

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月16日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501057

研究課題名（和文） 臨床検体を用いた統合的オミクス解析による骨転移関連遺伝子の網羅的探索と臨床応用

研究課題名（英文） Integrative omics study on bone metastatic tumors using clinical samples for clinical applications

研究代表者 近藤 格（KONDO TADASHI）

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：30284061

## 研究成果の概要（和文）：

転移性骨腫瘍の分子背景を調べるため、手術時に得られ保管されていた臨床検体を用いて、原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織の発現解析を行った。肺癌、乳癌、肝細胞癌、大腸癌、膵癌、胃癌、腎癌、耳下腺癌を対象とした。プロテオームを解析するために蛍光二次元電気泳動法および PROTOMAP 法を使用した。また、マイクロ RNA の網羅的解析のためにマイクロアレイを使用した。原発腫瘍組織に比べ転移性骨組織において発現が亢進あるいは低下している遺伝子を同定した。培養細胞株を用いた抑制実験を実施し、増殖・浸潤・遊走との関連を確認した。

## 研究成果の概要（英文）：

To reveal the molecular backgrounds of metastatic bone tumor, we created the expression profiles of primary tumor tissues and bone metastatic tissues, which were obtained and stored at the time of surgery. Lung cancers, breast cancers, hepatocellular carcinomas, colorectal cancers, pancreatic cancers, gastric cancers, renal cell carcinomas, and parotid gland tumors were included this study. Protein expression profiles were created by two-dimensional difference gel electrophoresis, and PROTOMAP. Global microRNA expression was examined by the microarray. We identified genes whose expression levels were aberrantly regulated in the bone-metastatic tumors compared with the primary tumors. The functional significances of the identified genes were verified by the in vitro experiments.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の骨への転移は肺癌、乳癌、腎癌、前立腺癌などさまざまな悪性腫瘍において発生する。本邦では 10~20 万人の癌患者が骨への転移を患っていると推定されている。腫瘍細胞が骨に転移すると疼痛、病的骨折、麻痺が発生する。そのような場合、全身状態や生命予後などを勘案して、QOL 維持のために外科的手術が行われている。しかし、脊椎など解剖学的に手術切除が困難な部位に発生した骨転移に対しては、疼痛緩和などの対処療法が行われてきた。

薬物療法としては、骨転移部位では破骨細胞の活性が亢進し骨吸収が異常亢進しているので、破骨細胞の増殖を抑制する薬が薬物療法として使用されている。たとえば破骨細胞にアポトーシスを誘導するビスホスホネート製剤である。また、分子標的薬の臨床開発も進んでいる。一方、骨転移した腫瘍細胞そのものに対しては、原発腫瘍に対応した治療としてホルモン療法、化学療法、放射線療法などが行われているものの、骨転移の機構に立脚して原発腫瘍組織から骨への転移を抑制する抗癌剤は得られていない。

我々はプロテオーム解析の手法を臨床検体に用い、癌の悪性度の背景にある分子機構を解明しつつ、バイオマーカーや治療標的の探索を行ってきた。臨床検体を用いたプロテオーム解析のために大型の電気泳動装置を用いた蛍光二次元電気泳動法 (Kondo et al, Nat Protocols 2007) を開発し、質量分析を基盤とした発現解析の手法である PROTOMAP 法 (Dix et al, Cell 2008) の導入を図ってきた。また、タンパク質の発現を制御するマイクロ RNA の網羅的発現解析も実施してきた。その後の多施設の検証実験に成功したバイオマーカーや、機能的意義が実証された治療標的などを得ている (Suehara et al, Clin Cancer Res 2008)。

今までに構築してきた網羅的発現解析の研究基盤を転移性骨腫瘍に応用し、転移性骨腫瘍の分子背景を解明しつつ、診断や治療に有用な研究成果を得るために本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

転移性骨腫瘍に関わる遺伝子の異常を臨床検体において同定し、診断や治療に資する知見を得ること

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体

手術時に得られた原発腫瘍組織および転移性骨腫瘍組織を使用した。対象とした悪性腫瘍は、肺癌、乳癌、肝細胞癌、大腸癌、膵癌、胃癌、腎癌、耳下腺癌である。

### (2) タンパク質の網羅的発現解析

凍結されて保管されている腫瘍組織よりタンパク質を抽出し、大型蛍光二次元電気泳動法でタンパク質の発現プロファイルを作製した。原発腫瘍組織において原発臓器間で発現が異なるタンパク質、原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織との間で発現が異なるタンパク質を同定し、質量分析で構造解析・同定実験を行った。結果はそれぞれのタンパク質について特異抗体を用いてウェスタンブロットティングで確認した。同様に PROTOMAP 法によって原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織の比較を行った。

### (3) マイクロ RNA の網羅的発現解析

凍結されて保管されている腫瘍組織より RNA を抽出し、マイクロアレイで発現プロファイルを作製した。原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織との間で発現が異なるマイクロ RNA を同定した

### (4) 同定した遺伝子の機能解析

同定した遺伝子の機能的な意義を確認するために、特異的な siRNA を培養細胞に導入し、細胞増殖、浸潤、遊走などを指標に、癌細胞への影響を調べた。

## 4. 研究成果

蛍光二次元電気泳動法を用いてタンパク質発現プロファイルを作製した。蛍光二次元電気泳動法ではタンパク質を蛍光色素で標識してから等電点と分子量で分離し、タンパク質一つ一つを蛍光シグナルとして観察する。そのため、蛍光シグナルに備わっている広いダイナミックレンジでタンパク質発現を定量的に調べることができる。また、内部標準サンプルを実験サンプルとは異なる蛍光色素で標識して実験に加えることができるので、実験間の誤差を補正することもできる。この方法で約 2500 種類のタンパク質の発現を定量的に調べた。当初は研究に使用可能な臨床検体が限られていたため、原発腫瘍の組織型に対応して転移巣で発現が異なるタンパク質が存在するかどうかという検討から実験を始めた。骨という共通した転移組織ではあるが、原発巣の組織型に対応したタンパク質が存在する可能性があることを確認した。原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織の比較を、平行して追加されたサンプルも合わせた解析を行った。その結果、転移巣で発現が亢進または減少しているタンパク質を多数観察した。質量分析を用いたタンパク質同定実験を行った。その結果、転移の機構に関わることが報告されている遺伝子、ステージなどの悪性度に関係する遺伝子、また転移等との関連が示唆されていなかった遺伝子などが同定されたものの中に含まれているこ

とがわかった。

PTOTOMAP 法を用いても同様の実験を行った。PROTOMAP 法はタンパク質を等電点で分離することなく、まず分子量で分離し、次に質量分析を用いてペプチド単位で分離して解析する。質量分析のイオン強度が定量値として扱われるためダイナミックレンジは狭く、蛍光二次元電気泳動法より定量性に乏しいという欠点がある。一方、蛍光二次元電気泳動法では等電点の関係で観察範囲からはずれるタンパク質や、等電点の電気泳動ゲルでは解析できない難溶性のタンパク質などを、質量分析の感度で高感度に観察することができる。したがって、蛍光二次元電気泳動法と PROTOMAP 法を相補的に使用することは理にかなっている。実際、PROTOMAP 法では蛍光二次元電気泳動法では観察できなかったタンパク質を、転移性骨腫瘍関連タンパク質として同定することができることを確認した。文献検索の結果、それらの中には悪性度に関わることが報告されているリン酸化酵素などが含まれていた。今回の実験では少数の症例しか検討できなかった、予備実験の結果を踏まえて症例数を増やす計画である。

マイクロ RNA についても同様の比較実験を行い、転移性骨腫瘍で発現が亢進または減少しているものを同定した。今後は RT-PCR で結果を検証する計画である。

原発臓器によらずほぼ一様に骨転移巣で異常になっているもの、骨転移との関連が今までに報告がないもの、などを同定したタンパク質から選択した。そして、対応する mRNA の発現を siRNA によって抑制し、種々の培養癌細胞における形質の変化を観察した。その結果、調べた一部のタンパク質については増殖、浸潤、遊走などに著しい影響を与えることが確認された。そのようなタンパク質については実験動物を用いた研究に着手すべく、安定抑制系、過剰発現系の作製を開始した。

#### 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 16 件)

1. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Fujita S, Kondo T. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal proteomic intra-tumor heterogeneity in colorectal cancer. *Journal of Proteomics*. 2013;78:134-47. 査読有
2. Kimura K, Ojima H, Kubota D, Sakumoto M, Nakamura Y, Tomonaga T, Kosuge T, Kondo T. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein

contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. *Journal of Proteomics*. 2013;78:362-73. 査読有

3. Sugihara Y, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Sakamoto K, Nakamura Y, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T. Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *Journal of Proteomics*. 2012;75(17):5342-55. 査読有
4. Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J. Decreased Selenium-Binding Protein 1 Enhances Glutathione Peroxidase 1 Activity and Downregulates HIF-1 $\alpha$  to Promote Hepatocellular Carcinoma Invasiveness. *Clin Cancer Res*. 2012;18(11):3042-53. 査読有
5. Ito A, Mimae T, Yamamoto Y, S, Hagiya M, Nakanishi J, Ito M, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. Novel application for pseudopodia proteomics using excimer laser ablation and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Lab Invest*. 2012;92(9):1374-85. 査読有
6. Uhlén M, Oksvold P, Älgenäs C, Hamsten C, Fagerberg L, Klevebring D, Lundberg E, Odeberg J, Pontén F, Kondo T, Sivertsson Å. Antibody-based protein profiling of the human chromosome 21. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2012;11(3):M111.013458. 査読有
7. Morofuji N, Ojima H, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Asahina D, Ushigome M, Hiraoka N, Nagino M, Kondo T. Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *Journal of Proteomics*. 2012;75(5):1577-89. 査読有
8. Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. *Journal of Proteomics*. 2012;75(4):1401-10. 査読有
9. Kikuta K, Kubota D, Saito T, Orita H, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Katai H, Shimada Y, Toyama Y, Sato K, Kaneko K, Beppu Y, Murakami Y, Kawai A, Kondo T. Clinical proteomics identified

- ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Proteomics*. 2012;75(4):1089-98. 査読有
10. Hosako M, Muto T, Nakamura Y, Tsuta K, Tochigi N, Tsuda H, Asamura H, Tomonaga T, Kawai A, Kondo T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *Journal of Proteomics*. 2012;75(3):833-44. 査読有
  11. Kubota D, Orita H, Yoshida A, Gotoh M, Kanda T, Tsuda H, Hasegawa T, Katai H, Shimada Y, Kaneko K, Kawai A, Kondo T. Pfetin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;41(10):1194-202. 査読有
  12. Mimae T, Tsuta K, Takahashi F, Yoshida A, Kondo T, Murakami Y, Okada M, Takeuchi M, Asamura H, Tsuda H. Steroid receptor expression in thymomas and thymic carcinomas. *Cancer*. 2011;117(19):4396-405. 査読有
  13. Hagiwara T, Saito Y, Nakamura Y, Tomonaga T, Murakami Y, Kondo T. Combined use of a solid-phase hexapeptide ligand library with liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis for intact plasma proteomics. *International Journal of Proteomics*. 2011;2011:739615. 査読有
  14. Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, Sugihara Y, Sakamoto K, Kobori Y, Palmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, Tanaka H, Mizushima H, Fujita S, Kondo T. Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Journal of Proteomics*. 2011;74(6):858-73. 査読有
  15. Suehara Y, Tochigi N, Kubota D, Kikuta K, Nakayama R, Seki K, Yoshida A, Ichikawa H, Hasegawa T, Kaneko K, Chuman H, Beppu Y, Kawai A, Kondo T. Secernin-1 as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics. *Journal of Proteomics*. 2011;74(6):829-42. 査読有
  16. Kikuta K, Tochigi N, Saito S, Shimoda T, Morioka H, Toyama Y, Hosono A, Suehara Y, Beppu Y, Kawai A, Hirohashi S, Kondo T. Peroxiredoxin 2 as a chemotherapy responsiveness biomarker candidate in osteosarcoma revealed by proteomics. *Proteomics Clinical Applications*. 2010;4(5):560-7. 査読有
- [学会発表] (計 21 件)
1. Kondo T. "Proteomics and immunohistochemistry validation established pfetin as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor". *Proteomics Forum 2013*, 2013 3/17 ~ 3/21; Berlin, German. 招待講演
  2. Kondo T, Kubota D, Kawai A. "Cancer proteomics for biomarker development for personalized medicine; lessons from biomarker study in gastrointestinal stromal tumor". 6th Central and Eastern European Proteomic Conference, 2012 10/14 ~ 10/17; Budapest, Hungary. 招待講演
  3. Kubota D, Kikuta K, Suehara Y, Gotoh M, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. "Proteomics revealed novel prognostic utility of KCTD12 in gastrointestinal stromal tumor". 9th Siena Meeting FROM GENOME TO PROTEOME: OPEN INNOVATIONS, 2012 8/26 ~ 8/30; Siena, Italy. 講演
  4. Kondo T, Kubota D, Ichikawa H, Tajima T, Mukaihara K, Sugihara Y, Suehara Y, Kikuta K, Kawai A. "Proteomic approach revealed novel prognostic biomarkers in gastrointestinal stromal tumor (GIST)". 17th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2012 11/14 ~ 11/17; Prague, Czech Republic. 講演
  5. Kondo T, Huang C, Sekizaki H, Ichikawa H, Sugihara Y, Kubota D, Murakami Y, Fan J. "Proteomics for biomarker development to personalized medicine". Asia Oceania Human Proteome Organization 6th Congress, 2012 5/5 ~ 5/7; Beijing, China. 招待講演
  6. Kondo T, Kubota D, Ichikawa H, Sugihara Y, Sekizaki Y, Murakami Y, Huang C, Fan J, Kawai A. "Proteomic approach for biomarker discovery towards personalized medicine". Human Proteome Organisation, 11th Annual World Congress, 2012 9/9 ~ 9/13; Boston, USA. 招待講演
  7. Kondo T. "Proteomics application for sarcoma". The symposium of therapy and diagnosis of bone and soft tissue

- neoplasm in upper extremity. 2012 3/25, Shanghai, China, 招待講演
8. 近藤 格. "プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 2011 11/17 ~ 11/20; 岡山. シンポジウム
  9. 近藤 格. "プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 70 回日本癌学会総会, 2011 10/3 ~ 10/5; 名古屋. 講演
  10. 近藤 格. "プロテオーム解析による個別化医療のためのがんバイオマーカー開発. Proteomic approach to biomarker development toward personalized medicine". 日本ヒトプロテオーム機構第 9 回大会, 2011 7/28 ~ 7/30; 新潟. シンポジウム
  11. Kondo T. "Cancer proteomics for biomarker development toward personalized medicine". 5th Central and Eastern European Proteomic Conference, 2011 9/19 ~ 9/22; Prague, Czech. 講演
  12. Kondo T., Kubota D., Kawai A. "Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis". 2011 Combined Meeting of the Connective Tissue Oncology Society and the Musculoskeletal Tumor Society, 2011 10/26 ~ 10/29; Chicago, USA. ポスター
  13. Kondo T., Hagiwara T., Kubota D., Sugihara Y., Yonemori H., Haga A., Ohtsu M., Murakami Y. "Solid-phase hexapeptide ligand library with liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis for intact plasma proteomics". Human Proteome Organisation, 10th Annual World Congress, 2011 9/3 ~ 9/7; Geneva, Switzerland. ポスター
  14. Kondo T., Hagiwara T., Kubota D., Sugihara Y., Yonemori H., Haga A., Ohtsu M., Murakami Y. "Solid-phase hexapeptide ligand library with liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis for intact plasma proteomics". Human Proteome Organisation, 10th Annual World Congress, 2011 9/3 ~ 9/7; Geneva, Switzerland. ポスター
  15. 近藤 格, 谷口 浩和, 杉原 豊, 陳 臣, 中村 友紀子, 坂本 華乃, 九嶋 亮治, 朝長 毅, 磯辺 俊明, 廣橋 説雄, 藤田 伸. "蛍光二次元電気泳動法と抗体を用いたプロテオーム解析による大腸がんバイオマーカーの開発". 第 73 回大腸癌研究会, 2010 7/2; 鹿児島. 講演
  16. 近藤 格. "Cancer proteomics for biomarker development". 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会・第 6 回日本臨床プロテオーム研究会連合大会, 2010 7/26 ~ 7/27; 千葉. シンポジウム
  17. Kondo T., Hirohashi S. "Cancer proteomics for biomarker development toward personalized Medicine". 第 69 回日本癌学会総会, 2010 9/22 ~ 9/24; 大阪. シンポジウム
  18. 近藤 格. "電気泳動法を用いたがん個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 61 回日本電気泳動学会総会, 2010 9/18 ~ 9/19; 札幌. 講演
  19. 近藤 格. "プロテオーム解析による個別化医療のためのバイオマーカー開発". 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 12/7 ~ 12/10; 神戸. 講演
  20. Kondo T. "GeMDBJ Proteomics". 4th The European Proteomics Association/British Society for Proteome Research Meeting, 6th ProCura Meeting, 2010 10/23 ~ 10/27; Estoril, Portugal. 講演
  21. Kondo T., Suehara Y., Kikuta K., Kubota D., Hosono A., Yoshida A., Tsuta K., Gotoh M., Hirohashi S., Kawai A. "Biomarker development by sarcoma proteomics". 16th Annual Connective Tissue Oncology Society Meeting, 2010 11/11 ~ 11/13; Paris, France. ポスター
- [図書] (計 2 件)
1. 近藤格 「プロテオーム解析」新臨床腫瘍学、南江堂、2012 年
  2. 近藤格 「探索的解析手法」臨床プロテオミクス、金原出版、2012 年
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 2 件)
- 名称: 分析方法  
 発明者: 木下英樹、鶴沼豊、近藤格  
 権利者: 国立がん研究センター、シャープ株式会社  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2013-71753  
 出願年月日: 2013 年 3 月 29 日  
 国内外の別: 国内
- 名称: APC-binding protein EB1 を用いた大腸癌の診断、治療法  
 発明者: 木下英樹、鶴沼豊、近藤格

権利者：国立がん研究センター、バイオマト  
リックス研究所  
種類：特許  
番号：特願 2011-94972  
出願年月日：2011年4月21日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/p09prote/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 格 (KONDO TADASHI)  
独立行政法人国立がん研究センター・研究  
所・分野長  
研究者番号：30284061

### (2) 研究分担者

川井 章 (KAWAI AKIRA)  
独立行政法人国立がん研究センター・中央病  
院・医長  
研究者番号：90252965

### (3) 連携研究者

なし