

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 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791530

研究課題名（和文） iTRAQ 法を用いた子宮肉腫の診断・治療の鍵となる蛋白質の同定

研究課題名（英文） Analysis of protein expression of uterine sarcoma by iTRAQ method

研究代表者

上田 豊（UEDA YUTAKA）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10346215

研究成果の概要（和文）：

当研究は、子宮肉腫の発生に関わる蛋白質を iTRAQ 法を用いて網羅的に解析し、診断・創薬の鍵となる蛋白質を同定することを目的とした。子宮肉腫・正常子宮筋組織からタンパク質を抽出し、iTRAQ 解析を行って、子宮肉腫で特異的に発現が増強または減弱している蛋白質をそれぞれ 8 種類・11 種類選出し、それぞれの蛋白質について、その発現を臨床検体を用いて免疫組織染色で確認した。

これによって、子宮平滑筋肉腫で発現が特異的に増強・減弱している蛋白質 C および蛋白質 L を同定した。現在、これらタンパク質の機能解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

We identified Protein C whose expression was specifically increased in leiomyosarcoma compared to normal myometrium and Protein L whose expression was specifically reduced in leiomyosarcoma compared to normal myometrium, by iTRAQ method and immunohistochemistry using clinical samples of uterine leiomyosarcoma and normal myometrium. Currently we are analyzing functions of these proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：子宮平滑筋肉腫・蛋白質・iTRAQ 法・網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

<臨床的背景>

子宮肉腫はI期ですら5年生存率が約70%で、早期に転移・再発をきたすため、半数近くは診断後3年以内に死亡するとされ、子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌に比してもその予後は悪い (Disaia PJ et al. *Clinical Gynecologic Oncology*, sixth edition)。しかも、成人女性の約3割が有するとされる子宮筋腫との鑑別が極めて困難であり、子宮筋腫と誤って診断されて治療の機会を逸してしまうこともある。早期症例では手術が主治療であるが、術後の追加補助療法は確立されておらず、放射線や既存の抗癌剤も効果は限定的である。また進行・再発症例においても Gemcitabin + Docetaxel の併用化学療法で53%の奏効率が報告されている (Hensley ML et al. *JCO* 2002,20;2824-2831) が、PFSは高々6ヶ月で、生存率の改善に至っていないのが現状である。

子宮平滑筋肉腫に対する診断・治療法の開発は産婦人科領域において極めて重要性が高いと思われる。

<研究的背景>

子宮肉腫に関する基礎研究は広く行われているが、これまでに明らかにされた発生に関わる主だった遺伝子は Calponin (Horiuchi A et al. *JNCI* 1999,91;790-796, Takahashi K et al. *Cancer Res* 2001,61;3969-3977)や Lmp2 (Hayashi T et al. *Cancer Res* 2002,62;24-27) など限られたもので、発生の鍵となる遺伝子や分子標的治療の対象となる遺伝子はほとんど不明のままである。

そこで、当研究において子宮肉腫の発生に関わる、あるいは子宮肉腫を特徴付ける蛋白質(遺伝子)を同定し、今後の治療応用(創薬)への基礎としたいと考えた。まず子宮肉腫で特異的に発現が増強または減弱している蛋白質を明らかにしたいと考えているが、候補遺伝子は未だ明らかではないため、網羅的な解析が必要と考えられる。これまで我々は、cDNA microarray などの手法を用いて婦人科癌の発癌に関わる遺伝子の網羅的解析をRNAレベルで行ってきており (Miyatake T et al. *Int J Cancer* 2007,120;2068-77)、蛋白質に関しても Protein Chip システム (SELDI-TOF-MS) を利用して子宮内膜癌に特異的な発現を示す蛋白質を同定してきた (Yoshizaki T et al. *Cancer Lett.* 2005,226;101-6)。今回、より高い再現性が期待でき、かつ high throughput な蛋白質の

