

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791405

研究課題名（和文）

タンパク質発現解析に基づいた骨軟部腫瘍バイオマーカーの大規模検証及び機能解析

研究課題名（英文）

Proteomics analyses of bone and soft tissue tumors

研究代表者

末原 義之（SUEHARA Yoshiyuki）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70509405

研究成果の概要（和文）：

我々は骨軟部腫瘍の新規バイオマーカーの開発を目的としたプロテオーム解析を行った。同定されたバイオマーカー候補タンパク質は、臨床応用を目的とした大規模検証と機能解析を行った。本研究では GIST, Ewing 肉腫、滑膜肉腫、骨肉腫と骨巨細胞種を中心に研究を行った。研究成果として我々はそれぞれの腫瘍にて予後関連タンパク質の同定に成功した。それらのタンパク質は多施設共同研究による大規模解析にてバイオマーカーとしての検証を行い、それぞれに高精度に予後予測が可能であることが確認された。また、それらのタンパク質は各腫瘍において機能解析が行い、一定の成果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We conducted proteomics approaches to discover novel biomarkers of bone and soft tissue tumors. Also, we tried to validate possibilities of the biomarker and the functions of the proteins in the each tumors for developing clinical applications. In this project, we focused on GIST, Ewing sarcoma, synovial sarcoma, osteosarcoma as well as giant cell tumor. In the results, we identified several proteins was candidates of biomarkers and have succeeded to confirm the power of biomarker in the each larger scale validation using multi-institutional cohorts. Also we also illuminated the functions of these proteins in the each tumors based on cell proliferation, interactive proteins, regulated proteins..

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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：整形外科学

キーワード：プロテオミクス、骨軟部腫瘍

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍の腫瘍マーカーは遺伝子技術の進歩により組織型特異的融合遺伝子が発見され、病理組織分類の補助診断マーカーとして大きく臨床に貢献することとなった。また、現在の肉腫における発現解析研究の中心は、mRNA レベルでの網羅的発現解析が中心に研究されて一定の成果をあげている。しかしながら、mRNA の発現は必ずしもタンパク質発現に相関しないという報告も多く存在して

おり、タンパク質レベルにおける腫瘍マーカーの開発にはタンパク質レベルにおける網羅的解析が不可欠と考える。研究代表者を中心とした国立がんセンター整形外科プロテオミクスグループは、2004 年より世界に先駆けて、骨軟部腫瘍各種において、予後予測マーカーや組織特異的マーカーの開発を目的としたタンパク質発現解析を行い、現在までに成果をあげてきた。特に、消化管間質腫瘍 (GIST) の予後予測マーカーである Pfetin、滑

膜肉腫の予後予測マーカーである SCR1 タンパク質の発見に成功してきた。

2. 研究の目的

本研究は骨軟部腫瘍の凍結検体を使用したプロテオーム解析を行うことで、(1)タンパク質発現の網羅的解析を行い、予後予測マーカーや組織特異的マーカーの開発を目的とし、(2) 各々の腫瘍にて同定された予後予測タンパク質に対しては、バイオマーカー(予後予測マーカー)としての可能性・有用性の検証を行った(特に、国内における多施設検証、及び Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC)を中心とした海外施設における大規模検証を軸とする。)(3)バイオマーカーとして有用と判断されたタンパク質、及びタンパク質発現プロファイリングで同定されたタンパク質の機能解析を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は特に GIST, 滑膜肉腫の凍結検体を使用したプロテオーム解析を行い

(1)各種予後予測マーカーの開発を目的とした大規模タンパク質発現解析による clinico-proteomic study

① 各種対象腫瘍よりタンパク質抽出を行う。

② 定量的なタンパク質発現プロファイルを作成しするために蛍光二次元電気泳動法(2D-DIGE)を使用し、その獲得データに対してテータマイニングを行う。

③ 検討項目ごとに重要と判断されたタンパク質スポットについては、質量分析計にて対応するタンパク質の同定を行う。

④ 同定されたタンパク質については特異抗体を使用し、Western-blotting 法、パラフィンブロックを使用した免疫染色にて発現を確認する。

⑤ 免疫染色にて発現差を確認できたタンパク質については、腫瘍マーカーとしての有効性を確認するために、解析に未使用のパラフィンブロックを新たに使用し、タンパク質発現を検証する。

(2)バイオマーカー(予後予測マーカー)の国内・海外施設における免疫染色等を用いた大規模検証: GIST 予後予測マーカーである Pfetin タンパク質、及び滑膜肉腫予後予測マーカーである SCR1 等のタンパク質について特異抗体を用いた免疫染色による検証等を行う。

(2-a)バイオマーカー(予後予測マーカー)の海外施設における大規模検証

海外大規模検証の中心施設であるMSKCCにおいて検証解析を行う。

(2-b)バイオマーカー(予後予測マーカー)の

国内多施設における大規模検証

国内における多施設共同研究のシステムとして既に、国立がんセンターを中心とする多施設共同研究「ゲノム・プロテオーム解析に基づく骨軟部腫瘍の分子病理把握とその臨床を目指す多施設共同研究」による、多施設間の大規模な検体・臨床情報の共有が可能な状態となっている。その多施設共同システムにのっとり検証解析を行う。

(3)GISTにおける Pfetin タンパク質及び滑膜肉腫における S タンパク質の機能解析

(3-a)免疫沈降等による関連タンパク質の同定とネットワークの解明

独自に作成した Pfetin 特異抗体及び SCR1 タンパク質特異抗体を使用した免疫沈降等の実験を行うことで関連タンパク質の同定を行い、各腫瘍の予後や癌化に関与するタンパク質ネットワークを解明する。

(3-b)関連タンパク質の腫瘍マーカー・治療ターゲットのとしての有用性の検証

共沈し同定された関連タンパク質は各腫瘍の新規予後予測マーカー・治療ターゲットタンパク質となる可能性があるため、それぞれの同定されたタンパク質は特異抗体を用いた Western-blotting 法・免疫染色による腫瘍マーカーとしての有用性の検証を行う。

4. 研究成果

(1)各種予後予測マーカーの開発を目的とした大規模タンパク質発現解析による clinico-proteomic study:

タンパク質発現解析を行い予後予測マーカーである Pfetin(KCTD12), KCTD10 及び DDX39(GIST)、SCR1(滑膜肉腫)、NP N1(Ewing 肉腫)の同定に成功し、骨肉腫の化学療法感受性マーカーとして PRDX2 を同定した。また予後予測マーカーは予後に有意に差があることを確認することに成功した。

(2)バイオマーカー(予後予測マーカー)の国内多施設における大規模検証:

タンパク質発現解析を行い同定した予後予測マーカーである Pfetin と DDX39(GIST)、Secernin-1(滑膜肉腫)、NPM1(Ewing 肉腫)タンパク質等について、特異抗体を用いた免疫染色による国内海外多施設研究を行い、それぞれのタンパク質の発現が予後に有意に差があることを確認することに成功し、予後予測マーカーとして有用であることを証明した。

(3)免疫沈降等による関連タンパク質の同定とネットワークの解明:

各種予後予測マーカーである GIST における Pfetin、Ewing 肉腫における NPM1 及び滑膜肉腫における Secernin-1 の各種特異抗体等及び細胞実験系を用いた免疫沈降等を行った。

その結果、各腫瘍の予後や癌化に関するタンパク質ネットワークデータの同定に成功した。現在解析中である。

また、それぞれのターゲットタンパク質(遺伝子)発現の強制抑制及び強制発現を行い、その状況下における細胞増殖能の観察と制御タンパク質の網羅的タンパク質のプロファイリングを行った(現在解析中)。

さらに GIST パラフィン固定検体より抽出した DNA を用いてメチル化修飾及び、シーケンスの行い解析を行い、Pfetin のある特定部位の ORF 変異が Pfetin タンパク質発現及び GIST の生命予後に特異的に関与していることを同定した。

(4) 骨巨細胞腫における p53 遺伝子変異の悪性転化への関与の可能性：悪性転化例を含む 30 例の骨巨細胞腫を対象とした p53 遺伝子変異検索及び GPX-1, CyclinD1, Ki-67 の免疫染色を行い、蛋白発現と臨床像との関連性の解析を行い、それらの遺伝子変異及びタンパク質発現が予後や再発に大きく関与していることを確認した。

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 17 件)

(1) Yoshiyuki Suehara, Maria Arcila, Marc Ladanyi, et al: Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. (Clin Cancer Res 2012 inpress) (1 番目 15 名 / 査読:有)

(2) Yoshiyuki Suehara, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, et al: Discovery of biomarkers for osteosarcoma by proteomics approaches (Sarcoma, 2012:425636) (1 番目 6 名 / 審査:有)

(3) Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Tadashi Kondo, et al: Validation Study on Pfetin and ATP-dependent RNA Helicase DDX39 as Prognostic Biomarkers in Gastrointestinal Stromal Tumour (Jpn J Clin Oncol, 2012 42(8): 730-41)(4 番目 12 名 / 審査:有)

(4) Taketo Okubo, Tsuyoshi Saito, Yoshiyuki Suehara, Kazuo Kaneko, et al: Intraneural lipomatous tumor of the median nerve: Three case reports with a review of literature (International Journal of Surgery Case Reports, 2012 3(9):407-411)(6 番目 12 名 / 審査:有)

(5) Tomoaki Torigoe, Yoshiyuki Suehara, Yasuo Yazawa, et al: Pedicle freezing with liquid nitrogen for malignant bone tumour in the radius: a new technique of osteotomy of the ulna. (Journal of orthopaedic surgery, 2012 20(1):98-102)(5 番目 12 名 / 審査:有)

(6) Kazutaka Kikuta, Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai, Tadashi Kondo, et al: Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor. (Journal of proteomics, 2012 75(4):1089-98)(7 番目 17 名 / 審査:有)

(7) Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo, et al: Secernin-1 as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics (Journal of proteomics, 2011 74(6): 829-42)(1 番目 15 名 / 審査:有)

(8) Yoshiyuki Suehara: Proteomic analysis of soft tissue sarcoma (International Journal of Clinical Oncology, 2011 16(2): 727-33) (1 番目 1 名 / 審査:有)

(9) Tsuyoshi Saito, Yoshiyuki Suehara, Takashi Yao, et al: A case of secondary malignant giant-cell tumor of bone with p53 mutation after long-term follow-up. (Hum Pathol. 2011 42(5): 727-33)(4 番目 11 名 / 審査:有)

(10) Tsuyoshi Saito, Yoshiyuki Suehara, Takashi Yao, et al: A case of de novo secondary malignant giant-cell tumor of bone with loss of heterozygosity of p53 gene that transformed within a short-term follow-up. (Pathology Research and Practice, 2011 207(10):664-9)(3 番目 8 名 / 審査:有)

(11) Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai and Tadashi Kondo, et al: Pfetin as a Prognostic Biomarker for Gastrointestinal Stromal Tumor: Validation Study in Multiple Clinical Facilities. (Jpn J Clin Oncol, 2011 41(10): 1194-1202)(10 番目 20 名 / 審査:有)

(12) Tomoaki Torigoe, Yoshiyuki Suehara, Yasuo Yazawa, et al: Metastatic Soft Tissue Tumors (Journal of Cancer Therapy, 2011 2(5): 746-751)(3 番目 6 名 / 審査:有)

(13) Tomoaki Torigoe, Yoshiyuki Suehara, Yasuo Yazawa, et al: The surgical Treatment and Outcome of Pathological Fracture in Patients with Giant Cell Tumor of Bone (Surgical Science, 2011 2(5):228-231)(3 番目 7 名 / 審査:有)

(14) Yoshiyuki Suehara, Tatsuya Takagi, Toshiharu Matsumoto, et al: Late recurrence of giant cell tumor of bone after adjuvant treatment. (Journal of Orthopaedic Surgery, 2010 18(1): 122-5)(1 番目 10 名 / 審査:有)

(15) Kazutaka Kikuta, Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo, et al: Pfetin as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Stromal Tumor: Novel Monoclonal Antibody and External Validation Study in Multiple Clinical Facilities. (Jpn J Clin Oncol, 2010 40(1): 60-72)(9 番目 12 名 / 審査:有)

(16) Kazutaka Kikuta, Yoshiyuki Suehara, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo, et al: Peroxiredoxin 2 as

a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics (Proteomics Clin Appl, 2010 4(5) 560-567) (8 番目 12 名 / 審査 : 有)

(17) Tomoaki Torigoe, Atsuhiko Terakado, Yoshiyuki Suehara, Hisashi Kurosawa, Tatsuya Takagi, Yasuo Yazawa: Bone versus soft-tissue sarcomas in the elderly. (Journal of Orthopaedic Surgery, 2010 18(1): 58-62)(3 番目 6 名 / 審査 : 有)

[学会発表] (計 14 件)

- (1) Yoshiyuki Suehara, Maria E. Arcila, Marc Ladanyi et al. ; *KIF5B-RET*: Discovery of a novel fusion oncogene in lung adenocarcinomas by a systematic screen for tyrosine kinase fusions and identification of patients for a RET targeted therapy trial. (American Society of Clinical Oncology - ASCO Annual Meeting, June 1-4, 2012, Chicago, USA) (1 番目 9 名 / 査読:有)
- (2) Tadashi Kondo, Daisuke Kubota, Hiroshi Ichikawa, Takashi Tajima, Kenta Mukaihara, Yutaka Sugihara, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Akira Kawai; PROTEOMIC APPROACH REVEALED NOVEL PROGNOSTIC BIOMARKERS IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR (GIST) (Connective Tissue Oncology Society, 2012 Annual Meeting, Nov 14-17, 2012, Prague, Czech Republic) (7 番目 9 名 / 査読:有)
- (3) Hiroshi Ichikawa, Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Tatsuo Kanda, Kazutaka Kikuta, Takashi Tajima, Kenta Mukaihara, Yutaka Sugihara, Akira Kawai, Tadashi Kondo; INTEGRATION OF PROTEOMIC AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS REVEALS THE DISTINCTIVE MOLECULAR BACKGROUNDS FOR GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR OF THE SMALL INTESTINE (Connective Tissue Oncology Society, 2012 Annual Meeting, Nov 14-17, 2012, Prague, Czech Republic) (3 番目 10 名 / 査読:有)
- (4) Daisuke Kubota, Tomohiro Fujiwara, Kenta Mukaihara, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Takashi Tajima, Hiroshi Ichikawa, Yutaka Sugihara, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Tadashi Kondo; CHEMO-RESPONSIVENESS PREDICTIVE BIOMARKER DISCOVERY FOR OSTEOSARCOMA USING MICRORNA-MICROARRAY;

(Connective Tissue Oncology Society, 2012 Annual Meeting, Nov 14-17, 2012, Prague, Czech Republic) (4 番目 11 名 / 査読:有)

