

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04730

研究課題名(和文) シングルセル・プロテオミクスによるがん幹細胞特性解明

研究課題名(英文) Single cell proteomics to molecular characterization of cancer stem cells

研究代表者

松本 雅記 (Masaki, Matsumoto)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60380531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：18000種類以上の組換えタンパク質を用いて、ゲノムワイドなタンパク質絶対定量である *in vitro* proteome assisted MRM for protein absolute quantification (iMPAQT) 法を確立した(Nature Methods, 2017)。さらに、試料調製や導入法を改良することで高感度化し、少数細胞プロテオーム解析を実現可能とした。また、細胞周期制御因子p57を新規がん幹細胞マーカーとして同定し、これを指標にがん幹細胞を濃縮する手法を確立した。最終的にこれらを組み合わせたマルチオミクス解析によってがん幹細胞の分子シグニチャーの同定を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって次世代型の定量プロテオミクスの技術基盤を確立することができた。これは、汎用的に利用されている手法と比べて精度や特異性において優れており、生命科学におけるタンパク質の解析に革新をもたらすことが期待される。さらに、高感度化によって少数細胞プロテオーム解析を実現可能としたことで、がん幹細胞の特徴を分子レベルで捉えることができるようになったことは、がんの根治を目指す医学研究を大いに促すものである。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new targeted proteomics platform *in vitro* proteome assisted MRM for protein absolute quantification (iMPAQT) using >18,000 human recombinant proteins for genome-wide protein absolute quantification (Matsumoto et al., Nature Methods, 2017). Improvements of sample preparation and sample loading system enable us to measure proteome in very small amount of sample. We found that a cell cycle regulator, p57 protein is a good marker for cancer stem cell. On the basis of the expression of p57, cancer stem cells were effectively enriched. Finally, we performed multi-omics approach to identify the molecular signature of cancer 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 1細胞分析 がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、わが国において約二人に一人が罹患し、約三人に一人が死亡するという現代医学が直面する最大の問題である。抗がん剤は一部の治療抵抗性の細胞群に対しては無効で、結果的に再発・転移につながる。近年の研究から、これら治療抵抗性の細胞は「がん幹細胞」であることが次第に明らかになってきた。がん細胞が特殊な代謝状態にあることは90年前から知られているが、がん幹細胞の代謝システムがどのような状態にあるのかという研究はほとんどなく、大きな謎として残されている。最大の障壁は、がん幹細胞が全がん細胞の1万分の1以下の“超少数”の細胞群であることで、現行のプロテオミクス技術では、がん幹細胞のタンパク質情報を得ることはほぼ不可能である。申請者はこれまでに、数多くのプロテオーム解析技術の開発とその応用を行ってきた。さらに、最近では次世代型プロテオミクス技術である iMPAQT (in vitro proteome-assisted Multiple reaction monitoring for Protein Absolute Quantification) 法を考案している（特許第5468073号）。

## 2. 研究の目的

生命システムの動態（挙動）を分子情報で表現するには、タンパク質の総体であるプロテオーム情報を様々な条件下で時間軸に沿って定量的に取得する必要がある。しかしながら、核酸を対象としたオミクス計測技術は超微量試料対応が進んでいる一方で、核酸のように増幅反応ができないタンパク質を扱う現行のプロテオーム解析法は極めて未成熟である。そこでわれわれはヒト完全長 cDNA ライブラリーを用いてヒト全タンパク質を試験管内合成し、すべてのタンパク質に対する MRM 解析に必要な事前情報をすべて取得・データベース化することによってゲノムワイドな MRM 法を可能とする新規解析プラットフォームを考案し、iMPAQT 法と名付けた（特許第5468073号）。本研究では、この新技术を完成・実用化し、がん幹細胞の解析に応用し、少数細胞のプロテオーム解析を実現可能とすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) がん幹細胞標識システムの構築

がん幹細胞の研究領域においては、がん幹細胞をいかに純化するかが大きな問題になっている。現行法のほとんどは表面抗原マーカーを用いて純化するものであるが、それが果たしてがん幹細胞のみを集めてきているのかは不明である。そこで本研究ではがん幹細胞マーカーを探索し、これを用いて、がん幹細胞を濃縮する仕組みを構築する。がん幹細胞マーカーの候補とし細胞周期制御因子である p57 を見出している。これが真にがん幹細胞のマーカーとなり得るのかを評価するとともに、通常細胞核に存在する p57 を発現する細胞を生細胞のまま濃縮する技術を開発する。

### 2) 微量細胞プロセスシステムの構築

上記の結果標識可能となったがん幹細胞を高性能セルソーター等を用いて回収後、プロテオーム解析を行うための試料調製プロセスの開発を行う。質量分析計を用いたプロテオーム解析には、細胞からのタンパク質の抽出、酵素消化などが必須であるが、シングルセルの解析のように超微量の試料ではこれらを損失なく実施する手段が存在しない。そこで、微小ウェルを用いたタンパク質抽出や酵素消化の手法を確立する。

### 3) iMPAQT システムの実用化

われわれが考案した iMPAQT 法を実用化するために、データベースの構築、質量分析計の高感度化、解析ソフトウェアの開発を行う。実用化が完了したら、微量細胞試料での解析を実現するために、試料調製プロセスの微小化や効率のより質量分析計への試料導入法の開発を行う。

### 4) がん幹細胞のトランスオミクス解析ミクス解析

細胞システムの成り立ちを鑑みると、がん幹細胞を支配する分子ネットワークは異なるオミクス階層にまたがって構成されていることが想定されることから、タンパク質階層だけではなく、その関連階層のオミクスの情報の取得とその統合を行う。

### 5) 数理モデルリングによるがん幹細胞分子ネットワーク解析

がん幹細胞のシングルセル・プロテオミクスから得られた高度に定量的なタンパク質の網羅的測定データを基に、がん幹細胞特異的ネットワークの構造決定を試みる。

### 6) がん代謝ネットワークを対象とした創薬標的の探索

作成した一次数理モデルを解析することで、各がん疾患ネットワークにおけるハブ分子を

探索する。例えば数理モデル上で特定のタンパク質の濃度をゼロにすると（インシリコノックアウト）、その影響で他のタンパク質濃度がどのように変動するかをシミュレーション可能である。インシリコの解析で重要分子の推定ができたなら、各々の分子に関して検証実験を実施する。最終的には、当該分子を標的とする薬剤のスクリーニングを行い、創薬シーズの発見を目指す。

#### 4. 研究成果

##### 1) がん幹細胞濃縮法の構築

がん幹細胞の細胞周期は非常に不活発で静止状態にあることが知られているが、その静止状態をもたらしているものは p57 であることを見出した。したがって、p57 が有効ながん幹細胞マーカーであることが推定されるが、p57 は核内に存在するタンパク質であり、通常の方法で p57 発現細胞を回収することは困難である。そこでマウス p57 遺伝子に Cre リコンビナーゼ/エストロゲンレセプター融合体 (Cre-ER) を組み込み、p57 遺伝子が転写・翻訳されると同時に Cre-ER が発現する仕組みを構築した。この方法によって、がん幹細胞のみを蛍光で標識することが可能になった。

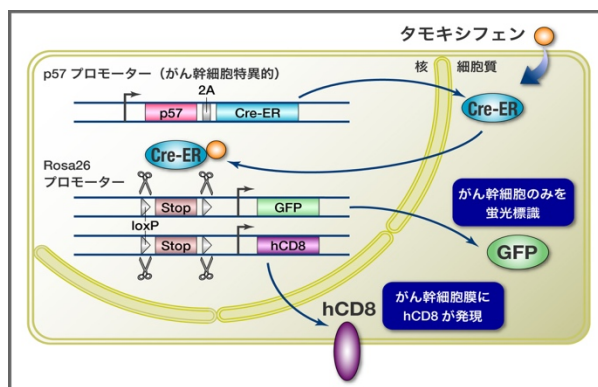


図1 がん幹細胞標識システムの構築

がん幹細胞特異的マーカーp57のプロモーター下流に Cre-ER を組み込み、タモキシフェンによって Rosa26 領域に組み込んだ蛍光タンパク質 (GFP) とヒト CD8 抗原 (hCD8) を発現させる。

##### 2) 微量細胞からのプロテオーム解析試料調製技術の構築

微量容積を吸引/吐出が可能なシリンジポンプに接続したフューズドシリカキャピラリーを用いてガラスプレート上で細胞溶解、酵素消化を実施することに成功した。得られた消化液を、そのまま HPLC カラムに直接導入を行うことで、超微量試料の損失を防いで質量分析することが可能であった。

##### 3) iMPAQT 法の実用化と 1 細胞解析への応用

ヒト組換えタンパク質ライブラリーを用いてターゲットプロテオミクスに必要な事前情報を大規模に取得し、データベースを構築した。さらに、これらの情報を用いて実際に MRM 計測を行うことで、各 MRM メソッドの感度や特異性の実験的評価を行い、これらの情報もデータベースに取り込み、公開データベースを作成した (Matsumoto M. et al. *Nature Method*, 2017)。さらに、iMPAQT 法を用いて代謝経路の一斉定量系を構築した (図 2)。

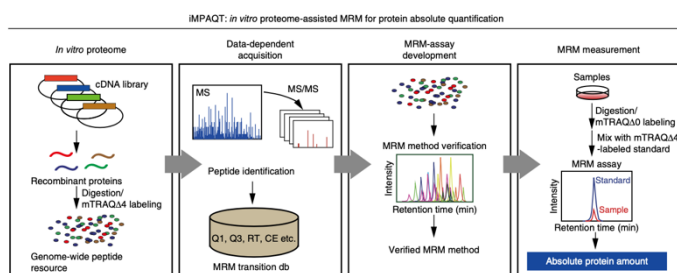


図2 | iMPAQT 法の概要

組換えタンパク質ライブラリーを対象とした事前情報取得、データベース化、これを MRM メソッド構築、さらに組換えタンパク質を内部標準とした絶対定量法を実施できるプラットフォームを構築した。

iMPAQT 法では、通常 150 細胞で網羅的な解析を行うことが可能であるが、さらに試料のハンドリングなどを工夫することで、わずか 10 細胞以下に相当する試料で 80 種類以上のタンパク質の一斉絶対定量に成功した(図 3)。

さらに、従来の解放型ではなく密閉型のイオンソースを開発し、適度な加熱や有機溶媒雰囲気導入によってイオン化効率を向上・安定化を図った。また、シングルセル・プロテオミクスを達成するため、細胞をフューズドシリカキャピラリー中で溶解させ、そのままトリプシンで消化後、キャピ

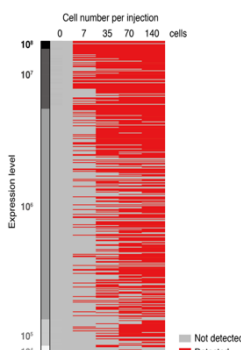


図3 | 極微量試料でのタンパク質絶対定量

細胞消化物を希釈し、質量分析計に導入した。10 細胞相当以下でも一部のタンパク質は絶対定量することが可能であった。

ラリー分析カラムに直接導入する仕組みを構築した。これによって、HeLa 細胞であれば1細胞でのプロテオーム解析も可能であることが明らかとなった。

#### 4) マウス版 iMPAQT の開発

上述した iMPAQT はヒト組換えタンパク質ライブラリーを利用したものである。本研究ではマウスがん幹細胞も解析対象とするので、iMPAQT をマウスに対応させた。具体的には、マウス組織由来のタンパク質を対象に情報取得を行い、iMPAQT の情報処理プラットフォームを流用して、マウス版データベースを作製した。

#### 5) iMPAQT を主軸とするトランスオミクス解析

がん幹細胞を支配する分子ネットワークを同定するため、プロテオーム解析に加えてメタボローム解析などのオミクスの情報を取得した。

#### 6) 数理モデリングによるがん幹細胞分子ネットワーク解析

がん幹細胞のシングルセル・プロテオミクスから得られた高度に定量的なタンパク質の網羅的測定データを基に、リファレンスネットワークを構築し、そこにがん幹細胞から得た大規模なプロテオームデータセットを投影した。さらに取得したプロテオーム絶対定量値を用いて数理モデルの構築を行った。このような数理モデルを作成することで、がん代謝に重要なサブネットワークの同定に成功した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

- 1) Hada K, Hirota K, Inanobe A, Kako K, Miyata M, Araoi S, Matsumoto M, Ohta R, Arisawa M, Daitoku H, Hanada T, Fukamizu A. Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 294:3091-3099, 2019.
- 2) Kawata K, Yugi K, Hatano A, Kokaji T, Tomizawa Y, Fujii M, Uda S, Kubota H, Matsumoto M, Nakayama KI, Kuroda S. Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data. *Genes Cells* 24: 82-93, 2019.
- 3) Hosokawa H, Romero-Wolf M, Yui MA, Ungerback J, Quiloan MLG, Matsumoto M, Nakayama KI, Tanaka T, Rothenberg EV. Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. *Nat. Immunol.* 19: 1427-1440, 2018.
- 4) Hosokawa H, Ungerback J, Wang X, Matsumoto M, Nakayama KI, Cohen SM, Tanaka T, Rothenberg EV. Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells by redirecting partner transcription factor binding. *Immunity* 49: 782, 2018.
- 5) Matsumoto M, Nakayama KI. The promise of targeted proteomics for quantitative network biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 54: 88-97, 2018.
- 6) Fujimoto T, Nakamura O, Saito M, Tsuru A, Matsumoto M, Kohno K, Inaba K, Kadokura H. Identification of the physiological substrates of PDIP, a pancreas-specific protein disulfide isomerase family member. *J. Biol. Chem.* 293: 18421-18433, 2018.
- 7) Moriya Y, Kawano S, Okuda S, Watanabe Y, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Yamanouchi Y, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Iwasaki M, Sugiyama N, Tanaka S, Goto S, Ishihama Y. The jPOST environment: an integrated proteomics data repository and database. *Nucleic Acids Res.* 47(D1): D1218-D1224, 2018.
- 8) Kawata K, Hatano A, Yugi K, Kubota H, Sano T, Fujii M, Tomizawa Y, Kokaji T, Tanaka KY, Uda S, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Saitoh K, Kato K, Ueno A, Ohishi M, Hirayama A, Soga T, Kuroda S. Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks. *iScience* 7: 212-229, 2018.
- 9) Watanabe S, Fujiyama H, Takafuji T, Kayama K, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshida K, Sugimoto N, Fujita M. GRWD1 regulates ribosomal protein L23 levels via the ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 131. pii: jcs213009, 2018.
- 10) Tognon CE, Rafn B, Cetinbas NM, Kamura T, Trigo G, Rotblat B, Okumura F, Matsumoto M, Chow C, Davare M, Pollak M, Mayor T, Sorensen PH. Insulin-like growth factor 1 receptor stabilizes the ETV6-NTRK3 chimeric oncoprotein by blocking its KPC1/Rnf123-mediated proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 293: 12502-12515, 2018.
- 11) Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M,

- Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell* 33: 355-367.e7, 2018.
- 12) Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical pathway for regulation of CCL2 expression by an mTORC1-FOXK1 axis promotes recruitment of tumor-associated macrophages. *Cell Rep.* 21: 2471-2486, 2017.
  - 13) Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Matsumoto M, Nakayama KI, Watanabe M, Hatakeyama S. Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuriteogenesis. *Biochem Biophys Res. Commun.* 494: 234-241, 2017.
  - 14) Kita K, Shiota M, Tanaka M, Otsuka A, Matsumoto M, Kato M, Tamada S, Iwao H, Miura K, Nakatani T, Tomita S. Heat shock protein 70 inhibitors suppress androgen receptor expression in LNCaP95 prostate cancer cells. *Cancer Sci.* 108: 1820-1827, 2017.
  - 15) Yachie N; Robotic Biology Consortium (Inc. Matsumoto M), Natsume T. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nat. Biotechnol.* 35: 310-312, 2017.
  - 16) Cui L, Nakano K, Obchoei S, Setoguchi K, Matsumoto M, Yamamoto T, Obika S, Shimada K, Hiraoka N. Small nucleolar noncoding RNA SNORA23, up-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinoma, regulates expression of spectrin repeat-containing nuclear envelope 2 to promote growth and metastasis of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* 153: 292-306.e2, 2017.
  - 17) Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto K, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakayama KI. A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat.e Methods* 14: 251-258, 2017.
  - 18) Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Ono E, Matzuk MM. Identification of KIAA1210 as a novel X-chromosome-linked protein that localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. *Biol. Reprod.* 96: 469-477, 2017.
  - 19) Matsumoto A, †Pasut A, †Matsumoto M (†equally contributed), †Yamashita R, Fung J, Monteleone E, Saghatelian A, Nakayama KI, Clohessy JG, Pandolfi PP. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature* 541: 228-232, 2017.
  - 20) Okuda S, Watanabe Y, Moriya Y, Kawano S, Yamamoto T, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Sugiyama N, Goto S, Ishihama Y. jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Res.* 45(D1): D1107-D1111, 2017.
  - 21) Kayama K, Watanabe S, Takafuji T, Tsuji T, Hironaka K, Matsumoto M, Nakayama KI, Enari M, Kohno T, Shiraishi K, Kiyono T, Yoshida K, Sugimoto N, Fujita M. GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. *EMBO Rep.* 18: 123-137, 2017.
  - 22) Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Tsutsui H, Hatakeyama S. The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 100: 43-53, 2016.
  - 23) Hatano A, Matsumoto M, Nakayama KI. Phosphoproteomics analyses show subnetwork systems in T-cell receptor signaling. *Genes Cells* 21: 1095-1112, 2016.
  - 24) Takahashi Y, Kinoshita T, Matsumoto M, Shimazaki K. Inhibition of the Arabidopsis bHLH transcription factor by monomerization through abscisic acid-induced phosphorylation. *Plant J.* 87: 559-67, 2016.
  - 25) Takahashi K, Tanaka M, Yashiro M, Matsumoto M, Ohtsuka A, Nakayama KI, Izumi Y, Nagayama K, Miura K, Iwao H, Shiota M. Protection of stromal cell-derived factor 2 by heat shock protein 72 prevents oxaliplatin-induced cell death in oxaliplatin-resistant human gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 378: 8-15, 2016.
  - 26) Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN $\gamma$  in memory-type Th2 cells. *Nat. Commun.* 7: 11289, 2016.
  - 27) Fujieda Y, Amengual O, Matsumoto M, Kuroki K, Takahashi H, Kono M, Kurita T, Otomo K, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Maenaka K, Hatakeyama S, Nakayama KI, Atsumi T. Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes. *Rheumatology* (Oxford) 55: 1117-26, 2016.
  - 28) Tanaka M, Shiota M, Nakao T, Uemura R, Nishi S, Ohkawa Y, Matsumoto M, Yamaguchi M, Osada-Oka M, Inagaki A, Takahashi K, Nakayama KI, Gi M, Izumi Y, Miura K, Iwao H. Identification of low-abundance proteins in serum via the isolation of HSP72 complexes. *J. Proteomics* 136: 214-21, 2016.

〔学会発表〕（計 10 件）

- 1) 松本 雅記、中山 敬一、iMPAQT: a scalable and flexible platform for the quantification of proteins of interest、第 91 回日本生化学会 2018 年 10 月（京都）
- 2) 松本 雅記、中山 敬一、iMPAQT ver.2.0: 拡張性と柔軟性を備えたタンパク質絶対定量プラットフォーム、MSP2018、2018 年 5 月（大阪）
- 3) Masaki Matsumoto、Robotics promotes accurate and reproducible data acquisition in proteomics, Robotics and Semantic Systems for Biology2 Symposium、2018 年 1 月 (Tokyo)
- 4) 松本 雅記、中山 敬一、次世代定量プロテオミクスによる生命システム理解への挑戦、Conbio2017、2017 年 12 月（神戸）
- 5) 松本 雅記、iMPAQT：組み換えタンパク質を用いたタンパク質絶対定量プラットフォーム、第 7 回新アミノ酸分析研究会学術講演会、2017 年 12 月（東京）
- 6) 松本 雅記、中山 敬一、iMPAQT: ヒト in vitro プロテオームに基づく大規模ターゲットプロテオミクス解析基盤、日本プロテオーム学会大会、2017 年 7 月（大阪）
- 7) 松本 雅記、iMPAQT: A Platform for Large-Scale Targeted Proteomics Based on an in Vitro Human Proteome、第 65 質量分析総合討論会（基調講演）2017 年 5 月（筑波）
- 8) Masaki Matsumoto、iMPAQT: A platform for large scale targeted proteomics based on in vitro human proteome, 1st-International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society, 2017 年 2 月（Kyoto）
- 9) 松本 雅記、定量プロテオミクスプラットフォームのためのインフォマティクス、質量分析インフォマティクス研究会・第 1 回ワークショップ、2016 年 10 月（東京）
- 10) 松本 雅記、iMPAQT: 組換えタンパク質を利用したタンパク質絶対定量プラットフォーム、日本プロテオーム学会大会、2016 年 7 月（東京）

〔図書〕（計 4 件）

- 1) 松本 雅記、中山 敬一、精密定量プロテオミクスに基づく生命科学研究、ライフサイエンス領域融合レビュー、2017 年
- 2) 松本 雅記、中山 敬一、ラボドロイドの活用：プロテオミクス実験(Application of LabDroid: Proteomics)、実験医別冊、2017 年 12 月発行
- 3) 松本 雅記、中山 敬一、次世代プロテオミクスによるがんの代謝解析、実験医学増刊 Vol.35 No.10、2017 年 06 月
- 4) 松本 雅記、ターゲットプロテオミクスの最新動向と試料調製の重要性、Proteome Letters, 1(1), 101-106, 2016

〔その他〕

公開データベース

<https://impaqt.jpost.org/iMPAQT/>

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：中山 敬一

ローマ字氏名：Nakayama Keiichi

研究協力者氏名：馬場 健史

ローマ字氏名：Bamba Takeshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。