

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08928

研究課題名(和文)血清高感度肺がんバイオマーカーの同定と新規治療標的分子の臨床応用

研究課題名(英文)Clinical application of high sensitive biomarker and therapeutic target for lung cancer

研究代表者

高野 淳 (Atsushi, Takano)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：50582607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：URST1は、肺がん、口腔がん、乳がんのいずれにおいても、がんで高発現し、siRNAにてURST1を抑制するとG2/M arrestによりがん細胞の増殖を抑制した。免疫組織染色での検討では、上記がんのいずれにおいて予後マーカーであった。URST1に対する阻害剤をによりがん細胞の増殖が有意に抑制され治療薬として有望であった。KIF11も口腔がんが高発現し、がんを増殖させること、阻害剤によりがん細胞の増殖抑制効果を確認できたため、論文報告をおこなった。高感度マーカーの探索として、肺がん患者20症例について、がん組織とエクソソーム中のURST1 mRNA濃度を同時に測定し、高頻度に検出しえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の候補を含めて、約10種類の前兆マーカー、治療標的分子について研究を進めており、阻害剤を用いたin vitroの検討において、がんの増殖抑制効果を確認できており、治療可能性が低い進行がんの治療、延命に向けて有効な治療法のひとつとなりうると考えられる。また、予後マーカーを用いて予後を予測することで高危険度群の選別して、徹底した経過観察、治療強度の選択の一助になるものと考えられる。血清中Exosomeを抽出しmRNA、タンパクを検出することは、これまでのバイオマーカーの検出限界を超えうるものである。新規治療薬、早期診断により、効果的な治療計画を選択すれば、医療費の削減にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical staining showed that URST1 expression was observed in the majority of lung cancer, oral cancer and breast cancer. URST1 expression was associated with poor prognosis for cancer patients. Reduction of URST1 expression by siRNA for URST1 (si-URST1) significantly suppressed growth of cancer cells through G2/M arrest. In addition, exposure of cancer cells to selective URST1 inhibitor suppressed the cell growth. In addition, we revealed that KIF11 was prognostic factor for oral cancer. si-KIF11 and KIF11 inhibitor suppressed the growth of cancer cells. Regarding to high sensitive biomarker, we detected URST1 mRNA in the majority of serum exosome and lung cancer tissues derived from 20 lung cancer patients.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：高感度バイオマーカー 肺がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本でがん死の第1位である肺がんは約60%が手術不可能な進行期肺がんで見られ、抗がん剤治療、分子標的治療、放射線治療などが行われるが、予後不良である。肺がんの中で比較的治癒率が高いのは非小細胞肺がんの病期IA期のみで、病期の進行に伴い5年生存率は大幅に低下する。NIHのデータでは肺がんをstage I, IIの段階で見れば、生存率が現在の16%から53%にまで上がるとされる。

他方、血中バイオマーカーは、容易に繰り返し行えLiquid biopsyの一手法として注目されている。高感度で侵襲の少ない早期診断法の確立を目指して、我々は血清のバイオマーカーに着目し研究を行ってきた。cDNA microarrayによる遺伝子発現解析データを用い、肺がんの新規血清診断マーカーに関する研究を報告してきた。ただ、一般に用いられている腫瘍マーカーは、ELISA法などにより悪性腫瘍患者の血清中に健常者よりも高値に検出されるタンパク質であるが、現時点では、検診などのスクリーニングでの肺がんの検出には適しているとはいえ、診断の補助、治療効果判定の指標には利用価値があるとされる。そこで更なる早期肺がんの血清診断に向けて、次世代シーケンサーや多検体・高感度分子探索技術であるDigital PCR、やBioplexを用いた早期診断マーカーの同定を試みている。

2. 研究の目的

肺がんの早期診断や治療効果予測を行うマーカーを同定し、最終的には、早期肺がんやがんの前段階での診断や予防を目標としている。また新規治療標的分子の開発も並行して行う。

1. cDNA microarray dataによる候補遺伝子の抽出: 研究室独自のcDNA microarrayデータより肺がんを高頻度に発現上昇し、生命維持に重要な正常組織で発現のほとんどない遺伝子を抽出し解析する。新規診断マーカーの同定: 早期発見、予後、再発診断に関する血清・組織マーカーの同定、有用性の検討。新規治療標的分子の開発: 肺がんの増殖浸潤に関わるタンパクを探索し、siRNA、抗体、阻害剤を用いた新規治療薬の開発を目指す。

2. Digital PCRによる検出: 肺がん特異的な遺伝子変異や分子治療標的薬の感受性を予測する遺伝子変異を血液中のExosomeに存在するDNA, RNAや血中のDNAを採取し、測定することで早期診断や薬剤感受性を予測する。

3. 研究の方法

cDNAマイクロアレイを用いた探索: データより肺がんが発現が高く、正常での発現がほとんどないタンパクについて、がん患者の検体を用いて、ELISA、免疫組織染色、Western blotで検討し、siRNA, Matrigel invasion assayにて肺がんの増殖、浸潤に関わるタンパクを抽出する。抗体によるがん細胞の増殖抑制効果の検討を行う。

