

## 骨軟部腫瘍のバイオマーカー・分子標的開発を目的とした遺伝子・タンパク質発現解析

順天堂大学 医学部 整形外科

末原 義之

### 1. 研究の学術的背景

骨軟部腫瘍の腫瘍マーカーは遺伝子技術の進歩により組織型特異的融合遺伝子が発見され、病理組織分類の補助診断マーカーとして大きく臨床に貢献することとなった。また、現在の肉腫における発現解析研究の中心は、mRNAレベルでの網羅的発現解析が中心に研究されて一定の成果をあげている。しかしながら、mRNA の発現は必ずしもタンパク質発現に相関しないという報告も多く存在しており、タンパク質レベルにおける腫瘍マーカーの開発にはタンパク質レベルにおける網羅的解析が不可欠と考える。研究代表者を中心とした国立がんセンター整形外科プロテオミクスグループは、2004 年より世界に先駆けて、骨軟部腫瘍各種において、予後予測マーカーや組織特異的マーカーの開発を目的としたタンパク質発現解析を行い、現在までに成果をあげてきた。特に、消化管間質腫瘍(GIST)の予後予測マーカーである Pletin、滑膜肉腫の予後予測マーカーである SCRNI タンパク質の発見に成功している。本研究は骨軟部腫瘍の凍結検体を使用したプロテオーム解析を行うことで、(1)タンパク質発現の網羅的解析を行い、予後予測マーカーや組織特異的マーカーの開発を目的とし、(2) 各々の腫瘍にて同定された予後予測タンパク質に対しては、バイオマーカー(予後予測マーカー)としての可能性・有用性の検証を行う(特に、国内における多施設検証、及び Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC)を中心とした海外施設における大規模検証を軸とする。)

### 2. 研究目的及び必要性

本研究の研究目的は、各種骨軟部腫瘍の予後予測マーカーの開発と現在までの骨軟部腫瘍のプロテオーム解析で、予後予測マーカーとして同定された各々の予後予測タンパク質に対し、バイオマーカーとしての臨床応用の実現化に向けた国内外施設における大規模検証と機能解析を目的とする。特に対象とするタンパク質は、現在までに我々が独自の特異抗体作成に成功し、それぞれの特異抗体を用いたバイオマーカー(予後予測マーカー)の検証で、施設内において一定規模の検証を行い成功している「GIST 予後予測マーカーである Pletin」及び「滑膜肉腫の予後予測マーカーである SCRNI タンパク質」に対して計画している。

現時点における施設内での検証では、臨床応用可能なエビデンスレベルには到達しておらず、これらバイオマーカーの臨床応用のためには、国内外における大規模検証は必須と考える。国内における大規模検証は、現在、国立がんセンターを中心とした多施設共同研究をたちあげ多施設検証を進め一定の成果を得ている。海外における大規模検証は、共同研究施設である MSKCC, Dr. Ladanyi 研究室を中心とした施設において、臨床応用を目的とした大規模検証を予定した。

### 3. 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

本研究の特色・独創性は、実際の骨軟部腫瘍臨床検体を用いて、各々の腫瘍の予後因子・生物学的特徴を規定している遺伝子・タンパク質発現プロファイルを作成し、骨軟部腫瘍のオーダーメイド医療を目的とした新たなバイオマーカーの開発と網羅的・複合的にメカニズムを明らかにする点にある。特に、骨軟

部腫瘍の凍結臨床検体を使用したタンパク質発現解析は、現時点において世界でも我々のグループのみで進められている研究であり、これまでに複数の研究成果をあげている。そのタンパク質発現解析(プロファイリング)は、世界トップレベルの網羅性と再現性を有する精度の高いプロテオーム解析システムと質の高い臨床検体を用いていた解析であり、その結果は実際の臨床像をよく反映し、基礎研究のみならず臨床的にもきわめて価値の高いデータとなっている。現在までの研究成果として、我々が骨軟部腫瘍のタンパク質発現解析にて発見した予後予測タンパク質(GIST 予後予測マーカーである Pletin、及び滑膜肉腫の予後予測マーカーである SCRNI タンパク質)については、独自に特異抗体の作成に成功しており、その研究における advantage は非常に大きく、特異抗体を用いての大規模検証や機能解析は、現時点において我々グループのみで可能な独創的な研究である。また、その特異抗体を使用した検証は、既に施設内において一定規模の検証を行い成功しており、それらタンパク質のバイオマーカーとしての臨床応用の可能性は非常に高い。国内大規模検証については、既に多施設共同研究を立ち上げ、一定の成果を得ている。また、海外大規模検証の中心施設となる MSKCC には、信頼性の高い臨床情報を伴った GIST、滑膜肉腫のパラフィンブロック臨床検体が多数蓄積されていることを既に確認しており、それらを用いた大規模検証は臨床応用に向けた精度と信頼性の高い検証となる。

本研究は、タンパク質発現解析によって、骨軟部腫瘍の遠隔転移能・予後など、臨床的に重要な生物学的特徴を規定している因子を明らかにしようとする世界初の研究である。本研究の結果は、骨軟部腫瘍の生物学的特徴に関する理解を深めるとともに、個々の腫瘍の特徴に応じたオーダーメイド医療の展開、新たな治療法の開発にも繋がることを期待され、難治性の骨軟部腫瘍の治療成績向上に大きく貢献することが期待される。

#### 4. 研究結果

##### 研究計画・方法(概要)

本研究は特に GIST、滑膜肉腫の凍結検体を使用したプロテオーム解析を行い(1)各腫瘍予後予測マーカーの開発を目的とした大規模タンパク質発現解析による clinico-proteomic study、(2)バイオマーカー(予後予測マーカー)の国内・海外施設における免疫染色等を用いた大規模検証である。

<現在までの進行状況>

(1)予後予測マーカーの開発を目的とした大規模タンパク質発現解析による clinico-proteomic study(GIST、滑膜肉腫)

タンパク質解析可能な多数の検体が必要であるが、我々はこれまでの研究で国立がんセンター及び順天堂大学関連施設を中心とした大規模な凍結腫瘍バンク(骨軟部腫瘍>500 例)を確立しており、既に 300 例以上の検体よりのタンパク質抽出ならびに RNA、DNA 抽出を終えている。このうち原発 GIST 検体は約 40 検体、滑膜肉腫検体は約 30 検体確認されている。

- ① タンパク質を抽出された上記検体全例で臨床病理学データを確認すると共に、KIT-mutation の発現及び融合遺伝子(SYT-SSX1、-SSX2)の発現を確認している。
- ② 定量的なタンパク質発現プロファイルを作成するためにタンパク質は蛍光色素標識し、二次元電気泳動を行う。方法としては GE Healthcare 社の蛍光二次元電気泳動法 (2D-DIGE: fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis)を使用している。一枚 20 x 24cm のゲルサイズで約 2000 個のタンパク質スポットを観察している。
- ③ 蛍光二次元電気泳動で獲得したイメージは、DeCyder (GE Healthcare 社)の画像解析ソフトを使用し、各タンパク質スポットを発現量としてテキストファイルに変換する。そのデータを cDNA マイクロアレイのデータ解析と同様に、多変量解析、機械学習法の手法でデータマイニングを行う。

- ④ 検討項目ごとに重要と判断されたタンパク質スポットについては、質量分析計にて対応するタンパク質の同定を行う。
- ⑤ 同定されたタンパク質については特異抗体を使用し、Western-blotting 法、パラフィンブロックを使用した免疫染色にて発現を確認する。
- ⑥ 免疫染色にて発現差を確認できたタンパク質については、腫瘍マーカーとしての有効性を確認するために、解析に未使用の GIST、滑膜肉腫パラフィンブロックを新たに使用し、タンパク質発現を検証する。既に国立がんセンター中央病院病理部及び順天堂大学関連施設に原発 GIST・滑膜肉腫パラフィンブロックが各約 210 症例・50 症例存在を確認している。
- ⑦ 原発 GIST・滑膜肉腫パラフィンブロックが各約 210 症例・50 症例による Pftin・S-タンパク質免疫染色を行い、Pftin・S-タンパク質特異抗体免疫染色の判定により無病生存率・生存率に高い有意差を認め、腫瘍マーカーとしての有用性を証明している (GIST:  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ 、滑膜肉腫:  $p=0.0015$ ,  $p=0.0012$ )。

現在⑦の項目まで実験は終了しており、予後予測マーカーとなりうる「GIST 予後予測マーカーである Pftin」及び「滑膜肉腫の予後予測マーカーである S タンパク質」を同定した。

<本研究結果>

(2)バイオマーカー(予後予測マーカー)の国内・海外施設における免疫染色等を用いた大規模検証: GIST 予後予測マーカーである Pftin タンパク質、及び滑膜肉腫予後予測マーカーである SCRN1 タンパク質について特異抗体を用いた免疫染色による検証等を行った。

バイオマーカー(予後予測マーカー)の海外施設における大規模検証

海外大規模検証の中心施設であるMSKCCにて、本研究の解析対象であるGIST、滑膜肉腫について、解析可能検体はGIST・300例、滑膜肉腫・100例のパラフィンブロック臨床検体を用いて免疫染色大規模検証を行った。

<方法・結果>

- ①:使用する骨軟部腫瘍凍結臨床検体・パラフィンブロック臨床検体の臨床病理学データを確認すると共に、KIT や SYT-SSX の発現を確認した。
- ②:パイロットスタディーとしての免疫染色を行い、免疫染色の適切な染色条件を設定した(タイトレーション)。
- ③:そのタイトレーションの情報に基づき、パラフィンブロックを使用した免疫染色にて各 GIST、滑膜肉腫について大規模検証を行った。
- ④:各組織型に対して適切な染色に成功した。
- ⑤:その免疫染色発現結果を臨床情報と共に単変量・多変量解析を行い、バイオマーカー(予後予測マーカー)としての能力・有効性を検証した。

現在、染色結果と臨床情報を統計解析中である。

## 5. 総括

海外大規模検証の中心施設であるMSKCCにて、本研究の解析対象であるGIST・300例、滑膜肉腫・100例のパラフィンブロック臨床検体に対して、抗 Pftin 抗体(GIST)及び抗 SCRN1 タンパク質抗体(滑膜肉腫)を用いて免疫染色による検証を行った。良好な染色結果を得た。現在、染色結果と臨床情報を統計解析中である。