

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006～2008
課題番号：18390382
研究課題名 (和文) 呼吸器悪性腫瘍 (肺癌および中皮腫) の生物学的性格に基づく新規診断・治療戦略の構築
研究課題名 (英文) Construction of the new diagnostic and therapeutic strategies based upon the biological characteristics of the respiratory malignancy (lung cancer and mesothelioma)
研究代表者 平野 隆 (Hirano Takashi) 東京医科大学・医学部・准教授 研究者番号：30238381

研究成果の概要：呼吸器悪性腫瘍 (肺癌、特に肺腺癌と悪性中皮腫) の早期診断と治療の個別化に向けた蛋白質レベルのバイオマーカー探索を目的に研究を行った。探索の主たる手段に 2 次元電気泳動法と質量分析 (LC-MS) を用いた。特に臨床上有効性の高い血清診断を可能にするバイオマーカーの探索をめざし、培養細胞・外科切除材料の短期培養上清 (conditioned medium) 中に分泌されるであろう蛋白質の解析を中心に行った。悪性中皮腫と低分化肺腺癌との鑑別 肺腺癌の早期発見バイオマーカー探索 (検診への応用) チロシンキナーゼ阻害薬のリン酸化腫瘍蛋白に与える影響の分析 効果予測の検討 肺腺癌の術後補助化学療法選択のためのバイオマーカー探索を中心に解析を進めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌・中皮腫・早期発見・個別化治療・バイオマーカー探索・臨床プロテオミクス・呼吸器外科

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 呼吸器悪性腫瘍、特に肺癌はわが国の癌死亡の中で第 1 位であり、今だに増加傾向が続いている高悪性度の腫瘍として知られている。その治療効果は現在の診断・治療戦略では限界があり、生存率の著名な改善につながることは見込めない。新たな早期発見法と治療法選択基準・治療薬の確立が求められている。

(2) 原発性肺癌の主たる組織型は扁平上皮

癌・腺癌・大細胞癌・小細胞癌の 4 つであるが、この約 30 年間で扁平上皮癌の相対的減少と腺癌の増加が顕著である。

(3) 中皮腫は石綿と関連する腫瘍と考えられており、石綿の使用規制が欧米諸国と比較し遅れたわが国では今後増加することが予測されているが、その診断法・治療法は限られており、予後は極めて不良である。

(4) 呼吸器領域の悪性腫瘍の現在の診断・治療戦略は病期によって規定される部分が多

く、神経内分泌腫瘍(小細胞癌)か否かの診断以外、腫瘍細胞の生物学的性格は根本的な治療戦略に反映される要素はきわめて少ない。個々の腫瘍で細胞学・生物学的性格から最も効果的と推測される治療法を選択する個別化治療の必要性を検討する時期にある。

(5) 近年、細胞内での生理作用に直接関わる分子である蛋白質の解析法が急速に進歩し、その包括的解析法であるプロテオミクスの解析手技を培養細胞や腫瘍患者から得られる臨床検体に応用することが可能になった。この手法の応用は臨床上有力な情報をもたらすバイオマーカーの探索に有力な手段となりうると考えられているが、血清バイオマーカー探索のために血清を直接解析するには膨大な量存在する古典的な血清蛋白質をある程度除去しても、依然としてダイナミックレンジの問題が残っている。

## 2. 研究の目的

- (1) 呼吸器悪性腫瘍の早期診断に有効なバイオマーカー、特に血清診断に役立つバイオマーカーの探索
- (2) 個別化治療の確立に必要なバイオマーカー探索
- (3) 上記バイオマーカーの確立により、新しいがん検診法の確立、個別化医療を中心に据えた治療戦略の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析対象とその解析方法

早期血清診断をめざしたバイオマーカー探索：培養細胞あるいは外科切除組織検体を無血清培地 TIL Media I (IBL) で短期培養し、その培養上清中の蛋白質の解析。一部の検証実験には患者および正常者血清を albumin, globulin 除去フィルターで処理後検体として使用した。

悪性中皮腫の診断マーカー：鑑別がしばしば問題となる低分化肺腺癌との比較を培養細胞およびその培養上清中の蛋白質の比較解析。

epidermal growth receptor (EGFR) の遺伝子変異の知られている肺腺癌培養細胞 PC9 を用い、チロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib の作用前後の蛋白質の発現比較およびリン酸化チロシン含有蛋白質の発現比較を行った。

### (2) 蛋白質の 2 次元電気泳動法(2DE)による解析

解析材料：肺腺癌培養細胞 (PC3, PC9, PC14, A549)、中皮腫培養細胞 (H28, H2452, H2052, MET0211H) およびその培養上清(無血清培地での培養後培養上清)；肺癌および中皮腫外科切除材料  
2 次元電気泳動用サンプルの作成：培養細胞および外科切除材料からは以前私

たちが報告した方法 (*Br J Cancer* 72, 840-848, 1995) に従い cell pellet を作成し 2DE 用サンプルの調整を行った。発現量の差を検出する場合は Ettan-DIGE 用の蛍光色素(Cy2, Cy3, Cy5)で標識し、2DE 用サンプルとした。2DE 用サンプルは蛋白質測定が行われ、1 解析あたり 50  $\mu$ g のサンプルが電気泳動に供された。等電点電気泳動 Immobiline DryStrip gel (pH3-10)(GE Healthcare UK Ltd) を用い、Multiphor II により 50  $\mu$ A/gel で泳動した。

SDS-PAGE は 10% polyacrylamide gel を用い、EttanDalt II (GE Healthcare UK Ltd) によって 30 W/gel で約 2 時間泳動した。(、の操作は GE Healthcare UK Ltd の操作マニュアルに従った。)

### 2 次元電気泳動ゲルの解析

) 蛍光色素(Cy dye) による蛍光標識サンプルの場合 Typhoon 9400 fluorescence gel scanner (GE Healthcare UK Ltd) により画像を取り込み、DeCyder software v. 5.0 (GE Healthcare UK Ltd) を用いて解析、2 サンプル間の発現量の差の比較・検定を行った。

) 蛍光標識されていないサンプルの場合 2DE 終了後 Deep Purple にて染色後、Typhoon 9400 fluorescence gel scanner (GE Healthcare UK Ltd) により画像を取り込み、DeCyder software v. 5.0 (GE Healthcare UK Ltd) で解析した。

蛋白質分子の同定 2DE によって検出された目的スポットは切り出され、質量分析法によって蛋白質分子を同定した。

- (3) 質量分析法 (MS) による蛋白質の同定  
蛋白質の加水分解：目的スポットのゲル中で固定されている蛋白質分子を、そのままトリプシンによる加水分解処理にかけた (Shevchenko et al. *Anal Chem* 68, 850-858, 1996)。生じたペプチド混合物をゲルマトリックスから抽出した。ペプチド混合物の質量分析：液体クロマトグラフと連結したイオントラップ型質量分析計を用いた (液体クロマトグラフ・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS))。分析はスポットごとに行った。

データベース検索：取得された各ペプチドのタンデム質量分析データを Swiss-Prot アミノ酸配列データベース (<http://www.uniprot.org>) に対して検索し、もとの蛋白質を同定した。検索には Mascot プログラム (Perkins et al. *Electrophoresis* 20, 3551-3567, 1999) を用いた。単一スポットから複数の蛋白

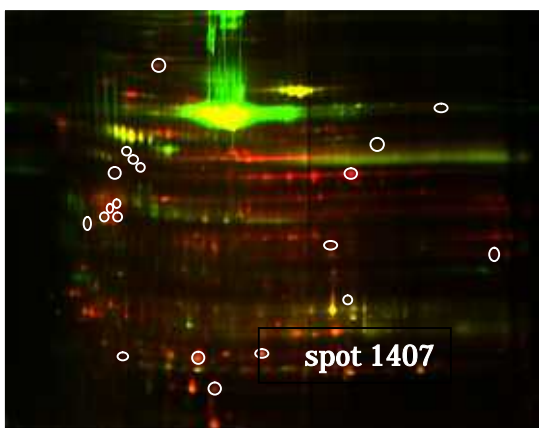
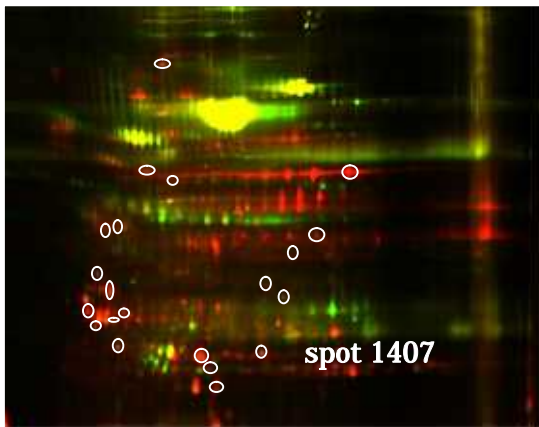
質が候補として挙がった場合は、それらを全て同定蛋白質とした。ただし、サイトケラチンは外部からの汚染による可能性が高いため同定蛋白質から除いた。

#### 4. 研究成果

1. 原発性肺腺癌の早期診断をめざした血清バイオマーカーの探索(解析対象: 臨床検体の短期培養後の培養上清) 肺腺癌組織正常末梢肺組織間で発現量に有意差 ( $p < 0.05$ ) を認め、かつ平均値で 2.5 倍以上の差を認めた 2DE ゲル上の 44 spots を肺腺癌バイオマーカー候補とした(図 1)。このうち 2 次元電気泳動ゲル上から切り出すことが可能であった 34 spots で MS 解析が可能であった。解析した全 spots で蛋白質分子が同定され、そのなかにサーファクタント関連蛋白質 (SpA) や以前私達が報告した原発性肺腺癌関連蛋白質 napsin A (TA02) が含まれた。

図 - 1

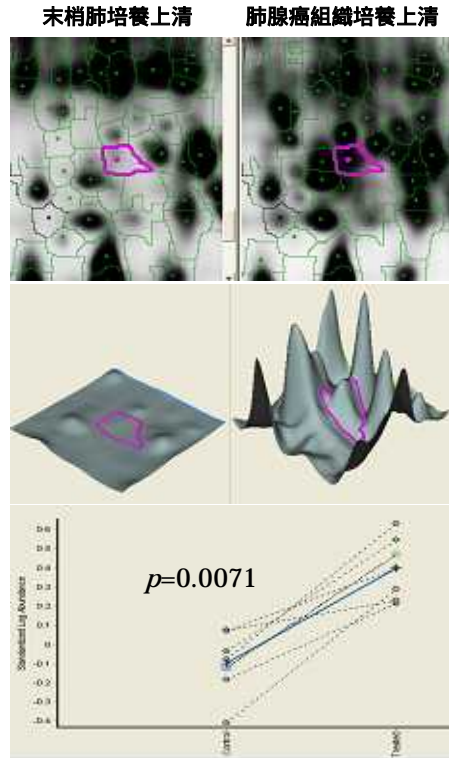
培養上清の Ettan-DIGE 像 (肺腺癌組織と正常末梢肺での比較)



白 は腺癌で発現量の平均値が 2.5 倍以上で統計的に有意に発現増加が見られた 34 spots の位置を示す。

図 - 2

spot 1407 の DeCyder 上での解析画面



実際の肺腺癌患者血清を用いて検証実験を施行。7 spots が腺癌患者血清で正常者よりも 1.5 倍以上高発現しており、この内 6 spots が肺扁平上皮癌、肺小細胞癌では正常血清以下の発現量であった。6 spots から同定された蛋白質分子は alpha-1-antitrypsin, vimentin, desmin, clusterin, peroxiredoxin-6, peroxiredoxin-2, protein DJ-1, peroxiredoxin-1 であった。

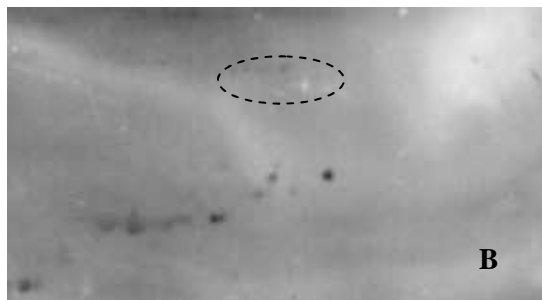
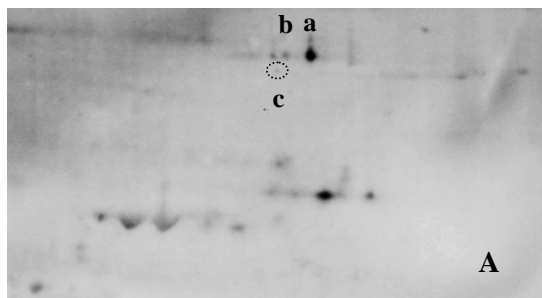
2. 悪性中皮腫の診断マーカー(解析対象: 中皮腫および肺腺癌培養細胞と培養細胞の培養上清) 培養細胞間の解析では発現量に統計的有意差を認めるものはなかったが、平均値で 2.0 倍以上発現量に差が認められた 24 spots を選び、MS 解析により 21 spots から蛋白質分子の同定が可能であった。主な同定蛋白質は lamin A/C, moesin, vimentin, protein disulfide- isomerase, splicing factor 45, macrophage-capping protein, hepatoma-derived growth factor, chloride intercellular channel protein 1, tumor protein D54, Cathepsin D, prohibitin, etc. 培養上清の解析では 2 倍以上の発現を示す spots は 14 個であり、MS 解析ですべての spots で蛋白質分子が同定可能であった。主な同定蛋白質は Complement factor B, moesin, Plasminogen activator inhibitor 1, Pentraxin-related protein, Follistatin-related protein 1, Plasminogen activator inhibitor, Follistatin,

Metalloproteinase inhibitor 2, Superoxide dismutase, Phosphatidylethanolamine-binding protein 1, etc. 臨床検体を用いた検証を予定しているが、臨床検体が十分に得られないため、検証実験は現在のところ待機中である。

3. 肺腺癌培養細胞 PC9 のチロシンキナーゼ阻害薬によるリン酸化蛋白質の発現変化 ETTAN-DIGE 法による解析で gefitinib 処理により発現低下する 2 次元電気泳動ゲル上の 11 spots を検出した。さらに抗チロシンリン酸化含有蛋白質抗体を用いた Western blotting 法では gefitinib 処理によりチロシンリン酸化蛋白質が発現低下した 21 spots を検出した。両方の解析で共通して発現低下が認められた spot を質量分析法で解析し、ezrin, lamin A/C を同定した。さらに抗チロシンリン酸化含有蛋白質抗体による Western blotting 法の解析結果に基づき発現が減少するとして検出されたスポットの質量分析法による解析では ezrin に加え radixin, moesin 分子も同定された。

図 - 3

肺腺癌培養細胞株の抗リン酸化チロシン含有蛋白質抗体を用いた Western Blotting 像 (A: gefitinib 処理なし。B: gefitinib 処理)



Spot a から ezrin が、spot b から ezrin, radixin が、spot c から moesin が同定されている。Gefitinib 処理によってこれらの spots はほぼ消失する。

4. I 期肺腺癌の uracil-tegafur (UFT) を用いた術後補助化学療法の個別化をめざした解析：UFT による術後補助化学療法の有

無と再発の有無により 4 群に分類、各群 6 例ずつ合計 24 検体の肺癌切除材料を LC-MS/MS により解析、個別化医療を進めるのに有効なバイオマーカーの探索を行った。myosin IIA と vimentin がともに陰性の症例では UFT による術後補助化学療法の有無に関わらず予後良好であり、術後補助化学療法が回避できる症例の選択に有効と考えられた。(British Journal of Cancer 98, 596-603, 2008.)

5. バイオマーカーを応用した早期診断と治療の個別化：今回の結果のみでは早期発見に有効なバイオマーカーの確立・治療の個別化の確立にまでは至らないが、その可能性を示すことができた。そのめざす将来像は以下の通りである。
  - 検診への血清バイオマーカーによる検診群の絞込み CT (や気管支鏡) を用いた精度の高い検診へ
  - 従来の病理組織学的評価・進行度評価 (TNM) に加えバイオマーカーによる腫瘍の生物学的評価を加味した治療法の選択
  - 個別症例での血清あるいは切除材料のバイオマーカー解析 手術法の選択 (標準術式か縮小手術か / 使用薬剤の選択 (効果予測・副作用予測) / 術後補助治療の必要性の判断 etc)

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 6 件)

Taizo Hibi, Taisuke Mori, Mariko Fukuma, Akinori Hashiguchi, Taketo Yamada, Minoru Tanabe, Koichi Aiura, Takao Kawakami, Atsushi Ogiwara, Tomoo Kosuge, Masaki Kitajima, Yuko Kitagawa and Michiie Sakamoto. Synuclein- $\gamma$  is closely involved in perineural invasion and distant metastasis in mouse models and is a novel prognostic factor in pancreatic cancer. Clinical Cancer Research, in press. (査読有)

Takao Kawakami, Junko Ozaki, Kazuhiro Kondo, Shinji Sato and Harunobu Yunokawa. Amino acid sequence database suitable for the protein and proteome analysis. Current Proteomics 5, 267-275, 2008. (査読有)

Junichi Maeda, Takashi Hirano, Atsushi Ogiwara, Shingo Akimoto, Takao Kawakami, Yousuke Fukui, Toshinori Oka, Yunbo Gong, Ran Guo, Hidehiro Inada, Kimitoshi, Nawa, Masakazu Kojika, Yasuhiro Suga, Tatsuo Ohira, Kiyoshi

Mukai, Harubumi Kato. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualization of postoperative therapy. *British Journal of Cancer* 98, 596-603, 2008. (査読有)

György Marko-Varga, Atsushi Ogiwara, Toshihide Nishimura, Takeshi Kawamura, Kiyonaga Fujii, Takao Kawakami, Yutaka Kyono, Hsiao-kun Tu, Hisae Anyoji, Mitsuhiro Kanazawa, Shingo Akimoto, Takashi Hirano, Masahiro Tsuboi, Kazuto Nishio, Shuji Hada, Haiyi Jiang, Masahiro Fukuoka, Kouichiro Nakata, Yutaka Nishiwaki, Hideo Kunito, Ian S. Peers, Chris G. Harbron, Marie C. South, Tim Higenbottam, Fredrik Nyberg, Shoji Kudoh, Harubumi Kato. Personalized medicine and proteomics - Lessons from non-small cell lung cancer. *Journal of Proteome Research*, 6(8), 2925-2935, 2007 (査読有)

Dejmek A, Naucler P, Smedjebäck A, Kato H, Maeda M, Yashima K, Maeda J, Hirano T. Napsin A (TA02) is a useful alternative to thyroid transcription factor-1 (TTF-1) for the identification of pulmonary adenocarcinoma cells in pleural effusions. *Diagn Cytopathol.* 35(8), 493-497, 2007 (査読有)

Hirano T, Kato H. Present status of clinical proteomic analysis for the early detection and determination of therapeutic strategy in lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 12:4-9, 2006 (査読無)

[学会発表](計 17 件)

川上隆雄, 荻原淳, 和田計也, 高見幸子, 永坂恵子, 尾辻真紀子, 田中直樹, 齋藤実, 秋元信吾, 加藤治文. バイオマーカー蛋白質の開発に向けた液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析データの統計解析手法の改良とその応用. 第 4 回日本臨床プロテオーム研究会, シンポジウム 1「非癌領域」, 2008 年 5 月 10 日, 大阪.

川上隆雄, 荻原淳. 疾患バイオマーカー開発のためのプロテオミクス: 網羅的な手法による探索結果を検証することの重要性. 第 56 回質量分析総合討論会, シンポジウム「医用分野における質量分析」, 2008 年 5 月 15 日, つくば.

Takao Kawakami, Atsushi Ogiwara. Statistical analyses of proteomic data for the clinical utility of protein biomarkers.

HUPO2008 7th World Congress, Amsterdam, Netherland, August 18 2008.

川上隆雄, 荻原淳, 和田計也, 高見幸子, 永坂恵子, 加藤治文, 平野隆. 蛋白質バイオマーカーの臨床使用に向けたプロテオームデータの統計解析手法の開発. 日本ヒトプロテオーム機構第 6 回大会, 2008 年 7 月 30 日, 大阪.

川上隆雄. 臨床応用へ向けた蛋白質バイオマーカーの探索と検証: プロテオミクスからのアプローチ. CBI 学会第 288 回研究講演会 (バイオインフォマティクスの最近の話題: 次世代シーケンサーデータ解析とプロテオミクスによるバイオマーカー探索), 2008 年 8 月 22 日, 東京.

Takao Kawakami, Atsushi Ogiwara, Kazuya Wada, Takashi Hirano, Harubumi Kato, Norihiko Ikeda. Discovery and validation of the protein biomarkers for tumor diagnosis: Differential analyses of the liquid chromatography/tandem mass spectrometry profiles from the tissue proteomes. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, Sapporo, August 28 2008.

川上隆雄, 荻原淳, 平野隆, 加藤治文. 組織プロテオームの液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析による腫瘍診断マーカー蛋白質の探索とその検証. 第 33 回日本医用マススペクトル学会, 2008 年 9 月 26 日, 東京.

川上隆雄, 荻原淳, 加藤治文. 質量分析より取得されるプロテオーム情報の高精度化, 第 3 回日本臨床プロテオーム研究会, 2007 年 4 月 28 日, 新宿.

平野 隆. 臨床応用に向けた肺癌のプロテオーム解析. 第 33 回日本肺癌学会北海道支部会 (特別講演), 2007 年 10 月 6 日, 札幌

平野 隆, 前田純一, 吉田浩一, 小鹿雅和, 坂田義詞, 佐治 久, 垣花昌俊, 藤岡 薫, 大平達夫, 坪井正博, 加藤治文. 原発性肺癌の術後治療の個別化に向けたプロテオーム解析の試み. 第 107 回日本外科学会定期学術集会, 2007 年 4 月 13 日, 大阪

平野 隆, 前田純一, 片場寛明, 小鹿雅和, 垣花昌俊, 本多英俊, 中嶋英治, 大平達夫, 坪井正博, 加藤治文. 臨床応用に向けた肺癌のプロテオーム解析. 第 48 回日本肺癌学会総会, 2007 年 11 月 8 日, 名古屋

Hirano T, Ohira T, Nomura M, Nishimura T, Nishiyama R, Fujii K, Bando Y, Mukai K, Kato H. Discovery of metastasis factors from in-depth proteomic analysis of formalin-fixed lung carcinoma tissues. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 3 2007, Yokohama

前田純一, 平野隆, 秋元信吾, 稲田秀洋, 大平達夫, 坪井正博, 荻原淳, 川上隆雄, 西村俊秀, 加藤治文. 1 期肺腺癌切除症例のプロテオーム解析 - UFT による術後補助化学療法との関係 -. 日本ヒトプロテオーム機構第 4 回大会, 第 2 回日本臨床プロテオーム研究会, 合同年会, 2006 年 7 月 18 日, 新宿.

平野 隆, 大平達夫, 前田雅弘, 荻原 淳, 秋元信吾, 西村俊秀, 加藤治文. 臨床応用を目指した肺癌のプロテオーム解析. 第 65 回日本癌学会学術総会, 2006 年 9 月 29 日, 横浜

平野 隆, 前田純一, 片場寛明, 野村将晴, 垣花昌俊, 梶原直央, 大平達夫, 坪井正博, 西村俊秀, 加藤治文. 肺癌個別治療をめざしたプロテオーム解析の現状. 第 44 回日本癌治療学会総会, 2006 年 10 月 19 日, 東京

平野 隆, 大平達夫, 荻原 淳, 秋元信吾, 羽田修二, 坪井正博, 加藤治文. チロシンキナーゼ阻害剤による薬剤生間質性肺炎のバイオマーカー探索. 第 12 回薬剤疫学学会総会. 2006 年 11 月 14 日, 横浜

Hirano T, Ogiwara A, Maeda J, Yoshida K, Fujioka K, Nomura M, Kakihana N, Kajiwara N, Ohira T, Tsuboi M, Kato H. Possibility of the prediction of an adverse effect (interstitial lung disease) by gefitinib (an interim report). The joint meeting of 3<sup>rd</sup> ISC International Conference on Cancer Therapeutics and the 11<sup>th</sup> International Symposium on Cancer Chemotherapy. December 6 2006, Tokyo

〔図書〕(計 4 件)

川上隆雄. Mascot - 蛋白質/プロテオーム解析における質量分析データと配列データベースの照合 -, 「改訂第 2 版 バイオデータベースとウェブツールの手取り足取り活用法」, 中村保一・石川淳・磯合敦・平川美夏・坊農秀雅 編集, 羊土社, pp. 188-199, 2007 年.

平野 隆. 肺がんにおけるプロテオーム解析 何をもたらすのか 文光堂・呼吸器 Common disease の診療 肺がんのすべて・36-38 頁・2007 年

平野 隆. プロテオミクスによる呼吸器疾患解析 医師薬出版・別冊医学のあゆみ 呼吸器疾患・67-69 頁・2007 年

平野 隆: プロテオミクス解析に基づく原発性肺癌のバイオマーカー探索, MOOK 肺癌の臨床 2005~2006 加藤治文, 西條長宏, 福岡正博, 小林紘一, 海老原善郎, 井内康輝, 早川和重 篠原出版新社, 東京, 75-80 頁, 2006 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

【発明の名称】手術後の予後を推定する方法及び診断キット【発明者】福井陽介, 荻原淳, 秋元信吾, 川上隆雄, 平野隆, 前田純一, 加藤治文【出願番号】PCT/JP2008/069289【国際出願日】2008 年 10 月 17 日.

〔その他〕(総説 3 件)

平野 隆: プロテオミクスを用いた肺癌の悪性度評価. 呼吸 25:472-475, 2006

平野 隆: 肺癌の早期診断とプロテオミクス: バイオマーカー探索の手法をみる. 分子呼吸器病 10:92-97, 2006

平野 隆: プロテオミクス解析の肺癌診療への応用とその課題 呼吸と循環 54, 1287-1292, 2006

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 隆 (HIRANO TAKASHI)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30238381

### (2) 研究分担者

大平 達夫 (OHIRA TATSUO)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40317847  
川上 隆雄 (KAWAKAMI TAKAO)  
東京医科大学・医学部・客員准教授  
研究者番号: 40366117  
加藤 治文 (KATO HARUBUMI)  
東京医科大学・名誉教授  
研究者番号: 20074768

### (3) 連携研究者

佐治 久 (SAJI HISASHI)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60420965  
西村 俊秀 (NISHIMURA TOSHIHIDE)  
東京医科大学・医学部・客員教授  
研究者番号: 40366092

