

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09054

研究課題名(和文)膵臓癌細胞特異糖鎖修飾ルミカンを標的とした新規膵癌早期発見法の開発

研究課題名(英文) Development of novel early diagnostic method targeted specific glycosylated lumican in pancreatic cancer

研究代表者

山本 哲志 (YAMAMOTO, Tetsushi)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：20453920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Lumicanは糖鎖修飾されることが知られているが、産生される臓器や細胞により異なる糖鎖修飾を受けることが示唆されている。今回、膵臓癌細胞でのみ産生される特異糖鎖修飾を受けたlumicanの存在について検討するため、消化器癌細胞より産生されるlumicanの精製を試みた。その結果、食道癌と膵臓癌細胞から産生・分泌されるlumicanを精製することができた。また、そのlumicanの発現パターンの違いを検討した所、膵臓癌細胞特異的と思われるlumicanが発現していた。このことから、この膵臓特異的に発現するlumicanを標的とした新たな診断法の開発につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that there are organ or tissue specific lumican based on different glycosylation. In this study, we performed purification of lumican that is produced by gastrointestinal cancer cells using transfection of lumican expression vector to investigate whether there is a specific glycosylated lumican that is produced by pancreatic cancer cells. We successfully purified the lumican that was produced by esophageal and pancreatic cancer cells. Then, we examined the difference in expression pattern of these lumican, and found differentially expressed lumican that was considered pancreatic cancer cell specific. Thus, this lumican might be a novel target for development of diagnostic method for pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ルミカン 膵臓癌 糖鎖修飾 プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

Lumican は小型ロイシンリッチプロテオグリカンファミリーに属しているプロテオグリカンの1種であり、そのコアタンパク内に10個のロイシンリッチリピート構造と4カ所の糖鎖修飾が可能な部位を持っている。皮膚の真皮や目の角膜においては、ケラタン硫酸鎖が付加した lumican が豊富に存在し、膠原線維の配列を調整している。そのため、眼科領域では角膜の創傷治癒と関連して研究が進められている。

一方、腫瘍領域においても、大腸癌、乳癌、子宮頸癌、悪性黒色腫細胞や骨肉腫細胞など様々な腫瘍で lumican の発現が報告されている。また、その機能についても検討が進められており、骨肉腫細胞では、分子量 64kDa の lumican を分泌しており、この発現を抑制すると細胞増殖が亢進することが報告された。また、悪性黒色腫細胞では分子量 50kDa の lumican を発現しており、遺伝子導入により過剰発現させるとアポトーシスを誘導することによる細胞増殖の抑制効果が報告されている。これらの報告より、発現している臓器が異なると産生されている lumican の分子量が異なることから、臓器特異的な lumican の発現が示唆されている。

我々はこれまでにヒト胎児腎細胞株(HEK 293)に lumican を遺伝子導入し、過剰発現株を作成すると、約 50kDa のタイプの lumican を過剰に分泌し、in vitro での細胞増殖能が抑制されることを報告した(Ishiwata T, et al. *Exp Mol Pathol.*, 2010)。また、膵臓癌組織におけるルミカンの発現とその機能についての検討では、癌周囲の間質でのルミカンの発現が、十二指腸や後腹膜への浸潤や予後の悪化と関連することを報告している(Ishiwata T, et al. *Oncol Rep.*, 2007)。さらに、ヒト培養膵臓癌細胞を用いて lumican の機能について詳細に検討した所、培養膵臓癌細胞は、約 70kDa の糖鎖修飾された lumican を分泌していることが明らかとなった。ヒト膵癌培養細胞の一つである PANC-1 細胞に lumican の遺伝子を導入した過剰発現細胞と siRNA を導入した発現抑制細胞を用いて検討した所、この糖鎖修飾された 70kDa の lumican の分泌量が変動した。その結果、lumican は in vitro における膵臓癌細胞の増殖能と浸潤能に関与していることが明らかとなった(Yamamoto T, et al. *Cancer Lett.*, 2012)。また、これらの lumican 発現変動細胞を用いてプロテオーム解析を行ったところ、アポトーシスのマーカーである Annexin A5 やマトリックスメタロプロテアーゼの発現調節に関わるメタロチオネインの発現が lumican の発現と相関を示していることも報告した(Yamamoto T, et al. *Oncol Rep.*, 2013)。

これまでの結果から lumican の糖鎖修飾の違いが、分泌されている lumican の分子量の違いに関連することが推測される。そこで、

消化器癌細胞より分泌されている lumican の糖鎖修飾構造を詳細に検討することで、膵臓癌細胞により特異的に分泌される糖鎖修飾 lumican の存在を確認することができるものと考えられる。さらに、この膵臓癌特異糖鎖修飾 lumican を標的とした血中での検出法の開発は、新たな膵臓診断法の開発に関する基礎的な検討につながることを期待される。癌における糖鎖修飾の異常は、発生した組織によって特異的に起こる可能性があるため、本研究によって膵臓癌細胞を含む消化器癌細胞のそれぞれの糖鎖を比較検討することで、癌特異的な糖鎖修飾を標的とした新たな診断法の開発につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

ヒト培養消化器癌細胞 PANC-1 (膵臓癌)、DLD-1 (大腸癌)、KATO-III (胃癌)、OE33 (食道癌)にそれぞれ lumican 発現ベクターを導入し、lumican 過剰発現細胞を調製する。これらの細胞より培養液中に分泌される lumican を抽出・精製する。精製した lumican の糖鎖修飾構造及び修飾部位を酵素消化法や質量分析計を用いて解析する。これにより、膵臓癌細胞により特異的に産生・分泌される特異糖鎖修飾 lumican の構造について明らかにする。次に精製された lumican を酵素消化し、得られたペプチド断片を質量分析計を用いた Selective Reaction Monitoring (SRM)法により特異糖鎖修飾ペプチドのみを選択に定量することで膵臓癌特異糖鎖修飾 lumican の分析法について基礎的検討を行う。最後に、精製した膵臓癌特異糖鎖修飾 lumican をマウスもしくはラットの血液中に一定量混合した血液サンプルを調製し、先の検討で確立した分析法で検出するための前処理条件や分析条件の最適化を行うことで、膵臓癌特異 lumican を標的とした新規診断法開発の基礎検討をする。

3. 研究の方法

(1) Lumican 発現ベクターの作製

pFN21A vector(Halo タグ付き組換えタンパク質発現用)及び pCMV6 vector(Flag タグ付き組換えタンパク質発現用)に lumican の cDNA を組み込んだルミカン発現ベクターを作成した。

(2) Lumican 過剰発現細胞の作製

(1)で作成した発現ベクターを培養消化器癌細胞に、FuGENE HD を用い化学的に遺伝子導入した。Real-time PCR 及び western blot を行うことで mRNA 及びタンパク質が過剰発現していることを確認した。

(3) Lumican の精製

(2)で作成した過剰発現細胞を 72 時間培養後、培養液採取した。培養液中に分泌された lumican を Anti DYKDDDDK tag Antibody Beads を用いて精製した。それぞれの細胞から得られた lumican を SDS-PAGE 及び western blot を行うことで確認した。

(4) Lumican 発現抑制細胞におけるアポトー

シスの解析

Lumican の siRNA (Applied 社) を PANC-1 及び BxPC-3 細胞に RNAi MAX を用い化学的に遺伝子導入した。対照細胞には他の遺伝子発現に影響を与えない negative control siRNA を導入した。Lumican 発現抑制細胞を 48 時間培養した後、RealTime Glo Annexin V Apoptosis Assay キットを用いてアポトーシスを測定した。

4. 研究成果

膵臓癌・食道癌・胃癌・大腸癌など消化器癌細胞で発現・分泌している lumican を解析することで、糖鎖修飾構造の異なる、膵臓癌細胞に特異的な糖鎖修飾構造をもつ lumican の存在を明らかにするため、タグ付の lumican 発現ベクターを構築した。

まず初めに、本研究の目的でもある膵臓癌細胞におけるルミカンを解析するために、培養膵臓癌細胞である PANC-1 と BxPC-3 の 2 種類の細胞に遺伝子導入を行った。Real-time PCR で lumican mRNA の過剰発現を確認した結果、対照細胞と比較して、遺伝子導入を行ったそれぞれの細胞において lumican の遺伝子発現が、数千から数万倍に上昇していた。しかしながら、western blot で lumican タンパク質の過剰発現を確認した所、遺伝子発現で認められたような過剰発現を確認することができなかった。このことは、大過剰に発現した lumican mRNA により、タンパク質の翻訳系に何らかの障害を及ぼしたことが考えられたため、新たに異なるタグ付の lumican 発現ベクターを構築し、これを培養消化器癌細胞に遺伝子導入を行った。

培養膵臓癌細胞である BxPC-3 と培養食道癌細胞である OE33 の 2 種類の細胞に、新たに調製した lumican 発現ベクターの遺伝子導入を行った。Real-time PCR で lumican mRNA の過剰発現を確認した結果、いずれの細胞においても対照細胞と比較して、遺伝子導入を行った細胞において lumican の遺伝子発現が、有意に上昇していた。次に培養液中に分泌された lumican のタンパク質を精製するため、タグに対して親和性を示す担体を用いたアフィニティー抽出を試みた結果、それぞれの細胞より培養液中に分泌された lumican を抽出することに成功した。

次に培養胃癌細胞である KATO-III と培養大腸癌細胞である SW480 に遺伝子導入を行い、膵臓癌細胞や食道癌細胞と同様の検討を行ったところ、いずれの細胞においても遺伝子の過剰発現を確認することはできたが、培養液中に分泌された lumican のタンパク質を膵臓癌細胞や食道癌細胞と同じ条件で抽出することができなかったため、遺伝子導入に用いる発現ベクターの量や遺伝子導入試薬の種類などの遺伝子導入の条件や抽出に用いるアフィニティー担体の使用量や種類などの抽出の条件のさらなる検討が必要であると考えられた。

一方、食道癌と膵臓癌細胞から精製してきた lumican の発現パターンの違いを SDS-PAGE を行うことで検討した所、それぞれの細胞には一部分子量の異なる lumican が存在していることが確認できた。このことから、臓器特異的に発現する lumican が存在することが示唆されたが、他の消化器癌細胞から産生・分泌される lumican を精製し、より詳細な比較解析を行う必要があると考えられた。

また、膵臓癌細胞で発現している lumican の機能についても解析を行った。これまでの検討により明らかとなっていた、lumican の発現を抑制した際に膵臓癌細胞の増殖が抑制される機構について検討を行ったところ、培養膵臓癌細胞である PANC-1 の lumican の発現を抑制するとアポトーシスが誘導され、細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。一方、Ras に変異のない野生型の培養膵臓癌細胞である BxPC-3 では、lumican の発現を抑制してもアポトーシスの誘導を介した細胞増殖の抑制効果がほとんど認められないことを新たに明らかにした。このことから lumican は Ras を介した経路に作用することで膵臓癌細胞の増殖に関与することが示唆された。膵臓癌患者の多くでは、Ras への変異が認められることから、lumican を標的とした治療法の開発は、健常者にはあまり影響を与えず、膵臓癌患者に対してのみ効果を発揮する選択的な治療法になり得ることが考えられた。

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 3 件)

Nagai N, Yamamoto T, Mitamura K, Taga A. Proteomic profile of the lens in a streptozotocin-induced diabetic rat model using shotgun proteomics., *Biomed Rep.*, 査読有, 7 巻, 2017 年, 445-450 ページ doi: 10.3892/br.2017.988

Yamamoto T, Sato K, Kubota Y., Mitamura K, Taga A. Effect of dark-colored maple syrup on cell proliferation of human gastrointestinal cancer cell., *Biomed Rep.*, 査読有, 7 巻, 2017 年, 6-10 ページ doi: 10.3892/br.2017.910

Yamamoto T, Kudo M, Peng WX, Takata H, Takakura H, Teduka K, Fujii T, Mitamura K, Taga A, Uchida E, Naito Z. Identification of aldolase A as a potential diagnostic biomarker for colorectal cancer based on proteomic analysis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue., *Tumor Biol.*, 査読有, 37 巻, 2016 年, 13595-13606 ページ doi: 10.1007/s13277-016-5275-8

[学会発表](計 1 件)

山本 哲志, 谷田 和香奈, 橋本 知樹,

三田村 邦子, 多賀 淳, 細胞外基質
Lumican の発現抑制による新規膵臓癌
細胞増殖抑制法の開発, 日本薬学会第
137 年会, 2017 年 3 月 25 日 ~ 2017 年 3
月 27 日, 国際センター(宮城県仙台市)
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 哲志 (YAMAMOTO, Tetsushi)
近畿大学・薬学部・助教
研究者番号：20453920

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし