

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790539

研究課題名（和文）大規模リン酸化プロテオーム解析による大腸癌の早期診断バイオマーカー探索

研究課題名（英文）Discovery of biomarkers for early colon cancer using a phospho-proteomic approach

研究代表者

久家 貴寿（TAKAHISA KUGA）

独立行政法人 医薬基盤研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・研究員

研究者番号：20551857

研究成果の概要（和文）：多検体の手術組織標本のタンパク質リン酸化プロファイルをプロテオミクス手法（Phospho-iTRAQ 法）を用いて比較し、大腸癌で特異的に変動しているタンパク質リン酸化修飾を 200 種類以上同定した。さらに、癌特異的リン酸化修飾変動をハイスループットに検証する方法（Phospho-SI-SRM 法）を確立した。これらの技術とバイオインフォマティクス解析を駆使して、大腸癌のリン酸化バイオマーカー候補と新規の大腸癌関連タンパク質を発見した。

研究成果の概要（英文）：The profile of protein phosphorylation in colon malignant tumor tissues were compared with those in colon benign tumor and non-tumor tissues using a phospho-proteomic technique (Phospho-iTRAQ). Phosphorylation levels at more than 200 phosphorylation sites were altered in the malignant tumor tissues, suggesting that these alterations are candidates for colon cancer. To validate these candidates, a phospho-SI-SRM technique was developed. Using these proteomic techniques and bioinformatics, I identified candidate biomarkers for colon cancer and signaling proteins involved in colon cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本で2番目に多いがんであり、進行大腸癌は予後不良である。したがって、大腸癌の発症や再発を早期に診断する方法の開発が急務である。

タンパク質リン酸化修飾の異常は癌と密接に関連しているため、癌に特異的なリン酸

化はバイオマーカーとなりうる。細胞内のリン酸化変動はプロテオーム手法を用いることで解析することが可能であり、培養細胞などを用いた大規模なリン酸化プロテオーム解析が数多く行われている。大腸癌の臨床組織検体を用いた大規模なリン酸化プロテオーム解析はリン酸化バイオマーカー開発に

有用であるが、ほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では最新の質量解析機器、リン酸化プロテオーム技術を用いて大腸癌手術標本を解析し、大腸癌で特異的に変動しているリン酸化タンパク質を探索する。得られたリン酸化修飾変動のプロファイルから大腸癌のリン酸化シグナル伝達機構を包括的に理解し、バイオマーカー候補および治療ターゲット候補を見出すことが目的である。最終的には大腸癌組織で変動しているリン酸化タンパク質が血液検体中で検出できるかどうかを検討し、大腸癌の早期診断・再発マーカーとしての応用を目指す。

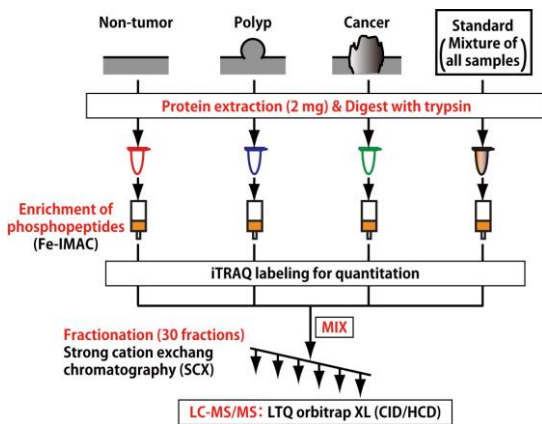
## 3. 研究の方法

### (1) 大腸癌手術標本の Phospho-iTRAQ 解析： 大腸癌特異的リン酸化タンパク質の探索

千葉大学医学部附属病院で協力研究者により摘出・保存された大腸癌患者の悪性腫瘍組織と周辺非腫瘍組織、および大腸ポリープ患者の良性腫瘍組織を解析に用いた。検体の収集・使用については各組織の倫理委員会の承認を受け、各患者からはインフォームドコンセントを得た。

各組織 6 検体から Phase-transfer surfactants (PTS) 法を用いてタンパク質の抽出とトリプシン消化を行い、Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) 法でリン酸化ペプチドを濃縮した。各検体のリン酸化ペプチドの量を比較定量するために iTRAQ 4 plex 法を用いた。iTRAQ 4 plex 法では一度に 4 検体の比較が可能であるが、そのうちの 1 検体をスタンダードサンプルとすることで全ての検体の比較を可能にした。陽イオン交換クロマトグラフィーでリン酸化ペプチドを分離した後、LTQ-Orbitrap XL 質量解析計を用いてリン酸化ペプチドの同定と定量を行った (図 1)。

図 1. Phospho-iTRAQ 解析の流れ



MS 解析により得られた各組織のリン酸化プロファイルを統計学的に処理し、大腸癌組織に特異的なリン酸化ペプチドを抽出した。得られたリン酸化プロファイルを用いて NetworKIN などの Bioinformatics で処理することで、大腸癌組織で起きているリン酸化シグナル変動を包括的に理解する事を試みた。

### (2) リン酸化バイオマーカーの検証

上記探索で得られたリン酸化バイオマーカー候補の検証は免疫学的手法と三連四重極型質量解析計を用いた Selected reaction monitoring (SRM) 法を用いて行う。SRM 法はリン酸化抗体を必要としない点でリン酸化バイオマーカーの検証方法として優れている。免疫学的手法としては、ウエスタンブロット法、免疫染色法、組織アレイ法などを用いた。リン酸化ペプチドの定量的 SRM 法 (Phospho-SI-SRM 法) は以下の流れで行う。1. 臨床検体からのタンパク質抽出・トリプシン消化

2. IMAC リン酸化ペプチド濃縮

3. 安定同位体標識標準ペプチド (SI ペプチド) 添加

4. Vantage 質量解析計による測定

複数の標的ペプチドに対する SI ペプチドを同時に添加することで、一度に数十種類の標的を定量することが可能である。協力研究者 (独立行政法人 医薬基盤研究所・久米英明) の結果では一度に 90 種類程度のペプチド定量が可能であった。乳癌組織のリン酸化バイオマーカーの検証で Phospho-SI-SRM 法の有効性を示した [協力研究者 (独立行政法人 医薬基盤研究所・村上達夫) との共同研究]。

### (3) 新規大腸癌関連シグナル伝達分子の発見と機能解析

大腸癌と大腸非腫瘍部のマイクロアレイ解析を行い大腸癌で発現が変動している遺伝子を抽出した。得られた大腸癌関連遺伝子候補の中から、大腸癌培養細胞の増殖や運動に重要な役割を持つタンパク質を、ノックダウン法を用いて決定した。さらにインタラクトーム解析を用いて、癌関連キナーゼとの関係などの分子メカニズムを明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸癌リン酸化バイオマーカー候補の同定

Phospho-iTRAQ 解析により 4931 種類のリン酸化サイトを同定・定量し、大腸癌悪性腫瘍組織で有意な変動を示したリン酸化修飾を 246 種類見出した (図 2)。これらは大腸癌の悪性化にかかわっている可能性があり、バイオマーカーの候補と考えられた。

## Cancer specific phosphorylation

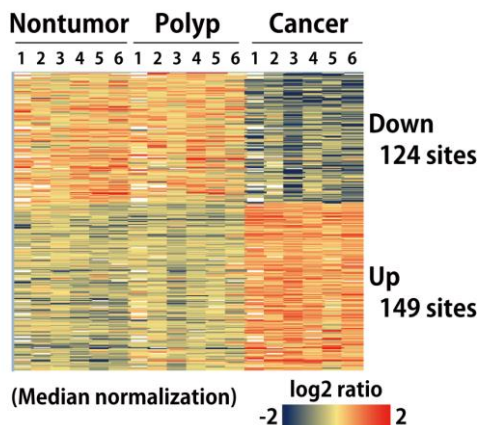


図2. 大腸癌特異的リン酸化修飾を示すヒートマップ

### (2) リン酸化バイオマーカーの検証手法の確立

リン酸化バイオマーカーの検証には通常リン酸化抗体が必要となる。そのリン酸化抗体をファージディスプレイ法でハイスループットに作成する事を試みたが、良好な結果が得られなかった。そこで、リン酸化抗体を必要としない、Phospho-SI-SRM法を用いた検証法の開発を協力研究(独立行政法人 医薬基盤研究所・研究員 村上達夫)ともに行った。Phospho-SI-SRM法を用いる事で一度に約20種類の乳癌リン酸化バイオマーカー候補の検証が可能であった(図3)(国際学術誌に論文投稿中)。今後、Phospho-SI-SRM法を用いて大腸癌のリン酸化バイオマーカー候補の検証を手術標本、血液検体を用いて行う。

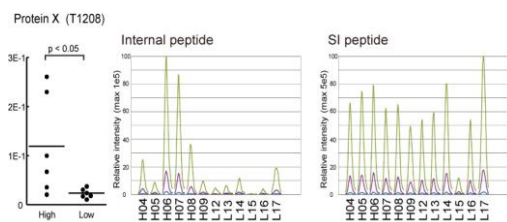


図3. Phospho-SI-SRM法による検証例  
乳癌の予後不良群(H)と予後良好群(L)における Protein X Threonine 1208 のリン酸化レベル(リン酸化ペプチド)定量データ。内在性のペプチド量(ピークエリア)をSIペプチドの量で補正し、ドットプロットで示した。予後不良群で有意に Protein X (T1208) のリン酸化レベルが上昇していた。

### (3) 大腸癌関連シグナル伝達機構の包括的理解

大腸癌組織に特異的なリン酸化変動情報を NetworKIN プログラムで解析し、そのリン

酸化変動に寄与するキナーゼを予測した。複数のキナーゼシグナルが大腸癌で変動している事が予測された(図4)。非癌部、良性腫瘍部と比較して、大腸癌組織では Akt-mTOR シグナルパスウェイの変動が起きている事が免疫学的手法で検証された(図5、6)。現在、この大腸癌組織におけるシグナル変動の意義を検討している。

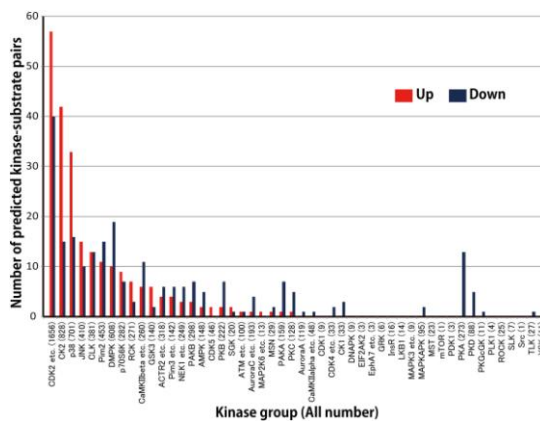


図4. NetWorKINによるキナーゼ活性化予測

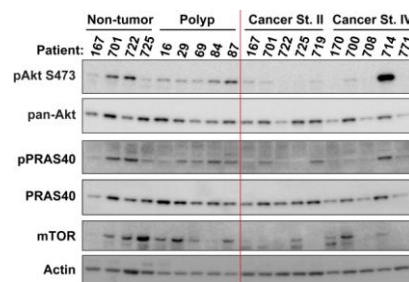


図5. Akt-mTOR 関連シグナル分子のウェスタンブロット解析

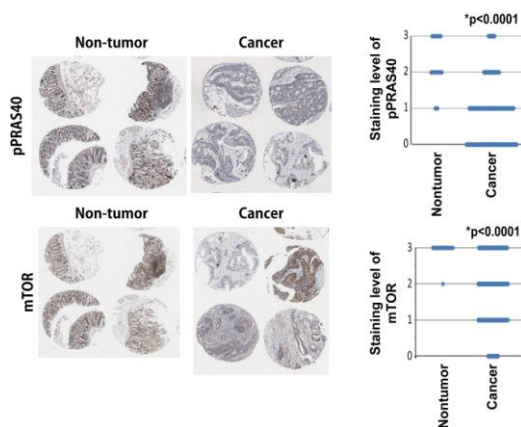


図6. 組織アレイによる検証

(4) 新規大腸癌関連シグナルタンパク質の同定

大腸癌患者の腫瘍部、非腫瘍部のマイクロアレイ解析により、歯のエナメル形成不全 (Amelogenesis imperfecta, AI) に関連するタンパク質が大腸癌で発現亢進している事が明らかになった。大腸癌培養細胞に AI 原因タンパク質の siRNA を導入すると細胞増殖抑制、アポトーシスが誘因され (図 7)、細胞運動の抑制も惹起された (図 8)。したがって、この AI 原因タンパク質は予想外に大腸癌細胞で重要な役割を担っている事が明らかになった。

AI 原因タンパク質の分子機能を明らかにするために、共免疫沈降法と LC-MS/MS 解析手法を用いたインタクトーム解析を行った。その結果、AI 原因タンパク質はケラチンタンパク質や癌関連キナーゼを含む複数のタンパク質と複合体を作っている事が明らかになった (図 9)。AI 原因タンパク質のノックダウンはケラチン線維の束化を促進させ、逆に AI 原因タンパク質を強発現させるとケラチン骨格が崩壊した (図 10)。AI 原因タンパク質の強発現は癌関連キナーゼをケラチン骨格へリクルートさせた (図 11)。この癌関連キナーゼの阻害は AI 原因タンパク質のノックダウンと同様にケラチン線維の束化を促進し、AI 原因タンパク質強発現時のケラチン骨格崩壊を遮断した (図 12)。これらの結果は、AI 原因タンパク質が癌関連キナーゼをケラチン骨格にリクルートすることでケラチン骨格構築を制御している事を示唆している。

ケラチン骨格は細胞の運動のみならず、細胞増殖やアポトーシスの制御に重要な役割を持つことが報告されている。したがって、AI 原因タンパク質はケラチン骨格の構造変換を制御することで大腸癌細胞の増殖、生存、細胞運動を促進させている事が考えられる。AI 原因タンパク質の発現上昇は大腸癌の進行、浸潤、転移などに関与することが推測されるため、大腸癌の治療ターゲットになる可能性が有る。(国際学術誌に論文投稿中、特許申請準備中)

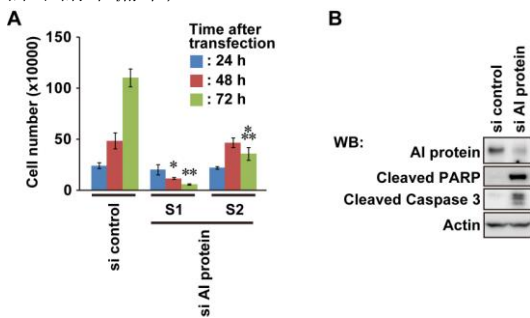


図 7. AI 原因タンパク質ノックダウン細胞の細胞増殖試験 (A) と Western blot 法によるアポトーシスマーカータンパク質の発現解

析 (B)。

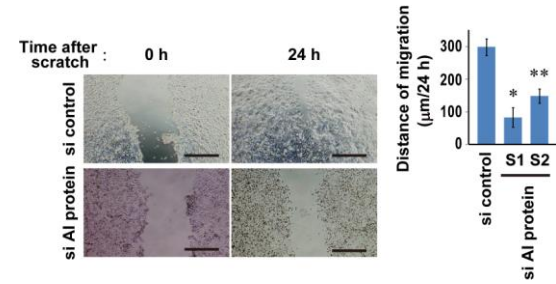


図 8. AI 原因タンパク質ノックダウン細胞の Wound healing 解析。

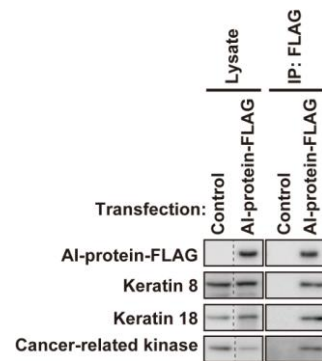


図 9. FLAG 標識した AI 原因タンパク質を免疫沈降し、Western blot 法で相互作用分子を検出した。

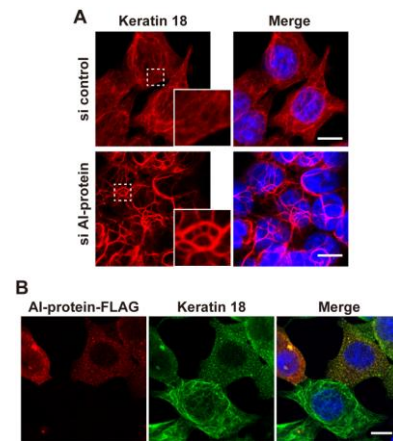


図 10. AI 原因タンパク質のノックダウンおよび強制発現させた大腸癌培養細胞のケラチン骨格。

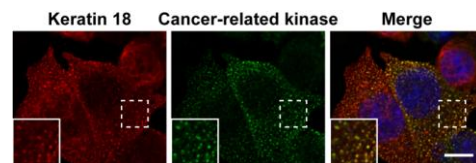


図 11. AI 原因タンパク質を強制発現させると癌関連キナーゼがケラチン骨格上にリクルートされた。

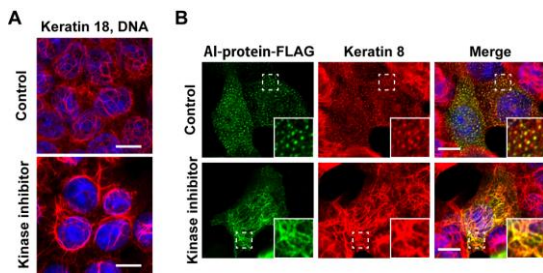


図 1 2. 癌関連キナーゼの阻害剤処理によるケラチン骨格の再構築 (A) と AI 原因タンパク質強発現時のケラチン骨格崩壊阻害 (B)。

## 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)

1. Kuga T, Nozaki N, Matsushita K, Nomura F, Tomonaga T. Phosphorylation statuses at different residues of lamin B2, B1, and A/C dynamically and independently change throughout the cell cycle. *Exp Cell Res* 2010; 316:2301-2312.
2. Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kuga T, Dohmae N, Yamaguchi N. The Lyn kinase C-lobe mediates Golgi export of Lyn through conformation-dependent ACSL3 association. *J Cell Sci* 2010; 123:2649-2662.
3. 久家貴寿, 曾川一幸, 野田健太, 梅村啓史, 佐藤 守, 小寺義男, 松下一之, 朝長 毅, 野村文夫 問題飲酒者マーカー 5.9 kDa ペプチドの発現機構における血液凝固系の関与. *アルコールと医学生物学* 2010; 29:89-92.

[学会発表] (計 21 件)

1. 久家貴寿, 足立淳, 白水崇, 村上達夫, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 福岡順也, 朝長毅: 定量的リン酸化プロテオミクスとバイオインフォマティクスを用いた大腸がんリン酸化シグナル伝達機構の包括的理解. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月13-16日
2. 久家貴寿, 足立淳, 白水崇, 松原久裕, 中山敬一, 小寺義男, 朝長毅: 大腸癌の定量的リン酸化プロテオーム解析. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3-5日
3. 久家貴寿, 鳴海良平, 村上達夫, 足立淳, 白水崇, 小寺義男, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長毅: 大腸がん手術組織標本の定量的リン酸化プロテオーム解析. 日本プ

ロテオーム学会2011年会, 新潟, 2011年7月28-30日

4. 白水崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立淳, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析による癌転移に関わる新規リン酸化シグナルの探索. 第63回日本細胞生物学会大会, 北海道, 2011年6月27-29日

5. 白水崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立淳, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長毅: ヒト大腸癌臨床検体を用いたリン酸化プロテオーム解析による新規転移因子の探索. 第9回日本プロテオーム学会, 新潟, 2011年7月28-29日

6. 白水崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立淳, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長毅: Phosphoproteomic analysis of human colorectal cancer tissues for exploring a novel cancer metastatic biomarker. 第70回日本癌学会学術総会, 愛知, 2011年10月3-5日

7. T. Shiromizu, R. Narumi, T. Kuga, J. Adachi, H. Matsubara, M. Matsumoto, K. Nakayama, T. Tomonaga, "Phosphoproteomic analysis of clinical colon cancer specimen; Exploring a novel factor of cancer metastasis" HUP0 2011, Geneva, Swiss, September 2011.

8. 足立淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: DNA 損傷応答におけるリン酸化・ユビキチン化プロテオーム定量解析. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日

9. 足立淳, 久家貴寿, 白水崇, 中山敬一, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011年10月3-5日

10. 足立淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規DNA損傷初期応答キナーゼの探索. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月13-16日

11. J. Adachi, R. Narumi, S. Sano, T. Kuga, T. Shiromizu, M. Matsumoto, K. Nakayama, M. Ikura, T. Ikura, M. Takata, T. Tomonaga. "Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network." HUP02011, Geneva, Switzerland, 4-7 September, 2011.

12. 村上達夫、鳴海良平、久家貴寿、石飛真人、稲治英生、宮本泰豪、加藤菊也、小寺義男、朝長毅：SRM/MSM法を用いたリン酸化ペプチドの定量法の確立。第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13-16日

13. 久家貴寿：リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索と検証。第7回千葉疾患プロテオミクス研究会、東京、2010年11月13日

14. 久家貴寿、鳴海良平、松本雅記、中山敬一、松原久裕、松下一之、野村文夫、朝長毅：大腸癌臨床検体を用いた定量的大規模リン酸化プロテオーム解析。日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、千葉、2010年7月26-27日

15. 久家貴寿、松下一之、野村文夫、松原久裕、中山敬一、朝長毅：大腸癌の大規模リン酸化プロテオーム解析。第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月22-24日

16. 久家貴寿、鳴海良平、村岡賢、足立淳、松本雅記、中山敬一、松原久裕、松下一之、野村文夫、長野一也、角田慎一、朝長毅：大規模リン酸化プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカー探索。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月7-10日

17. 鳴海良平、久家貴寿、松本雅記、中山敬一、石飛真人、稲治英生、宮本泰豪、加藤菊也、朝長毅：定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌組織の予後不良群と予後良好群の比較。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月7-10日

18. 鳴海良平、久家貴寿、松本雅記、中山敬一、石飛真人、稲治英生、宮本泰豪、加藤菊也、朝長毅：定量的リン酸化プロテオミクスによる乳癌の予後不良群と予後良好群の比較。日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、千葉、2010年7月26-27日

19. 越中屋里香、久家貴寿、久米秀明、鳴海良平、足立淳、朝長毅：細胞核のプロテオーム解析による染色体不安定性関連タンパク質の探索。日本ヒトプロテオーム機構第8回大会、千葉、2010年7月26-27日

20. 越中屋里香、久家貴寿、久米秀明、鳴海良平、足立淳、朝長毅：大腸癌細胞の細胞核のプロテオーム解析による染色体不安定性に関連するタンパク質の探索。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月7-10日

21. 足立淳、鳴海良平、佐野聖三、久家貴寿、白水崇、松本雅記、中山敬一、茂木章、井倉毅、高田穰、朝長毅：DNA損傷応答ネッ

トワークにおけるリン酸化・ユビキチン化修飾ダイナミクスのプロテオーム解析。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月7-10日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibio.go.jp/proteome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久家 貴寿 (Takahisa Kuga)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部プロテオームリサーチプロジェクト・研究員

研究者番号：20551857

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし