

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390326

研究課題名(和文) 網羅的プロテオーム解析を用いた膵臓癌の発癌と転移機序の解明とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Comprehensive proteome analysis of pancreatic cancers for understanding the mechanisms of carcinogenesis and cancer metastasis

研究代表者

谷内田 真一 (Yachida, Shinichi)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：20359920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がんはきわめて予後不良のがん腫であり、診断時にすでに遠隔転移を認めることが多い。本研究の目的は、最新のプロテーム技術を用いて、膵臓がんのバイオマーカーの開発と浸潤・転移機構の解明である。我々は、膵臓がん患者の迅速解剖を行った症例で、同一患者から樹立した 腹膜播種転移巣、肝転移巣、肺転移巣の細胞株を用いて、プロテームならびにチロシンリン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、それぞれの転移巣で異なる発現パターンを示した。つまり、プロテオームレベルでも明らかながんの不均一性が存在した。さらに、転移巣ごとに、キナーゼ阻害剤に対する異なる治療効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Many patients with pancreatic cancer have metastases to distant organs at the time of initial presentation. The goal of this study is to understand the mechanisms of pancreatic cancer metastasis at the proteome level, contributing to create a novel biomarker. To address, we employed a model system in which cells isolated from three sites of metastasis (liver, lung and peritoneum) from a single patient were compared. We used a SILAC-based accurate quantitative proteomic strategy combined with a high resolution mass spectrometry to analyze the total proteome and tyrosine phosphoproteome of each of the metastases. Our data revealed distinct patterns of both overall proteome expression as well as tyrosine kinase activities across the three different metastatic lesions. This heterogeneity is significant because it led to differential sensitivity of the neoplastic cells to small molecule inhibitors targeting various kinases and other pathways.

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：膵臓癌 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは極めて予後不良のがん腫であり、診断時にすでに遠隔転移を認めることが多い。手術適応となる患者は全体の約 2~3割のみである。したがって、膵臓がんの治療戦略においては、その早期発見と転移を制御することが最も重要であると考えられる。

我々のこれまでの研究成果から、膵臓がんでは原発巣内に分子遺伝学的な不均一性 (Heterogeneity) が存在し、時間経過とともにゲノムの進化 (Clonal evolution) を遂げ、転移能を獲得することが示唆された。そして、正常細胞に最初の突然変異が起きてから転移能を獲得するまでの期間は、少なくとも 10 年以上であることも分かってきた。

2. 研究の目的

上記のような知見から、膵臓がんにおいて最も重要な研究課題は、この根治可能な期間に膵臓がんを診断可能なバイオマーカーの開発、ならびに微小な転移巣を早期 (画像診断でとらえられる前) に診断するバイオマーカーの開発や転移機序の解明である。

本研究の目標は、最新のプロテオーム解析技術を用いて、膵臓がんのバイオマーカーの開発と浸潤・転移機構を解明し、新薬開発への基盤作りである。

3. 研究の方法

我々は、膵臓がん患者の迅速解剖を行った症例で、同一患者から樹立した 腹膜播種転移巣、肝転移巣、肺転移巣の細胞株を用いて、網羅的なプロテオーム解析 (SILAC-based quantitative proteomics strategy combined with high resolution mass spectrometry) を行った (図 1)。

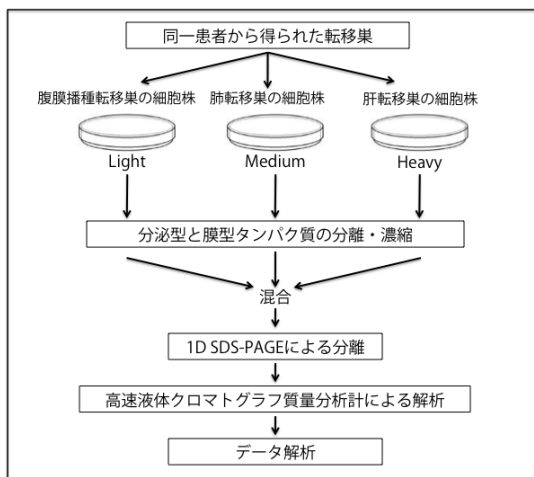


図 1 : 網羅的プロテオーム解析の流れ

これらの転移巣間に発現の相違が認められたタンパクを、我々が作成した TMA (Tissue Micro Array) スライド (一枚のプレパレートに 32 人分の膵臓がんの原発巣と腹膜播種転移巣、遠隔転移巣の標本がペアで貼り付けられてある) で免疫組織化学染色を

行った。

さらに、通常網羅的プロテオーム解析に加えて、チロシンリン酸化プロテオーム解析を行い、シグナル伝達経路に関する検討を行った。

上記の方法で遠隔転移と関連したシグナル伝達経路に関連するチロシンリン酸化阻害薬による治療実験を *in vitro* と *in vivo* で行った。

4. 研究成果

SILAC 法によるプロテオーム解析の結果、遠隔転移巣、つまり肝転移巣と肺転移巣は類似したタンパク発現を認めたのに対し、これらは腹膜播種転移巣のそれとは明らかに異なっていた。つまり膵臓がんでは、ゲノムと同様にタンパク質も同一患者のがん病巣間で明らかな不均一性 (Heterogeneity) が存在することが判明した。

さらに発現の変動を認めたタンパク質を機能ごとに分類し、詳細に検討したところ、Receptor activity と Signal transducer activity に関連するタンパク質が各転移巣で異なっていた。その結果、転移巣ごとにシグナル伝達経路の活性化の誘導が、異なる可能性が示唆された。

次に、チロシンリン酸化に基づくシグナル伝達経路が転移巣間で異なるか否かについて、ウェスタン・プロット法と、チロシンリン酸化ペプチドのイムノアフィニティー精製を行い、LC-MS/MS でその変動を詳細に検討した (図 2)。

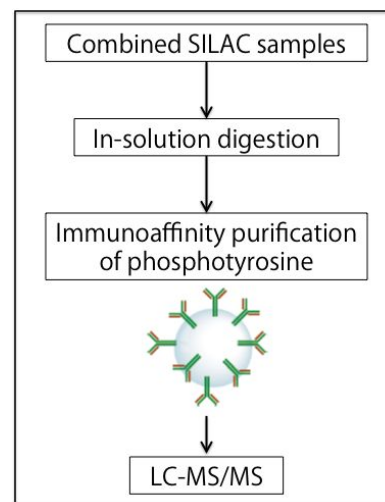


図 2 : チロシンリン酸化ペプチドの変動解析のワークフロー

その結果、Signal transduction すなわちチロシンキナーゼに参与する分子の活性化が、転移巣間で大きく異なることが新たに判明した。

したがって、転移巣によって薬剤の効果が異なる可能性が示唆され、レセプター・チロシンキナーゼを標的とする薬剤 (EGFR、ErbB2、Axl、Met と VEGFR) の反応性を *in vitro* で検討したところ、それぞれの細胞

株ごとに異なることが判明した。

TMA (Tissue Micro Array) スライドで免疫組織化学染色を行ったところ、同様の結果が認められた。

そのうち Axl は遠隔転移巣 (肝転移巣と肺転移巣) でリン酸化の亢進を認めたため、ヌードマウスのゼノグラフトモデルを用いて Axl 阻害剤 (R428) による治療実験を行った。その結果、腹膜播種転移巣では効果が全く認められなかったのに対し、肝転移巣と肺転移巣では Axl 阻害剤による明らかな縮小効果を認めた。

さらに多数の迅速解剖症例の原発巣と転移巣を対象に、免疫組織化学染色により、Axl タンパクの発現を検討した。その結果、転移巣が無数に見られる症例では、原発巣における Axl タンパクの発現が高いことも判明した。

上記の結果から、ゲノムと同様にタンパク質のがんにおける不均一性 (Heterogeneity) が明らかとなった。これらの結果は、臨床的に薬剤の効果が、原発巣や転移巣によって異なることを反映していると考えられる。

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)

Kim MS, Zhong Y, Yachida S, Rajeshkumar NV, Abel ML, Marimuthu A, Mudgal K, Hruban RH, Poling JS, Tyner JW, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Pandey A. Heterogeneity of pancreatic cancer metastases in a single patient revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2014, in press. 査読あり

pii: mcp.M114.038547.

Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y, Yachida S. Immunohistochemically detected expression of three major genes (*CDKN2A/p16*, *TP53* and *SMAD4/DPC4*) strongly predicts survival in patients with pancreatic cancer. *Ann Surg* 2013, 258: 336-346. 査読あり

doi:10.1097/SLA.0b013e3182827a6.

Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. *Oncogene* 2013, 32: 5253-5260. 査読あり

doi: 10.1038/onc.2013.29.

Yamamoto N, Okano K, Kushida Y, Deguchi A, Yachida S, Suzuki Y. Clinicopathology of recurrent hepatocellular carcinomas after radiofrequency ablation treated with salvage surgery. *Hepatol Res* 2013, Aug 19. [Epub ahead of print]. 査読あり

り

doi: 10.1111/hepr.12223.

Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM, Morgan RA, Saunders T, Laheru DA, Herman JM, Hruban RH, Klein AP, Jones S, Velculescu V, Wolfgang CL, Iacobuzio-Donahue CA. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res* 2012, 18: 6339-47. 査読あり
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1215.
Yachida S. Novel therapeutic approaches in pancreatic cancer based on genomic alterations. *Curr Pharm Des* 2012, 18: 2452-2463. 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内田 真一 (YACHIDA, Shinichi)
国立がん研究センター研究所・難治がん研究分野・ユニット長
研究者番号: 20359920

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

Iacobuzio-Donahue CA
Memorial Sloan Kettering Cancer
Center・病理学・教授
研究者番号：なし