

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293191

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫の新規分子標的の同定に基づく革新的診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular diagnosis and therapy of malignant pleural mesothelioma

研究代表者

柳澤 聖 (YANAGISAWA, Kiyoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20372112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：新たな胸膜悪性中皮腫分子診断法の開発を目指して、標的分子を検出可能なELISAシステムの開発を進めた結果、悪性胸膜中皮腫症例と健常対照者との比較において感度・特異度がともに90%を超える診断精度を得ることに成功し、新規分子診断法開発基盤構築を完了する事が出来た。並行して進めた悪性胸膜中皮腫に対する治療標的候補分子の機能解析に関しては、共作用するキナーゼとフォスファターゼの同定に成功すると共に、下流の制御分子を同定し、その制御機構の詳細を明らかと出来た。この成果は、悪性胸膜中皮腫に対する新たな分子標的治療の基盤構築に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed ELISA to analyze the concentration of novel target molecule for malignant pleural mesothelioma diagnosis and found that a comparison between mesothelioma patients including 18 cases of stage I and the healthy controls revealed an area under the curve of 0.9 (sensitivity and specificity > 90.0%). Thus level of target molecule in serum can discriminate surgically resectable malignant pleural mesothelioma patients from healthy individuals. We also identified another molecule, which is aberrantly up-regulated in malignant pleural mesothelioma, and conducted functional analyses of it. We identified downstream pathway of it including kinase and phosphatase. Our findings shed light on the underlying mechanisms how the tumor cells manage cellular stresses commonly caused from surrounding microenvironment at both primary and metastatic sites.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 バイオマーカー 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

中皮腫の発生にはアスベストの曝露が深く関与しており、これはグローバルな「人的災害」に位置づけられる。日本や英国など工業で長年使用してきた国では、現在でも持続的に死亡例の増加が認められ、さらには、未だアスベストの使用を規制していない中国などの新興国では、今後爆発的な発症例の増加が懸念されている。中皮腫は、治療への反応が認められないまま重症化していく例が多い典型的な難治性腫瘍であり、早期発見を可能とする革新的な分子診断法あるいは、特異的分子標的治療法の開発が希求されている。

研究代表者は、プロテオミクス研究分野における世界的パイオニアの一人としての業績を有し (Yanagisawa et al., Lancet 2003)、さらには、我が国におけるプロテオミクス応用研究分野においても先端的な実績を有する (Yanagisawa et al., J. Natl Cancer Inst. 2007; Cancer Res. 2010, Taguchi and Yanagisawa et al., Cancer Res. 2008)、また、がん臨床に应用が期待される新たな分子標的の同定・機能解析に関する報告を行う (Yamaguchi and Yanagisawa et al. Cancer Cell 2012, Hosono and Yanagisawa et al. EMBO 2011) と共に、その活動拠点の研究グループは、バイオインフォマティクス解析技術に関して、極めて高い評価を得ている (Tomida and Arima et al., J Clin Oncol. 2009; Tomida and Yanagisawa et al., Oncogene. 2004, 2007, 2009)。これらを駆使して進めた探索的研究において、これまでに、小胞体膜に局在中皮腫組織で過剰発現が認められ、中皮腫細胞増殖に関与すると共に、低栄養などが惹起するストレス応答に関与する知見を得ているタンパク質と、中皮腫細胞から分泌され、その増殖に深く関わりると共に、中皮腫症例由来の血液試料中にその存在が確認されたタンパク

質の単離・同定に成功していた。

2. 研究の目的

(1) 我々が見出した小胞体に存在し中皮腫細胞で高発現するタンパク質の発現抑制は、中皮腫細胞の増殖を阻害すると共に、周囲微小環境からのストレス時に重要な働きを持つ eIF2 α のリン酸化を誘導するという知見をこれまでに得ている。リン酸化 eIF2 α は、タンパク質の翻訳停止、或いは ATF4 を介した p21 誘導による細胞周期停止などを惹起し、不良な微小環境で増殖を続ける腫瘍に対して抑制的に働くことから、新たな治療標的として注目されつつある (Nature 2012, Nat. Rev Cancer 2004)。そこで本研究課題では、悪性中皮腫細胞の増殖に関連する標的タンパク質と eIF2 α が担うシグナル経路の徹底的な解明を目指した。

(2) 中皮腫症例血液中に検出されると共に、細胞株を用いた検討結果より、中皮腫において特異的に高い発現を示す事が確認されている標的タンパク質に関しては、高感度・高精度 ELISA を作成し、分子診断法の有用性検証を進め、臨床研究を踏まえて実臨床への導入を目指した。さらには、その発現抑制により中皮腫細胞株において増殖阻害効果が確認されていたことから、標的タンパク質シグナルネットワークの網羅的解析を進めることにより、さらなる新規分子標的治療法開発の基盤構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 標的タンパク質発現抑制による eIF2 α リン酸化の誘導には、小胞体膜上に存在する既知のキナーゼである PERK の活性化を伴わず、新たな経路の存在が示唆されていた。そこで、既知の eIF2 α を基質とするキナーゼのスクリーニングを行い、それぞれに対する siRNA を用いた発現抑制・遺伝子導入を組み合わせる事により、eIF2 α リン酸化制御、細胞増殖能、ストレス対応能に対する

効果、或いはそのレスキュー効果について検討した。また、テトラサイクリン誘導標的タンパク質発現中皮腫細胞株を樹立し、in vivo における eIF2 α リン酸化制御・細胞増殖能・浸潤能などへの関与について解析を進めた。

(2) ヒト臨床試料(血清・血漿、または胸水など)を対象として標的タンパク質を検出するために、既に作成を完了している数十種類のモノクローナル抗体群を用いて、サンドイッチ ELISA の確立を目指した。集積済み血液検体(中皮腫、肺がん、非がん呼吸器疾患症例、健常者など 500 検体以上)に加えて、各種臓器の腫瘍細胞株培養上清を用いて、確立した解析系の評価を進めた。検出感度・特異度の高い抗体セットに関しては、簡便かつ、迅速な臨床検査法の提供を目指して、検出抗体の直接標識法を用いた系の開発を行い、将来的な臨床試験に備えたデータの蓄積を進めた。

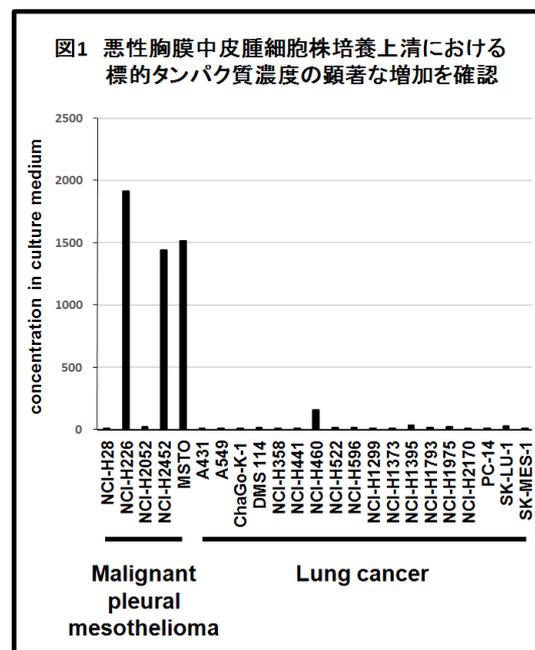
さらには、これらの抗体を用いて抗腫瘍効果を持つ抗体のスクリーニングを進めた。

4. 研究成果

(1) 悪性胸膜中皮腫に対する治療標的候補の機能解析に関しては、標的分子と共作用するキナーゼとフォスファターゼの同定に成功し、これらの分子群による相互制御機構の解明を行った。その結果、標的タンパク質は eIF2 α の責任キナーゼと結合しその機能を抑制する機構が明らかとなった。標的分子の発現抑制により eIF2 α 責任キナーゼの活性が亢進し、それによる細胞増殖抑制効果が得られる機構を見出すと共に、その効果は、eIF2 α 責任フォスファターゼの機能抑制により増強する事を明らかとした。これらの制御機構の詳細に関する知見を得る事が出来た事により、本研究課題の成果は悪性胸膜中皮腫に対する新たな分子標的治療の基盤構築に繋がるものと期待される。

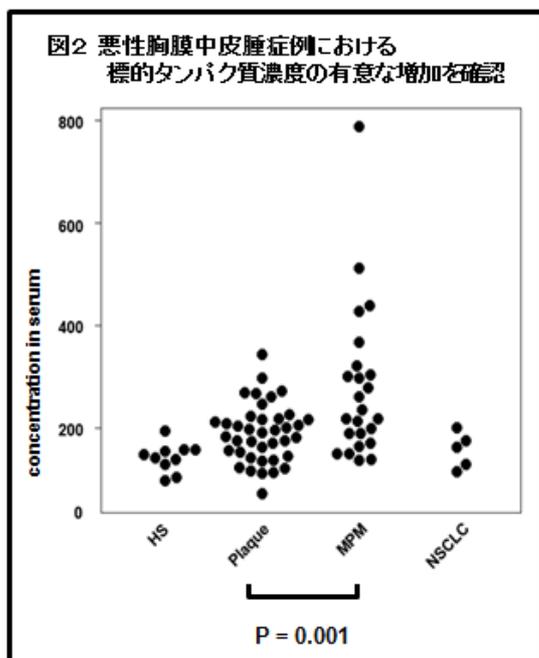
(2) 新たな胸膜悪性中皮腫分子診断法の開発を実現するために、実用化を念頭におい

た解析手順の簡略化を達成する新 ELISA システムの開発を進めた。抗体・試薬・試料調整濃度あるいは反応時間などの最適化を進め、悪性胸膜中皮腫と肺癌細胞株培養上清を用いた比較検討を進めた結果、中皮腫細胞株における標的タンパク質濃度の顕著な上昇が確認された。



この結果は、悪性胸膜中皮腫細胞からの標的タンパク質の分泌が、顕著に亢進している事に起因するものと考えられた。すなわち、悪性胸膜中皮腫症例においても、標的タンパク質の分泌亢進により、血液中濃度の上昇が認められる可能性が強く示唆された。そこで、開発・最適化された ELISA を用いて悪性胸膜中皮腫症例と健常対照者との間で、標的タンパク質の血液中濃度比較を進めた結果、感度・特異度がともに 90% を超える事が確認された。さらに、ROC curve を用いた検討によって、既存の悪性胸膜中皮腫診断マーカーである可溶性メソセテン関連ペプチドのそれを十分に上回る、AUC が 0.9 以上の診断精度が得られることを確認した。さらなる検討として、アスベスト曝露歴を有する非腫瘍性胸膜疾患症例を対照とした解析を行った結果、悪性胸膜中皮腫症例血液中において、標的タンパク質存在量の有意な増加を確認する事

が出来た。



以上の結果により、本研究課題で新規開発に成功した分子診断法の臨床的有用性が示唆された。

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 7 件)

Liu Z, Yanagisawa K, Griesing S, Iwai M, Kano K, Hotta N, Kajino T, Suzuki M, and Takahashi T. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. *Oncogene* 査読有、in press. doi: 10.1038/onc.2016.524.

Tai MC, Yanagisawa K, Nakatochi M, Hotta N, Hosono Y, Kawaguchi K, Naito M, Taniguchi H, Wakai K, Yokoi K, Takahashi T. Blood-borne miRNA profile-based diagnostic classifier for lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* 査読有、6: 31389, 2016. doi: 10.1038/srep31389.

Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. ROR1 sustains caveolae

and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat Commun.* 査読有、7:10060, 2016. doi:

10.1038/ncomms10060.

Ida L, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y, Suzuki M, Takahashi T.

Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1

lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase

1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 査読有、

107:155, 2016. doi: 10.1111/cas.12858.

Suzuki M, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai

MC, Yanagisawa K, Togawa N, Shiraishi T,

Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K,

Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y,

Igarashi Y, Inokuchi J, Iwaki S, Fujii S,

Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R,

Tamiya-Koizumi K, Murate T, Nakamura

M, Kyogashima M, Takahashi T. Targeting

ceramide synthase 6-dependent

metastasis-prone phenotype in lung cancer

cells. *J Clin Invest.* 査読有、126:254, 2016.

doi: 10.1172/JCI79775.

Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C,

Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe

Y, Yanagisawa K, Takahashi T.

miR-342-3p regulates MYC transcriptional

activity via direct repression of E2F1 in

human lung cancer. *Carcinogenesis.* 査読

有、36:1464, 2015. doi:

10.1093/carcin/bgv152.

Arima C, Kajino T, Tamada Y, Imoto S,

Shimada Y, Nakatochi M, Suzuki M,

Isomura H, Yatabe Y, Yamaguchi

T, Yanagisawa K, Miyano S, Takahashi T.

Lung adenocarcinoma subtypes definable

by lung development-related miRNA

expression profiles in association with
clinicopathologic features. Carcinogenesis.
査読有、35:2224, 2014. doi:
10.1093/carcin/bgu127.

〔学会発表〕(計 3 件)

Yanagisawa K. Proteomic Identification of
Malignant Pleural Mesothelioma Related
Molecules. 14th Human Proteome
Organization World Congress 2015 年 9 月
27-30 日 バンクーバー市 (カナダ)

Yanagisawa K., Kawahara T, Ozawa Y, Hotta
N, Nagino M and Takahashi T. Proteomic
analyses for biomarker discovery in human
pancreatic cancer. 13th HUPO World
Congress 2014 年 10 月 5-8 日 マドリッ
ド市 (スペイン).

Yanagisawa K., Kato S, Hotta N, Nakamura
S and Takahashi T. CKAP4 confers
resistance to amino acid insufficiency
through sequestration of GCN2 in
malignant pulmonary mesothelioma. 第 73
回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月
25-27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・
横浜市)

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 なし