

厚生労働科学研究費補助金

－第3次対がん総合戦略研究事業－

『がん化パスウェイネットワークが規定する
がんの分子標的の解析並びに予後予測法の確立』
(H22-3 次がん－一般-012)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 典子
平成24 (2012) 年 5月

目 次

I.総括研究報告

がん化パスウェイネットワークが規定するがんの分子標的の解析 並びに予後予測法の確立	1
--	---

後藤 典子

II.分担研究報告

1.肺癌のプロテオミクス	7
--------------	---

野村 将春

2.p53不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索	8
---------------------------------	---

江成 政人

3.PI3K-AKTシグナル伝達経路活性化分子機構の解明	11
------------------------------	----

野口 昌幸

I. 総括研究報告

がん化パスウェイネットワークが規定するがんの分子標的の解析並びに予後予測法の確立
(H22- 3 次がん - 一般- 012) に関する研究

主任研究者 後藤 典子

東京大学医科学研究所 分子療法分野 がん分子標的研究グループ 特任准教授

研究要旨

テーラーメイド医療を実現し、がんの罹患率及び死亡率を激減するには、個々の症例により異なる、複雑ながんの病態（個性）を統合的に解明することが重要である。がん病態の進行は、主だつたがん遺伝子やがん抑制遺伝子を中心とする、いくつかのがん化パスウェイを構成する基本成分の、相互作用（ネットワーク）の動態変化ととらえることができる。本研究では、がん化パスウェイの基本成分として、EGFR/HER, K-Ras, p53, PI-3k-AKTパスウェイに焦点をあてる。細胞株やヒト癌組織を用いて、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、ゲノミクス解析に加えて、新規バイオインフォマティクスを組み合わせた解析を行い、がん化パスウェイを統合的に解明する。その過程で、予後予測、早期診断、抗がん剤感受性予測などに有用な新規バイオマーカー並びに個々の症例に合った分子標的候補を同定することを目的とする。

p53 失活に伴って誘導される膜蛋白質を多数見出し、その中で、肺がんの予後とも関連する因子として *TSPAN2* 遺伝子を同定した。*TSPAN2* 遺伝子は、4 回膜貫通型蛋白質をコードしており、このファミリーに属する蛋白質は、がんの浸潤や転移といった腫瘍の悪性化に重要な役割を担っていることから、肺がん進展の過程で p53 の不活化が起こり、*TSPAN2* 遺伝子の発現が誘導され、肺がんを亢進させるモデルが考えられた。

プロトオンコジン *TCL1b* は他の protooncogene *TCL1 isoform* と同様に AKT を活性化し、類似した遺伝子を誘導した。beta-actin promoter を用い、*TCL1b* を全身性に過剰発現する transgenic mice を作製した結果、マウスは全例消化管由来の血管肉腫を発症し、8 ヶ月以内に死亡した。*TCL1b* を特異的に認識する polyclonal 抗体を作製し、ヒトのがんの免疫組織染色を行ったところ、血管肉腫始め、各種上皮性由来の多くの悪性腫瘍において活性化されていることが明らかとなった。その結果、*TCL1b* が AKT を活性化することにより、ヒトの悪性腫瘍における各種の病態発現に関与している可能性が示唆された。

手術により採取された肺癌切除組織、又はそこから培養された細胞を用いて様々な質量分析装置でタンパク質解析を行った。悪性度の強い肺癌に関係するタンパク質及び、薬剤感受性に関係するタンパク質を解析し、いくつかの物質を同定した。

HER がん化パスウェイに含まれる分子から、血清早期がんマーカー候補分子を選別した結果、FGL-1 の濃度が、早期肺がん血漿中において有意に高かった。

イレッサ耐性の分子機構のひとつは、Wnt-beta-catenin パスウェイの活性上昇によることが明らかになった。

HER-PI3 kinase がん化パスウェイ並びに HER-NFkB がん化パスウェイの詳細時系列トランスクリプトーム解析を行い、がん幹細胞シグネチャー、新規分子標的候補、がん早期、再発診断マーカー候補分子の抽出を行った。HER-NFkB がん化パスウェイ鍵分子として初期解析の結果得た 71 分子の解析を進め、いくつかについてがん幹細胞維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

野村 将春	東京医科大学 第一外科学講座	講師
江成 政人	国立がん研究センター研究所	ユニット長
野口 昌幸	北海道大学遺伝子病制御研究所	教授

A.研究目的

がんを早期に診断し、適切な治療法を選択できるテーラーメイド医療を実現し、がんの罹患率及び死亡率を激減するには、個々の症例により異なるがんの複雑な病態を統合的に解明、理解することが重要である。分子生物学の限界が指摘される中、申請者はがんのシステム生物学を4年前に提唱し、独創的な解析手法を試みたところ、従来法では発見されずにおかれたバイオマーカーや分子標的の発見に有用であった(PCT出願 JP2009/70386, 特願 2009-023933, 特願 2008-3114-81, British J. Cancer, 2010)。がん細胞の増殖、浸潤、転移という病態の進行は、主だったがん遺伝子やがん抑制遺伝子を中心とするいくつかのがん化パスウェイを構成する基本成分の相互作用(ネットワーク)の動態変化として、統合的に理解される。申請者は、この基本成分を高精度に抽出できる手法を開発してきた。本研究では、これを応用発展することにより、がんの複雑性の全貌を統合的に解明し、これを基盤として、バイオマーカーや革新的分子標的を同定することを目的とする。そして、診断薬や創薬への実用化を目指す。

23年度は、肺がんでは、すでに基本成分抽出が完了したHERパスウェイの解析に加え、K-Ras, p53, PI-3K-Aktパスウェイを解析する。また、乳がん幹細胞については、申請者が見いだしたNFkBパスウェイ並びにHER2陽性乳がんを解析する。そして、臨床検体の網羅的遺伝子、miRNAまたは蛋白質発現プロファイリング並びに網羅的遺伝子変異情報から、個々の症例のがん化パスウェイネットワークを導きだし、予後予測、(超)早期診断マーカー、症例の特性にあった分子標的候補を抽出する。さらに、がん細胞株の抗がん剤感受性情報付き網羅的遺伝子発現プロファイリングも用いて、抗がん剤の効果予測マーカー、新規分子標的候補を抽出する。次に候補分子の分子生物学的機能解析並びに、臨床検体を用いた評価を行い、診断薬開発並びに創薬へ進める。

B.研究方法

1.肺がんのがん化パスウェイの解析

22年度に、ヒト不死化肺上皮細胞に、p53-ERを用いてマイクロアレイ解析、バイオインフォマティクス解析に供する。

PTENの野生型肺がん細胞に、野口が見いだしたAKT活性化補助因子TCL1を発現させ、肺がん細胞におけるTCL1-AKTの活性化により誘導される遺伝子群と、恒常活性化型AKT (myr-AKT) の過剰

発現による誘導される遺伝子群を、マイクロアレイ法により網羅的に同定し、PTEN-AKTがん化パスウェイを解析する。

(江成、後藤、野村)

2.肺がんの個々の病態を規定するがん化パスウェイネットワークの解析

これまでに解析した230症例も含めて、次世代シーケンサーを用いた、exome sequencingを開始した。予後予測精度の更なる向上、早期診断マーカー、新規分子標的候補のさらなる抽出を行う。(後藤、江成、野村)

3.肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウェイネットワークの解析

PC9細胞並びにイレッサ耐性PC9A2細胞の解析を継続する。エキソームシーケンス、全ゲノムシーケンスにて、イレッサ耐性ととともに、変異の生じた遺伝子を網羅的に解析する。(後藤)

4.乳がん幹細胞のがん化パスウェイネットワークの解析

22年度に、乳がん細胞株を、Heregulin刺激によるNFkBを活性化させる系を用いて、mRNAの時系列マイクロアレイ解析を行った。miRNAの解析も取り入れて、バイオインフォマティクス解析に供する。がんの超早期診断、再発診断マーカー、革新的分子標的候補を得る。(後藤)

5.肺がんのホルマリン固定切片標本からのプロテオミクス解析

ホルマリン標本を用いたプロテオミクス解析から得られた蛋白質発現情報を元に組織切片を用いた評価を行い、予後因子などを含めた臨床情報との関連を調べる。(野村)

6.新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

新規分子標的候補分子について、分子生物学的に詳細な解析をさらに行う。

よい抗体がなければ、抗体を作製する。手術検体並びに血清は、国立癌センターと東京大学病院より入手する。(後藤、江成、野口、野村)

7. HER2陽性乳がんのがん化パスウェイネットワークの解析

HER2を乳腺特異的に発現するトランスジェニックマウス(MMTV-HER2)と、後藤が作製したFRS2betaノックアウトマウスを掛け合わせしたマウス(MMTV-HER2/FRS2beta^{-/-})に発症したがんは、MMTV-HER2マウスの乳がんと比較し、進行

が遅く、マウスは延命する。FRS2beta が、がん幹細胞の維持に重要な役割を果たしているためであることを示唆する結果を得ている。独創的な手法にて、個体レベルでがん化パスウェイ解析を行う。(後藤)

8. PI3K-AKT シグナル伝達系新規がん化パスウェイの解析 (野口)

(野口の項に記載)

(倫理面の配慮)

国立がんセンター(肺がん)、東京大学病院(乳がん)について:

生検・手術標本を用いる研究は、病理学的検索の後に残った組織を対象として行い、研究対象者から同意を得た上で、検体は匿名・コード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行う。

全ての研究は、原則的には研究者が所属する施設の倫理規定に基づいて行う。あらかじめ倫理委員会の承認が必要な研究に関して既に研究機関の承認が得られている。まだ承認の得られていない一部の研究については、開始前に研究機関の倫理委員会にて承認を得る。

がん組織における遺伝子発現・変異や血清中におけるタンパク質発現を解析する実験に際しては、法律および「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。

東京医大病院について(肺がん):

臨床検体を用いる研究に関しては既に東京医科大学内の倫理委員会の承認を得ている。基本的には研究に関連する全ての研究者はヘルシンキ宣言に従って試験を実施する。研究の実施にあたっては倫理的配慮を慎重に行い、説明・同意文章を用いて十分説明した上で、資料提供者本人から、別添の説明文章と自由意志による同意文書を用いてインフォームドコンセントを獲得する。患者の個人名(イニシャルを含む)は使用せずに、東京医科大学第一外科での登録番号を使用する。

個人識別情報の厳重な管理を行う為に、登録番号と試料の符号化の対比(個人情報管理)は、当科のデータ管理責任者の責任のもとでのみ行う。したがって、試料提供者の病期、病理組織診断、予後等の研究に不可欠な臨床情報と、研究を通じて得られる結果およびそれらの情報との対応は、当科のみ連結可能であり、本研究過

程のどの段階においても個々の試料に関する氏名、住所、生年月日等の個人情報外部の目に触れることはなく、極めて厳重に保護される。本研究はヒトを対象とする医学研究であるので被験者の福利に対する配慮が科学的及び社会的利益よりも優先されなければならない。

よって本研究へ参加する不安その他により患者本人に本研究の取りやめの権利があることを明確にする。また、研究への参加の継続について試料提供者、またはその代諾者の意思に影響を与える可能性のある情報が得られた場合には速やかに被験者またはその代諾者に伝える。また本研究より得られた遺伝子情報が患者の不安を惹起した場合には担当者より適切なカウンセリングを行う。

動物実験について

動物実験は、所属施設における動物実験の倫理規定に基づき、すでに承認が得られている。

C.研究結果

1. 肺がんのがん化パスウェイネットワークの解析と新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

(江成の項にも詳細記載)

HER がん化パスウェイに含まれる分子のうち、一分子の発現で、肺腺癌の5年生存あるいは再発率において、予後の悪いハイリスク群を予測できる分子として、72分子得られた。そのうち、ハイリスク群の患者に発現の高い分子40分子について、新規分子標的候補としての評価を行った。肺がんのみならず、他の癌においても、未知の候補分子が約半数含まれていた。主にこれらに注目し、創薬ターゲットとしての可能性を詳細に検討し、POC(proof of concept)獲得へ向けた解析を行っている。酵素活性や、膜分子かどうか、様々ながんの遺伝子発現プロファイリング情報を組み合わせで解析し、Druggable かどうか検討し、優先順位づけを行い評価を進めた。

本年度は特に、評価を進めるための様々な実験系の確立を行った。具体的には、各種肺がん細胞株を用いて、血清並びにEGF存在下での細胞増殖、軟寒天中コロニー形成能、細胞運動、ケモタキシスなどを計測する系の確立を行った。さらに、肺がんのがん幹細胞を調べるための系の確立も行った。各種肺がん細胞株を持ちいて、スフェア培養の系を立ち上げた。

HER がん化パスウェイに含まれる分子から、血清早期がんマーカー候補分子を選別した。早期肺がん患者40名の血漿と、健常人10名の血漿を用いて、候補分子の濃度をELISAによって測定し

た。その結果、FGL-1 の濃度が、早期肺がん血漿中において有意に高かった。

2. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウエイネットワークの解析

イレッサ感受性 PC9 細胞と、耐性亜株 A2 細胞の全ゲノムシーケンス、エクソームシーケンスを行い、オミクス解析結果全てが出揃った。イレッサ耐性がん化パスウエイ抽出を行った結果、いくつかのパスウエイが、特に A2 細胞で活性上昇している可能性が示された。この中で、Wnt パスウエイに注目して解析を行ったところ、その下流で beta-catenin が核へ移行していることが明らかになった。beta-catenin を siRNA を用いてノックダウンすると、イレッサ感受性が回復した。以上より、イレッサ耐性の分子機構のひとつは、Wnt-beta-catenin パスウエイの活性上昇によることが明らかになった。

さらに、エクソームシーケンスの結果、Kit 受容体チロシンキナーゼの細胞外ドメインに点変異が検出された。耐性 A2 細胞の細胞内では、AKT の活性が有意に上昇していることも示された。

3. 乳がん幹細胞のがん化パスウエイネットワークの解析と新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

HER-PI3 kinase-NFkB がん化パスウエイが、乳がん幹細胞の自己複製能維持に重要であることを新鮮臨床検体を用いて証明した。HER-PI3 kinase がん化パスウエイ並びに HER-NFkB がん化パスウエイの詳細時系列トランスクリプトーム解析を行い、

6. PI3K-AKT シグナル伝達系新規がん化パスウエイの解析

(野口の項に記載)

D. 考察

1. 肺がんのがん化パスウエイネットワークの解析と新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

(江成の項にも詳細記載)

HER がん化パスウエイに関与する分子について、予後予測のみならず、新規分子標的候補が多数得られている。血清バイオマーカー候補も得られた。また、定常状態での DNA マイクロアレイ解析から、p53 を標的とする分子標的候補も得られた。POC を獲得し、日本発の分子標的薬並びにバイオマーカーの開発へとつなげる予定である。

今後、これまでに確立してきた独創的システム生物学的手法を活用して、肺がんに関わるもうひとつの主要ながん遺伝子 KRas がん化パスウエイを解析することにより、肺がんの新規分子標的、

がん幹細胞シグネチャー、新規分子標的候補、がん早期、再発診断マーカー候補分子の抽出を行った。HER-NFkB がん化パスウエイ鍵分子として初期解析の結果得た 71 分子の解析を進め、いくつかについてがん幹細胞維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。

4. 肺がんのホルモリン固定切片標本からのプロテオミクス解析

(野村の項に詳細記載)

5. HER2 陽性乳がんのがん化パスウエイネットワークの解析

MMTV-HER2 マウスに発症した乳がん細胞を用いて、スフェア培養を行った。

その結果、FRS2beta ノックアウトマウスの乳がん中のがん幹細胞の数が減っていることがわかった。さらに、授乳期の乳腺細胞を用いて、スフェア培養を行ったところ、FRS2beta ノックアウトマウスの乳腺中のスフェア形成幹細胞/前駆細胞の数が減っていることがわかった。乳腺細胞を用いて、CD24/CD49f を用いて FACS 解析を行ったところ、FRS2beta ノックアウトマウスの luminal 前駆細胞の比率が、野生型に比較し、減っていることがわかった。

また、FRS2beta は、乳腺上皮の luminal 細胞の数%にのみ発現が認められ、妊娠、授乳とともにその発現が上昇する。

バイオマーカーを更に同定していく予定である。AKT パスウエイに関わる TCL ファミリーのがんにおける役割についてについて解析を進め、分子標的候補としての評価を進める。

2. 肺がんの抗がん剤感受性を規定するがん化パスウエイネットワークの解析

今回、Wnt パスウエイ並びに AKT の活性化を見いだした意義は大変大きい。活性化した Akt は、Wnt パスウエイを活性化する。Wnt パスウエイは、いくつかの固形がんにおいて、がん幹細胞との関連が知られているが、肺がんにおいてはまだほとんど報告はない。また、イレッサ耐性との関連は全く報告がない。がん幹細胞は、抗がん剤に対して抵抗性である。そのような細胞が、イレッサのような抗がん剤で長期間投与した患者の中で、生き残り、再発の温床になると考えられる。これまでイレッサ耐性のメカニズムとして報告されてきた、MET の増幅、HGF の過剰発現なども、すべて Wnt パスウエイの活性上昇とともに起こるがん幹

細胞化を最終的には起こし、そのために抗がん剤に対する耐性を起こしていると考えられる。

今回のプロジェクトで行っている研究がすべて有機的につながってきて、がんという病気の本質を統合的に理解することができる道筋が、とうとう開けてきたのかもしれない。

3.乳がん幹細胞のがん化パスウェイネットワークの解析と新規バイオマーカー、分子標的候補の機能解析と臨床検体を用いた評価

乳がん患者の新鮮臨床検体を用いたスフェア培養の系から、がん幹細胞維持に重要なパスウェイとして、ErbB-NFkB パスウェイを同定した。さらに、これまでに確立してきた独創的システム生物学的手法を活用して、新規分子標的候補を多数得つつある。今後は、この解析を更に進めるとともに、乳がんの新規分子標的、バイオマーカーを更に同定し、評価を進め、日本発の分子標的薬並びにバイオマーカーの開発へとつなげる予定である。

4.肺がんのホルマリン固定切片標本からのプロテオミクス解析

(野村の項に詳細記載)

5.HER2 陽性乳がんのがん化パスウェイネットワークの解析

FRS2beta は、HER ファミリー分子のフィードバック抑制因子であることを私どもは以前に報告した。また、乳腺の luminal 前駆細胞が、がん幹細胞化する可能性が最近報告されている。Luminal 前駆細胞を識別できるマーカーが現時点ではないので、FRS2beta が luminal 前駆細胞に発現しているかどうかを直接証明することはできないが、その可能性が高い。授乳期の乳腺細胞を取り出し、マトリゲルで培養させると、luminal 前駆細胞から各種細胞への分化段階をある程度みることができる。今後このアッセイ系で、野生型と FRS2beta ノックアウトマウスの luminal 前駆細胞の分化能を比較し、後者の分化能が低下しているとなれば、FRS2beta ががん幹細胞維持に重要な役割を果たしていることのさらなる証明になる。がん幹細胞は、他のがん細胞に比較し、dormancy という言葉で表される「増殖能力の低さ」を持っていることが大きな特徴である。その分子機構がここで明らかになる。FRS2beta は、がん幹細胞のマーカー並びに分子標的となる可能性がある。

現在ヒト乳がんの tissue array を用いて、FRS2beta の発現と予後情報との相関を解析している。

私どもは、つい最近 FRS2beta のがんマーカーと

しての国際特許を取得したので、これを実用化へ大きく進める可能性が開けてきた。

E.結論

新しいバイオインフォマティクス技術を駆使した、トランスクリプトーム、プロテオミクス、バイオインフォマティクスのこれまでにない形態での共同研究は、画期的な成果が出た。この成果は、国内国際学会での発表、招待講演、論文発表として世界へ発信されている。さらに、知的財産の獲得、実用化へと着実な筋道がつけられている。本研究をさらに加速、推進させることにより、21世紀の医療として注目されているがんの個別化医療へ着実に進めるものと考えられる。

論文発表

1) Nakata, A. & Gotoh, N.:

Recent understanding of the molecular mechanisms for the efficacy and resistance of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, in press.

2) Hinorara, K., Kobayashi S., Kanauchi, H., Shimizu, S., Nishioka, K., Tsuji, E., Tada, K., Umezawa, K., Mori, M., Ogawa, T., Inoue, J., Tojo, A. & Gotoh, N.: ErbB/NF-kB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 109, 6584-6589, 2012.

3) Hinohara, K. & Gotoh, N.: NF-kB pathways in breast cancer stem cells for tumorigenesis. In: *Breast cancer, Bentham eBooks, Bentham Science*, in press.

4) Kojima, K., Imoto, S., Yamaguchi, R., Fujita, A., Yamauchi, M., Gotoh, N. & Miyano, S.: Identifying regulational alterations in gene regulatory networks by state space representation of vector autoregressive models and variational annealing. *BMC Genomics*, Suppl. 1, S6, 2012.

5) Okayama, H., Khono, T., Ishii, Y., Shimada, Y., Shiraishi, K., Iwakawa, R., Furuta, K., Tsuta, K., Shibata, T., Yamamoto, S., Watanabe, S., Sakamoto, H., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Gotoh, N., Mizuno, H., Sarai, A., Kawano, S., Yamaguchi, R., Miyano, S. & Yokota, J.: Identification of genes up-regulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 72, 100-111, 2012.

6) Nomura, M., Fukuda, T., Fujii, K., Kawamura, T., Tojo, H., Kihara, M., Bando, Y., Gazdar, A.F., Tsuboi, M., Oshiro, H., Nagao, T., Ohira, T., Ikeda, N., Gotoh, N., Kato, H., Marko-Varga, G. & Nishimura, T.:

Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 1, 23, (3 September), 2011.

7) Yamauchi, M., Yoshino, I., Yamaguchi, R., Shimamura, T., Nagasaki, M., Imoto, S., Niida, A., Koizumi, F., Kohno, T., Yokota, J., Miyano, S. & Gotoh, N.: N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am. J. Cancer. Res.*, 1, 823-833, 2011.

8) Gotoh, N.: Somatic mutations of the EGF receptor and their signal transducers affect the efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 4, 403-409, 2011.

学会発表

“ErbB/EGF receptor signaling is a key pathway for self-renewing breast cancer stem cells”

“Cancer and stem cells”

シンポジウム オーガナイザー

第34回日本分子生物学会年会

2011年12月16日

横浜 招待講演

“がん幹細胞の新規分子標的の同定”

“がん幹細胞研究の進展と治療展開” パネルディスカッション3

第49回 日本癌治療学会

2011年10月27日

名古屋 招待講演

ErbB/NFkB signaling controls self-renewal of breast cancer stem cells”

Advances in Breast Cancer Research, AACR conference

2011年10月14日

サンフランシスコ

乳腺正常幹細胞と癌幹細胞の維持メカニズム：乳癌幹細胞は正常幹細胞由来か？

第70回日本癌学会学術総会

2011年10月5日

横浜

ErbB/NFkB signaling controls self-renewal of breast cancer stem cells”

13th Japanese-German Cancer Workshop

2011年9月18日

広島 招待講演

「システム生物学的手法を用いた疾患研究—肺癌予後予測シグネチャーと乳癌幹細胞シグナルの同

定」

第4回東京アンチエイジングアカデミー

2011年5月21日 招待講演

東京

“Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase-responsiveness provides critical prognostic genes of lung adenocarcinoma”

Lecture series of the Lung Cancer Oncogenome Group (LCOG)

2011年3月28日

Memorial Sloan Kettering Cancer Center

ニューヨーク 招待講演

学会座長

マイクロRNA

第70回日本癌学会学術総会

2011年10月5日

横浜

ワークショップ6 増殖因子・サイトカイン

日本がん分子標的治療学会 第15回学術集会

2011年6月22~24日、

東京

知的財産

PCT/JP2007/56100(国際特許出願)

- ・ 発明者：後藤典子、黒田雅彦、土田信夫
- ・ 名称：シグナル伝達阻害方法、それに用いるシグナル伝達阻害剤およびその用途
- ・ ErbB1 シグナルを阻害する分子標的候補FRS2betaの特許

出願者：東京大学法人 出願日：2007年3月23日

取得：米国 2012年5月8日

II. 分担研究者報告

【肺癌のプロテオミクス】

分担研究者 野村 将春 東京医科大学 第一外科学講座 講師

研究要旨

肺癌は個々によって不均一性が強く、個々の患者に合わせた治療が必要な悪性疾患の一つである。生体内で直接作用するタンパク質を解析する事により、疾患に強く関与している物質を同定する事が重要である

A. 研究目的

肺癌の臨床検体及び初期培養した細胞株を用いてタンパク質解析を行い個々の患者の特性を明らかにする。

B. 研究方法

手術により採取された肺癌切除組織、又はそこから培養された細胞を用いて様々な質量分析装置でタンパク質解析を行う。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ条約に基づいたICを所得する

C. 研究結果

これまでに肺癌の中で特に悪性度の高い癌のタンパク質解析を行い、いくつかのタンパク質を同定した。その中には、癌幹細胞のマーカーとされている物質や薬剤感受性に関与している物質が同定された。

D. 考察

悪性度の強い肺癌に関係している物質は、癌幹細胞のマーカーとして報告されているものであり、治療や予後の指標になる可能性がある。今後、それらの機能を解析し、他の肺癌や、他臓器の悪性疾患に応用できる可能性を考慮する。また、神経内分泌物質を産生している肺癌で多く産生されている物質は、ある薬剤にとっては感受性の、また別の薬剤にとっては抵抗性の指標になる事が示唆された。

E. 結論

悪性度の強い肺癌に関係するタンパク質及び、薬剤感受性に関係するタンパク質を解析し、いくつかの物質を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Journal of Clinical Bioinformatics 2011,1,23

<http://www.jclinbioinformatics.com/content/1/1/23>.

Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. An FFPE proteomic study

2. 学会発表

1) 第102回米国癌学会

Masaharu Nomura et al,

Novel characteristic proteins of large cell neuroendocrine carcinoma of lung

102nd Annual Meeting of AACR, Orlando, Florida, USA. April 2-6, 2011 (Poster)

2) 5th EORCT-NCI-ASCO Annual meeting on "Molecular markers in Cancer" Brussels, Belgium October 27-29 (Poster)

Masaharu Nomura et al.

Stathmin-1 – drug sensitivity associated protein of Lung cancer

Abstract is discribed on European Journal of Cancer, Vol.47, Suppl.4, S26, Oct 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

【p53 不活化とがん遺伝子活性化に伴って誘導される経路の探索】

分担研究者 江成 政人 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨

がん抑制因子 p53 は、肺がんの進行に伴って変異失活することが知られており、肺がんの浸潤・転移などの進展機序を解明する上で、p53 経路の制御機構の解析が重要であると考えられる。本年度は、肺がんの浸潤・転移における p53 パスウェイによって制御される因子を探索・同定することを目的とした。その目的を遂行するため、本年度は、ヒト肺上皮由来の細胞 (SAEC) を用いて、p53 失活に伴って誘導される膜蛋白質を多数見出し、その中で、肺がんの予後とも関連する因子として *TSPAN2* 遺伝子を同定した。*TSPAN2* 遺伝子は、4 回膜貫通型蛋白質をコードしており、このファミリーに属する蛋白質は、がんの浸潤や転移といった腫瘍の悪性化に重要な役割を担っていることから、ここで見出された *TSPAN2* 蛋白質も肺がんの進展に関わる因子であることが推測された。面白いことに、RNAi 法を用いて、*TSPAN2* 遺伝子の発現を抑制すると、細胞増殖や足場非依存的増殖等には影響を与えないが、肺がん細胞の運動能や浸潤能そして転移能を著しく低下させた。この結果は、肺がん進展の過程で p53 の不活化が起こり、*TSPAN2* 遺伝子の発現が誘導され、肺がんを亢進させるモデルが考えられた。

A. 研究目的

肺がんは様々な遺伝子の異常により悪性度の高いがんへと進行するが、その際、臨床病理的な知見から、がん抑制遺伝子 p53 の変異失活に伴う症例が非常に多いことから、p53 経路はがんの増殖抑制はかりではなく、浸潤や転移などのがんの進展にも関与していることが示唆されている。今まで、p53 経路の研究に関して、様々な細胞系でその伝達経路が解明されてきたが、多くのシグナル伝達系は細胞固有の性質に大きく左右されることから、腫瘍抑制因子としての p53 機能の本質を理解するには、ヒトがんの主な発生源である上皮系の細胞を用いて、p53 機能損失による細胞の変質やそこでの動作原理を理解することこそが重要であると考えられる。本研究では、肺上皮由来の不活化細胞を用いて、p53 不活化に伴う膜蛋白質を探索・同定し、その膜蛋白質に対する抗体創薬の開発基盤を構築することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト肺上皮由来の細胞 (SAEC) へ p53 に対する siRNA あるいはコントロール siRNA を導入した後、それら細胞から全 RNA を調製した。調製した全 RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析には、Affymetrix 社製 U133Plus2.0 アレイを用いた。その比較解析より、同定した遺伝子群の更なる定量には、Taqman プ

ローブを用いたリアルタイム PCR 法により行った。予後解析には、Prognoscan 等のデータベースを用いた。また、In vivo における肺への転移能を調べるために、SAEC を活性型 KRAS、SV40 ウイルス由来のラージ T 抗原及びスモール T 抗原でトランスフォームした。そのトランスフォームした細胞 (SAEC^{KSL}) を用いて、*TSPAN2* 発現抑制による細胞増殖能、足場非依存性増殖及び転移能への効果を調べた。細胞の増殖能には、WST-8 Cell counting kit を用い、足場非依存性増殖には、ソフトアガー (ボトムアガー: 0.6%; トップアガー: 0.3%) を用いた。In vivo における肺転移能には、免疫不全 NOG マウスを用い、マウスの尾静脈より *TSPAN2* 発現を抑制した SAEC^{KSL} 及びコントロール SAEC^{KSL} をそれぞれ注入した。また、SAEC^{KSL} には、ルシフェラーゼ遺伝子を構成的に発現させ、Xenogen 社製の in vivo イメージング装置を用いて、SAEC^{KSL} の肺転移状態をリアルタイムで観察した。

C. 研究結果

当初は、p53 活性化や不活化に伴って変動する蛋白質群・遺伝子群の発現動態を質量分析 (LC-MS/MS) あるいは DNA チップによる mRNA 発現比較解析を用いて同定する予定であったが、資金面的に p53 発現変動による経時変化の網羅的な解析は困難であったため、p53 不活化に伴

う遺伝子発現変動に焦点を絞り、解析した。ヒト肺上皮由来の細胞株 (SAEC) に p53 発現をノックダウンする shRNA の安定細胞株及び、p53 に対する siRNA を SAEC に導入した細胞から RNA を抽出し、DNA チップを用いてその遺伝子発現変化を解析した。その結果、p53 不活化に伴って抑制される遺伝子 (1/2 倍以下) 及び誘導される遺伝子 (2 倍以上) が多数あった。そのうち、抗体創薬等の観点から、p53 不活化に伴って誘導され、かつ細胞膜貫通型蛋白質をコードする遺伝子に絞って研究を進めた。そのような特徴を持つ遺伝子は全部で 10 遺伝子あり、その中で、p53 変異を持つ細胞において有意に発現が高い 2 つの遺伝子を抽出した。そして、更に、Prognoscan 等の公共のデータベースを用いた解析より、2 つの遺伝子のうち、TSPAN2 遺伝子が肺がんの予後とも関連する因子として同定された。TSPAN2 遺伝子は、4 回膜貫通型蛋白質をコードしており、このファミリーに属する蛋白質は、がんの浸潤や転移といった腫瘍の悪性化に重要な役割を担っていることから、ここで見出された TSPAN2 蛋白質も肺がんの進展に関わる因子であることが推測された。面白いことに、RNAi 法を用いて、TSPAN2 遺伝子の発現を抑制すると、細胞増殖や足場非依存的増殖等には影響を与えないが、肺がん細胞の運動能や浸潤能そして転移能を著しく低下させた。

D. 考察

本研究において、私達は、p53 不活化に伴って誘導され、肺がん予後と相関する膜蛋白質をコードする遺伝子を同定した。肺腺がんの発生源であるヒト肺上皮細胞における p53 の役割を理解する上で、この実験系を用いた解析は非常に意義深く、この実験系で見出された因子 TSPAN2 は、肺腺がんの浸潤や転移と深く関わっていると考えられる。現に、公共のデータベースを用いた解析より、TSPAN2 の発現が高いと肺腺がんの予後が悪いという結果を得ている。また、TSPAN2 の発現抑制が、肺腺がん細胞の浸潤能や転移能を抑制することからも、肺腺がんの進展に非常に重要な因子であることが窺える。このように、TSPAN2 は肺腺がんの浸潤や転移の標的分子であると考えられ、この膜蛋白質に対する抗体等が抗転移薬として期待できる。今後、更なる TSPAN2 の機能を明らかにするとともに、

TSPAN2 に対する抗体が肺線がんの転移を阻害するか調べる必要があるだろう。

E. 結論

以上の結果、がん進展の過程で p53 の不活化が起こり、TSPAN2 遺伝子の発現が誘導され、がん進展を亢進させるモデルが考えられた。この知見は、将来的に抗がん転移薬の開発に役立つと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yuudai Kondo, Kentaro Nagai, Shingo Nakahata, Yusuke Saito, Tomonaga Ichikawa, Akira Suekane, Tomohiko Taki, Reika Iwakawa, Masato Enari, Masafumi Taniwaki, Jun Yokota, Sumio Sakoda and Kazuhiro Morishita: Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of OSCC with p53 inactivation. **Cancer Sci.**, 103, 782-790, 2012.
- (2) Takashi Kohno, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Totoki, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nammo, Hiromi Sakamoto, Koji Tsuta, Koh Furuta, Yoko Shimada, Reika Iwakawa, Hideaki Ogiwara, Takahiro Oike, Masato Enari, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Aage Haugen, Vidar Skaug, Suenori Chiku, Itaru Yamanaka, Shun-ichi Watanabe, Ikuo Sekine, Seishi Ogawa, Curtis C. Harris, Hitoshi Tsuda, Teruhiko Yoshida, Jun Yokota and Tatsuhiro Shibata: KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. **Nat. Med.**, 18, 375-377, 2012.

2. 学会発表

- (1) p53 は癌における ALK 融合蛋白質によるチロシン残基リン酸化で失活する: 田矢 洋一, 江成 政人 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日
- (2) ALK による p53 不活性化機構: 江成 政人、大坪 千裕、田矢 洋一 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日
- (3) p53 不活性化による細胞の運動能と浸潤能の制御機構に関する研究: 大坪 千裕、岩川 麗香、市川 仁、清野 透、横田 淳、江成 政人 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011

年 10 月 4 日

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

【PI3K-AKT シグナル伝達経路活性化分子機構の解明】

分担研究者 野口 昌幸 北海道大学遺伝子病制御研究所 教授

A. 研究目的

prototooncogene TCL1bのAKT活性化補助因子としての機能を解析しヒト悪性腫瘍への機能的な関与を明らかにする。

B. 研究方法

AKT は細胞外からの刺激により細胞膜移行し、PHドメインにリン脂質 (PIP3) が結合し、PDK1(Phosphoinositide Dependent Kinase)により活性化される。AKTの活性化はFKHR (Fork Head Transcription Factor)、BAD、Nur77のリン酸化を介してアポトーシス、細胞増殖を制御する。我々はこれまで機能の分からなかったプロトオンコジントCL1がAKT キナーゼを活性化する「AKT活性化補助因子」であることを示し、ヒトT細胞芽球性白血病 (T-PLL) の分子学的な原因を明らかにした(*Mol. Cell* 2000; *J. Biol. Chem.* 2002; *Mol. Cell Biol.* 2002)。さらにAKT-TCL1複合体の結晶構造の解析し、AKT-TCL1複合体の構造と機能との関係を示し、私たちが同定したAKT特異的活性化阻害性剤ペプチドを同定した(*J. Biol. Chem* 2004; 特許出願 2003-416556、*Faseb J* 2007)。

プロトオンコジントCL1にはTCL1 bとMTCPIという3つのisoformが存在することが知られている。TCL1とTCL1 bの二つのisoformはヒトchromosome14.32に極めて近接に存在し、ヒトT-PLLにおいてともに、T細胞受容体プロモーター上流に転座、活性化される。また、TCL1遺伝子に関してはtransgenic miceが作成され、白血病が発症する。しかし、これまでにTCL1 b遺伝子のtransgenic miceは作成されていない。これらの理由のため、TCL1 bが生化学的にAKT活性化補助因子として機能しているかどうか、TCL1 bにより誘導される遺伝子群にはTCL1あるいは恒常活性型AKTとどのような類似性あるいは違いがあるかどうか、TCL1 bとAKTの活性化ならびに発がんなどの病態や機能との間に違いがあるかどうか、さらには多くのヒト悪性腫瘍においてどのように寄与しているかどうか。など不明な点が多く存在する。本年度の研究ではこれらの点についての解明を目指して検討を行った。

C. 研究結果

1. 哺乳動物過剰発現細胞を用いてプロトオンコジントCL1 bがAKTと免疫共沈法により結合することを生化学的に証明した。

2. 機能的にもプロトオンコジントCL1 bが哺乳動物細胞に過剰発現させたところ、細胞内におけるAKTの活性化を優位に上昇させることを証明した。

3. プロトオンコジントCL1 b、TCL1 あるいは恒常活性型AKT (Myr-AKT) を哺乳動物細胞に過剰発現させ、細胞由来のRNAを抽出し、DNA microarrayを用いたゲノムレベルでのBioinformaticsによる以下の解析を行った。

3-1. プロトオンコジントCL1 bは多変量解析により $Y(\text{TCL1b}) = 0.170 X_1 (\text{TCL1}) + 0.755 X_2 (\text{Myr-Akt}) - 0.165$ なる回帰式と $R=0.882$ ($p < 0.01$) という極めて高い相関係数にてTCL1 あるいは恒常活性型AKTと相関性を示すことが明らかとなった。

3-2. DNA マイクロアレイに基づいて施行したClusuter解析において、プロトオンコジントCL1 bはTCL1 あるいはMyr-AKT (恒常活性型AKT) と極めて類似した遺伝子群を変動 (誘導あるいは抑制) させることが明らかとなった。

3-3. KEGG pathway解析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/ja/>)は細胞レベルでの生命システムの機能に関する知識を、分子間相互作用ネットワーク (代謝、シグナル伝達、遺伝情報等) の二項関係に基づいた情報としてデータベース化し (PATHWAY)、たものである。このKEGG pathway解析法をもちいてプロトオンコジントCL1 b、TCL1、Myr-AKTによって誘導される遺伝子群を170を超えるKEGG pathwayの中でその類似性を比較したところ、TCL1 b、TCL1、Myr-AKTによって誘導 (誘導あるいは抑制) される遺伝子群も pathways in cancer, cytokine-cytokine receptor interaction, neuro-reactive ligand interaction, MAPK signaling pathway に含まれる遺伝子群を誘導することが

明らかとなった。

3-4. GO Slim (Gene ontology) を用いた機能分類解析は、発現変動遺伝子とマイクロアレイ上の全遺伝子群に対し、機能分類情報である GO Slim による規定される GO Term を個々に対応付けし、その該当遺伝子数の偏りを統計的に解析するものである。この GO Slim の主たる分類である molecular function, cellular component, or biological process の3種類の主たる機能分類に基づいて、プロトオンコジン TCL1 b は TCL1 あるいは Myr-AKT (恒常活性型 AKT) によって誘導される遺伝子群の該当遺伝子数の偏りを統計的に解析したところこれらのいずれにおいても極めて類似した属性パターンを呈することを明らかになった。

4. 生化学的、bioinformatics に基づき、TCL1 b は TCL1 あるいは Myr-AKT とその機能に類似性が強く示唆されることから、プロトオンコジン TCL1b の発がんに関する生物活性についての解析を行うこととした。まず *in vitro* における TCL1 b の発がん性 (形質転換能) を検証する目的で Soft agar transformation assay を行った。その結果、TCL1 b は TCL1 あるいは Myr-AKT (恒常活性型 AKT) 以上に高い NIH3T3 細胞を形質転換能 (癌化) する機能を持つことを明らかにした。

5. 次に *in vivo* における TCL1 b の発がん性を検証する目的で、その遺伝子を漸新世に発現する α -actin promoter を用い、プロトオンコジン TCL1 b を全身性に過剰発現する transgenic mice を作製した。これまで、TCL1 ならびに MTCPI 遺伝子に関しては主として免疫細胞系にこれらの遺伝子群を過剰発現する transgenic mice が作成され、いずれも免疫細胞主体の白血病様の病態を呈することが知られている。しかし、これまで、TCL1 b の transgenic mice は作成されておらず、また、TCL1 isoform の非免疫細胞での発がん性に関する検討は行われてこなかった。 β -actin promoter を用いた2つの独立したラインの transgenic mice でいずれも消化管由来の血管肉腫(angiosarcoma)を呈し、いずれのマウスも8か月で死亡した。免疫組織学的な検討では angiosarcoma としての特徴的な所見を示し、これらの組織は TCL1 b 陽性、VDGFR 陽性であった。

6. これまで、内在性のプロトオンコジン

TCL1b を免疫染色できる抗体は存在しなかった。そこで、我々はプロトオンコジン TCL1b を特異的に認識する polyclonal 抗体を作製した。ヒト血管肉腫(hemangiosarcoma)は高齢者の頭皮などに発症する極めて予後の悪い悪性腫瘍である。これまで、ヒト血管肉腫(hemangiosarcoma)の分子生物学的な発症機構はほとんど知られていない。我々はこの新規プロトオンコジン TCL1b 抗体を用いてヒト血管肉腫(hemangiosarcoma)由来組織を免疫染色したところ、4例中4例において抗 TCL1 b ならびに活性型 AKT が陽性に染色されることが明らかとなった。

7. プロトオンコジン TCL1 ならびにその isoform は免疫系細胞以外での病理的な意義に関してはこれまで全く知られていない。そこで我々はプロトオンコジン TCL1b のヒト悪性腫瘍一般における病態生理学的な意義を検討することにした。我々が作成した内在性のプロトオンコジン TCL1b を免疫染色できる抗体を用いて146の各種ヒト悪性腫瘍を含むヒト癌組織アレイ染色を行った。組織アレイに含まれる146例中69例(47%)において抗 TCL1b 抗体により陽性に染色されることが明らかとなった。さらにこれらプロトオンコジン TCL1 b 陽性の69例のがん組織のなかで、実に46例(67%)が活性型 AKT 染色において陽性の所見を示した。

D. 考察

プロトオンコジン TCL1 b は他の protooncogene TCL1 isoform と同様に AKT を活性化し、類似した遺伝子を誘導することが明らかとなった。また、これまで、TCL1 ファミリーのがん遺伝子は血液系の腫瘍のみを起こすことが推測されてきた。今回の研究により、プロトオンコジン TCL1 b は血液系の悪性腫瘍ばかりではなく、ヒト hemangiosarcoma をはじめ、各種上皮性由来の多くの悪性腫瘍において活性化されていることが明らかとなった。その結果、AKT を活性化し、ヒトの悪性腫瘍における各種の病態発現に関与している可能性が示唆された。これらの結果から、TCL1 b の発現がヒト各種悪性腫瘍における予後因子として機能している可能性もあるものと推測される。

E. 結論

プロトオンコジンTCL1 bはAKT活性化補助因子として機能し、ヒト血液系の腫瘍ばかりでなく様々なヒトのがんの病態や発症に参与していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

N.Hirata,H.ogura,M.Satoh,M.Noguchi ,M.Matamoto ,H.Togashi,K.Onoe,K.Iwabuchi,Y.Yanagawa: The role of tumor necrosis factor- α for interleukin-10 production by murine dendritic cells. *Cell Immunol.*,266,165-171 ; 2011

M. Noguchi & F. Suizu. Regulation of Akt by phosphorylation of distinct threonine and serine residues Threonine:Structure, Biosynthesis and Functions; Advances in Medicine and Biology.47 Nova Science Publishers, *New York. USA* 2011

2.学会発表

国際学会発表

M.Noguchi, : 「Characterization of protooncogene TCL 1b as an Akt kinase co-activator」 .

CSHL Meeting. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA 2011/10/12

M. Matsuda,F. Suizu,N. Hirata,T. Miyazaki,C. Obuse, M.Noguchi:

「Characterization of the interaction of influenza virus NS1 with Akt.」

国際微生物学連合 2011 会議 2011 年 9 月

北海道札幌市

M.Hashimoto, F. Suizu,M. Matsuda, N. Hirata, M. Noguchi :

「Characterization of protooncogene TCL1 b as an AKT Kinase co-activator」

The 3rd International Young Researcher Seminar 2011 年 9 月 北海道札幌市

国内学会発表

M.Hashimoto, F. Suizu,M. Matsuda, N. Hirata, M. Noguchi

「プロトオンコジン TCL1 b の AKT 活性化補助因子としての役割について」

第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日～16 日 神奈川県横浜市

M.Hashimoto, F.Suizu, M.Matsuda, N.Hirata, M.Noguchi :

「プロトオンコジン TCL1 b の生物機能解析」 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10

野口 昌幸 :

「インフルエンザウイルス感染症における感染宿主細胞の AKT とインフルエンザ NS1 蛋白結合の機能的解析」

第 85 回日本感染症学会総会 2011 年 4 月 21 日 東京

N.Hirata,Y.Yanagawa ,K.Iwabuchi ,M.Satoh ,H.Ogura,K.Onoe ,M.Noguchi :

「TNF- α drives IL-10 production in murine dendritic cells」 .

第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日～29 日 千葉県幕張市

