

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293130

研究課題名(和文) 新規腫瘍検査法評価と未知なるバイオマーカー因子同定

研究課題名(英文) Identifying several novel biomarkers of malignant tumors

研究代表者

茶野 徳宏 (Chano, Tokuhiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40346028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍に対する医学検査の革新を意図し、独自に開発してきた腫瘍バイオマーカー RB1CC1, p62/SQSTM1、他の臨床医学的検証を行った。とともに、ゲノム変異モデルマウスを用いた未知の悪性腫瘍バイオマーカーの探索、同定を併行して行ってきた。

一方で、正常細胞系列と癌細胞系列との比較に於いて発現解析、主成分分析を施行し、がん細胞、がん幹細胞に特異的発現を示す新規の分子群を同定し、革新的な標的治療分子として特許申請を行い、更に、これらの解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：In order to renovate the clinical laboratory examination for malignant tumors, we clinically verified the originally developed biomarkers such as RB1CC1 and p62/SQSTM1, etc. In parallel, we also conducted the trial identification of unknown biomarkers for tumors using the model mice with genetic mutations caused by ENU.

From a different side, gene expression in cancer and the stem cells (CSCs) was investigated by comparisons with normal cells through global transcriptomics and principal component analyses. We found that novel molecules are selectively expressed in cancer cells of different histotypes, and we made an application for Japanese patents about these molecular candidates as promising therapeutic targets for cancer.

研究分野：遺伝子診療

キーワード：biomarker 悪性腫瘍 RB1CC1 p62/SQSTM1 がん幹細胞 分子標的 RAB39A RXRB

1. 研究開始当初の背景

腫瘍検査医学の更なる革新を意図し、我々がこれまで独自に開発してきた腫瘍マーカー因子の臨床医学的検証を行う計画をした。とともに、ゲノム変異モデルマウスを用いた未知の腫瘍検査バイオマーカー因子の探索・同定を、併行して遂行することを計画した。

2. 研究の目的

“汎用性、実践性”をキーワードに、これまでに独自に開発を続けてきた腫瘍マーカー、RB1CC1, p62/SQSTM1, etc.について臨床医学的検証を行うこととした。更には、RIKEN ENU 変異マウスを用いた探索を行い、腫瘍検査、代謝検査、等、新規のバイオマーカーとなり得る未知の因子について、その探索・同定を遂行することとした。

これまでの実績に基づく臨床医学的検証と未知のバイオマーカー因子探索同定の両輪から、腫瘍検査医学の更なる発展、革新に寄与することを企画した。

3. 研究の方法

(1) RB1CC1, p62/SQSTM1 についての臨床医学的解析

我々がこれまで“汎用性、実践性”をキーワードに独自に開発を続けてきた各種の悪性腫瘍バイオマーカー、RB1CC1 (PLoS One 2010, Head Neck 2012), p62/SQSTM1, etc. について、臨床医学的、病理学的な解析に基づく検証を行う。

(2) RB1CC1 KO 変異マウスに於ける胎生致死を救済する長寿因子 S の探索・同定

次世代シーケンサーを用いた exome screening (G1 ゲノム ENU 変異の網羅的検出) と、引き続き G2-3 世代 intercross による *Rb1cc1* m/m 胎仔マウスの genotype-phenotype 関連解析により、長寿因子 S の同定を進める。

研究期間中に、当初計画にはなかった計画ではあるが、以下を実施した。

(3) 癌細胞特異的発現分子を標的とする新規腫瘍検査法、治療法の開発

癌細胞系列と正常細胞系列の transcriptomics & metabolomics を比較解析し、主成分分析を行うことによって、癌細胞系列に特異的機能発現を示す分子群を同定する。これら癌細胞特異的な機能発現分子については、標的化実験を行い、新規の治療標的を同定、革新的創薬に結びつけて行く。

4. 研究成果

独自開発の腫瘍マーカー臨床医学的検証と未知のバイオマーカー因子探索同定の両輪とともに、一方で、正常細胞系列と癌細胞系列に於いて、比較 multi-omics 解析、主成分分析を遂行した。癌細胞に特異的発現を示す発現分子群を新規に同定し、特許申請した。

(1) 独自開発の腫瘍バイオマーカー p62/SQSTM1, N-GlcNAc2 についての cohort studies

腫瘍バイオマーカーの検証として、口腔扁平上皮の癌化における p62/SQSTM1 の役割とその臨床的意義を検討した。また、下咽頭癌における p62/SQSTM1 の過剰が放射線治療抵抗性と関与し、治療選択の際の良い指標となることを実証した。それぞれ、2013、2016 年度に論文にて発表した。一方で、腎癌に於ける飢餓細胞死のバイオマーカーとして N-GlcNAc2 蛋白の蓄積を発見し得た。本内容は 2014 年度に発表した。

(2) RB1CC1 KO 変異マウスに於ける胎生致死を救済する長寿因子 S の探索、同定

ゲノム変異モデルマウスを用いた未知の腫瘍検査バイオマーカー因子の探索、同定については、未だ継続中である。今後、責任領

域の更なる解析を進め、未知の検査・治療バイオマーカー、長寿因子の同定に至る予定である。

(3) 癌細胞特異的発現分子を標的とする新規腫瘍検査法、治療法の開発

骨肉腫、乳癌細胞系列と正常線維芽細胞、間葉系幹細胞系列とを transcriptomics & metabolomics 比較解析し、主成分分析を行うことによって、癌細胞系列に特異的発現を示す分子群を同定した。これら癌細胞に特異的な分子については、標的化による実証実験の上、新規の抗がん分子標的として特許申請を行った。尚、これら分子のうち、特に RAB39A に対する標的治療有用性の proof of concept を積み上げることができた。現在、論文発表を準備し、更に、本分子に対する標的治療創生に向かって研究を継続している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Isono T, Chano T, Okabe H, Suzaki M. Study of global transcriptional changes of N-GlcNAc2 proteins-producing T24 bladder carcinoma cells under glucose deprivation. **PLoS One**. 8(4): e60397. 2013. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0060397.
2. Inui T, Chano T, Takikita-Suzuki M, Nishikawa M, Yamamoto G, Okabe H. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. **PLoS One**. 8(9): e74398. 2013. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0074398.
3. Isono T, Chano T, Kitamura A, Yuasa T. Glucose deprivation induces G2/M transition-arrest and cell death in N-GlcNAc2-modified protein-producing renal carcinoma cells. **PLoS One**. 9(5): e96168. 2014. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0096168.
4. Zhao L, Xu YH, Qin H, Abe S, Akasaka T, Chano T, Watari F, Komatsu N, Chen X. Platinum on nanodiamond: A promising prodrug conjugated with stealth polyglycerol, targeting peptide, and acid-responsive antitumor drug. **Adv Funct Mater**. 24(34): 5348-5357. 2014. 査読有り doi: 10.1002/adfm.201304298
5. Kita H, Okamoto K, Kushima R, Kawauchi A, Chano T. Dimethyl sulfoxide induces chemotherapeutic resistance in the treatment of testicular embryonal carcinomas. **Oncol Lett**. 10(2): 661-666. 2015. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4509453/>
6. Takagi A, Kume S, Kondo M, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S, Koya D, Haneda M, Chano T, Matsusaka T, Nagao K, Adachi Y, Chan L, Maegawa H, Uzu T. Mammalian autophagy is essential for hepatic and renal ketogenesis during starvation. **Sci Rep**. 6: 18944. 2016. 査読有り doi: 10.1038/srep18944.
7. Lemma S, Avnet S, Salerno M, Chano T, Baldini N. Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. **PLoS One**. 11(2): e0149481. 2016. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0149481.
8. Isono T, Chano T, Yonese J, Yuasa T. Therapeutic inhibition of mitochondrial function induces cell death in starvation-resistant renal

- cell carcinomas. **Sci Rep.** 6: 25669. 2016. 査読有り doi: 10.1038/srep25669.
9. **Chano T**, Avnet S, Kusuzaki K, Bonucci G, Sonveaux P, Rotili D, Mai A, Baldini N. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. **Am J Cancer Res.** 6(4): 859-875. 2016. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859889/>
 10. Avnet S, Lemma S, Cortini M, Pellegrini P, Perut F, Cesari V, Zini N, Kusuzaki K, **Chano T**, Grisendi G, Dominici M, De Milito A, Baldini N. Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance. **Oncotarget.** 7(39): 63408-63423. 2016. 査読有り doi: 10.18632/oncotarget.11503.
 11. Isono T, **Chano T**, Yoshida T, Kageyama S, Kawauchi A, Suzaki M, Yuasa T. Hydroxyl-HIF2- α is potential therapeutic target for renal cell carcinomas. **Am J Cancer Res.** 6(10): 2263-2276. 2016. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088290/>
 12. Avnet S, Di Pompo G, **Chano T**, Errani C, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Donati DM, Baldini N. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- κ B activation. **Int J Cancer.** 140(6): 1331-1345. 2016. 査読有り doi: 10.1002/ijc.30540.
 13. Massa A, Perut F, **Chano T**, Woloszyk A. Mitsiadis TA, Avnet S, Baldini N. The effect of extracellular acidosis on the behaviour of mesenchymal stem cells in vitro. **Eur Cell Mater.** 33: 252-267. 2017. 査読有り doi: 10.22203/eCM.v033a19.
 14. Di Pompo G, Lemma S, Canti L, Rucci N, Ponzetti M, Errani C, Donati D, Gillies R, **Chano T**, Baldini N, Avnet S. Intratumoral acidosis fosters cancer-induced bone pain through the activation of the mesenchymal tumor-associated stroma in bone metastasis from breast carcinoma. **Oncotarget.** 2017. Apr 13; Epub ahead of print. 査読有り [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=17091&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=17091&pubmed-linkout=1)
 15. Arai A, **Chano T**, Ikebuchi K, Hama Y, Ochi Y, Tameno H, Shimada T. p62/SQSTM1 levels predicts radiotherapy resistance in hypopharyngeal carcinomas. **Am J Cancer Res.** 2017. 7(4): 881-891. 査読有り <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411795/>
- [学会発表](計 3 件)
1. **Chano T**, Nishimura I, Kita H, Matsusue Y, Okabe H. RB1CC1 suppresses type II collagen synthesis in chondrocytes, and causes dwarfism. **CORS 2013** (8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies), San Servolo, Venice, Italy, 2013.10.13-16.
 2. **Chano T**. Tumour-specific metabolic

adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. (Keynote lecture) ISCaM2015 (2nd Annual Meeting of the International Society of Cancer Metabolism), San Servolo, Venice, Italy, 2015.9.16-19.

3. **Chano T**, Avnet S, Kusuzaki K, Mai A, Baldini N. Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells. EORS 2016 (European Orthopaedic Research Society). Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy, 2016.9.14-16.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：癌の検査方法、癌細胞増殖阻害剤、抗癌剤及び抗癌剤のスクリーニング方法

発明者：茶野徳宏

権利者：滋賀医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-123952

出願年月日：2015年6月19日

国内外の別：国内

取得状況 (計 2 件)

名称：癌マーカー及び癌細胞の検査方法

発明者：茶野徳宏

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第 5574522 号

取得年月日：2014年7月11日

国内外の別：国内

名称：頭頸部癌及び食道癌用抗癌剤及び増強

剤

発明者：茶野徳宏、島田剛敏

権利者：滋賀医科大学、株式会社ジーンケア

研究所

種類：特許

番号：特許第 5762103 号

取得年月日：2015年6月19日

国内外の別：国内

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茶野 徳宏 (CHANO Tokuhiro)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40346028

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし

研究者番号：