次世代シーケンサーによる肺がん特異的遺伝子配列の同定: 肺がん組織、正常肺からDNAを回収し、血清Exosome中のDNA, RNAや血中DNAの肺がん特異的遺伝子配列をDigital PCRなどで検出する。

4. 研究成果

cDNAマイクロアレイデータより肺がんを高発現し、正常での発現がほとんどないタンパクURST1について、引き続き検討を進めた。URST1は、肺がん、口腔がん、乳がんのいずれにおいても、正常細胞、組織と比較し、がんを高頻度に発現上昇し、siRNAにてURST1を抑制するとがん細胞の増殖を抑制した。がん組織検体を用いて、免疫組織染色を行い、肺がん、口腔がん、乳がんのいずれにおいても重要な予後マーカーであることが確認された。また、URST1に対する阻害剤をがん細胞の培養上清に添加することで、がん細胞の増殖が有意に抑制され、治療薬として有望である。更にURST1は、M期の細胞分裂に深く関与していることが判明した。その他、KIF11も同様に、口腔がんを高発現し、がんの増殖への関与すること、阻害剤の添加によりがん細胞の増殖抑制効果を確認できたため、論文での報告をおこなった。引き続き臨床

応用を進めている。その他にも URST4, 5, OASEP1 のタンパクについても口腔がんで発現上昇し、がんの増殖に関与し、予後不良 マーカーであることが判明した。一方、LASEP3 については、肺がんで高発現し、がんの増殖に関与する分泌タンパクであり、肺がん患者の組織検体を用いて、免疫組織染色を行い、重要な予後 マーカーであることを確認した。LASEP3 は、血清マーカーとしても有用で非小細胞肺がんで 61.8%、小細胞肺がんで 62.6%の感度 で、特異度は 94.5%であった。高感度マーカーの探索として、肺がん組織、正常肺から mRNA を回収し、血清 Exosome 中の mRNA、タンパクや血中 DNA の肺がん特異的 遺伝子配列を Digital PCR などで検出を進めている。肺がん患者 20 症例について、がん組織とエクソソーム中の URST1 mRNA 濃度を同時に測定し、それぞれ相関し高頻度に検出されることが確認できた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Kimura T, Hino K, Kono T, Takano A, Nitta N, Ushio N, Hino S, Takase R, Kudo M, Daigo Y, Morita W, Nakao M, Nakatsukasa M, Tamagawa T, Rafiq AM, Matsumoto A, Otani H, Udagawa J., Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis. *Gen Comp Endocrinol.* 1;260:58-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.12.008>.
2. Baghdadi M, Endo H, Takano A, Ishikawa K, Kameda Y, Wada H, Miyagi Y, Yokose T, Ito H, Nakayama H, Daigo Y, Suzuki N, Seino KI. High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. *Sci Rep.* 2018 Jan 11;8(1):418. doi: 10.1038/s41598-017-18796-8.
3. Daigo K, Takano A, Thang PM, Yoshitake Y, Shinohara M, Tohnai I, Murakami Y, Maegawa J, Daigo Y. Characterization of KIF11 as a novel prognostic biomarker and therapeutic target for oral cancer. *Int J Oncol.* 2018 Jan;52(1):155-165. doi: 10.3892/ijo.2017.4181.
4. Mai T, Takano A, Suzuki H, Hirose T, Mori T, Teramoto K, Kiyotani K, Nakamura Y, Daigo Y. Quantitative analysis and clonal characterization of T-cell receptor β repertoires in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with cancer vaccine. *Oncol Lett.* 2017 Jul;14(1):283-292. doi: 10.3892/ol.2017.6125.
5. Sumimoto H, Takano A, Teramoto K, Daigo Y. RAS-Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Is Required for Enhanced PD-L1 Expression in Human Lung Cancers. *PLoS One.* 2016 Nov 15;11(11):e0166626. doi: 10.1371/journal.pone.0166626.
6. Baghdadi M, Wada H, Nakanishi S, Abe H, Han N, Putra WE, Endo D, Watari H, Sakuragi N, Hida Y, Kaga K, Miyagi Y, Yokose T, Takano A, Daigo Y, Seino KI. Chemotherapy-Induced IL34 Enhances Immunosuppression by Tumor-Associated Macrophages and Mediates Survival of Chemoresistant Lung Cancer Cells. *Cancer Res.* 2016 Oct 15;76(20):6030-6042. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1170.
7. Shiraishi K, Okada Y, Takahashi A, Kamatani Y, Momozawa Y, Ashikawa K, Kunitoh H, Matsumoto S, Takano A, Shimizu K, Goto A, Tsuta K, Watanabe S, Ohe Y, Watanabe Y, Goto Y, Nokihara H, Furuta K, Yoshida A, Goto K, Hishida T, Tsuboi M, Tsuchihara K, Miyagi Y, Nakayama H, Yokose T, Tanaka K, Nagashima T, Ohtaki Y, Maeda D, Imai K, Minamiya Y, Sakamoto H, Saito A, Shimada Y, Sunami K, Saito M, Inazawa J, Nakamura Y, Yoshida T, Yokota J, Matsuda F, Matsuo K, Daigo Y, Kubo M, Kohno T. Association of variations in HLA class II and other loci with susceptibility to EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Nat Commun.* 2016 Aug 9;7:12451. doi: 10.1038/ncomms12451.
8. Thang PM, Takano A, Yoshitake Y, Shinohara M, Murakami Y, Daigo Y. Cell division cycle associated 1 as a novel prognostic biomarker and therapeutic target for oral cancer. *Int J Oncol.* 2016 Oct;49(4):1385-93. doi: 10.3892/ijo.2016.3649.
9. 高野 淳, 住本 秀敏, 寺本 晃治, 醍醐 弥太郎 滋賀医科大学医学部附属病院腫瘍センターにおける がん薬物療法のレジメン審査と適正管理の動向に関する考察. *滋賀医大誌* 30(1), 102-107, 2017
10. 住本 秀敏, 林 駒紀, 服部 聖子, 長谷川 千晶, 森井 博朗, 森田 幸代, 高野 淳, 寺本 晃治, 遠藤 善裕, 醍醐 弥太郎 滋賀医科大学医学部附属病院における緩和

