

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430128

研究課題名(和文)臨床検体を用いた骨転移関連遺伝子・タンパク質の網羅的探索と臨床応用

研究課題名(英文)Global omics study for bone-metastatic tumors towards clinical application

研究代表者

近藤 格 (Kondo, Tadashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：30284061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨転移はすべての癌において発生し、多くの癌患者が治療に必要な骨転移を患っている。本研究では、転移性骨腫瘍において臨床応用可能な知見を得ることを目的として、臨床検体を用いた多層的オミクス解析を行った。原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織を対象とし、タンパク質とmiRNAの発現を網羅的に調べ、転移巣で発現亢進・減弱するタンパク質およびmiRNAを多数同定した。同定した分子の機能的意義をin vitroで確認し、さらに特異的阻害剤を用いた活性抑制実験を行った。また、転移性骨腫瘍で発現亢進するタンパク質が腫瘍細胞から放出されていることを特異抗体を用いた実験で見出した。

研究成果の概要(英文)：All malignancies can cause bone metastasis, and many cancer patients have bone metastasis. To obtain the molecular insights of bone metastasis and develop clinical applications, we performed multi-OMICS study. Using tumor tissues of primary and bone metastatic lesion, we compared the protein and miRNA expression in a global way. We identified differently expressed genes. The functional significances of identified genes were examined by in vitro gene silencing study, and confirmed that the specific inhibitors affected the growth of tumor cells, The protein with overexpressed level in bone metastasis was released from the tumor cells, and we measured it by specific antibody.

研究分野：希少がん研究

キーワード：転移性骨腫瘍 多層的オミクス解析

1. 研究開始当初の背景

骨への転移は肺癌、乳癌、前立腺癌、肝癌などすべての癌において発生し、本邦では新規に年間5~10万人の癌患者が治療に必要な骨転移を患っている。骨転移はほとんどの悪性腫瘍で発生し、骨転移による疼痛の緩和や病的骨折の治療を目的とした手術が年間1万件以上、行われている。①治療法の進歩による癌患者生存期間の延長、②高齢化による癌罹患率の上昇、③画像診断機器の発達、などにより今後ますます転移性骨腫瘍症例は増加すると考えられる。転移性骨腫瘍においては完治は望めない症例が多いと考えられるが、転移性骨腫瘍は疼痛や病的骨折を引き起こすことから、その治療は癌患者のADL (Activity of Daily Living) およびQOL (Quality of Life) 向上に重要である。

転移性骨腫瘍に対しては外科的手術が行われている。しかしながら、脊椎など解剖学的に手術切除が困難な部位に発生した骨転移に対しては疼痛緩和などの対処療法しか手段がない。手術非適応症例に対しては破骨細胞の増殖を押さえる治療薬(ゾメタ、ノバルティスファーマ)が使用されている。一方、骨転移した腫瘍細胞そのものに対して特異的な抗癌剤はなく、原発腫瘍への抗癌剤が使用されている。治療薬の開発に加え、診断法の開発も重要である。転移性骨腫瘍の症例の中には原発臓器が不明な原発不明癌が含まれており、転移性骨腫瘍症例の腫瘍組織を診断するためのバイオマーカーが求められている。さらに、転移性骨腫瘍においても早期診断は重要であり、早期に転移性骨腫瘍の治療を開始することでQOLを向上させることができる。

転移に関与する遺伝子を特定するために悪性腫瘍でマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析が行われてきたが、転移性骨腫瘍の網羅的発現解析は例外的であり未開拓の分野として残されている。特にプロテオーム解析では臨床検体を用いて転移性骨腫瘍が調べられた報告はほとんどない。研究代表者は国立がん研究センター研究所において転移性骨腫瘍の研究を行ってきた。本研究に関連しては、「臨床検体を用いた統合的オミクス解析による骨転移関連遺伝子の網羅的探索と臨床応用(基盤研究C、平成22年度~24年度)」において、新規の骨転移関連遺伝子の同定と機能解析を行った。具体的には、まず転移性骨腫瘍の臨床検体を収集した。そして、タンパク質については研究代表者が構築した大型蛍光二次元電気泳動法(Kondo et al, Nat Protocol 2007)の手法を用い、マイクロRNAについては市販のDNAマイクロアレイの実験系を用いて、転移性骨腫瘍に特徴的な分子を網羅的に探索した。そして、今までに骨転移との関連が知られていなかった分子を多数同定し、培養細胞を用いて細胞の増殖能や浸潤能へ与える効果を調べた。

研究代表者は、転移性骨腫瘍の研究に向けて、臨床医と研究者が密接に連携する研究体制を構築してきた。分担研究者(川井)は、国立がん研究センター中央病院で整形外科領域の悪性腫瘍を担当しており、骨腫瘍の治療については国内で指導的立場にある臨床医である(J Orthop Sci 2009)。本研究で見いだされる骨転移関連分子の情報を臨床病理情報と関連づけて解析し、臨床応用への可能性を臨床医としての経験を活かして検討してきた。転移性骨腫瘍の臨床検体を用いた研究は実施例が少なく、また本研究の最終目的が臨床応用であることから、熟練した臨床医が早期から研究に関わることはきわめて重要である。

2. 研究の目的

骨転移腫瘍の新しい治療法の開発につながる成果を得ることが、本研究の目的である。本研究においては、治療標的や診断に有用なバイオマーカー候補を同定するために、転移性骨腫瘍に特徴的な分子の異常を同定し、その機能的意義を検討し、当該分子に対する阻害剤の効果を調べる。

3. 研究の方法

【タンパク質解析】

蛍光二次元電気泳動法では、タンパク質を高感度の蛍光色素で標識し、大型の電気泳動装置を用いて等電点と分子量にしたがって分離した。分離されたタンパク質を含むアクリルアミドゲルをレーザースキャナーでスキャンし、サンプルごとに固有の画像データを得た。画像データ間の比較を行い、発現差のあるタンパク質を「タンパク質スポット」として蛍光シグナルで検出した。検出されたタンパク質スポットを全自動回収装置を用いて回収し、トリプシンでペプチド化し、質量分析装置(Finnigan LTQ Orbitrap mass spectrometer)で質量数を測定した。得られたデータを用いてデータベース検索を行い、該当するタンパク質を同定した。

PROTOMAPでは、タンパク質をSDS-PAGEで分子量にしたがって分離し、電気泳動後のゲルを手動で切り取って回収した。回収したゲルに含まれるタンパク質をペプチド化し、質量分析を用いた同定実験を行った。ゲルごとに独立したサンプルとして比較解析を行うことで、同一の遺伝子由来するタンパク質であっても分子量が異なるタンパク質を別の産物として区別して解析した。

発現差のあったタンパク質については、特異抗体を用いて発現差を確認した。培地中に放出されているタンパク質について、無血清培地で腫瘍細胞を培養し、培養上清を回収して遠心濃縮した。タンパク質をSDS-PAGEで分子量にしたがって分離し、分離されたタンパク質を電氣的に膜に転写した。転写されたタ

ンパク質に特異抗体を反応させ、形成される免疫複合体を化学発光によって検出した。

発現差のあったタンパク質について、該当する遺伝子に対応する siRNA およびコントロール siRNA を腫瘍細胞にトランスフェクションした (DharmaFECT)。抑制効果を調べるために、細胞の増殖 (MTT アッセイ、Cell Counting Kit-8)、浸潤能 (BD BioCoat™ Invasion Chamber)、および抗がん剤感受性 (メソトレキセート、シスプラチン、ドキソルビシン) を調べた。

発現差のあったタンパク質を恒常的に発現する腫瘍細胞を作製した。プラスミドベクターに当該遺伝子の cDNA を組み込み、トランスフェクションし、セレクションをかけて安定して当該タンパク質を高発現する細胞クローンを得た。

【miRNA 解析】

miRNA の発現は DNA マイクロアレイ (Agilent human miRNA Microarray V3) を用いて調べた。原発腫瘍組織と転移性骨腫瘍組織との間で発現差のある miRNA を同定した。

miRNA の発現検証を RT-PCR を用いて行った。

4. 研究成果

【タンパク質の発現検証】

臨床検体を用いたプロテオーム解析によって転移性骨腫瘍で高発現することがわかったタンパク質について、発現差が特に高く、原発腫瘍組織での発現が報告されているものに関して、その発現を特異抗体を用いて臨床検体で確認した。

当該タンパク質の発現を siRNA で抑制することで、細胞の増殖能、浸潤能が顕著に減少することがわかった。また、抗がん剤に対する感受性が亢進した。

腫瘍細胞内に発現するタンパク質であるが、培養腫瘍細胞の培地中に放出されていることを特異抗体を用いて見出した。当該タンパク質の転移性骨腫瘍の血清腫瘍マーカーとしての有用性を検証する目的で、検証実験のための臨床検体の収集を開始した。

【タンパク質の機能検証】

上記のタンパク質についてその機能的な役割を実験動物で調べた。In vitro の機能解析では、悪性形質 (増殖や浸潤) を亢進させることが確認できた。また、抗がん剤への耐性に寄与することもわかった。そこで、安定して発現する腫瘍細胞を作製した。安定して発現することを確認したが、実際に実験動物を使用する実験には至らなかった。

【治療標的としての有用性の検討】

当該タンパク質の機能を抑制する低分子化合物を用いて腫瘍細胞を処理したところ、増殖が抑制される傾向が認められた。しかしながら、顕著な抑制効果ではなく、増殖以外のたとえば浸潤や遊走などの因子を検討することが必要だと考えられた。

