

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07656

研究課題名（和文）大腸がんにおける新規翻訳後修飾変動の解析

研究課題名（英文）Analysis of novel post-translational modifications in colorectal cancer

研究代表者

三城 恵美（佐藤恵美）（Mishiro-Sato, Emi）

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任講師

研究者番号：00455544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がんの新たな治療標的を探索するため、新規大腸がん治療法の開発を指向して、大腸がん腫瘍組織におけるアシル化修飾の変動の生物学的意義を解明することを目的とした。マウスモデルで見つかった修飾変化の臨床的重要性を検証し治療標的を探索するため、家族性大腸腺腫症 familial adenomatous polyposis (FAP) 患者の大腸腫瘍組織を用いてプロテオーム解析およびアシル化関連翻訳後修飾網羅解析を行った。標的として絞り込んだNAT10について阻害実験を行ったところFAP患者腫瘍由来オルガノイドや大腸がん細胞株で増殖抑制がみられたため、メカニズムの解明を進めており投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは、早期発見で治療をすれば治癒すると思われがちだが、死亡者数は年々増加し続けており、新しい治療法の標的探索が求められている。腫瘍部の遺伝子やタンパク質だけでなく、その翻訳後修飾に着目した本研究は新しい側面で大腸がんの治療標的を見出すことができたことから、メカニズム解明を進めることで新しい治療戦略の構築が期待される。

研究成果の概要（英文）：To explore new therapeutic targets for colorectal cancer, we aimed to elucidate the biological significance of variations in acylation modifications in colorectal cancer tumor tissues with the aim of developing novel colorectal cancer therapies. To validate the clinical significance of the modification changes found in mouse models and to explore therapeutic targets, we performed proteomic analysis and comprehensive analysis of acylation-related post-translational modifications using colorectal tumor tissues from familial adenomatous polyposis (FAP) patients. Inhibition of NAT10, which was selected as a target, showed growth inhibition in tumor-derived organoids and colorectal cancer cell lines from FAP patients, and the mechanism is now being elucidated.

研究分野：Proteomics

キーワード：翻訳後修飾 大腸がん プロテオミクス

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、大腸がん腫瘍組織と正常部を比較して、タンパク質のアシル化翻訳後修飾が大規模に変化することを見出していた。

本研究では、新規大腸がん治療法の開発を指向して、大腸がん腫瘍組織におけるアシル化修飾の変動の生物学的意義を解明する。

まず大腸がんモデルマウスや患者検体の組織を用いて、各種のアシル化修飾特異的抗体を用いてアシル化修飾標的タンパク質を濃縮し、質量分析により同定する。次に新規治療標的につながる可能性のある標的タンパク質に関して検証を進めることにより新規大腸がん治療法の開発につなげる。

### 2. 研究の目的

大腸がん腫瘍組織において、アシル化翻訳後修飾(タンパク質リジン残基のアセチル化やマロニル化など)が大規模に変化することを申請者は見出した。そこで「腫瘍組織におけるグローバルなアシル化修飾変動(アシローム変動)は腫瘍形成と関連性があるのか?」という学術的問いを解明する。そのために、モデルマウスやヒト臨床検体を用いて各種アシル化修飾タンパク質の同定と定量比較を行い、新規治療標的につながる標的タンパク質を見出して機能解析する。大腸がん組織におけるタンパク質のアシル化修飾に焦点を当て、得られた知見を大腸がんの新規治療方法開発に展開することを最終目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 大腸腫瘍組織におけるアシル化標的タンパク質の同定

マウス腫瘍組織を用いた解析:

本研究計画では、腸管腺腫組織(*Apc* 変異マウス)、浸潤性腸がん組織(*Apc/Smad4* 変異マウス)を用いて、アシル化修飾の解析、アシル化翻訳後修飾標的タンパク質の同定を実施する。アシル化修飾については、ウェスタンブロットおよび免疫沈降 に使用可能な抗体がすでに市販されている。まずウェスタンブロット法により、マウスの腸管腺腫組織、浸潤性腸がん組織におけるアシル化修飾の状態を解析する。次に、大規模な変化が起こっているアシル化修飾に関して、免疫沈降により濃縮したアシル化標的タンパク質を LC-MS/MS により同定する。

ヒト臨床サンプルを用いた解析:

家族性大腸腺腫症(FAP)患者から、内視鏡下で採取した腫瘍病変部とそれに付随した辺縁正常組織を回収した検体を用いて解析する。回収検体からタンパク質を抽出し、マウス組織と同様にまずウェスタンブロットにてアシル化修飾を解析する。次に、大規模な変化が起こっているアシル化修飾について免疫沈降法により標的タンパク質を濃縮し、LC-MS/MS により同定する。そして、マウス腫瘍組織およびヒト家族性大腸腺腫症患者で同様の変化をしているアシル化標的タンパク質のリストを作成する。文献的検討も加味して、有望なアシル化翻訳後修飾標的タンパク質を絞り込む。

### 4. 研究成果

研究代表者は、大腸がんの新たな治療標的となりうる分子やシグナル伝達経路を探索するため、大腸がんマウスモデルを用いたプロテオーム解析や翻訳後修飾 ( Post-translational modification: PTM ) 解析を行ってきた。その中で、タンパク質発現だけでなく、アシル化修飾が、大腸がんの初期病変である良性腺腫の段階で大きく変動していることを見出した。新規大腸がん治療法の開発を指向して、大腸がん腫瘍組織におけるアシル化修飾の変動の生物学的意義を解明することを目的とした。

マウスモデルで見つかったタンパク質およびその PTM 変化の臨床的重要性を検証し治療標的を探索するため、家族性大腸腺腫症 familial adenomatous polyposis (FAP) 患者の大腸腫瘍組織を用いて、まずはウェスタンブロットでアシル化修飾の変化がヒトとマウスで共通に生じる現象であることを確認し、次に変動するタンパク質を特定するため、プロテオーム解析およびアシル化関連の PTM 網羅解析を行って比較した。プロテオーム解析によって、ヒト・マウスのいずれにおいても、大腸腫瘍組織では大腸正常組織と比較して核やリボソーム関連タンパク質群の増加、ミトコンドリア関連タンパク質の減少が認められ、アシル化 PTM 網羅解析では、特にアセチル化タンパク質について、ヒト・マウスに共通した変化を腫瘍組織に認められた。標的として絞り込んだ NAT10 について阻害実験を行ったところ FAP 患者腫瘍由来オルガノイドや大腸がん細胞株で増殖抑制がみられたため、引き続き発展させた形の科研費を取得し、メカニズムの解明を進めており、さらに投稿準備中である。

#### 1) サンプルプレパレーションステップの確認

マウスモデルで見つかったタンパク質およびそのアシル化翻訳後修飾変化がヒトの臨床検

体でも同様に生じるかを検証することを目指し、事前にサンプルプレパレーションのステップについてマウスモデルの組織を用いて確認した。臨床サンプルが得られる手術検体の回収を想定し、室温条件下ではアシル化修飾やその他腫瘍マーカーなどのタンパク質が分解されることが明らかになった。手術の際はスケジュールの確認とアイスボックスの用意を必須とし、手術室との連携のもと、迅速に運搬・保管することが大切であることを確認した。サンプルの回収に関しては、愛知県がんセンター病院 内視鏡部 田近正洋部長（研究協力者）をはじめ、同意してくださった患者の皆様方のお陰で実現できた。

## 2) マウスとヒトの共通性の確認

マウス腫瘍組織で生じていた PTM の変化について、ヒトでも再現できるのか、臨床的重要性を検証し治療標的を探索するため、家族性大腸腺腫症 familial adenomatous polyposis (FAP) 患者 6 名の大腸腫瘍組織や正常組織（図 1）を用いて、各種アシル化修飾特異的抗体でウエスタンブロッティングにより検証したところ、ヒトにおいても腫瘍部で同様の変化がみられることを確認することができた。アシル化のうち、アセチル化・マロニル化・スクシニル化について変動を解析したが、特にアセチル化の変動がヒトとマウスで共通した変化を認めた（図 2）。

## 3) メカニズムの解明につなげるため、他のモデルマウスとの比較検討

当初から使用していた家族性大腸腺腫症モデルマウス（Apc 変異マウス）だけでなく、大腸病変の発生は Wnt シグナル経路の活性化をきっかけに生じることが分かっているため、腫瘍化はしないが増殖が盛んになる過形成モデルマウス（カテニン変異マウス）さらに悪性化したがんのモデルとして、進行した浸潤性大腸がんモデルマウス（cis-Apc/Smad4 マウス）について同様に比較解析したところ、ごく初期の病変から悪性化進展した大腸がんにおいてもアセチル化の変化は共通しており腫瘍形成に重要であることを見出した（図 3）。この変化は、以前のメタボロミクスでの代謝変化がごく初期の病変から生じることとよく一致していた。これらのマウスは、在籍研究室である愛知県がんセンター研究所がん病態生理学分野の青木 正博 分野長、藤下 晃章 主任研究員らにより提供され、長年研究されてマウスを作出されてきた成果である。

## 4) プロテオーム解析およびアシル化関連の PTM 網羅解析

各マウスモデルの腫瘍・正常組織、FAP 患者の大腸腫瘍組織や正常組織を用いたプロテオーム解析によって、ヒト・マウスのいずれにおいても、大腸腫瘍組織では大腸正常組織と比較して核やリボソーム関連タンパク群の増加、ミトコンドリア関連タンパクの減少が認められた。さらに実施したアシル化 PTM 網羅解析では、アセチル化タンパクについて、ヒト・マウスに共通して、核で増加しミトコンドリアで減少する変化を腫瘍組織に認めた（図 4）。アセチル化を制御する可能性がある候補分子を絞り込み、変動するアセチル化タンパク質の中でも核に存在して増加していた RNA cytidine acetyltransferase である、NAT10 に着目し解析を進めることにした（図 5）。データ解析において、在籍研究室である愛知県がんセンター研究所がん病態生理学分野の小島 康 主任研究員のお陰で実現できた。

## 5) NAT10 の阻害による増殖抑制

NAT10 に着目したことで、阻害薬やノックダウンの実験に着手することができた。NAT10 は阻害薬 Remodelin が市販されており、FAP 患者腫瘍由来オルガノイドや大腸がん細胞株に作用させたところ増殖を抑制することができ、FAP 患者正常部由来オルガノイドの増殖

には影響がなかった(図6)。NAT10 に特異的な siRNA を用いた大腸がん細胞株の実験でも増殖を抑制することができた。在籍研究室である愛知県がんセンター研究所がん病態生理学分野の梶野 リエ 主任研究員の技術により FAP 患者腫瘍由来オルガノイドの実験が実現し、大腸がん細胞株を用いた実験は藤下 晃章 主任研究員に実施していただいた。

図1 FAP患者検体情報

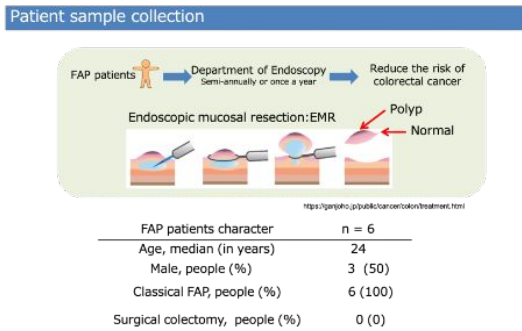


図2 アセチル化の変動がヒトとマウスで共通

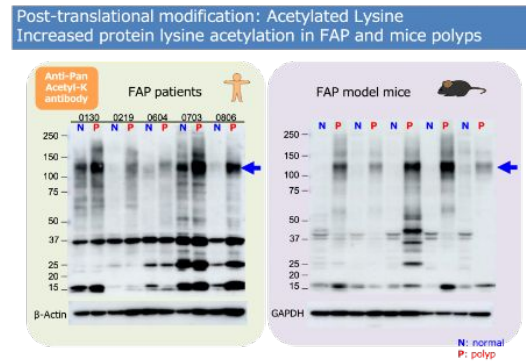


図3 腫瘍化前から悪性化まで共通の変化

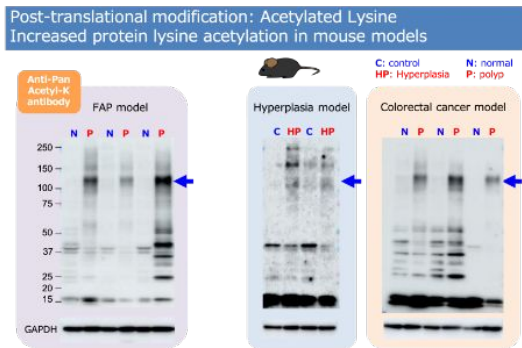


図4 プロテオミクス概要

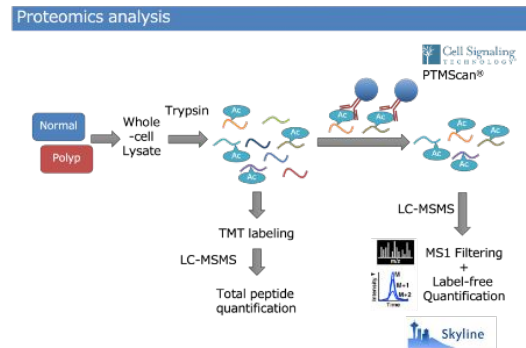


図5 アセチル化修飾のうち酵素に着目

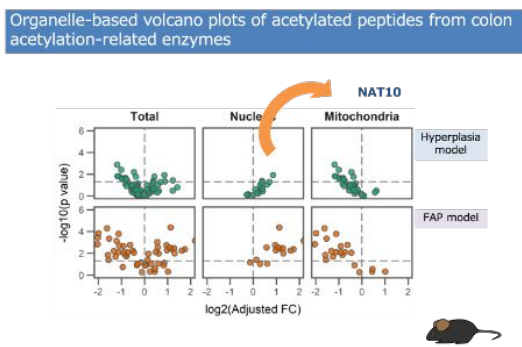
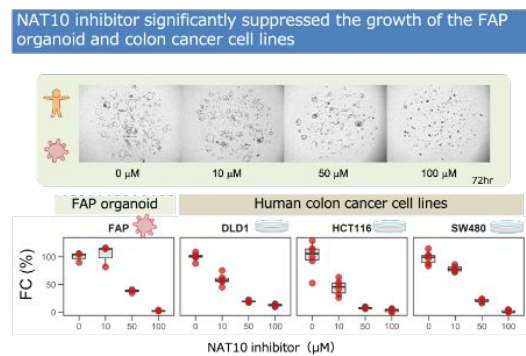


図6 オルガノイドや大腸がん細胞株の増殖抑制



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三城恵美
2. 発表標題 大腸腫瘍組織における翻訳後修飾変化の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	田近 正洋  (Tajika Masahiro)	愛知県がんセンター・病院 内視鏡部・部長  (83901)	臨床検体の収集

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------