

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890218
 研究課題名（和文） プロテオーム解析による骨軟部腫瘍の腫瘍マーカー開発及び機能解析
 研究課題名（英文） Protein-expression profiles to develop prognostic biomarkers and molecular function 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・助教
 研究者番号：70509405

研究成果の概要（和文）：

各種予後予測マーカーの開発を目的としたタンパク質発現解析を行い、消化管間質腫瘍（GIST）の予後予測マーカーである Pfetin、滑膜肉腫の予後予測マーカーである S タンパク質（仮名）を発見した。また、消化管間質腫瘍（GIST）の発生部位におけるタンパク質プロファイリングの作成と滑膜肉腫の組織亜型及び融合遺伝子におけるタンパク質プロファイリングの作成を行った。腫瘍特異的タンパク質についての機能解析として、特に GIST における Pfetin タンパク質の機能解析を行い、Pfetin 関連タンパク質の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：

For developing prognosis biomarkers of bone and soft tissue tumors, we conducted global protein expression studies using 2D-DIGE. We identified pfetin, which is prognosis biomarker of GISTs and S-protein which is prognosis biomarker of synovial sarcomas. In order to analyzing the function of pfetin, we examined a immunoprecipitation using pfetin antibody, We identified co-pfetin proteins as candidate protein of prognosis markers for GISTs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：プロテオミクス、骨軟部腫瘍、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍の腫瘍マーカーは遺伝子技術の進歩により組織型特異的融合遺伝子が発見され、病理組織分類の補助診断マーカーとして大きく臨床に貢献することとなった。また、現在の肉腫における発現解析研究の中心は、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、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。研究代表者を中心とした国立がんセンター整形外科プロテオミクスグループは 2004 年より世界に先駆けて、骨軟部腫瘍各種において予後予測マ-

カーや組織特異的マーカーの開発を目的としたタンパク質発現の網羅的解析を行い、現在までに *Pfetin* などの予後予測マーカーを発見し成果をあげてきた。

2. 研究の目的

本研究は軟部肉腫の凍結検体を使用したプロテオミクス解析を行うことで、(1)タンパク質発現の網羅的解析を行い、予後予測マーカーや組織特異的マーカーの開発を目的とする(中心施設:国立がんセンター)と共に、(2)現在までに我々のグループが行ってきたプロテオミクス研究にて発見されてきた複数の腫瘍特異的タンパク質についての機能解析を目的とする(中心施設:順天堂大学)。

3. 研究の方法

(1)各種予後予測マーカーの開発を目的とした大規模タンパク質発現解析による clinico-proteomic study

- ① 各種対象腫瘍よりタンパク質抽出を行う。
- ② 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蛍光二次元電気泳動法(2D-DIGE)を使用し、その獲得データに対してテータマイニングを行う。
- ③ 検討項目ごとに重要と判断されたタンパク質スポットについては、質量分析計にて対応するタンパク質の同定を行う。
- ④ 同定されたタンパク質については特異抗体を使用し、Western-blotting 法、パラフィンブロックを使用した免疫染色にて発現を確認する。
- ⑤ 免疫染色にて発現差を確認できたタンパク質については、腫瘍マーカーとしての有効性を確認するために、解析に未使用のパラフィンブロックを新たに使用し、タンパク質発現を検証する。

(2) 腫瘍特異的タンパク質についての機能解析(特に GIST における *Pfetin* タンパク質の機能解析)

(2-a) GIST における *Pfetin* タンパク質の翻訳後修飾の解明

二次元電気泳動上では *Pfetin* タンパク質は等電点方向、分子量方向に分離した複数のタンパク質スポット(8個)で存在することが確認されており、そのタンパク質スポットは予後予測の感度が高い高感度スポット群と予後予測の感度が低い低感度スポット群に分類されることが判明している。その予後予測感度の違いは *Pfetin* タンパク質にリン酸化や糖鎖修飾など翻訳後修飾が生じていることが推測される。その各スポットの翻訳後修飾を SDS-page, 2D-page にてタンパク質を展開して、各種特異抗体を使用し確認する。

また、各スポットについては質量分析計にてタンパク質構造解析を行い翻訳後修飾について解析・解明する。

(2-b) 免疫沈降等による *Pfetin* 関連タンパク質の同定とネットワークの解明

我々のグループで作成に成功している *Pfetin* タンパク質特異抗体を使用した免疫沈降等の実験を行うことで *Pfetin* 関連タンパク質の同定を行い、GIST の予後や癌化に関与するタンパク質ネットワークを解明する。

(2-c) *Pfetin* 関連タンパク質の腫瘍マーカー・治療ターゲットのとしての有用性の大規模検証

共沈し同定された *Pfetin* 関連タンパク質は新規 GIST 予後予測マーカー・治療ターゲットタンパク質となる可能性があるため、それぞれの同定された *Pfetin* 関連タンパク質については必要に応じて、特異抗体を用いたウエスタンブロット・免疫染色による腫瘍マーカーとしての有用性の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 各種予後予測マーカーの開発を目的とした大規模タンパク質発現解析による clinico-proteomic study

① 悪性消化管間葉系腫瘍である消化管間質腫瘍(GIST)のタンパク質発現プロファイルの予後における比較を行い、予後予測マーカーである *Pfetin* タンパク質を発見している。その *Pfetin* タンパク質においては既に、210例の GIST(M0/primary samples)パラフィン切片について *Pfetin* 特異抗体を用いた免疫染色による大規模検証を行った。その結果、*Pfetin* 特異抗体免疫染色の判定により無病生存率・生存率に高い有意差を認め、予後予測腫瘍マーカーとしての有用性を証明した($p < 0.0001$) (Clin Cancer Res 2008 14: 1707-17 / 1 番目 10 名 / 査読: 有)。

② 消化管間質腫瘍(GIST)の発生部位におけるタンパク質プロファイリングの作成と発生部位特異的腫瘍マーカーの開発を行い、論文にて発表を行った(Proteomics Clin Appl, 2009 3(5), 584-596 / 1 番目 18 名 / 査読: 有)。

③ 滑膜肉腫の組織亜型及び融合遺伝子におけるタンパク質プロファイリングの作成と組織特異的腫瘍マーカーの開発を行い、論文にて発表を行った(Proteomics Clin Appl, 2009 3(5), 623-634 / 1 番目 15 名 / 査読: 有)。

④ 滑膜肉腫のタンパク質発現プロファイリングを作成し、2年以内に死亡した予後不良群と5年以降遠隔転移を認めない予後良好群の比較を行い、滑膜肉腫の予後に関与するタンパク質の同定に成功した。その中でも S タンパク質は特に予後予測の精度は高く、45

例の滑膜肉腫パラフィンブロックを使用した検証において、無病生存率・生存率に高い有意差を認めている (p=0.0015, p=0.0012) (論文投稿中)。

(2) 腫瘍特異的タンパク質についての機能解析 (特に GIST における *Pfetin* タンパク質の機能解析)

(2-a) <GIST における *Pfetin* タンパク質の翻訳後修飾の解明>

20 年度は GIST 凍結検体よりタンパク質抽出し、我々の作成した *pfetin* 特異抗体と各種リン酸化抗体にて 2D-ウエスタンブロットを行い、*Pfetin* タンパク質スポットのリン酸化のマッピングに成功した。21 年度は、質量分析計にてリン酸化部位の同定と解析を行った。

(2-b) <免疫沈降等による *Pfetin* 関連タンパク質の同定とネットワークの解明>

20 年度は GIST 凍結検体と cell line よりタンパク質を抽出し、*Pfetin* 特異抗体を用い免疫沈降を行い、*Pfetin* タンパク質と共免疫沈降される *Pfetin* 関連タンパク質バンドの確認に成功した。21 年度は、前年度より作成していた *Pfetin* タンパク質強制発現 cell line も完成し、同 cell line の免疫沈降を行い *Pfetin* 関連タンパク質バンドの確認に成功した。共免疫沈降した *Pfetin* 関連タンパク質バンドについては質量分析計にてタンパク質の同定にも成功した。

(2-c) <*Pfetin* 関連タンパク質の腫瘍マーカー・治療ターゲットのとしての有用性の大規模検証>

今後、同定された *Pfetin* 関連タンパク質については、特異抗体を用いた検証を行う。

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 12 件)

英語

- 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, and Setsuo Hirohashi: *Pfetin*, as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics (Clin Cancer Res 2008 14: 1707-1717/ 1 番目 14 名 / 査読:有)

- Yoshiyuki Suehara et al. *Pfetin* predicts outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors (Nature Clinical Practice Oncology (2008) 5(7), 364-365/ 1 番目 14 名 / 査読:有)
- Akira Kawai, Tadashi Kondo, Yoshiyuki Suehara, Kazutaka Kikuta, Setsuo Hirohashi, : Protein-expression profiles associated with clinicopathological features of bone and soft tissue sarcomas (Clin Orthop Relat Res. 2008 466(9):2099-106. / 1 番目 5 名 / 査読:有)
- Torigoe T, Terakado A, Suehara Y, Kurosawa H. Xanthoma of bone associated with lipoprotein lipase deficiency. (Skeletal Radiol. 2008 37(12):1153-6/ 3 番目 4 名 / 査読:有)
- Kobayashi E, Kawai A, Endo M, Suehara Y, Takeda K, Nakatani F, Asano T, Sakuraba M, Chuman H, Seki K, Beppu Y. Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma. (J Orthop Sci. 2008 Nov;13(6):566-71. / 4 番目 11 名 / 査読:有)
- 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, 2009 3(5), 623-634/ 1 番目 15 名 / 査読:有)
- 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, 2009 3(5), 584-596 / 1 番目 18 名 / 査読:有)
- Kazutaka Kikuta, Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi,

Tadashi Kondo, et al: Pftin as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Stromal Tumor: Novel Monoclonal Antibody and External Validation Study in Multiple Clinical Facilities. (Jpn J Clin Oncol, 2010 40: 60-72/ 9 番目 12 名 / 査読:有)

inpress

- Yoshiyuki Suehara, Masahiko Nozawa, Sung-gon Kim, Masataka Nagayama, Tomoko Kojima, Tomoaki Torigoe, Daisuke Kubota, Yasuo Yazawa, Toshiharu Matsumoto: Late recurrence of giant cell tumor of bone after adjuvant treatment. (Journal of Orthopaedic Surgery, 2010 in press/ 1 番目 9 名 / 査読:有)
- Tomoaki Torigoe, Atsuhiko Terakado, Yoshiyuki Suehara, Hisashi Kurosawa: Treatment outcome of bone and soft tissue sarcoma in elderly patients. (Journal of Orthopaedic Surgery, 2010 in press/ 3 番目 6 名 / 査読:有)

日本語

- 末原義之: 骨軟部肉腫の網羅的発現解析 (癌と化学療法: Current Organ Topics, 2008 35(3):407-410)
- 末原義之: 悪性骨・軟部腫瘍(滑膜肉腫)におけるプロテオーム解析および新たな腫瘍マーカー開発に関する研究 (整形外科療法: 整形外科トピックス, 2008 Vol. 59 No. 6 page 406)

[学会発表] (計 15 件)

海外

2008 年

- Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo, et al: Grobal protein-expression analysis of bone and soft tissue tumors. (13ème Réunion de Société Franco-Japonaise d'Orthopédie. Tokyo, Sep. 2008) (1 番目 9 名 / 査読:有)
- Yoshiyuki Suehara, Kunihiro Seki, Kiyonaga Fujii, Tadashi Hasegawa, Tadakazu Shimoda, Yasuo Beppu, Akira Kawai, Setsuo Hirohashi, Tadashi Kondo; Pftin, as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. ; (14th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, November 12-15, 2008, London, UK: CTOS Young Investigator Award) (1 番目 9 名 / 査読:有)

2009 年

- Yoshiyuki Suehara, Akira Kawai, Tadashi Kondo, et al: GST- p1 as a histological biomarker of synovial sarcoma revealed by proteomics. (15th, International Symposium on Limb Salvage; September 23 - 26, 2009, Boston, USA) (1 番目 8 名 / 査読:有)

国内

2008 年

- 末原義之: 第 5 回関東骨軟部基礎を語る会; 招待講演 (教育研修講演) 骨軟部腫瘍における新規バイオマーカーの探索- プロテオミクスの視点から- 東京 2008 年 4 月
- 末原義之 近藤格 長谷川匡 関邦彦 下田忠和 中馬広一 川井章 別府保男 廣橋説雄: 第 41 回日本整形外科学会・骨軟部腫瘍学術集会: 骨肉腫の化学療法感受性予測マーカーの開発を目的としたプロテオミクスの検討 横浜 2008 年 7 月
- 末原義之 近藤格 長谷川匡 関邦彦 下田忠和 川井章 別府保男 廣橋説雄 第 41 回日本整形外科学会・骨軟部腫瘍学術集会: 消化管間質腫瘍(GISTs)の予後予測マーカーの開発を目的としたプロテオミクスの検討 横浜 2008 年 7 月
- 末原義之 近藤格 長谷川匡 関邦彦 栃木直文 下田忠和 中馬広一 川井章 別府保男 廣橋説雄 第 23 回日本整形外科学基礎学術集会; シンポジウム 骨・軟部腫瘍の治療: Future perspectives (骨・軟部腫瘍治療の新展開) : 骨・軟部腫瘍の予後・組織マーカーの開発を目的としたプロテオーム解析 京都 2008 年 10 月
- 末原義之 菊田一貴 中山ロバート 藤井清永 市川仁 長谷川匡 関邦彦 栃木直文 下田忠和 川井章 別府保男 廣橋説雄 近藤格 日本癌学会 67 回 総会 : Proteomic signature corresponding to original site of gastrointestinal stromal tumor 名古屋 2008 年 10 月
- 末原義之: 第 164 回 骨・軟部腫瘍症例検討会; 招待講演: 腫瘍マーカーの開発を目的とした骨軟部腫瘍におけるプロテオーム解析 東京 2008 年 12 月

2009 年

- 末原義之 菊田一貴 栃木直文 中馬広一 川井章 別府保男 廣橋説雄

近藤格：第 6 回関東骨軟部基礎を語る会；滑膜肉腫組織亜型に関するプロテオーム解析 (Proteomics signatures corresponding to synovial sarcoma subtypes) 東京 2009 年 4 月

- 末原義之 渡辺純夫 近藤格：第 95 回日本消化器病学会：ワークショップ：GIST 研究の進歩と臨床応用：消化管間質腫瘍 (GIST) の予後予測マーカーの開発を目的としたプロテオミクスの検討 札幌 2009 年 5 月
- 末原義之 菊田一貴 栃木直文 中馬広一 川井章 別府保男 廣橋説雄 近藤格 第 82 回日本整形外科学会学術総会：滑膜肉腫組織亜型に関するプロテオーム解析 (Proteomics signatures corresponding to synovial sarcoma subtypes) 福岡 2009 年 5 月
- 末原義之 菊田一貴 栃木直文 中馬広一 川井章 別府保男 廣橋説雄 近藤格 日本癌学会 68 回総会：GST-P1 as a histological biomarker of synovial sarcoma revealed by proteomics (滑膜肉腫組織亜型に関するプロテオーム解析) 東京 2009 年 10 月
- 末原義之：招待講演：腫瘍マーカーの開発を目的とした骨軟部腫瘍におけるプロテオーム解析；(中央区港区整形外科医会学術講演会) 東京 2009 年 10 月
- 末原義之 菊田一貴 栃木直文 中馬広一 川井章 別府保男 廣橋説雄 近藤格：第 24 回日本整形外科学基礎学術集会；滑膜肉腫組織亜型に関するプロテオーム解析 (Proteomics signatures corresponding to synovial sarcoma subtypes) 東京 2009 年 11 月

[図書] (計 1 件)

- 末原義之 川井章：がん看護 実践シリーズ 12；骨軟部腫瘍 p64-87, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

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のキット

発明者：近藤格、川井章、末原義之

権利者：近藤格、川井章、末原義之

種類：特許

番号：特願 2009-285045

出願年月日：平成 21 年 12 月 16 日

国内外の別：国内

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・助教
研究者番号：70509405

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし