

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591743
 研究課題名（和文）網羅的遺伝子・タンパク質発現解析による悪性骨軟部腫瘍バイオマーカーの探索
 研究課題名（英文）Search for useful biomarkers in bone and soft tissue tumors using global expression analysis
 研究代表者
 川井 章
 国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・研究員
 研究者番号：90252965

研究成果の概要（和文）：

本研究により、Gastrointestinal stromal tumor (GIST)、ユーイング肉腫、滑膜肉腫の新たな予後因子、生物学的特徴を規定している因子のいくつかを見出した。GIST においては、2D-DIGE により新たな予後予測マーカー“フェチン”を同定し、その有用性を多施設検体を用いた免疫染色により検証した。ユーイング肉腫においては、新たな予後予測マーカー“nucleophosmin”を見出した。

研究成果の概要（英文）：

In the current study a number of novel prognostic factors and factors determining the biological characteristics of gastrointestinal stromal tumor (GIST), Ewing's sarcoma, and synovial sarcoma were identified. For GIST, a novel prognostic marker “pfetin” was identified on 2D-DIGE, and its usefulness was verified by performing immunostaining for samples from multiple facilities. As for Ewing's sarcoma, “nucleophosmin” was identified as a novel prognostic marker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨軟部腫瘍、バイオマーカー、網羅的発現解析、タンパク質、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の治療成績は強力な化学療法など集学的治療の導入によって漸次改善されてきたが、これらの治療に応じた症例の予後は依然極めて不良であり、さらなる治療成績向上のためには、この治療抵抗性のメカニズムを解明するとともに、治療抵抗性（予後不良）の腫瘍を早期に診断、層別化し、より有効な治療を行なう治療戦略の確立が不可欠である。一方、網羅的遺伝子・タンパク質発現解析の手法は、遺伝子発現プロファイルに基づく腫瘍起原の探索など、骨軟部肉腫においてもその病態解明の大きな力となりつつある。またタンパク質の発現プロファイル解析は、生体機能の直接の担い手であるタンパク質の空間的・時間的発現情報を通して、遺伝子発現プロファイルのみでは得られない貴重な情報となることが期待されている。中でも、我々が独自に開発したきわめて精度の高い蛍光二次元電気泳動法（2D-DIGE）は世界トップレベルの網羅性と再現性を有するプロテオーム解析を行うことが可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性骨軟部腫瘍の治療成績向上の要である化学療法反応性、その他の生物学的態度に関して、これらを規定している遺伝子・タンパク質（群）を網羅的遺伝子・タンパク質発現解析の手法を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

網羅的遺伝子発現解析は、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix 社) を用いて約 4.7 万遺伝子の発現解析を行なう。タンパク質発現解析

は、蛍光二次元電気泳動、質量分析を用いて行なう。臨床試料より RNA, タンパク質を抽出、RNA は遺伝子発現解析、タンパク質は内部標準サンプルを Cy3、個別のサンプルを Cy5 で標識し、二次元電気泳動で分離した後、質量分析により同定する。データ解析には、GeneSpring (Agilent) を用いる。データマイニング (T-test, ANOVA, クラスタリング、主成分分析等) の手法を用いて、その発現と生物学的態度が関連する遺伝子・タンパク質（群）を特定する。

4. 研究成果

“GIST”

2D-DIGE により、GIST の新たな予後予測マーカーとしてタンパク質（フェチン）を同定した。さらにフェチンのバイオマーカーとしての有用性を検証するために、国立がんセンター以外の国内他施設で治療が行なわれた GIST 症例について、免疫染色によるフェチンの発現と患者予後との相関を検討した。その結果、他施設の症例においてもフェチン高発現の症例の予後はそうでないものに比べて有意に良好であることが示された。次いで GIST の発生部位による生物学的差異を明らかにするために、胃発生 GIST と小腸発生 GIST のタンパク質発現の差を 2D-DIGE で解析した。両者間で発現に差のみられるタンパク質として 105 スポットを同定。質量分析の結果、これら 105 スポットは prothobin, PEDF などが関連タンパク質を含む 68 のタンパク質に相当することが明らかになった。

“ユーイング肉腫”

ユーイング肉腫における新たな予後予測マーカーとして nucleophosmin を見出した。Nucleophosmin は、2D-DIGE にて検出された

ユーイング肉腫のタンパク質 2,364 スポットの中からその予後と相関するスポットとして抽出された 66 スポット (53 遺伝子産物) 中に含まれ、nucleophosmin 高発現のユーイング肉腫はそうでないものに比べて有意 ($p < 0.01$) に予後不良であった。多変量解析においても nucleophosmin は clinical stage と共にユーイング肉腫の独立した有意な予後因子であった。

“滑膜肉腫”

二相性滑膜肉腫において比較的特異的に高発現しているタンパク質として glutathione S-transferase P を同定した。

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 24 件)

英文

- ① Akira Kawai, Ako Hosono, Robert Nakayama, Akihiko Matsumine, Seiichi Matsumoto, Takafumi Ueda, Hiroyuki Tsuchiya, Yasuo Beppu, Hideo Morioka, Hiroo Yabe. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: A study of 75 patients. *Cancer 査読有* 109: 109-116, 2007
- ② Teiyu Izumi, Yoshinao Oda, Tadashi Hasegawa, Yukihiro Nakanishi, Akira Kawai, Hiroshi Sonobe, Tomonari Takahira, Chikashi Kobayashi, Hidetaka Yamamoto, Sadafumi Tamiya, Setsuo Hirohashi, Yukihide Iwamoto, Masazumi Tsuneyoshi. Dysadherin expression as a significant prognostic factor and as a determinant of histologic features in synovial sarcoma: Special reference to its inverse relationship with E-cadherin expression. *Am J Surg Pathol 査読有* 31: 85-94, 2007
- ③ Hideto Obata, Takafumi Ueda, Akira

Kawai, Takeshi Ishii, Toshifumi Ozaki, Satoshi Abe, Kazuhiro Tanaka, Hiroyuki Tsuchiya, Akihiko Matsumine, Hiroo Yabe. Clinical outcome of patients with Ewing sarcoma family of tumors of bone in Japan. *Cancer 査読有* 109: 767-775, 2007

- ④ Takuro Wada, Akira Kawai, K Ihara, M Sasaki, T Sonoda, T Imaeda, T Yamashita. Construct validity of the Enneking score for measuring function in patients with malignant or aggressive benign tumours of the upper limb. *J Bone Joint Surg 査読有* 89-B: 659-663, 2007
- ⑤ Robert Nakayama, Takeshi Nemoto, Hiro Takahashi, Tsutomu Ohta, Akira Kawai, Kunihiro Seki, Teruhiko Yoshida, Yoshiaki Toyama, Hitoshi Ichikawa, Tadashi Hasegawa. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: Characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Modern Pathology 査読有* 20: 749-759, 2007
- ⑥ Yukio Kawakami, Toshiyuki Kunisada, Shinsuke Sugihara, Atsushi Ono, Keiichiro Nishida, Nobuhiro Abe, Akira Kawai, Kazuo Fujiwara, Yuki Morimoto, Toshifumi Ozaki. New approach for assessing vascular distribution within bone tumors using dynamic contrast-enhanced MRI. *J Cancer Res Clin Oncol 査読有* 133: 697-703, 2007
- ⑦ Makoto Endo, Ukihide Tateishi, Kunihiro Seki, Umio Yamaguchi, Fumihiko Nakatani, Akira Kawai, Hirokazu Chuman, Yasuo Beppu. Prognostic implications of glucose transporter protein-1 (Glut-1) overexpression in bone and soft-tissue sarcomas. *Jpn J Clin Oncol 査読有* 37:

- 955-960, 2007
- ⑧ Robert Nakayama, Yasunori Sato, Mitsuko Matsutani, Hideki Ogino, Fumihiko Nakatani, Hirokazu Chuman, Yasuo Beppu, Hideo Morioka, Hiroo Yabe, Hiroshi Hirose, Haruhiko Sugimura, Hiromi Sakamoto, Tsutomu Ohta, Yoshiaki Toyama, Teruhiko Yoshida, Akira Kawai. Association of a missense single nucleotide polymorphism, Cys1367Arg of the WRN gene, with the risk of bone and soft tissue sarcomas in Japan. *Cancer Sci* 査読有 99: 333-339, 2008
- ⑨ Yoshiyuki Suehara, Tadashi Kondo, Kunihiro Seki, Tatsuhiro Shibata, Kiyonaga Fujii, Masahiro Gotoh, Tadashi Hasegawa, Yasuhiro Shimada, Mitsuru Sasako, Tadakazu Shimoda, Hisashi Kurosawa, Yasuo Beppu, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi. Pftin as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. *Clin Cancer Res* 査読有 14: 1707-1717, 2008
- ⑩ Ako Hosono, Atsushi Makimoto, Akira Kawai, Yoichi Takaue. Segregated graft-versus-tumor effect between CNS and non-CNS lesions of Ewing's sarcoma family of tumors. *Bone Marrow Transplantation* 査読有 41: 1067-1068, 2008
- ⑪ Akira Kawai, Tadashi Kondo, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Setsuo Hirohashi. Global protein-expression analysis of bone and soft tissue sarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 査読有 466: 2099-2106, 2008
- ⑫ Umio Yamaguchi, Robert Nakayama, Kazufumi Honda, Hitoshi Ichikawa, Tadashi Hasegawa, Miki Shitashige, Masaya Ono, Ayako Shoji, Tomohiro Sakuma, Hideya Kuwabara, Yasuhiro Shimada, Mitsuru Sasako, Tadakazu Shimoda, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tesshi Yamada. Distinct gene expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 査読有 26: 4100-4108, 2008
- ⑬ Eisuke Kobayashi, Akira Kawai, Makoto Endo, Yoshiyuki Suehara, Ken Takeda, Fumihiko Nakatani, Takayuki Asano, Minoru Sakuraba, Hirokazu Chuman, Kunihiro Seki, Yasuo Beppu. Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma. *J Orthop Sci* 査読有 13: 566-571, 2008
- ⑭ Kan Yonemori, Umio Yamaguchi, Masayuki Kaneko, Hajime Uno, Masahiro Takeuchi, Masashi Ando, Yasuhiro Fujiwara, Ako Hosono, Atsushi Makimoto, Tadashi Hasegawa, Ryohei Yokoyama, Fumihiko Nakatani, Akira Kawai, Yasuo Beppu, Hirokazu Chuman. Prediction of response and prognostic factors for Ewing family of tumors in a low incidence population. *J Cancer Res Clin Oncol* 査読有 134: 389-95, 2008
- ⑮ Naoko Kudo, Akira Ogose, Takashi Ariizumi, Hiroyuki Kawashima, Tetsuo Hotta, Hiroshi Hatano, Tetsuro Morita, Masaki Nagata, Yukie Siki, Akira Kawai, Yuko Hotta, Makiko Hoshino, Naoto Endo. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Giant Cell Tumor of Bone. *Anticancer Research* 査読有 29: 2219-2226, 2009
- ⑯ Yukihide Iwamoto, Kazuhiro Tanaka, Kazuo Isu, Akira Kawai, Shin-ichiro Tatezaki, Takeshi Ishii, Kazuyoshi Kushida, Yasuo Beppu, Masamichi Usui, Akio Tateishi, Kiyoo Furuse, Takeshi Minamizaki, Noriyoshi Kawaguchi, Shinya Yamawaki. Multiinstitutional phase II study of neoadjuvant

- chemotherapy for osteosarcoma (NECO study) in Japan: NECO-93J and NECO-95J. J Orthop Sci 査読有 14: 397-404, 2009
- ⑰ Kazutaka Kikuta, Naobumi Tochigi, Tadakazu Shimoda, Hiroki Yabe, Hideo Morioka, Yoshiaki Toyama, Ako Hosono, Yasuo Beppu, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo. Nucleophosmin as a candidate prognostic biomarker of Ewing's sarcoma revealed by proteomics. Clin Cancer Res 査読有 15: 2885-2894, 2009
- ⑱ Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Robert Nakayama, Kiyonaga Fujii, Hitoshi Ichikawa, Tatsuhiro Shibata, Kunihiro Seki, Tadashi Hasegawa, Masahiro Gotoh, Naobumi Tochigi, Tadakazu Shimoda, Yasuhiro Shimada, Takeshi Sano, Yasuo Beppu, Hisashi Kurosawa, Setsuo Hirohashi, Akira Kawai, Tadashi Kondo. Anatomic site-specific proteomic signatures of gastrointestinal stromal tumors. Proteomics Clin Appl. 査読有 3: 584-596, 2009
- ⑲ Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Robert Nakayama, Naobumi Tochigi, Kunihiro Seki, Hitoshi Ichikawa, Kiyonaga Fujii, Tadashi Hasegawa, Tadakazu Shimoda, Hisashi Kurosawa, Hirokazu Chuman, Yasuo Beppu, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo. GST-P1 as a histological biomarker of synovial sarcoma revealed by proteomics. Proteomics Clin Appl. 査読有 3: 623-634, 2009
- ⑳ Umio Yamaguchi, Kazufumi Honda, Reiko Satow, Eisuke Kobayashi, Robert Nakayama, Hitoshi Ichikawa, Ayako Shoji, Miki Shitashige, Mari Masuda, Akira Kawai, Hirokazu Chuman, Yukihide Iwamoto, Setsuo Hirohashi, Tesshi

- Yamada. Functional genome screen for therapeutic targets of osteosarcoma. Cancer Sci 査読有 100: 2268-2274, 2009 邦文
- ① 骨・軟部腫瘍の臨床診断. 川井 章. 日整会誌 査読有 82: 536-548, 2008
- ② 骨・軟部腫瘍に対する補助化学療法. 小林英介、川井 章. 腫瘍内科 2(6): 510-516, 2008
- ③ 骨腫瘍の診断. 川井 章. 病理と臨床 27: 106-113, 2009
- ④ 全国骨・軟部腫瘍登録について. 川井 章. MB Orthop 22: 143-149, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1.
名称:「セセルニン-1の使用、滑膜肉腫の予後予測方法及び検査用試薬キット」
発明者:近藤 格、川井 章、末原義之
権利者:HS 財団
番号:特願 2009-285045
出願年月日:2009年12月16日
国内外の別:国内
2.
名称:「ペロキシレドキシニン2の使用、骨肉腫の化学療法奏効性の予測方法及び検査試薬キット」
発明者:近藤 格、菊田一貴、川井 章、廣橋説雄
権利者:HS 財団
番号:特願 2009-213605
出願年月日:2009年9月15日
国内外の別:国内
3.
名称:「消化管間質腫瘍(GIST)を処置するための医薬組成物、ならびに消化管間質腫瘍を患う患者の予後を予測するためのキットおよび方法」
発明者:近藤 格、廣橋説雄、川井 章、菊田一貴
権利者:HS 財団

番号：PCT/JP2008/71495

出願年月日：2008年11月27日

国内外の別：国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井 章 (KAWAI AKIRA)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床
開発センター）・研究員

研究者番号：90252965

(2) 研究分担者

近藤 格 (KONDOU TADASHI)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床
開発センター）・プロジェクトリーダー

研究者番号：30284061

市川 仁 (ICHIKAWA HITOSHI)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床
開発センター）・プロジェクトリーダー

研究者番号：30201924