

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月21日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650612

研究課題名（和文） ショットガンプロテオミクスを用いた癌の診断・治療標的候補の網羅的探索

研究課題名（英文） Comprehensive identification of novel tumor markers by targeted shotgun proteomics

研究代表者

吉田 清嗣 (YOSHIDA KIYOTSUGU)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70345312

研究成果の概要（和文）：

本研究では、2DICAL 法という無標識サンプル間比較解析が可能な定量性プロテオミクス解析システムを構築し、様々な解析を行うことを目標とした。まず癌細胞株を用いた2DICAL法による質量分析測定を行い、その定量比較解析限界を検討した。加えて我々が焦点を当てて研究を進めている DYRK2 や p53 などについて、2DICAL 法を用いて会合分子の単離やリン酸化部位の同定も試み、基質分子候補やリン酸化部位候補が多数同定された。

研究成果の概要（英文）：

In an attempt to identify cancer-specific disease markers, we chose 2DICAL as a quantitative proteome analysis. By using 2DICAL, we found novel cancer-related genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：プロテオーム、癌、腫瘍マーカー

### 1. 研究開始当初の背景

癌は我が国の死亡原因の第一位であり、癌の原因を解明し、診断・治療を開発して癌を制圧することは喫緊の国民的課題である。申請者はこれまでに、癌の診断・治療への応用を視野に入れた研究を推進してきた。具体的には、ゲノム DNA に生じる損傷が癌の主な原因であることから、DNA 損傷における細胞応答、特にアポトーシスと呼ばれる細胞死誘導の分子機構の解明に取り組んできた (Yoshida K, et al. *EMBO J.* 2003; Yoshida K, et al. *Nat. Cell Biol.* 2005; Yoshida K. *Trends Mol. Med.* 2008)。DNA 損傷によって惹起されるアポトーシスでは、癌抑制遺伝子である p53 がその中心的な働きを担っている。p53 は多彩な修飾を受けてその機能を使い分けており、中でも Ser46 のリン酸化はアポトーシス誘導に必須と考えられている (Oda K, et al. *Cell* 2000)。ところが、どのようなリン酸化酵素(キナーゼ)が DNA 損傷に応答して Ser46 をリン酸化するのか明らかにされていなかった。そこで我々は、Ser46 キナーゼの同定を目指し、世界に先駆けて Ser46 キナーゼとして DYRK2 を同定することに成功した (Taira N, et al. *Mol. Cell* 2007; Taira N, et al. *J. Biol. Chem.* 2010)。我々は DYRK2 の機能についてさらに解析を進めたところ、DYRK2 の発現を抑制すると細胞周期において顕著な G1 期の短縮が観察され、結果として細胞増殖能の亢進が見られるという、興味深い知見を得た。そこで癌組織マイクロアレイを用いて免疫組織染色を行ったところ、いくつかの癌組織において正常組織と比べて DYRK2 発現の顕著な低下が観察された。これらの知見から、DYRK2 の発現が低下した癌組織においては、DNA 損傷によって引き起こされるアポトーシス誘導の回避や過剰な細

胞増殖が起きていることが予測され、DYRK2 が新規癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。と同時に、DYRK2 が新規腫瘍マーカーや癌治療の標的分子になりうると期待される。

### 2. 研究の目的

これまでの DYRK2 の知見を機軸として、臨床検体の解析により発癌や癌の進展に関わる新規腫瘍マーカーを網羅的に探索する。その具体的な方法としては、癌組織をマイクロダイセクション法により分離し、LC-MS (Liquid chromatography and mass spectrometry; 液体クロマトグラフィーと質量分析)解析用に調整し、質量分析による解析を 2DICAL (2-Dimensional Image Converted Analysis of LC-MS)法という最先端の方法を用いることで、発現しているタンパク量を定量的に測定する。さらに同様の手法を用いて、プロテオーム解析により癌治療の標的分子候補を網羅的に探索し、癌制圧に向けた臨床応用への可能性を追求することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ① 最新鋭の質量分析計を用いた 2DICAL 法による検出限界検証

現況のスクリーニングシステムでは、ホルマリン固定パラフィン組織切片の約 3 mm<sup>2</sup> (~10,000 cells)から得られる試料が 2DICAL 法における定量比較解析限界である。特に生検試料を用いて解析を行う場合、解析に供給できる実質量には限りがあるため検出限界を知ることが必須の情報となる。申請者が所属する大学が所有する最新鋭の質量分析計を用いることで、検出限界をさらに引き上げることが可

能になると考えている。この機種を用いた 2DICAL 法による解析は今まで全く行われておらず、我々による試みが世界初である。そこでまずこの分析計を用いた 2DICAL の試料検出限界を検証する。始めに同じ臓器由来の異なる2種類の癌細胞株を用いて、その LC-MS 調整試料を希釈していき、比較検出限界を確かめる。次にパラフィン包埋ブロック由来の癌組織切片からマイクロダイセクションによって癌部と非癌部を抽出し、それぞれを LC-MS 解析用に調整し、2DICAL 法によりタンパク量の定量測定を行い、正常組織との比較検出限界を調べる。この限界は癌種によって大きく異なることが予想されることから、様々な癌種で試行することが必要である。そこですぐに着手できる乳癌ならびに大腸癌検体から始め、検体が入手され次第、種類を増やしていく。

## ② 2DICAL 法による癌臨床検体の網羅的解析

癌臨床検体を用いて 2DICAL 法によりタンパク量の比較定量解析を行う。癌臨床検体は東京医科歯科大学包括病理学教室で所有しているホルマリン固定パラフィン包埋試料と、東京慈恵会医科大学外科学教室においてバイオプシーで得られた生検サンプル及び手術検体を、各教室のご協力のもと提供していただく。試料はレーザーマイクロダイセクションで癌部と非癌部に分けてそれぞれを LC-MS 解析用に調整し、2DICAL 法によりタンパク量の定量測定を行い、癌組織と正常組織の細胞内タンパク量を比較する。癌組織特異的な発現パターンを示す分子群を網羅的に探索し、腫瘍マーカーや分子標的分子候補を同定する。試料にアクセス出来次第すぐに着手できる乳癌ならびに大腸癌

検体から始めていく。

## ③ 腫瘍マーカー／分子標的候補分子の有効性評価

これまでの解析から得られた腫瘍マーカー候補や分子標的候補についてその有効性を多角的に検証する。

### 1) 細胞レベルの in vitro 解析

まず用いたパラフィン包埋試料や生検試料について、癌部・非癌部に分けて候補分子の発現レベルをリアルタイム RT-PCR や免疫染色により可能な限り検証する。次に種々の癌細胞株を用いて、候補分子の発現レベルを RT-PCR による mRNA とウエスタンブロッティングによるタンパク質それぞれについて調べ、発現レベルの解離があるかどうかについて検証する。細胞株において mRNA とタンパク質で明らかな発現レベルの解離がみられた場合には、それが翻訳後修飾による可能性(たとえばユビキチン化によるプロテアソームでの分解)などについて検討する。このように量的または質的变化をきたしている候補分子を絞り込む。

次に選ばれてきた候補分子について、細胞内での機能解析を行う。まず RNAi によるノックダウン法や過剰発現により細胞増殖能や細胞浸潤能などへの影響を調べる。また会合する分子を 2DICAL により網羅的に同定する。

### 2) モデル動物を用いた in vivo 解析

候補分子の発現が癌細胞で高い場合にはノックダウン、低い場合には過剰発現させた細胞株を樹立し、ヌードマウスに皮下移植してその腫瘍増殖効果を調べる。さらに経静脈、あるいは心腔内に細胞株を移植し、その転移能獲得への影響も検証する。以上の in vitro 並びに in vivo 解析により、どの候補分子が腫瘍マーカーあるいは

は分子標的として有効であるか総合的に評価する。

### 3) 追跡コホート解析

癌臨床検体を提供していただいた患者の予後について、後ろ向き追跡調査を実施し、候補分子の予後予測マーカーとしての有効性について評価する。

## 4. 研究成果

平成23年度は様々な癌細胞株を用いて、2DICAL 法による質量分析測定を行い、併せてその定量比較解析限界を検討した。これらの予備実験をふまえて、適切な条件のもと臨床検体の網羅的発現解析を順次進めている。加えて我々が焦点を当てて研究を進めている DYRK2 や p53 などについて、2DICAL 法を用いて会合分子の単離やリン酸化部位の同定も試みた。興味深いことに、DYRK2 の基質分子候補が多数同定されており、そのいくつかについて現在精力的に機能解析を進めている。いずれにしても、DYRK2 という、これまでどんな働きを担っているのかほとんどわかっていなかったリン酸化酵素が、本研究を通してその機能が徐々にではあるが明らかになりつつあると考えている。また我々は近年、細胞周期に関わる分子が分裂期において特異的にリン酸化修飾されることを見出し、2DICAL 法の解析システムを応用してこのリン酸化部位の同定を試みた。その結果、新たなリン酸化部位を一カ所同定することに成功した。以上より、2DICAL 法はリン酸化修飾の同定にも極めて有効なシステムであることが判明した。

平成24年度は、我々が焦点を当てて研究を進めている DYRK2 や p53 などについて、2DICAL 法を用いて会合分子の単離やリン酸化部位の同定を試みた。興味深いことに、DYRK2 の基質分子候補が多数同定されて

おり、そのいくつかについて現在精力的に機能解析を進めている。p53 によって特異的に誘導される細胞死関連分子についても、その会合分子群をプロテオーム解析によって明らかにすることで、新たな p53 による制御機構が判明しつつある。また我々は近年、細胞周期に関わる分子が分裂期において特異的にリン酸化修飾されることを見出し、2DICAL 法の解析システムを応用してこのリン酸化部位の同定を試みた。その結果、新たなリン酸化部位を一カ所同定することに成功した。この分子のリン酸化は細胞が分裂期に突入し、分裂前期で染色体が効率よく凝縮するために必須であることを見出した。以上より、2DICAL 法はリン酸化修飾の同定にも極めて有効なシステムであることが判明した。本研究を通して、2DICAL 法による解析基盤を確立できたのみならず、幅広いアプリケーションへの可能性にも寄与できたと考えている。今後は、他の翻訳後修飾、例えばアセチル化やユビキチン化などの同定にも応用できるかについても、検討を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1, Suzuki K, Dashzeveg N, Lu Z-G, Taira N, Miki Y, Yoshida K. PDCD6, a novel p53-responsive gene, targets to the nucleus in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Sci*. 103: 1788-1894 (2012)

2, Taira N, Mimoto R, Kurata M, Yamaguchi T, Kitagawa M, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J Clin. Invest*. 122:859-872 (2012)

3, Taira N, Yoshida K. Post-translational modifications of p53 tumor suppressor:

determinants of its functional targets. *Histol. Histopathol.* 27:437-443 (2012)

4, 平直江、吉田清嗣 『抗腫瘍性キナーゼによる細胞周期制御とがんの進展』 「実験医学」30:1786-1789 (2012)

5, Hew HC, Liu H, Lu-Z-G, Kimura J, Miki Y, Yoshida K. Identification of Evi-1 as a novel effector of PKC $\delta$  in the apoptotic response to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1803:285-294 (2011)

6, Hew HC, Liu H, Miki Y, Yoshida K. PKC $\delta$  regulates Mdm2 independently of p53 in the apoptotic response to DNA damage. *Mol. Carcinog.* 50:719-731 (2011)

7, 吉田清嗣 『アポトーシス誘導におけるPKC』 「Surgery Frontier」18:62-65 (2011)

8, Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K. Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *Int. J. Cancer* 128:1524-1531 (2011)

[学会発表](計28件)

1. Yoshida K. DYRK2 phosphorylation of c-Jun/c-Myc controls tumor progression by monitoring G1/S transition. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. Tokyo, Japan 2/1-2 (2013)

2. Taira N, Kimura J, Lu Z-G, Yamaguchi T, Yoshida K. Identification of a novel mechanism for apoptosis and microRNA metabolism in response to genotoxic stress. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. Maui, Hawaii: 2/21-25/2013

3. Dashzeveg N, Taira N, Miki Y, Yoshida K. The comprehensive study for the target genes of the Serine 46 phosphorylation of the p53. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. Maui, Hawaii: 2/21-25/2013

4. Yoshida K. Role for DYRK2 in cell cycle control and tumor progression. *Siraj Medical Journal* 64: Suppl. 2, Nov-Dec. 61. (2012) MMC2012. Bangkok, Thailand: 12/19-12/22/2012

5. Mimoto R, Imawari Y, Kamio M, Kato K, Nogi H, Toriumi Y, Takeyama H, Yoshida K. Uchida K. DYRK2 regulates breast cancer invasion via Snail/E-cadherin pathway. The 2012 CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, TX: 12/4-12/8/2012

6. Dashzeveg N, Taira N, Miki Y, Yoshida K. Discovery of the pro-apoptotic genes induced by tumor suppressor p53. AACR Annual Meeting 2012, Chicago, IL: 3/31-4/4/2012

7. Mimoto R, Taira N, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 regulates cancer invasiveness via Snail/E-cadherin pathway. AACR Annual Meeting 2012, Chicago, IL: 3/31-4/4/2012

8. Taira N, Mimoto R, Miki Y, Yoshida K. DYRK2-mediated phosphorylation of c-Jun and c-Myc is requisite for proper control of the G1/S transition. AACR Annual Meeting 2012, Chicago, IL: 3/31-4/4/2012

9. Hew HC, Liu H, Lu-Z-G, Kimura J, Miki Y, Yoshida K. PKC $\delta$  controls Evi-1 to transactivate PLZF in the apoptotic response to DNA damage. 'Signal Transduction

within the Nucleus', Gordon Research Conference. Ventura, CA: 2/27-3/4/2011

10. Taira N, Kimura J, Lu Z-G, Yamaguchi T, Higashiyama S, Ono M, Miki Y, Yoshida K. Amphiregulin, a novel target of p53, modulates microRNA metabolism in the nucleus. 'Signal Transduction within the Nucleus', Gordon Research Conference. Ventura, CA: 2/27-3/4/2011

11. 吉田清嗣 細胞死誘導と細胞周期制御による発癌抑制の分子機構 第3次対がん10か年総合戦略・文科省がん支援活動合同公開シンポジウム、東京; 1月31日、2012

12. 吉田清嗣 アポトーシス誘導の制御機構 第26回生体・生理工学シンポジウム/「バイオシグナルの統合と治療応用に関する研究会」第21回研究会、草津、滋賀; 9月21日、2011

[図書](計3件)

1. Yoshida K. Functional role for the c-Abl tyrosine kinase signalling in the DNA damage response. In: Kimura S and Shimizu S (eds), *DNA repair: New Research*. Nova Science Publishers, Inc. pp.133-147 (2012)

2. Yoshida K. Role for PKC $\delta$  on apoptosis in the DNA damage response. In: Clark C. Chen (ed), *Selected Topics in DNA Repair*. InTech. pp.293-304 (2011)

3. Yoshida K. Molecular function of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. in Chapter 12 of *Tumor Suppressors*. Nova Science Publishers, Inc. pp.229-242 (2011)

[その他]

ホームページ等

[http://www.jikei.ac.jp/academic/course/06\\_seikagaku.html](http://www.jikei.ac.jp/academic/course/06_seikagaku.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 清嗣 (YOSHIDA KIYOTSUGU)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 70345312

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし