

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640080

研究課題名(和文)次世代プロテオミクスを用いたがんにおけるワールブルグ効果の根本的な解明

研究課題名(英文)Elucidation of Warburg effect in cancer with the next-generation proteomics

研究代表者

中山 敬一(Nakayama, Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80291508

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)：われわれは従来バリデーションベースに使用されているターゲットプロテオミクスの代表的な方法であるMultiple Reaction Monitoring (MRM) 法を発展させることで網羅的かつ高精度でタンパク質絶対定量を行うための基盤技術の開発を行い、新方法であるinformation-based MRM (iMRM) 法を発明した(特許第5468073号)。本研究ではiMRM法によって正常細胞とがん細胞中の全ての代謝酵素(約1000種類)および代謝物を絶対定量し、システム生物学的な手法を用いてワールブルグ効果の鍵分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：we developed a new platform (information-based MRM: iMRM) that allows genome-wide absolute quantification of the human proteome and is reliant on the production of ~18,000 recombinant proteins. We applied iMRM to delineate the metabolic landscape of human diploid fibroblasts. Oncogenic transformation of these cells gave rise to relatively small but global changes in metabolic pathways that account for aerobic glycolysis (Warburg effect) and increased rates of macromolecule synthesis. Modulation of metabolic enzyme expression revealed an unexpected functional interaction between glycolysis and the pentose phosphate pathway that facilitates nucleic acid synthesis. Furthermore, integration of proteomic and metabolomic data allowed construction of a mathematical model for identification of key enzymes responsible for the metabolic shift in cancer. Our results thus provide a global view of metabolic restructuring in cancer that underlies adaptation to a rapid growth state.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん プロテオミクス ワールブルグ効果 代謝

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画が終了した現在、生命の本質を知るためには、生命システムをダイナミックネットワークとして定量的に記述し理解するシステム生命科学的手法が求められている。しかし現行のタンパク質量技術であるウェスタンブロットリング法は半定量的で相対定量であるため、計算科学に適さない。そこで現在、全く新しいタンパク質の網羅的定量手法が求められている。われわれが開発した iMRM 法は 10 年以上かかると言われているこのヒトプロテオーム計画を 1 年で完遂する能力を有する。この新技术を用いてがんにおける代謝ネットワーク構成因子を網羅的に計測し、数理科学的手法を適用することによって、がん代謝の全体像と特徴を把握し、がんの根本的治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

がんでは大規模な代謝シフト(ワールブルグ効果)が起こることが 90 年前より知られているが、そのメカニズムや目的については現在でもほとんどわかっていない。最近われわれはヒトの全種類のタンパク質について、その絶対存在量(1細胞あたりの分子数)を直接測定できる革新的質量分析法『情報基盤定量法(iMRM法)』(特許出願中)の開発に世界で初めて成功した。この方法は現行のウェスタンブロットリング法等の100万倍以上のスループット性能があり、今まで10年以上かかると言われていたヒトプロテオーム解読を1年以内に完遂することが可能である。本課題では、この技術を用いて世界初の完全ヒトプロテオーム解読を行い、全ての代謝酵素を絶対定量することによって、システムバイオロジック的なアプローチによりがんにおける代謝シフト(ワールブルグ効果)の全貌を解明することを目指す。

3. 研究の方法

1) iMRM 定量メソッドの最適化

大規模に合成した組み換えタンパク質を酵素消化し、得られたペプチド試料を、LC-MS/MS 解析を行うことで、各ペプチドの座標(LC上の保持時間、質量、部分質量)の決定を行い、これらの情報をデータベース化して、それを元にしてMRM(multiple reaction monitoring)法を実施し、タンパク質の絶対量を算出する。この方法を情報基盤定量法(information-based iMRM: 略称 iMRM)と称する。この情報を元にして大規模なシングルペプチドの合成を開始する。

2) 代謝経路の絶対定量による正常細胞とがん細胞の差異の検討

代謝パスウェイは約1,000種類の酵素によって触媒される連続した生化学反応であり、代謝酵素を計測すれば細胞内における代謝酵素活性を概算することも可能である。われわれは iMRM を用いて全代謝酵素の絶対定量を行った。また同時に主要な代謝物の定量も

施行した。

3) トランスフォーム細胞を用いたがん代謝シフト(ワールブルグ効果)の本質解明

プロテオーム解析を始めとするオミクス研究においては膨大なデータから生物学的知見を導き出すことが要求される。そのためには、再現性の高く、解釈が容易な解析対象を選定する必要がある。本研究ではヒト正常細胞に対して各種がん関連遺伝子の導入によって人工的にがん化誘導を行うモデルシステムを構築する。ヒト正常細胞はマウス等の細胞に比べて単一がん原遺伝子導入ではがん化しないことが知られている。そこで、TERT 遺伝子と SV40 遺伝子を導入した細胞に Myc、活性型 Akt、活性型 Rasなどを多重導入しがん化を誘導する。本モデルシステムの利点はがん化の引き金となる因子が前もって明らかなことであり、膨大で複雑なデータの解釈が要求される大規模解析において有用な情報となる。

4. 研究成果

われわれはヒト 18,000 種類以上のタンパク質に関して、全てリコンビナントタンパク質を合成し、LC-MS/MS 解析を行って、感度の高いペプチド(prototypic peptide: PTP)の情報取得を完了した(約200,000ペプチド)。これらの情報から、主要パスウェイ構成タンパク質約2,000種類に関して、高感度定量用ペプチドの選定と各種パラメータの最適化を行った。これによって iMRM 法はほぼ完成した。

代謝酵素絶対定量のための最適化は終了し、iMRM 法にてヒト正常線維芽細胞における600種類程度の代謝酵素の絶対量計測に成功した。この規模でタンパク質の絶対定量を行った例はなく、世界初の成果である。その結果、代謝酵素の存在量は1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子と極めて広いダイナミックレンジを有していることが明らかとなった。このように代謝酵素のタンパク質絶対量が判明すれば、メタボローム情報と合わせて代謝経路の *in silico* での再現が可能になった。

そこで実際にがん細胞の特性を調べるために、ヒト正常線維芽細胞(TIG-3)に c-Myc を過剰発現させ細胞をトランスフォームした。細胞の形態の変化、増殖能の亢進、足場非依存性、さらにはがん細胞の代謝的特徴であるワールブルグ効果が観測された。この系を用いて、親細胞とトランスフォーム細胞の全代謝酵素を絶対定量し、その変化をネットワークレベルで解明した。さらに鍵分子のノックダウンを行い、複数の鍵分子がワールブルグ効果に重要な役割を担っていることを証明した。このようにがん細胞において全てのタンパク質を絶対定量し代謝ネットワークの歪みとしてその特性を理解することによって、がん特有の代謝シフトであるワールブルグ効果の本質が解明された。今後はこの知見に基づく新たながん治療法が確立され

ることが期待される。

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7件)

Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K., Nakayama, K. I.: F-box protein FBXW7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner. *J. Clin. Invest.*, 125: 621-635 (2015). 査読有. DOI: 10.1172/jci78782

Saita, S., Shirane, M., Ishitani, T., Shimizu, N., Nakayama, K. I.: Role of the ANKMY2-FKBP38 Axis in Regulation of the Sonic Hedgehog (Shh) Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.*, 289: 25639-25654 (2014). 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M114.558635

Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K. I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24. *Mol. Cell. Biol.*, 34: 3321-3340 (2014). 査読有. DOI: 10.1128/mcb.00320-14

Yugi, K., Kubota, H., Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., Funato, Y., Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T., Kuroda, S.: Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep.*, 8: 1171-1183 (2014). 査読有. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.021

Moroishi, T., Yamauchi, T., Nishiyama, M., Nakayama, K. I.: HERC2 targets the iron regulator FBXL5 for degradation and modulates iron metabolism. *J. Biol. Chem.*, 289: 16430-16441 (2014). 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M113.541490

Matsumoto, A., Takeishi, S., Nakayama, K. I.: p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. *Blood*, 123: 3429-3439 (2014). 査読有. DOI: 10.1182/blood-2013-10-532390

Hashimoto, Y., Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T., Nakayama, K. I.: Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *J. Biol. Chem.*, 289:

12946-12961 (2014). 査読有. DOI: 10.1074/jbc.M113.528687

[学会発表](計15件)

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. 第 2 回 Medical Frontier Consortium Beyond the Organcentric Dogma. 東京. (3/28, 2015).

中山敬一. がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. 第 3 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会. 福岡. (2/21, 2015).

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. 第 13 回群馬大学大学院医学系研究科・大学院生によるワークショップ「未来を切り拓く医学研究」. 前橋. (2/13, 2015).

中山敬一. 次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. 第 45 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「がんの多様性に応じた研究・治療 - 創薬のパラダイムシフト - ». 東京. (1/13, 2015).

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会. 福岡. (11/23, 2014).

Nakayama, K. I. Deep and absolute quantification of human proteome unveils a global landscape of cancer metabolism. The 4th Japan-France Cancer Workshop. Kyoto. (11/19, 2014).

中山敬一. がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. 第 134 回山口県医師会生涯研修セミナー. 山口. (11/9, 2014).

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. 第 23 回長崎障害者支援再生医療研究会. 長崎. (11/4, 2014).

中山敬一. 次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜. (9/25, 2014).

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. 第 8 回レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会. 宮崎. (8/21, 2014).

中山敬一. がんの完治に向けた次世代型アプローチ. 第 50 回姫路市医師会夏期大学. 姫路. (7/27, 2014).

中山敬一. 医学研究に貢献する最先端分析技術. 九州プロサーチオープニングセミナー. 福岡. (7/26, 2014).

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90 年来のがん

の秘密を解き明かす. 第 7 回 KAITEKI Forum. 東京. (7/8, 2014).

中山敬一. 全タンパク質の絶対定量によるがん代謝シフトの解明. 第 14 回日本蛋白質科学会年会. 横浜. (6/25, 2014).

中山敬一. 次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. 生命科学系 3 分野がん・ゲノム・脳支援活動合同シンポジウム. 東京. (5/27, 2014).

〔図書〕(計 2 件)

武石昭一郎, 中山敬一. DNA 量の変化などを用いた細胞周期の解析. 実験医学別冊「直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!」(中内啓光, 清田純 編) pp. 46-57. 羊土社 (東京). (2014).

沖田康孝, 中山敬一. 形態学的・生化学的变化を用いたアポトーシスの解析. 実験医学別冊「直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!」(中内啓光, 清田純 編) pp. 72-83. 羊土社 (東京). (2014).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 新規悪性腫瘍診断技術
発明者: 中山敬一、三森功士
権利者: 国立大学法人九州大学
種類: 特許出願
番号: 特願 2014-266001
出願年月日: 2014 年 12 月 26 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)
九州大学生体防御医学研究所・主幹教授
研究者番号: 8 0 2 9 1 5 0 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし