

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：84420
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23701093
 研究課題名（和文） 大腸癌臨床検体を用いたリン酸化プロテオーム解析およびSRM/MRM法による検証
 研究課題名（英文） Phosphoproteomic analysis of clinical colon cancer specimen and validation by SRM/MRM analysis.
 研究代表者
 白水 崇（SHIROMIZU TAKASHI）
 独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員
 研究者番号：00582678

研究成果の概要（和文）：

進行度の異なる大腸癌の臨床検体を用いた大規模リン酸化プロテオーム解析により、バイオマーカー候補および悪性化に関わる分子の探索を行った。解析条件の最適化により、これまで同定されなかった多くの分子が同定された。転移性株の解析結果との比較とパスウェイ解析により、バイオマーカー候補分子の絞り込みを行った。また *in vitro* 浸潤能試験により、癌浸潤に関わる新規機能分子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We performed mass spectrometry-based quantitative phosphoproteomic analysis to search for biomarker candidates by using surgically extracted colorectal cancer tissues. Novel biomarker candidates were identified by optimization of analysis conditions. For the selection of candidate genes, pathway analysis and comparison with the results of metastatic cancer cell lines were performed. Also by *in vitro* invasion assay, we have identified a novel functional molecule involved in cancer invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：大腸癌、プロテオミクス、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年のプロテオーム解析技術の目覚ましい進歩により、タンパク質の翻訳後修飾、特にリン酸化の解析が飛躍的に進んでいる。しかし、そのほとんどは細胞生物学的な研究であり、疾患に関するプロテオーム研究は遅れている。癌の進行にはタンパク質リン酸化シグナルの異常が深く関わっているため、リン酸化タンパク質は癌のバイオマーカー候補として有望である。ただ、それらのバイオマ

カーとなり得るタンパク質の多くは微量なタンパク質であり、効率良く検出するのが難しい。そのため、未だに大腸癌の診断・治療に有効なバイオマーカーは開発されていない。しかし最近、高効率にタンパク質抽出・消化する方法が開発され、さらにリン酸化ペプチドの濃縮法と組み合わせることで、大規模リン酸化プロテオーム解析のターゲットとすることが可能となった。

2. 研究の目的

(1)大腸癌臨床組織を用いたバイオマーカー候補分子の探索

進行度の異なる大腸癌患者組織を用いた大規模リン酸化プロテオーム解析により、大腸癌のバイオマーカー候補となる新規分子の探索を行う。特に遠隔転移のない患者(Stage2)と遠隔転移のある患者(Stage4)の検体サンプル間の比較から、癌転移に関わるバイオマーカーに着目する。

(2)バイオマーカー候補分子の検証

探索されたバイオマーカー候補分子について、リン酸化部位特異的な抗体または三連四重極型質量分析計を用いた SRM/MRM (Selected Reaction Monitoring/Multiple Reaction Monitoring)法による検証を行う。特に SRM/MRM 法では、多検体の臨床サンプルをハイスループットに検証することができるので、効率の良いバイオマーカー候補の絞り込みが可能である。

(3)候補となるタンパク質リン酸化の大腸癌における機能解析

検証された候補分子については、培養細胞を用いた解析により、癌の進行に関わる機能(細胞の増殖、浸潤、転移など)についての解析を行う。機能的な解析から、創薬ターゲットとなる分子を探索する。

3. 研究の方法

(1)大腸癌組織でのリン酸化プロテオーム解析技術の最適化

ヒトの臨床組織からプロテオーム解析の材料となるタンパク質を抽出するためには、界面活性剤によるタンパク質の可溶化が必要である。しかし界面活性剤は、その後の質量分析のステップに影響を及ぼすため、難溶性の画分に存在するタンパク質も含めた網羅的なプロテオーム解析を行うためには、界面活性剤を用いた抽出法の最適化が必須である。本研究では最初に、複数の界面活性剤を用いた抽出法について、最も効率のよい実験条件の検討を行った。次のステップとして、抽出した試料中の微量なリン酸化ペプチドの濃縮法について検討を行った。

(2)安定同位体標識法による定量的プロテオーム解析

進行度の異なる大腸癌臨床検体において組織間のタンパク質のリン酸化量を比較するために、濃縮したリン酸化ペプチドは安定同位体標識(iTRAQ法)を行った。定量性の保証と補正を目的にペプチド断片化の前に全ての検体に0.5%(w/w)カゼインを内標準蛋

白質として添加した。さらに同位体標識したペプチドは、イオン交換クロマトグラフィーと質量解析計にオンライン接続した逆相クロマトグラフィーで二次元分画した。二次元分画により、微量なペプチドの同定が可能になる。リン酸化ペプチドの同定にはLTQ Orbitrap Velos(Thermo scientific;Thermo)を用いた。解析データからのペプチド同定・定量解析ソフトウェアとして、Mascot(Matrix Science)を用いた。

(3)リン酸化シグナル経路のパスウェイ解析
定量的プロテオーム解析により、癌の進行に伴って変化のあった分子群について、どのようなシグナルパスウェイが関与しているか調べるためにパスウェイ解析ソフト Ingenuity (Ingenuity Systems) や MetaCore (GeneGo)を用いたリン酸化シグナルのパスウェイ解析を行った。また、同定されたリン酸化タンパク質が、どのようなキナーゼによりリン酸化されるかを予測するために、キナーゼ-基質間の相互作用を予測するソフトウェアである NetworKINを用いて、同定されたリン酸化タンパクに関わるキナーゼシグナルについての予測を行った。

(4)候補リン酸化タンパク質の機能解析

検証された候補タンパク質については、癌化との関連について機能解析を行った。癌化に関わる新規分子の発見は新しい創薬ターゲットに繋がる可能性がある。機能解析の具体的な手法としては、リン酸化部位特異的抗体での免疫染色による細胞/組織内での局在の観察、およびリン酸化部位に変異を加えた遺伝子の培養細胞への導入実験などを行った。変異遺伝子を導入した培養細胞に対しては、細胞増殖能の変化の観察、浸潤、転移能への影響について migration assay や matrigel invasion assay を行った。

(5) 候補リン酸化タンパク質のバイオマーカーとしての検証

SRM/MRM法によるハイスループットな解析では、一度に100種類以上のマーカー候補の検証が可能である。少数の検体に対して検証された候補分子について、さらに多検体での検証を行うことでバイオマーカーとしての有用性を検証する。

(6) バイオマーカー候補を用いた大腸癌の診断法の開発

多検体での検証でバイオマーカーとしての有効性が示された候補について、最終的に数種類に絞り込んで、大腸癌の早期発見や病態の進行の把握などに有用なマルチマーカーパネルの作成を目指す。

4. 研究成果

(1) リン酸化プロテオーム解析の実験条件最適化

検体組織の難溶性の画分に存在するタンパク質も含めた網羅的なプロテオーム解析を行うため、界面活性剤を用いたタンパク質の抽出法の比較、および実験条件の最適化を行った。抽出方法として、PTS 法 (Phase Transfer Surfactant: 相間移動溶解法)、FASP 法 (Filter Aided Sample Preparation) の比較検討を行ったところ、組織からのペプチド回収率、サンプル処理中のタンパク質分解や脱リン酸化への影響といった点から、FASP 法の方が優れていた。次に、抽出したサンプル中の微量なリン酸化ペプチドの濃縮法について検討した。金属カラムを用いた濃縮法として、IMAC 法 (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography) と HAMMOC 法 (Hydroxyl Acid Modified Metal Oxide Chromatography) で比較検討を行ったところ、回収率と濃縮率で共に IMAC 法が上回った。

(2) 臨床組織検体を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析

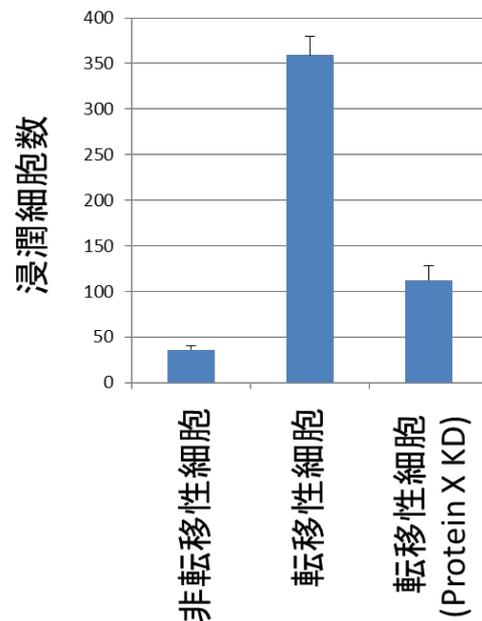
条件検討の結果により最適化されたプロトコルを用いて、大腸癌臨床検体の大規模リン酸化プロテオーム解析を行った。遠隔転移なし (Stage2) および遠隔転移あり (Stage4) の組織と同一患者より採取した非癌部大腸組織、およびポリープを使用して解析を行った。結果として、10000 以上のリン酸化ペプチドと約 4000 のリン酸化タンパク質が同定された (表)。この同定数はこれまでに報告された、臨床組織を用いた同様の研究を大幅に上回る結果である。次に同定結果について、パスウェイ解析ソフト Ingenuity (Ingenuity Systems) を用いたリン酸化シグナルのパスウェイ解析を行ったところ、細胞間接着や細胞極性形成など、癌転移に関わるシグナル経路の分子について、これまで知られていないタンパク質リン酸化の変化があることが確認された。これらのリン酸化タンパクを新規のバイオマーカーの候補とした。

同定結果 (FDR 1%)	
同定リン酸化ペプチド数	10302
同定タンパク数	3933

(表) 大腸癌臨床組織を用いた大規模リン酸化プロテオーム解析による同定リン酸化ペプチドおよび同定タンパク数

(3) バイオマーカー候補分子の機能解析

大腸癌臨床検体のプロテオーム解析により得られた癌転移に関わるバイオマーカー候補について、候補分子のさらなる絞り込みを行った。マウス同所移植モデルにより樹立した、転移性ヒト大腸癌細胞株のプロテオーム解析の結果との比較から、両方で共通な変化が見られた分子を SRM/MRM による検証の候補とした。また、癌転移との機能的な関連について調べるため、in vitro での浸潤能試験を行った。siRNA によるスクリーニングにより、癌浸潤に関わる新規分子 (Protein X) を同定した (図)。また、プロテオーム解析の結果にはこれまで未同定であったタンパク及びリン酸化タンパクが多く含まれていたため、それらの結果をデータベースへ登録した (<http://www.proteomexchange.org/>) (ID: PX D000089)。



(図) Protein X の siRNA ノックダウンおよび In vitro 浸潤能試験

(4) 今後の展望

本研究で行った臨床検体によるリン酸化プロテオーム解析により、癌の転移の有無により変化したタンパク質リン酸化部位が数百同定された。そこからさらにパスウェイ解析および機能解析にスクリーニングにより、約 100 種類のリン酸化ペプチドを SRM/MRM のターゲットとして絞り込んだ。今後は更に多くの臨床検体を用いて、今回得られた候補ペプチドの転移マーカーとしての有用性について検証していく。

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1件)

Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Shio Watanabe, Tatsuo Murakami, Takahisa Kuga, Satoshi Muraoka, and Takeshi Tomonaga. Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. Journal of Proteome Research, 査読有, January 11, 2013 (web), DOI : 10.1021/pr300825v

[学会発表] (計7件)

① 白水 崇, Proteomic analysis of highly metastatic colorectal cancer cells established from orthotopic metastatic mouse model. 第71回日本癌学会学術総会、2012.9.19、北海道

② Takashi Shiromizu, Quantitative proteomic profiling of orthotopic xenograft mouse model of colorectal cancer metastasis. HUP02012 11th World Congress, 2012.9.9, Boston, MA in the United States

③ 白水 崇、同所性移植モデルによる大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析、日本プロテオーム学会 2012年大会、2012.7.26、東京

④ 白水 崇、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 2011.10.3、名古屋

⑤ Takashi Shiromizu, Phosphoproteomic analysis of clinical colon cancer specimen; Exploring a novel factor of cancer metastasis, HUPO, 2011.9.5, スイス、ジュネーブ

⑥ 白水 崇、Phosphoproteomic analysis of clinical colon cancer specimen for exploring a novel factor involved in cancer metastasis、第9回日本プロテオーム学会、2011.7.28、新潟

⑦ 白水 崇、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、2011.6.27、北海道

6. 研究組織

研究代表者

白水 崇 (SHIROMIZU TAKASHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：00582678