

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20590532

研究課題名(和文) 薬物感受性判定を目指した乳がん細胞発現蛋白検索法開発

研究課題名(英文) Development of the analysis method of proteins in breast cancer for the prediction of drug sensitivity

研究代表者

小田桐 弘毅 (ODAGIRI HIROKI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60250601

研究成果の概要(和文)：初年度から2年目は、手術で摘出された乳癌組織から抽出したタンパクを用いて二次元電気泳動の条件設定を行った。

乳がん組織中の蛋白発現パターンを飛行時間型質量分析計(SELDI-TOF MS)を用いた網羅的蛋白解析のための条件を探った。

至適条件として、一次元電気泳動では膨潤液に添加するタンパク量 30 μ g で pH レンジを 3-10、電圧を 500v1 時間、1000v1 時間、8000v2.5 時間が最も良い結果であった。二次元電気泳動は 10mA/gel 1.5 時間で明瞭な泳動パターンが得られた。

組織間のタンパク発現量の差を客観的データで比較するため、定量的二次元電気泳動法としては 2D-DIGE (2 dimensional differential gel electrophoresis) を選択した。

がん組織から得られたタンパクおよび非がん組織から得られたタンパクをそれぞれ Cy3 および Cy5 という 2 種類の蛍光色素で標識し、二次元電気泳動を行ってそれぞれの組織中の蛋白量の差を比較した。

2010 年度は、実際の乳癌患者の手術材料を 2D-DIGE(2 dimensional differential gel electrophoresis) で解析した。10 名の患者で行った結果、がん組織と非がん組織の間で蛍光色素の量がかかるドットが多数認められた。これらはがんで発現量が増える蛋白として重要であるため、今後症例を増やして普遍的なドットに関しては、タンパクの同定を行ってがん化の過程の究明に発展させたい。

今後は、この手法を用いて薬物治療前の組織中のタンパクの解析を行い、薬物反応性に重要なタンパクの同定を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In the first two years, optimal condition of the two dimensional gel electrophoresis using proteins from breast cancer tissue was decided.

Optimal condition was as follows: applied protein amount for gel was 30 μ g, pH range was 3-10, voltage was 500v 1h, 1000v 2h, then 8000v 2.5h in the first dimension polyacrylamide gel electrophoresis. Clear dots pattern was obtained in 10mA/gel 1.5h for the second

dimensional gel electrophoresis.

2D-DIGE (2 dimensional-differential gel electrophoresis) was selected to compare the amount of proteins between the cancer tissue and the non-cancerous tissue quantitatively.

Protein from cancer tissue was labeled by Cy3 and protein from non-cancerous tissue was labeled by Cy5. Difference of the amount of proteins from two kind of tissue was shown by the difference of the intensity of those two kinds of fluorescence.

In 2010, tissue from removed from ten breast cancer patients was tested.

Several dots, which showed difference in the intensity of fluorescence between cancer and non-cancerous tissue, were observed. Those should be candidates of protein that are important when cancer shows malignant characters.

In near future, we will identify the proteins from those dots which differ between cancer and non-cancerous tissue for the better understanding of the carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：癌、蛋白質、プロテオーム、薬物反応性

1. 研究開発当初の背景

乳がんの遺伝子発現パターンによるサブタイプ分類が博物治療効果の予測に有用であることが、近年明らかとなってきた。

組織内蛋白を比較的簡便に解析する方法として飛行時間型質量分析計(

SELDI-TOF MS)が提唱されている。

2. 研究の目的

乳がん組織中の蛋白発現パターンをこの SELDI-TOF MS を利用して網羅的に解析し、乳がんの蛋白発現による新たなサブタイプ分類を行い、個別化医療へ生かそうとするものである。

3. 研究の方法

手術で切除された乳がん組織を用いて組織溶解液を作成し、二次元電気泳動を行う。

この結果から最適の ProteinChip を選択する。

引き続き、より多くの蛋白質を分離できる至適条件を確立する。その条件のもとで、タンパク発現のパターン分類する。

4. 研究成果

初年度は、手術で摘出された乳癌組織から抽出したタンパクを用いて二次元電気泳動の条件設定を行った。

至適条件として、一次元電気泳動では膨潤液に添加するタンパク量 30 µg で pH レンジを 3-10, 電圧を 500v1 時間、1000v1 時間、8000v2.5 時間が最も良い結果であった。二次元電気泳動は 10mA/gel 1.5 時間で明瞭な泳動パターンが得られた。

組織間のタンパク発現量の差を客観的データで比較するため、定量的二次元電気泳動法としては 2D-DIGE (2 dimensional differential gel electrophoresis) を選択した。

がん組織から得られたタンパクおよび非がん組織から得られたタンパクをそれぞれ Cy3 および Cy5 という 2 種類の蛍光色素で標識し、二次元電気泳動を行ってそれぞれの組織中の蛋白量の差を比較した。

10 名の乳癌患者の手術材料を用いた検索ではがん組織と非がん組織の間で蛍光色素の量がことなるドットが多数認められた。これらはがんで発現量が増える蛋白として重要であるため、今後症例を増やして普遍的なドットに関しては、タンパクの同定を行ってがん化の過程の究明に発展させたい。

今後は、この手法を用いて薬物治療前の組織中のタンパクの解析を行い、薬物反応性に重要なタンパクの同定を行う予定である。

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 2 件)

- ① Masateru Maruyama, Hiroki-Odagiri et al. The suicide gene introduction using two recombinant adenovirus vectors with HER2 promoter and Cre/loxP system. Hirosaki Med J 査読あり, Vol 61, No2-4, 2011, pp150-158.
- ② Tatsuya Nodagashira, Hiroki Odagiri et al. Efficient gene transduction in HER2-expressing cancer cells by two recombinant virus vectors with Her2 promoter and Cre/loxP system. Hirosaki Med J 査読あり Vol 61, No1, 2010, pp26-34.

[学会発表] (計 0 件)

[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 (2009~2010)

小田桐 弘毅 (ODAGIRI HIROKI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60250601

研究代表者 (2008)

立石 友則 (TATEISHI TOMONORI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80236554

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：