

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871240

研究課題名(和文)大腸癌高転移性細胞株を用いたリン酸化プロテオーム解析による微小転移マーカーの開発

研究課題名(英文) Establishment of highly metastatic colorectal cancer cells and phosphoproteomic analysis for biomarker discovery.

研究代表者

白水 崇 (Shiromizu, Takashi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号：00582678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌の予後は転移の有無により大きく左右されるため、早期転移診断マーカーの開発は重要である。癌転移のプロセスには組織周辺の環境が大きく影響するため、同所移植は癌微小環境を反映した優れた研究モデルである。本研究では、同所移植モデルにより大腸癌の転移性細胞株を樹立し、リン酸化プロテオーム解析により転移マーカー候補分子の探索および機能解析を行った。HCT116ヒト大腸癌細胞株より樹立した転移性細胞は元株と比べて高浸潤性であることが確認された。リン酸化プロテオーム解析により16541のリン酸化ペプチドを同定し、浸潤との関連が予想される分子の機能解析から、新たな2つの浸潤関連タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Early detection of cancer metastasis is crucial to improve the prognosis. Cancer metastatic progression is influenced by surrounding tissue environment. Orthotopic implantation provides a valuable in vivo model for cancer metastasis research. Here, we established metastatic colorectal cancer cells by surgical orthotopic implantation of HCT-116 human colon cancer cells. These established cells demonstrated highly invasive potential. In this study, we performed differential proteomic profiling of metastatic cells for identification of colorectal cancer metastatic biomarker candidates. A total of 16541 distinct phosphopeptides were identified and hundreds of phosphopeptides were differentially expressed between metastatic and nonmetastatic cancer cells. And two metastasis-associated proteins were identified by functional analysis.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：バイオマーカー プロテオミクス 大腸癌 転移

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は他の癌と異なり肝臓の転移巣の摘出も行うが、微小転移が臓器全体に広がっている場合には手術適応にならないため、微小転移判定マーカーの開発は重要な課題である。近年の基礎研究により、転移のメカニズムは明らかになりつつあるが、転移に関わる生物学的過程は複雑であり、単一の分子を解析して転移を予測することは困難である。転移に関わる多数の分子を同時に解析するオミックス研究により幾つかの転移関連因子を同定されているが、未だに転移の診断に有効なバイオマーカーは開発されていない。

タンパク質リン酸化シグナルの異常と癌の進展は密接に関わることから、リン酸化タンパク質はバイオマーカーの有望な候補である。しかし、リン酸化タンパク質は微量であることから、リン酸化プロテオーム解析は非リン酸化タンパク質の解析に比べて高精度・高感度な質量分析計が必要であり、コンピューターの処理能力も高いものが要求される。そのため、リン酸化プロテオーム解析によるバイオマーカー探索は、非リン酸化タンパク質の研究に比べて進んでいない。しかし近年、質量分析計とコンピューターの性能は飛躍的に向上し、様々なリン酸化ペプチド濃縮法も開発されてきたことから、細胞内のリン酸化シグナル経路を網羅的に解析するリン酸化プロテオーム研究の報告数は次第に増えてきている。さらには大規模なデータを解析するバイオインフォマティクス技術や、リン酸化シグナルを解析するツールも数多く開発されてきており、リン酸化タンパク質をターゲットとしたバイオマーカー探索の環境は漸く整ってきたと言える。

2. 研究の目的

(1) マウス同所性移植モデルを用いたヒト大腸癌高転移性細胞株の樹立

プロテオーム解析に用いるための高転移性細胞株を樹立する。ヒト大腸癌細胞株を免疫不全マウスに同所移植し、肝臓への転移を起こさせた後、転移巣より回収した細胞で再び同所移植を行う。二回目の転移巣より培養細胞株を樹立する。樹立した株から特に転移性の高いクローンを選択する。

(2) 大規模リン酸化プロテオーム解析によるバイオマーカー候補の探索

安定同位体標識による定量的プロテオーム解析により、転移性株と非転移性株の間で変化のあったリン酸化タンパク質をバイオマーカーの候補とする。また、バイオインフォマティクスによる候補の絞り込みも行う。

