

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640080

研究課題名(和文) 定量プロテオミクスを解析基盤とした腫瘍標的分子の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive identification of tumor-targeting molecules based on the quantitative proteome analysis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本邦で開発された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駆使し、様々な解析を行うことを目標とした。まず臨床検体への応用を目指して、癌細胞株による定量比較解析限界を検討した。次に我々が研究を進めているいくつかの分子について、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を多数同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To identify tumor-targeting molecules, we have carried out 2DICAL as the quantitative proteome analysis. By using 2DICAL, we have uncovered novel cancer-related genes. We also found their post-translational modifications.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌 プロテオーム 分子標的

1. 研究開始当初の背景

世界で毎年760万人もの命が癌で失われており、我が国でも癌は死亡原因の第一位である。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世界的・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。その機構として、DYRK2 は c-Jun/c-Myc という転写因子を直接リン酸化し分解を誘導することで、G1 期から S 期への移行を制御していることが判明した。c-Jun/c-Myc の分解抑制による高発現が多くの癌細胞において見出されていることから、DYRK2 の機能不全が発癌や癌の進展に関与する可能性が示唆される。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 c-Jun/c-Myc の発現制御異常を伴う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

これまでに我々が取り組んできた DYRK2 の機能解析を機軸として、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)法という本邦発の最先端の方法を用いることで、発現している分子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、癌治療の標的分子となるような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希求する。

3. 研究の方法

① 2DICAL 法による検出限界検証

癌組織由来の生検試料を用いてプロテオーム解析を行う場合、解析に供給できる実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に先般導入された最新鋭の質量分析計を用いることで、検出限界の向上を試みる。この機種を用いた 2DICAL 法による解析はまだほとんど行われていない。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、様々な癌種での試行が必要である。

② 2DICAL 法による臨床検体の解析

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。検体は東京慈恵会医科大学外科学講座で得られた生検サンプル及び手術検体を用いる。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、標的候補分子を同定する。

③ 標的候補分子の有効性評価

1) 細胞レベルの in vitro 解析

検体を癌部・非癌部に分けて候補分子の発現レベルを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ト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25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った。これらの予備実験をふまえて、予測される適切な条件における臨床検体の網羅的発現解析を順次進行中である。加えて我々が現在焦点を当てて研究を進めているいくつかの分子について、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。さらに DYRK2 によって惹起される p53 のリン酸化依存的に誘導される分子としてアンフィレグリン (AREG) を同定したが、その細

胞死への関与が不明であったため、AREG の会合分子を 2DICAL によって探索した。するとその一つとして RNA ヘリカーゼである DDX5 を単離することに成功した。この会合の意義とその機能を解析したところ、AREG は DDX5 や Drosha と複合体を形成し、miRNA のプロセシングに関わっていることが判明した。さらにこのプロセシングによって成熟した miRNA が産出されることで、抗アポトーシス分子の発現を抑制しアポトーシスを誘導しているという複雑かつ巧妙な仕組みを明らかにした。

平成26年度は、引き続き我々が焦点を当てて研究を進めている分子について、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。その一つである、細胞周期に関わる Mps1 というキナーゼが、分裂期において染色体を凝集するコンデンシン II のサブユニットである CAP-H2 を特異的にリン酸化することを見出し、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、これまでに報告のない新たなリン酸化部位を一カ所同定することに成功した。リン酸化部位に関連する様々な変異体による解析から、このリン酸化はコンデンシンが分裂期前期にクロマチンにリクルートされるために必須であることを明らかにした。この結果、Mps1 によるリン酸化によりコンデンシンの局在が制御されることが、M 期初期における染色体構築に重要な機能を果たすことが示唆された。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。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。

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
(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9件)

1. Mimoto R, Taira N, Takahashi H, Yamaguchi T, Okabe M, Uchida K, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail. *Cancer Lett.* 339:214-225 (2013)
2. Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, Lu Z-G, Fukuda S, Higashiyama S, Ono M, Yoshida K. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:717-722 (2014)
3. Dashzeveg N, Taira N, Lu Z-G, Kimura J, Yoshida K. Palmdelphin, a novel target of p53 with Ser46 phosphorylation, controls cell death in response to DNA damage. *Cell Death & Disease* 5:e1222 (2014)
4. Kagami Y, Nihira K, Wada S, Ono M, Honda M, Yoshida K. Mps1 phosphorylation of condensin II controls chromosome condensation at the onset of mitosis. *J. Cell Biol.* 205:781-790 (2014)
5. Nakazawa K, Dashzeveg N, Yoshida K. Tumor suppressor p53 induces miR-1915 processing to inhibit Bcl-2

in the apoptotic response to DNA damage. *FEBS J.* 281:2937-2944 (2014)

6. Matsumoto M, Matsuura T, Aoki K, Maehashi H, Iwamoto T, Ohkawa K, Yoshida K, Yanaga K, Takada K. An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatol. Res.* 45:315-325 (2015)
7. Yamaguchi N, Mimoto R, Yanaihara N, Imawari Y, Hirooka S, Okamoto A, Yoshida K. DYRK2 regulates epithelial-mesenchymal-transition and chemosensitivity through Snail degradation in ovarian serous adenocarcinoma. *Tumor Biol.* in press
8. Asakura T, Yamaguchi N, Ohkawa K, Yoshida K. Proteasome inhibitor-resistant cells cause EMT-induction via suppression of E-cadherin by miR-200 and ZEB1. *Int. J. Oncol.* 46:2251-2260 (2015)
9. Nihira NT, Yoshida K. Engagement of DYRK2 in proper control for cell division. *Cell Cycle* 14:802 -807 (2015)

[学会発表] (計18件)

1. Yoshida K. DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition by degrading Snail. 3rd International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research. National Harbor, MD: 9/18-22/2013

2. Dashzeveg N, Taira N, Yoshida K. Tumor suppressor p53 with Ser46 phosphorylation controls cell death via palmdelphin in the apoptotic response to DNA damage. 4th International Conference on “Current advances in Microbiology and Immunology”. Ulaanbaatar, Mongolia: 6/19-21/2014

[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.jikei.ac.jp/academic/course/06_seikagaku.html

<http://jikei-biochem.wix.com/yoshidalab>

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