

201207004A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成25（2013）年 5月

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田哲司

平成25（2013）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

II. 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 13
金井弥栄
3. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 21
近藤格
4. 難治がんの創薬バイオマーカー探索研究 33
中山敬一
4. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究 42
黒光貞夫、鞍馬岳吏

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 49

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 創薬臨床研究分野 分野長

研究要旨

本研究では、5年間で肝細胞がん、肺がん、胃スキルスがん、膵がんなどの難治がんの新規治療標的分子、再発や転移、患者の予後や病態を診断するバイオマーカーを探索することを目的として、大規模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収集した。現在までにエクソソームを用いた低発現量遺伝子のプロファイル解析、蛍光二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析、次世代シーケンサーを用いたキナーゼ遺伝子の全エクソソームのシーケンス、逆相マイクロアレイ法、さらに siRNA ライブラリーを用いた網羅的な機能解析などの統合されたゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームの所謂オミックス解析を行ってきた。平成24年度には肝細胞がん50例のエクソソームデータより、治療候補となる分泌因子を抽出した。スキルス胃がん7株のRNAシーケンスより新規の融合遺伝子を同定した。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。ゲノム網羅的DNAメチル化解析による胃がんの予後診断マーカー、肝細胞がん発現が亢進するタンパク質、および門脈侵襲と相関するタンパク質を同定した。また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。さらには24年度には電気泳動法と質量分析法を用いて全長タンパク質の情報を保持したまま超高感度にタンパク質を定量的に比較解析する手法（PROTOMAP法）やPhospho-mTRAQ法を補完する方法論としてノンターゲット定量アプローチであるSWATH法を利用したPhospho-SWATH法を確立した。

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
分子病理分野・分野長

中山敬一

九州大学生体防御医学研究所・主幹教授

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・分野長

本田一文

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

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・分野長

浅村尚生

国立がん研究センター中央病院・副院長
呼吸器外科・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新規治療標的分子、再発や転移、患者の予後や病態を診断するバイオマーカーを見出すことを目的にゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームの手法を用いた多層オミックス解析を行った。

B. 研究方法

ゲノム解析

スキルス胃がん細胞 7 株 (HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, HSC60) の RNA のディープシーケンシング解析データを行った。

エピゲノム解析

胃がん 110 症例のがん部粘膜と非がん部粘膜からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA をバイサルファイト変換後、Infinium HumanMethylation27 Bead Array (イルミナ社) を用いて網羅的 DNA メチル化解析を施行した。

トランスクリプトーム解析

国立がんセンターで取得された肝細胞癌症例 50 例における腫瘍組織と非腫瘍組織より RNA を抽出し、Affymetrix 社のエキソアレイを用いた発現解析を行った。

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

ガラス基板上に 23 種類の肝細胞がん細胞株の lysate を高密度にスポットし、185 個のリン酸化部位特異的抗体でリン酸化タンパク質のプロファイリングを行った。

PROTOMAP 法

国立がんセンター中央病院にて手術を受けた肝細胞癌症例を対象とし、切除され保管されていた手術検体を使用した。電気泳動法 (SDS-PAGE 法) を用いて分子量にしたがってタンパク質を分画し、ペプチド断片としてタンパク質を回収し、質量分析法にてペプチドの精密質量を測定し、正常組織および肝細胞癌組織の比較を行った。

Phospho-SWATH 法

大量に精製したリン酸化ペプチドを対象に SWATH 法による測定と同条件で LC-MS/MS (データ依存分析) を行い、SWATH データを解析するためのリン酸化ペプチドライブラリーを構築した。次に、各種パラメーターを最適化することでリン酸化ペプチドの大規模定量に利用できるよう改善し、実際にリン酸化ペプチドの定量情報が取得できるか検証した。

(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

ゲノム解析

スキルス胃癌細胞株の RNA ディープシーケンシング解析データから 3 個の非キナーゼ融合変異遺伝子候補を抽出した。RT-PCR にて融合遺伝子の発現が確認された細胞株を用い、siRNA によるノックダウン試験を実施した結果、非キナーゼ融合変異遺伝子候補 X は、内在発現を示す HSC39 での機能検証実験より、当該細胞において腫瘍増殖ドライバーとして機能する可能性が示唆された。

エピゲノム解析

性・年齢・実験のバッチで補正したロジスティック検定において、3,877 プロブの DNA メチル化率について、ボンフェローニ補正 $\alpha = 3.78 \times 10^{-7}$ で、がん部粘膜と非がん部粘膜の β 値に有意な差異を認めた。3,877 プロブにおける非がん部の β 値を用いて胃がん症例の階層的クラスタリング (ワード法・ユークリッド距離) の結果、胃がん症例は前がん段階にある非がん胃粘膜における DNA メチル化プロファイに基づいて、クラスター A (20 症例)・B1 (20 症例)・B2 (70 症例) に分類された。このクラスター分類と、その症例に生じたがんの組織形は有意に相関し ($P=0.0196$)、クラスター B1

症例においては全生存率 (P=0.0318) ならびに無病生存率 (P=0.0403) がクラスターA・B2 症例に比して有意に低値であった。

各クラスター間でDNAメチル化状態に有意なかつ顕著なDNAメチル化率の差異を示す27遺伝子を同定した。同定した27遺伝子のそれぞれのDNAメチル化率は、腫瘍径・脈管侵襲・リンパ節転移・腹膜播種等の臨床病理学的因子等と有意に相関した。

トランスクリプトーム解析

肝細胞癌症例50例のエキソンアレイデータより分泌因子6個を選抜した。肝癌細胞16株における各分泌因子の発現をqPCRで確認し、高発現する株を特定した。これら細胞株でsiRNAを用い当該分子の発現を抑制したが、顕著な増殖抑制は認められなかった。

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、感受性と最も高い相関を示すリン酸化タンパク質として p-rpS6 S235/236 が同定された (スピアマン相関係数 0.5791, p=0.0044)。p-rpS6 S235/236 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、p-rpS6 S235/236 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た。p-rpS6 S235/236 抗体を用い、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 p-rpS6 S235/236 の強い陽性反応が認められた。

PROTOMAP 法

PROTOMAP法で得られた約1400種類のタンパク質データで正常組織、2種類の腫瘍組織 (門脈侵襲陽性と陰性の症例に由来) の比較を行った。その結果、門脈侵襲陽性症例の腫瘍組織で高発現あるいは低発現を示すタンパク質として、ある種の転写因子や細胞骨格等のタンパク質を同定した。また、正常組織との比較において、門脈侵襲陽性の腫瘍組織で特に発現異常を示すタンパク質として、転写因子およびその複合体因子、酵素、核酸結合タンパク質等を同定した。単に発現量が異なるだけでなく、門脈侵襲陽性症例において予想しなかった分子量にて、種々の転写因子が発現異常を来していることがわかった。

Phospho-SWATH 法

1) リン酸化ペプチドの高効率大規模同定
本方法をより効率的に行うためにゲル濾過や分取型 SDS-PAGE (Gelfree法) を用いてタンパク質レベルでの事前分画を行い、各分画を酵素消化後、リン酸化ペプチドを精製した。得られたリン酸化ペプチドに対して SWATH法での測定と同様のグラジエント条

件 (1 測定 120 min) でデータ依存分析を行った。また、各試料には既に開発している保持時間マーカーをスパイクすることで保持時間情報を元にしたピーク検出の精度向上を図った。得られたデータは MASCOT および ProteinPilot によるデータベース検索によってリン酸化ペプチドの配列を同定した。同定されたリン酸化ペプチドの情報は新たに作成した

Phospho-SWATH 用事前情報データベースに格納した。

2) Phospho-SWATH 法の実施

定量計測に用いるサンプルは少量のタンパク質量であることが本方法のメリットである。そこで 200 µg 相当の前細胞抽出液をメタノールクロロフォルム沈殿後、酵素消化し、得られた消化物を 100 l の IMAC ビーズを充填したチップカラムに導入し精製を行った。本チップカラムは C18 メンブランをフリットとして使用しているため、精製後、脱塩処理までを単一カラムで実施できるため微量検体の処理に向いている。得られたリン酸化ペプチドを SWATH 法によるデータ取得を行った。SWATH 法はグラジエント条件や SWATH の測定パラメーターを詳細に検討しより、効率よくリン酸化ペプチドの定量に適した条件を設定した。

リン酸化ペプチドデータベースから、任意のタンパク質のリン酸化ペプチドの情報をダウンロードして、PeakView (ABSciex の SWATH 解析用

ソフトウェア)に読み込ませることで SWATH データから目的リン酸化ペプチドの抽出クロマトグラムを得ることができた。検証実験として HeLa 細胞への EGF 刺激後のリン酸化の変化を追跡したところ、EGF 受容体や MAP キナーゼのリン酸化の経時変化を正確に捉えることに成功した。

D. 考察

シーケンシング解析

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。

エピゲノム解析

胃がん症例より得られた非がん胃粘膜における DNA メチル化プロファイルに基づくクラスター分類が、その症例に生じた胃がんの予後と有意に相関したことから、前がん段階において、その後に生じるがんの悪性度や症例の予後を規定する DNA メチル化プロファイルが既に成立していることが示唆された。今後、MassARRAY 法等、Infinium 解析とは異なるプラットフォームでの DNA メチル化率の技術的検証を行うとともに、検証コホート症例

において予後診断精度を検証することを予定している。

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

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。

PROTOMAP 法

このようなタンパク質は肝細胞癌の転移・再発に関わる可能性が高く、症例数を増やして検証した上で機能解析を実施する価値があると考えられる。肝細胞癌においては単なる発現量の異常だけではなく、分子量の変化を伴った異常を有するタンパク質が存在することわかった。PROTOMAP 法に使用する質量分析のデータからは切断の正確な配列はわからないことから、培養細胞を用いた機能解析のためにはN末端およびC末端を決定するための技術が必要である。

Phospho-SWATH 法

本年度は phospho-MRM 法の欠点を補完する手法として新たに phospho-SWATH 法を構築した。Phospho-SWATH 法は現

時点では内部標準を使用していないため、絶対定量は出来ていないが、MRM 測定メソッドを作成することなく簡便に定量情報の取得が可能であることが大きな利点である。また、リン酸化ペプチドの同定作業は事前に一度だけ大規模に行えば良く、量を得ることが困難な試料（臨床検体）に関してはモデル細胞（培養細胞）を用いて事前情報を取得しておけば、実際の検体に関しては少量で定量実施が可能となり、今後のバイオマーカー探索などへの応用に向けて大きなメリットがある。

E. 結論

スキルス胃癌細胞株において新規の非キナーゼ融合変異遺伝子候補 X を見出した。治療標的候補として更に全長のクローニング、腫瘍特異的な発現、癌化能の有無について検討を進める。

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

切除不能な進行肝細胞がんにおける唯一の分子標的治療薬であるソラフェニブの作用標的は、Raf、VEGFR、PDGFR、KIT、FLT-3、RET とされている。しかしながら、作用機序の詳細はいまだ不明であり、治療効果をあらかじめ予測できる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、独自に開発した逆相タンパクマイクロアレイ基盤と 180 のリン酸化部位特異抗体を用い、HCC 細胞株 23 株におけるシグナル伝達分子のリン酸化プロファイルを取得した。得られた結果とソラフェニブに対する感受性(IC50 値)の相関解析から、rpS6 の 235 と 236 番目のセリン残基のリン酸化(p-rpS6 S235/236)が、ソラフェニブに対する抵抗性予測マーカーとなる可能性を見出した。更に、ソラフェニブ投与前の HCC 患者由来生検試料を用いて、p-rpS6 S235/236 の発現を免疫組織染色法で検証した結果、ソラフェニブの効果の認められなかった患者において強い陽性反応が検出された。rpS6 は mTOR シグナル経路の下流分子であり、これまでしばしば mTOR シグナル活性化の代理マーカーとして使用されている。我々は、ソラフェニブ抵抗性の HCC 細胞株において、mTOR シグナル経路の恒常的活性化を検出し、mTOR 阻害剤が rpS6 S235/236 のリン酸化及び細胞増殖を抑制することを確認した。一方、ソラフェニブ抵抗性の一部の株では、mTOR シグナル活性化に加えて、ソラフェニブが標的とする RAF の下流に位置する MAPK シグナル経路 (MEK/ERK/RSK) に恒常的活性化が認められた。それらの細胞において、mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤の併用は、細胞増殖抑制効果を増強し、相乗的に機能することも明らかとなった。以上の結果から、p-rpS6 S235/236 の発現が高い HCC の場合、ソラフェニブに対し抵抗性である一方、mTOR 阻害剤単剤投与或いは、MAPK シグナル経路阻害剤との併用療法が有効となる可能性が示唆された。本研究結果は、HCC における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。

A. 研究目的

炎ウイルスの持続感染により発生する

肝細胞がんは B 型あるいは C 型の肝 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、経皮的ラジオ波焼灼療法、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、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- β 、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 ヶ月でおよそ 65 万円 (3 割負担で 19.5 万円) と非常に高額であり、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のが期待される。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、23 種類の肝細胞がん細胞株について、180 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) 免疫組織染色法による p-rpS6 発現の検討 : HCC 患者 9 症例のソラフェニブ投与前生検試料を p-rpS6 S235/236 抗体及び rpS6 S235/236 抗体を用いて、免疫組織染色法により染色を行った。

4) イムノブロット法による mTOR 及び MAPK シグナル経路分子群の活性化の検討 : ソラフェニブ感受性及び抵抗性細胞株を、様々な濃度のソラフェニブで 2 時間処理し、p-rpS6 S235/236、p-MEK、p-ERK、p-RSK、p-S6K に対する影響をイ

ムノブロット法で検証した。更に、高レベルの p-S6K が検出されたソラフェニブ抵抗性細胞株について、mTOR 阻害剤のエベロリムスで処理し p-rpS6 S235/236 シグナルへの影響を検討した。

5) mTOR 阻害剤及び MAPK シグナル経路阻害剤による増殖抑制効果の検討: ソラフェニブ抵抗性株を mTOR 阻害剤 AZD8055 で、或いは MEK 阻害剤 CI-1040 と共に処理し、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて増殖抑制効果を検討した。また、併用による相乗効果については Chou-Talalay median-dose effect 法をもとに CompuSyn software (<http://www.combosyn.com/>) を用いて判定を行った。

(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漏りするようにならな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

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、感受性と最も高い相関を示すリン酸化タンパク質として p-rpS6 S235/236 が同定された (スピアマン相関係数 0.5791, $p=0.0044$)。p-rpS6 S235/236 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、p-rpS6 S235/236 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た。興味深いことに、pS6 の 240 と 244 番目のセリン残基のリン酸化 (p-rpS6 S240/244, スピアマン相関係数 0.5524, $p=0.0070$) が第 2 位に、そして rpS6 のリン酸化キナーゼの一つである RSK2 のリン酸化が第 3 位の相関を示した。この結果は、rpS6 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。p-rpS6 S235/236 抗体を用い、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 p-rpS6 S235/236 の強い陽性反応が認められた。

rpS6 は mTOR シグナル経路の下流分子であり、これまでしばしば mTOR シグナル活性化の代理マーカーとして使用された経緯がある。そこで、我々は、ソラフェニブ感受性及び抵抗性の HCC 細胞株について、mTOR シグナル経路の下流分子であり、かつ rpS6 のリン酸化酵素である S6K の活性化をイムノブロット法により検討した。ソラフェニブ感受性株では p-S6K が殆ど検出されないのに対し、抵抗性株では高レベルの p-S6K が検出され、ソラフェニブ抵抗性株における mTOR シグナル経路の恒常的活性化が示唆された。更に、ソラフェニブ抵抗性株を mTOR 阻害剤で処理したところ、rpS6 S235/236 のリン酸化は抑制された。一方、細胞増殖アッセイでは、ソラフェ

ニブ抵抗性株はソラフェニブ感受性株に比べ、mTOR 阻害剤に感受性が高いことが明らかになった。

ソラフェニブ抵抗性株の一部の細胞では、ソラフェニブが標的とする RAF の下流にある MAPK シグナル経路 (MEK/ERK/RSK) において、ソラフェニブでは阻害不能なリン酸化が認められた。これらの細胞株では、mTOR シグナル活性化 (高レベル p-S6K1) に加えて、MAPK シグナル経路の恒常的な活性化も起きていると考えられる。実際に、これらの細胞を、mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤で処理したところ、併用により細胞増殖抑制効果を増強され、相乗的に機能することも明らかとなった。

D. 考察

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、ソラフェニブに対する抵抗性を予測するマーカー候補 p-rpS6S235/236 を見出した。現段階では、ソラフェニブによる治療を受けた HCC 患者 9 症例における検証であるが、がんが縮小し、27 か月の長期生存が認められた一例の治療前生検試料において、p-rpS6 は陰性反応を示した。今後、本マーカーの正確性の検証が多症例で必要と考える。

本研究結果より、p-rpS6 S235/236 の発現が高い HCC の場合、ソラフェニブに対し抵抗性であることが予測されるが、mTOR シグナル経路の活性化も同時に予測されるため mTOR 阻害剤が有効である可能性が高い。また、ソラ

フェニブ抵抗性細胞株の一部では、mTOR シグナル経路の活性化に加えソラフェニブでは抑制できない MAPK シグナル経路の恒常的活性化も起きおり、MEK 阻害剤等、MAPK シグナル経路阻害剤との併療法が有効である可能性が示唆された。実際に、細胞株では、mTOR 阻害剤と MEK 阻害剤の併用による増殖抑制効果の増強と相乗効果が確認できているため、臨床応用へ可能性も考えられる。

E. 結論

我々が見出したソラフェニブに対する抵抗性を予測するマーカー候補 p-rpS6S235/236 は、抵抗性の患者を選択できるだけではなく、抵抗性の患者に有効な治療を提示できる可能性がある。

本研結果は、肝細胞がんにおいて、分子標的治療薬の選択を可能とする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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushima S, Yoshida A, Honda K, Maeshima AM, Narita Y, Yamada T, Shibui S, Tsuda H.

Immunohistochemical actinin-4 expression in infiltrating gliomas: association with WHO grade and differentiation.

Brain Tumor Pathol. 2013

2. Yoneyama T, Ohtsuki S, Ono M, Ohmine K, Uchida Y, Yamada T, Tachikawa M, Terasaki T.

- Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated α -fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J Proteome Res.* 1;12(2):753-62, 2013
- 3. Honda K, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura N, Yamada T.** Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn J Clin Oncol.* 43(2):103-9. 2013
- 4. Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Imada K, Oda Y, Kamita M, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M.** Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol.* 2012:768190, 2012
- 5. Honda K, Okusaka T, Felix K, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Tsuchida A, Shimahara T, Shimahara M, Yasunami Y, Kuwabara H, Sakuma T, Otsuka Y, Ota N, Shitashige M, Kosuge T, Büchler MW, Yamada T.** Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer: protein characterization and multi-institutional validation. *PLoS One.* 7(10):e46908, 2012
- 6. Ono M, Kamita M, Murakoshi Y, Matsubara J, Honda K, Miho B, Sakuma T, Yamada T.** Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL: 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Int J Proteomics.* 2012;2012:897412, 2012.
- 7. Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, Nakamura Y, Yoshida M, Kamino H, Murai R, Yamada T, Arakawa H.** Identification of 14-3-3 γ as a MIEAP-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Sci Rep.* 2012;2:379, 2012.
- 8. 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.* 60(7):1073-83. 2012
- 9. Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y, Tokino T.** CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 13;287(16):12975-84.2012
- 10. 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

11. **Kashima L, Idogawa M, Mita H, Shitashige M, Yamada T, Ogi K, Suzuki H, Toyota M, Ariga H, Sasaki Y, Tokino T.**

CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation.

J Biol Chem. 2287(16):12975-84, 2012

2. 学会発表

1: **Masuda M**

Identification of Phosphorylated Ribosomal Protein S6 as a Potential Predictor of Hepatocellular Carcinoma Response to Sorafenib by Pathway-based Phosphoprotein Profiling

The 3rd JCR-AACR Special Joint Conference; The latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics.

Busan, Korea. Nov.30 - Dec. 2, 2011.

2: **Masuda M, Honda K, Yamada T.**

Identification of a Potential Predictor of Hepatocellular Carcinoma Response to Sorafenib by Pathway-based Phosphoprotein Profiling

2nd RPPA Global Workshop

Edinburgh, Scotland. Nov. 12-13, 2012.

3: **Masuda M, Honda K, Yamada T.**

Identification of Phosphorylated Ribosomal Protein S6 as a Potential Predictor of Hepatocellular Carcinoma Response to Sorafenib by Pathway-based Phosphoprotein

Profiling

The 8th Annual Symposium of Bioinformatics and Systems Biology in Taiwan.

Viena, Austria. Sep. 28 – Oct. 2, 2012

4: **Tesshi Yamada, Reiko Satow, Mari Masuda, Kazufumi Honda**

Integrated Genomic Approaches to Therapeutic Target Identification for Hepatocellular Carcinoma

Viena, Austria. Sep. 28 – Oct. 2, 2012

5: **Mari Masuda, Kazufumi Honda and Tesshi Yamada**

Phosphoproteomics with Reverse-Phase Protein Arrays (RPPA): Identification of a Potential Response Predictor to Sorafenib *71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.*

Sapporo, Sep 19-21, 2012.

6. 増田万里、本田一文、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10回日本プロテオーム学会2012年会
東京、2012年7月26-27日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- カルナバイオサイエンスへ RPPA 法の技術移転(2012年3月)

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胃がんの予後診断マーカー開発を行った。

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. 胃がん予後診断マーカー開発: 胃がん 110 症例に対する胃全摘術あるいは亜全摘術標本より、病理診断に支障を来さない部位より、がん部粘膜 110 検体と、同一症例の非がん部粘膜 110 検体（合計 220 検体）を採取した。対象症例の組織型は、「胃癌取り扱い規約（第 7 版）」によると pap 3 例/tub1 18 例/tub2 36 例/por1 10 例/por2 29 例/sig 11 例・muc 3 例であった。対象症例においては、診療録の閲覧等により、詳細に予後を把握した。全検体からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA をバイサルファイト変換後、Infinium HumanMethylation27 Bead Array（イルミナ社）を用いて網羅的 DNA メチル化解析を施行した。同アレイは、既知のがん関連遺伝子を網羅して miRNA 遺伝子等のプロモーター領域も含む高密度ビーズチップで、27,578 の CpG 部位を 1 塩基解像度で解析することができる。各 CpG 部位の DNA メチル化率は、平均 β 値（0.0 ないし 1.0）として表わされる。

（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

Infinium 解析において、検出 P 値 0.01 未満を持って有効な解析と判断したところ、全 220 検体において 26,000 プローブ以上の β 値が得られ、イルミナ社の基準による適切な解析と見なされた。本検討で、Infinium アレイの 71 プローブにおいてはコール率が全検体の 90%未満であった。これら 71 プローブが、多型部位に設計されている可能性が考慮された（実際に日本人において遺伝子多型が知られている遺伝子を多く含んでいた）ので、以後の解析からこの 71 プローブを排除した。性染色体上のプローブも以後の解析から排除し、26,415 プローブを用いて以後の解析を施行した。

性・年齢・実験のバッチで補正したロジスティック検定において、3,877 プローブの DNA メチル化率について、ボンフェローニ補正 $\alpha = 3.78 \times 10^{-7}$ で、がん部粘膜と非がん部粘膜の β 値に有意な差異を認めた。我々は従来、諸臓器の炎症等を伴う前がん段階において DNA メチル化異常が既に蓄積していることを報告している。また、ヘリコバクター感染や慢性炎症を伴う胃がん症例より得られた非

がん胃粘膜は、前がん段階にあると理解される。そこで、3,877プローブにおける非がん部の β 値を用いて胃がん症例の階層的クラスタリング（ワード法・ユークリッド距離）を施行した。全症例は、非がん胃粘膜におけるDNAメチル化プロファイルに基づいて、クラスターA（20症例）・B1（20症例）・B2（70症例）に分類された。前がん段階にある胃がん粘膜のDNAメチル化プロファイルに基づくクラスター分類と、その症例に生じたがんの組織形は有意に相関し（ $P=0.0196$ ）、クラスターB1症例においては全生存率（ $P=0.0318$ ）ならびに無病生存率（ $P=0.0403$ ）がクラスターA・B2症例に比して有意に低値であった。

各クラスター間でDNAメチル化状態に有意なかつ顕著なDNAメチル化率の差異を示すプローブに着目し、前がん段階におけるDNAメチル化プロファイルを特徴付ける27遺伝子を同定した。同定した27遺伝子のそれぞれのDNAメチル化率は、腫瘍径・脈管侵襲・リンパ節転移・腹膜播種等の臨床病理学的因子等と有意に相関した。そこで、受信者動作特性曲線（receiver operating characteristic: ROC）解析により、曲線下面積（area under the curve: AUC）0.9以上のプローブを抽出し、抽出した遺伝子のDNAメチル化率を用いた予後診断指標の策定を試みている。

D. 考察

胃がん症例より得られた非がん胃粘膜におけるDNAメチル化プロファイルに基づくクラスター分類が、その症例に生じ

た胃がんの予後と有意に相関したことから、前がん段階において、その後に生じるがんの悪性度や症例の予後を規定するDNAメチル化プロファイルが既に成立していることが示唆された。諸臓器における我々の従来の検討では、前がん段階でDNAメチル化状態が既に変化し、その変化ががんに継承されるあるいはがんにおいてさらに亢進する遺伝子は、しばしばよい予後診断マーカーとなった。他方では、特に前がん段階における胃粘膜においては、浸潤炎症性細胞混入の影響が他臓器の組織検体に比して大きく、炎症に依存し発がんには寄与しないDNAメチル化の変化が存在する可能性等も憂慮された。そこで本研究では、各クラスター間で特に顕著なDNAメチル化率の差異を示すプローブにのみ着目した。これにより、予後診断マーカーとなる遺伝子を効率的に抽出し得た。

今後、MassARRAY法等、Infinium解析とは異なるプラットフォームでのDNAメチル化率の技術的検証を行うとともに、検証コホート症例において予後診断精度を検証することを予定している。

E. 結論

前がん段階において、その後に生じるがんの悪性度や症例の予後を規定するDNAメチル化プロファイルが既に成立していることが示唆された。発がん過程で起こったDNAメチル化異常は、維持メチル化機構によりDNA2重鎖上に共有結合で安定に保持されるため、診断指標としての再現性が高く、バイオマーカーとして概して優れていると考えられる。エピゲ

ノム診断指標を実用化することで、進行胃がん症例においても予後診断を行うと期待される。

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: Tollesbol T (ed), Epigenetics in Human Disease. Elsevier, Amsterdam, p29-52, 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* 33: 1487-1493, 2012.
3. 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: E12-18, 2012.
4. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu YT, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagawa H, Toyokuni S. Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. *PLoS One* 7: e43403, 2012.
5. 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.
6. 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.
7. Nakagawa T, Kanai Y, Nakanishi H, Komiyama M, Fujimoto H. Characteristics of lymph node metastases defining the outcome after radical cystectomy of urothelial bladder carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 42: 1066-1072, 2012.
8. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Nishimura R, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: morphological

- significance of calponin h1. *FEBS Lett* 586: 1824-1831, 2012.
9. 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* 103: 1051-1057, 2012.
 10. Tateno Y, Esaki M, Shimada K, Ojima H, Kanai Y, Hiraoka N. Morules in intraductal papillary mucinous neoplasm with an associated invasive carcinoma of the pancreas. *Pancreas* 41: 651-652, 2012.
 11. 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* 228: 113-118, 2012.
 12. 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* 18: 207-213, 2013.
 13. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T, Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PLoS One* 8: e59444, 2013.
 14. Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, Kushima R, Hiraoka N, Tsuta K, Tsuda H, Kanai Y. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous neoplasms. *Br J Cancer* 108:951-958, 2013.
 15. Matsubara A, Sekine S, Yoshida M, Yoshida A, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kanai Y. Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumors. *Histopathology* 62: 657-661, 2013.
 16. Matsubara A, Sekine S, Kushima R, Ogawa R, Taniguchi H, Tsuda H, Kanai Y. Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum. *J Pathol* 229: 579-587, 2013.
 17. Nakagawa T, Hara T, Kawahara T, Ogata Y, Nakanishi H, Komiyama M, Arai E, Kanai Y, Fujimoto H. Prognostic risk stratification of patients with urothelial carcinoma of the bladder with recurrence after radical cystectomy. *J Urol* 189:1275-1281. 2013.
 18. Hara T, Nakanishi H, Nakagawa T, Komiyama M, Kawahara T, Manabe T, Miyake M, Arai E, Kanai Y, Fujimoto H. Ability of preoperative 3.0-Tesla magnetic resonance imaging to predict the absence of side-specific extracapsular extension of prostate cancer. *Int J Urol*, in press, 2013.
 19. Oguro S, Shimada S, Ino Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma. *Am J Surg Pathol*, in press, 2013.