

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号：19791003
 研究課題名 (和文) ゲノミクス・プロテオミクス複合解析を利用した脳腫瘍 (神経膠腫) の
 プロファイリング
 研究課題名 (英文) Genomic and proteomic characterizations of the central nervous system
 tumors
 研究代表者 岡本 浩昌
 (OKAMOTO HIROAKI)
 佐賀大学・医学部・客員研究員
 研究者番号：50336137

研究成果の概要：

私は脳腫瘍を対象とした研究で、病理学的診断をもとにそれぞれの subtype 間の網羅的な蛋白発現検索を施行し、これらの解析を更に進めることで各脳腫瘍 (特に神経膠腫) および各 subtype 間の特徴をプロテオミクスパターンとしてデータベース化できないかと考えてきた。この“脳腫瘍ファイル”が出来上がれば、例えば病理学的には診断困難な場合、プロテオミクス解析からの病理診断を判断すると言う逆からのアプローチも可能になると思われる。また特に神経膠芽腫などに関してはまだ細かな subtype への分類が必要と以前より考えられているが、この病理学的診断手法、プロテオミクス解析手法を合わせることによりその細分化も可能になると考えられる。

平成 20 年度は、これまでの情報の蓄積を行うことで、脳腫瘍のプロテオミクスデータベースの構築を継続した。実際の症例に対してこの構築したプロテオミクスデータベースを利用することで、病理学的診断を試みている。これらの結果を踏まえ、当研究で得たプロテオミクスパターンと病理学的診断との関連を解析している。次にゲノムマイクロアレイによるゲノミクスデータに基づいた 1p, 10q, 19q などの LOH の陽性群陰性群の比較検討、EGFR の amplification 有無での検討、また MSP による MGMT のメチル化の有無での検討、更には予後 (生存期間、薬剤感受性) などの因子に関しても比較検討している。これらの結果により、ゲノム異常に関連すると考えられる蛋白の同定を行い、マーカーとして有用かどうか検討するのみでなく、治療標的としても対象となりうるかどうか検討した (検討症例 21 例)。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：ゲノミクス プロテオミクス 脳腫瘍 神経膠腫

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の中でも特に神経膠腫に対しては外科的治療のみの治療では限界があることは周知の通りであり、“全脳の疾患”であるこの腫瘍を克服するためには、従来の放射線療法や化学療法の併用などに加え、新たな分子標的療法などを含めた治療が不可欠であると考えられる。しかし残念ながらその様な新たな治療法の開発のために必要とされるこれらの脳腫瘍の病態解明は、現時点ではまだまだ不十分であり、より高度で強力な研究手法が必要とされている。

近年遺伝子レベル、RNA レベルなどにおいて網羅的に、非常に多数の遺伝子、RNA の解析を同時に行うゲノム解析（ゲノミクス解析）、トランスクリプトーム解析などが積極的に行われてきている。これらの解析手法は非常に強力で、多くの研究領域において、従来の単一の遺伝子を調査する研究とは異なり、一度に多くの情報をもたらした。また特に疾患を対照とする場合において、各対象グループの特徴をパターン化で認識するという解析方法を生み出し、そのパターンを調べることによって、予後などとの関連も提示できることが証明された。

しかし以上の研究手段が非常に効果的であるのは異論の無いことであるが、最終的に直接の働きを担っている蛋白に関しても同様の手法が期待されるようになったのは当然のことだと思われる。そこで近年注目されている多数の蛋白質を同時に解析することができるプロテオミクス解析がその役を担うわけではあるが、以前はエドマン解析法などにしか頼れず非常に時間や手間のかかった蛋白質の同定が、田中耕一博士がノーベル賞を授与された質量分析法の開発、およびヒトを初めとしたゲノム情報が解明されたことなどにより、短時間でしかも高検出率にて行えるようになり、同手法は確立された。癌研究を含めた幅広い研究分野においてこの手法は活用され、多くの解析結果が報告されている。

私は今まで、このプロテオミクス解析を用いた研究に多く関わってきた。国内外において異なった手法でのプロテオミクス解析法を学び、その結果、現時点では、広く普及している2次元電気泳動と質量分析法を組み合わせた方法が最も有効ではないか考えられた。また国内では虚血や stem cell を対象に、米国留学中は主に脳腫瘍を対象に研究を行ってきたが、特に脳腫瘍を対象とした研究では、病理学的診断をもとにそれぞれの subtype 間の網羅的な蛋白発現検索を施行し、

多くの結果を得てきた。またその間、これらの解析を更に進めることで、各脳腫瘍（特に神経膠腫）および各 subtype 間の特徴をプロテオミクスパターンとしてデータベース化できないかと考えてきた（実際、ヒトの器官やいくつかの疾患のプロテオミクス（2次元電気泳動ゲル）情報が”ExPASy Proteomics Server”などにおいて、既に公開されている）。この“脳腫瘍ファイル”が出来上がれば、例えば病理学的には診断困難な場合、プロテオミクス解析からの病理診断を判断すると言う逆からのアプローチも可能になると思われる。また特に神経膠芽腫などに関してはまだ細かな subtype への分類が必要と以前より考えられているが、この病理学的診断手法、プロテオミクス解析手法を合わせることによりその細分化も可能になると考えられる。

この様にプロテオミクス解析の利用により、多くの新たな情報を我々は得ることが出来ると考えられるが、複雑化したこれらの疾患へのアプローチとしては、それぞれの腫瘍の特性の blueprint ともいえるゲノム情報を抜きにしてはやはりまだ不十分だと考えられる。我々は既に脳腫瘍の遺伝子異常検索をゲノムマイクロアレー（Genosensor, PropGene CGH Array, GSPArray）による解析にて行ってきたが、これらの情報をもとに、特に神経膠腫の予後などに関連すると言われている 1p、10q、19q の loss of heterozygosity (LOH)などのゲノム情報の観点から分類を行ったのちに、上記のプロテオミクスデータベースを利用・比較し関連するパターンを検索し、さらには特に関連する個々の蛋白の同定も試みる。同様に脳腫瘍化学療法薬として新たに認可されたテモゾロマイドの効用と関連すると報告されているMGMTのメチル化、また臨床的予後との関連などについても、同様にプロテオミクス解析結果とリンクさせ、これらを規定する複数の因子（蛋白）を見出すことも可能だと考えられる。

2. 研究の目的

脳腫瘍の中でも特に神経膠腫に対しては外科的治療のみの治療では限界があることは周知の通りであり、“全脳の疾患”であるこの腫瘍を克服するためには、従来の放射線療法や化学療法の併用などに加え、新たな分子標的療法などを含めた治療が不可欠であると考えられる。しかし残念ながらその様な新たな治療法の開発のために必要とされるこれらの脳腫瘍の病態解明は、現時点ではまだまだ不十分であり、より高度で強力な研究手法が

必要とされている。

私は今まで、このプロテオミクス解析を用いた研究に多く関わってきた。国内外において異なった手法でのプロテオミクス解析法を学び、その結果、現時点では、広く普及している 2 次元電気泳動と質量分析法を組み合わせた方法が最も有効ではないか考えられた。また国内では虚血や stem cell を対象に、米国留学中は主に脳腫瘍を対象に研究を行ってきたが、特に脳腫瘍を対象とした研究では、病理学的診断をもとにそれぞれの subtype 間の網羅的な蛋白発現検索を施行し、多くの結果を得てきた。またその間、これらの解析を更に進めることで、各脳腫瘍（特に神経膠腫）および各 subtype 間の特徴をプロテオミクスパターンとしてデータベース化できないかと考えてきた。この“脳腫瘍ファイル”が出来上がれば、例えば病理学的には診断困難な場合、プロテオミクス解析からの病理診断を判断すると言う逆からのアプローチも可能になると思われる。また特に神経膠芽腫などに関してはまだ細かな subtype への分類が必要と以前より考えられているが、この病理学的診断手法、プロテオミクス解析手法を合わせることでよりその細分化も可能になると考えられる。

研究計画・方法：平成 19 年度に得た情報をデータベースに蓄積を行うことで、脳腫瘍のプロテオミクスデータベースを構築する。実際の症例に対してこの構築したプロテオミクスデータベースを利用することで、病理学的診断を試みる。これらの結果を踏まえ、当研究で得たプロテオミクスパターンと病理学的診断との関連を解析する。平成 19 年度に質量分析法 (LC/MS/MS) にて得られた個々の蛋白についての検討を行う。

上記の結果において同定された候補蛋白に対して、脳腫瘍（悪性神経膠腫）細胞株を使用して、siRNA による発現抑制、transfection による発現増幅などを行い、その in vitro での効果を確認する。この系にて何らかの抗腫瘍効果が認められれば、新たな薬剤の開発に役立つと考えられる。

3. 研究の方法

1. 平成 19 年度に得た情報をデータベースに蓄積を行うことで、脳腫瘍のプロテオミクスデータベースを構築する。
2. 実際の症例に対してこの構築したプロテオミクスデータベースを利用することで、病理学的診断を試みる。これらの結果を踏まえ、当研究で得たプロテオミクスパターンと病理学的診断との関連を解析する。
3. 平成 19 年度に質量分析法 (LC/MS/MS) にて得られた個々の蛋白についての検討を行う。
 - a. まず病理学的分類の見地よりその発現に優位な差が認められた蛋白に関しては、当研究でプロテオミクス解

析に使用しなかった他の症例を用いて、免疫染色法などを利用することにより、各腫瘍の鑑別診断に利用できる特異なマーカーとなり得ないかなどを検討する。

- b. 次にゲノムマイクロアレイによるゲノミクスデータに基づいた 1p, 10q, 19q などの LOH の陽性群陰性群の比較検討、EGFR の amplification 有無での検討、また MSP による MGMT のメチル化の有無での検討、更には予後（生存期間、薬剤感受性）などの因子に関しても比較検討する。これらの結果により、ゲノム異常に関連すると考えられる蛋白の同定を行い、マーカーとして有用かどうか検討するのみでなく、治療標的としても対象となりうるかどうか検討する。

上記“3”の結果において同定された候補蛋白に対して、脳腫瘍（悪性神経膠腫）細胞株を使用して、siRNA による発現抑制、transfection による発現増幅などを行い、その in vitro での効果を確認する。この系にて何らかの抗腫瘍効果が認められれば、新たな薬剤の開発に役立つと考えられる。

4. 研究成果

私は脳腫瘍を対象とした研究で、病理学的診断をもとにそれぞれの subtype 間の網羅的な蛋白発現検索を施行し、これらの解析を更に進めることで各脳腫瘍（特に神経膠腫）および各 subtype 間の特徴をプロテオミクスパターンとしてデータベース化できないかと考えてきた。この“脳腫瘍ファイル”が出来上がれば、例えば病理学的には診断困難な場合、プロテオミクス解析からの病理診断を判断すると言う逆からのアプローチも可能になると思われる。また特に神経膠芽腫などに関してはまだ細かな subtype への分類が必要と以前より考えられているが、この病理学的診断手法、プロテオミクス解析手法を合わせることでよりその細分化も可能になると考えられる。

平成 20 年度は、これまでの情報の蓄積を行うことで、脳腫瘍のプロテオミクスデータベースの構築を継続した。実際の症例に対してこの構築したプロテオミクスデータベースを利用することで、病理学的診断を試みている。これらの結果を踏まえ、当研究で得たプロテオミクスパターンと病理学的診断との関連を解析している。次にゲノムマイクロアレイによるゲノミクスデータに基づいた 1p, 10q, 19q などの LOH の陽性群陰性群の比較検討、EGFR の amplification 有無での検討、また MSP による MGMT のメチル化の有無での検

討、更には予後（生存期間、薬剤感受性）などの因子に関しても比較検討している。これらの結果により、ゲノム異常に関連すると考えられる蛋白の同定を行い、マーカーとして有用かどうか検討するのみでなく、治療標的としても対象となりうるかどうか検討した（検討症例 21 例）。

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 2 件）

Li J, Okamoto H, Yin C, et al. : Proteomic characterization of primary diffuse large B-cell lymphomas in the central nervous system. *Journal of Neurosurgery*.109 : 536-546.2008.査読有

Li J, Yin C, Okamoto H, et al. : Identification of a novel proliferation-related protein WHSC1 4a, in human gliomas. *Neuro-oncology*.10 : 45-51.2008.査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者 岡本 浩昌

(OKAMOTO HIROAKI)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50336137

