

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670638

研究課題名(和文) 標的タンパク発現プロファイルに基づく新規膠芽腫分類の試み

研究課題名(英文) Molecular subclassification of glioblastoma based on the absolute quantitative proteomics

研究代表者

中田 光俊 (NAKADA, MITSUTOSHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20334774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質の絶対定量値を取得できる独自のプロテオミクス技術を用いた新規の膠芽腫サブタイプ分類の樹立を試みた。相互排他的な発現パターンを示すEGFR, ERBB2, PDGFRに着目し、初発膠芽腫をEGFR群25例、PDGFR群11例、ERBB2群7例に分類した。PFS中央値はそれぞれ8.3, 12.8, 37ヶ月で、OS中央値はそれぞれ16.1, 17.9, 25.7ヶ月であり、ERBB2群でPFS, OSが延長する傾向があった。以上の結果から、絶対定量プロテオミクスによるチロシンキナーゼの絶対発現量に基づいた膠芽腫のサブタイプ分類が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to attempt to classify GBM subtypes based on the molecular profile determined by absolute quantitative proteomics and to investigate its clinical significance. GBMs in our study harbored mutually exclusive dominant expression of three RTKs; EGFR, PDGFR and ERBB2. Therefore, we propose a subclassification of GBM with respect to the dominant expression of these proteins; EGFR (n=25), PDGFR (n=11) and ERBB2 (n=7). PFS and OS tended to be longer in ERBB2 group in comparison with EGFR and PDGFR group. Molecular subclassification of GBM based on the absolute quantitative proteomics reflects the clinical behavior and might have clinical significance.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：膠芽腫 プロテオミクス チロシンキナーゼ 分類

1. 研究開始当初の背景

人類最悪性の腫瘍である膠芽腫の克服は医学上の重要課題である。膠芽腫の診断はこれまでの H&E 染色による形態診断から遺伝子発現に基づく分子診断に移行しつつある。米国でのがんゲノムアトラスプロジェクト The Cancer Genome Atlas (TCGA)により DNA マイクロアレイや DNA チップによる膠芽腫の網羅的遺伝子解析が行われ、膠芽腫は遺伝子発現パターンにより proneural, neural, classical, mesenchymal の4つのサブタイプに分類されることが報告された。これ以降、脳腫瘍研究領域では本サブタイプ分類に基づいた膠芽腫研究が盛んになっている。膠芽腫の悪性形質に関わる分子は多岐にわたっており、中でも、細胞膜に存在する膜型のチロシンキナーゼ (TK) 分子群は膠芽腫の悪性化に大きく寄与していることが認知されている。

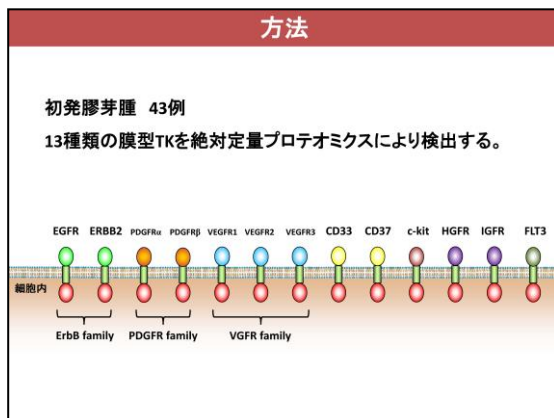
2. 研究の目的

本研究の目的は「治療に直結する標的タンパク分子の発現プロファイリングに基づいた膠芽腫分類は膠芽腫の臨床において有益である。」との仮説に基づき、申請者がこれまで遂行してきた絶対定量プロテオミクスによる膠芽腫組織のタンパク発現解析を土台として、膠芽腫における定量的標的タンパクプロファイルから、日常の臨床に有益な新規膠芽腫分類を提唱することにある。

3. 研究の方法

下記の手順で研究を進めた。

- (1) 初発膠芽腫 43 例の摘出検体から細胞膜画分を調製する。
- (2) 液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた絶対定量プロテオミクスにより、各症例における 13 種類の膜型チロシンキナーゼ (EGFR, ERBB2, PDGFR $\alpha$ ,  $\beta$ , VEGFR1, 2, 3, CD33, CD37, c-kit, HGFR, IGFR, FLT3) について絶対発現量プロファイルを得る。



- (3) TK のタンパク発現パターンからサブタイプ分類を考案する

- (4) 提唱する新規分類と年齢、性別、KPS などの症例背景、放射線化学療法の有効性、画像所見、病理所見、無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) を含めた詳細な臨床因子、さらに MGMT promoter メチル化の有無、1p19q 欠失の有無、IDH1 遺伝子変異の有無といった腫瘍生物学的な因子との関連を統計学的に解析する。

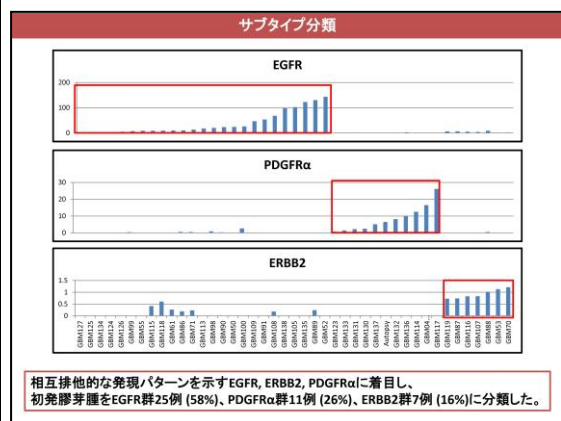
4. 研究成果

得られた結果は、下記の6項目に要約される。いずれもこれまでに得られことのない膠芽腫のタンパク発現の新規知見である。

- (1) 13 種類の TK のうち EGFR, ERBB2, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , VEGFR1, CD33, CD37, c-kit が検出感度以上の発現量を示し定量可能であった。

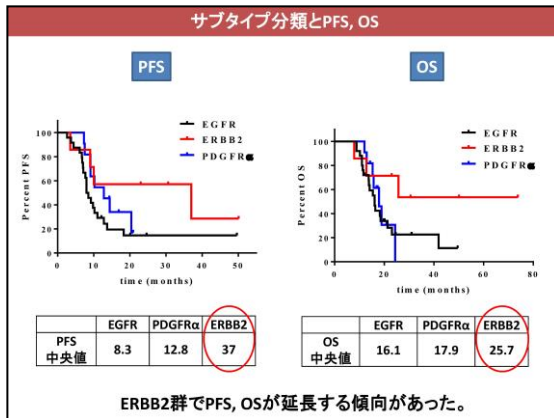


- (2) TK のタンパク発現量に顕著な個人差があり EGFR, ERBB2, PDGFR $\alpha$  が主要な TK であった。
- (3) EGFR, ERBB2, PDGFR $\alpha$  は相互排他的な発現パターンを示した

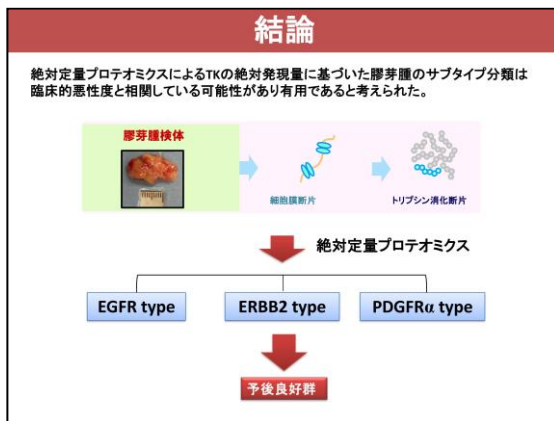


- (4) 初発膠芽腫を EGFR 群 25 例、PDGFR $\alpha$  群 11 例、ERBB2 群 7 例に分類した。
- (5) それぞれの群の特徴は年齢 (平均: 66.0, 62.8, 58.4 歳)、性別 (男/女: 16/9, 8/3, 5/2)、術前 KPS (中央値: 75, 70, 90)、摘出率 (平均%: 91.9, 77.7, 92.0)、IDH1 (wild/mutant: 21/4, 9/2, 7/0)、MGMT promoter (メチル化型/非メチル化型: 12/13, 6/5, 3/4) であった。

- (6) PFS 中央値はそれぞれ 8.3, 12.8, 37 ヶ月で、OS 中央値はそれぞれ 16.1, 17.9, 25.7 ヶ月であり、ERBB2 群で PFS, OS が延長する傾向があった。



以上の結果から、絶対定量プロテオミクスによる TK の絶対発現量に基づいた膠芽腫のサブタイプ分類は可能であり臨床的悪性度と相関しており有用であると考えられた。



今後は本新規分類の妥当性の検証を進めるとともに、最適な分子標的薬を患者個別に提案するための治療指標分類に発展させたい。

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 3 件)

- Kim SH, Ezhilarasan R, Chhipa R, Ladner K, Phillips E, Sparks A, Taylor D, Furuta T, Sabit H, Kurozumi K, Kuroiwa T, Akio A, Gallego-Perez1 D, Sulman EP, Cheng S, Lee J, Nakada M, Guttridge D, DasGupta B, Goidts V, Bhat KP, Walker J, Nakano I. Serine/Threonine kinase MLK4 determines Mesenchymal Identity in Glioma Stem Cells in an NFκB-dependent manner *Cancer Cell* 29: 201-213, 2016 2016 Feb 8;29(2):201-13. doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.005. 査読有
- Tanaka S, Nakada M, Yamada D, Nakano I,

Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, Hirao A. Strong therapeutic potential of γ-secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. *J Neurooncol* 121: 239-250, 2015 doi: 10.1007/s11060-014-1630-z. 査読有

- Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoo KI, Hamada JI, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway. *Mol Cancer Ther* 14: 564-574, 2015 doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0479. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 中田光俊, 宮内英輔, 立川正憲, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 大槻純男, 寺崎哲也. 最先端プロテオミクス SWATH 法による膠芽腫バイオマーカーの探索. 第 16 回日本分子脳神経外科学会, 平成 27 年 8 月 28 日-29 日, アクトシティ浜松 コンgressセンター (浜松)
- Nakada M, Miyauchi E, Tachikawa M, Furuta T, Sabit H, Ohtsuki S, Terasaki T. Biomarkers of glioblastoma identified by quantitative proteomics with SWATH mass spectrometry. The 21st International Conference on Brain Tumor Research & Therapy, April 10-13, 2016, Bankoku Shinryokan (Okinawa, Japan)
- 中田光俊, 田中慎吾, 小淵航, 大槻純男, 古田拓也, 宮下勝吉, 寺崎哲也, 林裕. 絶対定量プロテオミクスによる新規膠芽腫サブタイプ分類の臨床的有用性の検討. 第 15 回日本分子脳神経外科学会, 平成 26 年 9 月 25 日-26 日, 大手門パルズ (山形)
- Nakada M, Obuchi W, Ohtsuki S, Tanaka S, Furuta T, Kitabayashi T, Sabit H, Terasaki T, Hayashi Y. Molecular subclassification of glioblastoma based on the absolute quantitative proteomics. Society for Neuro-Oncology 19th Annual Meeting 2014, November 13-16, 2014, Loews Miami Beach Hotel (Miami, Florida, USA)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学医薬保健研究域医学系脳・脊髄機能

制御学ホームページ

<http://neurosurgery.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中田 光俊 (NAKADA MITSUTOSHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：20334774

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

寺崎 哲也 (TERASAKI TETSUYA)

東北大学・薬学部・教授

研究者番号：60155463