

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659882

研究課題名(和文) 融合プロテオミクスと組織像の統合解析による転移性口腔癌検出システムの開発

研究課題名(英文) Development of a detection system for metastatic oral cancer by combining integrated proteomics with cancer histology analysis

研究代表者

ウィルソン 政代 (WILSON, MASAYO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員

研究者番号：90271113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は治療前の組織検査により、微小ながん転移も検出できるがん転移検出システムの開発を目的としている。まず、非転移性がん細胞と転移性がん細胞からなるヒトがん組織類似動物モデルを作製し、各がん細胞の転移・発育様式を解析した。次に両がん細胞のタンパク質と遺伝子の総合的解析にて、低酸素時に発現する分子群が転移性がん細胞に特徴的な分子であることが分かった。動物モデルでのこれらの分子の発現様式を経時的に解析した結果、これらの分子の発現様式(局在・発現量)の変化を総合的に判断することにより、がん転移のstageを推測できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a detection system for micro-metastasis and metastatic stages using examination of biopsy. We created an in vivo animal model of heterogeneous human cancer consisting of non-metastatic (NM) and metastatic (M) tongue cancer cells and analyzed the pattern of metastasis and growth of both cancer cell lines. In addition, using integrated differential proteomics and transcriptomics, we identified significant activation of hypoxia-inducible-related signals in M cancer cells versus NM cancer cells. The analysis of the expression pattern of these molecules in an in vivo animal model suggested that we may be able to determine the metastatic stages of cancer by comprehensive examination of changes in the pattern of their expression (localization, expression volume).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：がん 転移 転移性がん細胞マーカー マイクロメタ シグナルネットワーク プロテオミクス マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 転移性がん細胞の有無は患者の予後を大きく左右する。診断技術の進歩により、がんの転移の検出率は非常に向上したものの、転移巣がある程度の大きさにならないと現行の検査ではがん転移を見つけることはできない。分子生物学的解析技術の急速な発展により、網羅的解析が可能になったので、この手法を利用し、目的とする細胞の性格付けを行うことにより、微量ながん転移も検出できると考えられる。

(2) われわれは診断・治療法開発のため、まず、同所性移植法により浸潤・転移能が異なるヒト舌がん細胞株を同一患者様より樹立し、浸潤・転移実験モデル系を確立した。がん組織は非転移性がん細胞や転移性がん細胞など色々な性質をもった heterogeneous (ヘテロ) な細胞集団から成るので、非転移性がん細胞と転移性がん細胞を異なった蛍光でラベルし、混和した細胞集団を同所性移植し、がん組織類似動物モデルを作製した。転移性と非転移性がん細胞間のプロテオーム解析とトランスクリプトーム解析結果を統合した融合プロテオミクスを行い、転移性がん細胞に亢進する分子シグナルネットワークを同定し、その特徴的な分子の上記がん組織類似動物モデルのがん移植舌組織における発現様式と転移の各 stage の詳細な解析により、原発巣の検査にて転移性がん細胞の存在と転移の stage がわかる臨床応用可能な診断法を考案することができ、更に転移性がん細胞マーカーの同定により、転移性がん細胞の治療薬の開発もできると考えた。

2. 研究の目的

(1) がんの原発巣を調べることにより、原発巣における転移性がん細胞の有無ならびに転移の各 stage (転移無し、転移初期：マイクロメタ、転移中期以降：マクロメタ) を正確・低格・簡便に検出するシステムの開発を目的とする。

(2) 目的のために、転移の各 stage に特有な分子 (転移性がん細胞マーカー) を同定し、がん組織類似動物モデルにおける転移性がん細胞マーカー候補分子の発現様式 (局在・発現量) と転移の stage の関係を明らかにし、転移の stage の検出法を考察する。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* がん組織類似動物モデルの作製と頸部リンパ節転移 stage・舌における各がん細胞の発育様式の検討：がん組織類似動物モデルにて、転移性がん細胞と非転移性がん細胞の区別ができるように、各がん細胞を

可視化し (転移性舌がん細胞株 SQUU-B : GFP 発現・緑、非転移性舌がん細胞株 SQUU-A : RFP 発現・赤)、両細胞を混和したヘテロながん細胞集団をヌードマウスの舌に同所性移植し、実体蛍光顕微鏡を用いて、経時的 (移植後 0 日、3 日、7 日、11 日、14 日、18 日、21 日、42 日、50 日) に頸部リンパ節転移の stage および舌移植部位における各がん細胞の発育様式を観察した。また転移性がん細胞および非転移性がん細胞をそれぞれ単独でヌードマウスの舌に同所性移植し、同様の解析を行った。

(2) 転移性がん細胞にて亢進するシグナルネットワークおよび転移性がん細胞マ - カ候補分子の検討：がん組織において転移性がん細胞を検出するために、上記 *in vivo* がん組織類似動物モデルにて使用した転移性がん細胞と非転移性がん細胞の遺伝子とタンパク質の発現の相違を DNA チップ (54675 アレイ)・質量分析法 (iTRAQ 法・LC-MS/MS 解析) にて解析後、われわれが開発したアルゴリズムによって両データを融合させ分子ネットワーク解析を行い、転移性がん細胞にて亢進しているシグナルネットワークおよび転移性がん細胞に特徴的な分子 (転移性がん細胞マーカー候補分子) を検討した。

(3) 転移性がん細胞マーカー候補最重要分子 HIF-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α) のノックダウンによるヘテロな細胞集団の発育様式の変化の検討：転移性がん細胞にて亢進するシグナルネットワークにて最も中心的な分子として、HIF-1 α を同定したので、転移性がん細胞の HIF-1 α をノックダウンした細胞 (SQUU-B-HIF^{KD}) を作製した。HIF-1 α ノックダウンによるヘテロな細胞集団の発育様式の変化の客観的評価向上のため、マトリゲルを使用した三次元培養 (*in vitro* モデル) を行いし、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各がん細胞の局在・占める割合を培養 2 日から 18 日にわたり経時的に観察した。また、*in vivo* 動物モデルを用いて、転移性がん細胞の HIF-1 α ノックダウンによる転移能の変化を検討した。

(4) ヘテロな細胞集団における活性化 HIF-1 α の発現様式の検討：転移性がん細胞に HIF レスponse エlement を有する GFP 発現レポータージーンを導入した細胞を作成し、転移性がん細胞の活性化 HIF-1 α の発現を可視化した。この細胞を含むヘテロな細胞集団 (*in vitro* 三次元培養法および *in vivo* 動物モデル) 内の転移性がん細胞における活性化 HIF-1 α の局在を共焦点レーザー顕微鏡あるいは実体蛍光顕微鏡を用いて解析し、転移

stage との関係を検討した。

(5) **転移性がん細胞マーカー候補分子の *in vivo* 動物モデルにおける発現検討**: がんの原発巣を調べることにより、原発巣における転移性がん細胞の有無ならび転移の各 stage を検出するシステムを考案するため、各がん細胞の *in vitro* および *in vivo* がん組織類似動物モデルの舌組織において、融合プロテオミクスにて選定した転移性がん細胞マーカー候補分子 (MIF、HIF-1 α 、Nogo、E-Cadherin、Biglycan、TG2、CD44、Cytokeratin14、プロテイン X) の発現様式の経時的变化を免疫染色法にて解析し、発現様式と転移 stage との関係を検討した。

4. 研究成果

(1) **初期転移時原発巣の腫瘍中心部では非転移性がん細胞の減少が出現する**: *in vivo* がん組織類似動物モデルにおけるヘテロながん細胞集団の発育様式を経時的に調べると、非転移性がん細胞と転移性がん細胞を混合した細胞集団移植後 7 日目までは、非転移性がん細胞と転移性がん細胞はほぼ同じ範囲で存在していた。非転移性がん細胞は 11 日目では腫瘍中心部で減少し始め腫瘍の外側に進展、14 日では腫瘍の中心部での減少が進み、さらに 18 日以降では中心部ではほとんど検出されず、辺縁部に限局していた。転移性がん細胞は腫瘍全体に見られたが、移植後 14 日以降腫瘍の増大が著明となり、優勢発育が認められた。頸部リンパ節転移は、移植後 11 日以降より転移性がん細胞のみ認められた。マウスは移植後 50 日前後で死亡したが、死亡時においても、リンパ節の節外浸潤は認められなかったことより、このモデル系では、非転移・転移初期・転移中期以降の 3 stage が診断可能であった。転移の有無、片側・両側転移、転移巣の大きさより、未転移 (7 日以前)、転移初期マイクロメタ (11 日~18 日)、転移中期 (21 日以降) と判断できた。舌組織での各がん細胞の発育様式と転移の stage との関係を検討すると、非転移性がん細胞が腫瘍の中心部で減少し始めると転移初期、さらに非転移性がん細胞の減少が進み辺縁部に限局した状態は、転移中期を示唆す可能性が考えられた。

(2) **HIF シグナル伝達系の亢進は転移性がん細胞に特有なネットワークである**: ヘテロながん細胞集団の発育機構を明らかにするために、各がん細胞のプロテオーム解析とトランスクリプトーム解析を行い、そのデータを統合した融合プロテオミクス法を行ったところ、転移性がん細胞に発現が高い HIF-1 α の上流分子として、MIF、Biglycan、Nogo、

TMP21 を検出し、下流分子として、TG2、E-Cadherin、サイトケラチン 8、18、19、CatheisinD を認め、転移性がん細胞に高発現を認めた 41 分子中 30 分子が HIF のシグナルネットワーク系に含まれることがわかった。これらのことから、HIF を中心としたシグナル伝達系は、転移性がん細胞を最も特徴づけるものであると考えられた。両細胞の HIF-1 α の発現をウェスタンブロッティングと蛍光染色法にて検討すると、有酸素状態では、転移性がん細胞に若干の HIF-1 α の発現を認めるが、疑似的低酸素状態では、転移性がん細胞のみ濃度依存性に活性型 HIF-1 α が核に強く発現し、転写因子として機能しており、HIF-1 α は転移性がん細胞に特徴的な分子であると考えられた。

(3) **ヘテロながん細胞集団における転移性がん細胞の優勢発育と転移は HIF-1 α に起因する**: ヘテロな細胞集団の発育様式・転移と HIF-1 α の関係を明らかにするため、*in vitro* 三次元培養システムを樹立し、共焦点レーザー顕微鏡にて各細胞の動態を経時的に観察したところ、非転移性がん細胞は徐々に減少し辺縁部に押しやられ、*in vivo* 動物モデルの結果と一致していた。そこで、転移性がん細胞の HIF-1 α をノックダウンした細胞 (SQUU-B-HIF^{KD}) を非転移性がん細胞と混合培養し三次元解析を行った結果、非転移性がん細胞は減少しなかったことから、転移性がん細胞に HIF-1 α が発現することにより、転移性がん細胞の独占的発育と、非転移性がん細胞の減少および辺縁部への後退が起こっているのではないかと考えた。*in vivo* 動物モデルにて SQUU-B-HIF^{KD} は頸部リンパ節転移しなかったことより、転移は HIF-1 α によると考えられた。

(4) **転移性がん細胞は HIF-1 α が発現すると E-Cadherin の発現が減弱する**: 転移性がん細胞に特有なネットワークである HIF シグナル伝達系を詳細に検討すると、転移との逆相関が報告されている E-Cadherin の発現が転移性がん細胞に高かった。これ現象を理解するために、*in vitro* および *in vivo* 動物モデルの舌組織において免疫染色法を行い、E-Cadherin と HIF-1 α の発現の関係について検討した。非転移性がん細胞・転移性がん細胞・HIF-1 α のノックダウン細胞 (SQUU-B-HIF^{KD}) の *in vitro* での E-Cadherin の発現は有酸素状態で均一に発現していたが、疑似的低酸素状態や細胞が重層すると、転移性がん細胞に HIF-1 α の発現を認め、HIF-1 α を発現している細胞間の E-Cadherin の発現が減弱あるいは消失していた。また、各癌細胞を単独移植した *in vivo* 動物モデル

の舌組織では、*in vitro*の結果と同様に、非転移性がん細胞・SQUU-B-HIF^{KD}のE-Cadherinは均一に発現し、HIF-1 α は発現していなかった。転移stageとの関係を見ると、転移性がん細胞では、未転移時E-Cadherinは均一に発現しHIF-1 α は発現していなかったが、早期転移以降では、HIF-1 α の発現を認め、HIF-1 α を発現している細胞間のE-Cadherinの発現が減弱あるいは消失していた。転移のstageが進むにつれて、HIF-1 α 発現細胞とE-Cadherin発現減弱あるいは消失細胞が増大していた。転移性がん細胞は細胞が密集してくるとHIF-1 α が発現し、HIF-1 α 発現細胞間のE-Cadherinの発現が減弱あるいは消失するため、細胞間の接着が緩くなり動き易くなると考えられた。転移が成立しているかどうかはHIF-1 α の発現とHIF-1 α 発現細胞間のE-Cadherinの発現の減弱・消失が1つの基準になると考えられた。

(5)HIF-1 α の発現領域は中心部から外側に変動する:*in vitro*三次元培養および*in vivo*動物モデルのヘテロな細胞集団における転移性がん細胞のHIF-1 α の発現領域を調べると、活性型HIF-1 α は初めは中心部に若干発現し、その後中心部よりやや外側領域認められた。*in vivo*動物モデルの舌組織における活性型HIF-1 α の発現領域と転移のstageとの関係を検討すると、未転移時には活性型HIF-1 α の発現は認められないが、早期転移時には中心部に若干発現し、転移中期時中心より外側領域に発現が見られ、以後その部位を中心に発現領域の増大が見られことから、HIF-1 α の発現および局在領域により転移のstageを推測できる可能性が示唆された。

(6)転移性がん細胞マーカー候補分子の発現様式より転移stageは予測できる:*in vivo*がん組織類似動物モデルの舌組織における転移性がん細胞マーカー候補分子(MIF、HIF-1 α 、Nogo、E-Cadherin、Biglycan、TG2、CD44、Cytokeratin14、プロテインX)の発現様式(経時的・局在様式・組織像)と転移stageとの関係を検討したところ、転移のstageが進むにつれ、発現が増大する分子群、均一な発現から不均一な発現になる分子群、不均一な発現をするが発現の領域が変化する分子群に分けられ、これらの3分子群の腫瘍や血管内皮細胞における発現量と腫瘍内での局在様式の変化が頸部リンパ節転移のstageの変化と関与している可能性が示唆された。実用化に向けては、臨床検体でのこれらの分子群の発現様式と転移stageとの関係を調べ、このシステムの有用性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Masayo Wilson-Morifuji, Akiko Nanbu-Niibori, Daiki Kobayashi, Norie Araki, Integrated proteomics for the study of metastatic human tongue cancer development in a heterogeneous microenvironment. HUP0 12th Annual World Congress, 2014年09月14日~09月18日, 横浜 パシフィコ横浜

Masayo Wilson-Morifuji, Akiko Nanbu-Niibori, Daiki Kobayashi, Norie Araki, Heterogeneous oral cancer development by competition via HIF-1 alpha signal regulation. 第72日本癌学会学術総会、2013年10月03日~2013年10月05日、横浜 パシフィコ横浜

Masayo Wilson-Morifuji, Akiko Nanbu-Niibori, Daiki Kobayashi, Souhei Mizuguchi, Norie Araki, HIF-1 alpha signals activated in the heterogeneous oral cancer model promote the metastatic cancer development. 第71日本癌学会学術総会、2012年09月19日~2012年09月21日、札幌 トロント札幌

Masayo Wilson-Morifuji, Akiko Nanbu-Niibori, Daiki Kobayashi, Norie Araki, Molecular mechanism of metastatic tumor human tongue cancer via HIF1 signal transduction. 第70日本癌学会学術総会、2011年10月03日~2011年10月05日、名古屋 名古屋国際会議場

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 統合プロテオーム解析用データ群の生成方法ならびに同生成方法にて生成した統合プロテオーム解析用データ群を用いる統合プロテオーム解析方法、およびそれらを用いた原因物質同定方法

発明者: 荒木令江、ウィルソン森藤政代、他3名

権利者: 国立法人熊本大学

種類: 特許

番号: US-2013-0023574-A1

出願年月日: 2013年01月24日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1)研究代表者

ウィルソン 政代 (WILSON Masayo)

熊本大学・大学院生命科学研究部・

研究員

研究者番号: 90271113

(2)研究分担者

荒木 令江 (ARAKI Norie)
熊本大学・大学院生命科学研究部・
准教授
研究者番号：80253722

(3)連携研究者

入江 厚 (IRIE Atushi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・
講師
研究者番号：30250343

田代 康介 (TASHIRO Kosuke)
九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：00192170