

201107005A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成24（2012）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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成 24 (2012) 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・・・・・・・・・・ 7
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・・・・・・・・・・ 12
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・・・・・・・・・・ 24
中山敬一
4. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究・・・・・・・・・・ 33
黒光貞夫、鞍馬岳吏

I I I. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 39

I V. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・ 41

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・エクソンアレイなどの統合的なゲノム・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。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、さらに逆相マイクロアレイ法などの統合された所謂オミックス解析を臨床検体を用いて行い、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、実際の臨床例で有用性を検証した。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、門脈侵襲陽性症例の原発腫瘍組織に特徴的なタンパク質を同定した。また、抗体ライブラリーを用いた実験において、核酸配列からは推定されない分子量で存在するタンパク質が肝細胞癌の腫瘍組織で多く認められることを見出した。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創薬プロテオーム研究分野
国立がん研究センター研究所副所長	
中山 敬一	本田 一文
九州大学生体防御医学研究所・主幹教授	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
近藤 格	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

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

小菅智男

国立がん研究センター中央病院・副院長

黒光貞夫

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

鞍馬岳吏

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・主管研究員

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

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

スキルス胃がん細胞株 14 株の全キナーゼ遺伝子のゲノム DNA ディープシーケンシング解析から変異配列候補を抽出した。改変したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムにより既知の PIK3CA (E542K) 及び PIK3CA (E545K) 活性化変異が HGC27 及び HSC-59 細胞株にてコードされていることを検出した。更に、Okajima 株におけるキナーゼ C (R31G 及び L166R) 変異、AZ521 株におけるキナーゼ D (H176Q) 変異、HSC-59、AZ521 株におけるキナーゼ E (P469L) 変異、AZ521 株におけるキナーゼ F (T98M) 変異、HSC-58 株におけるキナーゼ G (E561G) 変異を抽出した。

スキルス胃がん細胞株で見出したキナーゼ D (H176Q) 変異、キナーゼ E

(P469L) 変異、キナーゼ F (T98M) 変異、キナーゼ G (E561G) 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、いずれの変異ともに強力な腫瘍増殖ドライバー変異として機能していないと結論した。

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) の相関解析を行い、高い相関を示すリン酸化タンパク質を同定した (スピアマン相関係数 0.5791, $p=0.0044$)。結果について、ウエスタン法により確認を行ったところ、ソラフェニブ感受性の高い細胞で、本マーカー候補分子の高いリン酸化レベルが検出された。更に、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 7 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結果、治療効果が見られなかった 6 症例で本マーカー候補分子の強いリン酸化が認められた。一方、画像診断によりがんの縮小が認められた症例では本マーカー候補のリン酸化は検出されなかった。

リン酸化タンパク質の絶対定量

1) MRM-transition database ver.2 の構築

これまで当研究室で独自に取得し

た約 30000 種類の iTRAQ 標識リン酸化ペプチド情報を格納するデータベースを構築している。本年度はこれをヒトプロテオームワイドな MRM 情報(こちらも独自取得)と統合した、MRM transition db ver.2 の構築を行った。本バージョンでは昨年度開発した高感度 MRM を実行するために必要な各種パラメーター計算アルゴリズムや保持時間予測システムなどが実装されており、より高機能なデータベースとして進化している。リン酸化ペプチド同定の際に保持時間マーカーを混合しておけば、リン酸化ペプチドの保持時間をマーカーとの相対位置情報としてデータベースに格納できる。これによって、サンプルの測定前に、一度保持時間マーカーの溶出プロファイルを取得すれば、これを元に予測された保持時間や最適パラメーターを付与された MRM トランジションファイルが出力される仕様となっている。

2) MRM 測定パラメーター自動選定法

上記のように MRM を高感度かつ大規模に行うためのプラットフォームは完成させることができたが、定量値を得るためには実際の測定で得られる大量の MRM クロマトグラムを解析擦る必要がある。現在、質量分析メーカー等で提供される定量ソフトにおける自動ピーク判定が不完全であるため、手作業による確認が必要となり、これには多大な労力を要する。さらに、

大規模な MRM 解析では独自フォーマットのトランジション ID を付加しているため、各ペプチドのアノテーション(タンパク質や遺伝子情報との紐付け)が必要となる。このような問題点を解決するために、独自のアルゴリズムを実装した定量ソフトの開発や得られた定量結果を効率良く処理・管理できるデータベースの構築を行った。定量ソフトに関しては現在最適化を実行中であるが、定量結果格納データベースは既に完成しており、市販のソフトウェア(MultiQuant)で得られる定量結果を自動読み込みし、遺伝子あるいはタンパク質情報を元にグループ化して表示できる。また、内部標準量を入力することで絶対量への換算も自動で行うことが可能である。

蛍光二次元電気泳動法

門脈侵襲陽性の症例の原発腫瘍組織で高い発現を示すが、門脈侵襲陰性の症例の原発腫瘍組織では背景肝組織と変わらない発現を示すタンパク質を選択した。選択したタンパク質は複数の悪性腫瘍において悪性度との関わりが報告されていたが、肝細胞癌においては報告がなかった。抑制実験を施行したところ、腫瘍細胞の増殖には影響がなく、浸潤を促進する役割を担っていることが分かった。抗体を用いた発現解析の結果を質量分析で検証するために、正常組織、非腫瘍組織、腫瘍組織(門脈侵襲陽性症例、陰性症例)を GeLC-MS/MS で調べた。抗体実験で同定されたバイオマーカー候補

の一部は質量分析による実験でも再現された。転写因子のあるものが、配列からの予測より小さい分子量で、特に悪性度の高い症例の原発腫瘍組織で存在することが分かった。また、質量分析を用いた解析から、予測されない分子量で発現するタンパク質が腫瘍組織で多数存在することが新たに分かった。そのようなタンパク質のデータを解析するための手法の開発に着手した。

エピゲノム解析

腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織は、非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して、組織学的に特記すべき所見を示さない。従って、淡明細胞がん・乳頭状腎細胞がん・嫌色素細胞がん・オンコサイトーマ症例より得られた非腫瘍部腎組織の間に、相互に組織学的な所見の差違を認めない。ところが、嫌色素細胞がん・オンコサイトーマ症例より得られた非腫瘍部腎組織において、非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して、DNAメチル化亢進あるいは減弱を示すBACクローン数は、淡明細胞がん症例より得られた非腫瘍部腎組織のそれに比して有意に少数であった。全症例の非腫瘍部腎組織においてDNAメチル化亢進あるいは減弱を示すBACクローン数は、250BACクローンに谷を持つ2峰性分布をとることが分かった。非腫瘍部腎組織において250BACクローン以上にDNAメチル化の亢進あるいは減弱を認める症例は、非腫瘍部腎組織において

250BACクローン未満にDNAメチル化の亢進あるいは減弱を認める症例に比して、無再発生存率が有意に低値であった(ログランク法, $P=0.0204$)。

全プローブの蛍光強度比を用いた腎腫瘍組織のクラスター解析(教師なし法)で、1型乳頭状腎細胞がんと2型乳頭状腎細胞がんは、互いに異なるサブクラスターに属していた。嫌色素細胞がんとオンコサイトーマは、この2つの組織型の腫瘍のみから成る単一クラスターに属していたが、ウイルコクソン検定($P < 0.01$)で、21BACクローンにおける蛍光強度比が嫌色素細胞がんとオンコサイトーマの間で有意に異なることが分かった。全21BACクローンにおいて、適切な蛍光強度比の診断閾値を設定することにより、検討の対象とした嫌色素細胞がんを、感度・特異度とも100%でオンコサイトーマから区別することができた。

D. 考察

改変したキナーゼ活性化変異予測アルゴリズムを用い活性化変異キナーゼを抽出可能であることは示された。しかしながら、現アルゴリズムによる予測においてはfalse-positiveも数多く抽出され、ディープシーケンシングにより検出される変異から効率よく活性化変異を予測、抽出する為に、更なるアルゴリズムの改良が必要と考えられた。

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を見出した。ソラフェニ

ブ抵抗性細胞株では本マーカー候補分子のリン酸化レベルが高く、またソラフェニブ治療を受けた肝細胞がんの患者由来の生検試料においても、治療効果の見られなかった症例で強いリン酸化が認められた。従って、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。また、ソラフェニブ抵抗性の細胞株において mTOR 経路の恒常的活性化が認められること、加えて、mTOR 阻害剤により、本マーカー分子のリン酸化が抑制されることから、ソラフェニブの効果が期待できない患者さんに対し、mTOR 阻害剤による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。

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位相情報を鋳型にして、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、新たな質量分析計の開発などに期待するとともに、試料の前処理や LC への導入法などに関してさらなる技術開発が必要であると思われる。

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

2000年以降、癌治療における分子標的治療薬の開発が進み、現在はより安全で有効な薬剤の投与を可能とするために、有効性の高い患者をあらかじめ予測し絞り込むことのできるコンパニオン診断薬の開発が薬剤開発と共に開発される流れが加速している。2011年に欧州医薬品審査庁(EMA)および米食品医薬品局(FDA)は診断薬の開発を促すガイダンスを発表しており、今後は薬剤と同時に実用化されるコンパニオン診断薬が増加することが予測される。

我々は、逆相タンパクマイクロアレイ法を用い95種類の癌細胞株のリン酸化プロファイリングを取得する基盤の確立に成功しており、本研究期間において、リン酸化プロファイリングの結果を用い、肝がんにおけるソラフェニブの奏効性予測マーカーの同定し、本基盤を様々な治療薬のコンパニオン診断薬開発に応用すべく更なる改良を進めた。

切除不能な進行肝細胞がんへの適応が認可されている唯一の多キナーゼ阻害剤ソラフェニブの作用標的及び作用機序の詳細はいまだ不明な点が多く、奏効性予測マーカーも存在せず、現状では適切な患者の選択に至っていない。我々は23種のHCC細胞株のリン酸化タンパク質のプロファイルとそれら細胞株のソラフェニブ感受性との間で相関解析を行い、ソラフェニブの奏効予測マーカー候補を見出した。更に、ソラフェニブ抵抗性の細胞株ではmTORシグナルが恒常的に活性化されていることを本研究期間に見出した。この結果はソラフェニブ抵抗性のがんに適する他の薬剤や多剤併用療法が提示できる可能性を示唆している。一方、我々が開発した逆相タンパクアレイによるリン酸化プロファイリング基盤は、今後、コンパニオン診断薬開発のための強力な基盤となる可能性があり、現在、薬剤処理前後の細胞株のリン酸化プロファイリングや臨床組織検体を用いた基盤確立に向け最適化を進めている。

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は肝切除などの局所療

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（商品名ネクサバル）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、2009年5月に本邦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、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）と高額であるにもかかわらず、明確な有効性が認められる症例は非常に少ないのが現状である。高額な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奏効性予測マーカーの同定が求められている。

ネクサバルのように有効性の高い患者をあらかじめ予測できるコンパニオン診断薬の存在しない薬剤も現在のところ多く存在するが、今後は、乳がん治療におけるトラスツマブ（商品名ハーセプチン）とHER2遺伝子の過剰発現、結腸・直腸治療薬のセツキシマブ（商品名アービタックス）とKRAS遺伝子変異などのコンパニオン診断薬の開発が加速することが予測

される。現にFDAは薬剤と診断薬は同時に開発、承認されるべきとの方針を表明しており、今後、コンパニオン診断薬の開発を支える効率よく正確性の高い基盤の確立が必要となることが予測される。

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、ウェ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。この基盤を用いて肝がん細胞株23種を含む95種類のがん細胞株について、183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。更に、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ル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。

2) ソラフェニブ抵抗性細胞におけ

るシグナル解析: 同定されたソラフェニブ感受性予測マーカー候補が含まれるシグナル経路について上流に位置する分子群のリン酸化の状態をソラフェニブ感受性及び抵抗性の細胞でウエスタン法を用い検証し比較を行った。

3) 臨床組織を用いたリン酸化アレイの最適化: 細胞を用いたリン酸化アレイの作製を基に、マウスの組織を用い抽出液の組成と組織からのタンパクの調整法の検討を行った。

(倫理面への配慮)

共同研究施設である Taipei Medical University 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、検体の個人情報漏出す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) の相関解析を行い、高い相関を示すリン酸化タンパク質を同定した (スピアマン相関係数 0.5791, $p=0.0044$)。結果について、ウエスタン法により確認を行ったところ、ソラフェニブ感受性の高い細胞で、本マーカー候補分子の高いリン酸化レベルが検出された。更に、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 7 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結果、治療効果が見られなかった 6 症例で本マーカー候補分子の強いリン酸化が認められた。一方、画像診断によりがんの縮小が認められた症例では本マーカー候補のリン酸化は検出されなかった。

2) 同定されたマーカー候補分子のリン酸化は殆どのソラフェニブ感受性細胞株では認められなかったが、中には弱いリン酸化が検出された細胞株もあった。しかしながら、そのリン酸化はソラフェニブ処理により濃度依存的に消失した。一方、ソラフェニブ抵抗性の細胞株では、ソラフェニブで処理しても、マーカー候補分子のリン酸化に変化は見られず、原因として mTOR 経路の恒常的活性化が関与している可能性が示唆された。これらの細胞株を mTOR 阻害剤エバロリムスで処理すると、nM レベルで本マーカー分子のリン酸化は完全に抑制された。

3) リン酸化アレイに使用する組織溶解液は常に安定した質が求められる。よって我々は Pierce 社の T-PER 組織抽出液を用いてマウスの組織からタンパク抽出液を調整し、ウエスタンによりタンパク質リン酸化が検出できることを確認した。しかしながら、組織によっては大量に不溶分画が生じる。現在、他の組織抽出液による検討、及び 2 次抽出による難溶性タンパク質の抽出を行う条件検討を行っている。

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

一候補を見出した。ソラフェニブ抵抗性細胞株では本マーカー候補分子のリン酸化レベルが高く、またソラフェニブ治療を受けた肝細胞がんの患者由来の生検試料においても、治療効果の見られなかった症例で強いリン酸化が認められた。従って、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。また、ソラフェニブ抵抗性の細胞株においてmTOR経路の恒常的活性化が認められること、加えて、mTOR阻害剤により、本マーカー分子のリン酸化が抑制されることから、ソラフェニブの効果は期待できない患者さんに対し、mTOR阻害剤による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。

E. 結論

培養細胞のリン酸化タンパクプロファイルとソラフェニブ感受性との相関解析によって、肝細胞癌におけるソラフェニブ奏効性予測マーカー候補を見出した。しかしながら、今後多くの臨床例における本マーカーの正確性の検証は必須である。一方、我々が開発した逆相タンパクアレイによるリン酸化プロファイリング基盤は、今後、コンパニオン診断薬開発のための強力な基盤となる可能性があり、現在、薬剤処理前後の細胞株におけるリン酸化プロファイルの変化の検出や臨床組織検体を用いた基盤の最適化を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumour development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Histopathology*. Feb 20. 2012

2. Ito H, Honda K, Satow R, Arai E, Shitashige M, Ono M, Sakuma T, Sakano S, Naito K, Matsuyama H, Yamada T.

Combined functional genome survey of therapeutic targets for clear cell carcinoma of the kidney. *Jpn J Clin Oncol*. 41(7):847-53, 2011

3. Matsubara J, Honda K, Ono M, Sekine S, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Sakuma T, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Tsuchida A, Shimahara M, Yasunami Y, Chiba T, Yamada T. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20(10):2195-203, 2011.

4. Satow R, Shitashige M, Jigami T, Fukami K, Honda K, Kitabayashi I, Yamada T.

β-catenin inhibits promyelocytic leukemia protein tumor suppressor function in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 142(3):572-81, 2012.

2. 学会発表

1: 増田万里、本田一文、下 Wei-Yu Chen、中村優香、Chi-Long Chen、山田 哲司。高密度逆相タンパクアレイを用いたリン酸化タンパク質の網羅的解析及び肝がんにおけるソラフェニブ感受性予測マーカー候補の同定。第31回日本分子腫瘍マーカー研究会、名古屋、2011年10月2日

2: Tesshi Yamada, Kazufumi Honda, Mari Masuda, Miki Shitashige and Masaya Ono. Identification new therapeutic targets for personalized medicine. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 名古屋、2011年10月3-5日

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、本年度はゲノム網羅的 DNA メチル化解析による腎腫瘍鑑別診断マーカーを開発した。

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

所体細胞研究匿名管理者のもとで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. 腎腫瘍鑑別診断マーカー開発:種々の組織型の腎腫瘍において、染色体の広い範囲で同期にして起こる DNA メチル化の変化を検出するのに適した、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、ゲノム網羅的解析を施行した。腎淡明細胞がん 51 例ならびに特殊型腎腫瘍症例 (乳頭状腎細胞がん 4 例 [1 型 2 例、2 型 2 例]、嫌色素細胞がん 10 例、オンコサイトーマ 3 例) の、腎摘除術標本より得られた、非腫瘍部腎組織ならびに腫瘍組織を解析の対象とした。DNA メチル化プロファイルには組織特異性・臓器特異的性が存在するので、対照として、末梢血等ではなく、腎盂がん・胚細胞腫瘍の後腹膜リンパ節転移等の非腎腫瘍症例において施行された腎摘除術標本より採取した正常腎組織検体を用いた。

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、国立がん研究センターと東京医科歯科大学の稲沢譲治教授が共同で開発した 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。

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。

(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体細胞研究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

腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組

織は、非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して、組織学的に特記すべき所見を示さない。従って、淡明細胞がん・乳頭状腎細胞がん・嫌色素細胞がん・オンコサイトーマ症例より得られた非腫瘍部腎組織の間に、相互に組織学的な所見の差違を認めない。ところが、嫌色素細胞がん・オンコサイトーマ症例より得られた非腫瘍部腎組織において、非腎腫瘍症例より得られた正常腎組織に比して、DNAメチル化亢進あるいは減弱を示すBACクローン数は、淡明細胞がん症例より得られた非腫瘍部腎組織のそれに比して有意に少数であった。全症例の非腫瘍部腎組織においてDNAメチル化亢進あるいは減弱を示すBACクローン数は、250BACクローンに谷を持つ2峰性分布をとることが分かった。非腫瘍部腎組織において250BACクローン以上にDNAメチル化の亢進あるいは減弱を認める症例は、非腫瘍部腎組織において250BACクローン未満にDNAメチル化の亢進あるいは減弱を認める症例に比して、無再発生存率が有意に低値であった（ログランク法、 $P=0.0204$ ）。

全プローブの蛍光強度比を用いた腎腫瘍組織のクラスター解析（教師なし法）で、1型乳頭状腎細胞がんと2型乳頭状腎細胞がんは、互いに異なるサブクラスターに属していた。嫌色素細胞がんとオンコサイトーマは、この2つの組織型の腫瘍のみから成る単一クラスターに属していたが、ウイルコクソン検定（ $P<0.01$ ）で、21BACクローンにおける蛍光強度比が嫌色素細胞がんとオンコサイトーマの間で有意に異なることが分かった。全21BACクローンにおいて、適切な蛍光強度比の

診断閾値を設定することにより、検討の対象とした嫌色素細胞がんを、感度・特異度とも100%でオンコサイトーマから区別することができた。

D. 考察

分担研究者は、腎腫瘍症例より得られた非腫瘍部腎組織は、組織学的に特記すべき所見を示さず、慢性炎症やウイルスの持続感染等を伴わないにもかかわらず、DNAメチル化異常を伴う前がん段階にあることを示してきた。そこで、非腫瘍部腎組織におけるDNAメチル化状態に着目したところ、嫌色素細胞がん症例とオンコサイトーマ症例の非腫瘍部におけるDNAメチル化状態は、淡明細胞がん症例のそれと明らかに異なっており、非腫瘍部においてDNAメチル化異常が蓄積する症例は予後不良であった。前がん段階で、その症例に生じるがんの組織型あるいは症例の予後を規定するDNAメチル化プロファイルが、既に確立している可能性があると考えられた。

1型乳頭状腎細胞がんと2型乳頭状腎細胞がんは元来組織形態学的に分類されたものであるが、2型乳頭状腎細胞がんの方が診断時の病期が進行している頻度が高いことが知られている。しかし、1型・2型乳頭状腎細胞がんの間で頻度の異なる遺伝子変異等は、多くは知られていない。本研究から、ゲノム網羅的DNAメチル化プロファイルの相違が、1型・2型乳頭状腎細胞がんの臨床病理像の相違を規定する可能性が示唆された。

ともに好酸性顆粒状胞体を特徴とする嫌色素細胞がんとオンコサイトーマは、組織学的に鑑別が困難である場合がある。また、

Birt-Hogg-Dubé 症候群には、嫌色素細胞がんとオンコサイトーマの双方を合併する場合があります、“so-called hybrid oncocytic tumors with histological features similar to both chromophobe RCCs and oncocytomas” を合併することもある。他方では、嫌色素細胞がんにはゲノムのコピー数異常が蓄積しているが、オンコサイトーマではまれである。

本研究で他の組織型を排除して嫌色素細胞がんとオンコサイトーマが一つのクラスターを形成したことから、DNA メチル化プロファイルが（ゲノム不安定性の差を越えて）、形質の類似性を説明出来る可能性がある。他方で、ウイルコクソン検定で選択された 21BAC クローンで嫌色素細胞がんとオンコサイトーマが感度・特異度とも 100% 出区別出来たことから、両腫瘍で標的となる染色体部位は異なる可能性がある。また、良・悪性の差があり術後の経過観察方針も異なるべき嫌色素細胞がんとオンコサイトーマの組織学的鑑別が困難である場合には、同定した 21BAC クローンにおける DNA メチル化状態が、両腫瘍の鑑別診断の補助指標となり得ると考えられた。

E. 結論

病院検査室等で施行しやすいように最適化すれば、同定した 21BAC クローン上の CpG 部位の DNA メチル化率を評価することにより、腎腫瘍の鑑別診断の補助とし得ると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1、論文発表

1. Kanai Y, Arai E. DNA methylation alterations in human cancers. In: *Epigenetics in Human Disease*. ed. Tollefsbol T. Elsevier, in press, 2012.
2. Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H, Kanai Y. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Carcinogenesis*, in press, 2012.
3. Yamada M, Sekine S, Ogawa R, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kanai Y. Frequent activating GNAS mutations in villous adenoma of the colorectum. *J Pathol*, in press, 2012.
4. Kondo S, Ojima H, Tsuda H, Hashimoto J, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, Tamura K, Shimada K, Kanai Y, Okusaka T. Clinical impact of c-Met expression and its gene amplification in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol*, in press, 2012.
5. Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Maruyama T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci*, in press, 2012.
6. Arai E, Nakagawa T, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Kanai Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology*, 60: E12-8, 2012.

7. Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y, Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in the human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 32:1529-1541, 2012.
8. Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res*, 22: 208-219, 2012.
9. Ono H, Hiraoka N, Lee YS, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Chiwaki F, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Gene Chrom Cancer*, 51:30-41, 2012.
10. 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.
11. 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*, 129: 1170-9, 2011.
12. 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.
13. Sekine S, Ogawa R, Ojima H, Kanai Y. Overexpression of α -methylacyl-CoA racemase is associated with CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinomas. *Histopathology*, 58: 712-719, 2011.
14. Sekine S, Ogawa R, Kanai Y. Hepatomas with activating Ctnnb1 mutations in 'Ctnnb1-deficient' livers: a tricky aspect of a conditional knockout mouse model. *Carcinogenesis*, 32:622-628, 2011.
15. Sekine S, Ogawa R, Ojima H, Kanai Y. Expression of SLCO1B3 is associated with intratumoral cholestasis and CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 102:1742-7, 2011.
16. Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*, 140: 310-321, 2011.

17. Yagi R, Tanaka M, Sasaki K, Kamata R, Nakanishi Y, Kanai Y, Sakai R. ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. *Oncogene*, 30: 1413-1421, 2011.
 18. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kanai Y, Shiozawa T, Tonegawa S, Konishi I. Molecular Approach to Uterine Leiomyosarcoma: LMP2-Deficient Mice as an Animal Model of Spontaneous Uterine Leiomyosarcoma. *Sarcoma*, 2011:476498, 2011.
 19. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Tonegawa S, Konishi I. Involvement of proteasome β 1i subunit, LMP2, on development of uterin leiomyosarcma. *N Am J Med Sci*, 3: 394-399,2011.
 20. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Tagawa Y, Nishimura R, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Konishi I. Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Sci Rep*, 1: 180, 2011.
- 2、 学会発表
1. Naotaka Nishiyama, Eri Arai, Ryo Nagashio, Hiroyuki Fujimoto, Fumie Hosoda, Tatsuhiro Shibata, Taiji Tsukamoto, Sana Yokoi, Issei Imoto, Johji Inazawa, Yae Kanai. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. 27th Annual European Association of Urology Cogress, 2012.
 2. 金井弥栄. 多層的オミックス解析による疾患の本態解明と臨床応用 シンポジウム 2「オミックス解析と病理学」第 101 回日本病理学会総会、2012.
 3. 佐藤崇、新井恵吏、知久季倫、河野隆志、蔦幸治、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 肺多段階発がん過程における DNA メチル化の変化のゲノム網羅的解析. 第 101 回日本病理学会総会、2012.
 4. 西山直隆、新井恵吏、長塩亮、藤元博行、細田文恵、柴田龍弘、塚本泰司、横井左奈、井本 逸勢、稲澤譲治、金井弥栄. 尿路上皮がんにおける染色体構造異常と臨床病理学的検討: DNA メチル化状態と染色体構造異常との関係. 第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012.
 5. 新井恵吏、知久季倫、森泰昌、後藤政広、中川徹、藤元博行、金井弥栄. ゲノム網羅的 DNA メチル化解析による腎淡明細胞がんの CpG アイランドメチル化形質. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会、2012.
 6. 佐藤崇、新井恵吏、知久季倫、河野隆志、蔦幸治、後藤政広、渡辺俊一、副島研造、別役智子、金井弥栄. 肺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 6 回日本エピジェネティクス研究会、2012.
 7. Naotaka Nishiyama, Eri Arai, Ryo Nagashio, Hiroyuki Fujimoto, Fumie