

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 11 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23790216

 研究課題名（和文） 画期的な転移診断・抑制法の開発を目指した
大腸がん転移関連蛋白質の探索と評価

 研究課題名（英文） Search for metastasis-related proteins in colorectal cancer
by proteome analysis

研究代表者：長野 一也（NAGANO KAZUYA）

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：40548301

研究成果の概要（和文）：

本研究では、がんの予後に重要な「転移」の分子機構の解明と診断・抑制法の開発に資する転移関連蛋白質の同定を目的とする。

本観点から研究代表者は、がんの中でも死亡率が上昇している大腸がんに着目したうえで、高確度に目的蛋白質を見いだすべく、同一患者の原発巣由来の SW480 と転移巣由来の SW620 細胞を用い、SW620 で発現変動している候補蛋白質を数多く同定した。この中から転移に関連する蛋白質を見いだすため、これら蛋白質の大腸がん組織での発現分布と各症例が有する臨床情報との相関を解析した。その結果、Rho GDP-dissociation inhibitor (RhoGDI) の発現割合は、大腸壁の深達度の進行とリンパ節転移の発生に伴って有意に上昇することが示された。そこで、遠隔転移との関連を検証するため、代表的な転移臓器である肝臓に高転移性の細胞株を独自に樹立し、RhoGDI の蛋白質発現量を比較したところ、肝転移性が高い細胞株ほど、発現量が高くなる傾向が認められた。

本知見が、腫瘍生物学の進展や創薬開発の一助になることを期待している。

研究成果の概要（英文）：

Since metastasis is one of the most important prognostic factors in colorectal cancer, development of novel diagnostic and preventive methods for metastasis is highly desirable. However, the molecular mechanism of the metastatic phenotype has not been well elucidated. In this regard, we searched for metastasis-related proteins in colorectal cancer by analyzing the differential expression of proteins between primary and metastasis focus-derived colorectal tumor cells using a proteomics-based study. In order to validate these candidate proteins, we analyzed the expression profile of these proteins in tissue microarray. As a result, Rho GDP-dissociation inhibitor (Rho GDI) was identified as a metastasis-related protein in colon cancer patients. Consequently, Rho GDI may be useful for a diagnostic or preventive target against colon cancer metastasis.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

医歯薬学

科研費の分科・細目：

薬学・医療系薬学

キーワード：

医療薬剤学・プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

近年、CT・MRI・PET といった医療診断機器の高性能化により、がん病巣の高感度な検出が可能となっている。また、Herceptin (抗 HER2 抗体) や Avastin (抗 VEGF 抗体)、Rituxan (抗 CD20 抗体) をはじめとする分子標的治療薬の台頭によって、がん細胞選択性の高い治療法も実現しつつある。しかし、がんは未だ先進国において死因の第一位であり、社会の高齢化も伴って、その死亡者数は増加の一途をたどり続けている。この大きな要因の 1 つは、「転移」にある。がんの中でも、転移性が低く、原発巣に留まる性質のがんであれば、外科的手術などによる効果的な治療が可能であるものの、転移性の高いがんの場合には、外科的治療が困難な症例が多く、また原発巣が切除できても往々にして再発してしまう。このように、がんを完治し、死亡率低下を達成するためには、「転移」の克服が不可欠である。

がん転移克服のためには、①転移の分子メカニズムを明らかとし、②転移を的確に予測・診断すること、③転移を抑制しうる治療薬などを開発することが必要である。これまでも上記を目指して精力的に研究が進められてきた。1973 年に Fidler らが低転移性のマウス黒色腫細胞 B16 から高転移性亜株を樹立し、転移の動物実験モデルを確立したことにより、がん転移研究は大きく進展した。1986 年には Liotta により、転移浸潤は、がん細胞と基底膜の接着、基底膜構成成分の分解、がん細胞の運動、の 3 段階により成り立つという、いわゆる「three Step Theory」が提唱された。さらに最近では、上皮がんが転移を起こす過程には、間葉系細胞様の性質を獲得する形質転換を生じることにより、がん細胞同士の接着性低下や移動性の亢進、がん組織からの離脱促進が起こっているという「上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transformation ; EMT)」という新たな概念が提唱されている。このようにがん転移に関する研究は進展してきたものの、分子病態メカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。

このような背景のもと、近年、蛋白質の網羅的同定・解析を行いうるプロテオミクスによりバイオマーカーを探索し、疾患の分子メカニズムの解明や診断・治療法の開発に展開しようとするアプローチに大きな期待が寄せられている。特に、健常状態と比較して疾患状態で発現挙動が異なる、蛋白質を網羅的に解析しようとする疾患プロテオミクス研究が注目され、がんのバイオマーカー探索も精力的に行われている。しかし、疾患プロテオミクスによる探索研究では、個人差や人種差などの変動因子が多いことなどが一因とな

って、対照サンプルと比較して疾患サンプルで発現変動している数多くの候補蛋白質の中から、目的とする疾患の発症や悪化に関わる蛋白質を見いだすことが困難な現状にあり、転移の分子メカニズムの解明や、転移の高確度な予測診断法・転移抑制法の開発など、期待された研究成果は国内外を問わず、殆ど得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、がんの重要な予後決定因子である「転移」の分子メカニズムの解明と転移診断法・転移抑制法の開発に資する転移関連蛋白質の同定を目的とする。対象としては、女性のがん死亡率が第一位であり、食の欧米化も相まって罹患者数が増大し続けている大腸がんに着目した。また、高確度に転移関連マーカー蛋白質を探索するために、同一患者から樹立された転移性の異なる大腸がん細胞株 (原発巣由来と転移巣由来) に着目し、これら細胞間で発現変動している蛋白質の中から転移に関連する分子を見出したうえで、それらの機能解析を試みることで目的の達成を図る。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト大腸がん細胞株 SW480 と SW620 は、ATCC より購入し、10%FCS を含有した Leibovitz' s Medium (Wako) で培養した。いずれの細胞も継代培養をして、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。

脾臓注入肝転移試験

BALB/c nude マウス (5 週齢、雌) を日本エスエルシーから購入後、1 週間 SPF 環境下で飼育した。ネンブタール (大日本住友製薬) を腹腔内に注射することで麻酔し、腹部を切開して、脾臓を露出させた。2 × 10⁷ cells/ml に調整した SW480 と SW620 をマウス 1 匹あたり 50 μl 脾臓内に注射後、閉腹した。8 週間後、開腹して肝臓への転移の有無を確認した。

2 次元ディフアレンシャル電気泳動 (2D-DIGE) 解析

SW480 と SW620 を Lysis Buffer (7 M Urea、2 M Thiourea、4% CHAPS、10 mM Tris-HCl (pH 8.5)) で溶解し、2D-Clean-up Kit (GEhealthcare) にて、蛋白質を精製した。精製蛋白質を 2D Quant Kit (GEhealthcare) により濃度を測定し、各 25 μg ずつを等量混合することで Internal Standard Sample を作製した。これと SW480、SW620 から抽出した蛋白質 50 μg ずつを、それぞれ 400 pmol の蛍光試薬 cy2、cy3、cy5 (GEhealthcare)

でラベルした。30 分後、10 mM Lysine を加えることでラベル化反応を停止させた。標識したサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT, 2% Pharmalyte (GEhealthcare), 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS) でメスアップした。また、質量分析 (MS) のためのピックゲル用として、蛍光標識していないサンプルも同様に調製した。サンプルを IPG-gel (pH 4-7) ストリップ (GEhealthcare) に添加し、10 時間膨張させた後、等電点電気泳動を 15 時間行った。泳動後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8), 6 M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB, 10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8), 6 M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB, 25 mg/ml Iodoacetamide) に浸し、15 分間ずつ平衡化した。SDS-PAGE 用ゲルに IPG-gel ストリップをセットし、17 時間泳動した。蛍光画像を取り込み、DeCyder (GEhealthcare) により発現変動を解析した。また、ピックゲルは Deep Purple Total Protein Stain (GEhealthcare) を用いて染色し、発現変動スポットの切り出しには Ettan Spot Picker (GEhealthcare) を使用した。

MS 解析

発現変動 spot を切り出したゲル片に脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate/50%アセトニトリル) を加え、室温で 10 分間振盪した。脱色液を除き、200 μ l のアセトニトリル中で 10 分間振盪後、減圧遠心器により脱水した。このゲル片に Trypsin 溶液 (20 μ l/ml Trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) をしみこませ、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。これに抽出液 (50 μ l の 50%アセトニトリル/ 0.1%ギ酸溶液) を加え、30 分間振盪して回収した。この操作をあと 2 回 (2 回目は 50 μ l の 80%アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液、3 回目は 50 μ l の 100%アセトニトリルで抽出) 繰り返すことで消化ペプチドを抽出した。ペプチド抽出液を減圧遠心器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) で精製した。サンプル溶液 2 μ l を超高分解能飛行時間型質量分析計 (LC-TOF/MS, maXis, BRUKER DALTONICS) により質量分析を行った。蛋白質の同定には、メチオニン残基の酸化、Iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮し、Mascot search により swiss prot のデータバンクをもとに解析した。

組織マイクロアレイ (TMA) の免疫染色

Advanced colon cancer tissue array (C0807, US Biomax) を 60°C で 2 時間加温し、キシレンに 3 度浸すことでパラフィンを溶解・除去した。次いで、無水エタノール、90%エタノール、75%エタノールに順次浸すことで親水

化した。抗原を賦活化するために、DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO) 中で、125°C で 30 秒、90°C で 10 秒処理した。以降の免疫染色の一連の操作には DAKO AutoStainer (DAKO) を使用した。始めに、DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) を添加することで、各組織の内因性ペルオキシダーゼを除去した。次いで、10% BSA を 30 分間静置することでブロッキングした。下記に示した抗体を Dako REAL Antibody Diluent (DAKO) で至適濃度に希釈し、室温で 30 分間反応させた。wash buffer (DAKO) で 2 回洗浄後、ENVISION+ System Labelled polymer-HRP を添加し、30 分間静置した。wash buffer (DAKO) で 2 回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO) を用いて発色させた。

使用した 1 次抗体を、以下に示す。

Rabbit anti-hPRDX6 polyclonal Ab. (ATLAS)、Rabbit anti-h14-3-3 zeta polyclonal Ab. (Ab-58) (Ab FRONTIER)、Mouse anti-hRho GDI monoclonal Ab. (santa cruz biotechnology)

組織マイクロアレイ解析

各抗原の発現は、各組織中のがん細胞での発現割合を 2 段階 (50%以下の発現を 1、50%以上の発現を 2)、発現強度を 3 段階でスコアリングし、その合計が 2 以下で陰性、3 以上で陽性と判定した。各抗原の発現分布と臨床情報との統計解析は、StatView を利用して、Mann Whitney U test により評価した。

がん組織からの高転移性細胞亜株の樹立

脾臓注入肝転移試験において、SW620 投与群の肝転移巣を無菌的に取り出し、脂肪組織や結合組織を除去後、組織を小片に刻んだ。これを 0.25% trypsin 含有 PBS に入れ、15 分間室温で攪拌後、溶液を回収した。この操作を 3 回繰り返し、セルストレーナー (Millipore) を用いて組織残渣を除去した。遠心分離後、10% FCS を含有した Leibovitz' s medium (WAKO) で再懸濁し培養した。

Western blotting

SW480 と SW620、高転移性細胞亜株として樹立した SW620/ok1 と SW620/ok2 を可溶化した。各抽出蛋白質試料を Laemmli Sample Buffer (Bio-rad laboratories) と等量混合し、終濃度 5%となるように 2-mercaptoethanol を添加後、95°C で 5 分間加熱処理した。各サンプルを、10% e-PAGEL (アトー) に添加し、1 時間電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (Millipore) に転写し、4% Block Ace (DS ファーマバイオメディカル) を添加して 4°C、over night で振盪することでブロッキングした。0.4% Block Ace で希釈した Rho GDI に対する抗体を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 2 時間反応させた。

0.05% PBST (0.05% Tween 20 を含む PBS) で5回洗浄後、0.4% Block Ace で希釈した Rabbit anti-mouse IgG HRP Ab. (SIGMA) を添加し、振盪しながら室温で2時間反応させた。0.05%PBST で5回洗浄後、PVDF膜をECL plus Western Blotting Detection System (GEhealthcare) で処理し、発光像をLAS-3000 (富士フイルム) によって撮影した。

4. 研究成果

転移関連蛋白質を効率よく同定するために、同一患者由来の大腸がん原発巣由来細胞株 (SW480) と転移巣由来細胞株 (SW620) に着もした。まず、これら細胞の転移性を検証するため、大腸がんの主要な転移臓器である肝臓への転移性を、脾臓注入肝転移モデルにて比較した。その結果、転移症例数・転移コロニー数ともに、原発巣由来のSW480に比べて転移巣由来のSW620で多く、大腸がん転移関連蛋白質を探索するためのソースとして有用な細胞セットであることが示唆された。そこで次に、SW480に比較してSW620で発現変動している転移関連蛋白質の候補を探索するため、2次元ディフレンシャル電気泳動解析を実施した。両細胞を可溶化し、各細胞由来蛋白質を異なる蛍光色素Cy3とCy5でラベルした。混合後、等電点と分子量の違いによって蛋白質を2次元に分離し、各細胞に発現する蛋白質量を蛍光強度の違いから比較解析した。さらにSW480に比べてSW620で発現変動していたスポットは、ゲルからピックし、質量分析によって蛋白質同定を試みた。その結果、1.5倍以上発現変動していた8種類の蛋白質を見出すと共に、それら全てを同定することに成功した。

そこで、同定された候補蛋白質の中から転移に関連する蛋白質を見いだすため、特に変動率の大きかった Rho GDP dissociation inhibitor (RhoGDI) 【発現変動率：1.90】、Peroxiredoxin-6 【発現変動率：1.86】、14-3-3 zeta/delta 【発現変動率：1.63】に対する抗体を用い、数多くの大腸がん組織が搭載された組織マイクロアレイを免疫染色し、各候補蛋白質の発現プロファイルと各症例が有する臨床情報との相関を解析した。その結果、RhoGDI の発現割合は、大腸壁の深達度の進行とリンパ節転移の発生に伴って有意に上昇することが示された。一方で、その他の候補蛋白質については、がん組織で発現していたものの、臨床情報との相関は認められなかった。

続いて、RhoGDI の遠隔転移との関連を検証することを目的に、大腸がんの

代表的な転移臓器である肝臓に高転移性の細胞株を独自に樹立し、RhoGDI の蛋白質発現量の比較を試みた。まず、SW620を脾臓に注入することで肝臓に転移した腫瘍組織を取り出し、in vitro 培養することで、SW620/ok1 を樹立した。さらに同様の手法により、SW620/ok1 から樹立された亜株をSW620/ok2 とした。これら独自に樹立した細胞株の転移性を評価するため、脾臓注入肝転移モデルにて比較したところ、SW480<SW620<SW620/ok1 の順に転移症例数・転移コロニー数が増加した。そこで、これら同一患者由来で、肝臓への転移性の異なるがん細胞株における RhoGDI の発現量を Western blotting により評価した。その結果、RhoGDI は、肝転移性が高い細胞株ほど、発現量が高くなる傾向が認められた。

RhoGDI は、Rho に GDP が結合した不活性型から GTP が結合した活性型に変換される過程を阻害する蛋白質として知られている。これまでに Rho は、活性型に変換されることで、アクチン細胞骨格の制御のみならず、最近ではカドヘリンを介した細胞接着やアポトーシスに関与していることが報告されている。そのため、今後、分子レベルでの検証が必要なものの、RhoGDI は、がん組織からの離脱やアポトーシスの回避、さらには本検討で相関が認められたがん細胞の浸潤性に関与することによって、転移能の向上につながった可能性が考えられる。今後は、遺伝子工学的な手法を用いて、この蛋白質の機能を詳細に検証し、転移メカニズムに基づいた診断薬の開発、さらには転移抑制薬の可能性を検証していく予定であるが、これら得られた知見が腫瘍生物学の発展や創薬の進展の一助になることを祈念している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

1. Yamashita T., Okamura T., **Nagano K.**, Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, 67(3): 253-255, 2012.

〔学会発表〕 (計4件)

<国際学会>

1. **Nagano K.**, Okamura T., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression of Rho GDP dissociation inhibitor correlates

positively with lymph node metastasis in colorectal cancer., EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.

<国内学会>

1. **長野一也**, 岡村賢孝, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 古屋 剛, 井上雅己, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤 康央, 角田慎一: 大腸がん転移診断・治療法の開発を目指した転移関連たんぱく質の探索., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.
2. Yamashita T., **Nagano K.**, Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteomic profiling of proteins associated with metastasis in colorectal cancer cell lines., 第70回日本癌学会学術総会., 名古屋(愛知), 2011年10月.
3. **長野一也**, 岡村賢孝, 山下琢矢, 堤康央, 角田慎一 : プロテオミクスによる大腸がん転移関連たんぱく質の探索., 第20回日本がん転移学会学術集会・総会., 浜松(静岡), 2011年6月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野一也 (NAGANO KAZUYA)

(独) 医薬基盤研究所・

バイオ創薬プロジェクト

プロジェクト研究員

研究者番号: 40548301

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者:

角田慎一 (TSUNODA SHIN-ICHI)

(独) 医薬基盤研究所・

バイオ創薬プロジェクト

プロジェクトリーダー

研究者番号: 90357533

鎌田春彦 (KAMADA HARUHIKO)

(独) 医薬基盤研究所・

バイオ創薬プロジェクト

サブプロジェクトリーダー

研究者番号: 00324509