

23-B-27 難治がんの高浸潤能・高転移能獲得に寄与する
主要な分子機構の解明とそれを標的とする革新的治療戦略の構築

独立行政法人国立がん研究センター研究所 難治がん研究分野 ユニット長 江成 政人

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

膵がんは難治性の高いがんであり、膵がんに対する治療法の開発が国内外で進められているが、良好な治療法はほとんどないのが現状である。本研究では、難治性の高い膵がんにおいて、高頻度に変異失活しているがん抑制因子 p53 に関わる制御経路を網羅的に解析し、その分子機構を解明すると共に、その経路と他の発がん過程に重要と考えられる経路とのクロストークを網羅的に解析することによって、革新的治療標的を同定することを目的として、研究を推進している。具体的には、様々ながん進展に関わる経路が発見されているが、その中でも、膵がんの予後不良な難治がんにおいて p53 経路が不活化している場合が多く、その経路の分子機構の詳細かつ重点的な解析によって、新たな治療標的分子が同定できると考えられる。本研究では、膵がんにおける p53 経路に関わる酵素分子群や細胞膜蛋白質群を探索し、膵がんにおいて、細胞増殖、浸潤、転移や治療感受性に関与している分子群の同定し、新たな治療標的分子の特定を目指す。

研究経費

19,200 千円

研究班の組織

江成 政人	国立がん研究センター研究所 難治がん研究分野ユニット長	研究の総括・実施
筆宝 義隆	国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野ユニット長	膵臓幹細胞からの in vitro 発がん実験
尾野 雅哉	国立がん研究センター研究所 創薬臨床研究分野ユニット長	2D I C A L によるプロテオミクスデータ解析
温川 恭至	国立がん研究センター研究所 ウイルス発がん研究分野研究員	Notch 経路の解析
小菅 智男	国立がん研究センター中央病院 副院長、肝胆膵腫瘍科長	膵がんの臨床情報の解析
近藤 俊輔	国立がん研究センター中央病院 肝胆膵腫瘍科 医員	膵がん患者における臨床的意義の検証

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標) :

膵がんの多くで変異失活している p53 経路に焦点を絞り、p53 経路と他の発がん過程に重要と考えられる経路とのクロストークを免疫沈降法等の生化学的手法やプロテオミクス等を用いて網羅的に解析することによって、浸潤、転移や治療抵抗性獲得等のメカニズムの理解及び克服することを目的とする。そして、細胞増殖、浸潤、転移や治療抵抗性等に関連した新たな治療標的分子群の同定を到達目標とする。

第1年次

(到達目標)

- 1 p53 経路及び Notch 経路を解析する目的で、野生型 p53 及び脳腫瘍及び膵がん等で最も高頻度で見られる変異型 p53 を発現するプラスミド、そして Notch を発現するプラスミドを各々構築し、p53 あるいは Notch に結合する分子を 2D-ICAL 法を用いて解析する。2D-ICAL 法を用いたプロテオミクス解析には、尾野 (研究分担者) が担当する。また、Notch 経路の解析には、温川 (研究分担者) が担当する。その一方で、In vitro 幹細胞評価系の構築及びその条件検討に着手する (筆宝が担当)。また、免疫沈降法等の生化学的手法を用いて解析するための脳腫瘍及び膵がん由来細胞株の選定・収集を行う。
- 2 ATM 経路を解析する目的で、まず、精製した組換え ATM 蛋白質を細胞より大量に調製する。そして、私達が開発した ATM 基質の同定法を用いて、その基質を網羅的に探索する。
- 3 脳腫瘍及び膵がん患者からの正常組織及びがん組織を使用するために、倫理申請書類 (観察研究計画) 等の作成を行う。脳腫瘍及び膵がん患者からの正常組織及びがん組織の収集及び情報に関しては、小菅及び近藤 (研究分担者) が担当する。

(年次評価時点の実績要点)

- 1 野生型 p53 及び変異型 p53 を発現するプラスミドを構築し、p53 に結合する分子を 2D-ICAL 法を用いて解析した。2D-ICAL 法を用いたプロテオミクス解析には、尾野 (研究分担者) が担当し、変異型 p53 に結合する多数の分子群を同定した。その一方で、In vitro 幹細胞評価系の構築するための条件を調べ、p53 や PTEN 等のがん抑制遺伝子を発現抑制させてもがん化できないことがわかった (筆宝が担当)。現在、p53 や PTEN 等の発現抑制と KRAS 等のがん遺伝子発現との組み合わせで、更なる条件検討を行っている。また、免疫沈降法等の生化学的手法を用いて解析するための脳腫瘍及び膵がん由来細胞株の選定・収集を行った。
- 2 ATM 経路を解析する目的で、まず、精製した組換え ATM 蛋白質を細胞より大量に調製した。そして、私達が開発した ATM 基質の同定法を用いて、その基質を網羅的に探索したところ、多数のバンドが確認された。
- 3 脳腫瘍及び膵がん患者からの正常組織及びがん組織を使用するために、倫理申請書類 (観察研究計画) を作成し、倫理審査中である。

研究成果と考察

第1年次評価時点

p53 経路に関与する分子群の網羅的解析 :

脳腫瘍及び膵がんで見られる p53 変異上位 10 個のうち、脳腫瘍では 6 つの p53 変異体、膵がんでは 5 つの p53 変異体を選出して、p53 欠損細胞へ遺伝子導入し、それら変異体に結合する分子の探索を行った。銀染色法を用いて p53 変異体を含む溶出液中の蛋白質を解析した結果、幾つかの共通するバンドが検出された。この溶出液を濃縮し、2D-ICAL 法を用いて解析したところ、シャペロン系の酵素群、メチル化酵素群、miRNA プロセッシング酵素群や Hippo 経路のリン酸化酵素等多くの分子が変異型 p53 に結合することを発見した。このことは、変異型 p53 が様々な機能を変質させ、がんの生存に適した環境を構築していることが示唆された。

ATM 経路に関与する分子群の網羅的解析 :

精製した野生型 ATM、キナーゼ欠損型 ATM 及び ATP アナログ感受性 ATM を大量に調製し、銀染色法及びウエスタン

ブロット法で ATM 蛋白質を確認した。ATM 欠損細胞由来の細胞抽出液と上記精製した ATM とを ATP あるいは ATP アナログである N6-1-methylbutyl-ATP 存在下反応させ、抗リン酸化 Ser/Thr-Glu 抗体でウエスタンブロットしたところ、ATP アナログと ATP アナログ感受性 ATM を反応させた場合のみ検出されるバンドが多数得られた。

In vitro 幹細胞評価系の構築及びその条件検討：

マウスの臍臓を摘出、ミンチした後、様々な条件で幹細胞様の細胞塊が出現するか調べたところ、ある種の増殖因子の添加によって、マトリゲル中で細胞塊が著明に観察された。

また、脳腫瘍及び膵がん患者からの正常組織及びがん組織を使用するための準備として、倫理申請書類（観察研究計画）を作成した。

倫理面への配慮

当該研究を遂行するために、組換え DNA 実験、動物実験に対する審査を必要とするが、既に遺伝子組換え実験安全委員会、実験動物安全管理委員会の承認をそれぞれ得ている。しかしながら、実験に際しては、法律および「国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全管理規程」、「国立がん研究センター実験動物安全管理規程」および「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、細心の注意を払いながら組換え DNA 実験、動物実験を遂行する。特に、動物実験においては、動物愛護を配慮し、実験動物を最小限に留め、出来る限り苦痛が軽減されるよう十分に配慮する。また、臨床検体組織や手術標本を用いた解析を行う際には「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

(第1年次)

1. Yuudai Kondo, Kentaro Nagai, Shingo Nakahata, Yusuke Saito, Tomonaga Ichikawa, Akira Suekane, Tomohiko Taki, Reika Iwakawa, Masato Enari, Masafumi Taniwaki, Jun Yokota, Sumio Sakoda and Kazuhiro Morishita: Overexpression of DNA sensor proteins, AIM2 and IFI16, contributes to tumorigenesis of OSCC with p53 inactivation. *Cancer Sci*, 103: 782-790, 2012
2. Takashi Kohno, Hitoshi Ichikawa, Yasushi Totoki, Kazuki Yasuda, Masaki Hiramoto, Takao Nanno, Hiromi Sakamoto, Koji Tsuta, Koh Furuta, Yoko Shimada, Reika Iwakawa, Hideaki Ogiwara, Takahiro Oike, Masato Enari, Aaron J. Schetter, Hirokazu Okayama, Aage Haugen, Vidar Skaug, Suenori Chiku, Itaru Yamanaka, Shun-ichi Watanabe, Ikuo Sekine, Seishi Ogawa, Curtis C. Harris, Hitoshi Tsuda, Teruhiko Yoshida, Jun Yokota and Tatsuhiro Shibata: KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*, 18: 375-377, 2012
3. Ito, H., Ono, M. et al.: Combined Functional Genome Survey of Therapeutic Targets for Clear Cell Carcinoma of the Kidney. *Jpn J Clin Oncol*, 41: 847, 2011
4. Matsubara, J., Ono, M. et al.: Identification of Adipophilin as a Potential Plasma Biomarker for Colorectal Cancer using Label-free Quantitative Mass Spectrometry and Protein Microarray. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20: 2195, 2011
5. Matsubara, J., Ono, M. et al.: Reduced Plasma Level of CXC Chemokine Ligand 7 in Patients with Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20: 160, 2011
6. Miyamoto, Y., Ono, M. et al.: Possible Existence of Lysosome-Like Organelle within Mitochondria and Its Role in Mitochondrial Quality Control. *PLoS ONE*, 6: e16054, 2011
7. Murakoshi, Y., Ono, M. et al.: Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci*, 102: 630, 2011

(学会発表)

1. 尾野雅哉: 2DICAL による定量プロテオミクス、日本プロテオーム学会 2011 年大会 日本ヒトプロテオーム機

構第9回大会、シンポジウム 口演、2011年7月、新潟

2. **尾野雅哉**: 2DICALを用いた疾患関連蛋白質の探索法と臨床研究への応用、第15回 薬物動態談話会セミナー、口演、2011年8月、大阪
3. **尾野雅哉**: プロテオームを活用した最先端がん研究、第2回バイオファイナンスギルドセミナー、口演、2011年9月、東京
4. **尾野雅哉**、他: 2DICALプロテオーム解析手法を用いた癌診断治療標的分子の開発、第70回日本癌学会学術総会、口演、2011年10月、名古屋
5. **尾野雅哉**: 2DICALによる新規がんマーカー探索、第11回バイオメディカル研究会、口演、2011年10月、大阪
6. **尾野雅哉**: プロテオーム解析技術「2DICAL」を基盤とした質量分析計による新しいがん診断・治療法の開発、メタボロミクス/プロテオミクスセミナー、口演、2011年11月、大阪、東京

(書籍)

1. 山田哲司, **尾野雅哉**, 他: がん(腫瘍)マーカー, 渋谷正史, 湯浅保仁 編: がん生物学イラストレイテッド. 東京, 羊土社, 2011, pp 318-324