

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07218

研究課題名(和文) 癌の悪性化におけるGL01の役割の解明

研究課題名(英文) The role of GL01 in Cancer malignant progression

研究代表者

藏満 保宏 (KURAMITSU, Yasuhiro)

北海道医療大学・医療技術学部・教授

研究者番号：50281811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞内のGL01が核内でどのように悪性化を促進しているのかを核内蛋白質を抽出し、GL01と結合する蛋白質同定を目標とした。

(1) マウス線維肉腫プログレッサーQRsP11細胞とヒト膵癌細胞KLM1から核内蛋白質を抽出し抗GL01抗体によるCo-IPを行ったが有意なバンドを検出することができなかった。(2) QRsP11とKLM1のGL01高発現株を作製しCo-IPを行ったが同定には至っていない。(3) Bio-IDを付けたGL01高発現株を作製したが発現が細胞質でのみ確認できたため、Bio-ID-GL01は核に入らない可能性が考えられた。(4) 膵癌の肝転移の肝生検組織からオルガノイドを樹立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究成果からGL01が予後不良の膵癌を筆頭に悪性化進展癌細胞の中で核に高発現し癌細胞の浸潤に深く関与していることがわかっている。GL01が核でどのように働いて癌の悪性化が進展していくのかをGL01と核内で結合する蛋白質を同定して明らかにするために人為的にGL01を高発現させて結合蛋白同定を試みた。この人為的に高発現させたGL01は細胞質のみならず核に局在していることも確認できた。現在Co-IP後の試料を質量分析する段階にまで来ている。Co-IPの精度を上げるためにBio-IDを付けたGL01高発現株を作製したが核に入らないことが明らかになったためCo-IPには用いることができなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the proteins which associate to GL01 in the nucleus of malignant progression clones. (1) Albeit we performed Co-IP with GL01 in QRsP11 and KLM1 cells, we could not get any band in Co-IP precipitates. (2) We established GL01-overexpressed QRsP11 and KLM1 cells, and performed Co-IP with FLAG-tag. Now co-workers are performing MS analysis. (3) We also established BioID-GL01 transduced cells to let Co-IP become easier and securer. However, BioID-GL01 molecule could not translocate to the nucleus. (4) We could establish the pancreatic cancer organoid from the pancreatic cancer tissue in the liver for further investigation of GL01 function in cancer malignant progression.

研究分野：癌の悪性化

キーワード：GL01 膵癌 悪性化 プログレッション プロテオミクス オルガノイド BioID

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

浸潤性膵癌の5年生存率は1-4%と非常に予後不良であり、発見時に手術不能症例が大多数を占める。その理由のひとつとして膵癌の高転移能、高浸潤能が挙げられる。そこで、膵癌の高転移能、高浸潤能に關与する蛋白質同定を目的として膵癌組織のプロテオーム解析を行ったところ、膵癌組織中のGL01が周辺の非癌部組織と比較して有意に高発現していることが明らかとなった (Anticancer Res 32: 3219-3222, 2012)。また、Naito等が樹立して報告している腎細胞癌 (J Natl Cancer Inst 78: 377-385, 1987)の高転移クローン SN12Cpm6、中高転移クローン SN12C clone 2、中低転移親株 SN12C、低転移クローン SN12C clone 4の比較プロテオーム解析を行ったところ、GL01の発現が転移能に比例して増強していることが明らかとなった。また、スキルス胃癌の高転移株と低転移株での比較解析においても高転移能とGL01の発現が比例していることがわかった (Oncol Rep 30: 2365-2370, 2013)。さらに慢性炎症誘発の実験的マウスの線維肉腫悪性化進展モデル QR32 細胞 (退縮型) と QRsP11 細胞 (悪性進展型) のプロテオーム解析の結果から、悪性進展型 QRsP11 細胞における有意な GL01 発現の増強、さらに悪性進展型 QRsP11 細胞における GL01 の明らかな核への局在、そして GL01 ノックダウンによる QRsP11 細胞の migration の有意な抑制を明らかにしている (Electrophoresis 35: 2195-2202, 2014)。

2. 研究の目的

これまで明らかにしてきた GL01 は、浸潤能・転移能が高いより悪性の癌細胞に高発現している。GL01 は、より悪性である癌細胞の migration を促進する。GL01 は、より悪性である癌細胞の核内に局在しているという3点に着目し、本研究では、QRsP11 細胞内の GL01 が核内でどのような働きを行って、migration を促進しているのかを GL01 と DNA が結合して遺伝子の発現に影響しているという仮説ならびに、GL01 と他の蛋白質が結合して核内に移行し、migration 促進に何らかの影響を及ぼしているという仮説から、悪性化進展細胞の核内から蛋白質を抽出して GL01 と結合する DNA や蛋白質を同定して GL01 が悪性化進展細胞の核内でどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GL01 の Co-IP による核内蛋白質の同定

QRsP11 細胞から NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher) を用いて核内蛋白質を抽出し (Electrophoresis 35: 2195-2202, 2014)、Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (Novex) と抗 GL01 抗体による Co-IP を行い、SDS-PAGE で分離後にゲルから切り出してトリプシンによるゲル内消化を行い、質量分析により QRsP11 細胞の核内で GL01 と結合する蛋白質の同定を行う。

(2) GL01 の強制発現株樹立と GL01 の Co-IP による核内蛋白質の同定

GL01 の Co-IP による核内蛋白質の同定を QRsP11 細胞から NE-PER

Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents を用いて核内蛋白質を抽出し Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (Novex) と抗 GL01 抗体による Co-IP を試みたが、有意な蛋白バンドを検出できなかったため、膵癌細胞株 KLM1 とマウスプロゲッションモデル線維肉腫株 QRsP11 へのトランスフェクションによって GL01 高発現株と Bio-ID を付けた GL01 高発現株を作製し、GL01 との Co-IP を行い、SDS-PAGE で分離後にゲルから切り出してトリプシンによるゲル内消化を行い、質量分析により QRsP11 細胞の核内で GL01 と結合する蛋白質の同定を行う。

(3) 膵癌組織からのオルガノイド樹立と培養

膵癌組織摘出後の癌組織をコラゲナーゼで消化、分離後に特殊なマトリクスを敷いた培養ディッシュで培養してオルガノイドを樹立する。オルガノイドは二次元培養の癌細胞株とは異なり培養過程による遺伝子の変異が入りにくく、癌組織中の癌細胞の性質を保持している点で癌細胞の in vivo での造腫瘍性、転移能を見るのに適しているため、GL01 関連蛋白質同定後の機能評価のためにオルガノイドを準備しておく (Cell 160: 324-338, 2015)。既に山口大学の倫理委員会の承認を得ており、患者にはインフォームド・コンセントを得て実施する。

4. 研究成果

(1) マウス線維肉腫プロゲッサーである QRsP11 細胞から NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher) を用いて核内蛋白質を抽出し、Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (Novex) と抗 GL01 抗体による Co-IP を行い、SDS-PAGE で分離を行ったが CBB 染色はもちろん、silver staining を行っても Heavy chain と Light chain 以外に有意なバンドを検出することができなかった。さらにヒト膵癌細胞株 KLM1 細胞からも同様に核内蛋白質を抽出し Co-IP を行い、SDS-PAGE で分離を行ったが、やはり有意なバンドを検出することができなかった。

(2) マウスプロゲッションモデル線維肉腫株 QRsP11 と膵癌細胞株 KLM1 とへのトランスフェクションによって GL01 高発現株を作製した。また、Bio-ID を付けた GL01 高発現株も同様に

作製した。Bio-ID とは、目的蛋白質にビオチンリガーゼを融合させ目的蛋白質と相互作用した蛋白質をビオチン化させ、このビオチン化された蛋白質をアビジンに結合させることで容易に分離・回収した後に質量分析で同定する方法である。目的蛋白質にタグを付けて分離・回収を行う従来の手法とは違って、例えば結合が微弱であったり、結合の時間的な長さが非常に短い場合でもビオチン化されていることで目的蛋白質と相互作用する蛋白質の同定が可能である。

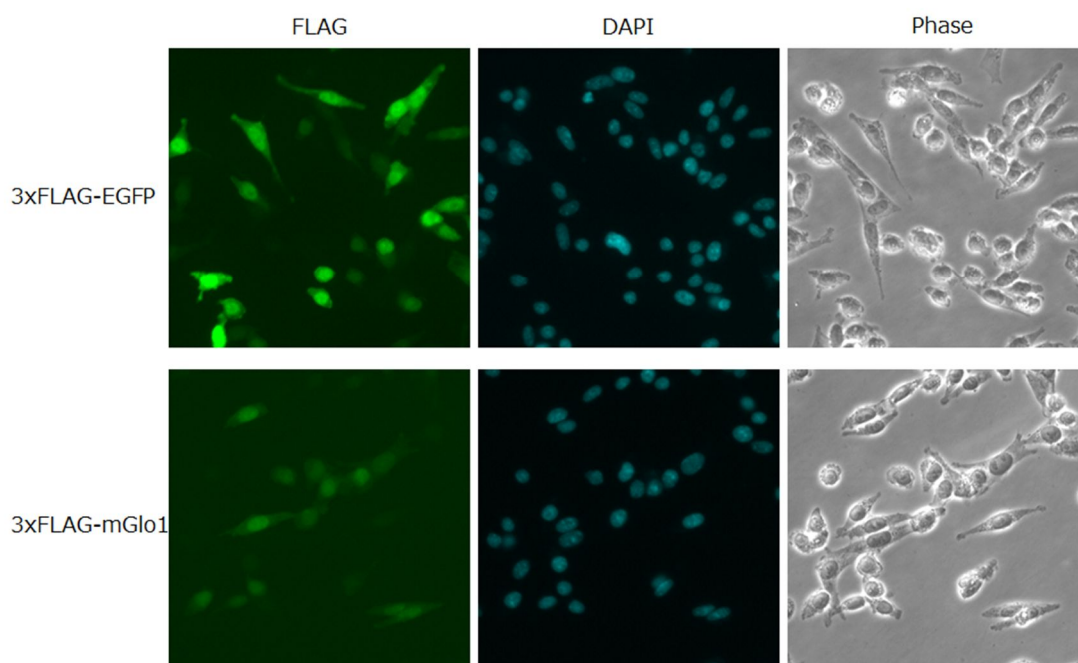
1) マウス GL01 (mGL01) (GFP, mGL01, BioID-mGL01, BioID (コントロール), BioID-luc2 (コントロール)) をリグレーション・クローン QR-32 に発現させたところ 90%以上の細胞で発現させることができた。また同様に、ヒト GL01 (hGL01) を PDAC 細胞株 KLM1 に発現させたところ、90%以上の細胞で発現が確認できた。

1 x 10⁵ cell/12 well, DMEM 1mlで1日培養

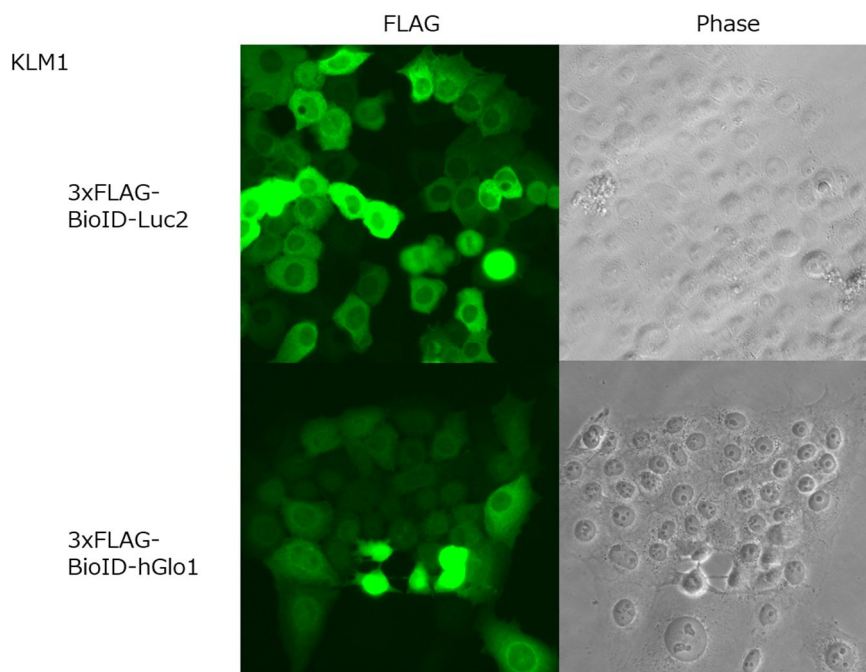
1mg/mL doxycyclineを1μL添加、1日培養

4%PFAで15分固定、1%TritonXで15分透過処理、1%goat serumで15分ブロッキング、1次抗体FLAG

(Wako)1/40004°C o/n, 2nd mouse ab-alexa4881/1000 + 5mg/ml DAPI 1/1000 1h 観察



さらに、導入した遺伝子発現の局在を調べたところ、BioID-GL01以外のいずれも細胞質、核での発現が確認できたが、BioID-GL01は細胞質でのみ発現が確認できたため、BioID-GL01は核に入らない可能性が考えられた。GL01自体小さな蛋白質なのでBioIDをつけると局在に大きく影響した可能性が考えられた。



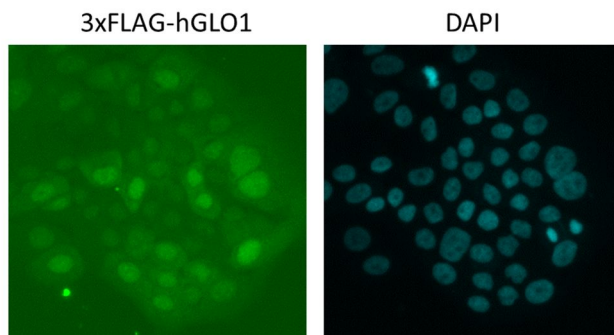
2) 残念ながら、当初の計画とは異なり BioID-GL01 を用いた方策がうまくいかなかったため、Flag-GL01 発現を用いての CoIP での同定に変更した。KLM-1: tet-3xFLAGEGFP、KLM-1: tet3xFLAG-

hGLO1、QR32 : tet-3xFLAG-EGFP、QR32 : tet3xFLAGhGLO1 を作成し FLAG 磁気ビーズ(M8823-1ML, Sigma)を用いて GLO1 と核内で結合している蛋白質を回収した後にグリシンを用いて抽出を行い、トリプシンと Lys-C を用いて消化した後に蛋白質の同定を熊本大学医学部の荒木令江先生との共同研究で行っている。

KLM1 tet-3xhGLO1

10 μ g/mL doxで1日誘導後に4%PFA固定

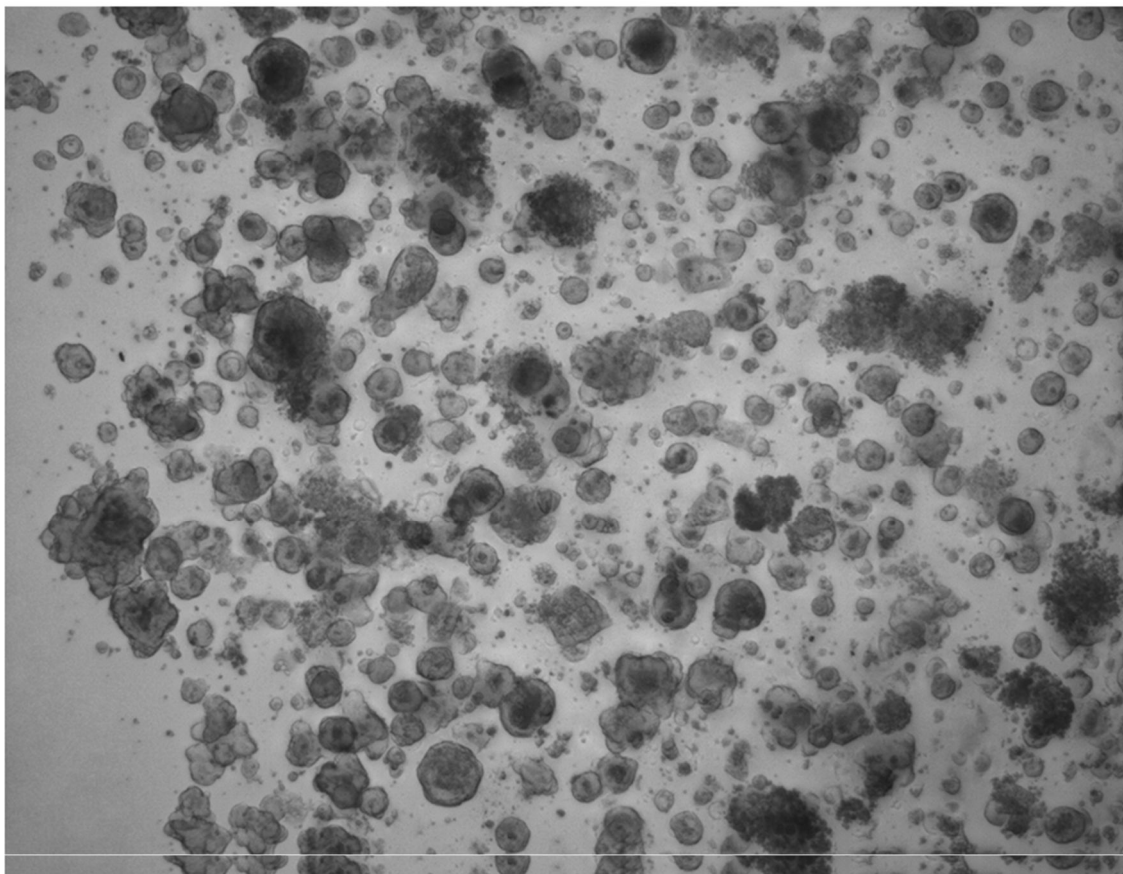
FLAGとDAPIで染色



(3) 膵癌組織摘出後の癌組織をコラゲナーゼで消化、分離後に特殊なマトリクスを敷いた培養ディッシュで培養してオルガノイド樹立を目指したが、膵癌組織からの樹立は困難を極めた。最終的に膵癌の肝転移が疑われる患者の肝生検組織から樹立できた。

Panc cancer org from liver biopsy
passage 3 8日後

x4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Shimada T, Nanimoto Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Kuramitsu Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Enzyme treated asparagus extract down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 759-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11305.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tokuda K, Baron B, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Tokuda N, Morishige N, Kobayashi M, Kimura K, Nakamura K, Sonoda K.	4. 巻 62
2. 論文標題 Optimization of fixative solution for retinal morphology: a comparison with Davidson's fixative and other fixation solutions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 481-490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-018-0592-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fucoxanthin potentiates anoikis in colon mucosa and prevents carcinogenesis in AOM/DSS model mice.	4. 巻 64
2. 論文標題 Terasaki M, Iida T, Kikuchi F, Tamura K, Endo T, Kuramitsu Y, Tanaka T, Maeda H, Miyashita K, Mutoh M.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 198-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2018.10.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuhara K, Tokuda K, Kitagawa T, Baron B, Tokunaga M, Harada K, Terasaki M, Uehara O, Ohta T, Takai R, Hamada J, Kobayashi M, Shimo T, Nagayasu H, Kuramitsu Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) was down-regulated by active hexose-correlated compound in human pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 6107-6111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12961.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Islam S, Muthumala M, Matsuoka H, Uehara O, Kuramitsu Y, Chiba I, Abiko Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 How Each Component of Betel Quid Is Involved in Oral Carcinogenesis: Mutual Interactions and Synergistic Effects with Other Carcinogens-a Review Article.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11912-019-0800-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Y, Kuramitsu Y, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Akada J, Maehara S, Maehara Y, Nakamura K.	4. 巻 50
2. 論文標題 PI3K inhibitor LY294002, as opposed to wortmannin, enhances AKT phosphorylation in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 606-612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2016.3804.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 4857-4862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Liang S, Takahashi H, Hirose T, Kuramitsu Y, Hatakeyama S, Yoshiyama H, Wang R, Hamada J, Iizasa H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 p54nrb is a negative regulator for SOX2 promoter.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Genomics & Proteomics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tokuda K, Baron B, Yamashiro C, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Kobayashi M, Sonoda K, Kimura K.	4. 巻 on line
2. 論文標題 Up-regulation of the pentose phosphate pathway and HIF-1 expression during neural progenitor cell induction following glutamate treatment in rat ex vivo retina.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 on line
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11212.s	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Islam S, Uehara O, Matsuoka H, Kuramitsu Y, Adhikari BR, Hiraki D, Toraya S, Jayawardena A, Saito I, Muthumala M, Nagayasu H, Abiko Y, I Chiba.	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA hypermethylation of sirtuin 1 (SIRT1) caused by betel quid chewing -a possible predictive biomarker for malignant transformation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-019-0806-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Terasaki M, Kuramitsu Y, Kojoma M, Kim S-Y, Tanaka T, Maeda H, Miyashita K, Kawagoe C, Kohno S, Mutoh M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 High fucoxanthin wakame (Undaria pinnatifida) prevents tumor microenvironment formation in an AOM/DSS mouse carcinogenic model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Nanimoto Y, Shimada T, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Kuramitsu Y.
2. 発表標題 The effect of ETASR50 on expression of heat shock protein 27 in pancreatic cancer cells.
3. 学会等名 The 26th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, July 21-22, 2018, Sapporo (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Baron B, Kuramitsu Y.
2. 発表標題 Determination of the effect of perilla extract on NRF2 activity using an ARE-luciferase sensor.
3. 学会等名 the 25th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tokuda K, Kuramitsu Y, Baron B, Teranishi S, Tokuda N, Kimura K.
2. 発表標題 AHCC inhibits TGF-beta-induced EMT in ARPE-19.
3. 学会等名 the 25th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Baron B, Kuramitsu Y.
2. 発表標題 Assessing cryopreservation of mesenchymal stem cells using Oligonol.
3. 学会等名 the 25th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北川 孝雄 (KITAGAWA Takao) (20614928)	山口大学・大学院医学系研究科・助教(特命) (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉野 茂文 (YOSHINO Shigefumi) (60294633)	山口大学・医学部附属病院・准教授 (15501)	