

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861342

研究課題名(和文)骨軟部腫瘍の新規治療法開発を目的としたプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic 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・准教授

研究者番号：70509405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨軟部腫瘍の各組織型においてタンパク質発現プロファイリング構築とバイオマーカー開発を行った。同定されたバイオマーカー候補タンパク質は、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、類上皮肉腫を中心に研究を行った。研究成果として複数の予後関連・薬剤関連タンパク質の同定に成功した。それらの同定タンパク質は大規模解析にてバイオマーカーとしての有用性が確認された。それらの同定タンパク質の機能解析では、各腫瘍において悪性度・治療抵抗性の機能解明を行った。組織型特異的融合遺伝子に関わるタンパク質発現解析を行い、融合遺伝子タンパク質発現プロファイリング構築を行った。

研究成果の概要(英文)：We conducted proteomics analyses to generate the protein profiles regarding bone and soft-tissue tumors (BST) and discover novel biomarkers of BST. We performed validation and functional studies for identified proteins that were candidate biomarkers. In this project, we focused on GIST, Ewing sarcoma, synovial sarcoma, osteosarcoma as well as epithelioid sarcoma. In the results, we identified several proteins which were candidates of biomarkers including prognosis and chemo-sensitivities. We also succeeded to validate the power of biomarker in the each larger cohort as validation studies. And we succeeded to elucidate functions regarding malignancies and chemo-resistances as functional studies. Furthermore, we conducted proteomics analyses to generate the protein profiles regarding histological specific fusion genes in BST.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 タンパク質発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍の治療成績は、有効な化学療法等の導入によって著明に改善されてきたが、化学療法の効果が不十分な症例及び初診時転移例の予後は依然極めて不良である。骨軟部腫瘍のさらなる治療成績向上のためには、(1)これら治療抵抗性のメカニズムや生命予後を規定する因子の解明、(2)オーダーメイド医療のための新たなバイオマーカーの開発や分子標的治療法のための新たなターゲットの開発が必要である。

現在までの肉腫における発現解析研究の中心は、DNA 及び 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、翻訳後修飾を含むタンパク質特異的状況等より、DNA 及び 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。

以上より本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の研究目的は、

- (1)骨軟部腫瘍の網羅的タンパク質発現解析によるバイオマーカー候補の同定、
- (2)同定された予測タンパク質に対しては、バイオマーカーの臨床応用を目的とした大規模検証、
- (3)その同定された予測関連タンパク質の機能解明、
- (4)骨軟部腫瘍特異的組織型特異的融合遺伝子発現に基づいたタンパク質発現プロファイリングの構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 骨軟部腫瘍の凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析：

各種骨軟部腫瘍の凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析を行いタンパク質発現プロファイリングの獲得を行った。

タンパク質を抽出された上記検体全例で臨床病理学データを確認すると共に、既存の融合遺伝子及び腫瘍特異的遺伝子の発現確認を行った。

定量的なタンパク質発現プロファイルを作成するためにタンパク質は i-TRAQ 法及び 2D-DIGE 法で解析を行った。

その獲得されたタンパク質発現プロファイルについては、各検討項目ごとの比較を行い、発現差の大きな重要と考えられるタンパク質を選出・同定した。

また、同時に IPA などを使用したネットワーク解析を行い、各検討項目に対してタンパ

ク質ネットワーク解析を行った。

同定されたタンパク質については上端プロット・免疫染色にて発現を確認した。

(2) バイオマーカーの臨床応用を目的とした大規模免疫染色検証：

各種骨軟部腫瘍のタンパク質発現プロファイリングで同定された予後・治療予測関連タンパク質の発現検証を行った。

使用する骨軟部腫瘍凍結臨床検体・パラフィンブロック臨床検体の臨床病理学データを確認と共に融合遺伝子及び腫瘍特異的遺伝子の発現を確認した。

同定されている予後予測マーカーである GIST (KCTD12, KCTD10, DDX39)、滑膜肉腫 (SCRN1)、Ewing 肉腫 (NPM1)、類上皮肉腫 (CAPZB)、骨肉腫 (PRDX ファミリー) に対して検証を行った。

その免疫染色等の発現結果を臨床情報と共に単変量・多変量解析を行い、バイオマーカーとしての能力・有効性を検証した。

(3) 同定タンパク質の機能解析：

同定されている候補タンパク質である GIST (KCTD12)、滑膜肉腫 (SCRN1)、Ewing 肉腫 (NPM1)、類上皮肉腫 (CAPZB) に対して検証を行った。

同定タンパク質発現抑制及び強制発現による細胞増殖の観察とその状況下における網羅的タンパク質発現解析を行った。

各タンパク質発現を統計学的手法及びネットワーク解析を行った。

各種細胞系においてその同定タンパク質・主流ネットワークの発現抑制及び強制発現させ、細胞増殖を観察した。

(4) 組織型特異的融合遺伝子発現に基づいた網羅的タンパク質発現解析：

Ewing 肉腫、滑膜肉腫、横紋筋肉腫を中心に融合遺伝子発現に関連したタンパク質発現プロファイリングの獲得を行った。

各種腫瘍細胞系において融合遺伝子の発現を確認した。

融合遺伝子発現の抑制下における制御タンパク質の発現プロファイルを i-TRAQ 法を用いて獲得した。

## 4. 研究成果

(1) 骨軟部腫瘍の凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析：

GIST、滑膜肉腫、Ewing 肉腫、類上皮肉腫、骨肉腫に対してタンパク質発現解析を行った。それぞれのタンパク質発現プロファイリングを獲得した。GIST (KCTD12, KCTD10, DDX39)

滑膜肉腫 (SCRN1)、Ewing 肉腫 (NPM1)、類上皮肉腫 (CAPZB)、骨肉腫 (PRDX ファミリー) を同定した。

(a)GIST の KCTD12 について:

現在までの研究に引き続きとして GIST の凍結検体約 20 例で予後に関連するタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で KCTD12 に注目して発現検証実験を進めた。小規模な検証セットにて発現検証に成功したため、(2)における大規模検証に移行した。

(b)GIST の KCTD10 について:

現在までの研究に引き続きとして GIST の凍結検体約 20 例で予後に関連するタンパク質同定をタンパク質発現解析及び遺伝子発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で KCTD10 に注目して発現検証実験を進めた。小規模な検証セットにて発現検証に成功したため、(2)における大規模検証に移行した。

(c)GIST の DDX39 について:

現在までの研究に引き続きとして GIST の凍結検体約 20 例で予後に関連するタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で DDX39 に注目して発現検証実験を進めた。小規模な検証セットにて発現検証に成功したため、(2)における大規模検証に移行した。

(d)滑膜肉腫の SCRN1 について:

現在までの研究に引き続きとして滑膜肉腫の凍結検体約 20 例で予後に関連するタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で SCRN1 に注目して発現検証実験を進めた。小規模な検証セットにて発現検証に成功したため、(2)における大規模検証に移行した。

(e) Ewing 肉腫の NPM1 について:

現在までの研究に引き続きとして Ewing 肉腫の凍結検体約 20 例で予後に関連するタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で NPM1 に注目して発現検証実験を進めた。小規模な検証セットにて発現検証に成功したため、(2)における大規模検証に移行した。

(f) 類上皮肉腫の CAPZB について:

類上皮肉腫の凍結検体約 10 例で腫瘍特異的タンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で CAPZB に注目して発現検証実験を進めた。発現検証に成功したため、(2)における検証に移行した。

(g)骨肉腫の PRDX ファミリーについて:

現在までの研究に引き続きとして骨肉腫の凍結検体約 20 例で化学療法奏功性に関連するタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。それら検体より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。その中で PRDX2 に注目して発現検証実験を進めた。発現検証にも成功した。

(2) バイオマーカーの臨床応用を目的とした大規模免疫染色検証:

GIST (KCTD12, KCTD10, DDX39)、滑膜肉腫 (SCRN1)、Ewing 肉腫 (NPM1)、類上皮肉腫 (CAPZB) に対して行った。GIST (KCTD12, KCTD10, DDX39)、滑膜肉腫 (SCRN1)、Ewing 肉腫 (NPM1) に対して有意差を認めた。

(a)GIST の KCTD12 について:

現在までの研究に引き続き、GIST の KCTD12 について多施設検証として約 100 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 KCTD12 の発現により有意差を持って GIST の予後の予測が可能であった。

(b)GIST の KCTD10 について:

現在までの研究に引き続き、GIST の KCTD10 について約 100 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 KCTD10 の発現により有意差を持って GIST の予後の予測が可能であった。

(c)GIST の DDX39 について:

現在までの研究に引き続き、GIST の DDX39 について約 100 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 DDX39 の発現により有意差を持って GIST の予後の予測が可能であった。

(d)滑膜肉腫の SCRN1 について:

現在までの研究に引き続き、滑膜肉腫の SCRN1 について多施設検証として約 50 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 SCRN1 の発現により有意差を持って滑膜肉腫の予後の予測が可能であった。

(e)Ewing 肉腫の NPM1 について:

現在までの研究に引き続き、Ewing 肉腫の NPM1 について多施設検証として約 50 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 NPM1

の発現により有意差を持って Ewing 肉腫の予後の予測が可能であった。

(f) 類上皮肉腫の CAPZB について:

類上皮肉腫の CAPZB について約 20 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 CAPZB の発現により臨床病理学的差は認めなかった。

(3) 同定タンパク質の機能解析:

同定されている候補タンパク質である GIST (KCTD12)、滑膜肉腫 (SCRN1)、Ewing 肉腫 (NPM1)、類上皮肉腫 (CAPZB) に対して検証を行った。機能一部解明に成功した。

(a) GIST の KCTD12 について:

GIST の KCTD12 について機能解析を行った。GIST 培養細胞系で KCTD12 を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と KCTD12 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成を行った。KCTD12 が GIST の細胞増殖に関与していることを同定した。また GIST の腫瘍遺伝子である c-kit の発現に関連を持ちながら KCTD12 は発現していることが解明された。GIST における KCTD12 関連タンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成に成功した。それらプロファイリングを活用してネットワーク解析を行い主要パスウェイのデータ構築を行った。

(b) 滑膜肉腫の SCRN1 について:

滑膜肉腫の SCRN1 について機能解析を行った。滑膜肉腫培養細胞系で SCRN1 を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と SCRN1 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成を行った。SCRN1 が滑膜肉腫の細胞増殖に関与していることを同定した。滑膜肉腫における SCRN1 関連タンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成に成功した。

(c) Ewing 肉腫の NPM1 について:

Ewing 肉腫の NPM1 について機能解析を行った。Ewing 肉腫培養細胞系で NPM1 を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と NPM1 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成を行った。NPM1 が Ewing 肉腫の細胞増殖に関与していることを同定した。また Ewing 肉腫の腫瘍遺伝子である EWS/FLI1 の発現に相関を持ちながら NPM1 は発現していることが解明された。Ewing 肉腫における NPM1 関連タンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成に成功した。それらプロファイリングを活用してネットワーク解析を行い主要パスウェイのデータ構築を行った。その結果 MYC パスウェイなどが重要であることが示唆されたため、細胞系を用いてそのパスウェイの検証したところ悪性度や NPM1 の発現に相関を認めた。

(d) 類上皮肉腫の CAPZB について:

類上皮肉腫の CAPZB について機能解析を行った。類上皮肉腫培養細胞系で CAPZB を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と CAPZB 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成を行った。NPM1 が類上皮肉腫の細胞増殖に関与していることを同定した。類上皮肉腫における CAPZB 関連タンパク質・遺伝子発現プロファイリングの作成に成功した。それらプロファイリングを活用してネットワーク解析を行い主要パスウェイのデータ構築を行った。その結果、類上皮肉腫の腫瘍抑制伝子である INI1 欠損に関係を持ちながら CAPZB は発現していることが解明された。

(4) 組織型特異的融合遺伝子発現に基づいた網羅的タンパク質発現解析:

特に EWS/FLI1 (Ewing 肉腫)、SYT/SSX (滑膜肉腫) について、タンパク質発現プロファイリングを獲得した。

(a) 滑膜肉腫の SCRN1 について:

滑膜肉腫培養細胞系を用いて SYT/SSX に関わるタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。滑膜肉腫培養細胞系で SYT/SSX を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と SYT/SSX 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングを行った。それら解析より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。

(b) Ewing 肉腫の EWS/FLI1 について:

Ewing 肉腫培養細胞系を用いて EWS/FLI1 に関わるタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。Ewing 肉腫培養細胞系で EWS/FLI1 を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と EWS/FLI1 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングを行った。それら解析より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。

(b) 横紋筋肉腫の PAX3/FOXO1 について:

横紋筋肉腫培養細胞系を用いて PAX3/FOXO1 に関わるタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。横紋筋肉腫培養細胞系で PAX3/FOXO1 を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と PAX3/FOXO1 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングを行った。それら解析より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。

(d) GIST の c-kit について:

GIST 培養細胞系を用いて c-kit に関わるタンパク質同定をタンパク質発現解析の手法を用いて行った。GIST 培養細胞系で c-kit を発現調整し、細胞増殖などの影響評価と c-kit 動態に関わるタンパク質・遺伝子発現プロファイリングを行った。それら解析より約 1500-2000 のタンパク質発現プロファイリングを獲得した。

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 28 件)  
全論文査読有り

1. Akaike K, Kurisaki-Arakawa A, Hara K, Suehara Y, Takagi T, Mitani K, Kaneko K, Yao T, Saito T. Distinct clinicopathologic features of NAB2-STAT6 fusion gene variants in solitary fibrous tumor with emphasis on the acquisition of highly malignant potential. (Hum Pathol. 2015 46(3):347-56)
2. Mukaihara K, Kubota D, Yoshida A, Asano N, Suehara Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Proteomic Profile of Epithelioid Sarcoma (Journal of Proteomics & Bioinformatics 2014 7: 158-165)
3. Suehara Y, Kubota D, Saito T. Tissue Sample Preparation for Biomarker Discovery (Methods in Molecular Biology, 2013 1002:13-23)
4. Suehara Y, Kohsaka S, Kubota D, Mukaihara K, Akaike K, Mineki R, Fujimura T, Kaneko K, Ladanyi M, Saito T, Kondo T. Proteomic technologies to develop biomarkers and functional analyses for bone and soft tissue tumors (Journal of Proteomics & Bioinformatics 2013 pbs3001-13)
5. Kubota D, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Okubo T, Saito T, Orita H, Sato K, Taguchi T, Yao T, Kaneko K, Katai H, Kawai A, Kondo T: Gene expression network analysis of ETV1 reveals KCTD10 as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor. (PLoS ONE. 2013; 8(8): e73896.)

〔学会発表〕(計 29 件)

1. Suehara Y, Ishii M, Akaike K, Mukaihara K, Kubota D, Okubo T, Takagi T, Yao T, Kaneko K, Saito T. Clinicopathological and functional analyses of protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha mutations in gastrointestinal stromal cell tumors. European Society For Medical Oncology - ASIA, December 18 - 21, 2015, Singapore,
2. 末原義之: 新たな創薬へ 骨・軟部腫瘍の新規治療法開発を目的としたプロテオーム解析\_シンポジウム ゲノムビッグデータとバイオインフォマティクス 新たな創薬へ (第 30 回日本整形外

科学会・基礎学術集会)富山市 2015 年 10 月 22-23 日

3. 末原義之: 骨軟部腫瘍のプロテオーム解析 (第 73 回日本癌学会) 東京、2015 年 9 月 25- 27 日
4. Suehara Y, Kohsaka S, Mukaihara K, Akaike K, Ishii M, Kubota D, Kazuno S, Mineki R, Fujimura T, Kaneko K, Ladanyi M, Saito T. Proteomic approaches for defining the protein profiles of EWS/FLi1 in Ewing's sarcomas. the 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society March 28-31 2015, Las vegas USA
5. Mukaihara K, Kubota D, Suehara Y, Akaike K, Ishii M, Kohsaka S, Kaneko K, Saito T: Functional analysis of F-actin capping protein subunit beta in epithelioid sarcomas. Connective Tissue Oncology Society, 2014 Annual Meeting, October 15-18, 2014, Berlin, Germany
6. 末原義之: 分子標的治療薬の時代へ ; Ewing's 肉腫における EWS/FLI1 融合遺伝子の i-TRAQ 解析 (プロテオーム解析); (第 47 回日本整形外科学会・骨軟部腫瘍学術集会), 大阪 2014 年 7 月 17-18 日

〔図書〕(計 3 件)

1. 窪田大介、末原義之:【肉腫研究・診療の最前線-bench-to-bedside】肉腫橋渡し研究の最前線(2):プロテオーム解析 - 骨軟部腫瘍とプロテオミクス - 医学のあゆみ 2015 年 7 月 254 巻 4 号 (271-275)
2. 末原義之、齋藤 剛、赤池 慶祐:【放っておいてはいけない『しこり・こぶ・腫れ』】軟部腫瘍における遺伝子・タンパク質の解析 - なぜ基礎研究は重要か - Orthopaedics. 全日本病院出版会 28 巻 6 号 (71-80) (2015.06)
3. 向井原健太、末原義之:「骨軟部腫瘍において治療標的チロシンキナーゼ (Tyrosine Kinase) と阻害剤が果たす役割とその現状について」癌と化学療法 癌と化学療法社 2015 年 42 巻 3 号 (296-300)

6. 研究組織

(1)研究代表者

末原 義之 (Yoshiyuki SUEHARA)  
順天堂大学 医学部 准教授  
研究者番号 : 70504905