

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10703

研究課題名(和文) レーザープロテオミクスを用いた悪性胸膜中皮腫浸潤メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of malignant pleural mesothelioma invasion using laser-proteomics

研究代表者

宮田 義浩 (Miyata, Yoshihiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：50397965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はレーザープロテオミクスと、レーザーマイクロダイセクションを用いて、悪性胸膜中皮腫(MPM)の微小浸潤に関わる分子の同定とその機能解析を試みた。

MPM検体より浸潤部細と非浸潤部からRNAを抽出し、網羅的比較遺伝子解析を行った。12例の検体からBAP1, NF2, NOTCH1, ABL1, ATM, CDKN2A, ERBB2, FBXW7, PTENが候補遺伝子として同定された。更に肺腺癌との鑑別に有用な分子(Noxa, MUC4, DAB2, Intelectin-1, Glypican-1, Survivin, BAP1, Mucin 21)を同定し、臨床での有用性を確かめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスベスト暴露に起因し近年社会問題化している悪性胸膜中皮腫(MPM)は、早期発見が難しく、その治療性成績は極めて悪い。そのため早期診断や新規治療薬の開発による予後改善が急務である。今回MPM浸潤成分特異的分子、及び肺腺癌との鑑別に有用な分子を同定できたことにより、MPMの浸潤メカニズムの一部が解明された。これによりMPMの早期確定診断が可能となり、手術等による局所治療介入による予後改善が期待できる。更に同定された分子を制御する機序解析を進めることにより、新規分子標的治療薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We used laser-proteomics and laser-microdissection to identify molecules involved in the micro-invasion of Malignant Pleural Mesothelioma (MPM).

RNA was extracted from the invasive area and non-invasive area from the MPM sample, and a comprehensive gene analysis was performed. BAP1, NF2, NOTCH1, ABL1, ATM, CDKN2A, ERBB2, FBXW7, PTEN were identified as candidate genes from 12 samples. Furthermore, we decided the molecules (Noxa, MUC4, DAB2, Intelectin-1, Glypican-1, Survivin, BAP1, Mucin 21), which could differentiate MPM from lung adenocarcinoma and confirmed their clinical relevances.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：悪性胸膜中皮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫 (MPM) に対しては、術前化学療法後に胸膜肺全摘などの切除術が行われるが、その治療侵襲の大きさにも関わらず治療成績は極めて不良である。早期発見による予後改善が最も期待されているが、図に示す如く反応性胸膜肥厚と軽微な浸潤を示す MPM の病理学的鑑別は極めて困難であり、MPM が早期に治療されることは稀である。両者を鑑別できる新規バイオマーカーが同定できれば、MPM の早期診断が可能となり、この難病に苦しむ患者の福音となる。

我々はレーシック角膜屈折矯正手術に用いられるエキシマレーザーが水平平坦な切離面 (ablation front) を作る特性に着目し、細胞の微細構造物を蛋白変性なく採取するのに有用ではないかと発想した。結果、エキシマレーザー照射による癌細胞浸潤突起の蛋白分画採取に成功し、2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) 及び質量分析を経て、新規癌浸潤突起特異的局在分子の同定を可能とした (Mimae T, et al. Lab Invest. 2012;92:1374-85.)。浸潤突起は培養細胞腹側より垂直方向に伸長するアクチンが豊富な構造物で、細胞外基質分解酵素産生も特徴である。これらの特性は強い癌浸潤への寄与を示唆している。細胞株を用いた本技術で同定された浸潤突起特異的分子はヒト検体解析に比べて純粋に浸潤のみ関与している可能性が高い。

更に我々は微小浸潤肺腺癌細胞で、非浸潤癌より浸潤癌に進展する際の遺伝子発現の変化に着目して研究を進めてきた。これはレーザーマイクロダイセクションにて精巧に非浸潤成分と浸潤成分の癌細胞のみを採取し、それぞれ全 RNA を抽出、抽出物を増幅後に両成分での遺伝子発現を網羅的に比較解析する技術である (Mimae T, et al. Clin Cancer Res. 2012;18:945-55.)。これにより浸潤成分に高発現が認められる遺伝子の抽出が可能となる。

我々が開発したレーザープロテオミクス技術は、既に臨床応用 (レーシック角膜屈折矯正手術) されているエキシマレーザーの水平平面作成に着目し、浸潤突起を蛋白変性なく採取できる画期的な新技術である。加えて採取したタンパクを 2D-DIGE 及び質量分析に供し、新規浸潤突起局在分子の同定に成功している。微小浸潤肺癌については、網羅的遺伝子解析により非浸潤細胞-浸潤細胞への悪性化に伴う転写因子 Notch2 と Six1 の発現亢進を報告した (Mimae T, et al. Clin Cancer Res. 2012;18:945-55.)。

本研究は我々が開発した培養細胞を用いたレーザープロテオミクス、ヒト切除標本を用いた次世代シーケンサーによるジェノミクスの特性を相補的に融合することにより、より精度の高い候補分子を絞り込めることに高い独創性を有する。更に当科では約 60 例の術前化学療法前後の MPM 新鮮凍結標本、ホルマリン固定標本、および血液検体を採取、保有している。各症例の術前治療前後の臨床病理学的所見も網羅しており、これは世界最大級の貴重な組織バンクである。また当科は本邦トップクラスの年間 MPM 手術症例数を有するため、新鮮手術組織の採取は容易である。本研究により MPM の微小浸潤に関わる分子を同定し、その機能解析が進めば、MPM 早期診断治療が可能となり、MPM 治療成績が飛躍的に向上することが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では上記両技術を用いて、MPM 細胞株、早期 MPM 組織検体から MPM の微小浸潤に関わる分子を同定し、その機能解析を進めることにより、MPM 早期診断に寄与する新規バイオマーカーの発見や治療開発を目指す。

- 1) MPM 細胞浸潤突起の蛋白分画抽出
- 2) 微小浸潤 MPM の浸潤・非浸潤細胞からの RNA, DNA 抽出
- 3) 浸潤突起のプロテオミクスと微小浸潤 MPM の網羅的比較遺伝子解析
- 4) 同定分子の機能解析
- 5) MPM 切除例における同定分子の発現と臨床病理学的特徴の解析

3. 研究の方法

1) MPM 細胞浸潤突起の蛋白分画の抽出

(1) 穴あき透過膜 (ポアサイズ 3、又は 1 μm) 付き培養インサートを 12 ウェルプレートに置き、当施設に保有するヒト MPM 細胞株を穴あき透過膜上で培養する。ウェルに走化性因子を添加し、癌細胞から偽足 (浸潤突起) をポア内に伸長させる。透過膜をコートする基質 (フィブロネクチン等) 及び走化性因子 (NIH3T3 馴化培地、EGF 等のサイトカイン) を様々に変更し、効率的な突起伸長条件を決める。

(2) 上記培養系で最小限の蛋白変性でポア内に浸潤突起を残し、細胞体を完全に除去するために、Argon Fluoride エキシマレーザーを透過膜上方より照射。照射装置は、レーシック角膜屈折矯正手術装置 EC-5000 CXIII (ニッデク社) を改変して使用。試験照射にて次の調整を行う。(a) 切離面 (ablation front) の調整: 広い水平切離面の確保と、切離深度 (透過膜 (厚さ 10 μm) を約 2 μm 削る) を設定する。(b) レーザー出力とスキャン回数の調整: 細胞体の除

去が 30 秒以内に完了するようレーザー出力と照射スキャン回数を至適化する。

(3) 偽足突起蛋白の回収と純度解析:(a)同一培養条件で培養インサートを 100 個用意する。至適照射条件下で順次レーザー照射を行い、照射直後に液体窒素で急速凍結する。全透過膜を一度に凍結粉砕して蛋白抽出を行う。(b) 対照蛋白画分は透過膜上で培養した細胞体の蛋白抽出液とする。超薄層(0.1 mm 厚)PAGE に展開した後、インテグリンやコルトアクチン(浸潤突起での濃縮が既知の分子)に対する抗体でプロットし、浸潤突起蛋白の濃縮を確認する。

2) 微小浸潤 MPM の浸潤・非浸潤細胞からの RNA 抽出

(1) MPM の生検材料が外科的に切除されると直ちに 2 つの最大断面をホルマリン固定パラフィン包埋と凍結包埋にする。

(2) パラフィン切片で微小浸潤 MPM と診断後、凍結包埋より薄切切片を作製し、室温 10 度以下の環境でレーザーマイクロダイセクションにて浸潤部細胞と反応性中皮細胞を速やかに分取し RNA を抽出する。

(3) MPM のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)由来試料および血漿検体において、レーザーマイクロダイセクションにて浸潤部細胞と反応性中皮細胞より RNA を抽出する。

3) 浸潤突起のプロテオミクスと微小浸潤

(1) 2D-DIGE 及び銀染色で検出された特異的スポットやバンドを質量分析(LC-MS/MS)に供する。50~100 個程度の分子の同定を行う予定である。

(2) 全 RNA は次世代シーケンサー(Genome Analyzer IIX (illumine)、広島大学)を用いて、MPM 浸潤組織における遺伝子変異、遺伝子発現の解析を行う。フローセル上に固定し増幅させた DNA 断片のシーケンスをハイスループットに行い、DNA、RNA シーケンス解析が可能である。

(3) MMP における浸潤部細胞と反応性中皮細胞試料を用いて paired analysis を行う。次世代シーケンスにより標的遺伝子を少量ヒトサンプル(DNA:10ng)での解析が可能である。RNA シーケンスにより、遺伝子発現の変化を解析し、MPM の浸潤メカニズムに重要な関与を示すいくつかの遺伝子を同定する。それぞれの遺伝子を相互関係の有無、Gene Ontology に従ってシグナル経路別に分類を行う。

CSCs related gene

A20/TNFAIP3, ABCB5, ABCG2, ALCAM/CD166, ALDH1A1, AFP, AMACR, Aminopeptidase N/CD13, B220/CD45R, beta-Catenin, BMI-1, BM-4, BMP-4/BMP-7 Heterodimer, BRCA1, CD133, CD117/c-kit, CD15/Lewis X, CD151, CD19, CD2, CD24, CD27/TNFRSF7, CD3, CD3 epsilon, CD31/PECAM-1, CD34, CD38, CD44, CD45, CD45RO, CD47, CD74, CD90/Thy1, CD96, CEACAM-6/CD66c, c-Maf, c-Myc, Connexin 43/GJA1, CX3CL1/Fractalkine, CX3CR1, CXCL12/SDF-1, CXCR1/IL-8 RA, CXCR4, Decorin, DLL4, DPPIV/CD26, E-Cadherin, EGF R/ErbB1, Endoglin/CD105, EpCAM/TROP1, ErbB2/Her2, Fc epsilon RI, Fc gamma RI/CD64, GLI-1,-2, HGF R/c-MET, HIF-2 alpha/EPAS1, IL-1 alpha/IL-1F1, IL-3 R alpha/CD123, IL-6 R alpha, Integrin alpha 1/CD49a, Integrin alpha 6 beta-1,-4, Integrin alpha 6/CD49f, Integrin alpha 9 beta 1, Integrin beta 1/CD29, L1CAM, Lgr5/GPR49, LMO2, MICL/CLEC12A, MS4A1/CD20, Musashi-1,-2, Nanog, Nestin, NF2/Merlin, Notch-1, Nucleostemin, Oct-1, Oct-3/4, Oct-4A, OV-6, PDGF R beta, PIWIL1/HIWI, Podoplanin, PON1, PRL-2/PTP4A2, PTEN, Sca-1/Ly6, Snail, Sonic Hedgehog/Shh, SOX2, SSEA-1,-3,-4, STAT3, Syndecan-1/CD138, Tfr, TIM-3, TRA-1-60(R), Vimentin

4) MPM 切除例における同定分子の発現と臨床病理学的特徴の解析

早期 MPM の診断マーカー・進行期 MPM の予後マーカーとしての有用性:十分な術後フォローアップ期間を有する MPM における同定分子の発現様式と予後や臨床病理学的特徴との相関性を解析する。

5) 浸潤関連分子から浸潤促進分子への絞り込み、創薬を目指した同定分子の機能解析

同定された分子の遺伝子発現を、MPM 細胞株の RT-PCR 法にて確認するとともに、全長 cDNA をクローニングし、遺伝子変異の有無を調べる。細胞株に由来する全長 cDNA を哺乳類発現ベクターに挿入し、MPM 細胞に対して遺伝子導入を行う。遺伝子強制発現によって浸潤突起形成能(細胞 1 個当たりの偽足突起の数、偽足突起の長さ・太さ等を調べる。同様に wound healing アッセイや穴あき透過膜(ポアサイズ 8 μm)遊走(transmigration)アッセイ等により、細胞運動・遊走能を調べる。

4. 研究成果

外科的に切除された MPM 検体の 2 つの最大断面をホルマリン固定パラフィン包埋と凍結包埋し、パラフィン切片で微小浸潤 MPM と診断後、凍結包埋より薄切切片を作製し、レーザーマイクロダイセクションにて浸潤部細胞と反応性中皮細胞を分取し RNA を抽出し、微小浸潤 MPM の網羅的比較遺伝子解析を行った。Cancer hotspot panel v2(CHPv2)、及び Oncomine Comprehensive assay により候補遺伝子を検討した。12 例の検体から BAP1, NF2, NOTCH1, ABL1, ATM, CDKN2A, ERBB2, FBXW7, PTEN が候補遺伝子として同定された。上記で同定された分子の遺伝子強制発現

によって浸潤突起形成能、細胞運動・遊走能を調べる。更に上記遺伝子のノックダウンによりその機能を確認した。
更に MPM と反応性中皮細胞、肺腺癌より遺伝子を抽出し、その鑑別に有用な分子 (Noxa, MUC4, DAB2, Intelectin-1, Glypican-1, Survivin, BAP1, Mucin 21) を同定し臨床での有用性を確かめた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kai Y, Tsutani Y, Ito M, Mimura T, Miyata Y, Okada M. Metachronous Lung Cancer After Pleurectomy/Decortication. Ann Thorac Surg, 107. e1-e3, 2019. (査読・有)
2. Kai Y, Tsutani Y, Tsubokawa N, Ito M, Mimura T, Miyata Y, Okada M. Prolonged post-recurrence survival following pleurectomy/decortication for malignant pleural Mesothelioma. Oncol Lett, 17, 3607-3614, 2019. (査読・有)
3. Kai Y, Amatya VJ, Kushitani K, Kambara T, Suzuki R, Tsutani Y, Miyata Y, Okada M, Takeshima Y. Mucin 21 is a novel, negative immunohistochemical marker for epithelioid mesothelioma for its differentiation from lung adenocarcinoma. Histopathology, 545-554, 2019. (査読・有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。