

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670626

研究課題名(和文) Kinomeを用いた肺癌転移能の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive kinome analysis of metastatic activity in lung cancer cells

研究代表者

伊達 洋至 (DATE, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60252962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：in vivo selectionで作成した細胞株を親株と高転移株との間で、転移に関連したマーカー発現の解析を行った。中でも、PC14とその高転移株の間では、高転移株でE-cadherinの減少とVimentin発現の亢進がみられ、腫瘍細胞転移能に関係するとされるEMT変化が起こっているものと考えられた。またその他の3細胞株(HARA細胞、Lewis細胞、H460)については、上記変化が見られなかった。Kinome解析は、特許技術により施行できなかった。

研究成果の概要(英文)：The molecular markers associated with tumor metastasis were compared between the parental lung cancer cell lines and the highly metastatic cells which were induced by in vivo selection methods. Highly metastatic cells originated from PC14 showed the loss of E-cadherin expression and the gain of Vimentin expression, showing its EMT phenotype. The other three cells did not show such phenomenon. The kinome analysis could not be performed due to its patent problem.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：Kinome 肺癌転移能

## 1. 研究開始当初の背景

癌は本邦での死亡率の第一位であり、その中でも肺癌は最多である。その一因として高率な遠隔転移が挙げられ、進行がん・治療後再発における転移病変の制御は肺がんの治療に最も重要であると考える。

今回我々は、Kinobeads、液体クロマトグラフィー/質量分析器 (LC/MS) を用いた kinase の網羅的解析を用いて、肺癌の転移関連 kinase の同定を計画している。これまで同様の研究として頭頸部癌細胞株における kinase の網羅的解析、およびそれを用いた研究 (Wu Z, et al. *Mol Cell Proteomics*. 2011) が共同研究者の Stephan Feller 研究室で行われている。この研究では、頭頸部癌細胞株 34 株において Kinobeads により kinase のみを抽出した後、LC/MS を用いて kinase を抽出・解析している。最終的に EphA2 受容体発現が癌細胞の増殖を抑制していることを確認し、癌治療ターゲットとなりうることを発見した。

癌細胞には少なからず heterogeneous な性質があり、転移にはこのうちある特徴を持つ成分 (side population) が関与しているとされている。今回、我々が行う研究は、肺がん細胞株を親株として、これを in vivo selection technique を用いて樹立した高転移性細胞株を用いる研究を予定としている。これらの細胞株に発現する kinome の差異を前述の Kinobeads、LC/MS を用いて抽出、解析することにより、転移に関連する kinase の同定を試みる。さらに同定した kinase に対して、in vitro、in vivo で介入を行うことで転移能メカニズムのさらなる解析、臨床・創薬への応用が可能と考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト genome 解析が成し遂げられ、癌治療においても、genome 情報に基づいた創薬

はめまぐるしいものがある。しかし、genome 異常が必ずしも、mRNA、タンパク質の異常に結びつかないことも多く、近年はより高感度、高特異度であるタンパク質の情報に基づいた研究が報告されている。今回、我々は癌細胞に発現しているタンパク質のうち、kinase (kinome) に注目した。癌細胞とその転移細胞における kinase を網羅的解析し、転移に関連する kinase を同定することにより、新たな転移関連シグナルの発見および速やかな臨床応用を目指すことを目的とし、創薬を視野に入れた研究を行った。

## 3. 研究の方法

まず In vivo selection による転移細胞株の樹立を行った。肺癌細胞株数種類をマウスに移植し、発生した転移細胞を繰り返し、マウスに移植、転移させ、最終的に高転移能を有する細胞株として樹立した。次に、転移に関連する kinome による網羅的解析を施行し、親株と転移細胞株において、kinome の差異を解析する予定であった。しかし、特許の関係で Kinobeads の利用が能わず、やむを得ず、個々の転移関連分子発現の比較を行った。

## 4. 研究成果

in vivo selection で作成した細胞株を親株と高転移株の間で、転移に関連したマーカー発現の解析を行った。中でも、PC14 とその高転移株の間では、高転移株で E-cadherin の減少と Vimentin 発現の亢進がみられた、腫瘍細胞の転移能に関係するとされる EMT 変化が起こっているものと考えられた。またその他の 3 細胞株 (HARA 細胞、Lewis 細胞株、H460) については、上記の変化を起こしていないことを示した。高転移株の作成に成功し、それぞれ親株との比較を行って、個々の浸潤転移関連分子発現の比較は可能であった。しかし、本研

究の主要な解析方法である kinase 特異的な沈降実験用ビーズの購入が特許のため行えず、同解析の施行が困難であった。したがって別の形での網羅的解析が必要である。EMT 変化が転移を起こす一つのメカニズムであることが示唆されたため、EMT を抑制することで、転移が抑制されるかどうか E-cadherin の repressor である Snail/Slug, Twist などの knockdown を行い、解析を検討する。また網羅的解析に関しては、phospho-tyrosine 特異的抗体を用いた phosphoproteome へと方針を変更し、解析を行う必要ができた。

#### 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 15 件)

- 1) Fujimoto M, Sumiyoshi S, Yoshizawa A, Sonobe M, Kobayashi M, Moriyoshi K, Kido A, Tanaka C, Koyanagi I, Date H, Haga H. SALL4 immunohistochemistry in non-small-cell lung carcinomas. *Histopathology*. 2014;64:309-11. doi:10.1111/his.12241.
- 2) Sakamoto J, Sonobe M, Kobayashi M, Ishikawa M, Kikuchi R, Nakajima D, Yamada T, Nakayama E, Takahashi T, Sato T, Chen F, Bando T, Date H. Prognostic factors for patients in postoperative brain metastases from surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014;19:50-6. doi:10.1007/s10147-012-0503-8.
- 3) Hamaji M, Omasa M, Chen F, Yamada T, Sato M, Menju T, Sato T, Aoyama A, Sonobe M, Bando T, Date H. Survival and treatments in patients with incompletely resected thymoma *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* December 9, 2013, doi: 10.1177/0218492313516116.
- 4) Sonobe M, Okubo K, Teramukai S, Yanagihara K, Sato M, Sato T, Chen F, Sato K, Fujinaga T, Shoji T, Omasa M, Sakai H, Miyahara R, Bando T, Date H. Phase II study of adjuvant vinorelbine and cisplatin in Japanese patients with completely resected stage II and III non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;74:1199-206.
- 5) Sumiyoshi S, Yoshizawa A, Sonobe M, Kobayashi M, Sato M, Fujimoto M, Tsuruyama T, Date H, Haga H. Non-terminal respiratory unit type lung adenocarcinoma has three distinct subtypes and is associated with poor prognosis. *Lung Cancer*. March 2014; dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.03.013.
- 6) Ikeda M, Bando T, Yamada T, Sato M, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, Date H. Clinical application of ET-Kyoto solution for lung transplantation. *Surg Today*. 2014 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24845738
- 7) Sato M, Aoyama A, Yamada T, Menju T, Chen F, Sato T, Sonobe M, Omasa M, Date H. Thoracoscopic wedge lung resection using virtual-assisted lung mapping. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2014 Jun 12. pii: 0218492314539332. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24928645.
- 8) Matsuoka T, Sonobe M, Date H. Intraoperative fine-needle aspiration biopsy (FNA) for lung cancer: diagnostic value and risk of pleural dissemination. *Surg Today*. 2014 Sep 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25223625.
- 9) Ishikawa M, Sonobe M, Imamura N, Sowa T, Shikuma K, Date H. Expression of the GLI family genes is associated with tumor progression in advanced lung adenocarcinoma. *World J Surg Oncol*. 2014.Aug8;12:253. doi:10.1186/1477-7819-12-253. PubMed PMID: 25103784.
- 10) Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Uehara T, Fujimoto M, Tsuruyama T, Date H, Haga H. HER2 status in lung adenocarcinoma: A comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations. *Lung Cancer*. 2014 Sep;85(3):373-8. doi:10.1016/j.lungcan.2014.06.007. Epub 2014 Jul 7. PubMed PMID: 25047676.
- 11) Matsuo Y, Chen F, Hamaji M, Kawaguchi A, Ueki N, Nagata Y, Sonobe M, Morita S, Date H, Hiraoka M. Comparison of long-term survival outcomes between stereotactic body radiotherapy and sublobar resection for stage I non-small-cell lung cancer in patients at high risk for lobectomy: A propensity score matching analysis. *Eur J Cancer*. 2014 Nov;50(17):2932-8. doi: 10.1016/j.ejca.2014.09.006. Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25281527.
- 12) Sato M, Yamada T, Menju T, Aoyama A, Sato T, Chen F, Sonobe M, Omasa M, Date H. Virtual-assisted lung mapping: outcome of 100 consecutive cases in a single institute. *Eur J Cardiothorac Surg*.

- 2014 Dec 24. pii: ezu490. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25539649
- 13) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 $\alpha$ . Nat Commun. 2015 Jan 23;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. PubMed PMID: 25615526.
- 14) Kitamura J, Uemura M, Kurozumi M, Sonobe M, Manabe T, Hiai H, Date H, Kinoshita K. Chronic Lung Injury by Constitutive Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase Leads to Focal Mucous Cell Metaplasia and Cancer. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0117986. doi: 10.1371/journal.pone.0117986. eCollection 2015. PubMed PMID: 25659078.
- 15) Hamaji M, Chen F, Matsuo Y, Kawaguchi A, Morita S, Ueki N, Sonobe M, Nagata Y, Hiraoka M, Date H. Video-Assisted Thoracoscopic Lobectomy Versus Stereotactic Radiotherapy for Stage I Lung Cancer. Ann Thorac Surg. 2015 Feb 5. pii: S0003-4975(14)02123-7. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.11.009. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25661580.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Hiroshi Date 21<sup>st</sup> European Conference on General Thoracic Surgery ( May 26-29, 2013, Birmingham, England ) 5<sup>th</sup> collaborative symposium on general thoracic surgery: Lung cancer - oligometastatic.
- 2) Hiroshi Date. 15th World Conference on Lung Cancer (October 27-30, 2013, Sydney, Australia) Tuesday's highlights of the day – surgery and staging.
- 3) Hiroshi Date. 94th Annual Meeting of American Association for Thoracic Surgery (April 26-30, Toronto) Long-term results after surgical treatment for 1,763 lung cancer patients with interstitial lung diseases – should it be done? Hiroshi

Date, Toshihiko Sato, Satoshi Teramukai, Atsushi Watanabe, Kazuma Kishi, Masahito Ebina, Yukihiro Sugiyama, Haruhiko Kondo, The Japanese Association for Chest Surgery.

4) Hiroshi Date. 25th Annual Congress of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons in Aisa (November 12-15, 2015, Cebu, Philippines) Thoracic surgery symposium  
Surgical treatment for T4 lung cancer. Hiroshi Date

5) Hiroshi Date. EACTS Academy  
The surgical treatment of lung failure (2015.11.16-18, Windsor UK)  
Live lung reconsidered

〔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  
<http://www.thoracic-kyoto-u.gr.jp>  
6 . 研究組織  
(1) 研究代表者  
(1) 研究代表者  
伊達 洋至 (DATE Hiroshi)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号： 60252962

(2)研究分担者

毛受 曉史(MENJYU Toshi)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 30527081

(3)連携研究者