

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390171
 研究課題名(和文) マイクロRNAと蛋白の発現統御異常の検出によるオーダーメイド癌診断システムの構築
 研究課題名(英文) Tailor-made cancer diagnosis by systematically detecting alterations of miRNA and protein expressions

研究代表者
 高橋 隆(Takashi Takahashi)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50231395

研究成果の概要：

本研究はマイクロRNAと蛋白の発現プロファイルに着目し、4個のマイクロRNAの発現情報に基づく予後診断モデルの構築に成功するとともに、マイクロRNAと蛋白の両者の発現情報を加味したさらに高精度な予測モデルの構築にも成功した。一方、血液試料を用いた癌の早期発見を目指した膵臓癌のMALDI-MS解析による存在診断については、膵臓癌を7個の蛋白の発現量をもとに感度73%、特異度94%の高精度で検出可能とする診断システムの構築に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査システム

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムが保持する遺伝情報の発現制御システムの失調が、癌を始めとする各種疾患の発症と進展を惹起していることに疑念の余地はない。ヒトゲノム計画の完遂によって蛋白を規定する遺伝子の数は予想されたよりも遥かに少なく、高々2万数千個程度であることが明らかとなっている。一方、我々が本研究において新たに着目したのは、これらのコンベンショナルな遺伝子とは全く異なり、蛋白を規定していないいわゆるnon-coding RNAである。とく

に、その中でも蛋白を規定するコンベンショナルな遺伝子の3'非翻訳領域に僅かなミスマッチを許して結合し極めて多種のmRNAの翻訳を阻害し発現を制御している、僅か20-25塩基のRNA分子であるマイクロRNA分子に特に焦点を当てた。

もう一つの本研究の焦点は、細胞内における最終的な機能分子であり、その発現制御の異常が癌を始めとする各種疾患の発症・進展の分子基盤である蛋白発現であり、直接的かつ網羅的にマスマスペクトロメトリー法を駆使して

解析を進めた。このようなプロテオミクスアプローチの現況は、爆発的な進歩を目前に控えた黎明期とも言える状況にあって、世界的に見てマスペクトロメトリー法を用いた癌のプロテオミクス解析に関する主たる報告は数報に過ぎない状況にあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、種々のヒト癌腫の発生と進展に関わる遺伝情報の発現制御異常について特にマイクロRNA分子と蛋白を中心に、ポストゲノムシーケンス時代に相応しい先鋭的な知見と多角的な解析手法を駆使し、オーダーメイド医療の実現へと結実させることにある。

3. 研究の方法

充実した臨床病理学的インフォメーションが付随した各種癌腫症例の腫瘍組織試料を用い、これまで癌をはじめとするヒト疾患における解析の対象として全く省みられてこなかった、20-15塩基のごく小さなRNA分子として機能するマイクロRNA分子の網羅的発現解析と、マスペクトロメトリー法を応用した蛋白の網羅的発現解析の両者を平行して進める。得られたデータの綿密なバイオインフォマティクス解析によって、相互に制御しあっているマイクロRNA分子と蛋白分子の発現制御の統合異常についての知見を得るとともに、それを予後予測や薬剤感受性予測を可能とするシステムの構築へと応用し、従前からの単一のバイオマーカーやmRNAの網羅的発現解析法による診断法とは全く異なったアプローチによる、飛躍的に高い予測精度を持つ診断システムの構築の実現を目指す。また、mRNAを検討対象とするマイクロアレイ法では検討不可能な血液試料を対象とした、マスペクトロメトリー法を駆使した早期発見診断システムの開発を目指す。

4. 研究成果

マイクロRNAの発現プロファイルに基づく予後診断モデルの開発を進めるための基盤となる情報を得るべく、470個のマイクロRNA断片が貼付されたマイクロアレイを用いて網羅的発現解析を遂行した。さらに、肺腺癌外科切除後の予後予測モデルの構築について、63例の肺腺癌症例のマイクロアレイ解析データをもとに、470個のマイクロRNAから、サンプル数の90%以上で有意な発現が検出される256個のマイクロRNAを抽出した。さらに、256

個のマイクロRNAについて、Significance Analysis of Microarrays (SAM)においてT-statisticとWilcoxon検定を用いて、外科切除5年以内の再発・死亡症例と5年以上の追跡期間中に全く再発を見なかった生存症例の両者における有意差順にランキングし、両手法においてともに有意差のあった6個のマイクロRNAを抽出した。これらの6個のマイクロRNAを用いて総当り的にマイクロRNAの数および組み合わせを変えて10-fold cross validationによる解析を進めた結果、4個のマイクロRNAの発現量に基づきweighted voting法によって極めて高精度に予後を予測可能とする診断モデルの構築に成功した。構築した予測診断モデルによってハイリスクと予測された症例においては、その78%に再発が観察された。一方、ローリスクと予測された症例においては、実際67%が5年間無再発で生存していた(P=0.016 by log-rank test)。

さらに、マイクロRNAの発現量に基づく予測診断モデルと、我々がこれまでに構築したMALDI-MS解析における25ピークに対応する蛋白発現量に基づく予測モデルとの統合を試みた。その結果、両者の予測診断がともにハイリスクであった症例においては全例で再発が観察され、一方、ともにローリスクの予測が得られた症例の場合は、実に73%が5年間無再発で生存していた(P=0.0004 by log-rank test)。すなわち、ヒトゲノムから読みだされた二つの異なった機能分子(マイクロRNAと蛋白)の発現プロファイルから得られる情報を、両者ともに組み込んで予測することによって、極めて高精度な予測モデルの構築の構築に結び付けることができた。

一方、血液試料を用いた癌の早期発見を目指した診断モデルの構築については、膵臓癌を中心に進めた。MALDI-MS解析により得られたピークにおいて、SAM(T-statistic)を用いて、健常250症例と膵臓癌102症例の両者において有意差のあるピークを抽出した。抽出したピークに対して10-fold cross validationを用いて、最適なweighted voting法による判別モデルを構築し、最終的に、7ピークによる判別モデルを構築した。膵臓癌のMALDI-MS解析による存在診断については、膵臓癌を7個の蛋白の発現量をもとに感度73%、特異度94%で検出可能とする診断システムの構築に成功し

たが、興味深いことに陽性判定の症例には汎用されているCA-19-9陰性の症例も含まれていた。さらに、多次元ナノ高速液体クロマトグラフィーとタンデムマスペクトロメトリーを組み合わせた、iTRAQラベリング法を用いた解析によって、膵臓癌組織で発現上昇がみられる35種類の蛋白を同定し、順次血中における腫瘍特異的な発現変化に関する検証を進める基盤を確立した。

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、全て査読あり)

1. Tomida, S., Takeuchi, T., Takahashi, T. (8人中8番目), et al. Relapse-related molecular signature in lung adenocarcinomas identifies patients with dismal prognosis. **J. Clin. Oncol.** 2009 (in press)
2. Ebi, H., Tomida, S., Takahashi, T. (9人中9番目), et al. Relationship of deregulated signaling converging onto mTOR with prognosis and classification of lung adenocarcinoma shown by two independent in silico analyses. **Cancer Res.** 2009 (in press)
3. Taguchi, A., Yanagisawa, K., Takahashi, T. (7人中7番目), et al. Identification of HIF-1 α as a novel target for *miR-17-92* microRNA cluster. **Cancer Res.** 68: 5540-5545, 2008.
4. Osada, H., Tomida, S., Takahashi, T. (9人中9番目), et al. Roles of ASH1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer. **Cancer Res.** 68:1647-1655, 2008.
5. Yamada, H., Yanagisawa, K., Takahashi, T. (8人中8番目), et al. 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.
6. Yatabe, Y., Takahashi, T., and Mitsudomi, T. Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. **Cancer Res.** 68:2106-2111, 2008.
7. Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, N. and Takahashi, T. *let-7* regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. **Carcinogenesis** 29: 2073-2077, 2008.
8. Shimizu, J., Horio, Y., Takahashi, T. (9人中7番目), et al. mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines. **Respirology** 13: 510-517, 2008.
9. Yanagisawa, K., Tomida, S., Takahashi, T. (6人中6番目), et al. A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 99: 858-867, 2007.
10. Tanaka, H., Yanagisawa, K., Takahashi, T. (15人中15番目), et al. Lineage-specific dependency of lung adenocarcinomas on the lung development regulator TTF-1. **Cancer Res.** 67: 6007-6011, 2007.
11. Ebi, H., Matsuo, K., Takahashi, T. (8人中8番目), et al. Novel NBS1 heterozygous germline mutation causing MRE11-binding domain loss predisposes to common types of cancer. **Cancer Res.** 67:11158-65, 2007.
12. Nagai, H., Sugito, N., Takahashi, T. (10人中9番目), et al. CLCP1 interacts with semaphorin 4B and regulates motility of lung cancer cells. **Oncogene** 26: 4025-4031, 2007.
13. Matsubara, H., Takeuchi, T., Takahashi, T. (12人中12番目), et al. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. **Oncogene** 26:6099-6105, 2007.
14. Tomida, S., Yanagisawa, K., Takahashi, T. (7人中7番目), et al. Identification of a metastasis signature and the DLX4 homeobox protein as a regulator of metastasis by combined transcriptome approach. **Oncogene** 26: 4600-4608, 2007.
15. Majidi, M., Al-Wadei, H. A., Takahashi, T. and Schuller H. M. Non-genomic β estrogen receptors enhance β 1 adrenergic signaling induced by the nicotine-derived carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane in human small airway epithelial cells. **Cancer Res.** 67: 6863-6871, 2007.
16. Yamashita, D., Sano, Y., Takahashi, T. (9人中6番目), et al. hDREF regulates cell proliferation and expression of ribosomal

- protein genes. **Mol Cell Biol.** 27: 2003-2013, 2007.
17. Ranganathan, P., Agrawal, A., Takahashi, T. (7人中6番目), et al. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: Differential regulation in normal and tumour cells. **BMC Genomics** 8: 98, 2007.
 18. Nicolescu, A.C., Comeau, J.L., Takahashi, T. (8人中5番目), et al. Aryl radical involvement in amiodarone-induced pulmonary toxicity: Investigation of cytoprotection by spin trapping nitrosones. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 220: 60-71, 2007.
 19. Sadeghi, M. M., Esmailzadeh, L., Takahashi, T. (13人中10番目) et al. ESDN is a marker of vascular remodeling and regulator of cell proliferation in graft arteriosclerosis. **Am. J. Transplant.** 7: 2098-2105, 2007.
 20. Sakamoto, H., Shimizu, J., Takahashi, T. (7人中5番目), et al. Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. **J Pathol.** 212: 287-94, 2007.
 21. Onozato, R., Kosaka, T., Takahashi, T. (7人中5番目), et al. LKB1 gene mutations in Japanese lung cancer patients. **Cancer Sci.** 98:1747-1751, 2007.
 22. Osada, H. and Takahashi, T. MicroRNAs in Biological Processes and Carcinogenesis. **Carcinogenesis** 28: 2-12, 2007.
 23. Takeuchi, T., Tomida, S., Takahashi, T. (8人中8番目), et al. Expression profile-defined classification of lung adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. **J. Clin. Oncol.** 24: 1679-1688, 2006.
 24. Maeno, K., Masuda, A., Takahashi, T. (8人中8番目), et al. Altered regulation of c-jun and its involvement in anchorage-independent growth of human lung cancers. **Oncogene** 25: 271-277, 2006.
 25. Yatabe, Y., Hida, T., Takahashi, T. (6人中5番目), et al. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. **J Mol Diagn.** 8: 335-341, 2006.
 26. Al-Wadei, H.A., Takahashi, T., and Schuller, H.M. Caffeine stimulates the proliferation of human lung adenocarcinoma cells and small airway epithelial cells via activation of PKA, CREB and ERK1/2. **Oncol Rep.** 15: 431-435, 2006.
 27. Ko, K., Furukawa, K., Takahashi, T., et al. (8人中3番目) Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. **Oncogene** 25: 6924-6935, 2006.
 28. Sato, H., Yazawa, T., Takahashi, T. (13人中11番目), et al. Growth regulation via insulin-like growth factor binding protein-4 and -2 in association with mutant K-ras in lung epithelia. **Am J Pathol.** 169: 1550-1566, 2006.
- [学会発表] (計 13 件) (全て招へい講演)
1. 高橋隆 ヒト肺癌の多様性の理解を目指して (シンポジウム) 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会 平成20年12月11日 名古屋
 2. 高橋隆 ゲノム情報の読出しに反映された肺腺癌の分子病態の多様性 (シンポジウム) 第49回日本肺癌学会総会 平成20年10月30日 名古屋
 3. 高橋隆 ヒト肺癌の病態とマイクロRNAの異常 (シンポジウム) 第68回日本癌学会学術総会 平成20年10月30日 名古屋
 4. 高橋隆 ヒト癌の分子病態の多様性: 網羅的発現解析による描出と応用 (教育講演) 第19回日本消化器癌発生学会総会 平成20年8月28日 別府
 5. Takahashi T. "Omics views" of lung cancers (シンポジウム) The 2nd Asian Pacific conference on perspectives in lung cancer. 平成20年8月2日 Sapporo, Japan
 6. Takahashi T. Improved integrative "omics" view and an unresolved question in lung cancer pathogenesis (ワークショップ) 1st European Lung Cancer Conference, Geneva, Switzerland 平成20年4月25日
 7. 高橋隆 肺癌分子病態の基礎的理解のアップデートとこれから (教育講演) 第48回日本肺癌学会総会 平成19年11月8日 名古屋
 8. 高橋隆 microRNA alterations in the molecular pathogenesis of lung cancers. (シンポジウム) 平成19年10月4日 横浜

9. Takahashi, T. microRNA alterations in the pathogenesis of lung cancer. (シンポジウム) 33rd Annual Meeting of the Korean Cancer Association. Seoul, Korea, 平成19年6月14日
10. Takahashi, T. MicroRNAs in Biological Processes and Carcinogenesis. (Meet-the-Professor セッション) 33rd Annual Meeting of the Korean Cancer Association. Seoul, Korea, 平成19年6月14日
11. 高橋隆 肺腺癌の発生と terminal respiratory unit (TRU) (シンポジウム) 第47回日本呼吸器学会総会 平成19年5月12日
12. Takahashi, T. Transcriptome and proteome analyses toward better understandings of lung cancer biology and realization of tailor-made medicine. (シンポジウム) Asia-Pacific Congress on Lung Cancer. Taipei, Taiwan, 平成18年12月3日
13. 高橋隆 ヒト肺癌におけるマイクロRNAの発現異常とその役割 第95回日本病理学会総会 (シンポジウム) 平成19年5月1日

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：質量分析法を利用した複数癌腫の血液検出のための方法および生物マーカー
発明者：高橋隆、柳澤聖、富田秀太、他4名
権利者：国立大学法人名古屋大学、他2者
種類：特許権
番号：特願2008-235216
出願年月日：平成20年9月12日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 隆 (Takahashi, Takashi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50231395

(2) 研究分担者

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
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

(3) 連携研究者

後藤 秀実 (Goto, Hidemi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10215501
榑野 正人 (Nagino, Masato)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20237564
光富 徹哉 (Mitsudomi, Tetsuya)
愛知県がんセンター・分子腫瘍学部・研究員
研究者番号：70209807
樋田 豊明 (Hida, Toyoaki)
愛知がんセンター・分子腫瘍部・研究員
研究者番号：80250249
谷田部 恭 (Yatabe, Yasushi)
愛知県がんセンター・分子腫瘍部・研究員