

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651252

研究課題名(和文) プロテオーム解析による臓器デザインの分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular-based analysis of organ construction using proteomic analysis

研究代表者

鎌田 春彦 (Kamada, Haruhiko)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・サブプロジェクトリーダー

研究者番号：00324509

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)：本研究では、組織の3次元構築に関わる分子を探索・同定するために、我々独自の細胞培養技術であるCancer Tissue Originated Spheroid (CTOS)作製技術を用いて、スフェロイド培養と平面培養における細胞に発現するタンパク質をプロテオーム解析した。また、この過程でCTOSを平面培養するための方法論の確立も行った。細胞の培養形態の違いが最も強く反映されると考えられる細胞膜ならびに細胞間質に特化したビオチン化をベースとするプロテオミクス解析を実施した結果、各培養法に特徴的に発現する複数のタンパク質を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on protein expression pattern of CTOS membrane and extra cellular matrix to discover the molecules related with the construction of 3D organ structure. Moreover, we created new method to culture CTOS as flat culture. Several proteins were identified as specific expression in spheroid CTOS but not flat cultured CTOS expressed in membrane and extracellular matrix, which estimate to reflect heavily culture patterns, using proteomic analysis with biotinylation. These proteins were suggested to have an important role to construct the organ structure and will be clarify the activity in 3D structure in future.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：プロテオミクス

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

1. 研究開始当初の背景

臓器は多種類の細胞から構成される三次元構造を持った複雑な構造体であり、各細胞が有機的に相互作用することで高次機能を発揮している。しかし、どのような機構でその構造を保ちながら機能を発揮しているのか、詳細なメカニズムは未だ不明な部分が多い。臓器は、通常 *in vitro* 培養される細胞のように平面（二次元）ではなく立体（三次元）であるため、立体組織構造を再構築しうる三次元細胞培養法により初めて分子メカニズムを解析することが可能になるものと考えられる。現在、骨組織の再生に関する検討が報告されており、Bone morphogenic protein (BMP)-2 等のタンパク質がこの組織構造に関与することが報告されている。上記研究の内容は、二次元培養した細胞と三次元培養した細胞におけるタンパク質発現の違いを単に検討したものであるが、この従来法の最大の問題点は、細胞を一旦平面培養した後に、足場構造を人工的に作製し、組織様構造に再構築する点にある。すなわち、組織の構造を一旦破壊しその後再構築することで、立体構造を維持するための機能の一部を失う原因となっている可能性が考えられる。このような性質を維持するためには、組織からの一次培養（*primal culture*）から、組織構造を維持したままの培養法が必要である。

これまで我々は、成人病センターの井上正宏部門長との共同研究の中で、がん組織やそれに随伴する非がん部正常組織をそのまま培養可能な、Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) を作製してきた。この CTOS 作製法の利点は、組織を *in vitro* で立体構造やその機能をそのままに、継代・維持できる、組織由来の細胞を高確率で一次培養できる、マウス等の動物に移植できることにある。一方で我々らは、独自のプロテオーム解析を利用し、健常と疾患状態の比較解析にて、様々なバイオマーカーを同定してきた。この技術によって、微量タンパク質から抗体を作製し、タンパク質の機能解明を行うとともに、組織間質等に発現する分子の同定に成功してきた。CTOS 作製技術と二つのプロテオーム解析とを組み合わせ、『組織の高次構造をデザインするタンパク分子』を同定可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、CTOS 由来平面培養細胞株の作製、CTOS と CTOS 由来の平面培養細胞株の両者のプロテオーム解析、を通じて『組織の高次構造をデザインする分子の同定と、その機能解析』を行うことを目的とする。このような研究は、先述したマトリクスを利用した三次元培養法を用いて解析され

てきた経緯があるが、多くの場合、再構築に利用する細胞は、既に本来持っていた性質の多くが失われている可能性が高い。本研究では、それらの高次構造を維持した CTOS と CTOS 由来の平面培養細胞株を用いるため、立体構造維持に必要な新規タンパク質を同定出来る可能性が高いと考える。

3. 研究の方法

1. CTOS の調製

DMEM/F12 培地 20 mL に浸漬した。培地ごと腫瘍組織をシャーレ（非接着性；non-treated 10 cm；イワキ）に移した。なお、固形腫瘍は基底部の繊維芽細胞や細胞が基質が混入しないように新鮮な増殖性の高い表面部をできるだけ採取するよう心がけた。

ピンセットとメスを用いて約 1 mm 角に細片化し、腫瘍組織を 50 mL 遠心管へ移した。1 ~ 2 分静置させることで、断片化された腫瘍組織を沈殿させ、上清を取り除いた。その後、HBSS にて洗浄し、200 g、2 分間遠心した。HBSS を用いた洗浄操作を 3 回行い、40 mL の DMEM/F12 に Final 0.26 U/mL になるよう Liberase DH リサーチグレード (Roche) 400 uL を入れて混和して、滅菌済み 100 mL キャップ/ねじ付きガラス製ビンへ移した。インキュベーター内にてスターラーで攪拌しながら 37°C 1.5 時間反応させた。消化後の腫瘍組織をステンレスメッシュ (500 μm；滅菌済み) に通し、50 mL 遠心管に回収した。さらに回収した懸濁液を 250 μm メッシュ 100 μm・40 μm セルストレーナー (BD Falcon) の順に通した。100 μm と 40 μm のセルストレーナーに捕捉された細胞塊をピペッティングにより 50 mL チューブに回収した。200 g、2 分間 (4°C) で遠心することで上清を除き、StemPro 培地にて、37°C 5% CO₂/95% Air 条件下で培養した。

2. CTOS ならびに接着 CTOS の培養

CTOS の培養には、StemPro hESC SFM (Invitrogen) を用いた。この培地の組成を以下に示す。

Reagent	Final Conc.
DMEM/F-12 + GlutaMax (1x) Kit	1x
StemPro hESC SFM Growth Supplement (50x) (Kit)	1x
BSA 25% (Kit)	1.8%
bFGF (100 μg/mL) (Invitrogen)	8 ng/mL
EGF (1000 μg/mL) (Invitrogen)	20 ng/mL
2-Mercaptoethanol (55 mM in DW)	0.1 mM
PenStrep (100x) (Invitrogen)	Penicillin 100 units/mL Streptomycin 100 μg/mL
Y-27632	10 μM

上記の組成の培地にて、回収した CTOS を培養した。

一方、接着 CTOS の作製は以下の手順で行った。まず、上記の方法で CTOS を回収し、死細胞ならびに CTOS 以外の細胞を除くために StemPro hESC SFM 培地にて一晚培養した。培養後の CTOS を 50ml チューブに回収し、200 g、2 分間遠心することで回収した。回収した CTOS を 10%FCS D-MEM, high glucose (sigma) にて懸濁し、表面加工された細胞培養ディッシュ (nunc) で培養した。培養ディッシュに接着した CTOS のみを回収し、実験に供した。

3. 膜タンパク質の抽出・精製

培養液中に含まれるタンパク質を除くため、細胞を PBS にて 3 回洗浄した。洗浄後、細胞膜タンパク質をビオチンにてラベル化するために 880 μ M Sulfo-NHS-LC-biotin (Thermo Scientific) 溶液を添加し、5 分間室温で反応させた。300 μ L の 1 M Tris-HCl (pH7.4) を添加し、ビオチン化反応を止めた。セルスクレイパーを用いて細胞を培養ディッシュより剥がして回収した。回収後の細胞に対して、Lysis Buffer (2% NP-40, 0.2% SDS, 10mM EDTA in PBS) を添加し、30 分間、氷上で反応させることでタンパク質を可溶化した。可溶化後のサンプルを 14000rpm、15 分間遠心し、溶解しなかった細胞を除去した。回収した上清中のタンパク質を BCA assay にて定量した。

4. プロテオミクス解析

400 μ g のタンパク質に対して、還元アルキル化を行った。タンパク質溶液に対して、終濃度 5mM になるように TCEP (Tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) を添加した。添加後、室温で 15 分間反応させ、その後 95 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた。反応後の溶液を室温に戻し、終濃度 10mM になるようにヨードアセトアミドを添加した。遮光下、室温で 15 分間反応させ、過量の L-システインを添加することで反応を停止させた。還元アルカリ化したタンパク質溶液に対して、あらかじめ Buffer A (1% NP-40, 0.1% SDS in PBS) にて洗浄したストレプトアビジンビーズ (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare) を添加した。添加後、二時間反応させ、ビオチン化タンパク質を回収した。ビオチン化タンパク質がキャプチャーされたビーズをフィルター濾過し、Buffer A にて 3 回、Buffer B (0.1% SDS, 2M NaCl in PBS) にて 2 回洗浄した。洗浄後のサンプルを Digestion Buffer (50 mM Tris-HCl, 1mM CaCl₂, pH 8.0) にて 10 回洗浄した。洗浄後のビーズを 80ng/ μ L のトリプシン溶液にて、一晚反応

させ、タンパク質を分解した。分解後のペプチドを、Omix Tip (Agilent) にて回収し、LC-MS/MS (Orbitrap, ThermoFisher Science) にてタンパク質を同定した。

4. 研究成果

本研究では、臓器の構築を司る分子を同定・機能解析することを目的に、組織由来のスフェロイド (CTOS) に対してプロテオミクス等の網羅的解析を実施した。まず、CTOS を作製するために、手術摘出組織・生検組織を機械的・化学的に処理し、直径が数十から数百マイクロメートルの組織細胞塊 (スフェロイド/オルガノイド) を回収し、CTOS を作製した。CTOS 作製工程のうち、単分散した細胞が得られるが、この細胞群は組織中の間質細胞 (血管内皮細胞、繊維芽細胞など) が多く含まれており、培養ディッシュへと接着後の細胞を目視すると、様々な形態の細胞が含まれることが示唆された。そこで、一度 CTOS を回収した後に、この CTOS を培養ディッシュへと接着させることにした。

この CTOS をスフェロイド培養から平面培養へと展開するために、表面処理した培養ディッシュに播種するとともに、通常 CTOS を培養する StemPro[®]培地から 10% FCS 含有 D-MEM 培地へと培地交換した。その結果、通常、スフェロイドとして維持される細胞群は、培養ディッシュに接着し、sprouting することで、培養ディッシュ上に拡散した。

そこで、上記 CTOS を一旦作製した後、培地の組成を幹細胞培地から 10% FCS 含有 DMEM に置換することで、効率よく平面培養に展開することが可能であることを見出した。そこで、この CTOS に発現するタンパク質と平面培養された細胞にそれぞれ発現する膜タンパク質に着目したプロテオーム解析を実施するために、膜タンパク質を濃縮し、抽出したタンパク質の定性・定量的なプロテオーム解析を実施した。

CTOS に発現するタンパク質と平面培養された細胞にそれぞれ発現する膜タンパク質を濃縮し、抽出したタンパク質の定性・定量的なプロテオーム解析を実施した。今回の検討では、三種類の肺がん由来 CTOS を用いて比較解析し、各 CTOS からは 800 から 950 程度のタンパク質が同定され、そのうち、約六割のタンパク質がスフェロイド培養と平面培養との間で、共通して発現していることが明らかになった。特に、スフェロイド培養では発現せず、接着 CTOS でのみ発現が確認されたタンパク質を五種類見出すことが出来た。また、同定されたタンパク質の中には、細胞の運動性や接着時に活性・発現が変化することが知られている、Rho Kinase に dependent なタンパク質が二種類含まれていた。これらのタンパク質は、その発現が増加

することで、スフェロイド状態から平面状態へと移行するものと示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

山下琢矢, 鎌田春彦 他, Exosome 由来膜タンパク質のプロテオーム解析による新規肺がんバイオマーカーの探索, 第37回日本医用マスペクトル学会年会, 平成24年10月、名古屋(愛知)

鎌田 春彦 他, がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索, 日本プロテオーム機構第10回大会, 平成24年7月、東京(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibio.go.jp/bio-r/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌田 春彦 (KAMADA HARUHIKO)

研究者番号: 00324509

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし