

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590892

研究課題名（和文） プロテオミクス技術を応用した網羅的発現解析による
肺癌関連タンパクの探索研究課題名（英文） Comprehensive protein expression profiling using proteomic
technologies to explorer lung cancer associated molecules

研究代表者

柳澤 聖 (YANAGISAWA Kiyoshi)

名古屋大学・高等研究院・特任講師

研究者番号：20372112

研究成果の概要：

肺癌組織を対象とした網羅的なタンパク質発現量解析とバイオインフォマティクス解析により、術後再発・予後に深く関与するタンパク質群の発見に成功した。また、タンパク質の発現制御に重要な役割を持つ肺癌関連マイクロRNAの探索を行い、染色体21q21.1欠失領域に存在するマイクロRNA (*miR-99a*, *let-7c*, *miR-125-b-2*) の肺癌における発現低下を明らかにした。さらには、質量分析装置を用いた網羅的蛋白質発現プロファイル解析により、13q31.3上に存在する肺癌関連 *miR-17-92* cluster が HIF1- α を標的とし、肺癌細胞増殖に深く関与する事を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、腫瘍マーカー、プロテオミクス、質量分析装置、バイオインフォマティクス、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

本研究課題で対象とする肺癌は、わが国の癌死亡原因の第1位を占め、今後も発症例の増加が確実である典型的な難治癌である。化学療法、放射線療法、外科療法、免疫療法などの集学的治療にも関わらず、環境因子・遺伝子異常などが関与するその発症メカニズムの複雑さゆえ、十分な治療効果が得られているとは言い難い現状である。このため、発

症・進展の詳細な機構を明らかにし、取得された研究成果を可及的速やかに実地臨床へ還元する事は、極めて重要であり、肺癌予後の大きな改善につながるものと期待される。

プロテオミクス技術を応用した医学研究の重要性・有用性は明らかであるが、世界的にみた腫瘍プロテオミクス研究に関する主要な報告は、限られた施設からのみである (Petricoin et al *Lancet* 2002, Sidransky et

al *J Natl Cancer Inst* 2003)。研究代表者は、同分野の世界的パイオニアの一つといえる成果を報告している (Yanagisawa et al *Lancet* 2003)。この様な先進的プロテオミクス研究は、臨床・基礎医学研究分野全体の推進に大きく貢献するものと期待されている。

近年、タンパクを規定していない僅か 20-25 塩基の RNA 分子であるマイクロ RNA 分子が、タンパク発現の精密な制御に極めて重要な役割を担っている事が明らかとなってきた。我々は、肺癌において、過剰発現を示すマイクロ RNA 遺伝子のクラスター (miR-17-92) を発見し、それが肺癌細胞の増殖に有利に働いている知見を得て報告している (Hayashita Y et al., *Cancer Res* 2005)。これらの報告は、ヒトの疾患とマイクロ RNA 分子の発現異常について機能的な役割にまで踏み込んだ数少ない報告である。近年、マイクロ RNA 分子の発現プロファイルが各種のヒト癌腫間で異なる事が報告される等 (Lim et al., *Nature* 2005)、マイクロ RNA 分子による発癌機構の解明は、極めて興味深い研究領域と言える。

2. 研究の目的

本研究では、わが国の癌死亡原因の第 1 位である肺癌を研究対象とし、世界的にも非常に先進的なプロテオミクス技術を応用・駆使した組織試料における網羅的タンパク発現解析と緻密なバイオインフォマティクス解析を統合解析する事により、

(1) 肺癌特異的発現タンパクの発見

(2) 相互に制御ネットワークを形成する、タンパク質とマイクロ RNA 分子の統合的制御異常の解明を目指した、肺癌関連マイクロ RNA 分子の標的タンパクの発見を目的とする。

本研究による、肺癌の臨床病態に深く関与するタンパク質の多面的解析によって取得される結果は、その発症・進展の分子機序解明に寄与する貴重な基盤情報になりうると期待される。

3. 研究の方法

5 年以上の術後フォローアップ、再発の有無と再発までの期間など精度が高く、充実した臨床情報と、種々のマーカー分子の変異解析や免疫染色像を含む高度な病理形態学的情報が付随した肺癌腫瘍組織及び正常肺組織試料を対象とする。

我々が確立し、現在運用中である先進的なプロテオミクス解析システムは、2 種類あり、その一つは MALDI 型質量分析装置を用いた、組織試料の直接的・網羅的タンパク発現解析システムである。加えて、多次元ナノ液体クロマトグラフィー+タンデムマスマスペクトロメトリーで構成され、さらに酵素消化後

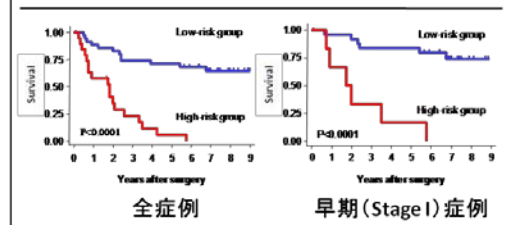
のペプチドラベリング技術 (iTRAQ 試薬: アプライドバイオシステムズ社製) を応用したシステムを運用している。本システムでは、微量試料を対象とし、複数検体 (最大 4 検体) 同時に、精密なタンパク発現量データを取得しつつ、タンパク質の同定を進める事が可能である。これにより、各回の実験において、内部標準試料の解析を行う事が可能となり、解析スピードを高めつつ、実験間の不可避免的な誤差を修正し、より精度の高い結果を取得することが可能となる。

4. 研究成果

(1) 肺癌特異的発現タンパク発現プロファイルの発見

ヒト肺癌組織試料を対象とした網羅的タンパク発現プロファイル解析を、MALDI 型質量分析装置を駆使する事により遂行し、取得されたデータを基盤情報として、様々なバイオインフォマティクス解析を行う事により、肺癌手術症例における術後再発、並びに予後に深く関与するタンパク発現プロファイルの抽出に成功した。さらには、抽出された肺癌臨床病態と関与の深いプロファイルから、術後再発・予後を予測可能な判別モデルの構築を行うため、さらなるバイオインフォマティクス解析を進め、高精度な予測モデルの構築に成功している (図 1)。これらの成果を、*J Natl. Can. Inst.* に報告している。

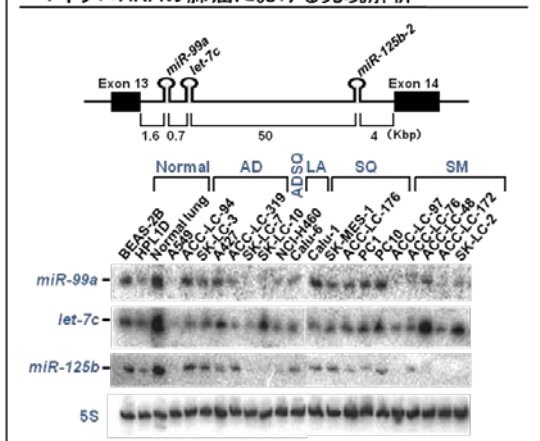
【図 1】MALDI 型質量分析装置を用いたプロテオミクス解析による肺癌予後(再発)予測



(2) 肺癌関連マイクロ RNA 分子の標的タンパクの発見

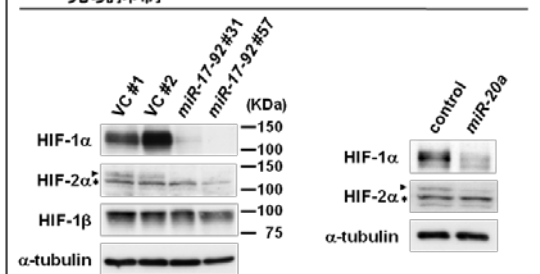
85 種類のヒト肺癌細胞株を用いて、染色体 21q21.1 領域に存在するホモ欠失に対する詳細な検討を進める事により、マイクロ RNA (*miR-99a*, *let-7c*, *miR-125-b-2*) を含む 3.4Mbp の範囲にまで欠失領域を限定化する事に成功した。これらのマイクロ RNA に加え、欠失領域内に存在する *SAMSN1* と *USP25* 遺伝子に対する発現解析を行った結果、全ての遺伝子について、ヒト肺癌組織・細胞株における発現低下が確認された (図 2)。以上の結果は、染色体 21q21.1 ホモ欠失領域に存在するマイクロ RNA を含む複数の遺伝子の機能障害が、肺癌の発症・進展に深く関与する可能性を示唆するものと考えた。これらの成果を、*Genes, Chromosomes and Cancer* に報告している。

【図2】染色体21q21.1ホモ欠失領域に存在するマイクロRNAの肺癌における発現解析



肺癌組織試料において高発現が認められ、細胞増殖能に深く関与する事を明らかとしていた 13q31.3 上に存在する miR-17-92 cluster が標的とするタンパク質の探索を、質量分析装置を用いた網羅的タンパク質発現プロファイル解析により進めた。その結果、HIF1- α が標的分子の一つである事を明らかとした (図3)。さらには、肺癌細胞の増殖に対して、miR-17-92 cluster/HIF-1 α /c-myc の形成する相互制御ネットワークが、重要な役割を担う事を明らかとした。これらの成果を、Cancer Research に報告している。

【図3】miR-17-92 clusterによるHIF-1 α の発現抑制



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Ayumu Taguchi, Kiyoshi Yanagisawa, Masaharu Tanaka, Ke Cao, Yasushi Matsuyama, Hidemi Goto and Takashi Takahashi, Identification of hypoxia-inducible factor as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster, Cancer Research, 68, 5540-5545, 2008、査読有
- ② Hideki Yamada, Kiyoshi Yanagisawa, Shogo Tokumaru, Ayumu Taguchi, Yuji Nimura, Hirotaka Osada, Masato Nagino, and Takashi Takahashi, Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at

21q11-21 in human lung cancer, Genes Chromosomes Cancer, 47, 810-818, 2008、査読有

③ Hisaaki Tanaka, Kiyoshi Yanagisawa, Keiko Shinjo, Ayumu Taguchi, Ken Maeno, Shuta Tomida, Yukako Shimada, Hirotaka Osada, Takayuki Kosaka, Hideo Matsubara, Tetsuya Mitsudomi, Yoshitaka Sekido, Mitsune Tanimoto, Yasushi Yatabe and Takashi Takahashi, Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1, Cancer Research, 67, 6007-6011, 2007、査読有

④ Kiyoshi Yanagisawa, Shuta Tomida, Yukako Shimada, Yasushi Yatabe, Tetsuya Mitsudomi, and Takashi Takahashi, A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer, J. National Cancer Institute, 99, 858-867, 2007、査読有

⑤ Hideo Matsubara, Toshiyuki Takeuchi, Eri Nishikawa, Kiyoshi Yanagisawa, Yoji Hayashita, Hiromichi Ebi, Hideki Yamada, Motoshi Suzuki, Masato Nagino, Yuji Nimura, Hirotaka Osada and Takashi Takahashi, Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92, Oncogene, 26, 6099-6105, 2007、査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 柳澤 聖、網羅的発現解析による新規ヒト肺癌転移関連遺伝子の同定と機能解析、第 67 回日本癌学会学術総会、2008. 10. 29、名古屋国際会議場
- ② 柳澤 聖、プロテオミクス解析技術を応用した呼吸器疾患関連分子の探索とその臨床応用、第 33 回日本医用マスペクトル学会年会、2008. 9. 26、東京大学医学部鉄門記念講堂
- ③ 柳澤 聖、肺癌発症・進展の分子機構の探索 第 48 回日本呼吸器学会学術総会、2008. 6. 17、神戸コンベンションセンター
- ④ YANAGISAWA Kiyoshi, Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1, 第 66 回日本癌学会学術総会、2007. 10. 5、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 聖 (YANAGISAWA Kiyoshi)
名古屋大学・高等研究院・特任講師
研究者番号：20372112

(2) 研究分担者

富田, 秀太 (TOMIDA Shuta)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 10372111