【miRNA の発現検証】

DNA マイクロアレイを用いて、原発腫瘍組織に比べて転移性骨腫瘍において高発現することがわかった miRNA について、その発現検証実験を定量的 RT-PCR を用いて行った。その結果、転移性骨腫瘍組織において著しく高発現していることが確認された。一方、正常骨での発現がきわめて高いことが定量的 RT-PCR で判明した。すなわち、転移性骨腫瘍に混入している骨組織にデータが大きく影響されていることがわかった。腫瘍組織の不均一性はサンプリングの段階からして避けがたく、計画していた miRNA の実験は中断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 30 件)

1. Pan X, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Current status of publicly available sarcoma cell lines for use in proteomic studies. *Expert Rev Proteomics*. 2016 Feb;13(2):227-40.
2. Ichikawa H, Yoshida A, Kanda T, Kosugi S, Ishikawa T, Hanyu T, Taguchi T, Sakumoto M, Katai H, Kawai A, Wakai T, Kondo T. Prognostic significance of promyelocytic leukemia expression in gastrointestinal stromal tumor; integrated proteomic and transcriptomic analysis. *Cancer Sci*. 2015 Jan;106(1):115-24.
3. Tajima T, Kito F, Ohta T, Shiozawa K, Kawai A, Kondo T. Interactome analysis reveals molecular mechanisms underlying the association between selenium binding protein 1 expression and the malignant features of tumor cells. *J Electrophoresis* 2015; 59:1, doi:10.2198/jelectroph.59.1
4. Kikuta K, Morioka H, Kawai A, Kondo T. Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1854(6):696-701.
5. Uemura N, Kondo T. Current advances in esophageal cancer proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1854(6):687-95.
6. Taoka M, Morofuji N, Yamauchi Y, Ojima H, Kubota D, Terukina G, Nobe Y, Nakayama H, Takahashi N, Kosuge T, Isobe T, Kondo T. Global PROTOMAP profiling to search for biomarkers of early-recurrent hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*. 2014 Nov 7;13(11):4847-58.

7. Hosoya N, Sakumoto M, Tomita Y, Kondo T. Approach to spot overlapping problem in 2D-PAGE revealed clinical and functional significance of RKIP and MnSOD in renal cell carcinoma. *EuPA Open Proteomics* 2014 4: 129-139.
8. Mukaiharu K, Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomic profile of epithelioid sarcoma. *J Proteomics Bioinform* 2014, 7:7 158-165.
9. Ito M, Hagiwara M, Mimae T, Inoue T, Kato T, Yoneshige A, Nakanishi J, Kondo T, Okada M, Ito A. α -Parvin, a pseudopodial constituent, promotes cell motility and is associated with lymph node metastasis of lobular breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Feb;144(1):59-69.
10. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells.* 2014 Apr;32(4):959-73.
11. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J Proteome Res.* 2014 May 2;13(5):2250-61.
12. Mimae T, Ito A, Hagiwara M, Nakanishi J, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. A novel approach to pseudopodia proteomics: excimer laser etching, two-dimensional difference gel electrophoresis, and confocal imaging. *Protoc exch.* 2014 Mar 4;2014. pii: 2014.007.
13. Kubota D, Yoshida A, Kikuta K, Saito T, Suehara Y, Gotoh M, Kawai A, Kondo T. Proteomic approach to gastrointestinal stromal tumor identified prognostic biomarkers. *J Proteomics Bioinform* 2014, 7:1 10-16.
14. Ichikawa H, Kanda T, Kosugi S, Kawachi Y, Wakai T, Kondo T. Proteomic and meta-transcriptomic study on lymph node metastasis in gastric cancer. *EuPA Open proteomics.* 2014;3:183-194.
15. Kondo T, Kawai A. A Proteomic approach for the development of sarcoma biomarkers. *EuPA Open Proteomics* 2014;4:121-8.
16. Uemura N, Kondo T. Current status of predictive biomarkers for neoadjuvant therapy in esophageal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014 Aug 15;5(3):322-34.
17. Kondo T. Inconvenient truth: cancer biomarker development by using proteomics. *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1844(5):861-5.
18. Kondo T. Casting doubt on the traditional approach of cancer biomarker discovery through proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2014 Feb;11(1):9-12.
19. Kondo T. Inconvenient truth: Cancer biomarker development by using proteomics. *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1844(5):861-865.
20. Kondo T. Casting doubt on the traditional approach of cancer biomarker discovery through proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2014;11(1):9-12.
21. Hosoya N, Sakumoto M, Nakamura Y, Narisawa T, Bilim V, Motoyama T, Tomita Y, Kondo T. Proteomics identified nuclear N-myc downstream-regulated gene 1 as a prognostic tissue biomarker candidate in renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug 30. pii: S1570-9639(13)00307-5.
22. Kubota D, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Okubo T, Saito T, Orita H, Sato K, Taguchi T, Yao T, Kaneko K, Katai H, Kawai A, Kondo T. Gene expression network analysis of ETV1 reveals KCTD10 as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor. *PLOS ONE.* 2013;8(8):e73896.
23. Kubota D, Mukaiharu K, Yoshida A, Tsuda H, Kawai A, Kondo T. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. *J Proteomics.* 2013 Aug 2;91C:393-404.
24. Ichikawa H, Kanda T, Kosugi S, Kawachi Y, Sasaki H, Wakai T, Kondo T. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal the role of a novel macrophage-capping protein in lymph node metastasis in gastric cancer. *J Proteome Res.* 2013 Aug 2;12(8):3780-91.
25. Yonemori H, Kubota D, Taniguchi H, Tsuda H, Fujita S, Murakami Y, Kondo T. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis with alkaline isoelectric point immobilized gel reveals proteomic intra-tumor heterogeneity in colorectal cancer. *EuPA Open Proteomics.* 2013; 1, 17-29

26. Arai K, Sakamoto R, Kubota D, Kondo T. Proteomic approach toward molecular backgrounds of drug resistance of osteosarcoma cells in spheroid culture system. *Proteomics*. 2013 Aug;13(15):2351-60.
27. Kubota D, Mukaiharu K, Yoshida A, Suehara Y, Saito T, Okubo T, Gotoh M, Orita H, Tsuda H, Kaneko K, Kawai A, Sato K, Yao T, Kondo T. The prognostic value of pftetin: a validation study in gastrointestinal stromal tumors using a commercially available antibody. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Jun;43(6):669-75.
28. Kimura K, Ojima H, Kubota D, Sakamoto M, Nakamura Y, Tomonaga T, Kosuge T, Kondo T. Proteomic identification of the macrophage-capping protein as a protein contributing to the malignant features of hepatocellular carcinoma. *J Proteomics*. 2013 Jan 14;78:362-73.
29. Huang C, Wang Y, Liu S, Ding G, Liu W, Zhou J, Kuang M, Ji Y, Kondo T, Fan J. Quantitative Proteomic Analysis Identified Paraoxonase 1 as a Novel Serum Biomarker for Microvascular Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res*. 2013; 12, 1838-46.
30. Haga A, Ogawara Y, Kubota D, Kitabayashi I, Murakami Y, Kondo T. Interactomic approach for evaluating nucleophosmin-binding proteins as biomarkers for Ewing's sarcoma. *Electrophoresis*. 2013 Jun;34(11):1670-8.
6. 近藤格、“Biomarker development for sarcoma toward personalized medicine”、2014年3月27-29日、14th Annual Meeting of Korean Human Proteome Organization 釜山、韓国
7. 近藤格、“プロテオーム解析によるがんバイオマーカー開発の常識を疑う”、2014年7月17-18日、日本プロテオーム学会2014年会、筑波
8. 近藤格、“Proteomic Approach for Cancer Biomarker Development toward Personalized Medicine”、2013年11月17-18日、12th Swedish Proteomics Society Symposium、ルンド、スウェーデン
9. 近藤格、“Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis for Tissue Biomarker Study”、2013年14-18日、10th Annual World Congress of Human Proteome Organization、横浜
10. 近藤格、“プロテオーム解析を用いた肉腫のバイオマーカー開発”、2013年9月27日、第26回京都がん研究会、京都
11. 近藤格、“個別化医療に向けたがんのプロテオーム解析”、2013年8月24日、第8回 Basic Urology Research Seminar、山形
12. 近藤格、“Translational Research for Sarcoma by Proteomics”、2013年10月3-5日、第72回日本癌学会学術総会、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤格 (KONDO Tadashi)

国立がん研究センター研究所

分野長

研究者番号：30284061

(2) 研究分担者

川井章 (KAWAI Akira)

国立がん研究センター中央病院

医長

研究者番号：90252965

[学会発表] (計12件)

1. 近藤格、“Cancer Proteomics in the Era of Personalized Medicine”、2015年9月28日-10月1日、14th Annual World Congress of Human Proteome Organization、モントリオール、カナダ
2. 近藤格、“Casting doubt on conventional approach to cancer biomarker development by proteomics”、2015年3月23-25日、Proteomic Forum 2015、ベルリン、ドイツ
3. 近藤格、“プロテオーム解析によるがん個別化医療のためのバイオマーカー開発”、2015年10月29-31日、第53回日本癌治療学会学術集会、京都
4. 近藤格、“プロテオーム解析によるがんのバイオマーカー開発”、2015年2月14-15日、第25回生物試料分析化学会年次学術集会、東京
5. 近藤格、“Biomarker development for sarcoma toward personalized medicine”、2014年10月9-11日、19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine、アテネ、ギリシャ