

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430152

研究課題名(和文) 診断・治療法開発に向けた新規大腸癌バイオマーカー候補タンパク質の網羅的機能解析

研究課題名(英文) Comprehensive functional analysis of colorectal cancer biomarker candidates for the exploitation of diagnostic and therapeutic methods

研究代表者

原 康洋 (Hara, Yasuhiro)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：70568617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室によって見出された大腸癌で増大している膜タンパク質群に関して、siRNAによるノックダウンを用いて機能的スクリーニングを行うことにより、大腸癌細胞株の増殖、浸潤に参与する2種のタンパク質を見出した。小胞体タンパク質であるSIGMAR1は小胞体ストレスの調節を介して癌細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。グルタチオン代謝関連タンパク質であるGGT5はそのノックダウン効果が大腸癌細胞に特異性が高く、正常細胞の増殖を阻害しないことから、大腸癌治療の標的候補となることが示唆された。以上の結果から、これら2種の膜タンパク質は大腸癌に対するバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported the identification of a number of membrane proteins which were increased in colorectal cancer tissues. These proteins appeared to be biomarker candidates for colorectal cancer. In this study, to investigate the relevance of these proteins to cancer progression, we performed screening for functions of these proteins against growth, migration, and invasion of colon cancer cells using siRNA knock-down. Consequently, we found two proteins that were significantly suppressed viability of cancer cells. SIGMAR1 is known to participate in ER stress regulation. Treatment of colon cancer cells with a SIGMAR1 agonist mitigated tunicamycin-induced ER stress. We assumed that SIGMAR1 facilitated cancer progression via suppression of ER stress. GGT5 is an enzyme metabolizing glutathione. Knock-down of GGT5 significantly reduced growth of colon cancer cells but not normal cells. Thus, GGT5 is likely to contribute the exploitation of therapeutic methods of colorectal cancer.

研究分野：疾患オミクス

キーワード：大腸癌 膜タンパク質 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌バイオマーカーおよび大腸癌分子標的薬の現状

画像診断技術の飛躍的な向上に対して、早期発見、再発予測のための大腸癌バイオマーカーは未だ旧態依然のままであり十分に有効とは言えない。一方、大腸癌の治療法は分子標的薬の登場により急速な進歩を遂げ、患者の予後は飛躍的に改善されつつある。それらの分子標的治療を効果的に行うために早期発見、再発予測のための新しいバイオマーカーの開発が最重要課題となっている。また、大腸癌においても他の癌と同様に、薬効が見られない患者の存在、耐性化など、既存の分子標的薬だけでは限界があることが予測されている。したがって、今後、創薬の標的となる新たなタンパク質の発見が求められる。

(2) プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索の問題点

これまでプロテオーム解析によって実用的な大腸癌バイオマーカーは発見されていない。その理由として、血液あるいは培養細胞からタンパク質を探索する方法が用いられていたことが挙げられる。血液を用いた場合は多量な血中タンパク質の存在によって癌組織由来の微量タンパク質を同定することが難しい、細胞を用いた場合は細胞株に特異的な現象を見ているに過ぎない、という問題が生じるため、これらの方法では大腸癌の本質に関わるバイオマーカータンパク質を発見できる可能性は少ない。そこで真に有用な大腸癌バイオマーカータンパク質を見つけるためにプロテオーム解析の戦略を見直す必要があった。

(3) これまでの研究成果

申請者の研究室では、大腸良性腫瘍(ポリープ)、転移のない大腸癌、転移のある大腸癌から調製した膜画分のプロテオーム解析により、すでに約100個の大腸癌バイオマーカー候補となる膜タンパク質を見出している(Kume H, Mol Cell Proteomics 2014, 特許出願)。我々の方法の利点は、大腸癌組織から調製した膜画分を用いてプロテオーム解析を行っていることである。膜表面にあるタンパク質は体液中に放出されやすい、抗体の接近が容易という性質から、バイオマーカーになりやすく(Lund R, J Proteome Res 2009)、癌組織から調製した膜画分はいわばバイオマーカー候補が濃縮された状態にある素材と言える。膜画分から見つかった候補タンパク質が血中で検出可能かどうか調べるという方法であれば、血中から閾値に探索する方法に比べ、癌進行に特異的なバイオマーカーを発見できる可能性が高い。本研究室では、最新の質量分析技術である selected reaction monitoring (SRM)法と呼ばれるタンパク質の定量法を用いて、上記のバイオマーカー候補タンパク質のポリープと大腸癌間の発現量の差の検証をすでに行っている。

検証された候補タンパク質の内、ポリープと比較し癌組織で増大するものは早期診断マーカー、転移のある癌で増大するものは再発予測マーカーの有力な候補と言える。さらに組織で検証された候補タンパク質の幾つかは血中でも発現量の差を確認することができている。

(4) 本研究の着想

これまでプロテオーム解析により多数の癌バイオマーカー候補が見つけれられてきたが、それらの多くは、労力を費やしたにも関わらず実用化に至っていない。その大きな理由として癌発生、進行に対する機能的な確証を得ないまま、バイオマーカーとしての検証を開始していたことが挙げられる。そこで申請者は候補タンパク質がバイオマーカーとしての実用化研究に移行する価値があるものかどうかを判断するためには、機能的な裏付けを得ることが重要であるという着想に至った。また、癌治療への応用の観点からは、癌の増殖、転移を制御するタンパク質の多くが細胞膜に存在する可能性が高いことから、膜画分から同定された大腸癌バイオマーカー候補タンパク質は、同時に創薬、特に抗体医薬の有望な標的候補となり得ると考えた。

2. 研究の目的

申請者の研究室では大腸癌組織に由来する膜タンパク質のプロテオーム解析を行っており、すでに癌の進行と共に増大する約100個の膜タンパク質を見出している。これらの多くが機能未知であり、新規バイオマーカーあるいは創薬標的の候補と考えられた。本研究では、これらを癌診断、治療へと展開していくことを目的に全候補タンパク質に関して癌の発生、進行との機能的な関連を調べる。主な研究項目は、(1)候補タンパク質のノックダウンあるいは過剰発現による癌細胞の増殖、浸潤への影響の解析、(2)癌との機能的関連が見出されたタンパク質のマウス移植モデルによる確認、である。これらの解析によって候補タンパク質の癌発生、進行との関連を明らかにすることで大腸癌の早期診断、再発予測および標的創薬といった応用へ向けた基盤を創出する。

3. 研究の方法

(1) siRNA ノックダウンに用いる大腸癌細胞株の選定

候補タンパク質群のノックダウンを行う大腸癌細胞株を選択するために9種類の大腸癌細胞株からRNAを単離し候補タンパク質の発現をRT-qPCRによって調べた。

(2) 候補タンパク質をノックダウンした大腸癌細胞を用いた増殖、浸潤、移動アッセイ
21個の候補タンパク質を選択し、大腸癌細胞 SW620 を用いて siRNA のトランスフェクションによるノックダウンを行った。それらノックダウン細胞を回収し、WST-8 による増殖アッセイ、wound healing による移動能アッセイ

セイ、マトリゲル・インベーション・チャンパーによる浸潤能アッセイの3通りを用いノックダウンによる影響を調べた。

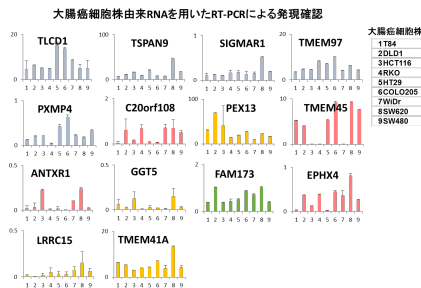
(3) ノックダウンにより顕著な効果が見られたタンパク質 SIGMAR1 の機能解析

SIGMAR1 に対する2種類のアゴニストと2種類のアンタゴニストを大腸癌細胞に添加し、tunicamycin による小胞体ストレス誘導時に、それら薬剤が与える効果を小胞体ストレスマーカータンパク質である CHOP の発現を指標に調べた。また、アゴニスト、アンタゴニストを添加することによる細胞増殖への効果も調べた。

4. 研究成果

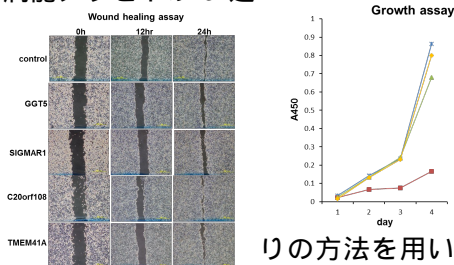
(1) siRNA ノックダウンに用いる大腸癌細胞株の選定

RT-qPCR による発現解析から SW620 細胞がそれぞれの候補タンパク質を最も発現していることが確認できたため、SW620 を siRNA によるノックダウン実験に用いることとした。



(2) siRNA を用いた候補タンパク質のノックダウンによる大腸癌細胞の増殖、浸潤、移動への影響の解析

最終的に大腸癌検体で発現が増大していることが確認できたタンパク質の中から、大腸癌との機能的関連の新規性を基準に約 50 のタンパク質を選定し、その中から RT-qPCR による大腸癌細胞株での発現量を指標に 21 個の膜タンパク質を研究対象とした。それらタンパク質を siRNA トランスフェクションによりノックダウンし、WST-8 による細胞増殖アッセイ、wound healing による移動能アッセイ、matrigel invasion chamber による浸潤能アッセイの3通



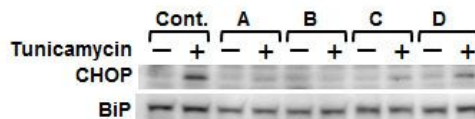
りの方法を用いて癌発生、進行との機能的関連を調べた。それらのスクリーニングから大腸癌進行に関わる可能性が見られたタンパク質に関してさらに配列を変えた siRNA でスクリーニングを行い、2 配列以上の siRNA で細胞増殖、浸潤を顕著に抑制する二つのタンパ

ク質 SIGMAR1、GGT5 を見出した。

(3) 大腸癌進展との関連が示された2種のタンパク質の機能解析

小胞体膜に存在するシャペロンであり小胞体ストレスの制御に関与する SIGMAR1 は、そのノックダウンにより HCT116、SW620、WiDr といった種々の大腸癌細胞の増殖を顕著に抑制した。大腸癌細胞における小胞体ストレスと SIGMAR1 の関連を調べるため、tunicamycin による小胞体ストレス誘導時に SIGMAR1 agonist / antagonist を添加し、小胞体ストレスに対する効果を検討した。その結果、agonist を低濃度に添加することにより小胞体ストレスマーカーである CHOP の発

agonist A,B の小胞体ストレス保護作用



現が有意に抑えられることが示された。また、agonist A の量を変えて添加していくと高濃度の添加では逆に CHOP が顕著に増大し細胞死が起こることを見出した。これらの結果から大腸癌検体で発現が増大している SIGMAR1 は小胞体ストレスの調節を介して癌細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。一方、細胞膜に存在するグルタチオン代謝酵素である GGT5 はそのノックダウン効果が大腸癌細胞に特異性が高く、正常細胞である HEK293 の増殖を阻害しないことから、大腸癌治療の標的候補となることが示唆された。

以上のことから、本研究で見出された2種の膜タンパク質 SIGMAR1、GGT5 が大腸癌に対する新規なバイオマーカーとなる可能性が考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 康洋 (HARA YASUHIRO)

大阪大学・医学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：70568617

(2)研究分担者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：80227644

足立 淳 (ADACHI JUN)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬基盤研究部・プロジェクト研究員

研究者番号：20437255

久米 秀明 (KUME HIDEAKI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号：50322714

(平成27年度まで分担者として参画)