- (5) Kenta Mukaihara, Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Takashi Tajima, Hiroshi Ichikawa, Yutaka Sugihara, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Tadashi Kondo; PROTEOMIC ANALYSIS IDENTIFIED LUNG METASTASIS-RELATED PROTEINS IN OSTEOSARCOMA (Connective Tissue Oncology Society, 2012 Annual Meeting, Nov 14-17, 2012, Prague, Czech Republic) (3 番目 10 名 / 査読:有)
- (6) Tatsuo Ito, Zhao Xinyang, Yoshiyuki Suehara, Hitoshi Ichikawa, Toshifumi Ozaki, Akira Kawai, Stephen D. Nimer, Marc Ladanyi; ROLE OF POST TRANSLATIONAL MODIFICATION OF THE RUNX2 TRANSCRIPTION FACTOR IN OSTEOSARCOMA (Connective Tissue Oncology Society, 2012 Annual Meeting, Nov 14-17, 2012, Prague, Czech Republic) (3 番目 8 名 / 査読:有)
- (7) Yutaka Sugihara, Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Takashi Tajima, Kenta Mukaihara, Kazutaka Kikuta, Hiroshi Ichikawa, Akira Kawai, Tadashi Kondo; PROTEIN EXPRESSION PROFILING OF PLEURAL EFFUSION IN MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA (Connective Tissue Oncology Society, 2012 Annual Meeting, Nov 14-17, 2012, Prague, Czech Republic) (3 番目 9 名 / 査読:有)
- (8) Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara, Takashi Tajima, Yutaka Sugihara, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Tadashi Kondo; Proteomic analysis identified lung metastasis-related proteins in osteosarcoma (Human Proteome Organisation (HUPO) 2012/9, Boston, U.S.) (2 番目 7 名 / 査読:有)
- (9) Tatsuo Ito, Yoshiyuki Suehara, Marc Ladanyi et al.: Role of post-translational modification of the RUNX2 transcription factor in osteosarcoma. (American Association for Cancer Research, 102nd Annual meeting, April 2-6, 2011, Orland, FL, USA) (3 番目 7 名 / 査読:有)
- (10) Yoshiyuki Suehara, Tatsuo Ito, Marc

Ladanyi: NUCLEOPHOSMIN
EXPRESSION DEFINES A MORE
AGGRESSIVE SUBSET OF EWING'S
SARCOMA (Connective Tissue
Oncology Society, 2011 Annual
Meeting, Oct 26-29, 2011, Chicago, IL,
USA) (1 番目 3 名 / 査読:有)

- (11) Daisuke Kubota, Yoshiyuki Suehara,
Tadashi Kondo et al.: PFETIN AS A
PROGNOSTIC BIOMARKER FOR
GASTROINTESTINAL STROMAL
TUMOR: VALIDATION STUDY IN
MULTIPLE CLINICAL FACILITIES
(Connective Tissue Oncology Society,
2011 Annual Meeting, Oct 26-29, 2011,
Chicago, IL, USA) (3 番目 15 名 / 査読:
有)
- (12) Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai,
Tadashi Kondo et al.: Secernin-1 as a
novel prognostic biomarker candidate
of synovial sarcoma revealed by
proteomics, (Connective Tissue
Oncology Society (CTOS) annual
meeting , 2010 November 11-13, Le
Meridien Etoile, Paris, France) (1 番目
15 名 / 査読:有)
- (13) 末原義之: パネルディスカッション: 基
礎研究の現状と診断: 骨軟部腫瘍におけ
るタンパク質発現解析; (第 45 回日本整
形外科学会・骨軟部腫瘍学術集会), 東
京 2012 年 7 月
- (14) 末原義之: パネルディスカッション: 骨・
軟部腫瘍の予後と治療における分子病理
学的アプローチ: 滑膜肉腫予後予測マー
カーの開発を目的としたプロテオーム解
析; (第 43 回日本整形外科学会・骨軟部
腫瘍学術集会), 東京 2010 年 7 月

〔図書〕 (計 1 件)

①末原義之, 鳥越知明: アトラス骨・関節画
像診断 4. 骨・軟部腫瘍 2010 p88-89

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末原義之 (Yoshiyuki SUEHARA)

順天堂大学 整形外科 助教

研究者番号: 70504905