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Atsushi Takano, et.al. Identification of OASEP1 as a biomarker and therapeutic target for oral cancer. 第 63 回 日本人類遺伝学会学術総会 2018 年 10 月 12 日、横浜
2. Atsushi Takano, et.al. Identification of URST1 as a biomarker and therapeutic target for lung cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日、大阪
3. Atsushi Takano, et.al. Characterization of URST1 as a biomarker and therapeutic target for lung cancer and oral cancer. 第 16 回 日本臨床腫瘍学会学術総会 2018 年 7 月 19 日、神戸
4. 高野 淳、他、化学療法レジメン管理の後方視研究、第 115 回 日本内科学会総会 2018 年 4 月 14 日、京都
5. Atsushi Takano, et.al. Characterization of URST1 as a prognostic biomarker and therapeutic target for oral cancer. AACR 2018 meeting. 2018 年 4 月 16 日 シカゴ、
6. Atsushi Takano, et.al. Characterization of a prognostic biomarker and a therapeutic target for oral cancer, URST1. AACR 2017 meeting. 2017 年 4 月 4 日、ワシントン、米国
7. Atsushi Takano, et.al. Characterization of URST1 as a biomarker and therapeutic target for respiratory tract cancers. 第 76 回 日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 30 日、横浜.
8. Atsushi Takano, et.al. Identification of URST1 as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung and oral cancers. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術総会, 2017 年 7 月 27 日、神戸.
9. 高野 淳、他、がん薬物療法の適正管理に向けたレジメン審査に関する考察. 第 114 回 日本内科学会総会, 2017 年 4 月 16 日、東京.
10. Atsushi Takano, et.al. Identification of URST1 as a biomarker and therapeutic target for lung cancer. 第 62 回 日本人類遺伝学会学術総会 2017 年 11 月 16 日、神戸.
11. Atsushi Takano, et.al. Characterization of LASEP1 as a new serological and prognostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer. 125th IMS symposium, 2017 年 11 月 28 日、東京.
12. Atsushi Takano, et.al., Identification of LASEP1 as a new serological and prognostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer, 第 75 回 日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日、横浜.
13. Atsushi Takano, et.al., Identification of LASEP3 as a new serological and prognostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer, 第 14 回 日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016 年 7 月 30 日、神戸.
14. Atsushi Takano, et.al., Characterization of LASEP1 as a new serological and prognostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer. 2016 年 6 月 4 日 2016 IMS symposium, 東京.
15. Atsushi Takano, et.al., Identification of a new serological and prognostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer, LASEP3, 2016 AACR meeting. 2016 年 4 月 18 日、ニューヨーク、米国.
16. 高野 淳、他、大学病院におけるがん薬物療法レジメン審査への取り組み：腫瘍内科医の視点から、第 113 回 日本内科学会総会, 2016 年 4 月 16 日、東京
17. Atsushi Takano, et.al., Identification of LASEP1 as a new serological and prognostic

biomarker and a therapeutic target for lung cancer, ICHG 2016 meeting, 2016年4月4日,
京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：醍醐 弥太郎

ローマ字氏名：Daigo, Yataro

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部・臨床腫瘍学講座

職名：教授

研究者番号(8桁): 30345029

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。