

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

クリニカルプロテオミクス解析を基盤とする肺がんの分子病態の解明と  
革新的分子標的治療の開発

業務主任者 高橋隆 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

要旨

クリニカルプロテオミクス解析を基盤とする肺がんの分子病態の解明と、我々が同定した新規分子標的 CLCP1 に対する革新的分子標的治療の開発を目指した研究を展開し、以下の成果を得た。高転移性ヒト肺癌細胞株 LNM35 と低転移性親株 N15 株を用いた網羅的なタンパク質発現の定量比較解析を通じて、385 種類の発現差を認めるタンパク質を同定した。外科切除を受けた非小細胞肺癌患者 173 症例の網羅的タンパク質発現解析データセットをもとに、術後再発危険性との関連性のランク付けを行い、非小細胞肺癌の生物学的な悪性度への関連性の高い 514 種類のタンパク質を抽出した。両者のデータの統合的解析によって、非小細胞肺癌の浸潤・転移の過程における機能的な関与と、非小細胞肺癌患者における臨床病態の双方に関連する、18 種類の新たな分子標的候補を同定し、がん転移抑制法の開発に資する標的分子の同定につなげるべく、順次実験的な検証を進めつつある。

がん細胞における CLCP1 の高発現が、アノキスの抑制を介して、がん細胞の特徴である足場非依存性増殖に役割を担っていることを示唆する結果を得た。また、CLCP1 の細胞内ドメイン結合分子として、paxillin と p130CAS を同定し、CLCP1 によるアノキス抑制の分子機序解明へ向けた手掛かりを得た。また、高親和性抗 CLCP1 抗体 FA19-1 への曝露による、EGFR の発現量とリン酸化の減少を明らかとした。さらに、CLCP1 が EGFR とのヘテロ二量体とともに CLCP1 自身のホモ二量体を形成しており、両者が FA19-1 抗体への曝露によって促進されることを明らかとした。分子機序の全貌解明を目指し、検討を進めつつある。

**業務項目担当責任者**

柳澤聖 名古屋大学大学院医学系研究

**科・講師**

長田啓隆 愛知県がんセンター研究所分子

## A．研究目的

肺がんは代表的難治がんであり、本態解明と革新的な分子標的の探索・同定が希求されている。本研究の目的は、詳細な臨床情報の付帯する肺がん腫瘍組織の定量的プロテオミクス解析を通じて得たクリニカルプロテオミクス解析データを活用し、高転移性 LNM35 株と低転移性親株 N15 株のプロテオミクス解析データと統合的に検討を加えることによって、肺がんの分子病態形成、とくに浸潤・転移の分子機構の本態に迫るとともに、革新的な治療法の開発に向けた新規分子標的の探索・同定を進めることにある。

また、我々が同定した分子標的 CLCP1 を対象として、プロテオミクス解析技術を応用しつつ、その増殖・浸潤・転移における役割と分子機序の解明、及び、抗 CLCP1 抗体を用いた革新的な新規治療法の開発に道を拓くための情報を得ることを目的とする。

## B．研究方法

### 1) クリニカルプロテオミクス解析にもとづく難治がんの病態解明と新規分子標的の探索・同定

我々が樹立した高転移細胞株 NCI-H460-LNM35 (以下、LNM35) 株と低転移親株 NCI-H460-N15 (以下、N15) 株から抽出したタンパク質試料をトリプシン消化後に、iTRAQ 試薬による標識を行った。標識ペプチド試料を混合し、高速ナノ液体クロマトグラフィーと質量分析装置を用いた網羅的タンパク質発現解析を行った。また、クリニカルプロテオミクス解析において得られた網羅的なタンパク質発現定量解析のデータを用いて、タンパク質の発現量と肺がん患者の臨床病態と関連するタン

パク質群の絞り込みを行った。さらに、両者の解析で得られた知見を統合し、肺がんの浸潤・転移の過程への機能的な関与と、肺がん患者における臨床病態の双方に関連する、新規分子標的候補の探索を進めた。

### 2) CLCP1 を分子標的とする難治がんの診断・治療法への応用

肺がん細胞株において CLCP1 をノックダウン後にソフトアガーに撒き、足場非依存性増殖能を検討した。細胞死誘導は、ミトコンドリア膜電位差が低下すると赤色蛍光から緑色蛍光へと変化する JC-1 と、死細胞を染色する propidium iodide (PI) を用いて検討した。また、野生型 或いは、siRNA 結合部位に silent 変異を持つ siRNA 抵抗性の CLCP1 発現レンチウイルスの導入によるレスキュー実験を行った。CLCP1 と細胞接着に關与するインテグリン複合体の細胞内分子群との結合は、両者を 293T 細胞に導入し、免疫沈降-ウェスタンブロット (IP-WB) 法によって検討した。また、HA タグを付加した CLCP1 細胞内ドメインの発現ベクター (CLCP1-IC-HA) を 293T に導入し、抗 HA 抗体で免疫沈降して共沈降産物を銀染色によって検討した。

