

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（業務項目）

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

担当責任者 柳澤聖 名古屋大学大学院医学系研究科 講師

要旨

詳細な臨床情報の付帯した非小細胞肺癌腫瘍組織のクリニカルプロテオミクス解析データを基盤としたリバーストランスクリプションを推進することを目的として研究開発を進めた。質量分析技術とペプチド標識技術を用いて、173 例の非小細胞肺癌腫瘍組織のクリニカルプロテオミクス解析を極めて深い解析深度で遂行して取得された、約 10,000 種類のタンパク質に関する定量的な発現情報をもとに、詳細な臨床情報を最大限に活用したバイオインフォマティクス解析を推進した。その結果、肺癌患者の臨床病態と有意な関連性を示すタンパク質として 514 種類を同定した。一方、我々が樹立した高転移性ヒト非小細胞肺癌株 NCI-H460-LNM35 株と低転移性親株 NCI-H460-N15 株を用い、同様に極めて深い解析深度で網羅的な定量タンパク質発現解析を遂行して、3000 種類以上のタンパク質に関する発現情報を取得した。その中から、機能的に肺癌細胞の運動・浸潤・転移能の獲得に関連するタンパク質が濃縮している一群として、両細胞株間における発現量に 2 倍以上の差を認める 385 種類の蛋白質を同定した。上記のクリニカルプロテオミクス解析のデータと統合的に検討することによって、肺癌の浸潤・転移の過程における機能的な関与と、肺癌患者における臨床病態の双方に関連しており、その重要性が強く示唆される候補分子を 18 種類にまで絞り込んだ。現在、非小細胞肺癌細胞株を用いて浸潤・転移等の非小細胞肺癌悪性化の分子機序を裏打ちする、新たな分子標的候補の同定へ向けて機能解析を進めつつある。

A . 研究目的

肺癌は我が国を含む先進諸国におけるがん死亡原因の第一位を占める代表的な難治がんであり、この 20 年間治療成績の向上が認められない、典型的な難治がんと言える。肺癌

による原病死を引き起こす病態は、がん細胞の浸潤・転移の結果生じる多臓器不全によるものである。したがって、浸潤・転移の分子機構の解明とその機序に基づいた革新的な診断・治療法の開発は、この難治がんを克服するための喫

緊の課題と考えられる。

我々は、長年に渡って詳細な臨床情報とともに収集・蓄積してきた肺がん腫瘍組織試料を最大限に活用して、バイオマーカーの探索・同定を極めて深い解析深度のクリニカルプロテオミクス研究を通じて進め、新規分子診断法の樹立を目指してきた。また、ヒト肺がん細胞の浸潤・転移に関わる分子機構の研究に資するべく、極めて安定した高い血行性及びリンパ行性転移能を示すヒト非小細胞肺がん細胞株（NCI-H460-LNM35 株。以下 LNM35 株）の樹立に成功している。そこで、本研究においては、LNM35 株を、その低転移性親株（NCI-H460-N15 株。以下 N15 株）とともに、上述のクリニカルプロテオミクス解析と同様の深い解析深度を進めて、両者の網羅的なタンパク質発現情報を統合的に解析することによって、肺がんの浸潤・転移の分子機構の解明を進めるとともに、新規分子標的候補の探索・同定を進めることを目的とする。

B．研究方法

I．高転移性ヒト肺がん細胞株モデル系の質量分析器による網羅的タンパク質定量解析：

高転移細胞株 LNM35 株と低転移親株 N15 株から抽出したタンパク質試料の解析を下記の如くに進めた。LNM35 株と N15 株の両細胞株からのタンパク質抽出は T-PER 試薬（Pierce 社）を用いて行い、その後トリプシン消化によりペプチド試料を作成した。引き続き iTRAQ 試薬（ABSciex 社）を用いて、それぞれの試料を個別に標識した。さらに、ペプチド試料を混合し、液体クロマトグラフィーによる分画化を行い、質量分析装置（ABSciex 社）を用いた網羅的タンパク質発現解析によって試料中のタンパク質の定量情報を取得した。

II．バイオインフォマティクス解析による肺

がん術後再発関連タンパク質群の抽出：

高転移細胞株 LNM35 株と低転移親株 N15 株から抽出したタンパク質試料の網羅的なタンパク質発現は、両試料の混合物を対照とする存在比として取得され、これらの定量解析データに基づいて、両細胞における各タンパクの発現量比を算出した。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について、タンパク質の発現量と当該症例の無病再発期間の関連付けをしたデータベースを用いて、肺がん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、両者の解析において得られた知見を統合することによって、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。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究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。

C．研究結果

I．網羅的タンパク質定量解析による転移能の獲得に関連する候補タンパク質の同定：

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、本研究グループが有する最新のプロテオミクス解析技術とペプチド標識技術を駆使することにより、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 種類に及ぶたんぱく質の発現を確認した。さらに、LNM35 株と N15 株の間で 2 倍以上の発現差を認めるタンパク質として、385 種類を同定した。

II. 非小細胞肺癌症例における術後再発リスクと関連するタンパク質群の同定:

非小細胞肺癌の外科切除後に肺癌による死亡が確認されている、或いは、外科切除後5年以上(最長術後9年間)に渡って生存中であり再発の有無に関する臨床情報が付帯する非小細胞肺癌 173 症例から、プロテオミクス技術を駆使して取得した網羅的タンパク質発現データを基盤として、ランダムクロスバリデーションと partial cox regression 解析を応用したバイオインフォマティクス解析を行うことによって、臨床病態(術後再発)を予測する判別のモデル構築を行った。この過程において、29,000 種類の判別モデルが構築された。そこで、この膨大な数の判別モデルが持つ臨床病態に関連する情報を最大限に引き出して活用すべく、それぞれのモデルを構成したタンパク質を全てリスト化して、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った。その結果、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するに至った。

そこで、これらの非小細胞肺癌の腫瘍組織を用いた網羅的タンパク質発現定量比較解析データのバイオインフォマティクス解析を通じて同定した、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

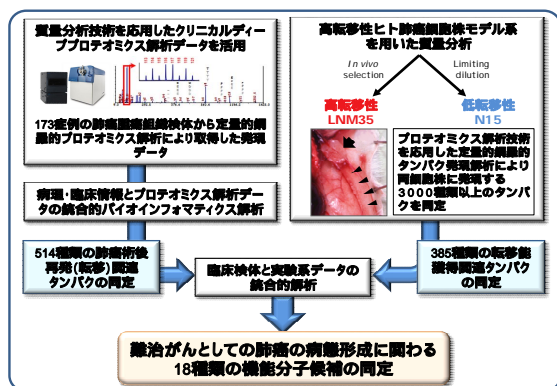
ンパク質群との間で比較検討を進めた結果、両群に共通する 18 種類のタンパク質を同定するに至った(図)。

D. 考察

今年度の非小細胞肺癌手術摘出組織検体から取得したタンパク質定量発現情報に対するバイオインフォマティクス解析を通じて、非小細胞肺癌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。これらの分子群には、発現情報と非小細胞肺癌術後再発危険性との間に、統計学的に有意な関連性を示すものの、肺癌細胞における運動・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おり、それらの中から、非小細胞肺癌の転移・浸潤の分子機構の鍵となる分子群を見出すことは、困難を極めるものと推測される。

そこで、我々が樹立した in vitro 及び実験動物を用いた検討における転移能の異なる LNM35 株と N15 株間で有意な発現差を認めるタンパク質群についても検討を進めることとした。両細胞株間で発現差の異なる分子群には、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が、一方で、運動・浸潤・転移能の獲得に関わる機能を有さないタンパク質群も含まれるものと考えられる。

以上の観点に立ち、非小細胞肺癌細胞の運動・転移・浸潤能の制御に深く関与するタンパク質群のより効率的な同定を目指して、我々は、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こととした。その結果、18 種類の候補タンパク質を同定するに至った。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ことが示唆される。十分に実験的な検証の遂行が可能な数にまで絞り込むことができたので、こ



モデル系における転移能の獲得に関連するタ

これらの分子に関し、肺癌細胞の運動・浸潤・転移能の獲得への機能的な関与について、LNM35株とN15株を用いた検討を開始した。

E . 結論

これらの分子群は、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しており、その重要性が強く示唆される。がん転移抑制法の開発の基盤となる標的分子の同定に繋げることを目指していく。

F . 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) 学会発表

- 1 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回日本がん学会学術総会(口演) 横浜、2014年9月25-27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(ポスター) Madrid, Spain, 2014年10月5-8日.

G . 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

CLCP1 を分子標的とする難治がんの診断・治療法への応用

担当責任者 長田啓隆 愛知県がんセンター研究所 室長

要旨

我々が同定した新規分子標的 CLCP1 について、革新的な治療法の開発を目指した研究開発を進め、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、接着斑におけるインテグリン複合体を構成する paxillin と p130CAS を同定し、CLCP1 によるアノキス抑制のシグナリング経路解明に重要な手掛かりを得た。また、FA19-1 抗体への曝露が、EGFR の発現量とリン酸化の低下を惹起することを明らかとした。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、結果的にリン酸化型 EGFR の存在量が低下したものと考えられる。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した。さらにその分子機序を解明すべく、検討を進めている。

A．研究目的

新規分子標的として同定した CLCP1 は、正常細胞における発現がほぼ見られない極めて腫瘍特異的な発現を示し、また、肺癌がん細胞の浸潤・転移に機能的に寄与していることを、我々はこれまで示してきた。また、CLCP1 が、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の MET や EGFR との間でクロストークを示すことを明らかにしてきたが、その分子機序については未だ不明の点が多い。一方、CLCP1 が、細胞膜を 1 回関通する受容体であることは、抗体を用いた肺がんの革新的な分子標的治療法の開発に極めて適した分子であることを示唆している。

本業務項目における研究開発は、高いがん特

異性を持つ細胞膜受容体の CLCP1 が、肺がんの浸潤・転移能の獲得において果たす分子機能について、プロテオミクス解析技術を応用しつつ、その全貌解明を目指すとともに、高親和性抗 CLCP1 抗体を用いた革新的な肺がん治療法の樹立に道を拓くことを目指すものである。

B．研究方法

CLCP1 の細胞増殖と細胞死抑制における分子機能：

肺がん細胞株において siRNA により CLCP1 ノックダウン (KD) した後に soft agar に撒き、コロニーを数えて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。

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 CLCP1 を 293T 細胞に導入し、両者の複合体形成について、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。

抗 CLCP1 抗体による RTK シグナリング抑制の分子機序：

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 ヘテロ複合体の動態について、時系列データを取得して検討を加えた。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、抗 CLCP1 抗体 (FA19-1) に種々の時間暴露した。その後、添加した抗 CLCP1 抗体による免疫沈降が起こらないように、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。

(倫理面への配慮)

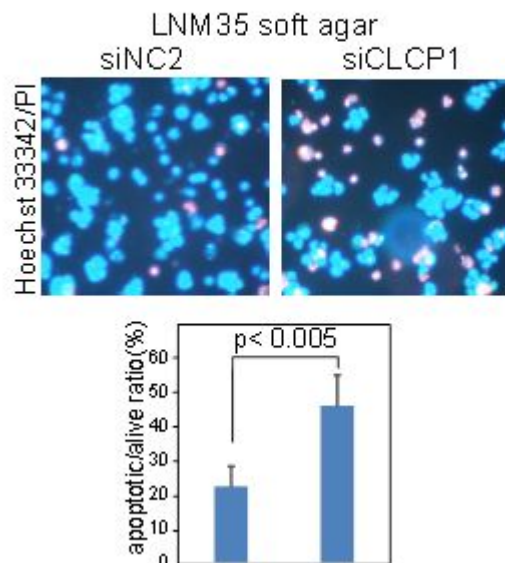
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、研究試料提供者の人権及び利益に十分配慮して、倫理審査委員会の承認を得た上で進めた。

C . 研究結果

CLCP1 の細胞増殖と細胞死抑制における分子機能：

足場非依存性増殖を示す高転移性ヒト肺がん細胞株 NCI-H460-LNM35 (以下、LNM35) 株を用いて、CLCP1 のノックダウンが及ぼす影響について検討を加えた。CLCP1 をノックダウンした LNM35 細胞をソフトアガー中の足場非接着状態においた後に、Hoechst33342 と PI で染色した。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 (図 1)。

図1 CLCP1 ノックダウンによる足場非接触環境下における細胞死の誘導

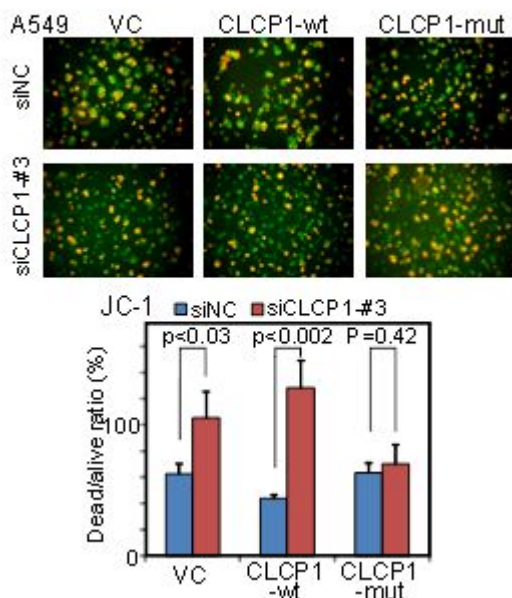


また、肺腺癌細胞株 A549 株において、JC-1 の赤色蛍光の緑色蛍光への変化が観察された。ミトコンドリア膜の電位差の低下が CLCP1 のノックダウンによって著明に誘導されたと考えられた。同時に、PI で染色される死細胞が増加し、アノキスの惹起が検出された。さらに、これらの現象が siRNA 抵抗性 CLCP1 の導入によって著明に抑制できることを確認し、CLCP1 発現低下によって特異的に惹起されたことを確認した (図 2)。

上述の如くに、CLCP1 が細胞接着非存在下に

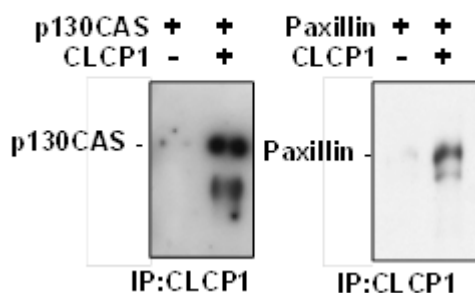
おけるアノキスの抑制に関わっていることが示唆されたので、CLCP1 のシグナル伝達に關与すると考えられる CLCP1 細胞内ドメインに結合する分子群の探索を進めている。細胞接着に

図2 CLCP1 ノックダウンによるミトコンドリア膜電位の著減



重要なインテグリン分子複合体に含まれる細胞内分子との相互作用について、293T を用いて IP-WB 解析によって検討したところ、paxillin 及び p130CAS(BCAR1)と結合することが判明した(図3)。また、HA タグを付加した CLCP1 細胞内ドメイン(CLCP1・IC-HA)を発現させて免疫沈降し銀染色を行ったところ、約35kDaの CLCP1 細胞内ドメインが検出されると共に、複数のバンドの共沈降が見られた。

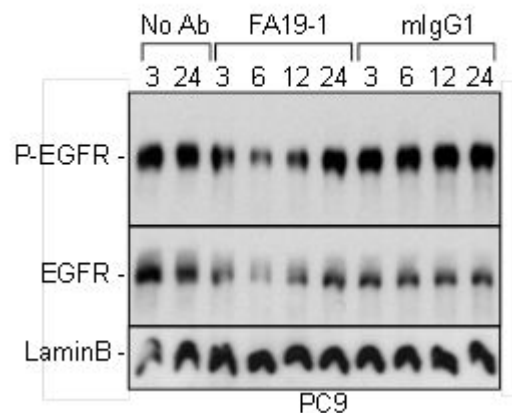
図3 CLCP1 と paxillin 及び p130CAS との結合



抗 CLCP1 抗体による RTK シグナリング抑制の分子機序:

CLCP1 と RTK とのヘテロ複合体形成、及び、抗 CLCP1 抗体 FA19-1 への暴露による CLCP1 の内在化・発現低下をこれまでに見出している。そこで、EGFR 変異を持ち EGFR シグナリング依存性を示す肺がん細胞株 PC9 を用いて、以下の検討を行った。FA19-1 抗体に暴露して時系列的に EGFR の発現および活性に關連するリン酸化の変化を検討したところ、曝露開始6時間後をピークとする EGFR の発現低下とリン酸化の低下が觀察された(図4)。

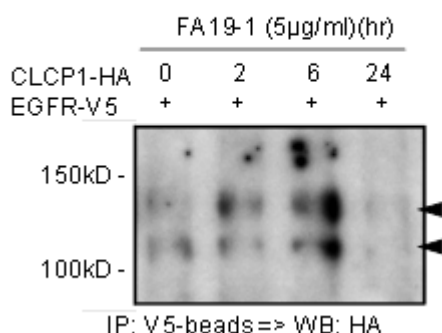
図4 抗 CLCP1 ノックダウン抗体への暴露による EGFR 発現量とリン酸化の減少



一方、CLCP1 と RTK との複合体形成の動態を検討するために CLCP1(HA-tag)と EGFR(V5-tag)を発現させて、V5 抗体で免疫沈降し、HA 抗体で WB 解析を行った。その結果、CLCP1 と EGFR とは恒常的に結合している(矢頭)が、FA19-1 抗体への暴露により CLCP1-EGFR 複合体の形成が促進されることが判明した(図5)。

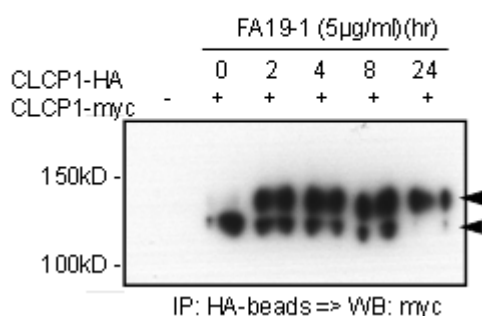
図5 FA19-1 抗体への暴露による CLCP1-EGFR 複合体形成の促進

**図5 FA19-1抗体への暴露による
CLCP1-EGFR複合体形成の促進**



また、HA タグおよび myc タグの異なるタグを付加した CLCP1 を発現するベクターを用いて、CLCP1 のホモ複合体形成についても IP-WB 解析による検討を加えた。その結果、CLCP1-myc と CLCP1-HA の共沈降が検出され、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（図 6）。

**図6 CLCP1 のホモ二量体形成の検出と
FA19-1 抗体暴露による影響**



D . 考察

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、接着斑のインテグリン複合体を構成する 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 への暴露によって、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 抗体への暴露によって EGFR が内在化して分解され、結果的にリン酸化型 EGFR の存在量が低下したものと考えられる。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 抗体への暴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 抗体への暴露下で見られるこれらの現象の分子機序を明らかとしていく予定である。

E . 結論

CLCP1 が、足場非接着により誘導されるアノキスの抑制に関わっていることを明らかとした。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きたい。また、肺がん細胞株を抗 CLCP1 抗体 FA19-1 に暴露すると、EGFR の発現低下が惹起されることを明らかとした。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について、より詳細な検討を行っていく予定である。

F . 研究発表

1) 論文発表

1. 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
2. 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, la 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 Discovery*. 4: 415-22, 2014.
 3. 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.
 4. 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. *Gastroenterology*. 146: 562-72, 2014.
 1. 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25-27日.
 2. 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25-27日

G . 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

2) 学会発表