

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26505001
研究課題名(和文) 定量リン酸化プロテオミクスによる膠芽腫幹細胞mTORシグナルの阻害攪乱機構の解明

研究課題名(英文) Quantitative phosphoproteomic analysis of mTOR signaling perturbation in glioblastoma stem cells

研究代表者
秦 裕子 (KOZUKA-HATA, Hiroko)
東京大学・医科学研究所・技術専門員

研究者番号：80401256
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は診断確定後の平均生存期間が短く、従来の治療法に対して高い抵抗性を示す最も悪性度の高い脳腫瘍である。本研究課題では、患者由来膠芽腫幹細胞において幹細胞性制御の要となる因子の抽出を目的として mTOR 特異的阻害剤を用いてEGFシグナルに関する摂動解析を行い、大規模定量プロテオームデータ並びにリン酸化プロテオームデータを取得した。これらのデータを用いた統合ネットワーク解析の結果、DNAチェックポイント機構が当該細胞の幹細胞性維持に関与する可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is the most malignant brain tumor with poor prognosis and shows high resistance to the conventional treatment such as chemotherapy or radiation. In this study, we performed global quantitative proteome and phosphoproteome analyses of EGF-dependent mTOR signaling in patient-derived glioblastoma stem cells through perturbation by mTOR specific inhibitor, Torin1. As a result of integrated statistical and mathematical analyses of these large-scale data, it was strongly suggested that DNA damage checkpoint might be involved in the maintenance of stemness properties in the glioblastoma stem cells.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス 膠芽腫幹細胞 mTORシグナル リン酸化 SILAC

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳腫瘍の中で発生頻度が最も高く、診断確定後の平均生存期間は約 15 か月、5 年生存率は 5~10 % と報告されている極めて悪性度が高い腫瘍である。抗がん剤や放射線治療に対しても高い抵抗性を示し、過去 20 年以上にわたって治療成績はほとんど向上していない。近年、がん組織にも幹細胞が存在し、階層性の頂点に立って自己複製能を保ちつつ分化したがん細胞を生み出すというがん幹細胞仮説が提唱され、脳腫瘍を含むいくつかの悪性腫瘍においてその存在が実験的に証明されてきた。このような背景から、がんの根治のためには腫瘍組織全体をターゲットとする従来の治療法を見直し、がん幹細胞に代表される造腫瘍能が高い細胞に的を絞った新たな治療戦略の展開が必須である。

がん幹細胞を含むがん組織は、元来正常幹細胞を頂点とする正常組織を基盤としていられることから、従来の個別研究では治療のターゲットとなるがん幹細胞の特徴を明らかにすることは容易ではなく、網羅的な解析技術とそこから得られる大規模データから特徴を抽出するデータ駆動型の研究手法が非常に有用であると考えられる。我々は先行研究において患者由来膠芽腫幹細胞を研究対象とし、SILAC (Stable isotope labeling by amino acid in cell culture) 法と TiO₂ カラムによるリン酸化ペプチド濃縮法を組み合わせた相対定量解析を行ったところ、同定された 6,073 種類のリン酸化ペプチドの中で当該細胞の幹細胞性維持に必須である上皮成長因子 (EGF) 依存的に 516 か所のリン酸化活性が上昇し、275 か所が低下していることが明らかとなった。更にこれらの大規模データを基に統計科学的なネットワーク解析を行った結果、EGF 刺激依存的に mTOR パスウェイが顕著に活性化されていることを見出した (Kozuka-Hata et al., PLoS One, 7: e43398, 2012)。

2. 研究の目的

本研究課題では、膠芽腫幹細胞における幹細胞性を制御する要として mTOR パスウェイに焦点を絞り、mTOR 特異的阻害剤を用いた摂動によって包括的な定量プロテオーム解析並びに定量リン酸化プロテオーム解析を行う。得られた大規模データを基に統計科学的解析を実施し、出力結果を統合することにより当該細胞の幹細胞性を制御するハブとなる因子及び経路を抽出する。

3. 研究の方法

- (1) mTOR 特異的阻害剤 Torin1 を用いて膠芽腫幹細胞の EGF シグナルに関する摂動解析を行い、大規模定量プロテオームデータ及び定量リン酸化プロテオームデータの取得を行う。
- (2) 得られた定量プロテオームデータに関

して、DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) に基づく機能分類および細胞内局在に関する情報を取得し、IPA (Ingenuity Pathway Analysis; <http://www.ingenuity.com/>) を用いてパスウェイレベルでの詳細なネットワーク解析を行う。更に、リン酸化プロテオームデータに関して NetworKIN (<http://networkin.info/>) 及び Motif-x (<http://motif-x.med.harvard.edu/>) による上流キナーゼ予測解析を行い、これらの解析結果を統合して当該細胞の幹細胞性を規定する新規分子標的候補をシステムレベルで抽出する。

4. 研究成果

- (1) 患者由来膠芽腫幹細胞において mTOR 特異的阻害剤 Torin1 を用いた摂動実験により大規模な相対定量プロテオーム解析を行った結果、4,645 種類の同定蛋白質の中で Torin1 依存的に 49 分子の発現レベルが上昇し、436 分子が低下していた。
- (2) 包括的な定量リン酸化プロテオーム解析を行った結果、6,250 種類のリン酸化ペプチドが同定され、Torin1 依存的に 253 か所のリン酸化活性が上昇し、346 か所が低下していた。
- (3) Torin1 処理により、mTOR パスウェイの活性化の指標となる種々のリン酸化活性が低下しているのみならず、著名ながん幹細胞マーカーの発現が顕著に減少しており、mTOR パスウェイが当該細胞の幹細胞性制御を担っていることを支持する結果が得られた。
- (4) 得られたプロテオーム及びリン酸化プロテオーム情報に基づき、DAVID, IPA, NetworKIN 及び Motif-x を用いた統合ネットワーク解析を行った結果、DNA チェックポイント 細胞周期制御機構が当該細胞の幹細胞性制御に大きく関与することが示唆された。

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 19 件)

Hashimoto T, Horikawa DD, Saito Y, Kuwahara H, Kozuka-Hata H, Shin-I T, Minakuchi Y, Ohishi K, Motoyama A, Aizu T, Enomoto A, Kondo K, Tanaka S, Hara Y, Koshikawa S, Sagara H, Miura T, Yokobori S, Miyagawa K, Suzuki Y, Kubo T, Oyama M, Kohara Y, Fujiyama A, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A, and Kunieda T. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat.*

Commun., 7: 12808, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12808. 査読有.

Narushima Y, Kozuka-Hata H, Tsumoto K, Inoue J, and Oyama M. Quantitative phosphoproteomics-based molecular network description for high-resolution kinase-substrate interactome analysis. *Bioinformatics*, 32: 2083-2088, 2016. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw164. 査読有.

Hirano A, Nakagawa T, Yoshitane H, Oyama M, Kozuka-Hata H, Lanjakornsiripan D, and Fukada Y. USP7 and TDP-43: Pleiotropic Regulation of Cryptochrome Protein Stability Paces the Oscillation of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS One*, 11: e0154263, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154263. 査読有.

Yuki Y, Kurokawa S, Kozuka-Hata H, Tokuhara D, Mejima M, Kuroda M, Oyama M, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, and Kiyono H. Differential analyses of major allergen proteins in wild-type rice and rice producing a fragment of anti-rotavirus antibody. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 76: 128-136, 2016. DOI: 10.1016/j.yrtph.2016.01.023. 査読有.

Nishimura A, Yamamoto K, Oyama M, Kozuka-Hata H, Saito H, and Tatebayashi K. Scaffold Protein Ahk1, Which Associates with Hkr1, Sho1, Ste11, and Pbs2, Inhibits Cross Talk Signaling from the Hkr1 Osmosensor to the Kss1 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 36: 1109-1123, 2016. DOI: 10.1128/MCB.01017-15. 査読有.

Taniue K, Kurimoto A, Sugimasa H, Nasu E, Takeda Y, Iwasaki K, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Hiyoshi M, Kitayama J, Negishi L, Kawasaki Y, and Akiyama T. Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of UHRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113: 1273-1278, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1500992113. 査読有.

Sato Y, Kato A, Maruzuru Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, and Kawaguchi Y. Cellular Transcriptional Coactivator RanBP10 and Herpes Simplex Virus 1 ICP0 Interact and Synergistically Promote Viral Gene Expression and Replication. *J. Virol.*,

90: 3173-3186, 2016. DOI: 10.1128/JVI.03043-15. 査読有.

Narushima Y, Kozuka-Hata H, Koyama-Nasu R, Tsumoto K, Inoue J, Akiyama T, and Oyama M. Integrative Network Analysis Combined with Quantitative Phosphoproteomics Reveals TGFBR2 as a Novel Regulator of Glioblastoma Stem Cell Properties. *Mol. Cell. Proteomics*, 15: 1017-1031, 2016. DOI: 10.1074/mcp.M115.049999. 査読有.

Sato Y, Kato A, Arii J, Koyanagi N, Kozuka-Hata H, Oyama M, and Kawaguchi Y. Ubiquitin-specific protease 9X in host cells interacts with herpes simplex virus 1 ICP0. *J. Vet. Med. Sci.*, 78: 405-410, 2016. DOI: 10.1292/jvms.15-0598. 査読有.

Liu Z, Kato A, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, and Kawaguchi Y. Role of Host Cell p32 in Herpes Simplex Virus 1 De-Envelopment during Viral Nuclear Egress. *J. Virol.*, 89: 8982-8998, 2015. DOI: 10.1128/JVI.01220-15. 査読有.

Hirohata Y, Arii J, Liu Z, Shindo K, Oyama M, Kozuka-Hata H, Sagara H, Kato A, and Kawaguchi Y. Herpes Simplex Virus 1 Recruits CD98 Heavy Chain and β 1 Integrin to the Nuclear Membrane for Viral De-Envelopment. *J. Virol.*, 89: 7799-7812, 2015. DOI: 10.1128/JVI.00741-15. 査読有.

Inoue D, Nishimura K, Kozuka-Hata H, Oyama M, and Kitamura T. The stability of epigenetic factor ASXL1 is regulated through ubiquitination and USP7-mediated deubiquitination. *Leukemia*, 29: 2257-2260, 2015. DOI: 10.1038/leu.2015.90. 査読有.

Kobayashi R, Kato A, Oda S, Koyanagi N, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, and Kawaguchi Y. Function of the Herpes Simplex Virus 1 Small Capsid Protein VP26 Is Regulated by Phosphorylation at a Specific Site. *J. Virol.*, 89: 6141-6147, 2015. DOI: 10.1128/JVI.00547-15. 査読有.

Hirohata Y, Kato A, Oyama M, Kozuka-Hata H, Koyanagi N, Arii J, and Kawaguchi Y. Interactome analysis of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein H. *Microbiol. Immunol.*, 59: 331-337, 2015. doi: 10.1111/1348-0421.12255. 査読有.

Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, and Kawaoka Y.

Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe*, 16: 795-805, 2014. DOI: 10.1016/j.chom.2014.11.002. 査読有.

Ohta M, Ashikawa T, Nozaki Y, Kozuka-Hata H, Goto H, Inagaki M, Oyama M, and Kitagawa D.

Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nat. Commun.*, 5: 5267, 2014, DOI:10.1038/ncomms6267. 査読有.

Takai H, Masuda K, Sato T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Katou Y, Ogawa H, Morishita Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K, and Akiyama T. 5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep.*, 9: 48-60, 2014, DOI:10.1016/j.celrep.2014.08.071. 査読有.

Fujii H, Kato A, Mugitani M, Kashima Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, and Kawaguchi Y.

The UL12 protein of herpes simplex virus 1 is regulated by tyrosine phosphorylation. *J. Virol.*, 88: 10624-10634, 2014, DOI: 10.1128/JVI.01634-14. 査読有.

Maruzuru Y, Shindo K, Liu Z, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kato A, and Kawaguchi Y.

Role of herpes simplex virus 1 immediate early protein ICP22 in viral nuclear egress. *J. Virol.*, 88: 7445-7454, 2014, DOI:10.1128/JVI.01057-14. 査読有.

〔学会発表〕(計 11 件)

尾山 大明

高精度プロテオミクスによるシグナル伝達制御機構の数理ネットワーク解析
新学術領域「数理シグナル」第一回公開シンポジウム「数理シグナル」学術領域の創出 2017年2月11日 東京大学医科学研究所附属病院棟 8階 大会議室(招

待講演)

尾山 大明

大規模翻訳後修飾情報に基づくインタラクトーム解析
新学術領域「数理シグナル」第一回公開シンポジウム「数理シグナル」学術領域の創出 2017年2月11日 東京大学医科学研究所白金ホール

秦 裕子

膠芽腫幹細胞情報伝達系の数理システム解析
新学術領域「数理シグナル」第一回公開シンポジウム「数理シグナル」学術領域の創出 2017年2月11日 東京大学医科学研究所白金ホール

秦(小塚)裕子、成島 悠太、廣木 朋子、那須 亮、津本 浩平、井上 純一郎、秋山 徹、尾山 大明

高精度定量リン酸化プロテオミクスと大規模インタラクトーム情報を基盤とする膠芽腫幹細胞情報伝達系の統合ネットワーク解析
第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日 パシフィコ横浜 (シンポジウム発表)

Masaaki Oyama

Phosphoproteomics-based Network Analysis of Cancer Cell Signaling Regulation
The 8th Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) Congress 2016年9月23日 Fleur De Chine Hotel, Sun Moon Lake, Taiwan (Invited)

秦 裕子、廣木 朋子、那須 亮、津本 浩平、井上 純一郎、秋山 徹、尾山 大明
mTOR 阻害剤を用いた膠芽腫幹細胞プロテオーム及びリン酸化プロテオームに関する統合摂動解析

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015) 2015年12月4日 神戸ポートアイランド (口頭発表)

成島 悠太、秦 裕子、那須 亮、津本 浩平、井上 純一郎、秋山 徹、尾山 大明
高精度定量リン酸化プロテオミクスに基づく統合ネットワーク解析による膠芽腫幹細胞分化制御因子の同定
第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015) 2015年12月3日 神戸ポートアイランド

秦 裕子、廣木 朋子、那須 亮、津本 浩平、井上 純一郎、秋山 徹、尾山 大明

mTOR 阻害剤を用いた膠芽腫幹細胞プロテオーム及びリン酸化プロテオームに関する統合摂動解析
第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015)
2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド

秦 裕子

IPA Advanced Analytics を活用した膠芽腫幹細胞における蛋白質制御ネットワークの解明
Ingenuity ユーザーミーティング 2015 年 10 月 2 日 (招待講演)

Masaaki Oyama

High-resolution phosphoproteomics defines regulation of cancer cell signaling
2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling 2015 年 1 月 24 日、The Auditorium, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo (招待講演)

Hiroko Kozuka-Hata

Sophisticated proteomics technologies for identifying protein-protein interaction sites using cross-linking / high-resolution mass spectrometry
2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling 2015 年 1 月 23 日、The Auditorium, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

〔図書〕(計 3 件)

尾山 大明、秦 裕子 「リン酸化プロテオミクスに基づく数理ネットワーク解析」実験医学増刊「初めての数理モデルとシミュレーション」羊土社、Vol35、No.5, 183-186, 2017.

Kozuka-Hata H and Oyama M

Phosphoproteomics-based network analysis of cancer cell signaling systems.
In Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling (ed. Jun-ichiro Inoue and Mutsuhiro Takekawa), Springer, 3-15, 2015.

Homma MK, Shibata T, Suzuki T, Ogura M, Kozuka-Hata H, Oyama M, and Homma Y. Role for protein kinase CK2 on cell proliferation: Assessing CK2 complex components in the nucleus during the cell cycle progression.
In Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States (ed. Khalil

Ahmed, Olaf-Georg Issinger, and Ryszard Szyska), Springer, 197-226, 2015.

〔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
東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー
(<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/mppl/top.html>)

アウトリーチ活動

2014 年 4 月 17 日 盛岡市立北陵中学校
2014 年 4 月 24 日 いわき市立大野中学校
2014 年 5 月 1 日 喜多方市立第三中学校
2014 年 5 月 9 日 海津市立日新中学校
2014 年 5 月 13 日 仙台市立五橋中学校
2014 年 5 月 15 日 弥富市立弥富北中学校
2014 年 5 月 29 日 福井市立成和中学校
2014 年 6 月 4 日 安城市立東山中学校
2014 年 6 月 12 日 みよし市立北中学校
2014 年 9 月 18 日 海津市立平田中学校
2014 年 10 月 8 日 広島県立高陽東高校
2014 年 10 月 22 日 鳴門教育大学附属中学校
2015 年 2 月 4 日 京都市立西京高校附属中学校
2015 年 3 月 26 日、27 日 上智福岡高校
2015 年 8 月 5 日 大阪府立天王寺高校
2016 年 2 月 18 日 庄内町立余目中学校
2016 年 4 月 22 日 那須塩原市立東那須野中学校
2016 年 4 月 27 日 会津若松市立一箕中学校
2016 年 5 月 24 日 西尾市立一色中学校
2016 年 6 月 1 日 江南市立古知野中学校
2016 年 6 月 7 日 名古屋市立萩山中学校
2016 年 8 月 4 日 大阪府立天王寺高校
2016 年 8 月 19 日 上野学園中学校高校
2016 年 10 月 19 日 広島県立高陽東高校
2016 年 10 月 20 日 四日市市暁中学校
2016 年 10 月 20 日 鳴門教育大学附属中学校
2016 年 10 月 28 日 西東京市立田無第四中学校
2016 年 11 月 17 日 石見智翠館高校
2017 年 2 月 23 日 庄内町立余目中学校
2017 年 3 月 17 日 いわき秀英高校

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 裕子 (KOZUKA-HATA, Hiroko)
東京大学・医科学研究所・技術専門員
研究者番号: 80401256

(2) 研究分担者

尾山 大明 (OYAMA, Masaaki)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 30422398