

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591019

研究課題名(和文)ペプチド製剤を用いたルミカンの特異糖鎖修飾制御による膵癌細胞増殖抑制法の開発

研究課題名(英文) Application of inhibitory method of pancreatic cancer cell growth by the regulation of lumican glycosylation using therapeutic peptides.

研究代表者

山本 哲志 (YAMAMOTO, Tetsushi)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：20453920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ルミカンの発現量と細胞増殖能には正の相関性があり、細胞浸潤能とは負の相関性があることが報告されている。今回、ルミカンが膵癌細胞の増殖や浸潤に関わる機構について検討するため、ルミカン発現調製細胞を用い、それらの細胞の発現タンパク質の変動を網羅的に解析した。その結果、24種類のタンパク質がルミカンの発現と相関性があることが明らかとなった。この中にはアポトーシスのマーカーとして知られているタンパク質やMMP-9の活性化と関連があるタンパク質が含まれていたことから、ルミカンはアポトーシスやこれらのタンパク質の発現に関わることで細胞増殖や浸潤を制御していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that lumican expression level showed positive correlation with cell growth of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells and showed negative correlation with cell invasion of PDAC cells. In this study, we performed global shotgun proteomic analysis using lumican-regulated PANC-1 cells to examine the effect of lumican on cell growth and invasion in PDAC cells. As a result of proteomics, 24 proteins were identified as candidate proteins which expression was regulated by lumican, and these candidate proteins included protein which is known apoptosis marker and protein which regulate MMP-9 activation. Thus, lumican might be involved in cell growth and invasion to regulate cell apoptosis and these proteins expression.

研究分野：医歯薬科学

キーワード：膵臓癌 ルミカン プロテオグリカン プロテオミクス アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

ルミカン(lumican)は小型ロイシンリッチプロテオグリカンファミリーに属しているプロテオグリカンの1種であり、そのコアタンパク内に10個のロイシンリッチリピート構造と4カ所の糖鎖修飾が可能部位を持っている。皮膚の真皮や目の角膜においては、ケラタン硫酸鎖が付加したルミカンが豊富に存在し、膠原線維の配列を調整している。そのため、眼科領域では角膜の創傷治癒と関連して研究が進められている。

腫瘍領域においては、大腸癌、乳癌、子宮頸癌、悪性黒色腫細胞や骨肉腫細胞など様々な腫瘍でルミカンの発現が報告されている。大腸癌や乳癌においては、ルミカンの発現は癌の若年発症や予後の増悪等と関連しているとの報告がある。一方、骨肉腫細胞や悪性黒色腫細胞ではルミカンの発現により癌細胞の増殖抑制やアポトーシスを誘導することが報告されている。さらに、悪性黒色腫細胞ではルミカンのコアタンパク質投与により細胞の遊走能を抑制したとの報告もあり、近年 lumican のコアタンパクの配列をモデルにしたペプチド (lumcorin) により同様に遊走能の抑制が可能であったことが報告されている (Zeltz C, et.al. FEBS Lett., 2009)。このようにいくつかの癌においてはルミカンにより癌の進行や転移を抑制できる可能性が報告されており、悪性黒色腫細胞に対してはルミカンモデルにしたペプチド製剤までもが開発されようとしている。しかし、その一方ではルミカンの発現が癌の進行や悪性度を増加させるような報告もあり、癌におけるルミカン発現の意義とその機能については未だ一致した見解が得られていない。

膵臓癌組織におけるルミカンの発現とその機能について検討では、癌周囲の間質でのルミカンの発現が、十二指腸や後腹膜への浸潤や予後の悪化と関連することが報告されている (Ishiwata T, et.al. Oncol Rep., 2007)。また、ヒト培養膵臓癌細胞を用いて、Western blot 法にてルミカンの発現を確認すると膵臓癌細胞内には 37~100kDa の複数の発現パターンが確認できたのに対して、培養液中には約 70kDa の単一のタイプのルミカンのみが分泌されていることが明らかとなった。ヒト膵臓癌培養細胞の一つである PANC-1 細胞にルミカンの cDNA を遺伝子導入し、ルミカンを過剰発現させたところ、70kDa のルミカンが過剰に分泌され、その結果、*in vitro* における細胞増殖能を亢進させることが確認された。また、siRNA を用いてルミカンの発現を抑制すると、逆に細胞増殖能は抑制された。一方、ヒト胎児腎細胞株 (HEK 293) に同様にルミカン遺伝子導入し、過剰発現株を作成すると、膵臓癌細胞の場合と異なり、約 50kDa のタイプのルミカンを過剰に分泌し、*in vitro* での細胞増殖能が抑制されることが明らかとなった (Ishiwata T, et.al. Exp Mol Pathol., 2010)。これらの結果からルミカンの糖鎖修飾の違い

が、細胞増殖能に対する作用の違いに関連することが推測されるが、その正確な修飾様式や、修飾の違いによる細胞機能への影響については十分に解明されていない。

本研究により、ルミカンによる膵臓癌培養細胞の増殖、遊走及び浸潤に関わるシグナル伝達経路とそれに寄与する糖鎖構造を詳細に解明することで、癌特異的な糖鎖修飾を標的とした新たな治療戦略の開発につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

ヒト培養膵臓癌細胞にルミカン発現ベクターまたは siRNA を導入し、ルミカン過剰発現細胞及びルミカン発現抑制細胞を調製する。これらの細胞よりタンパク質を抽出し、ルミカンにより発現誘導されるタンパク質や活性化されるタンパク質をショットガンプロテオミクスを行うことで網羅的に解析することで、ルミカンが増殖や浸潤を制御するシグナル伝達経路を解明する。

また培養膵臓癌細胞において発現・分泌されているルミカン単離し、その糖鎖修飾を質量分析法を駆使することで解析することで、膵臓癌細胞において特異的に発現している、ルミカンの糖鎖構造及び修飾部位を同定する。さらに同定された糖鎖修飾情報を基に合成するルミカンのペプチドを用いた膵臓癌細胞の増殖抑制薬開発の基礎検討をする。

3. 研究の方法

- (1) ルミカン過剰発現細胞の作製
pIRES2-EGFP vector にルミカンの cDNA を組み込んだルミカン発現ベクターを作成し、PANC-1 細胞に、FuGENE HD を用いて化学的に遺伝子導入した。対照細胞にはルミカンの cDNA を組み込んでいない空ベクターを導入した (Mock 細胞)。
- (2) ルミカン発現抑制細胞の作製
ルミカンの siRNA (Applied 社) を PANC-1 細胞に Trans IT-siQUEST を用いて化学的に遺伝子導入した。対照細胞には他の遺伝子発現に影響を与えない negative control siRNA を導入した (NC 細胞)。
- (3) ショットガンプロテオミクス解析
過剰発現細胞、発現抑制細胞及びその対照細胞より抽出したタンパク質をトリプシンで酵素消化しペプチドにする。得られたペプチドを LC-MS で解析することでそれぞれの細胞に発現しているタンパク質を同定した。その後スペクトラルカウント法を用いた半定量解析を行い、
- (4) ルミカン発現抑制細胞におけるアポトーシス関連タンパク質の発現解析
ルミカン発現抑制細胞より培養 72 時間後にタンパク質を採取した。その時の Bcl-2 ファミリーの発現を Western blot 法で比較検討した。
- (5) ルミカン糖鎖修飾構造解析の基礎検討
ルミカンの膵臓癌特異糖鎖修飾構造及び

修飾部位の解析系を確立するため、市販されている NS0 細胞で調製されたりコンビナントルミカンモデルタンパクを用いることができるかを検討した。

4. 研究成果

小型ロイシンリッチプロテオグリカンであるルミカンによる膵臓癌細胞の増殖、遊走及び浸潤に関わるシグナル伝達経路をを検討するために、ショットガンプロテオミクスを行うことでルミカンにより発現が制御されているタンパク質の網羅的な解析を行った。その結果、ルミカンの過剰発現細胞より448種類、発現抑制細胞より451種類のタンパク質を同定することができた。また、スペクトラルカウンティング法を用いてそれぞれの対照細胞との半定量的な発現解析を行ったところ、過剰発現細胞で174種類、発現抑制細胞では143種類のタンパク質が2倍以上発現量が変動しているという結果が得られた。過剰発現細胞と発現抑制細胞の2種類の比較解析の結果を検討したところ、24種類のタンパク質がルミカンの発現と相関関係を示していることが明らかとなった。変動しているタンパク質の中にはアポトーシスのマーカーとしても知られているAnnexin VやMMP-9の活性化との関連が報告されているメタロチオネインなどが含まれていた。これらのことより、ルミカンが膵臓癌細胞の増殖に関わる機構としてアポトーシスの制御が関連していることが示唆された。

そこでルミカン発現抑制細胞を用い、アポトーシス関連タンパク質の発現を検討したところ、アポトーシスに重要な役割を果たしているBcl-2ファミリーの一つであるBaxの発現が亢進していた。Baxの発現亢進によりアポトーシスの誘導が起こることが報告されていることから、ルミカン発現抑制時に認められた細胞増殖能の抑制効果にはアポトーシス誘導が関与していると考えられた。

次に、ルミカンの糖鎖修飾構造の解析法を確立するための基礎検討を行った。大腸菌で調製したりコンビナントタンパク質では糖鎖修飾が行われませんが、哺乳動物細胞で調製した場合には糖鎖修飾付加が期待できることから NS0 細胞産生リコンビナントルミカンがモデルタンパク質となりうるかを検討した。N 結合型糖鎖切断酵素である PNGase 処理を行った結果、糖鎖修飾が切断されたことによりルミカンのコアタンパク質と同じ分子量に電気泳動像がシフトしたことから、今回用いたりコンビナントルミカンには N 結合型の糖鎖修飾のみが付加していると考えられた。このことから今回用いたりコンビナントルミカンは、糖鎖修飾構造解析のためのモデルタンパク質として有用であることが示唆された。

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)

Yamamoto T, Uemura K, Kaho Moriyama, Mitamura K, Taga A. Inhibitory effect of maple syrup on cell growth and invasion of human colorectal cancer cells., *Oncol Rep.*, 査読有, 33 巻, 2015 年, 1579-1584 ページ
doi: 10.3892/or.2015.3777

Yamamoto T, Kudo M, Peng WX, Naito Z. Analysis of protein expression regulated by lumican in PANC_1 cells using shotgun proteomics., *Oncol Rep.*, 査読有, 30巻, 2013 年, 1609-1621ページ
doi: 10.3892/or.2013.2612

[学会発表](計 3 件)

山本哲志, プロテオーム解析を用いた lumican の膵臓癌細胞増殖制御機構の解析, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日 ~ 2014 年 3 月 30 日, 熊本市総合体育館 (熊本県熊本市)

山本哲志, Proteomic analysis for identification of proteins regulated by lumican in pancreatic cancer, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日 ~ 2012 年 9 月 21 日, ロイトン札幌 (北海道札幌市)

山本哲志, 膵臓癌細胞における分泌型 lumican の増殖・浸潤への関与, 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 26 日 ~ 2012 年 4 月 28 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

[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：
出願年月日：
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

山本 哲志 (YAMAMOTO Tetsushi)
近畿大学・薬学部・助教
研究者番号：20453920

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし