

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501341

研究課題名(和文) 肺がんの新規診断マーカー、治療標的分子の機能解析、開発

研究課題名(英文) Identification of new biomarkers and therapeutic targets for lung cancer

研究代表者

高野 淳 (ATSUSHI, TAKANO)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：50582607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌で高頻度に発現上昇し、正常臓器での発現が低い分泌蛋白LASEP1, LASEP3につき血清、予後マーカーとしての有用性を再確認した。siRNAでこれらの遺伝子の発現を抑制すると、アポトーシスの誘導により癌細胞の増殖が抑制された。siRNAを導入した細胞に対しGene chipを用い、がんの増殖に強く関与する下流遺伝子を同定し、PCRで発現を確認し、機能解析を進めた。

癌組織DNAを次世代シーケンサーで解析し、肺がん特異的な遺伝子変異を同定した。この遺伝子変異を血液中で同定するため、高感度なDigital PCRで検討している。予備検討で血清EGFR遺伝子変異を10例中4例で検出できた。

研究成果の概要(英文)：We identified a secreted proteins, LASEP1 and LASEP3 (LASEPs) as a candidate. Immunohistochemical staining showed that high level of LASEPs expression was associated with poor prognosis for NSCLC patients. Serum LASEPs levels were higher in NSCLC patients than in healthy volunteers. Furthermore, reduction of LASEPs by siRNA suppressed lung cancer cell proliferation and induced apoptosis. In addition, subsequent microarray analysis of these cancer cells identified several candidate downstream genes of LASEPs that relate to cell growth signals.

Next generation sequencer analysis detected tumor-specific mutation in lung cancer tissue. In addition, we detected mutation in mRNA from serum exosome or free DNA from serum by digital PCR. Digital PCR analysis showed that activating EGFR mutation in serum exosome was detected 4 cases out of 10.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は癌死の第1位を占めており、約70%が手術不可能な進行期肺癌で発見される。抗がん剤治療、放射線治療などが行われるが、予後不良な疾患である。肺癌による死亡が多い原因は早期発見が困難なことと進行癌に有効な治療法が確立していないことである。

実際、肺癌の中で比較的治癒率が高いのは非小細胞肺癌の病期 IA 期のみで、病期が進むにつれて5年生存率は大幅に低下する。(5年生存率: pStage IA 83.3%, IB, 66.4%, IIA 60.1%, IIB 47.2%, IIIA 32.8%, IIIB 30.4%, IV 23.2%、2007年肺癌合同委員会より引用) また、NIHのデータによると肺がんを stage I, II の段階で発見することができれば、生存率が現在の16%から53%にまで上げることができるとされる。一方、分子腫瘍学の発展により開発された分子標的薬などにより肺癌の治療成績が向上しているが、その治療成績は十分であるとは言えない。加えて新規治療標的分子による治療法の開発も必要である。

## 2. 研究の目的

肺癌の約70%が手術不可能な進行期で発見され、抗がん剤、放射線治療が行われるが、予後不良である。ただ、肺癌も早期発見できれば手術で完治可能である。そこで、早期診断、新規治療標的分子の開発のため、東京大学医科学研究所の肺癌 cDNA マイクロアレイのデータより、肺癌で高頻度に発現上昇し、生命維持に重要な正常組織で発現のほとんどないタンパクについて解析を行っている。

- (1) 新規血清・組織診断マーカーの同定: 早期発見、予後、薬剤感受性に関する血清組織マーカーの同定、有用性検討。
- (2) 新規治療標的分子の開発: 肺癌の増殖浸潤に関わるタンパクに対し、siRNA、抗体(シグナル伝達阻害、ADCC活性、抗体の内在化を利用)などを用いて、新規治療薬を開発する。

## 3. 研究の方法

候補遺伝子の抽出: 肺癌手術検体の原発巣より採取した検体と肺癌細胞株を用いて PCR

により正常肺と比較し肺癌での発現上昇を確認する。

候補遺伝子の機能解析: siRNA、一過性強制発現によりがんの増殖、浸潤への関与を検討。

術後肺癌の予後マーカーとしての可能性: 我々の作製した約400症例の非小細胞肺癌のTissue Microarrayを用いて、抗体染色を行い、抗体特異的な染色と病理学因子の関連を検討する。

血清マーカー: 膜・分泌タンパクについては、作製したモノクローナル抗体、市販の抗体を用いてELISAシステムを構築し、肺癌患者、健常人の血清中の濃度を測定する。

## 4. 研究成果

肺癌で高頻度に発現上昇し、正常臓器での発現が低い分泌蛋白 LASEP1, LASEP3 につき血清、予後マーカーとしての有用性を再確認した。siRNA でこれらの遺伝子の発現を抑制すると、がん細胞の増殖が抑制され、Sub G1 期の細胞の割合が増加し、アポトーシスが誘導された。更に、siRNA を導入した細胞に対し Gene chip を用い、がんの増殖に強く関与する下流遺伝子を同定し、PCR で発現を確認し、機能解析を進めた。

癌組織 DNA を次世代シーケンサーで解析し、肺がん特異的な遺伝子変異を同定した。この遺伝子変異を血液中で同定するため、高感度な Digital PCR で検討している。予備検討で血清 EGFR 遺伝子変異を10例中4例で検出できた。

## 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 5 件)

1. Kobayashi Y, Takano A, Miyagi Y, Tsuchiya E, Sonoda H, Shimizu T, Okabe H, Tani T, Fujiyama Y, Daigo Y. Cell division cycle-associated protein 1 overexpression is essential for the malignant potential of colorectal cancers. Int J Oncol. 2014 Jan;44(1):69-77. doi: 10.3892/ijo.2013.2177. 査読有
2. Oshita H, Nishino R, Takano A, Fujitomo T, Aragaki M, Kato T, Akiyama H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. RASEF is a

novel diagnostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer. *Mol Cancer Res.* 2013 Aug;11(8):937-51. doi: 10.1158/1541-7786. MCR-12-0685-T. 査読有

3. Daigo Y, Takano A, Teramoto K, Chung S, Nakamura Y. Systematic Approach for Development of New Therapeutics for Lung Cancers through Cancer Genomics Analysis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2013 Aug;94(2):218-23. doi: 10.1038/clpt.2013.90. 査読有

4. Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Deguchi N, Takano A, Tomoda Y, Yoshioka K, Fujitaka K, Arihiro K, Okada M, Yokoyama A, Kohno N. Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 is a prognostic biomarker for lung cancer. *Pathobiology.* 79(1):24-33. 2012 doi: 10.1159/000331230. 査読有

5. Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic Biomarker in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Internal Journal of Cancer Int J Cancer.* 130(2):377-87 2012 doi: 10.1002/ijc.26007. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 高野 淳、中村 祐輔、醍醐 弥太郎、肺癌の新規診断マーカー、予後マーカー、治療標的分子である LASEP1 の機能解析. 第 59 回人類遺伝学会 平成 26 年 11 月 21 日・東京

2. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, Characterization of LASEP3 as a serum diagnostic and prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. 73<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 平成 26 年 9 月 25 日. 横浜.

3. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, LASEP3 as a serological and prognostic biomarker and a therapeutic target. 平成 26 年 7 月 17 日. 福岡.

4. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo Identification of a lung cancer growth factor, LASEP1, as a serological and prognostic biomarker and a therapeutic target. 2014 ASCO Annual meeting, 平成 26 年 6 月 2 日 Chicago.

5. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo. Characterization of LASEP3 as a serological and prognostic biomarker and a therapeutic target for lung cancer. 2013 AACR Annual meeting, 平成 26 年 4 月 6 日. San Diego.

6. 高野 淳、中村 祐輔、醍醐 弥太郎、トランスクリプトーム解析により同定した肺癌の新規バイオマーカーで治療標的分子である LASEP3 の機能解析. 第 58 回人類遺伝学会 平成 25 年 11 月 23 日・仙台

7. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, Characterization of LASEP1 as a serological biomarker and a passive immunotherapeutic target for lung cancer. 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 平成 25 年 10 月 5 日. 横浜

8. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, Characterization of a lung cancer growth factor, LASEP3 as a serological and prognostic biomarker and a therapeutic target 平成 25 年 8 月 30 日. 仙台

9. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, Characterization of a lung cancer growth factor, LASEP1, as a serologic and prognostic biomarker and a therapeutic target. 2013 ASCO Annual meeting, 平成 25 年 6 月 3 日 Chicago.

10. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo. Characterization of a lung cancer growth factor, LASEP1 as a serological biomarker and a therapeutic target 102<sup>nd</sup> AACR Annual meeting, 平成 25 年 4 月 5 日. Orland.

11. 高野 淳、中村 祐輔、醍醐 弥太郎、包括的遺伝子解析に基づいた肺癌の新規診断マーカー・治療標的分子である LASEP 1 の同定と機能解析 第 57 回人類遺伝学会 平成 24 年 10 月 27 日・東京

12. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, Identification of LASEP3 as a diagnostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 平成 24 年 10 月 5 日・札幌

13. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo, Characterization of a lung cancer growth factor, LASEP1 as a serological and prognostic biomarker and a therapeutic target. 第 10 回 臨床腫瘍学会 平成 24 年 7 月 26 日・大阪

14. A Takano, Y Nakamura, Y Daigo. Characterization of a lung cancer growth factor, LASEP1 as a serological and prognostic biomarker and a therapeutic target. 2012 AACR Annual meeting, 平成 24 年 4 月 3 日. Chicago.

〔図書〕(計 1 件)

高野 淳、醍醐 弥太郎、日本臨床社、日本臨床増刊号、抗がん剤の副作用と支持療法、2015 年、73

〔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：  
出願年月日：  
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) 高野 淳 (TAKANO ATSUSHI)  
東京大学・医科学研究所・特任講師  
研究者番号：50582607

(2) 研究分担者

醍醐 弥太郎 (DAIGO YATARO)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30325029