

ゲノム解析に基づいた統合的がん分子病態診断システムの開発研究

醍醐 弥太郎^{1),2),3)}

1) 滋賀医科大学医学部臨床腫瘍学講座、2) 滋賀医科大学医学部附属病院腫瘍内科

3) 滋賀医科大学医学部附属病院腫瘍センター

Development of Integrated Molecular Pathological Diagnostics based on Genomics Strategy

Yataro DAIGO^{1),2),3)}

1) Department of Medical Oncology, Shiga University of Medical Science

2,3) Medical Oncology and Cancer Center, Shiga University of Medical Science Hospital

Abstract

To identify the molecules applicable as novel tumor biomarkers, we performed gene expression profile analysis of various human cancers whose tumor cells were purified by laser microdissection. Through a subsequent systematic approach using tissue microarray, RNA interference, and high throughput enzyme-linked immunosorbent assay techniques as well as bioinformatics, we have identified a set of molecules that fall into the category of oncoantigens. These molecules are potentially promising candidates for the development of new diagnostic biomarkers. We introduce our sophisticated and integrated cancer genomics strategy for developing new cancer biomarkers.

Keyword Genomics, Molecular pathology, Biomarker, Personalized medicine

はじめに

がんの個別化医療を実現するには、患者の病態に基づいた予後、治療効果・副作用予測が可能な治療の選択指標の開発が必要となる。2005年3月に米国食品医薬品局（FDA）が新薬の開発と既承認薬におけるファーマコゲノミクス（薬の作用とゲノム情報を結びつけて特定の患者の治療効果、副作用に関連する要因を見だし各患者に最適の薬剤を使い分ける研究）のデータ提出を推奨するガイダンスを公表し、さらに2007年には新薬の臨床開発コストの削減の切り札として先端的な分子バイオマーカーの探索・開発・応用を提唱した Critical Path Opportunity プログラムを開始し、産学官が一体となったバイオマーカーコンソーシアムの設立を進めてきたことが示すとおり、がんの診断・治療に応用可能なバイオマーカーはがん克服に向けた最有力の基盤資源と認識されている。また、2011年7月

に FDA は、コンパニオン診断薬（治療標的分子の発現や遺伝子変異の有無、薬物代謝酵素の遺伝子多型などを調べ、薬剤の有効性や副作用を予測するために使われる診断方法であり薬剤とセットで使われる）の同時開発に関するドラフトガイドラインを策定しており、医薬品とそのコンパニオン診断薬を同時承認する事例が続いている。ゆえに、がんの個別化医療の開発には、治療薬の開発と同時に有用なバイオマーカーの探索を進めていく研究・開発戦略が求められている。

本稿では、我々が進めているゲノミクス解析に基づいた統合的ながんの分子病態診断法の開発研究の一端について概説する。

がんバイオマーカーの探索

我々はがんの発生と悪性化に深く関与し、がんバイオマーカーや分子標的治療薬の開発に有用な標的分子

を同定するために以下に示す探索戦略をとっている[1]。すなわち、(1) レーザーマイクロダイセクション法でがん細胞部分を選択的に採取したがん組織と正常 30 臓器のマイクロアレイ解析によるゲノムワイドの遺伝子発現情報、(2) 各種固形がんを同時に解析可能な組織マイクロアレイシステムによるタンパク質の発現情報、(3) 各がん種数百例のがん患者血清を備えた迅速血清 ELISA システムを用いて臨床病理学的情報と比較解析のなされたがん関連分子の発現情報を取得している。さらに、(4) siRNA や抗体によるがん細胞での機能阻害実験や正常細胞への遺伝子導入実験により、がん細胞の増殖・浸潤に関与すると考えられる遺伝子について、創薬スクリーニング系の構築を念頭にその主要分子経路の機能解析を進めている。(5) またマイクロアレイ情報と臨床情報をバイオインフォマティクス解析することで、抗がん剤感受性やリンパ節・遠隔臓器転移に関わる遺伝子群の同定を試みている。一方、(6) 質量分析計を用いてがん患者と健常者の血清タンパク質量やその糖鎖修飾レベルを比較解析して得られたプロテオーム・グライコーム情報をマイクロアレイデータと統合し、糖鎖修飾を標的とした血清バイオマーカーの開発を進めている。これらの段階を経て同定された候補標的分子の多くはがん細胞の増殖や悪性化に関わる oncoantigen であり、血清・組織を用いたがんの未病状態や早期がん検出、がんの悪性度や抗がん剤感受性などの分子病態診断に有用なバイオマーカーの開発と各種の創薬研究に応用可能である。

血清マーカー・予後予測マーカー

難治がんのひとつである肺がんについて、上述の手法で選定された oncoantigen を用いた早期がん診断法の開発を行っている。これまでに 7 種類の血清バイオマーカー (EBI3, Nectin-4, LY6K, DKK1, ADAM8, TGFA, AREG) を同定し、ELISA 法による肺がん診断や抗がん剤感受性予測における有用性を示している[2-4]。さらに、これらのマーカーの組み合わせによる高感度のがん検出法の開発を進めている。

また、新規バイオマーカーや治療標的分子の生物学的・臨床病理学的意義を検討するために組織マイクロアレイを用いて肺がん、食道がんにおけるタンパク質の発現・相関解析を進め、これまでに複数の免疫組織化学的予後予測マーカー (hDUS2, PKP3, ANLN, SEZ6L2, NMU, CDCA1, KNTC2, FGFR1OP, IMP-1, KIF4A, DKK1, CDCA8, AURKB, HJURP, hTERT, LY6K, DLX5, FOXM1, ECT2, Nectin-4, WDHD1, TBC1D7, CDCA5, CSTF2, EBI3, CHODL, TMEM209) を同定するとともに、これらのマーカーの組み合わせによる定量的な予後予測システムの開発を進めている[5-9]。

転移診断マーカー

がんの転移治療においては、診断時や病勢モニタリング時における転移の危険性の予知、転移の早期検出とその進展度の正確な把握、そして診断に基づいたすみやかな予防処置、加療が求められるが、現状では切除リンパ節の病理診断と各臓器の画像診断が唯一確立された転移検出法である。我々は非小細胞肺がんの原発巣の 40 個の遺伝子の発現プロファイルのスコア結果からリンパ節転移の有無を検出する診断システムを構築すると共に、非小細胞肺癌の脳転移、小細胞肺癌の遠隔臓器転移に関わる遺伝子群を複数同定している。

抗がん剤感受性診断マーカー

これまでに、7 種類の抗癌剤 (docetaxel, paclitaxel, irinotecan, cisplatin, gemcitabine, vinorelbine, gefitinib) に対する肺がんの感受性に関わる遺伝子群を同定している。また進行期非小細胞肺がんの遺伝子発現プロファイル解析を行い、gefitinib 感受性群と耐性群で発現レベルが異なる分子を抽出し、100%近い感度の gefitinib 感受性予測システムを構築した。さらにこれらの中で gefitinib 耐性群の肺がん組織で発現が増加する EGFR のリガンド TGFA (TGF-alpha) と AREG (amphiregulin) の血清高値が gefitinib の低奏効率と予後不良因子であることを明らかにしている[10]。

がんの発症から進行に至る経過を正確に把握する分子病態診断に基づき、あらゆる病期のがんに対応した治療法を選択することに加えて、分子マーカーで高い有効性があらかじめ予測でき副作用の少ない医薬品を開発することは、がんの個別化医療の主要基盤となる。我々は、遺伝子発現情報解析に加えて、質量分析、次世代シーケンシング技術等も用いて新規のがんバイオマーカーの探索を進めており、同定した各種バイオマーカーの特性 (早期がん検出、がんの病態診断: 予後、転移、抗がん剤感受性) を最大限に生かしたがん患者の生命予後の延長に寄与しうる統合的ながん病態診断システムの構築を進めている。

文献

- [1] Daigo Y, Nakamura Y. From cancer genomics to thoracic oncology: Discovery of new biomarkers and therapeutic targets for lung and esophageal carcinoma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 56:43-53, 2008
- [2] Sato N, Yamabuki T, Takano A, Koinuma J,

- Aragaki M, Masuda K, Ishikawa N, Kohno N, Ito H, Miyamoto M, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy. *Cancer Res* 70:5326-5336, 2010
- [3] Takano A, Ishikawa N, Nishino R, Masuda K, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 69:6694-6703, 2009
- [4] Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Cancer-Testis Antigen, LY6K is a Serologic and Prognostic Biomarker and a Therapeutic Target for Lung and Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* 67:11601-11611, 2007
- [5] Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, Nakamura Y. Critical Function for Nuclear Envelope Protein TMEM209 in Human Pulmonary Carcinogenesis. *Cancer Res* 72:4110-4118, 2012.
- [6] Nguyen MH, Koinuma J, Ueda K, Ito T, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 5 by mitogen-activated protein kinase play a crucial role in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 70:5337-5347, 2010
- [7] Kato T, Sato N, Hayama S, Yamabuki T, Ito T, Miyamoto M, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y. Activation of Holliday Junction-Recognizing Protein Involved in the Chromosomal Stability and Immortality of Cancer Cells. *Cancer Res* 67:8544-8553, 2007
- [8] Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, Hirata D, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y. Phosphorylation and activation of CDCA8 by AURKB plays a significant role in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 67:4113-4122, 2007
- [9] Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Suzuki C, Yasui W, Inai K, Sone S, Ito T, Nishimura H, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y. The neuromedin u-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 66:9408-9419, 2006
- [10] Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, Furukawa C, Tsunoda T, Yano S, Nakagawa K, Tsuruo T, Kohno N, Fukuoka M, Sone S, Nakamura Y. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib. *Hum Mol Genet* 13:3029-3043, 2004