

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25640076

研究課題名(和文) 翻訳後修飾シグネチャによる革新的肺がん分子病態診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular diagnosis methods of lung cancer by proteomic signature

研究代表者

柳澤 聖 (Yanagisawa, Kiyoshi)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20372112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的タンパク質発現解析と術後再発期間を含む詳細な臨床情報を基盤としたバイオインフォマティクス解析の結果、肺癌術後再発期間の診断に関して有用性が極めて高い4種類のタンパク質を見出すと共に、当該分子を対象とする精密定量解析系を構築した。これらの解析を駆使することにより、肺癌手術摘出組織検体を用いた当該分子の発現解析を行った。その結果に基づいて、術後5年以内に再発が確認された肺癌症例群と5年以上の術後観察期間中に再発もしくは原病による死亡が認められなかった肺癌症例群の判別を可能とする術後再発期間の精密予測法構築を完了した。

研究成果の概要(英文)：We obtained protein expression profiles from both lung cancer and normal lung specimens. Based upon the information as well as clinical information, we conducted bioinformatic analyses. The resulting proteomic signature could accurately predict both disease-free and overall survival. Accordingly, we have discovered a proteomic signature that can distinguish NSCLC patients with a high risk from those with a favorable prognosis.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：肺癌 プロテオミクス 分子診断

1. 研究開始当初の背景

肺がんは、国内年間死亡者数が 65,000 人以上にのぼる代表的な難治癌であり、国内のみならず多くの先進国においてもがん死因第一位を占め、その生存率は 10 年前と比較して殆ど向上しておらず、個別化医療の実現に対する期待・必要性は極めて高い。

研究代表者らは、先進的なプロテオミクス・バイオインフォマティクス技術を駆使したタンパク質発現プロファイルの網羅的・統合的な解析を推進し、がん臨床研究分野において多くの業績を有していた。

2. 研究の目的

タンパク質活性制御の根幹をなし、極めて重要な機能を持つにもかかわらず、既存の検査法では全く対象とされていない翻訳後修飾の網羅的精密定量法開発を推進し、極めて予後不良な肺がん症例の早期発見や病態診断を可能とし飛躍的な生存率向上の実現に貢献する“翻訳後修飾シグネチャ”に基づいた次世代型高精度分子診断法の確立を目指している。

3. 研究の方法

先進的なプロテオミクス技術を基盤として、詳細な臨床情報の付帯する非小細胞肺癌手術症例 173 症例を対象として、摘出された肺がん組織中の翻訳後修飾タンパク質発現解析を推進し、肺がん臨床病態診断マーカー候補となる修飾タンパク質群の網羅的同定を行う。

取得された結果に基づき、革新的な発展性を有するプロテオミクス技術を駆使して、肺がん臨床病態関連翻訳後修飾タンパク質群全てに対する個別の精密絶対定量法を確立する。肺がん組織試料を対象とした修飾タンパク質精密絶対定量解析を遂行し、取得された発現情報に対して、先進的なバイオインフォマティクス解析を行うことにより、肺がん病態分子診断シグネチャを確立し、その臨床応用を目指す。

4. 研究成果

肺癌手術摘出組織 173 検体、さらには正常肺 90 検体を対象として、ペプチド標識技術と質量分析装置を応用した網羅的かつ定量的なタンパク質発現解析を遂行した。その結果、肺組織中に存在が確認出来る 10,000 種類以上ものタンパク質群を同定する事に成功した。この基盤情報は、今後の肺癌、さらには肺疾患の発症進展に寄与するタンパク質群の特定に際して、極めて有用であると考えられる事から、そのリストを公表することとし、準備を進めている。

本研究課題で解析対象とした肺癌症例群には、術後再発期間・死亡原因などを含む極めて詳細な臨床情報が付帯している事から、これらの臨床情報を基盤情報のタンパク質発現解析結果と統合し、先進的なバイオインフォマティクス解析を進めた結果、肺癌の術後再発期間と関連性を認める 800 種類以上のタンパク質群を同定することに成功した。これらの肺癌細胞の生物活性あるいは肺癌臨床病態と深く関連する事が示唆される分子群について、機能的重要性に関する情報を得ることを目的として、GO term 解析を並行して行った。その結果から、肺癌の術後再発期間に影響を与える事が示唆される分子機序として、細胞周期、アポトーシス、細胞運動性を制御する分子機構に加えて、タンパク質間相互作用、エネルギー代謝、酵素活性を規定する分子機能語彙が多数含まれる事が

