

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 10 日現在

機関番号：83802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701092

研究課題名(和文) マルチオミクス解析を利用したがん幹細胞特異的スプライシングバリエント探索法の開発

研究課題名(英文) Novel multi-omics approach for discovery of splicing variants in cancer stem cells

研究代表者

畠山 慶一 (Hatakeyama, Keiichi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20564157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本申請は、マルチオミクス解析を利用してがん幹細胞特異的なバイオマーカーの新規探索技術を開発することを目的としている。本研究では、主に転写物を対象としたトランスクリプトミクスとタンパク質を対象としたプロテオミクスを主体とした解析を行っている。この解析の結果、がん特異的な異常な転写物(スプライスバリエント)とそのバリエントから翻訳された異常なタンパク質(プロテインアイソフォーム)を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：This research aim is development of novel multi-omics approach for discovery of splicing variants in cancer stem cells. Our approach is based on transcriptomics and proteomics. Using the multi-omics analysis, we identified novel cancer-specific aberrant transcripts (splice variants) and variant-derived proteins (protein isoforms) in cancer cells and patients with cancer.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：癌 バイオマーカー オミクス がん幹細胞 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞(cancer stem cell)またはがん源細胞(cancer-initiating cell)と呼ばれる細胞集団の研究が盛んに行われている。この細胞は、がん細胞中に数%またはそれ以下の割合で含まれており、幹細胞様の挙動を示したり、高い薬剤耐性能を有したりするなど、通常のがん細胞には見られない特徴を持つ。そのため、がん診断や治療または薬剤開発における新たなターゲットとして注目を集めている(Gupta et al. *Cell*. 2009)。その中でもがん幹細胞と患者の予後不良の関連が疑われていることから、がん幹細胞特異的なバイオマーカーは、予後診断に利用できると考えられている。

しかしながら、がん幹細胞は2000年以降に様々ながん種で確認されはじめたが、未解明の部分が多い。その中にごん幹細胞マーカーに関する議論がある。例えば、CD133が大腸がんのごん幹細胞マーカーとして有用であることが示されたが(Ricci-Vitiani et al. *Nature*. 2007)、それだけではがん幹細胞マーカーとしては不十分だと指摘する報告も少なくない。マーカーの多くは表面抗原であり、がん幹細胞を同定できる指標は少ないのが現状である。そのため、新たながん幹細胞マーカーの同定は、がん幹細胞研究において極めて重要であると考えられる。

一方で近年、選択的スプライシングの一部とがんとの関連性が指摘されるようになってきた。また、選択的スプライシングを制御するスプライシングファクターSF/ASFの過剰発現が腫瘍抑制遺伝子 *BIN1* の選択的スプライシング異常を引き起こすという報告(Karni et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007)もされている。このことから、選択的スプライシングとそれに関わる経路が、がん発生のメカニズムに関与している可能性は十分に考えられる。しかしながら、がん幹細胞におけるスプライシング異常に関する報告はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、がん幹細胞特異的なスプライシングバリエーション探索法の開発を行う。マーカー候補の抽出のために、典型的なマルチオミクス解析を利用した探索アプローチと、スプライシングバリエーション探索に特化した新規探索アプローチの双方を試みる。これら探索アプローチで見つかったスプライシングバリエーションの遺伝子及びタンパク質レベルでの発現の確認と、がん幹細胞マーカーとしての有効性を検証する。また、このがん幹細胞マーカーが予後診断のマーカーとして利用可能かどうかとも評価する。

3. 研究の方法

(1) はじめに、プロテオミクス解析の最適化を行うために、細胞から抽出されるタンパク質サンプルの前処理方法の検討を行った。

次にがん細胞特異的な遺伝子及びタンパク質の探索を可能にするマルチオミクス解析手法の開発を試みた。

(2) 開発した新規マルチオミクス解析手法を応用して、がん幹細胞特異的な分子の探索を試みた。

(3) 同定されてきた候補分子の mRNA の構造とそこから翻訳されるプロテインアイソフォームの構造予測を試みた。

4. 研究成果

(1) プロテオーム解析において、LC-MS 測定前の前処理がタンパク質の同定数に大きく関わると考えられている。そこでタンパク質の同定効率の向上を目指して、細胞から抽出されたタンパク質の分画条件の検討を行なった。逆相 HPLC と等電点電気泳動分離装置を用いてタンパク質を分離することで、LC-MS によるタンパク質の同定効率を向上できることが示された。これにより、がん幹細胞由来のタンパク質を効率よく同定できる可能性が示唆された。さらに我々は、この抽出方法の一部を応用して、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織の賦活化時に特定のタンパク質が漏れ出している可能性を明らかにした(雑誌論文)。この成果は、FFPE 組織からもプロテオーム解析が可能であることを示している。次に、がん細胞特異的な遺伝子及びタンパク質の探索を可能にするマルチオミクス解析手法の開発を行なった。エクソンマイクロアレイと LC-MS から得られたデータを用いて、新規なスプライシングバリエーションとそのプロテインアイソフォームの探索が可能なるシステムを構築した(図 1)。

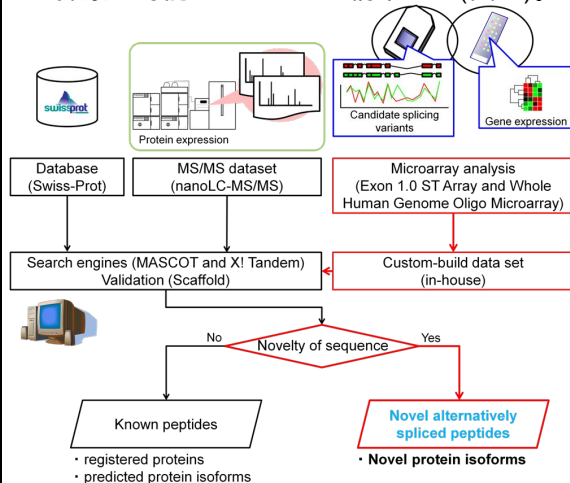


図 1. 新規マルチオミクス解析の流れ. エクソンマイクロアレイを用いて、スプライシングバリエーションを産生する候補分子を抽出. 候補分子の中から、DNA シーケンシングを用いてスプライシングバリエーションを同定. このバリエーションの配列情報を基に、翻訳されるプロテインアイソフォームのアミノ酸配列をデータベースに組み込む. このデータベースを用いて、MS/MS 解析を行う. これにより、従来データベースに登録されていないタンパク質の同定が可能になる.

この有効性を評価するために、胃癌細胞株 MKN45 と MKN45P の細胞間比較を行なったところ、新規スプライシングバリエーションとそのプロテインアイソフォームを同定することができた(雑誌論文)。

(2) 開発した解析法を応用して、大腸がん細胞株 SW620 に含まれる CD133 陽性細胞のプロテオーム解析を行った(図 2)。その結果、CD133 が細胞表面に高発現している CD133^{High} 集団に特異的に発現している 43 タンパク質が同定された。これらタンパク質が、がん幹細胞マーカーの候補となりえる。しかし、表面抗原 CD133 陽性細胞の集団は、あくまでがん幹細胞が濃縮された細胞の集まりであるため、さらに詳細を調べる必要性がある。

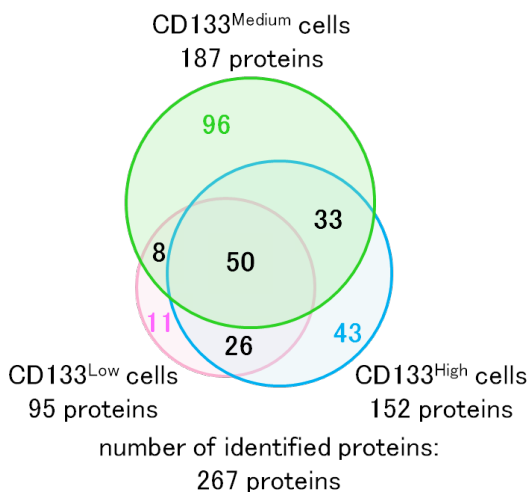


図 2. 大腸がん細胞株 SW620 に含まれる CD133 陽性細胞のプロテオーム解析。セルソータを用いて CD133^{High}, CD133^{Medium}, CD133^{Low} の集団を分離。それぞれの集団から同定されたタンパク質をベン図にて表示した。

(3) 開発した解析法を応用して同定されてきたスプライスバリエーションの1つの、がん特異性を調べた(図 3)。この野生型の遺伝子 (*ARHGDI1B*) は多くの臓器で発現しているが、スプライスバリエーションは多くのがん細胞と、胎盤のみに発現していた(雑誌論文)。我々が同定したこのスプライスバリエーションは、がん特異性がきわめて高いと考えられる。さらに我々は、腫瘍マーカーとして古くから知られているがん胎児性抗原(CEA)のスプライスバリエーションとそこから翻訳されるプロテインアイソフォームを同定した(図 4)。これらアイソフォームは、異なる原発臓器由来のがん細胞株で分泌パターンが異なることをみいだした。この結果は、臓器特異性が低いといわれていた CEA でもバリエーションには特異性がある可能性を示唆していた(雑誌論文)。本研究において、ここで紹介した他にも、いくつかの新規バリエーションを同定している。患者の血中に分泌しているタイプや、血中循環腫瘍細胞で発現しているバリエーションなどが見つけてきている。しかしながら、新たながん幹細胞マーカーになりえる候補

分子の同定までには至らなかった。それでも、本研究より開発された技術によって、バイオマーカーのポテンシャルをもついくつかの新規分子が同定されてきたことは、大きな成果であったと考えられる。

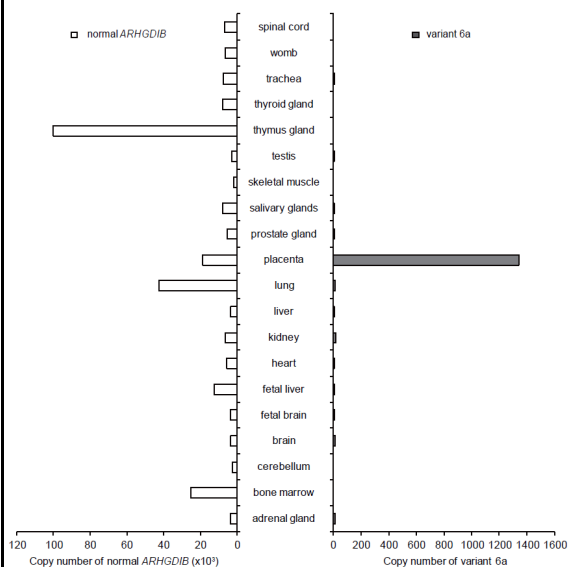


図 3. *ARHGDI1B* 遺伝子のスプライスバリエーションの正常臓器における発現。左パネルは、野生型の発現量を示す。右パネルは、スプライスバリエーションの発現量。スプライスバリエーションは胎盤のみに過剰発現している。

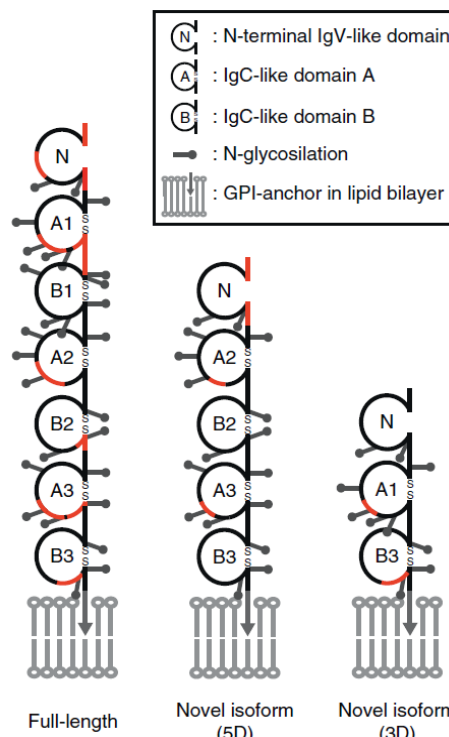


図 4. CEA 新たに同定されたプロテインアイソフォームの構造、左から完全長の野生型、5つのドメインからなる 5D アイソフォーム、3ドメインからなる 3D アイソフォーム。赤線は、MS/MS 解析で同定されたペプチド断片の位置を表す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Keiichi Hatakeyama, Kanako Wakabayashi-Nakao, Keiichi Ohshima, Naoki Sakura, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. *BMC Research Notes*, 2013, 6, 381-90. 査読有, DOI: 10.1186/1756-0500-6-381

Keiichi Hatakeyama, Yorikane Fukuda, Keiichi Ohshima, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Placenta-specific novel splice variants of Rho GDP dissociation inhibitor beta are highly expressed in cancerous cells. *BMC Research Notes*, 2012, 5, 666-73. 査読有, DOI: 10.1186/1756-0500-5-666

Keiichi Hatakeyama, Kanako Wakabayashi-Nakao, Yutaka Aoki, Shun-ichiro Ogura, Ken Yamaguchi, Takashi Nakajima, Taka-Aki Sato, Tohru Mochizuki and Isamu Hayashi, Novel protein extraction approach using micro-sized chamber for evaluation of proteins eluted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Proteome Science*, 2012, 10, 19-25. 査読有, DOI: 10.1186/1477-5956-10-19

Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Yorikane Fukuda, Shun-ichiro Ogura, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Identification of a novel protein isoform derived from cancer-related splicing variants using combined analysis of transcriptome and proteome. *Proteomics*, 2011, 11, 2275-82. 査読有, DOI:10.1002/pmic.201100016

[学会発表](計10件)

Masanori Terashima, Keiichi Hatakeyama, Yushi Yamakawa, Norihiko Sugisawa, Yuichiro Miki, Rie Makuuchi, Hironobu Goto, Masanori Tokunaga, Yutaka Tanizawa, Etsuro Bando, Taiichi Kawamura, Keiichi Ohshima and Toru Mochizuki, Survivin expression in circulating tumor cells of patients with gastric cancer. 2014 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, 2014, Jan., San Francisco, CA.

Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Kanako Wakabayashi-Nakao, Yutaka Tanizawa, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Identification of novel protein isoforms in secretome using combined analysis of microarray and mass spectrometry. 第72回日本癌学会学術総会, 2013, Oct., 神奈川県, パシフィコ横浜.

Kanako Nakao, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Identification of the novel CEACAM5 protein isoforms in gastrointestinal cancer cells. 第72回日本癌学会学術総会, 2013, Oct., 神奈川県, パシフィコ横浜.

山川 雄士, 谷澤 豊, 畠山 慶一, 坂東悦郎, 川村 泰一, 徳永 正則, 絹笠祐介, 上坂 克彦, 金本 秀行, 望月 徹, 寺島 雅典, 胃癌における新規スプライシングバリエーションの臨床病理学的検討. 第84回日本胃癌学会総会, 2012, Feb., 大阪府, 大阪国際会議場.

Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Kanako Wakabayashi-Nakao, Yutaka Tanizawa, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Quantification of splicing variant expression levels in peripheral blood of patients with gastric cancer. 第71回日本癌学会学術総会, 2012, Sep., 北海道, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館.

大島 啓一, 畠山 慶一, 中尾 香菜子, 寺島 雅典, 山口 建, 望月 徹, 癌細胞から放出されるエクソソーム中のプロテオーム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 2012, Sep., 北海道, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館.

中尾 香菜子, 畠山 慶一, 大島 啓一, 山口 建, 望月 徹, CEACAM4 の甲状腺髄様癌における特異的発現. 第71回日本癌学会学術総会, 2012, Sep., 北海道, ロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館.

Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Kanako Wakabayashi-Nakao, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Identification of a Novel Protein Isoform Derived from Cancer-related Splicing Variants Using a Proteomics Approach. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, Oct., 愛知県, 名古屋国際会議場.

Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Kanako Wakabayashi-Nakao, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki, Novel Proteomic Approach

for Identification of Protein Isoform Derived from Cancer-related Splicing Variants. がん若手研究者ワークショップ 文部科学省科学研究費新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」, 2011, Sep., 長野県, アートランドホテル蓼科.

皇山 慶一, 大島 啓一, 中尾 香菜子, 寺島 雅典, 山口 建, 望月 徹, がん関連スプライシングバリエント由来の新規プロテインアイソフォームの同定に向けた新規プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2011 年大会, 2011, Jul., 新潟県, 朱鷺メッセ.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: C E A C A M 5 遺伝子のスプライシングバリエント

発明者: 中尾 香菜子, 望月 徹, 皇山 慶一

権利者: 静岡県

種類: 特許

番号: 特願 2013-35758

出願年月日: 2013 年 2 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片中の蛋白質の賦活化処理システム及び賦活化処理方法

発明者: 青木 豊, 海野 ゆかり, 佐藤 孝明, 林 勇, 皇山 慶一, 小倉 俊一郎

権利者: 静岡県, 島津製作所

種類: 特許

番号: 特願 2011-117334

出願年月日: 2011 年 5 月 25 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: 甲状腺髄様がん判定方法

発明者: 中尾 香菜子, 望月 徹, 皇山 慶一

権利者: 静岡県

種類: 特許

番号: 特許公開 2013-255485

取得年月日: 2013 年 12 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: スプライスバリエント

発明者: 望月 徹, 皇山 慶一

権利者: 静岡県

種類: 特許

番号: 特許公開 2013-39111

取得年月日: 2013 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

皇山 慶一 (HATAKEYAMA, Keiichi)

研究者番号: 20564157