

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：クリニカルプロテオミクス解析を基盤とする肺がんの分子病態の解明と革新的分子標的治療の開発
2. 研究開発代表者： 高橋隆 （国立大学法人名古屋大学）
3. 研究開発の成果

肺がんは代表的難治がんであり、本態解明と革新的な分子標的の探索・同定が希求されている。本研究開発においては、詳細な臨床情報が付帯する肺がん腫瘍組織を対象としたクリニカルプロテオミクス解析データを基盤としたリバーストランスクリプションを目指して、肺がん腫瘍組織の解析から得た網羅的な蛋白発現情報と臨床病態との関連性と、高転移性 LNM35 株と低転移性親株 N15 株に対する最先端プロテオミクス解析によって得た網羅的な蛋白発現情報に対する、統合的な解析を通じた新規分子標的候補の探索・同定を進めた。これまでに、詳細な臨床情報の付帯する 173 例の非小細胞肺がん腫瘍組織から得た約 10,000 種類の網羅的な定量的蛋白発現情報をもとに、肺がん患者の臨床病態と有意な関連性を示すタンパク質として 514 種類を同定した。一方、我々が樹立した高転移性ヒト非小細胞肺がん株 NCI-H460-LNM35 株と低転移性親株 NCI-H460-N15 株間における網羅的なタンパク質の発現解析を通じて、両者の発現量に 2 倍以上の差を認める 385 種類の蛋白質を同定した。これらの患者腫瘍組織と *in vitro* の転移実験系の双方の解析において、肺がんの転移・増悪への関連性が共通して示唆された 18 種類のタンパク質から、新規性や機能面からとくに興味深いと考えられる 5 種類を選択し、それらを規定する遺伝子の siRNA を用いたノックダウンを行った。各遺伝子の発現抑制が、肺がん細胞株の運動・浸潤、細胞増殖等に与える影響について検討し、機能的な関与が強く示唆される遺伝子として、3 種類にまで絞り込んだ。現在、分子標的治療の研究開発に資する基盤的な情報を得るべく、これらの遺伝子についてさらに分子細胞生物学的及び生化学的な機能解析を加えつつある。

また、我々がこれまでに同定した肺がんの転移関連分子 CLCP1 を標的とする、革新的分子標的治療法の研究開発に資する基盤情報を得るための研究開発を進めた。本年度は、とくに CLCP1 と受容体型チロシンキナーゼ (RTK) との相互作用に焦点を当て、EGFR 等の RTK シグナルによる CLCP1 のリン酸化修飾の意義を中心に検討を加えた。CLCP1 上のリン酸化候補部位のチロシンをアラニンに置換した変異体を作成し、さらにこれらの CLCP1 変異体或いは野生型 CLCP1 を、EGFR 変異を持ち EGFR 阻害剤感受性の肺がん細胞株に導入して検討を加えたところ、特定のリン酸化候補残基の単独、或いは、複合変異体による有意な増殖抑制の惹起を見出した。また、CLCP1 の野生型あるいはリン酸化候補部位の変異体を肺がん細胞株に導入した上で、遺伝子発現プロファイルを取得し gene set enrichment analysis (GSEA) 法により検討したところ、CLCP1 のリン酸化候補部位の変異体の導入による発現プロファイルの変化は、EGFR 阻害剤によって EGFR シグナルを抑制した際に変動する遺伝子セットと有意な関連性を示した。一方、CLCP1 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトした肺がん細胞株を作成して検討した結果からは、MET の自己リン酸化の著減と、HGF 添加に対する反応性の減弱の惹起を見出している。これらの研究成果によって、CLCP1 上の特定のリン酸化部位の機能的な重要性とともに、CLCP1 と EGFR や MET 等の RTK との間に機能的なクロストークが存在することが明らかとなった。

なお、研究代表者と研究分担者らの所属機関は、同一市内に所在する。その地の利を最大限に生かして、随時研究進捗に関わる情報を交換するためのミーティングを開催し、密接な相互協力のもとに研究開発を円滑かつ効率的に推進した。

4. その他