

## 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 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590858

研究課題名（和文）

血中分子シグネチャ解析法の開発と難治性呼吸器腫瘍診断への応用

研究課題名（英文）

molecular signature for detection of intractable tumors

研究代表者

柳澤 聖 (YANAGISAWA KIYOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20372112

研究成果の概要（和文）：

本研究では、悪性胸膜中皮腫と肺癌のマーカー候補タンパク質の同定を目指して先進的なプロテオミクス技術の中核をなす質量分子装置を応用した網羅的なタンパク質発現解析を進めた。その結果、正常組織と発現差を認めるタンパク質群を数百種類特定することに成功しており、今後の悪性胸膜中皮腫、肺癌病態分子診断の基盤となる成果を得たと考えられる。また、本研究期間中に、当該成果に基づいて特許の出願を2件完了している。

研究成果の概要（英文）：

We employed shotgun proteomics together with peptide labeling technology to analyze comprehensive protein expression profiles of malignant pulmonary mesothelioma (MPM) and lung cancer and hundreds of candidate marker protein have been identified. Thus, our findings demonstrate that the combined proteomic technology is an efficient strategy for global proteomic analysis to discover novel biomarkers. We have applied two patents according to our observations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫・肺癌・プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

対象疾患の一つである悪性胸膜中皮腫は、十分な対策が講じられないまま使用が継続されたアスベストに対する曝露により発症例の爆発的増加が予測され、なお且つ有効性

の高い診断法・治療法が存在しない。また、同じく対象疾患の一つである肺がんは、国内年間死亡者数が65,000人以上にのぼる代表的な難治癌であるのみならず、多くの先進国においても癌死因第一を占め、さらに、その

生存率は10年前と比較して殆ど向上していない。

## 2. 研究の目的

プロテオミクス解析は、i) ゲノムにコードされた遺伝・生命情報の最終産物で、ii) 生命現象や疾患発症・進展の責任分子であり、iii) 極めてダイナミックに発現変動し、iv) リン酸化などの多様な翻訳後修飾はDNA/RNA情報から検討し得ない、などの特徴を有するタンパク質を解析対象とすることから、ポストゲノムシーケンス研究の中核に位置づけられる。

然しながら、プロテオミクス技術を応用した臨床医学研究の現況は、依然として発展途上とも言える状態であり、世界的に見ても質量分析装置を用いた臨床プロテオミクス研究に関する主要な報告は限られている。研究代表者は、世界的にみて同分野のパイオニアの一つといえる研究成果としてタンパク質発現プロファイルに基づく肺癌病理診断法を見出し(Yanagisawa et al. *Lancet*. 2003)、さらには早期肺癌術後予後を高精度に予測可能なタンパク質発現シグネチャを抽出することに成功(Yanagisawa et al. *J Natl Caner Inst*. 2007) するなどの成果をあげている。

我々は、これらの先駆的な研究を展開する過程を通じて、解析に用いたMALDI-TOF型質量分析装置の解析可能分子量域の制限(2KDa~30KDa)、プロファイルに対応するタンパク質の同定の不確定さ、汎用性確保、血液中の大過剰存在タンパク質に起因する $10^{12}$ にも及ぶダイナミックレンジへの対応など、臨床検査としての実用化へ向けた多くの課題に直面したことから、次世代の革新的プロテオミクス分子診断法開発を目指す研究を計画するに至った。

上述のごとくに、本研究課題では、個別化医療の実現に対する期待・必要性が極めて高

い以下の難治性呼吸器腫瘍を対象として、我々が構築してきたプロテオミクス・バイオインフォマティクス技術(Yanagisawa et al. *Lancet*. 2003, *J Natl Caner Inst*. 2007, Taguchi et al. *Cancer Res*. 2008, Tomida et al. *Oncogene*. 2004, 2007, Takeuchi et al. *J Clin Oncol*. 2006)を駆使した包括的な解析により、タンパク質発現“プロファイル”に基づく新規分子診断法の開発を推進する。

## 3. 研究の方法

悪性胸膜中皮腫、肺癌、並びに正常組織試料(集積済み)を対象とし、ペプチド標識法とタンデム型質量分析装置を組み合わせ、液体クロマトグラフィーを駆使した徹底的な分画化を併用したタンパク質発現の網羅的比較定量解析を並行して推進することにより、疾患関連タンパク質・ペプチド情報を可及的に取得し、疾患関連タンパク質候補群探索の網羅性を確保する計画である。本解析では、1解析あたり3000種類以上のタンパク質の同定が可能であることを確認済である。両疾患合わせて200症例程度を対象とし、疾患関連タンパク質候補群の可及的選出を行った。

MRM技術を応用した疾患関連タンパク質群の網羅的定量解析システムの確立：解析条件の確定した分子診断マーカー候補タンパク質群全てを対象に、悪性胸膜中皮腫症例から供与された血液検体と健常人血液試料を用いたMRM解析を進め、血液試料におけるフィージビリティスタディを行った。

さらには、独立した対象疾患症例群を用いた検証を進めることにより、診断有用性の検証を進めた。

疾患診断プロファイルの一括精密定量解析法の確立：バイオインフォマティクス解析により抽出された数百種類の肺癌特異的発

現を示すタンパク質を対象とした MRM 解析系の構築を、網羅的発現プロファイル情報を最大限に活用して進めた。

#### 4. 研究成果

悪性胸膜中皮腫組織試料対象とし、質量分子装置を応用した網羅的なタンパク質発現解析を進めた結果、疾患・正常組織中に存在する 621 種類のタンパク質に関して発現プロファイル情報を取得することに成功した。この情報を基盤として、疾患組織中において発現増強を認める診断マーカー候補分子の探索を進めた結果、正常組織と比較して 3 倍以上の発現増強を認めるタンパク質群を 7 種類特定することに成功した。これらの分子に対して精密定量測定法である MRM 解析系の構築を進め、中皮腫症例と対照疾患症例由来の血液試料を用いて検討を行ったところ、候補 7 分子中 1 分子について、中皮腫症例由来の血液試料でのみその存在が確認されたことから、当該分子の診断マーカーとしての有用性が非常に高いものであると考えた。このため、実地臨床に広く還元可能な特異的高感度解析法である ELISA 系の構築を進めることとし、作成が完了したプロトタイプの解析系を用いて悪性胸膜中皮腫 21 例、肺癌 116 例、非癌呼吸器疾患 56 例由来の血清試料を対象とした検証実験を進めた結果、悪性胸膜中皮腫の診断感度 81.0%、特異度 92.6%と、高い診断有用性が示唆される結果を得た。さらに、他臓器由来の腫瘍性疾患（大腸癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌など）症例由来の血液試料を加えて検証をすすめた結果、感度・特異度ともに 90%以上と良好な精度が得られたことから、新規中皮腫診断法として開発を進める方針とした。また、本研究期間中に、当該成果に基づいて特許の出願を 2 件完了している。

肺非小細胞癌の術後予後の予測を可能とする診断法開発を目指して、予後情報などの

臨床情報が完備した肺癌組織試料（腺癌 111 例、扁平上皮癌 40 例、大細胞癌 20 例、腺扁平上皮癌 8 例）について、組織試料の酵素消化とペプチド標識に引き続く質量分析装置による定量的かつ網羅的なタンパク発現解析を遂行し、それぞれの患者の肺癌腫瘍組織が示す蛋白発現プロファイルデータの採取を進めた。これら計 179 症例から採取した腫瘍組織試料（再発 5 年以内死亡群＝予後不良症例由来 79 検体、非再発 5 年以上生存＝予後良好症例由来 75 検体を含む）の解析を完了した。また、正常肺組織試料 60 検体についても合わせて解析を行い完了した。さらに、取得したタンパク発現情報を基盤として、とくに腫瘍組織における高発現や、細胞外に分泌される可能性が高いなどのバイオマーカー候補として適した特性を持つタンパクを選択し、順次血液試料中の網羅的なタンパク発現解析に必要な選択的定量解析（Multiple Reaction Monitoring, MRM）条件の設定を行い、約 5,000 種類のタンパクを対象とした解析系の構築を完了した。

#### 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 6 件）

- 1) Hosono Y, Yanagisawa K, and Takahashi T et al., MYBPH inhibits NM IIA assembly via direct interaction with NMHC IIA and reduces cell motility. *Biochem Biophys Res Commun.*、査読有、428, 2012, 173-8
- 2) Yanagisawa K, Arima C, and Takahashi T et al., Seven-Signal Proteomic Signature for Detection of Operable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Discrimination from Autoimmune Pancreatitis. *International Journal of Proteomics*、査読有、2012, 2012, 510397
- 3) Yamaguchi T, Yanagisawa K, Arima C, and

Takahashi T et al.,  
NKX2-1/TITF1/TTF-1-induced ROR1 is  
required to sustain EGFR survival signaling in  
lung adenocarcinoma. Cancer Cell、査読有、21、  
2012, 348-61

4) Hosono Y, Yanagisawa K, Arima C, and  
Takahashi T et al., MYBPH, a transcriptional  
target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces  
cell motility and metastasis. EMBO journal、査読  
有、31, 2011, 481-93

5) Nishikawa E, Arima C, Yanagisawa K, and  
Takahashi T et al., miR-375 is activated by ASH1  
and inhibits YAP1 in a lineage-dependent  
manner in lung cancer. Cancer Research、査読有、  
71, 2011, 6165-73

6) Yanagisawa K, Arima C, and Takahashi T et  
al., Novel metastasis-related gene CIM functions  
in the regulation of multiple cellular  
stress-response pathways. Cancer Research、査読  
有、70, 2010, 9949-58

[学会発表] (計 6 件)

1) Yanagisawa K et al., Proteomic identification  
of potential biomarkers of malignant pulmonary  
mesothelioma. 2012年9月21日、第71回日本  
癌学会学術総会、ロイトン札幌、札幌

2) Yanagisawa K et al. Quantitative Proteomic  
Profiling Identifies CKAP4 as a  
Malignant Pulmonary Mesothelioma-Associated  
Molecule that Regulates Metabolic Stress. 2012年  
8月18日、MECHANISMS & MODELS OF  
CANCER、Cold Spring Harbor Laboratory, USA

3) Kawahara T. and Yanagisawa K et al.,  
Proteomic analyses for biomarker discovery in  
human pancreatic cancer. 2011年10月3日、第  
70回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、  
名古屋

4) Yanagisawa K et al. CKAP4, a novel  
malignant pulmonary mesothelioma-related gene,

regulates eIF2 $\alpha$  and a cellular stress-response.

2011年10月3日、第70回日本癌学会学術総  
会、名古屋国際会議場、名古屋

5) Kato S and Yanagisawa K et al., Proteomic  
analyses for biomarker discovery in human  
malignant pleural mesothelioma. 第69回日本癌  
学会学術総会、平成22年9月22日、大阪国  
際会議場、大阪

6) Yanagisawa K et al., CIM, novel lung cancer  
metastasis gene, regulates multiple cellular  
stress-response pathways. 第69回日本癌学会  
学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議  
場、大阪

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：胸膜中皮腫患者の早期発見のための分  
子マーカー及びその発現解析方法

発明者：柳澤 聖、高橋 隆、横井香平、長  
谷川好規、小野健一郎、八木香澄、増田 瞳、  
竹内俊幸

権利者：同上

種類：特許

番号：特願番号 2011-202463

出願年月日：平成 23 年 9 月 15 日

国内外の別：国内

名称：胸膜中皮腫患者の早期発見のための分  
子マーカーの組合せとその発現解析方法

発明者：柳澤 聖、高橋 隆、横井香平、長  
谷川好規、小野健一郎、八木香澄、上原理恵、  
藤井慶宏、岸 義朗、竹内俊幸

権利者：同上

種類：特許

番号：特願番号 2013-039022

出願年月日：平成 25 年 2 月 28 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 聖 (YANAGISAWA KIYOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20372112

(2) 研究分担者

有馬 千夏 (ARIMA CHINATSU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00534843

(3) 連携研究者

該当なし