

令和元年6月25日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10880

研究課題名(和文) 臨床検体を用いたプロテオミクスによる転移性骨腫瘍の分子背景の解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Proteomic study using clinical materials for metastatic bone tumor toward the understanding of molecular backgrounds and the development of novel therapy

研究代表者

近藤 格 (Kondo, Tadashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：30284061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転移性骨腫瘍の病態を理解し臨床に有用なバイオマーカーを開発することを目的として本研究を行った。本研究は、臨床検体を用いたプロテオーム解析のデータを活用するところに特徴がある。プロテオーム解析の手法としては大型蛍光二次元電気泳動法および質量分析を用いた。転移性骨腫瘍のタンパク質発現プロファイルを作成し、病巣に特徴的に発現するタンパク質を特定し、それらの中から血中に放出されるタンパク質を同定した。臨床検体を用いた検証実験を行い、転移性骨腫瘍の症例における特異的発現を調べた。原発組織の異なる転移性骨腫瘍の腫瘍組織を用い、原発不明癌の鑑別診断のためのシースとなるタンパク質の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨は肺に次いで転移の多い臓器であり、多くの悪性腫瘍は骨に転移する。骨転移は予後不良因子であり、病的骨折を来すなどして患者のQOLを著しく損なう。しかしながら、転移性骨腫瘍の早期診断や有効な治療法は限られている。高齢化に伴うがん患者の増加および治療法の進歩により、骨に転移をもって長期生存する症例は増えており、転移性骨腫瘍の治療法の開発はますます重要になっている。その原発腫瘍の性状や分子背景により、転移性骨腫瘍は複雑な病態を示すが、適切な実験モデルが得難い。臨床検体を用いたオミクス解析のデータによって分子背景を網羅的に理解することで、有用なバイオマーカーなど新しい発見を期待することができる。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to understanding of disease mechanisms of metastatic bone tumors, and to develop biomarkers. This study was characterized by the use of clinical specimens and proteomics data. Large-format two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry were employed in this study. We created the protein expression profiles of metastatic tumors, identifying the proteins unique to tumors, and found biomarker candidates as proteins which could be released from the tumors and exist in the blood stream. Using the plasma samples, we validated the presence of identified proteins in the patients with or without bone metastasis. In addition, we investigated the protein expression differences among the metastatic bone tumors with different original sites. Those proteins could be candidates of biomarkers for differential diagnosis of malignancies of unknown origin.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：転移性骨腫瘍 バイオマーカー プロテオーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

骨への転移はすべての癌においてステージが進んだ段階で認められる可能性がある。乳がん、肺がんにおいて頻度が高く、前立腺がん、腎がん、胃がん、子宮がんにおいても認められる。本邦では新規に年間5~10万人の癌患者が治療に必要な骨転移を患っており、骨転移による疼痛の緩和や病的骨折の治療を目的とした手術が年間5000件以上行われている。一方、骨転移はそれ自体が生命危機を来さず末期症状での治療となるため臨床データの蓄積が少ない。また、遠隔転移に關与する遺伝子を特定するためにマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析が行われてきたが、転移性骨腫瘍の網羅的発現解析は実施例がきわめて少なく、未開拓の分野として残されている。特にプロテオーム解析では臨床検体を用いて転移性骨腫瘍を調べた例は申請者以外にほとんどない。分子標的薬の登場により治療戦略が複雑化していること、長期生存症例が増え転移性骨腫瘍症例が増えていること、病的骨折を予防し侵襲的治療を回避することは患者にとってメリットが大きいことから、姑息的治療ではなく、ADLやQOLの向上を目指した新しい治療法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

骨転移腫瘍の新しい治療法の開発に資する知見を得ることが本研究の目的である。転移性骨腫瘍に対しては外科的手術が行われているが、脊椎など解剖学的に手術切除が困難な部位に発生した場合は、疼痛緩和などの対処療法しか手段がない。破骨細胞の増殖を押さえる骨修飾薬が使用されているが、骨転移した腫瘍細胞そのものに対する有効な治療法は確立されていない。新しい抗がん剤の開発に並行して、バイオマーカーの開発も重要である。早期に発見され治療を受けた転移性骨腫瘍症例の方が予後がよいと考えられており、転移性骨腫瘍を早期に診断するバイオマーカーが必要とされている。現在、そのためのバイオマーカーとしては血清アルカリホスファターゼが使用されているが、腫瘍組織に特異的なものではなく胆道系の疾患でも高値を示すことから、新しいバイオマーカーが求められている。本研究では、1)申請者がこれまでに同定した転移性骨腫瘍のバイオマーカー候補の有用性を臨床検体で検証し、2)新しいプロテオーム解析の手法を用いて転移性骨腫瘍に關連するタンパク質を新規に探索する。また、3)骨転移巣から初代培養細胞株の樹立を行い、研究基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

これまでの研究で同定済の骨転移關連タンパク質のバイオマーカーとしての検証実験  
原発腫瘍組織と比較したときに転移性骨腫瘍組織において高発現し、発現抑制が腫瘍細胞の増殖抑制・浸潤能抑制を引き起こし、腫瘍細胞から細胞外に放出されているタンパク質をすでに同定している。このタンパク質を対象に、転移性骨腫瘍の症例、肺などの臓器に転移を来している症例、転移のない症例の間で、血漿・血清サンプルを比較解析する。50症例以上を対象とした検証実験を行う。サンプルは国立がん研究センターを中心に複数の医療機関の症例のものを使用する。複数の医療機関で収集される臨床検体を用いることで、多様な背景をもった症例群を形成し、機関ごとのバイアスを打ち消すことができる。

#### 液相トップダウン質量分析法

液体クロマトグラフィーによって分離したペプチドを高感度の質量分析装置(Finnigan LTQ Orbitrap mass spectrometer)で解析する。原発臓器の異なる腫瘍組織を使用する。本手法では、2000~3000種類のタンパク質を観察することができる。現在までに、全長タンパク質を分離する蛍光二次元電気泳動法やPROTOMAP法を用いて骨転移關連タンパク質を調べてきた。これらの方法とは分離の原理が異なることから、今までに観察対象となっていなかったタンパク質を比較解析できる。

#### 転移性骨腫瘍からの細胞株の樹立

転移性骨腫瘍の手術検体から初代培養を試み、株かを目指す。樹立が順調に行われた細胞株については動物移植モデルを作成し、バイオマーカーの機能解析や抗がん剤の感受性試験

験に使用する。

#### 4. 研究成果

同定済の骨転移関連タンパク質のバイオマーカーとしての検証実験

千葉大学呼吸器内科で採取された肺がん症例 75 例の血漿を用いて、画像的に骨転移が存在する症例群におけるバイオマーカーの血中発現レベルを、画像的に骨転移が存在しない症例群と比較した。市販の ELISA プレートはうまく稼働せずウェスタンブロットティングを用いた解析を行った。その結果、骨転移が陽性の症例群において高い確率で候補タンパク質が強く発現することが確認された。また、肺がん 70 例、悪性胸膜中皮腫 27 例の臨床病理情報について、バイオマーカー候補タンパク質の発現との相関解析を行った。悪性度との関連を示唆するデータを期待したが、そこには有意な相関を示す事象は同定されなかった。同タンパク質には複数のファミリータンパク質が存在する。そこで、ウェスタンブロットティングでファミリータンパク質を調べたところ、一連のものが血中で高い発現を示すことがわかった。また、次に述べる質量分析装置を用いた実験で一連のファミリータンパク質を調べ、同候補タンパク質の特異性を確認したところ、それらファミリータンパク質が腫瘍組織内で高い発現レベルを示すことがわかった。本バイオマーカーは分子パスウェイ全体として特定の機能の亢進に関与している可能性が高い。このことはすなわち、バイオマーカーとして検査系を構築する際、かならずしも本タンパク質である必要はないこと、複数のファミリータンパク質を同時測定することで感度特異度を向上させることができる可能性があること、を示唆している。今回、限られた症例数では発現の更新を確認することができたが、臨床的な悪性度との相関は認められなかったことから、血中濃度の亢進の機能的な意義を調べることは困難であると考えられる。今までの研究から悪性度に関与することはわかっているものの、血中で高値を示している当該タンパク質は必ずしも腫瘍細胞から分泌されているとは限らないからである。この問題にアプローチする手法としては、プロテオゲノミクスの手法が考えられる。すなわち、腫瘍細胞ごとにゲノム情報を得て変異配列を含むペプチドを質量分析で同定するというものである。このアプローチが血清バイオマーカーに応用された事例はかつてないのだが、国立がん研究センターでは同解析を可能にするソフトウェアを開発中である。転移性骨腫瘍に限らず血清腫瘍マーカーの開発における本ソフトウェアの応用を、次世代シーケンサーや高精度の質量分析装置の使用と合わせて今後の見当課題としたいと考えている。

原発巣の異なる転移性骨腫瘍組織の腫瘍組織を液相トップダウン質量分析で調べた。データ解析には、二次元質量分析解析ソフトウェア、データベースにはユニプロット・スイスプロット、検索にはマスコットを使用した。対象とした転移性骨腫瘍の原発腫瘍は、乳がん、肺がん、悪性リンパ腫、腎がん、皮膚がんである。データ全体の相関関係を調べると原発腫瘍同士が特に相関が高い傾向はなかったものの、主成分分析では、原発巣にしたがったタンパク質の発現プロファイルが存在することがわかった。階層的クラスタ解析および主成分分析では、悪性リンパ腫に由来する転移性骨腫瘍において、他のものと著しいプロファイルの違いが存在することがわかった。悪性リンパ腫に特異的に発現が高いことがわかったがん関連タンパク質としては、macrophage-capping protein などが挙げられる。このタンパク質は他の悪性腫瘍の予後バイオマーカーとして同定されており、増殖には関与しないが転移を促進することが今までの研究からわかっている。Nucleophosmin の発現も顕著だった。Nucleophosmin は種々の悪性腫瘍で高い発現を示し、予後バイオマーカーとして知られている。また、Peroxiredoxin ファミリータンパク質として、Peroxiredoxin 1, 2, 4, 5, 6 の発現が顕著に高く、特異な酸化還元系のパスウェイの関わりが悪性リンパ腫で想定される。そのほか、Epidermal growth factor receptor substrate 15、FK506-binding protein、Far upstream element-binding protein、RNA-binding protein FUS、FYN-binding protein、Glypican-1、78 kDa glucose-regulated protein、Heat shock protein HSP 90-alpha、Transgelin などが高い発現を示していたこ

とが興味深い。病態解析の意味では網羅的データは重要な役割を果たすのだが、治療標的になりえるような、たとえばリン酸化酵素の過剰発現などは認められなかった。これは質量分析の感度によるところが大きいと考えている。今回の実験で同定できたタンパク質は約 2800 種類であり、定量的に同定できていることを考慮しても、同定数としては少ない。多数の分画をとる、最新の質量分析装置を使用する、などして網羅性を拡張する必要があると考えられる。

転移巣からの初代培養の樹立については、腫瘍細胞以外の細胞があまりにも多く、樹立に至らなかった。血球系の細胞を除去する必要があると考えられる。細胞を分離する方法として、遠心分離法だけでなく血中循環腫瘍細胞を精製する装置などを検討したが、血球細胞を効率よく除去し腫瘍細胞を回収する方法を確立することはできなかった。骨には多様な非腫瘍細胞が含まれており、幹細胞としての性格を有するものも多いと考えられるため、患者由来がんモデルの樹立方法の開発が必要だと考えられる。同じことは、胸水や腹水からの樹立についても当てはまる一般的な課題であり、今後取り組んでいきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)

1. Qiao Z, Parlayan C, Saito S, Kondo T. Meta-analysis of global gene-expression profiles identify molecular signatures for histological subtypes of sarcomas. *J Electrophoresis*. 2018 62:21-29.
2. Shiozawa K, Yoshioka Y, Qiao Z, Shuting J, Ochiya T, Kondo T. Pazopanib-induced changes in protein expression signatures of extracellular vesicles in synovial sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Nov 30;506(3):723-730.
3. Oyama R, Kito F, Qiao Z, Sakumoto M, Noguchi R, Takahashi M, Toki S, Tanzawa Y, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment of a novel patient-derived Ewing's sarcoma cell line, NCC-ES1-C1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018 Dec;54(10):770-778.
4. Qiao Z, Kondo T. Identification of cephalomannine as a drug candidate for glioblastoma via high-throughput drug screening. *J Electrophoresis* 2018;62:17
5. Kito F, Oyama R, Sakumoto M, Takahashi M, Shiozawa K, Qiao Z, Sakamoto H, Hirose T, Setsu N, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment and characterization of novel patient-derived osteosarcoma xenograft and cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018 Jun 25.
6. Kito F, Oyama R, Takahashi M, Shiozawa K, Sakumoto M, Yoshida A, Setsu N, Kobayashi E, Kawai A, Kondo T. Establishment and characterization of a patient-derived cancer model of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Tiss. Cult. Res. Commun*. 37: 1-13 (2018)
7. Oyama R, Takahashi M, Kito F, Sakumoto M, Shiozawa K, Qiao Z, Yoshida A, Endo M, Kawai A, Kondo T. Establishment and characterization of patient-derived xenograft and its cell line of primary leiomyosarcoma of bone. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018 Jun;54(6):458-467.
8. Kito F, Oyama R, Takai Y, Sakumoto M, Shiozawa K, Qiao Z, Uehara T, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment and characterization of the NCC-SS1-C1 synovial sarcoma cell line. *Hum Cell*. 2018 Apr;31(2):167-174. doi: 10.1007/s13577-018-0199-9.
9. Oyama R, Kito F, Sakumoto M, Shiozawa K, Toki S, Endo M, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment and proteomic characterization of a novel synovial sarcoma cell line, NCC-SS2-C1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2018 May;54(5):392-399.
10. Fujii K, Suzuki N, Jimura N, Idogawa M, Kondo T, Iwatsuki K, Kanekura T. HSP72 functionally inhibits the anti-neoplastic effects of HDAC inhibitors. *J Dermatol Sci*. 2018 Jan 30. pii: S0923-1811(18)30018-5. doi:10.1016/j.jdermsci.2018.01.002.
11. Oyama R, Kito F, Sakumoto M, Shiozawa K, Toki S, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment and proteomic characterization of a novel cell line, NCC-UPS2-C1, derived from a patient with undifferentiated pleomorphic sarcoma.

In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2018 Mar;54(3):257-263. doi:  
10.1007/s11626-018-0229-7.

12. Sakumoto M, Oyama R, Takahashi M, Takai Y, Kito F, Shiozawa K, Qiao Z, Endo M, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Establishment and proteomic characterization of patient-derived clear cell sarcoma xenografts and cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2018 Feb;54(2):163-176.
13. Shiozawa K, Shuting J, Yoshioka Y, Ochiya T, Kondo T. Extracellular vesicle-encapsulated microRNA-761 enhances pazopanib resistance in synovial sarcoma. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan 1;495(1):1322-1327.
14. Takai Y, Oyama R, Kito F, Sakumoto M, Shiozawa K, Qiao Z, Nakajima K, Takahashi M, Yoshida A, Setsu N, Kobayashi E, Kawai A, Kondo T. Establishment and characterization of cell line of undifferentiated pleomorphic sarcoma. Tissue Culture Res Commun. 2017;36(5):41-48.
15. Qiao Z, Shiozawa K, Kondo T. Proteomic approach toward determining the molecular background of pazopanib resistance in synovial sarcoma. Oncotarget. 2017 Nov 28;8(65):109587-109595.
16. Qiao Z, Kito F, Kondo T. Meta-analysis identifies endothelin-3 as a prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumors. J Sarcoma Res
17. Qiao Z, Tajim T, Kito F, Arai Y, Kawai A, Kondo T. Metastasis-associated gene signature in primary myxoid liposarcoma identified through a gene expression study. J Electrophoresis. 2017 61(1):9-15.
18. Qiao Z, Kito F, Takai Y, Oyama R, Kondo T. Secretomics identifies follistatin as a predictive biomarker for response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in synovial sarcoma. J Electrophoresis. 2017 61(1):1-7
19. Sakumoto M, Takahashi M, Oyama R, Takai Y, Kito F, Shiozawa K, Qiao Z, Yoshida A, Endo M, Kawai A, Kondo T. Establishment and proteomic characterization of NCC-LMS1-C1, a novel cell line of primary leiomyosarcoma in the bone. Jap J Clin Oncol. 2017 Oct 1;47(10):954-961.
20. Kikuta K, Kubata D, Yoshida A, Qiao Z, Morioka H, Nakamura M, Matsumoto M, Chuman H, Kawai A, Kondo T. Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2 (DCBLD2) is a novel biomarker of myxofibrosarcoma invasion identified by global protein expression profiling. Biochim Biophys Acta. 2017 Jun 29;1865(9):1160-1166
21. Oyama R, Takahashi M, Yoshida A, Sakumoto M, Takai Y, Kito F, Shiozawa K, Qiao Z, Arai Y, Shibata T, Araki Y, Endo M, Kawai A, Kondo T. Generation of novel patient-derived CIC-DUX4 sarcoma xenografts and cell lines. Sci Rep. 2017 Jul 5;7(1):4712.
22. Nakasugi T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, Tanaka H, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H. Complementary Critical Functions of Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. PLoS Genet. 2017 Jan 23;13(1):e1006578. doi: 10.1371/journal.pgen.1006578. eCollection 2017 Jan.
23. Asano N, Yoshida A, Mitani S, Kobayashi E, Shiotani B, Komiyama M, Fujimoto H, Chuman H, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Kubo T, Kato M, Kohno T, Kawai A, Kondo T, Ichikawa H. Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma. Oncotarget. 2017 Feb 21;8(8):12941-12952.

〔学会発表〕(計3件)

1. プロテオゲノミクスソフトウェア Mutated Nucleotide and Amino-acid sequence Generator (MuNAGE) の開発. 服部恵美・塩澤久美子・近藤格 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28~30日, パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県
2. 希少がん・肉腫の研究 プロテオーム解析によるバイオマーカーの開発から患者由来がんモデルの樹立まで. 近藤格 第33回日本整形外科学会基礎学術集会 2018年10月12日, 奈良春日野国際フォーラム、奈良市、奈良
3. 核酸アプタマー (SOMAscan) による肝細胞癌の腫瘍組織のプロテオーム解析: 脈管侵襲に関連するタンパク質の同定. 喬志偉、近藤格 第68回日本電気泳動学会総会 2017年11月24~25日, 広島大学霞キャンパス、広島市、広島

〔図書〕(計1件)

1. 近藤 格. 「希少がんのプロテオーム解析」 体外診断用医薬品の開発と承認申請. 技術情報協会. 2017:293-300.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当なし

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

がんの多様性へのアプローチ (国立がん研究センター 希少がん研究分野)

[https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/rare\\_cancer\\_research/project/020/040/20170907182642.html](https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/rare_cancer_research/project/020/040/20170907182642.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 穴澤卯圭

ローマ字氏名: Ukei Anazawa

所属研究機関名: 東京歯科大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20245525

研究分担者氏名: 菊田一貴

ローマ字氏名: Kazutaka Kikuta

所属研究機関名: 慶應義塾大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 30383798

研究分担者氏名: 多田裕司

ローマ字氏名: Yuji Tada

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院医学研究院

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 50344990

研究分担者氏名: 川井章

ローマ字氏名: Akira Kawai

所属研究機関名: 国立がん研究センター

部局名: 中央病院

職名: 科長

研究者番号 (8 桁): 90252965

### (2) 研究協力者

該当なし