定量・同定法である iTRAQ 法 (LC-MS/MS) を用いて標的蛋白質を同定することを目的とする。

2. 研究の目的

産婦人科領域において、子宮肉腫(平滑筋肉腫)は頻度は低いものの、最も予後の悪い疾患のひとつであり、かつ婦人科腫瘍の中で最も頻度の高い子宮筋腫との鑑別が極めて難しい。これまでに、calponin や lmp2などがその発生に関わっていることが明らかにされてきているが、発生機序の全貌は未だ明らかになっていない。そこで当研究では、子宮肉腫の発生に関わる蛋白質を iTRAQ 法を用いて網羅的に解析し、診断・創薬の鍵となる蛋白質を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

子宮肉腫・子宮筋腫・正常子宮筋組織からタンパク質を抽出し、iTRAQ 解析を行って、子宮肉腫で特異的に発現が増強または減弱している蛋白質を同定、western blotting / 免疫組織染色で発現を確認する。

すなわち、まず、我々が長年にわたって収集・凍結保存してきた臨床検体を用いて、正常子宮筋組織や子宮筋腫と比べて子宮肉腫で特異的に発現が増強または減弱している蛋白質を iTRAQ 法により抽出する(詳細は後述)。iTRAQ 法にて子宮肉腫特異的に発現が変化していることが分かった蛋白質群から、Gene ontology などをもとに、解析対象蛋白質を選別する。それらの蛋白質について、免疫組織染色および western blotting によって発現を確認する。

次に、子宮肉腫臨床検体で発現が増強あるいは減弱していた蛋白質(特に膜蛋白質)に対して、子宮平滑筋肉腫細胞株(SK-LMS-1・SKUT-1等)を用いて、発現を抑制あるいは誘導することで、肉腫細胞としての増殖能・浸潤能・転移能が変化するかどうか解析する。また、発現を増強または抑制させることにより、各種抗癌剤に対する感受性が変化するかどうかを解析する。さらに、子宮肉腫で特異的に発現が増加している分泌蛋白質については、血清での検出・定量を試み、子宮肉腫の診断に応用できないか検討する。

具体的には以下の手順で行う。

- ① 既に予備的実験で、正常子宮平滑筋組織2検体と子宮肉腫組織2検体の蛋白質発現を iTRAQ 法で比較して、肉腫で共通

して発現が増強または減弱していた蛋白質（それぞれ8種類・11種類）を同定している（詳細は後述）が、当研究においてはさらに信頼度の高い結果を得るため、子宮肉腫・子宮筋腫・正常子宮筋組織8検体ずつからタンパク質を抽出し、iTRAQ解析を行い、子宮筋腫・正常子宮筋組織に比し子宮肉腫で特異的に発現が増強または減弱している蛋白質を抽出する。

- ② disseminated leiomyomatosis や metastasizing leiomyoma 検体における上記蛋白質の発現を調べ、子宮肉腫特異的に発現が変化している蛋白質を同定する。
- ③ 抽出された蛋白質に関し、Gene Ontology の観点から細胞増殖・細胞接着・細胞間相互作用・細胞移動・アポトーシスなどとの関連が示唆される蛋白質（特に膜蛋白質）を選別する。
- ④ 選別された蛋白質について残りの検体（10検体以上）で western blotting / 免疫組織染色で発現を確認し、子宮肉腫で有意に発現が増強あるいは減弱している蛋白質を選定する。
- ⑤ 上述手法で選定した蛋白質の発現と、臨床進行期・抗癌剤奏効性・予後などとの関連を調べる。
- ⑥ 子宮平滑筋肉腫細胞株（SKN 等）を用いて、子宮肉腫臨床検体で発現が増強していた蛋白質は siRNA や中和抗体を利用して発現を抑制させ、一方、発現が減弱していた蛋白質については遺伝子導入により発現を増強させることにより、肉腫細胞としての増殖能・浸潤能が変化するかどうか解析する。同様にマウスを用いて in vivo での転移能についても解析する。また、標的となる蛋白質の cDNA による NIH3T3 繊維芽細胞の形質転換能も調べる。
- ⑦ さらに発現を増強または抑制させることにより、子宮平滑筋肉腫細胞株（SK-LMS-1・SKUT-1 等）に対するシスプラチン・カルボプラチン・パクリタキセル・ドセタキセル・ゲムシタビンによる cell growth 50% 阻害濃度（IC50）を解析し、抗癌剤感受性が変化するかどうかを検討する。抗癌剤感受性に関わることが分かった場合は、抗癌剤の取り込み・排出との関連など、そのメカニズムを解析する。さらに、paclitaxel や

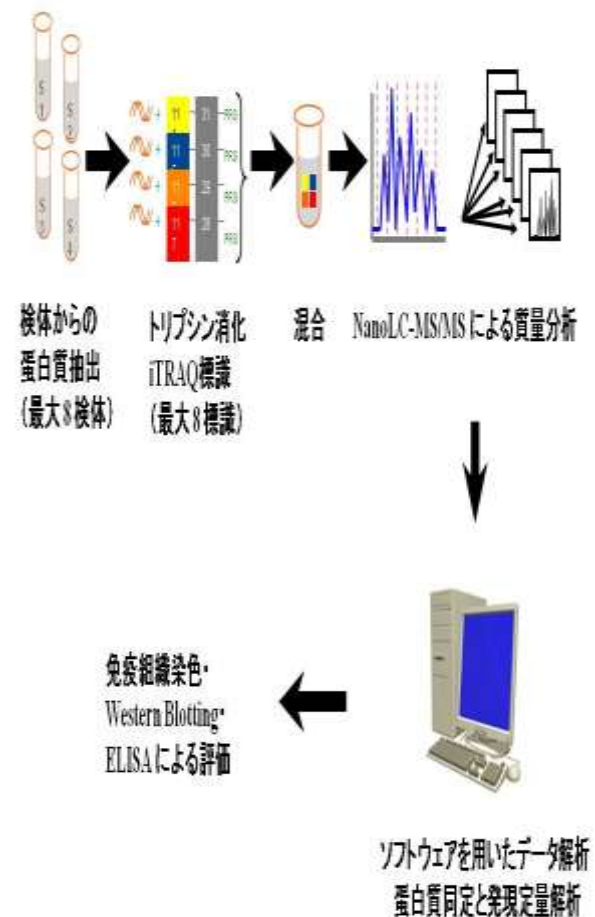
carboplatin に対する獲得耐性に関わるかどうか解析する。

- ⑧ 子宮肉腫で特異的に発現が変化している蛋白質のうち発現量の多い分泌蛋白質を選別。その蛋白質を免疫抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製し、同抗体を1次抗体とした ELISA 測定系を確立、子宮肉腫患者・子宮筋腫患者・正常ボランティア女性の血清での検出・定量を試み、子宮肉腫の診断に応用できないか検討する。

なお、以下に iTRAQ 法の概略を示す。

< iTRAQ 法の概略 >

iTRAQ 法では、まず蛋白質をペプチドに消化し、異なる dalton の iTRAQ 試薬（最大 8



種類) をアミノ基と反応させることによってサンプルを標識する。標識した数種類のサンプルを等量ずつ混合し、LC-MS/MS で解析す

る。すでに我々はLC-MS/MS法を用いて卵巣癌の抗癌剤抵抗性に関わる蛋白質を同定している (Kim A et al. Int J Cancer, 2009, Epub) が、この結果はiTRAQ法でも確認できており、iTRAQ法が有用な手法であることが分かっている。iTRAQ法は、約2000種類の蛋白質の定量比較と同定を同時に再現性を持って行うことができ、解析できるrangeも広く、従来の解析法よりはるかに低分子領域まで同定可能となっており、リン酸化も検出同定できる精度である。

4. 研究成果

正常子宮平滑筋組織2検体と子宮肉腫組織2検体の蛋白質発現をiTRAQ法を用いて網羅的解析・比較して、肉腫で共通して発現が増強または減弱していた蛋白質(それぞれ8種類・11種類)を同定した。以下にその結果一覧を示す。

<iTRAQ解析にて発現が増強していた蛋白質>

Ref.	検体1 / 検体1	検体2 / 検体1	検体3 / 検体1	検体4 / 検体1
蛋白質A	1.00	1.08	32.98	12.60
蛋白質B	1.00	2.52	31.41	21.06
蛋白質C	1.00	1.37	5.39	5.46
蛋白質D	1.00	2.39	38.08	39.30
蛋白質E	1.00	6.52	33.50	11.05
蛋白質F	1.00	0.85	4.12	2.28
蛋白質G	1.00	0.79	2.39	1.60
蛋白質H	1.00	0.75	2.41	2.24

(検体1・検体2：正常子宮筋組織、
検体3・検体4：子宮平滑筋肉腫)

<iTRAQ解析にて発現がしていた蛋白質>

Ref.	検体1 / 検体1	検体2 / 検体1	検体3 / 検体1	検体4 / 検体1
蛋白質I	1.00	0.42	0.04	0.09
蛋白質J	1.00	0.06	0.04	0.07
蛋白質K	1.00	0.42	0.05	0.14
蛋白質L	1.00	1.17	0.24	0.14
蛋白質M	1.00	1.50	0.16	0.31
蛋白質N	1.00	3.54	0.09	0.33
蛋白質O	1.00	1.15	0.18	0.50
蛋白質P	1.00	1.20	0.09	0.15
蛋白質Q	1.00	0.69	0.09	0.29
蛋白質R	1.00	1.55	0.10	0.36
蛋白質S	1.00	1.59	0.28	0.30

(検体1・検体2：正常子宮筋組織、
検体3・検体4：子宮平滑筋肉腫)

これら候補蛋白質計19種類について、多くの肉腫臨床検体・肉腫細胞株、および多くの子宮筋腫臨床検体、多くの正常子宮筋腫臨床検体を用いて、子宮肉腫に特異的に発現が変化しているかを免疫染色およびウエスタンブロットングによって解析した。

この11種類の蛋白質の中で8種類は、免疫染色およびウエスタンブロットングにて、必ずしも平滑筋肉腫で特異的に発現が増減しているとは言えなかった。残りの3種類のうちの1種類は、これまでから平滑筋肉腫の発生に関与していることが明らかな calponin h1であったため、現在、残りの2種類に絞って平滑筋肉腫の発生における役割の解析を進めている。

この2種類(蛋白質Cおよび蛋白質L)は、そもそもiTRAQ解析にて、蛋白質Cは肉腫組織2検体において正常組織に比して5.39倍および5.46倍に発現が増強しており、一方、蛋白質Lは肉腫組織2検体において正常組織に比して0.24倍および0.14倍に発現が減弱しているものであったが、平滑筋肉腫の臨床検体を用いた免疫染色にて、極めて特異性の強い発現パターンを示していた。すなわち、蛋白質Cは平滑筋肉腫の10検体中8検体で強陽性を示したのに対し、正常筋層および子宮筋腫では共に10症例中1症例で弱陽性を示しただけであった。一方、蛋白質Lは平滑筋肉腫の10検体中1検体で弱陽性を示したのに対し、正常筋層では10症例すべてで強陽性、子宮筋腫では10症例中8症例で弱陽性、残りの2症例は弱陽性を示した。これらの結果は、蛋白質Cの発現増強・蛋白質Lの発現減弱が、子宮平滑筋肉腫の形成において極めて特異的な役割を果たしていることを示唆するものである。

そこで、これら蛋白質が、子宮肉腫のどのような臨床的性質を特徴づけるものであるか、また診断・治療ターゲットとなりうるかどうかを明らかにすべく、子宮平滑筋肉腫の細胞株を用いて、これらの蛋白質の細胞増殖能・転移浸潤能・化学療法感受性との関連などを解析している。今後は、この蛋白質をターゲットとした分子標的治療の開発に向けてさらに研究を進める予定である。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 豊 (UEDA YUTAKA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10346215

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：