国立がんセンター研究所病理部・部長	柴田龍弘 国立がんセンター研究所ゲノム構造解析プロジェクト・リーダー
中山敬一 九州大学生体防御医学研究所・教授	浅村尚生 国立がんセンター中央病院第一領域外来部・医長
近藤 格 国立がんセンター研究所プロテオームバイオインフォマティクスプロジェクト・リーダー	小菅智男 国立がんセンター中央病院・副院長
本田一文 国立がんセンター研究所病理部・室長	工藤雅文 アステラス製薬株式会社創薬研究本

部・薬理研究所癌研究室・室長

竹内雅博

アステラス製薬株式会社創薬研究本部・薬理研究所癌研究室・専務理事

A. 研究目的

肝細胞がん、肺がん、胃スキルスがん、膵がんなどの難治がんの外科切除標本を用い、質量分析・蛍光二次元電気泳動・エクソンアレイなどのゲノム・プロテオームの手法で大規模な定量発現解析と機能解析を行い、がん細胞の生存・増殖に必須な膜タンパク質・酵素・シグナル伝達経路などを同定し、これらの分子（分子経路）の機能を阻害する化合物・抗体医薬を開発することを目的とする。

B. 研究方法

エクソンアレイ解析

国立がんセンター中央病院にて切除を受けた肝細胞がんのがん組織と背景肝組織、19種類の全身の正常組織を用いて、ヒト全エクソンにプローブの設計された Human Exon 1.0 ST arrays (Affymetrix 社製)にてゲノム網羅的なエクソンレベルでの遺伝子発現解析を行った。

蛍光二次元電気泳動法

肝細胞がんのがん組織と背景肝組織合計 82 検体（腫瘍組織 42 検体、非腫瘍組織 40 検体）を対象に、蛍光二次元電気泳動法を実施した。

エピゲノム解析

浸潤性膵管がん症例より得られた非がん膵組織・膵がん組織と、非膵がん症例手術材料より得られた正常膵組織を用いて BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイランド増幅法 (BAMCA) 法により、DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析した。

リン酸化タンパク質の絶対定量

EGF で刺激した HeLa 細胞抽出物をトリプシン消化し、IMAC によるリン酸化ペプチドの精製を行った。内部標準として EGF レセプター、Erk1、Erk2 のリン酸化部位に対応するリン酸化ペプチドを合成し、加えた。得られたリン酸化ペプチドを mTRAQ 試薬で標識し、QTRAP5500 にて分析した。

(倫理面への配慮)

平成 19 年 8 月 16 日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」などに従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織等の研究利用につき文書で同意を得ている。検体は連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。

C. 研究結果

肝細胞がんの新規治療標的の同定

エクソンアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、多段階の検証・特異性の検討・機能解析を行い、最終的に治療標的候補分子として *AKR1B10*,

HCAP-G, RRM2, TPX2 の 4 遺伝子を同定した。これら 4 種類の遺伝子の発現を RNA 干渉にて抑えると、免疫不全マウスに移植した腫瘍の増殖が有意に抑制されることが明らかになった。これら 4 種類の遺伝子産物は肝細胞がんでは著明に発現し、有望な治療標的分子であると考えられた。

肝細胞がんの新規スプライスバリエント同定

肝細胞癌症例 50 例のエクソンアレイデータの PAC 解析法により、タンパク質キナーゼ 9 種のエクソン発現異常が予備的に抽出された。当該遺伝子の 5' -RACE クローニングおよび塩基配列決定により、融合変異は検出されなかったが、いくつかのタンパク質リン酸化酵素のキナーゼドメインを有する新規スプライシングバリエントの可能性が示唆された。

肝細胞がんの異常発現タンパク質の同定

肝細胞がんと背景肝組織の間で発現強度に差のあったスポット ($p < 0.05$ 、群間平均 2 倍以上) は 61 個あった。61 個のタンパク質スポットを切り取り、一部はペプチド抽出を行いタンパク質同定を実施した。

膵がんと特異的なメチル化異常領域の同定

膵がん組織では、DNA メチル化の減弱・亢進を示す BAC クローンが多くみられ、DNA メチル化の減弱・亢進の程

度も高かった。感度・特異度とも 100% で膵がん検体を診断することができ、異常メチル化領域を同定した。また、膵がんの切除症例の早期再発群を長期無再発群を最もよく区別できる 11BAC クローンを同定した。

リン酸化タンパク質の絶対定量

EGF レセプターのある部位は EGF 添加直後から高度のリン酸化を示すのに対して、それ以外の部位では非常にゆっくりとリン酸化が起こることがわかった。一方で Erk1 や Erk2 のリン酸化は EGF 刺激から数百秒遅れて最大値を取り、明らかに EGF レセプターよりも遅い時間特性を有することが明らかとなった。しかし MRM による定量法にはいくつかの問題点があることも判明した。

D. 考察

エクソンアレイを用いた網羅的な発現解析と機能解析で、肝細胞がんの治療標的候補分子として AKR1B10, HCAP-G, RRM2, TPX2 の 4 遺伝子を同定したことができた。これらの遺伝子の発現は肝細胞がんの特異性が高く、肝細胞がん細胞の増殖に必須であり、治療候補分子として有望である。

また、エクソンアレイで見出された新規スプライスバリエントは、脳、脾臓等の正常組織においても有意に検出されたため、あるいは低コピー発現が示唆されたため、診断マーカー・治療標的としての可能性は低いと判断した。

侵襲性の高い膵生検を行っても、採取される組織は極めて少量で、膵管上皮が採取されず確定診断に到らない場合がある。得られる細胞数が多い膵液細胞診でも、膵液中でのがん細胞の変性が顕著で、形態学的診断は困難を極める。本研究で見出したエピジェネティック診断は、膵がんの存在診断として適切と考えられる。膵がんの予後予測指標は、膵切除術後の経過観察計画の策定に有用と期待されるのに加え、膵生検検体においても同様に予後予測を行えば、予後良好群に対する切除術の適応拡大等にも用いると期待された。

E. 結論

今後はこれらの遺伝子に対する siRNA を用いた核酸治療、あるいは AKR1B10 と RRM2 は酵素であるため、これに対する阻害化合物の開発に取り組む。肝臓に特異的に siRNA をデリバリーする方法は既にいくつか考案されているものがある。これら 4 遺伝子の発現は背景肝組織での発現が低く sorafenib 治療の対象にならない肝機能の不良症例でも、副作用を抑えた治療が可能であるかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

分担研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「肝細胞がんの創薬バイオマーカー同定」

	氏名	所属	職名
研究者代表者	山田哲司	国立がんセンター研究所化学療法部	部長
研究分担者	本田一文	国立がんセンター研究所化学療法部	室長

研究要旨

近年多キナーゼ阻害薬である sorafenib (BAY 43-9006) が進行した肝細胞がん患者の生存期間を有意に延長することが第 3 相試験にて報告され、米国の米国食品医薬品局に切除不能の肝細胞がん患者の治療薬として承認されている。しかしこの臨床試験は比較的良好な肝機能を示す症例に限られ、肝機能の予備能の乏しい症例での有効性については明らかではなかった。背景肝組織で発現せず、肝細胞がん組織に特異的に発現し、肝細胞がん細胞の増殖に必須な分子を同定できれば、肝細胞がんの新たな治療薬の標的になるものと考えられる。

本研究では国立がんセンターで手術を受けた肝細胞がん症例の手術検体を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、他段階の検証・特異性の検討・機能解析を行い、最終的に治療標的候補分子として *AKR1B10*, *HCAP-G*, *RRM2*, *TPX2* の 4 遺伝子を同定した。これら 4 種類の遺伝子の発現を RNA 干渉にて抑えると、免疫不全マウスに移植した腫瘍の増殖が有意に抑制されることが明らかになった。これら 4 種類の遺伝子産物は肝細胞がんで著明に発現し、有望な治療標的分子であると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞がんは B 型あるいは C 型の肝炎ウイルスの持続感染により発生することは良く知られているが、その発生のメカニズムについては殆ど明らかになっていない。肝細胞がんに対して肝切除、経皮的エタノール注入療法 (ethanol injection)、経皮的ラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation)、化学塞栓療法 (transarterial chemoembolization)

などの局所療法が有効であるが、進行・再発肝細胞がんに対する有効な抗がん剤は無かった。近年多キナーゼ阻害薬である sorafenib (BAY 43-9006) が切除不能の肝細胞がん患者の生存期間を有意に延長することが第 3 相試験にて報告され、米国の米国食品医薬品局に切除不能の肝細胞がん患者の治療薬として承認されている。しかしこの臨床試験は比較的良好な肝機能を示す症例に限られ、肝機能の予備

能の乏しい多くの進行・再発肝細胞がん患者への sorafenib の有効性については明らかではなかった。

背景肝組織で発現せず、肝細胞がん組織に特異的に発現し、肝細胞がん細胞の増殖に必須な分子を同定できれば、肝細胞がんの新たな治療薬の標的になるものと考えられる。

本研究では国立がんセンターで手術を受けた肝細胞癌症例の手術検体を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、「B. 研究方法」に示す多段階の検証・機能解析を行い、最終的に治療標的候補分子 4 遺伝子を同定した。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院にて切除を受けた肝細胞がん症例 84 症例の切除後、凍結保存されていた手術検体がん組織と背景肝組織を用いた。

RNA 抽出の目的で組織検体を液体窒素の存在下で破碎した。次にキアゲン社の RNeasy Plus Mini Kit を用いて組織検体から RNA を抽出し、濃度測定を行った。RNA の品質測定はアジレント社のバイオアナライザを用いて行った。ヒト全エクソンにプローブの設計された Human Exon 1.0 ST arrays (Affymetrix 社製)にて Discovery set 1、10 例と Discovery set 2、10 例の合計 20 例と 19 種類の全身の正常組織で、ゲノム網羅的な遺伝子発現解析を行った。

3 種類の肝細胞がん由来の培養細胞 (KIM-1, Hep3B, HLE) に対して RNA 干渉による細胞増殖を検討した。細胞増

殖は Premix WST-1 Cell

Proliferation

Assay System (Takara Bio) および dye exclusion test にて評価した。

さらにエクソンアレイをおこなった症例とは別の症例で、定量的な PCR 法と組織切片の免疫組織化学染色を行い、肝細胞がんの特異的な遺伝子・タンパク質発現の検証を行った。

最終的に選択された治療標的候補分子 4 遺伝子に対する small interfering RNA (siRNA) およびコントロールの RNA を合成し、免疫不全マウス (BALB/c nu/nu nude mice) の皮下に KIM-1 細胞を注入して形成させた腫瘍に対し投与し、腫瘍増殖に及ぼす影響を検討させた。

(倫理面への配慮)

国立がんセンターの倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮したがん患者の手術検体を用いた。動物実験に関しては動物の生命の尊厳を尊重し、動物の受ける苦痛を最低限にするような配慮のもと研究計画を作成し、国立がんセンターの動物実験倫理委員会の審査・承認を受け、科学的に妥当な最低限の個体数を用いて行った。

C. 研究結果

Discovery set 1 の 10 例と Discovery set 2 の 10 例のいずれにおいても背景肝組織にくらべ統計学的に有意 ($P <$

0.001, t test)で、3倍以上の発現亢進、がある9遺伝子(AKR1B10, ANLN, CCNB1, HIST1H3B, HIST1H3C, HIST1H3I, RRM2, TOP2A, TPX2)を選択した、さらに両set 20例での解析でさらに2遺伝子(HCAP-G, DEPDC1)を選択した。

これらの合計11遺伝子に対し、それぞれ2-3種類のsiRNAを合成し、KIM-1, Hep3B, HLEの3種類の肝細胞がん培養細胞に導入し、細胞増殖を評価した。2種類以上のsiRNAで20%以上の細胞増殖抑制を示す遺伝子としてTPX2, RRM2, HCAP-G, HIST1H3I, and AKR1B10を選択した。さらに細胞数をカウントし、確認した。

またエクソンアレイに用いたのとは別の20例(validation set 1)と44例(validation set 2)でリアルタイムPCRを行い、肝細胞がんでの発現亢進を検証した。全身の18種類の正常重要臓器のRNAでエクソンアレイ解析を行い、TPX2, RRM2, HCAP-Gは胸腺以外で発現が無いことを確認した。AKR1B10は小腸に弱い発現が見られたが、肝細胞がん組織に比べ有意に低値であった。HIST1H3Iは種々の正常臓器で有意な発現をしめたので、この段階ではずした。

さらに19例の肝細胞がんの切除標本の組織切片で免疫組織染色を行い、TPX2, RRM2, HCAP-G, AKR1B10遺伝子はタンパク質レベルでも42%以上の症例で、肝細胞がんが発現亢進していることを明らかにした。

最後に免疫不全マウスの皮下にKIM-1細胞を注入し、形成させた移植

腫瘍に対しTPX2, RRM2, HCAP-G, AKR1B10に対するsiRNAを局所投与し、腫瘍の増殖を観察した。KIM-1細胞を注入後1週間で形成された腫瘍に対し、一週間間隔で2回siRNAを投与した。AKR1B10に対するsiRNAは $P < 0.012$ 、TPX2, RRM2, HCAP-Gに対するsiRNAは $P < 0.0001$ の有意差をもって、腫瘍の増殖を抑制した。

D. 考察

バイアスの無い網羅的なゲノム発現解析と独立した症例での検証、正常組織での発現解析、タンパク質レベルでの発現解析、さらに培養細胞と移植腫瘍に対する機能解析で、肝細胞がんの治療標的候補分子としてAKR1B10, HCAP-G, RRM2, TPX2の4遺伝子を同定したことができた。胸腺組織は成人ではほとんど萎縮していることから、これらの遺伝子の発現は肝細胞がんの特異性が高く、肝細胞がん細胞の増殖に必須であり、治療候補分子として有望である。既にAKR1B10の肝細胞がんでの特異的な遺伝子発現が報告されていたが、本遺伝子が肝細胞がんの細胞増殖に必須であることは知られていなかった。HCAP-G, RRM2, TPX2の3遺伝子の肝細胞がんにおける発現や細胞増殖への機能的な関与はまったく新規な知見である。

今後はこれらの遺伝子に対するsiRNAを用いた核酸治療、あるいはAKR1B10とRRM2は酵素であるため、これに対する阻害化合物の開発に取り組む。肝臓に特異的にsiRNAをデリバ

リーする方法は既にいくつか考案されているものがある。これら4遺伝子の発現は背景肝組織での発現が低く、sorafenib 治療の対象にならない肝機能の不良症例でも、副作用を抑えた治療が可能であるかもしれない。

E. 結論

これら4種類の遺伝子および遺伝子産物は肝細胞がんで特異的に発現し、また肝細胞がんの増殖に必須であることから、有望な治療標的分子であると考えられる。

さらに骨肉腫など別のがん種においても同様なアプローチで有望な治療標的分子が同定された。本報告書には記載しないが、「研究成果の刊行物・別刷」に論文別刷りを加える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T.

Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma.

Clin Cancer Res.

2010 May 1;16(9):2518-28.

2: Matsubara J, Ono M, Honda K, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, Furuse

J, Furuta K, Sugiyama E, Saito Y, Kaniwa N, Sawada J, Shoji A, Sakuma T, Chiba T, Saijo N, Hirohashi S, Yamada T.

Survival prediction for pancreatic cancer patients

receiving gemcitabine treatment.

Mol Cell Proteomics.

2010 Apr;9(4):695-704.

3: Kobayashi E, Masuda M, Nakayama R, Ichikawa H, Satow R, Shitashige M, Honda K, Yamaguchi U, Shoji A, Tochigi N, Morioka H, Toyama Y, Hirohashi S, Kawai A, Yamada T.

Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma.

Mol Cancer Ther.

2010 Mar;9(3):535-44.

4: Yamaguchi U, Honda K, Satow R, Kobayashi E, Nakayama R, Ichikawa H, Shoji A, Shitashige M, Masuda M, Kawai A, Chuman H, Iwamoto Y, Hirohashi S, Yamada T.

Functional genome screen for therapeutic targets of osteosarcoma. *Cancer Sci.*

2009 Dec;100(12):2268-74.

5: Ono M, Matsubara J, Honda K, Sakuma T, Hashiguchi T, Nose H, Nakamori S, Okusaka T, Kosuge T, Sata N, Nagai H, Ioka T, Tanaka S, Tsuchida A, Aoki T, Shimahara M,

Yasunami Y, Itoi T, Moriyasu F, Negishi A, Kuwabara H, Shoji A, Hirohashi S, Yamada T.

Prolyl 4-hydroxylation of alpha-fibrinogen: a novel protein modification revealed by plasma proteomics.

J Biol Chem.

2009 Oct 16;284(42):29041-9.

6: Negishi A, Masuda M, Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T, Kuwabara H, Nakanishi Y, Kanai Y, Omura K, Hirohashi S, Yamada T.

Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma.

Cancer Sci.

2009 Sep;100(9):1605-11.

7: Matsubara J, Ono M, Negishi A, Ueno H, Okusaka T, Furuse J, Furuta K, Sugiyama E, Saito Y, Kaniwa N, Sawada J, Honda K, Sakuma T, Chiba T, Saijo N, Hirohashi S, Yamada T.

Identification of a predictive biomarker for hematologic toxicities of gemcitabine.

J Clin Oncol.

2009 May 1;27(13):2261-8.

2. 学会発表

Honda K, Yamada T

Early detection of pancreatic cancer using mass spectrometry; a

multi-institutional validation study.

2nd DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research

(July 7-9, 2009)

Yamada T.

Cancer Biomarker and Drug Target Discovery by Proteomics

2nd JST-ETHZ Joint Workshop on Molecular Medical Research (September

22-23, 2009)

Shitashige M, Satow R, Yamada T.

Search for potential drug targets in the Wnt signaling pathway of colorectal cancer.

The 14th Korea-Japan Cancer Research Workshop Translational cancer research and progress in colorectal cancer

(December 18-19, 2009)

Shitashige M, Satow R, Yamada T.

TNIK is a protein kinase essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth

The 14th Korea-Japan Cancer Research Workshop Translational cancer research and progress in colorectal cancer

(December 18-19, 2009)

Yamada T

Identification of Biomarkers and Therapy Targets by Proteomics

The 8th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Cancer Genomics, Epigenomics, and the

Development of Novel Therapeutics

(February 5-9, 2010)

Honda K, Ono M, Yamada T.

Detection of early-stage pancreatic cancer by mass spectrometry: a multi-institutional validation study

4th International cancer biomarker consortium conference

(March 22-23, 2010)

Ono M, Honda K, Yamada T.

Prolyl 4-hydroxylation of alpha-fibrinogen - A novel protein modification discovered by plasma proteomics

4th International cancer biomarker consortium conference

(March 22-23, 2010)

Yamada T.

Identification of biomarkers applicable to the early detection and therapy tailoring of patients with pancreatic cancer by label-free quantitative mass spectrometry

4th International cancer biomarker consortium conference

(March 22-23, 2010)

(国内学会は多数のため、省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

発明の名称：「膵臓癌の検出法」

発明者：本田一文、山田哲司、廣橋説

雄

出願日：2009年1月30日、2010年1月29日（国際PCT出願）

出願番号：特願2009-019920（国内出願）、PCT/JP2010/051225（国際PCT出願）

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：「早期肺腺がんの予後予測および治療のための医薬品組成物」

発明者：本田一文、山田哲司、野呂林太郎、廣橋説雄

出願日：2010年3月30日

出願番号：特願2010-078772（国内出願）

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：「バイオマーカー」

発明者：本田一文、山田哲司、幕内洋介、逢坂由昭、廣橋説雄

出願日：2010年3月31日

出願番号：特願2010-083198（国内出願）

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

	氏名	所属	職名
分担研究者	金井弥栄	国立がんセンター研究所病理部	部長

研究要旨

本研究では、肝細胞がん、肺がん、胃スキルスがん、膵がんなどの難治がんの外科切除標本を用い、オーム解析技術を駆使して創薬標的を同定し、リード化合物・抗体医薬を開発することを目的としている。本研究には、大規模オーム解析に耐える質と量を備え、疾患や病態の多様性に応じて十分数が確保され、説明と同意に基づく倫理性が担保され、質の高い病理情報が付随した臨床試料を用いることが必須である。国立がんセンター病理部において日常的に外科病理診断に従事する分担研究者は、外科切除標本のうち病理診断に支障を来さない診療後の残余組織を、個人情報保護と核酸・蛋白の保持に留意しつつ収集・保管し、厳密に匿名化して本研究のオーム解析に提供する。さらに、外科切除標本の病理組織学的解析を行い、バイオインフォマティクス処理でオーム解析結果を意義付けするための、詳細な病理情報を提供する。加えて、独自のエピゲノム解析により難治がんの診断マーカーを獲得することも目指しており、本年度はDNAメチル化プロファイリングに基づく膵がんの存在診断・予後診断指標を開発した。

A. 研究目的

肝細胞がん、肺がん、胃スキルスがん、膵がんなどの難治がんの外科切除標本を用い、オーム解析技術を駆使して創薬標的を同定し、リード化合物・抗体医薬を開発することを目的とする。分担研究者は、質の高い病理情報の付随した臨床試料を提供するとともに、独自のエピゲノム解析により難治がんの診断マーカーを獲得することも目指す。

B. 研究方法

1. 臨床試料の提供：診療後の残余の

組織の研究利用について、文書にて同意の得られている肝細胞がん等の症例の、外科切除標本が病理部に提出されたとき、分担研究者等は直ちに肉眼診断・写真撮影・術中迅速診断等を行い、この間に病理組織診断のための永久標本作製に支障を来さない部位より研究用組織検体を採取した。採取した組織は、直ちに液体窒素中で急速凍結し、核酸・蛋白の変性・分解を防いで適切に保管した。永久標本作製後に、顕微鏡的観察・免疫組織化学により個々の症例の臨床病理学的解析を行った。国立がん研究センター研究所に

において連結可能匿名化業務に従事する「連携研究支援プロジェクト」において、連結可能匿名化したのち、組織検体ならびに病理情報を本研究のオーム解析のために供与した。

2. エピゲノム解析による診断マーカー開発：2003-2008年に国立がんセンター中央病院で切除術が施行された浸潤性膵管がん症例より得られた非がん膵組織 (N) 17 検体・膵がん組織 (T) 46 検体と、非膵がん症例手術材料より得られた正常膵組織 (C) 8 検体を学習コホートとし、BAC アレイを基盤とするメチル化 CpG アイランド増幅法 (BAMCA) 法により、DNA メチル化状態をゲノム網羅的に解析した。BAMCA 法において、はじめに検体ならびに対照となるゲノム DNA を DNA メチル化感受性制限酵素 SmaI で消化し、DNA メチル化を受けていない CpG 部位に平滑末端を得た。次に、DNA メチル化非感受性制限酵素 XmaI で消化し、DNA メチル化を受けていた CpG 部位にのみ突出末端を得た。突出末端にアダプターを付加し、アダプターにアニールするプライマーを用いて蛍光標識ならびに PCR 増幅を施行した。これを、Whole Genome Array-4500 に、43 °C・72 時間の条件で共ハイブリダイゼーションした。遺伝子の不活化に直接関与しない領域の DNA メチル化状態は発がん早期から変化する可能性があること、染色体不安定性に先行して DNA メチル化が変化するゲノム領域はプロモーター領域に限局しないことから、通常用いられるプロモーターアレイではなく、ここでは上記カスタム BAC アレイを用いた。同アレイは国立がんセンターと東京医科歯科大

学稲澤譲治教授が共同で開発したものである。

GenePix Personal 4100A (Axon Instruments, Foster City, CA) でスキャンし、結果を GenePix Pro 5.0 imaging software (Axon Instruments) ならびに Acue 2 software (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan) により解析した。ゲノム網羅的 DNA メチル化状態に基づく階層的クラスタリングは、Impressionist software (Gene Data, Basel, Switzerland) を用いて施行した。

得られた診断指標の妥当性を検証するため、同時期に同院で切除術が施行された C7 検体・N16 検体・T45 検体を検証コホートとした。両コホート間で、C・N・T とも、性別・年齢等に偏りが無いことを確認している。

(倫理面への配慮)

平成 19 年 8 月 16 日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、国立がんセンター倫理委員会に研究の承認を得、倫理面に充分配慮して研究を進めた。手術材料の残余の組織等の研究利用につき、患者に対してあらかじめ説明し、文書で同意を得ている。試料の採取に当たっては、患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作製して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせなかった。全ての分子病理学的解析は、連結可能匿名化し、患者の個人情報保護に充分配慮して進めた。すなわち、個人識別番号と匿名化番号の対応表は、研究所内におかれた匿名管理者によって終始厳重に管理さ

れ、診療情報と同時に閲覧されることはなかった。実験室においては、終始患者個人を特定することなく研究を進めた。

C. 研究結果

Nでは既に、Cに見られた個体差や加齢の範囲を越えて、多数のBACクローンがDNAメチル化の減弱・亢進を示した。Tでは、DNAメチル化の減弱・亢進を示すBACクローンがさらに増加し、DNAメチル化の減弱・亢進の程度も亢進した。CとNの差違には、炎症等を反映する変化と前がん段階における異常の双方が含まれる可能性がある。C・NとTの差違には、C・Nの主体が膵がんの発生源である末梢膵管上皮ではなく腺房細胞等であることも寄与している可能性がある。そこで、DNAメチル化プロファイルを、膵液等による膵がんの存在診断に用いることを目指した。

学習コホートのC・Nに比しTにおいて有意なDNAメチル化減弱・亢進を示す、521BACクローンを抽出した。抽出した各BACクローンについて、特異度100%となるようにカットオフ値を設定し、TをC・Nから最もよく区別できる12BACクローンを同定した。12BACクローンのカットオフ値を組み合わせた診断基準を用いれば、学習コホートのT46検体を、感度・特異度とも100%でC・Nから区別し、膵がん検体と診断することができた。検証コホートのT45検体も、感度・特異度とも100%で膵がん検体と診断することができ、診断基準の妥当性が検証された。

次に膵がんの症例の予後予測指標を得るために、術後ゲムシタビンによるアジ

ュバント化学療法を受けていない学習コホート症例のうち、膵切除術後18箇月以内に再発した早期再発群17例のTにおいて、48箇月以上再発を認めなかった長期無再発群4例のTに比して、有意なDNAメチル化減弱・亢進を示す、64BACクローンを抽出した。抽出した各BACクローンについて、特異度100%となるようにカットオフ値を設定し、早期再発群を長期無再発群から最もよく区別できる11BACクローンを同定した。11BACクローンのカットオフ値を組み合わせた診断基準を用いれば、学習コホートの早期再発群17例を、感度・特異度とも100%で、長期無再発群4例から区別することができた。

本予後予測指標の妥当性を検証するため、術後ゲムシタビンによるアジュバント化学療法を受けていない検証コホート全34例において、11BACクローンにおけるDNAメチル化状態を評価した。2BACクローン以上において本基準を満たした膵がん29症例の無再発生存率・全生存率は、2BACクローン未満において本基準を満たした膵がん5症例に比して有意に低値であった。さらに、学習コホート・検証コホートを合わせた膵がん全91症例において多変量解析を行ったところ、我々の指標は既に有意な予後因子であることが知られている切除断端（陰性 vs 陽性）・リンパ節転移（陰性 vs 陽性）とは独立した、予後予測因子であることが分かった。

D. E. 考察ならびに結論

侵襲性の高い膵生検を行っても、採取される組織は極めて少量で、膵管上皮が採取されず確定診断に到らない場合がある。

得られる細胞数が多い膀胱細胞診でも、膀胱中でのがん細胞の変性が顕著で、形態学的診断は困難を極める。膀胱中で細胞が壊れたあとも行いうるエピジェネティック診断は、膀胱がんの存在診断として適切と考えられる。本年度開発した膀胱がんの存在診断法を、微量検体に適用できるようパイロシーケンス技術等を導入して改良し、膀胱検体への適用を目指したい。さらに本指標が、膀胱がん細胞を血球系細胞を含む諸臓器の正常細胞とも区別できることが確認されれば、血清検体による膀胱がんの診断も行いうると期待される。

本年度同定した膀胱がんの予後予測指標は、膀胱切除術後の経過観察計画の策定に有用と期待されるのに加え、膀胱検体においても同様に予後予測を行えば、予後良好群に対する切除術の適応拡大等にも用いうると期待された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arai E, Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis*. 30: 214-221, 2009.
2. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 125: 2854-2862, 2009.
3. Sekine S, Ogawa R, Ito R, Hiraoka N, McManus MT, Kanai Y, Hebrok M. Disruption of Dicer1 induces dysregulated fetal gene expression and promotes hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 5: 2304-2315, 2009.
4. Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, Kanai Y, Hebrok M. Dicer is required for proper liver zonation. *J Pathol* 219: 365-372, 2009.
5. Sekine S, Nakanishi Y, Ogawa R, Kouda S, Kanai Y. Esophageal melanomas harbor frequent NRAS mutations unlike melanomas of other mucosal sites. *Virchows Arch*, 454: 513-517, 2009.
6. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 132: 202-210, 2009.
7. Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hirohashi S. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology*, 77: 53-62, 2009.
8. Negishi A, Masuda M, Ono M, Honda K, Shitashige M, Satow R, Sakuma T,

- Kuwabara H, Nakanishi Y, Kanai Y, Omura K, Hirohashi S, Yamada T. Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 100: 1605-1611, 2009.
9. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci* 101: 36-45, 2010.
10. Arai E, Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. *Epigenomics*, in press, 2010.
11. Kanai Y, Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. ed. Grisham JW, Thorgeirsson S, Springer, in press, 2010.
12. Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. *Cancer Sci* 101: 231-240, 2010.
13. Ojima H, Yoshikawa D, Ino Y, Shimizu H, Miyamoto M, Kokubu A, Hiraoka N, Morofuji N, Kondo T, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Hirohashi S, Kanai Y, Shibata T. Establishment of six new human biliary tract carcinoma cell lines and identification of MAGEH1 as a candidate biomarker for predicting the efficacy of gemcitabine treatment. *Cancer Sci*, 101: 882-888, 2010.
14. Okamura J, Sekine S, Nara S, Ojima H, Shimada K, Kanai Y, Hiraoka N. Intraductal carcinosarcoma with a heterologous mesenchymal component originating in intraductal papillary-mucinous carcinoma (IPMC) of the pancreas with both carcinoma and osteosarcoma cells arising from IPMC cells. *J Clin Pathol*, 63:266-269, 2010.

2、学会発表

1. Yae Kanai. Epigenetic analyses in HCC. Basic workshop: Current Frontier in Genomic and Epigenetic Research on Liver Cancer. International Liver Cancer Association Third Annual Conference, 2009, Milan.
2. Eri Arai, Saori Ushijima, Hiroyuki Fujimoto, Fimie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation alterations and copy number alterations during renal carcinogenesis. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2009, Denver.
3. 金井弥栄. ヒト多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常のゲノム網羅的解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会、2009.
4. 金井弥栄. 多段階発がん過程におけるDNAメチル化異常-ゲノム網羅的解析を中心に. 第14回東京肝臓シンポジウム「発癌とその制御」、2009.
5. 金井弥栄. DNAメチル化プロファイルを指標とする発がんリスク評価とがんの病態診断. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患の基盤としてのエピジェネティクス」、2009.
6. 金井弥栄. がんの臨床病理学的特性の基盤となるDNAメチル化異常. シン

- ポジウム：エピジェネティック異常の基礎から臨床応用まで。第68回日本癌学会学術総会、2009.
7. 新井恵吏、牛島抄織、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、広橋説雄、金井弥栄。種々の組織垂型の腎腫瘍におけるDNAメチル化プロファイル。第3回日本エピジェネティクス研究会年会、2009.
 8. 新井恵吏、牛島抄織、後藤政広、尾島英知、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄。肝細胞がんとその前がん状態である慢性肝炎・肝硬変症におけるゲノム網羅的DNAメチル化プロファイル。第68回日本癌学会学術総会、2009.
 9. 西山直隆、新井恵吏、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、塚本泰司、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、廣橋説雄、金井弥栄。尿路上皮がんならびに前がん段階にある尿路上皮におけるDNAメチル化プロファイル-発がんリスク評価と予後予測。第68回日本癌学会学術総会、2009.
 10. 千原良友、Gangning Liang、Jones Peter A、新井恵吏、藤元博行、菅野康吉、藤本清秀、平尾佳彦、金井弥栄。定量的DNAメチル化解析に基づく尿路上皮がん診断示標。第68回日本癌学会学術総会、2009.
 11. Yae Kanai. DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer research and the Japanese Cancer Association “Cancer Genomics, Epigenomics, and the Development of Novel Therapeutics”, 2010, Hawaii.
 12. Eri Arai, Saori Ushijima-Wakai, Hiroyuki Fujimoto, Fumie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Tadashi Kondo, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Setsuo Hirohashi, Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and nontumorous renal tissues. American Association for Cancer Research Special Conference on Cancer Epigenetics, 2010, Puerto Rico.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
- 金井弥栄、新井恵吏、長塩亮「Pyrosequencing技術を用いてDNAメチル化状態を定量評価し肝細胞がんの発生リスクを評価する方法」（2010年6月出願予定）
- 2、実用新案登録
なし
 - 3、その他
なし

厚生労働科学補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告

「難治がんの創薬バイオマーカー探索研究」

氏名	所属	職名
分担研究者 近藤格	国立がんセンター研究所	
プロテオーム・バイオインフォマティクス・プロジェクト		リーダー

研究要旨

創薬バイオマーカー探索のために、蛍光二次元電気泳動法を用いて肝細胞癌症例における腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質の同定を試みた。国立がんセンター中央病院で手術を受けた肝細胞癌の症例から得られた82検体（腫瘍組織42検体、非腫瘍組織40検体）より抽出したタンパク質を、蛍光二次元電気泳動法によって比較解析した。観察された1734スポットのうち、正常組織と腫瘍組織の間で発現差があるタンパク質スポット（ $p < 0.01$ 、2倍以上の群間平均値の差）として61スポットを特定した。特定されたタンパク質に対応するタンパク質を同定する目的で質量分析による構造解析を開始した。

A. 研究目的

肝細胞癌は本邦では悪性腫瘍死の第4位を占める。肝細胞癌の5年生存率は40%程度と不良である。肝細胞癌の早期発見のための血清腫瘍マーカーとして有効なものは未だなく、また肝細胞癌に対する抗癌剤治療、分子標的治療法の開発は行われているものの、十分な成果が得られていない。このような背景を踏まえて、肝細胞癌の治療成績の向上を目指した研究開発が行われている。

プロテオームはゲノムの機能的翻訳産物なので、バイオマーカーや治療標的を探索するうえで有用なリソースである。肝細胞癌症例において腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差を示す

タンパク質は診断のためのバイオマーカー候補であると同時に、創薬のための分子標的とみなすことができる。そのようなタンパク質を探索するためのプロテオーム解析は盛んに行われており、多数の論文が発表されている。しかしながら、臨床応用にはいたった例はなく、より一層の研究が必要されている。

本研究では国立がんセンターで開発された定量性の高いプロテオーム解析の技術と、同センターで手術を受けた肝細胞癌症例の十分な数の手術検体を用いた実験を行い、診断技術や創薬に有用なタンパク質の同定を行うことを目的とする。