肺がん細胞株 PC9 を高親和性抗 CLCP1 抗体 FA19-1 (MBL 社より供与) に暴露した際に惹起される CLCP1 及び EGFR シグナルへの影響、及び、CLCP1-RTK ヘテロ複合体について検討を加えた。また、異なるタグを付加した CLCP1 発現コンストラクト (CLCP1-HA 及び CLCP1-myc)、或いは CLCP1-HA タグと V5 タグを付加した EGFR (EGFR-V5) の組み合わせを 293T 細胞に導入し、FA19-1/CLCP1 抗体に暴露した。その後、抗 HA タグ抗体或いは抗 V5 タグ抗体を結合したマグネットビーズを用いて免疫沈降し、抗 myc タグ抗体或いは抗 HA タグ抗体による WB 解析を行った。

### 3) プロジェクトの総合推進

高橋が研究全体を統括し、柳澤がプロテオ

ミクス解析を、柳澤・長田・高橋が分子細胞生物学的及び生化学的解析を、高橋と中柄がバイオインフォマティクス解析を担当する。プロジェクトの円滑かつ効率的な推進を図るべく、高橋を中心に随時研究進捗情報を交換し、密接な相互協力のもとに推進する。

### **(倫理面への配慮)**

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い、研究試料提供者の人権及び利益に十分配慮して、倫理審査委員会の承認を得た上で進めた。また、動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施した。

## **C . 研究結果**

### **1) クリニカルプロテオミクス解析にもとづく難治がんの病態解明と新規分子標的の探索・同定**

がん転移の制御につながる新規機能分子の同定を目指して、高転移性 LNM35 株と低転移性亜株 N15 株を用いた網羅的タンパク質発現定量比較解析を行った。その結果、両細胞株において約 3,700 種類のたんぱく質の発現を検出し、発現差を認めるタンパク質として 385 種類を同定した。最長術後 9 年間のフォローアップが完了している、外科切除を受けた非小細胞肺癌患者 173 症例から得られた、網羅的タンパク質発現プロファイルから臨床病態(術後再発の有無)を予測する判別モデルの構築過程において構築された、29,000 種類の判別モデルを構成したタンパク質を全てリスト化した。さらに、その出現頻度によって非小細胞肺癌の術後再発危険性との関連度のランク付けを行い、非小細胞肺癌の生物学的な悪性度への関連性の高いタンパク質として、514 種類のタンパク質を抽出した。

これら 514 種類の非小細胞肺癌の生物学

的な悪性度に関連するタンパク質群と、上述した高転移性ヒト非小細胞肺癌細胞株のモデル系における転移能の獲得に関連するタンパク質群との間で比較検討を進めて、両群に共通する 18 種類のタンパク質を同定した。

### **2) CLCP1 を分子標的とする難治がんの診断・治療法への応用**

足場非依存性増殖を示す高転移性 LNM35 株において、CLCP1 をノックダウンしソフトアガー中の足場非接着状態に保ち、Hoechst33342 と PI で染色したところ、PI で染色される死細胞が有意に増加し、アノキスの誘導が観察された。また、A549 株の JC-1 を用いた解析において、CLCP1 のノックダウンは、ミトコンドリア膜の電位差の低下による赤色蛍光の緑色蛍光への変化を惹起した。同時に、PI で染色される死細胞(アノキス)が増加した。さらに、これらの現象が siRNA 抵抗性 CLCP1 の導入によって著明に抑制できることを確認し、CLCP1 発現低下によって特異的に惹起されたことを確認した。また、CLCP1 の細胞内ドメインに結合する分子群の探索を進めて、CLCP1 が、細胞接着斑においてインテグリンと複合体を形成する paxillin 及び p130CAS(BCAR1) と結合することを明らかとした。さらに、HA タグを付加した CLCP1 細胞内ドメインをベイトにプルダウンし、プロテオミクス解析を適用した網羅的な CLCP1 結合タンパクの探索を開始した。

抗 CLCP1 抗体 FA19-1 への暴露が RTK に及ぼす作用について、EGFR 変異を持つ肺癌細胞株 PC9 を用いて検討を行い、以下の結果を得た。FA19-1 抗体に暴露開始 6 時間後をピークとした、EGFR の発現低下とリン酸化の低下が観察されるとともに、CLCP1 と RTK との複合体形成の動態の検討では、CLCP1 と EGFR の恒常的結合と、FA19-1 抗体への暴露による複合体形成の促進が観察された。

また、CLCP1 のホモ複合体形成について IP-WB 解析による検討を加えた結果、CLCP1 が RTK との複合体形成に加えて、恒常的に CLCP1 がホモ二量体(或いは多量体)を形成していることが確認された。興味深いことに、FA19-1 抗体への暴露により、とくに 140kDa の CLCP1 分子のホモ二量体形成が促進された。

### 3) プロジェクトの総合推進

研究開発の円滑かつ効率的な推進を図るために、随時研究進捗情報を交換しつつ、密接な相互協力のもとに進めるべく、高橋が中心となって本研究計画の全体を統括した。その結果、柳澤を中心とするクリニカルプロテオミクス解析にもとづく難治がんの病態解明と新規分子標的の探索・同定と、長田を中心とする CLCP1 を分子標的とする難治がんの診断・治療法への応用を目指した研究開発を、技術的支援以外にも相互に密接に協力しつつ効率的に推進した結果、多くの成果を得ることができた。

### D. 考察

非小細胞肺がんの病態と有意に関連する 514 種類のタンパク質を同定したが、これらの分子群には、肺がん細胞における運動・浸潤・転移能の獲得と機能的には関連しないものが多数含まれている可能性が高い。そこで、臨床試料と転移モデル系から取得された情報を統合的に評価するべく、我々が樹立した転移能の異なるヒト肺がん細胞株(LNM35 株及び N15 株)間で発現差の異なる分子群の探索を進めて、運動・浸潤・転移との機能的関連性を有するタンパク質群が濃縮されて含まれると期待される 385 種類のタンパク質群を同定した。最終的に 18 種類のタンパク質を、臨床病態の形成に機能的に関与し得る候補分子として同定した。これらの候補分子群には、キナーゼや代謝・遊走

能制御及び、翻訳後修飾・輸送に関わる蛋白群等が含まれ、機能的に重要な分子標的である可能性が示唆される。十分に実験的な検証の遂行が可能にまで絞り込むことができたので、これらの分子について、肺癌細胞の運動・浸潤・転移能の獲得への機能的な関与に関する LNM35 株と N15 株を用いた実験的検証を開始した。

我々が同定した新規分子標的 CLCP1 に関する本年度の研究成果は、がん細胞における CLCP1 の高発現が、アノキスの抑制を介して、がん細胞の重要な細胞生物学的特徴である足場非依存性増殖に役割を担っていることを示唆している。CLCP1 のシグナリングに関わる細胞内ドメインに結合する分子として、paxillin と p130CAS を同定したことは、CLCP1 によるアノキス抑制のシグナリング経路の解明に重要な手掛かりとなるものと期待される。現在鋭意遂行中の CLCP1 の細胞内ドメインに結合する分子群の網羅的探索とともに、さらなる検討を進めていく予定である。

また、抗 CLCP1 抗体 FA19-1 への曝露によって、EGFR の発現量とリン酸化の低下が観察された。両者の時系列的な動態は良く一致しており、FA19-1 抗体への曝露によって EGFR が内在化して分解されたことによる、リン酸化型 EGFR の存在量の低下と考えられる。さらに、CLCP1 が、RTK とのヘテロ二量体とともに CLCP1 自身のホモ二量体を形成しており、両者が FA19-1 抗体への曝露によって促進されることも明らかとなった。今後さらに、FA19-1 抗体への曝露下で見られるこれらの現象の分子機序を明らかとて行きたい。

### E. 結論

非小細胞肺がんの浸潤・転移の過程における機能的な関与と、非小細胞肺がん患者における臨床病態の双方に関連する、新たな分子標的の

候補の 18 種類のタンパク質について、今後順次実験的な検証を進めて、がん転移抑制法の開発に資する標的分子の同定につなげることを目指していく。

CLCP1 が、足場非接着により誘導されるアノイキスの抑制に関わっていることが明らかとなったので、今後その分子機序について、CLCP1 と結合する細胞内分子の同定を通じて明らかにしていく。抗 CLCP1 抗体 FA19-1 への暴露によって、EGFR の発現低下が惹起されることを明らかとなった。今後さらに、本年度に見出した、FA19-1 抗体による CLCP1 のホモ及びヘテロ二量体(或いは多量体)形成の促進との機能的関連性を中心により詳細な検討を行っていくとともに、マウス移植腫瘍を用いた増殖抑制等についても検討を進める予定である。