表 臨床情報

| | | |
|-----|---------|-------------|
| 総数 | | 173 |
| 年齢 | ≤63 | 95 (54.9%) |
| | >63 | 78 (45.1%) |
| 性別 | 男性 | 117 (67.6%) |
| | 女性 | 56 (32.4%) |
| 喫煙歴 | 非喫煙者 | 60 (34.7%) |
| | 喫煙者・禁煙者 | 113 (65.3%) |

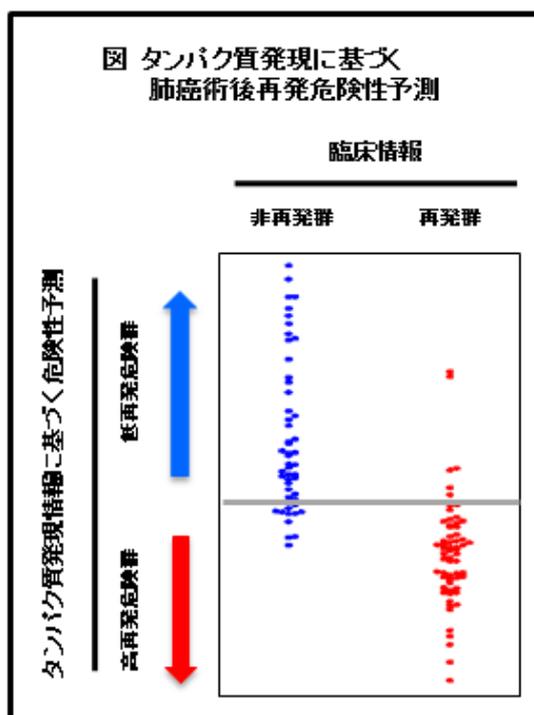
明らかとなり、肺癌の生物活性に関して極めて重要な知見を得ることに成功した。

表 GO term 解析結果
カットオフ値: FDR < 0.001

| Term | P Value | FDR |
|---|----------|----------|
| protein binding | 3.19E-39 | 5.15E-36 |
| catalytic activity | 7.76E-30 | 1.25E-26 |
| nucleotide binding | 2.69E-25 | 4.35E-22 |
| structural constituent of ribosome | 8.22E-23 | 1.33E-19 |
| purine nucleotide binding | 1.73E-18 | 2.79E-15 |
| ribonucleotide binding | 5.06E-18 | 8.16E-15 |
| purine ribonucleotide binding | 5.06E-18 | 8.16E-15 |
| RNA binding | 3.85E-16 | 5.33E-13 |
| nucleoside binding | 1.51E-15 | 2.51E-12 |
| purine nucleoside binding | 1.79E-15 | 2.86E-12 |
| adenyl nucleotide binding | 5.20E-15 | 8.42E-12 |
| adenyl ribonucleotide binding | 1.56E-14 | 2.51E-11 |
| ATP binding | 2.50E-14 | 4.03E-11 |
| binding | 5.61E-13 | 9.05E-10 |
| structural molecule activity | 6.61E-13 | 1.07E-09 |
| oxidoreductase activity | 1.05E-12 | 1.69E-09 |
| nucleoside-triphosphatase activity | 1.90E-11 | 3.06E-08 |
| pyrophosphatase activity | 2.38E-11 | 3.84E-08 |
| hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides | 2.94E-11 | 4.73E-08 |
| threonine-type peptidase activity | 3.71E-11 | 5.99E-08 |
| threonine-type endopeptidase activity | 3.71E-11 | 5.99E-08 |
| hydrolase activity, acting on acid anhydrides | 3.84E-11 | 6.20E-08 |
| cofactor binding | 3.27E-09 | 5.27E-06 |
| single-stranded DNA binding | 1.36E-08 | 2.19E-05 |
| structure-specific DNA binding | 3.71E-08 | 5.99E-05 |
| ATPase activity | 5.59E-08 | 9.01E-05 |
| coenzyme binding | 8.16E-08 | 1.32E-04 |
| hydrogen ion transmembrane transporter activity | 1.81E-07 | 2.91E-04 |
| hydrolase activity | 2.46E-07 | 3.97E-04 |
| oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor | 4.30E-07 | 6.93E-04 |
| aminoacyl-tRNA ligase activity | 5.98E-07 | 9.65E-04 |
| ligase activity, forming aminoacyl-tRNA and related compounds | 5.98E-07 | 9.65E-04 |
| ligase activity, forming carbon-oxygen bonds | 5.98E-07 | 9.65E-04 |

これらの機能的にも重要性が示唆される肺癌術後予後関連タンパク質群を対象として、質量分析装置を活用したタンパク質非標識精密定量解析系の構築を進めた。この過程では、個々のタンパク質に特有の解析メソッドの設定が、精密な定量を遂行するために極めて重要であるが、取得したタンパク質発現プロファイルデータをデータベース化し、これらの基盤情報を最大限に活用することにより、標

的タンパク質群に対する解析メソッドの設定を効率的に遂行することに成功した。さらに、バイオインフォマティクス技術を活用して、肺癌術後再発期間との関連性が極めて高いタンパク質群の絞り込みを行った結果、統計学的な有意性ランキングトップ30タンパク質を解析対象とすることで、研究推進の加速化実現につながる事が示唆された。このことから、これら30タンパク質を対象とした発現解析を遂行し、プロファイル情報に基づいたバイオインフォマティクス解析を進めたところ、術後再発危険性の高い肺癌症例を判別可能である事が示唆される結果が得られた。そこで、実臨床への応用を念頭に置き、肺癌手術症例を、術後5年以内に再発が確認された症例群と5年以上の術後観察期間中に再発もしくは原病による死亡が認められなかった症例群の2群に分けて、バイオインフォマティクス技術を駆使してタンパク質発現情報に基づく判別モデルの構築を進めた結果、実際に再発が認められた肺癌症例の90%以上が術後再発危険群と予測されるという、高い診断精度が得られる事を確認した。



さらに、判別精度の確認に用いられた症例群とは独立した症例群を用いることにより、さらなる検証を進めた結果、同程度の診断精度が得られる事を確認した。

以上の結果は、本研究課題で検討を進めた解析法が、新たな肺癌分子診断法の開発に繋がる可能性を示唆するものと期待される。

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 7 件)

Liu Z, Yanagisawa K, Griesing S, Iwai M, Kano K, Hotta N, Kajino T, Suzuki M, and Takahashi T. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. *Oncogene* 査読有、in press. doi: 10.1038/onc.2016.524.

Tai MC, Yanagisawa K, Nakatochi M, Hotta N, Hosono Y, Kawaguchi K, Naito M, Taniguchi H, Wakai K, Yokoi K, Takahashi T. Blood-borne miRNA profile-based diagnostic classifier for lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* 査読有、6: 31389, 2016. doi: 10.1038/srep31389.

ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. *Nat Commun.* 査読有、7:10060, 2016. doi: 10.1038/ncomms10060.

Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. Ida L, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y,

Suzuki M, Takahashi T. *Cancer Sci.* 査読有、107:155, 2016. doi: 10.1111/cas.12858.

Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. Suzuki M, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Yanagisawa K, Togawa N, Shiraishi T, Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Igarashi Y, Inokuchi J, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Nakamura M, Kyogashima M, Takahashi T. *J Clin Invest.* 査読有、126:254, 2016. doi: 10.1172/JCI79775.

miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C, Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe Y, Yanagisawa K, Takahashi T. *Carcinogenesis.* 査読有、36:1464, 2015. doi: 10.1093/carcin/bgv152.

Lung adenocarcinoma subtypes definable by lung development-related miRNA expression profiles in association with clinicopathologic features. 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. *Carcinogenesis.* 査読有、35:2224, 2014. doi: 10.1093/carcin/bgu127.

[学会発表](計 3 件)

Yanagisawa K. Proteomic Identification of Malignant Pleural Mesothelioma Related Molecules. 14th Human Proteome Organization World Congress 2015年9月27-30日バンクーバー市(カナダ)
Yanagisawa K, Kawahara T, Ozawa Y, Hotta N, Nagino M and Takahashi T. Proteomic

analyses for biomarker discovery in human pancreatic cancer. 13th HUPO World Congress 2014年10月5-8日 マドリッド市(スペイン).

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回日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 聖 (YANAGISAWA Kiyoshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20372112

(2) 研究分担者 なし