

201010008A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成23（2011）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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 23 (2011) 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 6
山田哲司、本田一文、増田万里
2. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 11
金井弥栄
3. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 19
近藤格
4. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 23
中山敬一
4. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究 33
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 38

I V. 研究成果の刊行物・別刷 40

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

「難治がんの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	国立がん研究センター研究所	上席副所長

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・エクソナーレイなどのゲノム・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、エクソナー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、さらに逆相マイクロアレイ法で肝細胞がんの治療標的・バイオマーカー分子を探索した。肝細胞がんのソラフェニブ感受性との間の相関解析により、ソラフェニブの奏効性を予測するマーカー候補を見出した。さらに DNA メチルトランスフェラーゼ発現に基づく精巣胚細胞腫瘍の予後診断指標、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、要素技術の開発を行った。

研究分担者

金井弥栄 国立がん研究センター研究所副所長	国立がん研究センター研究所創薬臨床研究分野・ユニット長
--------------------------	-----------------------------

中山敬一 九州大学生体防御医学研究所・主幹教授	柴田龍弘 国立がん研究センター研究所がんゲノミクス研究分野長
----------------------------	-----------------------------------

近藤 格 国立がん研究センター研究所創薬プロテオーム研究分野	浅村尚生 国立がん研究センター中央病院呼吸器腫瘍科長
-----------------------------------	-------------------------------

本田一文	小菅智男
------	------

国立がん研究センター中央病院・副院長

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、逆相マイクロアレイ法などのゲノム・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。特に創薬標的として有望なキナーゼを同定するため、リン酸化タンパク質の定量、遺伝子変異解析を行った。

B. 研究方法

シーケンシング解析

肝癌細胞株 Alexander, HepG2, HepG2(C3A), HLE, HLF, HuH1, HuH6, HuH7, JHH1, JHH4, JHH5, JHH7, Kim1, SK-Hep1, SNU182, SNU378, SNU398, SNU423, SNU449, SNU475 の 20 株のゲノムDNAのうち、全キナーゼ関連遺伝子 513 遺伝子にフォーカスした

ディープシンクエンシング解析データおよびその変異候補情報を取得した。スキルス胃癌株のRNAのディープシーケンシング解析によりキナーゼ遺伝子融合遺伝子を探索した。

逆相マイクロアレイ法 (Reverse Phase Protein Array; RPPA)

ガラス基板上に細胞や組織のタンパク抽出液をアレイ化し、様々な抗体を用いて発現の検出を行う逆相マイクロアレイ法をリン酸化タンパク質の発現解析に応用し、ウエスタン法に必要とされる 1/10,000 以下の微量な試料でリン酸化タンパク質を網羅的かつ high-throughput に解析できる基盤を確立した。この基盤を用いて 23 種類の肝細胞がん細胞株について、185 個のリン酸化部位特異的抗体で、それぞれの細胞のリン酸化タンパク質のプロファイリングを行った。

リン酸化タンパク質の絶対定量

MASCOT によって同定されたペプチド情報から MRM-transitions に必要な情報の自動抽出、およびデータベース化、各種パラメーターの最適値の自動算出法の開発、HPLC における保持時間の相対位置情報化による高精度保持時間予測法の開発を試みた。

蛍光二次元電気泳動法

国立がん研究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および抗体ライブラリーによって比較解析した。

エピゲノム解析

国立がん研究センター中央病院において高位精巣摘除術を受けた、セミノーマ 88 症例を対象とし、独自に作製した抗ヒト DNMT3B ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色で DNMT3B の発現を検討した。

(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、国立がん研究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

シーケンシング解析

既知の B-raf(V600E) 活性化変異が SK-Hep1 細胞株にてコードされていることを初めて見出した。更に、HepG2、HepG2 (C3A) 株におけるキナーゼ A (G480R) 変異、SNU182 株における PHKG1 (A192D) 変異、JHH5 株におけるキナーゼ B (K69M) 変異が抽出された。

スキルス胃がん株 HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60 の RNA を用いたディープシーケンシング解析データからいくつかの融合

変異遺伝子候補を抽出した。

逆相マイクロアレイ法 (Reverse Phase Protein Array; RPPA)

肝細胞がんの 23 種の細胞株についてリン酸化プロファイリングとソラフェニブ感受性 (IC50) の相関解析を行ったところ、高い相関を示すリン酸化タンパク質 (p X) が同定された (スピアマン相関係数 0.5791, $p=0.0044$)。p X のリン酸化レベルが高くなるに連れてソラフェニブの IC50 が高くなることから、タンパク質 X のリン酸化はソラフェニブ抵抗性の指標となることが予測される。で、それぞれの細胞のリン酸化タンパク質のプロファイリングを行った。

リン酸化タンパク質の絶対定量

1) MRM-transition データベース構築
MASCOT dat ファイルから必要な情報をテキストファイルとして抽出し、データベースに登録することを自動で可能とする情報インフラを構築した。

2) MRM 測定パラメーター自動選定法

MRM 測定で設定可能なパラメーターのうち CE (コリジョンエネルギー) と CXP(Q3 の引きこみ電圧) の設定が最も感度に影響をあたえることを見出した。そこで多数の合成ペプチドを用いてこれら 2 つのパラメータを詳細に検討し、Q1 および Q3 の情報を用いてこれらのパラメーターの最適値を予測するアルゴリズムを開発し

た。

3) HPLC 保持時間予測

MRM 測定を行う試料にもマーカーをスパイクし、マーカーの保持時間を計測し、試料中でのマーカーの保持時間プロフィールを取得すれば、これを用いて目的ペプチドの保持時間を予測することが可能である。本方法を用いて極端にグラジエントを変えた条件下でも正確な保持時間の予測が可能であることを確認した。

蛍光二次元電気泳動法

ある特定のパスウェイおよび分子ファミリーに比較的集中的に発現差が認められ、パスウェイの主要なタンパク質 240 種類についてウェスタンブロッティングを実施し、正常および腫瘍組織の間で発現差のあるタンパク質および早期に再発する症例で特徴的なタンパク質を同定した。

エピゲノム解析

DNMT3B 巢状発現陽性例は陰性例に比して術後再発が有意に高頻度であった ($P=0.037$)。Log-rank 検定で、DNMT3B 巢状発現陽性例は陰性例に比して、有意に無再発生存率が低かった ($P=0.0464$)。

D. 考察

肝癌細胞株で見出したキナーゼ遺伝子変異は当該発現細胞株での発現抑制、また野生型発現細胞株での発現抑制による細胞増殖阻害の強度の比較

を行った結果、両変異とも強力な腫瘍細胞増殖のドライバー変異として機能してはいることが分かったが、その機能は不明である。今後活性化変異がどのような機能に影響を及ぼすか検討する必要がある。

E. 結論

多数の既知キナーゼ遺伝子活性化変異とその構造的な位置情報を鋳型にして、キナーゼ遺伝子の変異配列から活性化変異候補を抽出して、その腫瘍増殖ドライバー変異の可能性を検討する予備的な解析土台は確立できた。今後は、活性化変異候補を抽出するプログラムの改良と実験的検証の範囲を広げて対応したい。また、スキルス胃がん株 14 株のディープシーケンシング解析から全キナーゼ遺伝子の変異解析を行い、肝癌同様に腫瘍増殖ドライバー変異の同定に挑みたい。

今年度の研究で、我々は肝細胞がんにおけるソラフェニブの奏効性を予測するマーカー候補 (p X) を見出した。ソラフェニブ抵抗性細胞ではタンパク質 X のリン酸化レベルが高いことから、p X は治療効果の期待できない患者を予測するマーカーとなることが期待される。今後症例を積み重ねその臨床応用可能性を検討する必要がある。

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

分担研究報告書に記載

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
研究代表者	山田哲司	国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野	長
研究分担者	本田一文	国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野	ユニット長
研究協力者	増田万里	国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野	研究員

研究要旨

2007年の米国臨床腫瘍学会（ASCO）において、それまで、有効な全身療法がなかった切除不能な末期の肝がん患者にたいし、多キナーゼ阻害薬ソラフェニブ（ネクサバル）の国際第3相臨床試験の結果が発表され、投与群では全生存期間中央値で約3カ月延長効果が示された。この結果をもとに我が国においても2009年5月にソラフェニブの肝細胞がんへの適応が認可された。ソラフェニブの作用標的は現在、Raf キナーゼ、VEGFR、PDGFR、KIT、FLT-3、RETとされているが、作用機序の詳細はいまだ不明であり、その治療効果をあらかじめ予測できるマーカーが存在せず、現状では適切な患者の選択に至っていない。

本研究では、我々が基盤を開発した逆相マイクロアレイ法を用い、HCC 細胞株のリン酸化タンパク質のプロファイリングを行った。更に、得られた結果と細胞株のソラフェニブ感受性との間の相関解析により、ソラフェニブの奏効性を予測するマーカー候補を見出した。加えて、本研究事業で我々が昨年報告した肝細胞がん症例の遺伝子発現解析結果をもとに、背景肝組織に比較し肝がん組織にて有意に発現上昇が認められた79遺伝子についてRNA干渉ライブラリーを作製し、肝がん細胞株23株について増殖抑制効果のスクリーニングを行った。

前者の研究結果より、ソラフェニブ単剤療法の奏効性を予測するマーカーや、ソラフェニブ抵抗性のがんについて併用療法に適する薬剤を提示できる可能性があり、HCCにおける分子標的治療薬を用いた個別化治療の実現へ向けた一歩となることが期待される。一方、後者の研究結果からは、新たな肝細胞がんの治療標的分子の提示が可能となることが期待される。

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の詳細は明らかではない。肝細胞がんに対して肝切除、経

皮的エタノール注入療法（PEIT：percutaneous ethanol injection therapy）、経皮的ラジオ波焼灼療法（RFA：radiofrequency ablation）、経カテーテル動脈塞栓術（TACE：transcatheter arterial

chemo-embolization)などの局所療法が有効であるが、進行肝細胞がんに対して、これまで明らかな延命効果を示す抗癌剤がなく、標準的な全身化学療法は確立していなかった。多キナーゼ阻害薬であるソラフェニブ（ネクサバル）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国際第3相臨床試験で報告され、2007年10月に欧州医薬品審査庁（EMA）、同年11月に米食品医薬品局（FDA）、2009年5月には日本でも切除不能の肝細胞がんに対する適応が承認された。ソラフェニブの作用標的は現在、Raf キナーゼ、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-B、KIT、FLT-3、RETとされているが、作用機序の詳細はいまだ不明な点が多く、その治療効果をあらかじめ予測できるマーカーが存在せず、現在、適切な患者の選択には至っていない。また、ネクサバルの治療にかかる医療費は、1ヵ月でおよそ65万円（3割負担で19.5万円）と非常に高額であり、高額の医療費負担や無用な副作用を避ける必要性からも早急な効果予測マーカーの同定が求められている。

B. 研究方法

1) 逆相マイクロアレイ法 (Reverse Phase Protein Array; RPPA) : リン酸化は細胞内のシグナル伝達タンパク質の多くの機能を制御しており、がん細胞においてタンパク質のリン酸化の状態を把握することは、がん化に関わる分子経路の同定及び、新たな治療

標的の同定に繋がることが期待される。我々は、ガラス基板上に細胞や組織のタンパク抽出液をアレイ化し、様々な抗体を用いて発現の検出を行う逆相マイクロアレイ法をリン酸化タンパク質の発現解析に応用し、ウエスタン法に必要とされる1/10,000以下の微量な試料でリン酸化タンパク質を網羅的かつhigh-throughputに解析できる基盤を確立した。この基盤を用いて23種類の肝細胞がん細胞株について、185個のリン酸化部位特異的抗体で、それぞれの細胞のリン酸化タンパク質のプロファイリングを行った。

2) ソラフェニブの薬剤感受性 (IC50) との相関解析: リン酸化プロファイリングが得られた肝細胞がんの23細胞株についてソラフェニブの薬剤感受性 (IC50) を測定し、リン酸化プロファイリングとの相関解析を行い、ソラフェニブ感受性予測マーカーの探索を試みた。

3) small interfering RNA (siRNA) ライブラリーを用いた増殖抑制効果のスクリーニング: 我々は、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) を用いて、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84症例の手術検体がん組織と背景肝組織について遺伝子発現解析を行い、昨年報告した。その結果をもとに、肝がん組織にて有意に発現上昇が認められた79遺伝子についてそれぞれ3種類のsiRNAを合成しRNA干渉ライブラリーを作製して、肝細胞がん細胞株23種について増殖抑制効果を

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)を用いて測定し、スクリーニングを行った。

(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。

C. 結果

1) 肝細胞がんの 23 種の細胞株についてリン酸化プロファイリングとソラフェニブ感受性 (IC₅₀) の相関解析を行ったところ、高い相関を示すリン酸化タンパク質 (p X) が同定された (スピアマン相関係数 0.5791, $p=0.0044$)。p X のリン酸化レベルが高くなるに連れてソラフェニブの IC₅₀ が高くなることから、タンパク質 X のリン酸化はソラフェニブ抵抗性の指標となることが予測される。興味深いことに、同定されたタンパク質 X の異なる部位のリン酸化が、p X に次いで、ソラフェニブ感受性と高い相関 (スピアマン相関係数 0.5524, $p=0.0070$) を示した。この結果は、タンパク質 X のリン酸化とソラフェニブ感受性の相関性について信憑性を加えるものと考えている。リン酸化プロファイリングの際 RPPA 法に用いた p X 抗体は、肝細胞がんの切除標本の組織切片の免疫組織染色にも使用が可能であることを確認している。この

抗体を用いて、共同研究施設である Taipei Medical University にて、ソラフェニブの治療を受けた肝がん症例の治療前生検試料について免疫組織化学染色を行ったところ、治療効果が見られなかった症例でタンパク質 X のリン酸化のレベルが高いという予備結果が得られており、現在、国立がんセンター中央病院の症例にて免疫組織化学染色による同様の試験を検討中である。

2) siRNA library を用いたスクリーニングにより、1 種類以上の siRNA で統計学的に有意 ($P < 0.05$, t test) な増殖抑制効果が 23 細胞株のうち 15 細胞株以上で認められた遺伝子が 17 遺伝子同定された。

D. 考察

本研究で、我々は肝細胞がんにおけるソラフェニブの奏効性を予測するマーカー候補 (p X) を見出した。ソラフェニブ抵抗性細胞ではタンパク質 X のリン酸化レベルが高いことから、p X は治療効果の期待できない患者を予測するマーカーとなることが期待される。今後、ソラフェニブ抵抗性の細胞株において、p X が含まれるシグナル経路の上流に位置する分子群の活性化の詳細を調べることで、ソラフェニブの効果が期待できない患者に対して他の分子標的治療薬での治療や併用療法を提示できる可能性があると考えている。

一方、siRNA library スクリーニングによって、多くの肝細胞がん細胞株で強い増殖抑制効果を示す遺伝子が見つかった。今後は、これらのうち、創薬ターゲ

ットとなりうる膜たんぱく質及び酵素に重点を絞り、組織切片の免疫組織化学染色により、肝細胞がんでの特異的発現の検証を行う予定である。最終的には、トランスポゾンを用いた遺伝子導入によるマウスの肝がん発がんモデルにおいて機能解析を行うことを現在検討している。

E. 結論

培養細胞を用いたリン酸化タンパクプロファイリングとソラフェニブ感受性との相関解析によって、ソラフェニブ奏効性を予測するマーカー候補を見出した。肝細胞がんにおいて、分子標的治療薬の患者の選択が可能となり、個別化治療の実現へ向けた一歩となることが期待される。一方、siRNA library を用いたスクリーニングにより得られた増殖抑制効果のある遺伝子は、新たな治療標的となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 9:695-704, 2010.

2. 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. 16:2518-28, 2010.

3. Shitashige M, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.

Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth.

Cancer Res. 70:5024-33, 2010.

4. Satow R, Shitashige M, Jigami T, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.

Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for canonical Wnt signaling in Xenopus axis formation.

J Biol Chem. 285:26289-94, 2010.

5. Murakoshi Y, Honda K, Sasazuki S, Ono M, Negishi A, Matsubara J, Sakuma T, Kuwabara H, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Shimahara M, Yasunami Y, Ino Y, Tsuchida A, Aoki T, Tsugane S, Yamada T.

Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray

Cancer Sci. 102:630-8, 2011

6. Matsubara J, Honda K, Ono M, Tanaka M, Kobayashi M, Jung G, Yanagisawa K, Sakuma T, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T,

- Okusaka T, Kosuge T, Tsuchida A, Shimahara M, Yasunami Y, Chiba T, Hirohashi S, Yamada T.**
 Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20:160-71, 2011.
- 4: Masuda M, Honda K, Shitashige M, Ono M, Yamada T.**
 High-density microarray-based phospho-protein profiling of cancer cell lines. *69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.* Osaka, Sep. 22-24, 2010.
- 2. 学会発表**
- 1: Masuda M, Honda K, Yamada T.**
 Phosphoproteomic Profiling of Hepatocellular Carcinoma by Reverse-Phase Protein Array (RPPA) and Identification of Potential Predictors for Response to Sorafenib. *The 3rd JCR-AACR Special Joint Conference; The latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics.* Chiba, March 1-3, 2011.
- 5: Yamada T, Satow R, Masuda M, Honda K.**
 Functional genome and proteome survey of therapeutic targets. *69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.* Osaka, Sep 22-24, 2010.
- 2: Masuda M, Honda K, Yamada T.**
 Phosphoprotein Profiling of 95 Cancer Cell Lines by High-Density Reverse-Phase Protein Array (RPPA). *International Conference on Cancer Marker Discovery.* Taipei, Oct. 2, 2010.
- 6: 増田万里、本田一文、尾野雅哉、下重美紀、山田 哲司**
 高密度逆相タンパクアレイを用いた 96 がん細胞株におけるリン酸化タンパク質の網羅的解析
 日本プロテオーム学会 2010 年会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会・合同大会
 千葉、2010 年 7 月 26-27 日
- 3: Masuda M, Honda K, Yamada T.**
 Phosphoprotein Profiling of 95 Cancer Cell Lines by High-Density Reverse-Phase Protein Array (RPPA). *The 8th Annual Symposium of Bioinformatics and Systems Biology in Taiwan.* Taipei, Sep. 30 – Oct. 2, 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
 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	国立がん研究センター研究所分子病理分野	分野長

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。国立がん研究センター分子病理分野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している。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している。加えて、独自のエピゲノム解析に基づく稀少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メチルトランスフェラーゼ発現に基づく精巣胚細胞腫瘍の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稀少がんの病態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門に提出されたとき、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. 稀少がんの病態診断マーカー開発：分担研究者は年来諸臓器がんのエピゲノム解析に従事しており、DNAメチル化プロファイルが、がんの臨床病理学的因子とよく相関することを報告してきた。そこで本年度は、DNAメチル化プロファイル形成に寄与するDNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)に着目した。国立がん研究センター中央病院においては、稀少がんについても病態診断薬開発に足る多様な病態の症例が集積している。本年度は、ヒト精巣胚細胞腫瘍、特にセミノーマに着目した。

国立がん研究センター中央病院において高位精巣摘除術を受けた、セミノーマ88症例を対象とする。対象症例の平均年齢は38.8 ± 9.2歳(21-66歳)である。腫瘍の組織学的診断は、WHO分類に従って行った。初診時の病期は、胸部X線ならびにCT検査に基づいて診断された。本コホートには、術前治療例を含まない。本コホートのStage Iセミノーマ症例は、胸部X線・CT検査・血清腫瘍マーカー(αFP・βHCG)測定により経過観察され、再発が診断されるまで術後後療法を受けていない。

C末端ペプチドN-ENKTRRRRTADDSATS-Cを抗原として、抗ヒトDNMT3Bポリクローナル抗体を作製した。同抗体の抗原特異

性を、ヒト精巣奇形腫細胞株NCC-ITを用いたウエスタンブロット法で確認している。高位精巣摘除術検体のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を、同抗体(1000倍希釈)を用いた免疫組織化学的検討に供した。オートクレーブ処理(120°C・10分)による抗原賦活の後、ABC法を施行した。陰性対照として1次抗体を除去し、陽性対照としてDNMT3B mRNA発現が高値であることが報告されている非セミノーマ胚細胞腫瘍である胎児性がん3症例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いた。免疫組織化学的検討の結果と、症例の臨床病理学的因子の相関を検討した。

(倫理面への配慮)

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、国立がん研究センター倫理審査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

陽性対照とした精巣胎児性がんで、びまん性に核における強いDNMT3B染色性がみられることを確認した。胎児性がんと異なり、セミノーマ症例の多くにおいてDNMT3B染色性が全くみられなかったが、一部の症例では散在するごく少数の腫瘍細胞に胎児性がんと同様の強い染色性が確認された。そこで、胎児性がんと同等の強い染色性を呈する腫瘍細胞が50高倍率視野あたり1個以上観察されるセミノーマ症例を、DNMT3B巣状発現陽性症例と定義することとした。この基準に基づくと、セミノーマ88症例中35症例(39.8%)が、DNMT3B巣状発現陽性であった。尚、腫瘍の全域においてびまん性にDNMT3B発現を示すセミノーマ症例は存在しなかった。また、同一のセミノーマ症例内で、散在するDNMT3B陽性細胞と陰性細胞の細胞像に、顕微鏡的な差は観察されなかった。DNMT3B巣状発現陽性セミノーマ症例と陰性セミノーマ症例との間で、組織学的な差は観察されなかった。

Stage IIIにおいてはDNMT3Bが巣状に陽性となる例(100%)が、stage I(35.7%)・II(38.5%)に比して有意に高頻度であった($P=0.011$)。DNMT3B巣状発現は、腫瘍の悪性度を反映する可能性があると考えられた。そこで、DNMT3B巣状発現とStage Iセミノーマの臨床病理学的因子との相関を検討した。DNMT3B巣状発現と、腫瘍径・精巣網浸潤・精巣上体浸潤・白膜浸潤・リンパ管ならびに静脈浸襲・精索浸潤との相関は見られなかった。Stage Iセミノーマ70症例のうち9例は、高位

精巣摘除術後の経過観察期間(15-5509日、平均1794日)に、転移再発(8例においては後腹膜リンパ節転移・1例においては骨転移)を来した。DNMT3B巣状発現陽性例25症例中6症例(24%)に転移再発を認めたと、陰性例45症例で転移再発を来したのは3症例(6.7%)であった。DNMT3B巣状発現陽性例は陰性例に比して術後再発が有意に高頻度であった($P=0.037$)。Log-rank検定で、DNMT3B巣状発現陽性例は陰性例に比して、有意に無再発生存率が低かった($P=0.0464$)。

D. 考察

稀少がんである精巣胚細胞腫瘍の中で、最も頻度の高い組織亜型であるセミノーマ症例の多くは、高位精巣摘除術により完治するが、一部は術後長期間を経てリンパ節転移を来す。Stage Iセミノーマの術後管理には議論があり、放射線療法ならびに化学療法による後療法は再発率を低下させるが、再発をみない若年成人患者には過剰な負担となる。転移再発が早期に診断できれば、化学療法が奏功することが期待されるので、慎重な経過観察が過剰な後療法をさけるために適切な方針と考えられている。そこで、セミノーマ症例の適切な術後経過観察を行うために、再発予測指標の確立が強く望まれている。

DNMT3Bは正常発生胚においてエピジェネティクス再構成に寄与する。精巣胚細胞腫瘍は、胚発生の諸段階を模倣した多様な組織像を呈する悪性腫瘍である。そこで本研究では、DNMT3Bの精巣セミノーマにおける発現に着目した。

DNMT3B巣状発現陽性セミノーマ症例は

陰性例に比し、診断時の病期が高く、予後不良であることがわかった。一般にセミノーマは非セミノーマ胚細胞腫瘍に比して予後良好と認識されていたが、我々の検討では、stage I の DNMT3B 巢状発現陽性セミノーマ症例の無再発生存率は、stage I の非セミノーマ胚細胞腫瘍のそれと同等程度に低値であった。DNMT3B 巢状発現は、stage I セミノーマ症例の予後予測指標となる可能性がある。

Srigley らは、セミノーマが胚発生を模して、胎児性がんやその他の非セミノーマ胚細胞腫瘍に分化する可能性を提唱している。実際、精巣セミノーマ症例の再発後、転移巣が胎児性がんやその他の非セミノーマ胚細胞腫瘍の組織像を呈すことをしばしば経験する。De novo DNA メチル化酵素である DNMT3B は、ES 細胞や、マウス胚の発生初期の inner cell mass・embryonic ectoderm cells 等多分化能を有する細胞に発現がみられる。胎児性がんも、DNMT3B を高発現している。DNMT3B は、その de novo DNA メチル化活性を介して、発生過程と胚細胞腫瘍の双方で、細胞の多分化能に寄与する可能性が考慮される。DNMT3b 巢状発現は、セミノーマ細胞の一部が、胎児性がんやその他の非セミノーマ胚細胞腫に分化する能力を反映している可能性があると考えられた。

E. 結論

DNMT3B 巢状発現は stage I セミノーマの術後再発と相関することから、有用な再発予測指標となると考えられた。すなわち、DNMT3B 巢状発現陽性の stage I セミノーマ症例は、頻回の CT 検査等で長期

間経過観察を受けるのが適切である可能性がある。この巢状発現は mRNA 発現解析等では検出し得ず、免疫組織化学的にのみ検出可能である。免疫組織化学は、手術検体の通常の病理診断に用いるホルマリン固定・パラフィン包埋標本で施行可能であるので、臨床的に実用化しやすいとの利点がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1、論文発表

1. Nagashio R, Arai E, Ojima H, Kosuge T, Kondo Y, Kanai Y. Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. *Int J Cancer*, in press, 2011.
2. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis*, 32: 462-469, 2011.
3. Arai E, Kanai Y. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*, 4:58-73, 2011.
4. Arai E, Wakai-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 renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology*, 78:1–9, 2011.
5. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol*, 2011:780836, 2011.
 6. Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers. *Cancer Sci*, 101: 36-45, 2010.
 7. Kanai Y, Arai E. DNA methylation status in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. ed. Grisham, JW and Thorgeirsson, S. Springer, New York, pp147-159, 2010.
 8. Arai E, Kanai Y. DNA methylation profiles in precancerous tissue and cancers: Carcinogenetic risk estimation and prognostication based on DNA methylation status. *Epigenomics*, 2: 467–481, 2010.
 9. 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.
 10. Hiraoka N, Ino Y, Sekine S, Tsuda H, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Yoshida M, Yamada K, Koyama T, Kanai Y. Tumour necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. *Br J Cancer*, 103: 1057-1065, 2010.
 11. Matsumoto T, Ojima H, Akishima-Fukasawa Y, Hiraoka N, Onaya H, Shimada K, Mizuguchi Y, Sakurai S, Ishii T, Kosuge T, Kanai Y. Solitary hepatic lymphangioma: report of a case. *Surg Today*, 40: 883-889, 2010.
 12. Yamamoto Y, Ojima H, Shimada K, Onaya H, Hiraoka N, Mizuguchi Y, Kosuge T, Kanai Y. Long-term recurrence-free survival in a patient with primary hepatic carcinosarcoma: case report with a literature review. *Jpn J Clin Oncol*, 40: 166-173, 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. Akishima-Fukasawa Y, Ino Y, Nakanishi Y, Miura A, Moriya Y, Kondo T, Kanai Y, Hirohashi S. Significance of

- PGP9.5 expression in cancer-associated fibroblasts for prognosis of colorectal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 134: 71-79, 2010.
15. Ban D, Shimada K, Sekine S, Sakamoto Y, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. Pancreatic ducts as an important route of tumor extension for acinar cell carcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol*, 34: 1025-1036, 2010.
 16. 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.
 17. Hori S, Nara S, Shimada K, Ojima H, Kanai Y, Hiraoka N. Serous cystic neoplasm in an intrapancreatic accessory spleen. *Pathol Int*. 60: 681-684, 2010.
 18. 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*, 16: 2518-2528, 2010.
 19. Miyazawa Y, Uekita T, Hiraoka N, Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, Sakai R. CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res*, 70: 5136-5146, 2010.
 20. Kohno T, Kakinuma R, Iwasaki M, Yamaji T, Kunitoh H, Suzuki K, Shimada Y, Shiraishi K, Kasuga Y, Hamada GS, Furuta K, Tsuta K, Sakamoto H, Kuchiba A, Yamamoto S, Kanai Y, Tsugane S, Yokota J. Association of CYP19A1 polymorphisms with risks for atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma in the lungs. *Carcinogenesis*, 31: 1794-1799, 2010.
 21. Miyake M, Sugano K, Sugino H, Imai K, Matsumoto E, Maeda K, Fukuzono S, Ichikawa H, Kawashima K, Hirabayashi K, Kodama T, Fujimoto H, Kakizoe T, Kanai Y, Fujimoto K, Hirao Y. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci*, 101: 250-258, 2010.
 22. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kanai Y, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Mice-lacking LMP2, immuno-proteasome subunit, as an animal model of spontaneous uterine leiomyosarcoma. *Protein Cell*, 1: 711-717, 2010
- 2、 学会発表
1. Yae Kanai. DNA methylation alterations during multistage hepatocarcinogenesis. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference "The latest advances in liver cancer research: from basic science to therapeutics", 2011, Chiba.

2. Ryo Nagashio, Eri Arai, Hidenori Ojima, Tomoo Kosuge, Yutaka Kondo, Yae Kanai. Carcinogenetic risk estimation based on DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference “The latest advances in liver cancer research: from basic science to therapeutics”, 2011, Chiba.
3. 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.
4. Yae Kanai. DNA methylation alterations and clinicopathological diversity of human cancers. 41st International symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Found, 2010, Tokyo.
5. Yae Kanai. Genome-wide DNA methylation analysis using human tissue specimens. Symposium 9 “Cancer and epigenetics disorders” 69th Annual meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka.
6. Yae Kanai. Carcinogenetic risk estimation and prognostication of patients with cancers based on DNA methylation profiles. 2010 Annual Meeting of the Korean Association for Laboratory Animal Sciences (KALAS), 2010, Busan.
7. 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.
8. Eri Arai, Tohru Nakagawa, Saori Wakai-Ushijima, Hiroyuki Fujimoto, Yae Kanai. Focal DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage 1 testicular seminoma. Epigenetics and Stem Cells Conference, 2010 Copenhagen.
9. 金井弥栄. がんの臨床病理像の基盤となる DNA メチル化異常の網羅的解析とその臨床応用. シンポジウム7 「がん: 病理学の逆襲」 第99回日本病理学会総会、2010.
10. 金井弥栄. がんのリスク診断・病態診断マーカーとしての DNA メチル化異常. 第28回サイトプロテクション研究会、2010.
11. 金井弥栄. 筋層非浸潤性膀胱がんの悪性進展に関わるエピジェネティック異常. パネルディスカッション21 「(高リスク)筋層非浸潤性膀胱がんの治療戦略」 第48回日本癌治療学会学術集会、2010.
12. 新井恵吏、中川徹、若井-牛島抄織、藤元博行、金井弥栄. 精巣 Stage I セミノーマにおける DNMT3B 巢状発現は腫瘍再発予測指標となる. 第4回