## F . 健康危険情報

該当する事由なし

## G . 研究発表

### 1 ) 論文発表

1. Arima C, Kajino T, Tamada Y, Imoto S, Shimada Y, Nakatochi M, Suzuki M, Isomura H, Yatabe Y, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Miyano S, Takahashi T. Lung adenocarcinoma subtypes definable by lung development-related miRNA expression profiles in association with clinicopathologic features. *Carcinogenesis* 35: 2224-2231, 2014.
2. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene* 34: 73-83, 2015.
3. Chew SH, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, Toyokuni S. Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis* 35:164-172, 2014.
4. Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, Sun R, Menon R, Leenders F, Ortiz-Cuaran S, Peifer M, Bos M, Daßler J, Malchers F, Schöttle J, Vogel W, Dahmen I, Koker M, Ullrich RT, Wright GM, Russell PA, Wainer Z, Solomon B, Brambilla E, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brambilla CG, Lantuejoul S, Altmüller J, Becker C, Nürnberg P, Heuckmann JM, Stoelben E, Petersen I, Clement JH, Sänger J, Muscarella LA, Ia Torre A, Fazio VM, Lahortiga I, Perera T, Ogata S, Parade M, Brehmer D, Vingron M, Heukamp LC, Buettner R, Zander T, Wolf J, Perner S, Ansén S, Haas SA, Yatabe Y, Thomas RK. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 4: 415-22, 2014.
5. Jiang L, Yamashita Y, Chew SH, Akatsuka S, Ukai S, Wang S, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, Toyokuni S. Connective tissue growth factor and -catenin constitute an autocrine loop for activation in rat sarcomatoid mesothelioma. *J Pathol.* 233:402-414, 2014.

6. Shinjo K, Yamashita Y, Yamamoto E, Akatsuka S, Uno N, Kamiya A, Niimi K, Sakaguchi Y, Nagasaka T, Takahashi T, Shibata K, Kajiyama H, Kikkawa F, Toyokuni S. Expression of chromobox homolog 7 (CBX7) is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via TRAIL-induced apoptotic pathway regulation. *Int J Cancer*. 135:308-318, 2014.
  7. Younes M, Wu Z, Dupouy S, Lupo AM, Mourra N, Takahashi T, Flejou JF, Tredaniel J, Regnard JF, Damotte D, Alifano M, Forgez P. Neurotensin (NTS) and its receptor (NTSR1) causes EGFR, HER2 and HER3 over-expression and their autocrine/paracrine activation in lung tumors, confirming responsiveness to erlotinib. *Oncotarget* 5:8252-8269, 2014.
  8. Watari K, Shibata T, Kawahara A, Sata K, Nabeshima H, Shinoda A, Abe H, Azuma K, Murakami Y, Izumi H, Takahashi T, Kage M, Kuwano M, Ono M. Tumor-derived Interleukin-1 promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis through M2-type macrophages. *PLoS ONE* 9:e999568, 2014.
  9. Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 83: 23-9, 2014.
  10. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterol*. 146: 562-72, 2014.
- 2) 学会発表
1. Takahashi T. ROR1, a transcriptional target of TTF-1/NKX2-1 oncogene, sustains lineage-survival signaling in lung adenocarcinoma. 14th Japanese-German Workshop. Berlin, Germany. 2014年11月14日-16日.
  2. Yanagisawa K, Kawahara T, Ozawa Y, Hotta N, Nagino M, Takahashi T: Proteomic analyses for biomarker discovery in human pancreatic cancer. 13th Annual World Congress of the Human Proteome Organization (ポスタ) Madrid, Spain. 2014年10月5日-8日.
  3. Takahashi T. Elucidation of transcriptional regulatory circuitry involved in the molecular pathogenesis of lung cancer. 第73回日本癌学会学術総会(シンポジウム) 横浜、2014年9月25日-27日.
  4. Yanagisawa K, Kato S, Hotta N, Nakamura S, and Takahashi T: CKAP4 confers resistance to amino acid insufficiency through sequestration of GCN2 in malignant pulmonary mesothelioma. 第73回日本癌学会学術総会(口演) 横浜、2014年9月25日-27日.
  5. Osada H, Yanagisawa K, Tatematsu Y, Sekido Y, Takahashi T. CRISPR-Cas9-derived Knockout of CLCP1

gene revealed its functional role in lung cancer progression. 第73回日本癌学会学術総会(口演)、横浜、2014年9月25日-27日.

6. 長田啓隆、柳澤聖、立松義朗、谷田部恭、小野健一郎、関戸好孝、高橋隆。Genome editing を用いた転移関連遺伝子 CLCP1 の機能解析。第37回日本分子生物学会年会(ポスター)、横浜、2014年11月25日-27日

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし