

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06984

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質Rapシグナル経路のプロテオーム解析を用いた癌浸潤機構の研究

研究課題名(英文) Study of invasion mechanism of cancer cells by proteomic analysis of Rap pathway

研究代表者

明石 巧 (Takumi, Akashi)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・准教授

研究者番号：60242202

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)：癌の浸潤を制御しているアクチン関連分子を探索するためproximity labeling法を用いてアクチン、cortactin, Rap1Bをbaitとして浸潤性乳癌細胞MDA-MB-231においてアクチンと相互作用する分子のプロテオーム解析を行った。質量分析によって607個の蛋白を同定し、公開databaseをもとに肺腺癌組織で高発現し予後不良と相関する蛋白68個を絞り込んだ。その内17個についてin vitroで細胞運動を抑制する分子3個を絞り込むことができた。その一つであるアクチン結合蛋白LASP1が免疫組織学的に肺腺癌組織において高発現することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチンは細胞運動や細胞外基質の分解を介して癌の浸潤に重要な役割を担う。本研究では一過性に相互作用する分子を同定可能な近年に開発されたproximity labeling法を用いたプロテオーム解析によってアクチンと相互作用し癌の悪性度と相関するこれまでに報告のない候補分子を同定することができた。この成果をもとに癌の浸潤を促進する分子を同定することによって癌の悪性度の評価や浸潤・転移を抑制する創薬対象の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By the proximity-labeling approach, in which the proteins those transiently interact with the bait protein can be specifically biotinylated and purified, actin-related proteins which participate in invasion of cancer cells were investigated in invasive breast cancer cells. With three bait proteins of actin(ACTB), cortactin, and Rap1B, 607 proteins were identified. Among them, 68 proteins remained as the proteins those were overexpressed in the lung adenocarcinomas and correlated to poor prognosis based on open database analysis. Among them, knockdown effect of the 17 genes on in vitro migration of MDA-MB-231 cells were studied by shRNA transduction and 3 proteins remained. Among them, LASP1, an actin-binding protein, was shown to be overexpressed immunohistochemically in lung adenocarcinomas.

研究分野：人体病理学

キーワード：浸潤 癌細胞 プロテオーム proximity labeling アクチン Rap1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格蛋白であるアクチンは細胞運動や細胞外基質を分解する浸潤突起の形成を介して癌の浸潤に関与する。研究代表者はアクチンアクチン結合分子 cortactin(CTTN)が癌細胞の浸潤部において細胞頭頂部から基底部へ細胞内局在の変化を示し、転移、予後、腫瘍間質の形成と密接に相関することを報告したが、細胞骨格蛋白の細胞内局在の変化が起きる機序は不明であった。上皮細胞の頭頂部/基底部の極性形成は基底膜への接着、軸の方向性の決定、細胞間接着装置の形成、頭頂部・基底部への極性決定分子の局在、各分画固有分子の頭頂部/基底部への選択的輸送という複数の過程からなる。アクチン関連分子の一つである低分子量 G 蛋白質 Rap1/2 は細胞外基質への接着、細胞間接着形成、酵母の出芽の主要な調節因子と考えられており、Rap 経路の異常によって癌の浸潤部にみられる細胞外基質(基底膜)の改変、細胞極性の変化、出芽(budding)のいずれもが起きうる可能性が想定された。

2. 研究の目的

本研究では Rap1/2 の活性の変化が肺癌細胞の浸潤に与える影響を検討し、次に質量分析法を用いたプロテオーム解析による網羅的探索によって Rap1/2 経路を始めとしたアクチン関連分子の中で癌細胞で高発現し浸潤に関与している分子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

1)培養肺癌細胞 A549 の 3 次元浸潤モデルに与える Rap1/2 活性の影響の実験的検討
Rap1B/Rap2B 恒常活性型 (G12V,G63E) 活性阻害型(S17N),不活化分子 Rap1GAP1/2 全長 cDNA を遺伝子導入し、浸潤能に与える影響を実験的に検証した。
2)プロテオーム解析を用いた浸潤制御分子の網羅的解析
浸潤突起を形成する乳癌細胞 MDA-MB-231 においてアクチン、CTTN、Rap1b の近傍に局在する蛋白を Proximity labeling 法 (Hung, 2016) によって網羅的に解析し公開データベースを基に肺癌で高発現・予後不良と相関し、shRNA によって MDA-MB-231 細胞の運動を抑制する分子を肺癌の浸潤に関与する候補分子として絞り込み、肺腺癌における臨床病理学的な意義を免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

コラーゲンゲル内で 3 次元的に培養した A549 細胞の球状コロニーにレンチウイルスベクターを用いて対象遺伝子と MT1-MMP を共発現させることによって球状コロニーから周囲への索状の浸潤を誘導する浸潤モデルを作製し Rap 蛋白が癌細胞の浸潤能に与える影響を実験的に検討した。恒常活性型 Rap1B (G12V,G63E) Rap2B (G12V,G63E) 活性阻害型 Rap1B (S17N)、Rap2B (S17N)、不活化分子 Rap1GAP,Rap 1 GAP2 全長 cDNA を作製し A549 細胞に発現させた。陽性対照とした恒

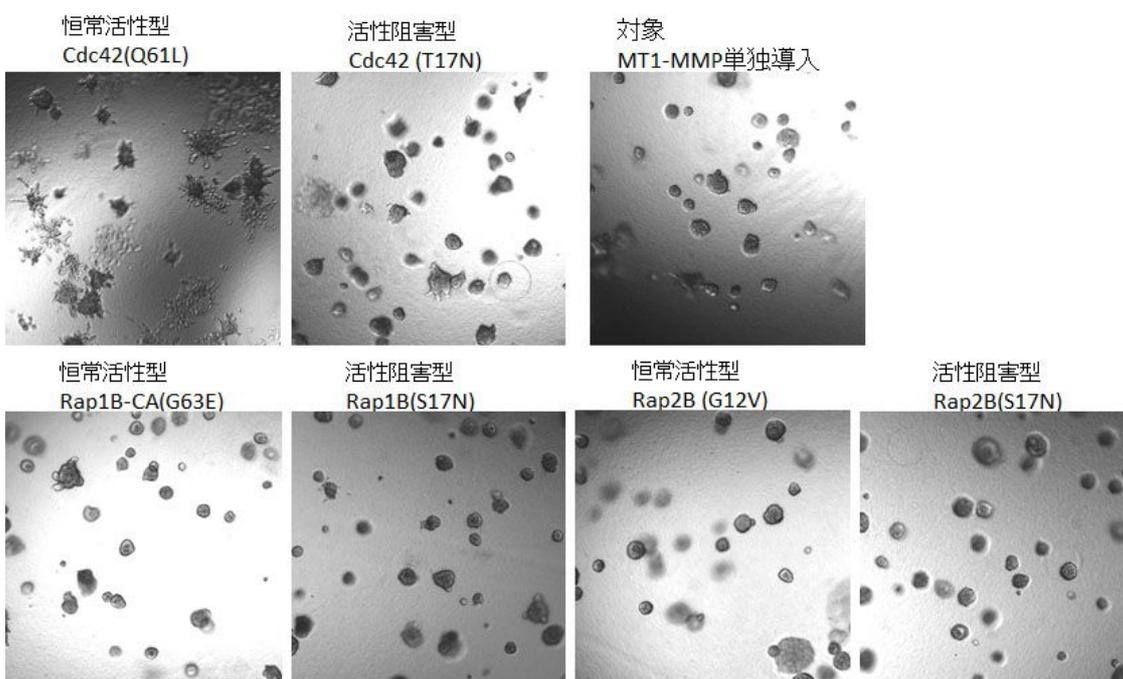


図1 肺癌細胞 A549 の 3 次元浸潤モデルを用いた Rap1/2 の活性変化による浸潤能の変化
恒常活性型 Cdc42 は MT1-MMP との共発現で索状浸潤を誘導したが Rap1/2 の活性変化は明らかな浸潤を誘導しなかった。

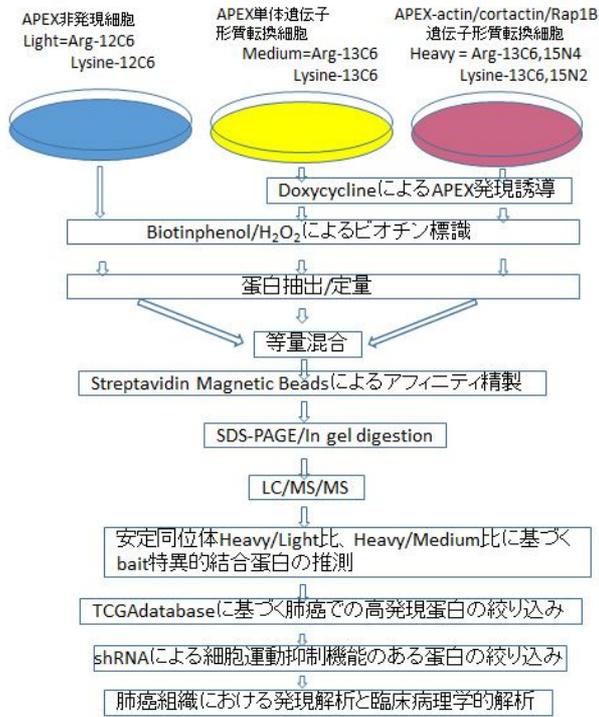


図 2a 癌細胞の浸潤に關するアクチン關連分子のプロテオーム解析の概要

常活性型 Cdc42(Q61L)が浸潤を誘導したのに対して恒常活性型・活性阻害型いずれの Rap1/2 によっても浸潤性的変化を見出せなかった(図 1)。

そこで Rap1B に加えてアクチン、CTTN について細胞内でそれらと会合し癌の浸潤を制御している分子の存在を想定し、細胞内で近傍に局在している分子を Proximity labeling 法によって探索を行った(図 2a)。免疫沈降法による会合分子の同定には安定した蛋白間結合を必要とするのに対して Proximity labeling 法では細胞内で bait 分子と距離 20nm 以内にあり数分間の一過性結合を示す会合蛋白をビオチン標識し分離・同定可能な方法と考えられている (Kim DI, 2016)。アクチン (ACTB)、CTTN、Rap1 それぞれを bait として cDNA をビオチン付加酵素である改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX) cDNA とともにレンチウイルスベクター (pLentiCMV-tightPuroDest) に組み込み rtTA 遺伝子とともに浸潤性乳癌細胞 MDA-MB-231 に遺伝子導入し安定形質転換細胞を作製した(図 2b, c)。EGFP-APEX 結合 ACTB は線維状アクチンマーカーである phalloidin と一致した局在を示し、細胞内でアクチン近傍分子をビオチン標識する bait として妥当であることが示され(図 2d)。bait 結合 APEX 導入細胞、bait 非結合 APEX 導入細胞、APEX 非導入細胞をそれぞれ Arg/Lys₁₃C/15N (heavy), Arg/Lys₁₃C (medium), Arg/Lys₁₂C/14N (light) によって安定同位体標識し、Doxycycline 存在下で bait 結合 APEX を発現させ、ビオチンフェノールと過酸化水素を加え細胞内蛋白をビオチン標識後に蛋白を抽出し、抽出蛋白を等量混合、ビオチン標識蛋白をストレプトアビジンビーズで回収し、SDS PAGE 泳動で 6

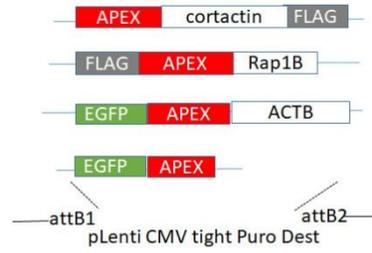


図 2b bait 結合 APEX の構築

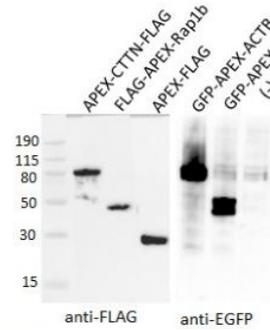


図 2c MDA-MB-231 細胞の安定形質転換細胞に発現させた bait 結合 APEX の確認

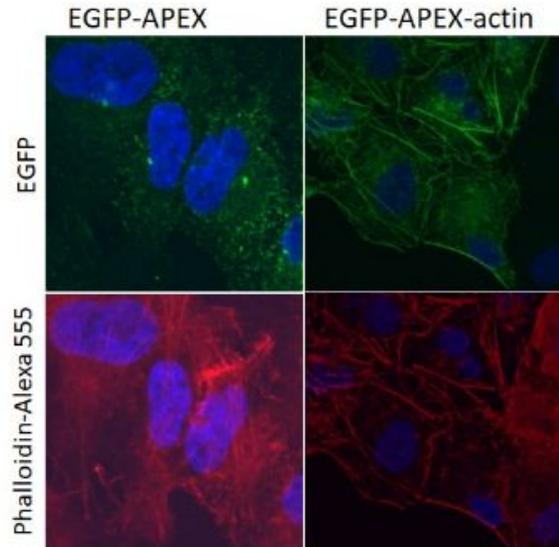


図 2d A549 細胞に発現させた APEX-actin の細胞内局在 EGFP-APEX-actin (右上)、phalloidin とともに stress fiber に一致して認められる。

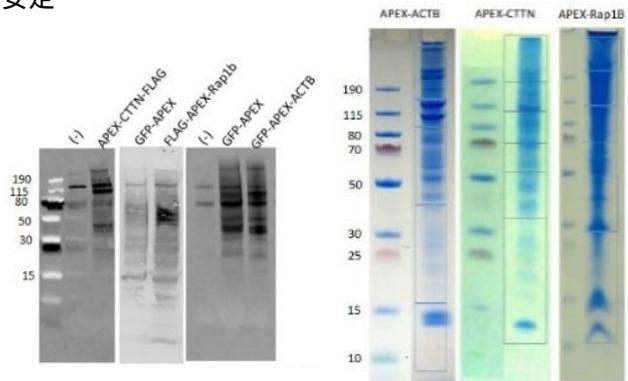


図 2e MDA-MB-231 安定形質転換細胞のビオチン標識蛋白の streptavidin-Cy3 による確認(左)と streptavidin ビーズによるビオチン標識蛋白の精製・SDS PAGE 分画(右)

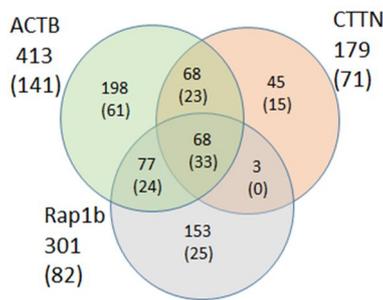


図 3a Heavy/Medium 比 > 0.8 以上の同定蛋白数 (): アクチン結合性既報告分子数

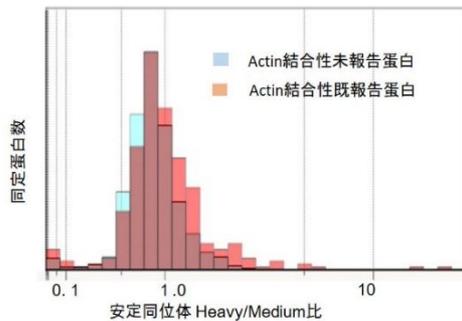


図 3b アクチン結合既報告分子、未報告分子の Heavy/Medium 比の度数分布
Heavy(APEX-actin bait 由来のペプチド)/Medium(EGFP-APEX 由来のペプチド)比はアクチン結合既報告分子の方が有意に高かった (p<0.001, Mann-Whitney 検定)

分画し(図 2e)、ゲル内消化後に FT-MS/MS (LTQ Orbitrap Velos ETD)を用いて質量分析を行った。同定ペプチドの中で heavy/light 比 > 2, heavy/medium 比 > 0.8 を bait による特異的なビオチン標識の可能性のある分子と判定した。その結果、アクチン, CTTN, Rap1B 3 個の bait によって 607 個の蛋白が同定された(図 3a)。アクチンを bait として同定された 413 分子については、既報告のアクチン結合分子は 141 個であり、heavy/medium 比は未報告分子よりも既報告分子の方が有意に高く bait 結合 APEX による特異的なビオチン標識とアフィニティ精製が裏付けられた(図 3b)。アクチンとの結合性の報告されている蛋白は約 2000 個 (IntAct Molecular Interaction Database) であり、その内で今回の実験に用いた MDA-MB-231 細胞において高発現 (RNA 量で GAPDH 比 10%以上) 中等量発現 (1-10%) 低発現 (0.1-1%) の分子はそれぞれ 198 個、524 個、726 個あり、その内 47 個、49 個、23 個が 3 個の bait によって同定され、網羅率は 24%、9.3%、3.1%であった。公開 database (GSE41313, Human Protein Atlas/TCGA, KM-plotter) を基に非浸潤性の乳癌細胞 MCF7 よりも MDA-MB-231 細胞で高発現する遺伝子 232 個、肺腺癌の生存期間と負に相関する遺伝子 148 個、正常肺組織よりも肺腺癌組織で高発現する遺伝子 68 個に順次絞り込んだ。その内 17 分子についてレンチウイルスベクター pLKO を用いて shRNA を作製し MDA-MB-231 細胞の 2 次元運動能をスクラッチアッセイ、3 次元運動をコラーゲンゲル内浸潤モデルによって検索した(図 4a, b)。そ

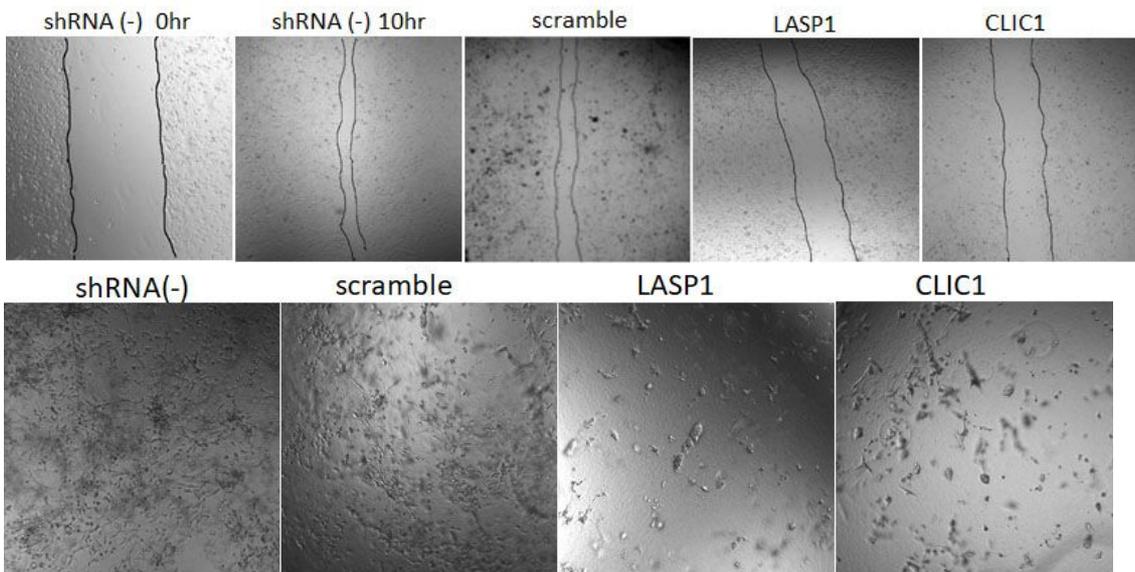


図 4a スクラッチアッセイ(上)、3 次元コラーゲンゲル内浸潤モデル(下)を用いた shRNA の MDA-MB-231 細胞運動抑制効果の検討 LASP1, CLIC1 に対する shRNA が運動抑制効果を示し(上)、個細胞性・紡錘形増生が集塊状になった(下)。

の結果 LASP1, CLIC1 FKBP52 を肺癌細胞の浸潤を促進する候補分子として絞り込んだ(表 1)。それらの肺腺癌組織における発現を免疫組織学的に検討した結果、LASP1 の肺腺癌組織における高発現が認められた。LASP1 は正常気道上皮、肺胞上皮には発現は認められず腺癌 141 例中 119 例で発現が認められた(図 5)。LASP1 を無・低発現 72 例/高発現 69 例に分けると浸潤径 (22 mm/31 mm)、胸膜浸潤あり (27 例/26 例)、リンパ管侵襲あり (14 例/7 例)

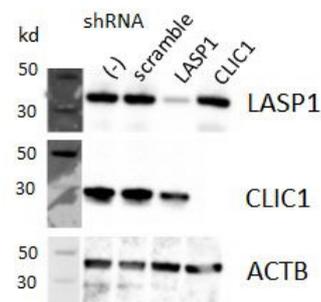


図 4b LASP1, CLIC1 に対する shRNA の knockdown 効果

Gene Name	Accession	Heavy/ Medium比	肺癌生存期 間有意差 (-log10)	MDA- MB231/MCF 7発現比	腺癌/正 常肺発 現比	2D運動(スク ラッチアッセ イ)対象比	3Dゲル内浸潤抑 制効果
LASP1	Q14847	5.6	2.97	3.8	1	0.6	++
DOCK7	Q96N67	1.3	1.55	5.0	1	0.7	+
VARS	P26640	0.8	3.16	6.9	2	0.5	+
CLIC1	O00299	1.1	1.59	2.7	2	0.6	+/-
KIF4A	O95239	2.9	2.66	2.4	3	0.6	+/-
G3BP1	Q13283	2.7	2.99	2.4	1	0.0	-
RRBP1	Q9P2E9	1.3	1.53	2.4	2	0.3	-
RAI14	Q9POK7	2.0	1.26	9.8	2	0.5	-
LDHA	P00338	7.5	5.64	2.8	2	1.5	-
ERCC6L	Q2NKX8	1.2	2.06	4.5	3	1.7	-
NCAPH	Q15003	1.1	3.17	4.0	3	1.4	-
NCAPG	Q9BPX3	0.9	2.93	6.2	3		致死性
ENO1	P06733	1.3	7.89	2.4	3		致死性
COPA	P53621	0.8	1.07	2.8	2		致死性
DYNC1H1	Q14204	2.1	1.05	5.5	1		致死性
CSE1L	P55060	0.9	1.46	2.9	2		致死性
SMC2	O95347	0.9	2.59	3.0	2		致死性
SMC4	Q9NTJ8	0.9	1.02	3.8	2		致死性

表 1 同定された蛋白のデータベースおよび in vitro での浸潤抑制効果に基づく絞り込みの結果

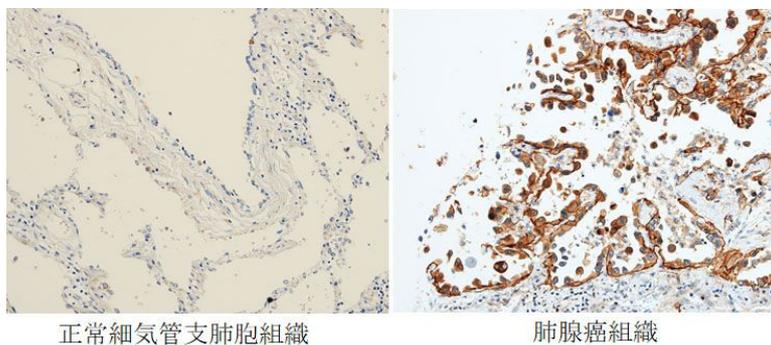


図 5 正常および腺癌組織における LASP1 の発現 LASP1 は正常気道上皮、肺胞上皮には認められないが、腺癌細胞ではしばしば発現が認められた。

LASP1	低発現	高発現	p 値
症例数	72	69	
最大径(mm)	32.7	37.3	0.21
浸潤径(mm)	21.6	30.8	0.07
血管浸襲			
Ly-	58	62	0.12
Ly+	14	7	
V-	33	43	0.05
V+	39	26	
胸膜浸潤			
pI0	45	43	0.98
pI1-3	27	26	
進行度			
I	45	41	0.6
II	14	12	
III	13	16	
リンパ節転移			
LN0	51	52	0.57
LN1	8	6	
LN2,3	13	11	

表 2 肺腺癌における LASP1 発現の臨床病理学的解析 (p 値:Mann-Whitney 検定)

静脈侵襲あり(39例/26例)リンパ節転移あり(22例/17例)でいずれも有意差を認めず臨床病理学的には浸潤との相関を示すには至らなかった(表2)。

(考察と今後の展望)

Rap1/2 の活性を抑制する Rap1Gap が ERK の抑制を介して乳癌細胞の浸潤能を抑制する報告(Shah, 2018) 逆に別個の Rap1Gap 分子である Sipa1 が細胞外基質の改変を介して前立腺癌細胞の浸潤を促進する報告(Shimizu, 2011)がある一方で、今回の実験で用いた肺癌細胞では Rap1/2 の活性変化と浸潤との関係を明らかに見だせず、Rap 経路は細胞や細胞外基質の種類に依存して多様な浸潤への関与を行っていると考えられた。そこで本研究では Rap1 に加えてアクチン、およびアクチン結合分子 CTTN を加えて浸潤に関与する分子のプロテオーム探索を行うことにした。

LASP1 は既知のアクチン結合分子であり MDA-MB-231 細胞のマトリックス分解

に關与する浸潤突起の形成に必要な分子であることも報告されている(Endres 2016) この研究においても shRNA を用いた特異的な発現抑制によってコラーゲンゲル内での浸潤が抑制されたこと、データベース検索と一致して肺腺癌組織での過剰発現が免疫組織学的にも認められた一方で、浸潤・転移との相関性を見出すまでには至らず LASP1 の過剰発現では肺腺癌の浸潤を説明するには不十分と考えられた。

アクチンを bait とした安定同位体の比率白と未報告蛋白の間で有意差を認め、bait 分子の近傍で特異的に蛋白のビオチン標識が行われていることが示唆された。したがって同定された分子の過半は database 上ではアクチン結合性を報告されていない分子であるが細胞内で一過性の相互作用を行っている可能性のある分子が含まれている可能性が考えられる。

今回の研究では同定された蛋白分子の浸潤への関与を合成の容易な shRNA を個々の遺伝子に対して作製しその MDA-MB-231 細胞の浸潤抑制効果によってスクリーニングを行ったが、しばしば細胞増殖も抑制しており、浸潤抑制効果の評価が困難となる問題点がある。今後は本学術研究支援センターが保有する全長遺伝子発現ライブラリー中の該当ベクターを使い過剰発現によって非浸潤性細胞株 MCF7、A549 細胞の浸潤性の獲得を指標にスクリーニングを行うことを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------