(3) マーカー候補分子の臨床組織での検証

同定されたバイオマーカー候補分子については、臨床検体でも発現変化が見られるかどうかを検証する。検証には三連四重極型質量分析を用いた SRM/MRM

(Selected/Multiple Reaction Monitoring) 法により行う。

(4) ターゲット分子の転移機能解析

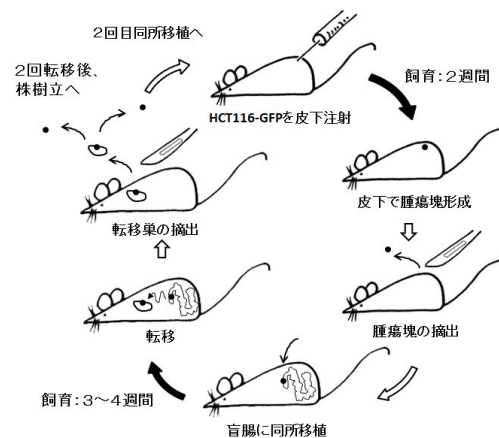
バイオマーカー候補分子の中から転移に関わる新規分子を探索し、機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 同所移植モデルでの高転移性株の樹立

ヒト大腸癌細胞 HCT-116 の同所移植

高転移性細胞株の樹立は、HCT-116 ヒト大腸癌細胞株に蛍光タンパク (GFP) を安定発現させた免疫不全マウスへの同所移植を行う。皮下に HCT-116-GFP を注入し、腫瘍塊を形成させた後に腫瘍塊を摘出し、別のマウスの盲腸へと移植する。皮下での腫瘍塊形成や遠隔臓器への転移は蛍光観察により非侵襲的に行うことができる。その後、肝臓の転移巣から培養細胞株を樹立し、もう一度同様の移植を行う。2 回肝臓へ転移させた培養細胞



を樹立する。(図 1)

(図 1) GFP メタマウスモデルによる高転移性ヒト大腸癌細胞株の分離

HCT-116 高転移性株の選択

樹立した培養細胞株から高転移性があるクローンのスクリーニングを行う。スクリーニングは細胞増殖能、移動能、浸潤能を調べる。

(2) 大規模リン酸化プロテオーム解析によるバイオマーカー候補の探索

FASP 法によるタンパク質の抽出・消化

細胞膜など、難溶性の細胞画分に存在するタンパク質も含めた網羅的なプロテオーム解析を行うため、タンパク質の抽出には界面活性剤を用いる。界面活性剤はトリブシン消化やその後の質量解析の妨げになるため、本研究では FASP 法 (Filter Aided Sample Preparation) によるタンパク質の抽出と消化を行う。FASP 法では可溶化と限外ろ過膜による界面活性剤の除去を組み合わせることで、難溶性タンパク質の同定が可能になる。

リン酸化ペプチドの回収と濃縮

微量なリン酸化タンパク質のプロテオーム解析のためには、試料の中からリン酸化ペプチドを濃縮して回収する必要がある。本研究では Fe³⁺イオンとリン酸基の親和性を利用した IMAC 法 (Immobilized metal ion affinity chromatography) を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行う。

リン酸化ペプチドの安定同位体標識

高転移性株におけるタンパク質リン酸化量の変化を定量するため、安定同位体標識法 (iTRAQ 法) を用いる。安定同位体標識したサンプルは質量分析の際にレポーターイオンを生成するので、サンプル間でのリン酸化ペプチドの量を相対的に定量することができる。

質量分析計によるリン酸化ペプチドの同定・定量

iTRAQ 試薬でラベルしたペプチドをイオン交換クロマトグラフィーと質量分析計にオンライン接続した逆相クロマトグラフィーで二次元分画する。二次元分画する事により、微量ペプチドの同定が可能になる。解析データからのペプチド同定・定量解析には解析ソフトウェア (Proteome Discoverer) を用いる。

リン酸化シグナル経路のパスウェイ解析

同定された候補分子について、バイオインフォマティクスによる解析を行う。パスウェイ解析ソフト Ingenuity (Ingenuity Systems) やキナーゼネットワーク予測ソフト NetworKIN を用いて、リン酸化シグナルの変化と転移に関する機能に寄与するかを予測し、ターゲットを絞り込む。

(3) SRM/MRM 法によるマーカー候補分子の臨床組織での検証

マーカー候補の臨床検体を用いた検証

同定されたマーカー候補分子については、臨床検体を用いて三連四重極型質量分析計 (TSQ Vantage, Thermo) による SRM/MRM 法での検出を試みる。SRM/MRM 法は、特定の質量を持つイオンを選択的に測定することで、複雑なサンプル内から標的とするタンパク質に由来するペプチドを高感度かつハイスループットに検出することができる。

