

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659633

研究課題名(和文) 浸潤突起を選択的に採取できる新技術レーザープロテオミクスによる肺癌浸潤機構の解明

研究課題名(英文) Application of pseudopodia proteomics using excimer laser ablation for investigation of lung cancer invasion

研究代表者

岡田 守人 (OKADA, MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70446045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の運動や癌細胞の浸潤に重要な役割を担う偽足突起はタンパク採取が可能であった。タンパク分画をそれぞれ抽出後に2次元電気泳動に供すると、2508個のタンバクスポットが観察され、211スポットが偽足突起分画タンパクと細胞体分画タンパクとの間で4倍以上の有意な発現差を持って同定された。偽足突起に高発現を示す候補タンパクの内、既に細胞運動への関与が知られているRAB1A, HSP90B, TDRD7, vimentin に関して偽足突起への高発現が認められた。偽足突起に高発現が認められるタンパクは細胞の運動や浸潤に強く関与し、これらの研究は肺癌の新たな治療開発の可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Identification of pseudopodia proteins leads to a further understanding of malignant phenotypes of tumor cells and novel therapeutic strategies. Proteins in whole cells and pseudopodia fractions were individually solubilized, labeled with a highly sensitive fluorescent dye, and separated using two-dimensional difference gel electrophoresis. Among 2508 protein spots observed, 211 had different intensity between whole cells and pseudopodia fractions (more than fourfold differences and P-value of <0.05). The localization of novel pseudopodia-localizing proteins such as RAB1A, HSP90B, TDRD7, and vimentin was confirmed using immunohistochemical examinations. The previous studies demonstrated that these four proteins may function in the cell migration process. This method will provide insights into the molecular details of pseudopodia and a further understanding of malignant phenotypes of tumor cells and novel therapeutic strategies for lung cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

癌死亡のトップである肺癌の中で多くを占める肺腺癌は、EGFR や ALK などその生物学的特性による分類に応じた個別化治療が行われつつあるが未だ不十分であり、新たなターゲット分子の発見は最重要課題である。我々は高浸潤性を有する癌細胞株において癌浸潤突起部 invadopodia のみを特殊なレーザーを用いて採取し、高感度プロテオミクス手法を併用して、浸潤突起部に高発現を認めるタンパク質を同定する新技術の開発に成功した。

2. 研究の目的

我々は癌浸潤突起部にあたるオルガネラのみを特殊なレーザーを用いて精巧に採取し、高感度なプロテオミクス手法である 2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) に供してタンパク発現解析を行うことで、突起部に高発現を認める分子を同定する技術を開発した。浸潤突起部に高発現を認める分子は浸潤の誘導・促進に強く関与していると考えられ、これら候補分子の機能解析は浸潤の制御という新たな癌治療の開発に発展し得る。この技術は多種の癌細胞において適応可能であり、生物学的背景因子が異なる複数の肺腺癌細胞株において研究を進めることができる。

既に EGFR などの遺伝子変異や ALK rearrangement の有無などが判明している細胞株を含め、多種のヒト肺腺癌細胞株において浸潤突起部で高発現を認める候補分子の同定を行い、ヒト手術検体における浸潤部への局在(再現性)を確認する。それらの分子の機能解析を行い、生物学的背景別に浸潤機構の特徴を明らかにして、個別化治療に有効な新規分標的を発見する。

3. 研究の方法

(1) 多種のヒト肺腺癌細胞株において EGFR、HER2、RAS 遺伝子変異を高感度で特異性高く検索し、ALK rearrangement の有無を免疫組織染色や reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)、chromogenic in situ hybridization assay で調べる。その結果に応じて検索した細胞株を生物学的特性別に分類する。また、ヒト肺腺癌細胞株 PC-9 は EGFR 変異を認めることが分かっており、コントロールとして使用する。

(2) ファイブロネクチンコートをした穴あきポリエチレンテレフタレート (PET) メンブレン上で細胞を培養し、confluent 状態にして突起を伸長させる。特殊なレーザー照射後に浸潤先進部にあたる突起のみを採取し、タンパク抽出を行う。さらに細胞の cell body 部分を scratch にて採取し、タンパク抽出を行う。

(3) 同定された候補分子の突起への局在をそれぞれの細胞において調べる。この際には細胞蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡 (NIKON 社の A1 confocal scanning system、または OLYMPUS 社の FMV1000) による観察を行う。これにより同定した

候補分子が浸潤突起部に特異的であることを確認する。

- (4) 同定された候補分子の中から (a) 発現の変化・増幅の程度が大きい、(b)機能性蛋白と推測される、(c) 浸潤・悪性化と関連する機能が示唆される、(d) 細胞の運動性への関与が示唆される、の観点から解析すべき分子を選定する。
- (5) 分子生物学・細胞生物学及び実験病理学の手法を駆使してその分子の機能を明らかにする。
- (6) 浸潤に関わることが確認された分子に関してはヒト検体において再現性を確認して、ヒト肺腺癌において治療のターゲットとなるか否かの可能性を模索する。この方法として遺伝子レベルは RT-PCR で、タンパクレベルは免疫組織染色や western blot で行う。

4 . 研究成果

偽足突起は培養細胞においてその腹側から垂直方向に突出するアクチンリッチな構造物であり、細胞の運動、癌細胞の浸潤に重要な役割を担う。ヒト腫瘍細胞をファイブロンectinでコートされた 3 μ m の穴あきメンブレンの上で培養すると、その細胞の運動能に合わせて偽足突起を穴に突出するように形成する。これにエキシマレーザーにより水平方向にレーザーを照射させ、細胞の細胞体の部分のみを除去する。これにより残存した偽足突起は明らかなダメージなくタンパク採取が可能であった。この方法により採取した偽足突起のタンパク分画と細胞体のタンパク分画をそれぞれ抽出後に高感度蛍光色素により標識させ、2 次元電気泳動に供した。結果、2508 個のタンパ

クスポットが観察され、211 スポットが偽足突起分画タンパクと細胞体分画タンパクとの間で 4 倍以上の有意な発現差を持って同定された。これらを質量分析に供して 46 個の偽足突起に高発現を示す候補タンパクを同定した。これらの内、既に細胞運動への関与が知られている RAB1A, HSP90B, TDRD7, vimentin に関して細胞蛍光免疫染色にてタンパク発現を確認したところ、偽足突起への高発現が認められた。また、RAB1A に関して過剰発現および発現を抑制する実験をおこなったところ、過剰発現させて細胞株では偽足突起の数が増加し、突起の伸長幅も増大したが、RAB1A の発現を抑制させるといずれも減少した。偽足突起に高発現が認められるタンパクは細胞の運動、浸潤に非常に強く関与している可能性が示唆された。この技術による偽足突起に特異的なタンパクの同定は偽足突起の更なる理解のみならず、腫瘍細胞における悪性の表現型の理解のみならず悪性腫瘍の新たな治療開発に大きな利益をもたらす。この新技術を生物学的特性の異なる複数のヒト肺癌細胞株を用いて、新規ターゲットの同定とその浸潤機構の解明を行うことができることが解った。

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 件)

[学会発表] (計 1 件)

Takahiro Mimae¹, Akihiko Ito, Man Hagiyama, Tadashi Kondo, and Morihito Okada, AACR 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10 Washington, DC, USA

[図書] (計 件)

研究者番号：

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

岡田 守人（OKADA MORIHITO）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70446045

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）