(4) ターゲット分子の転移機能解析

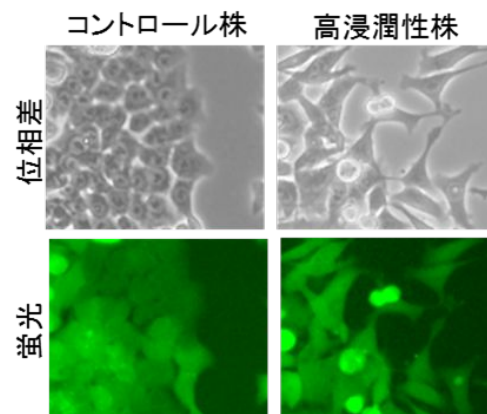
検証されたマーカー候補については、転移との関連について機能解析を行う。変異遺伝子の培養細胞への導入や、siRNA による特異的なノックダウンによる細胞増殖、浸潤、転移能への影響について観察する。

4. 研究成果

(1) 高浸潤性ヒト大腸癌細胞株の樹立

GFP メタマウスによる同所移植モデルによ

り、ヒト大腸癌細胞株 HCT-116 の転移性細胞株を樹立した (図 2)。樹立した細胞株は増殖性および遊走性においては元株と比較して変化はなかったが、浸潤性においては大きく亢進していた。さらに、樹立した株から浸潤性の特が特に高まっているクローンを単離した。



(図 2) 高浸潤性 HCT-116 ヒト大腸癌細胞株の顕微鏡観察像

(2) 高浸潤性大腸癌細胞株を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析

樹立した高浸潤性大腸癌細胞株を用いて大規模リン酸化プロテオーム解析を行った。コントロール株と高浸潤性細胞株から抽出したタンパク質をトリプシンで消化した後、IMAC 法でリン酸化ペプチドを濃縮し、iTRAQ 法により安定同位体でラベルした。その後サンプルを陽イオン交換カラムで分画し、質量分析計 (Orbitrap Velos) で解析した結果、16541 のリン酸化ペプチド (4918 タンパク) が同定された (表 1)。

定量解析の結果、コントロール株と比べて発現量が増加したリン酸化ペプチドについて、さらにターゲットを絞り込むために、バイオインフォマティクス解析 Ingenuity (Ingenuity Systems) によるリン酸化シグナルのパスウェイ解析を行った。その結果、機能的に転移との関連が予想される分子について、新規のバイオマーカーの候補とした。

同定結果 (FDR 1%>)	
リン酸化ペプチド数	16541
タンパク数	4918

(表 1) リン酸化プロテオーム解析結果

(3) マーカー候補の臨床組織での検証

パスウェイ解析により絞りこまれた約 100 種類のターゲットについて、大腸癌臨床組織検体での SRM/MRM 解析を行った。大腸癌の原発巣および肝転移巣それぞれ 20 検体に対して SRM/MRM 解析を行った結果、6 種類のターゲットについて、原発/転移巣間での有為な発現量変化が確認された。

(4) 転移機能解析

樹立した高浸潤性細胞を用いて、浸潤性に関わる新規分子の探索を行った。高浸潤性細胞に対してターゲット分子の変異を加えた所、2つの分子について浸潤能との関連が示唆された。

(5) 今後の展望

本研究で行った、高浸潤性細胞のリン酸化プロテオーム解析と臨床検体でのSRM/MRM解析の結果、新たな転移マーカー候補分子が多数同定された。今後は実際の診断や検査法の確立のため、血液サンプル等に対する有用性の検証を行う。

さらに浸潤能に関与する新規分子については、in-vivoでの検証を行うとともに、更なる詳細な分子メカニズム解明を進める。

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)

[学会発表](計3件)

Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Shigeo Yagi, Robert M. Hoffman, Takeshi Tomonaga. Proteomic analysis of highly invasive colorectal cancer cells established by orthotopic xenograft mouse model. 第72回日本癌学会学術総会、2013.10.3、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)」

Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Shigeo Yagi, Robert M. Hoffman, Takeshi Tomonaga. Proteomic analysis of highly invasive colorectal cancer cells established by orthotopic xenograft mouse model. HUPO 2013.9.14、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)」

白水崇、同所移植モデルによる大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析
個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ、2015.2.5、「琵琶湖ホテル(滋賀県・大津市)」

6. 研究組織

研究代表者

白水 崇 (SHIROMIZU TAKASHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号：00582678