

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 16 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791451

研究課題名(和文) 膵癌の循環血中腫瘍細胞における細胞骨格タンパク質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of cytoskeletal proteins in circulating tumor cells of pancreatic cancer

研究代表者

萩尾 真人 (HAGIO, Masahito)

東洋大学・生命科学部・助教

研究者番号：00623927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光標識したヒト膵癌細胞株を同所移植することでその後発生するCTCsをあらかじめ標識しておくことができることを確認した。よってこの実験系は、今後のCTCsの詳細な細胞解析に大きく寄与することが期待できる。nestin、E-cadherin、vimentinといった細胞骨格タンパク質のLC/MSによる高感度検出が可能となった。今後は、培養細胞のクルードタンパク質でも検出できるか検討していく必要がある。LC/MSによる絶対定量法が確立次第、次の目標である膵癌細胞におけるEMT発現タンパク質の発現パターンを評価するために、膵癌以外の癌細胞の発現パターンとも比較していく予定である。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that it is possible to keep then in advance labeled CTCs generated by the orthotopically transplanted fluorescence-labeled human pancreatic cancer cell lines. Therefore, in this experimental system can be expected to contribute significantly to the detailed cell analysis of CTCs in the future. Cytoskeletal proteins such as nestin, E-cadherin and vimentin have enabled high-sensitivity detection by LC / MS. In the future, it is necessary to consider whether can be detected in the crude protein of cultured cells. Upon absolute quantification method by LC / MS is established, in order to evaluate the expression pattern of EMT-related proteins in pancreatic cancer cell, which is the next target, and is expected to continue to compare with the expression pattern of cancer cells other than pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：LC/MS 膵癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、臓器の部位的特性から早期発見が非常に困難であることと、その進行の早さのため、診断時には既に切除不能となっている例や術後再発例が多い。そのため、早期に膵癌を検出する方法や、進行例でも有効な治療法の一刻も早い開発が望まれている。

循環血中腫瘍細胞 (CTCs) は、腫瘍の原発巣から血管内へ浸潤し、血管内に存在する腫瘍細胞であり、他臓器への遠隔転移の原因となる。近年、癌患者の血液中に CTCs が少数存在しており、その存在の有無が乳癌、前立腺癌、大腸癌において生命予後に密接に関連することが明らかとなった (Miller et al. *Journal of Oncology*. 2010)。しかし CTCs の性質や機能が、原発巣や転移巣の腫瘍細胞と相同か、異なるのかについては十分解明されていない。

細胞骨格を形成する microfilament、microtubule、中間径フィラメントは、重合、脱重合、再重合を繰り返して、細胞運動時に極めて短時間で、発現様式が変化する。特に癌の浸潤、転移においては細胞骨格タンパク質がダイナミックに変化し、細胞運動を直接的に調節している (Yamazaki et al. *Cancer Sci*. 2005)。また、細胞骨格タンパク質の一つである中間径フィラメントは、様々な分化段階や細胞の性質に応じて発現パターンが変化し (Guérette et al. *BMC Evol Biol*. 2007)、特に幹細胞特異的マーカーでもある nestin は、膵癌において、浸潤、転移に重要な役割を担っていることが報告されている (Ishiwata et al. *World J Gastroenterol*. 2011、Matsuda et al. *Cancer Biol Ther*. 2011)。このことから、中間径フィラメントタンパク質を含めた細胞骨格タンパク質の発現パターンの変化が腫瘍細胞の浸潤や転移に大きく関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

原発巣 CTCs 転移巣という癌進行の一連の流れの中で、細胞骨格タンパク質の発現パターン変化を解明することによって、CTCs の特性を把握することができるのではないかと考えた。そこで、本研究では、動物実験モデルを用いて CTCs を採取し、CTCs における細胞骨格タンパク質の発現について原発巣、転移巣と比較し、CTCs における細胞骨格の特性の解明を目指す。これにより、CTCs の早期検出による膵癌診断精度の向上、さらに CTCs の制御による膵癌転移の抑制治療につながる可能性がある。

CTCs は血液中に極めて少数しか存在せずその分離が困難であるため、患者血液を用いた CTCs の基礎的研究はほとんど進んでいない。本研究では、既存のマーカーを用いるのではなく蛍光標識による細胞検知によって CTCs の簡便かつ精度の高い分離採取をあらかじめ検討する。

近年、癌細胞の特長の一つとしてとらえられている上皮間葉転換 (EMT) において、細胞が間葉様にその性質を変化させる際、細胞骨格タンパク質の発現パターンが変化 (E-cadherin の発現減少、vimentin の発現増加) することが明らかになってきている。CTCs の細胞骨格タンパク質の発現量や発現パターンの変化、さらにリン酸化の有無の変化などの基礎的情報の獲得によって、CTCs の機能解析研究の前進につながることを期待されるため、それらの情報を正確に測定・評価する必要がある。これまでに nestin および他の細胞骨格タンパク質を網羅的に LC/MS で定量した例は少なく (Olsen et al. *Cell*. 2006)、リン酸化タンパク質の発現比較も Western Blot による解析が主流である。そこで本研究では高感度検出ならびに翻訳修飾評価にもその効果が期待できる LC/MS を用いた細胞骨格タンパク質の定量的評価法を検討する。

最終的には CTCs の検出法の開発や膵癌の新規治療法開発につながる臨床応用へ向けた基礎的知見の獲得を目指す。

3 . 研究の方法

< CTCs の分離法検討 >

ヒト膵癌培養細胞の同所移植によるマウス転移モデルを用い、血中 CTCs の分離採取法を検討した。

< 細胞骨格タンパク質の LC/MS 解析 >

細胞骨格タンパク質の nestin、E-cadherin、vimentin の LC/MS による絶対定量法の確立を検討した。

4 . 研究成果

< CTCs の分離法検討 >

蛍光標識したヒト膵癌細胞株 (DsRed (+) PANC-1 cell) を同所移植することでその後発生する CTCs をあらかじめ標識しておくことができる。そのため EpCAM などの既存マーカーの使用に比べ精度の高い CTCs の分離採取が可能であると考えた。検討の結果、3-4 匹分のマウス腹部大静脈血のプールサンプルを溶血処理後にフローサイトメーターに供することで、 10^2 のオーダーの DsRed 陽性細胞を回収することが可能となった。これまでの報告に比べ、回収細胞数が増加したことによって遺伝子発現解析やプロテオーム解析を行う場合などに有用であると考えられた。

< nestin の LC/MS 解析 >

Nestin を構成する 1621 アミノ酸残基の中から、*in silico* によって特定のアミノ酸配列を選択し、定量分析のための標品となるリコンビナントペプチドを合成した。この合成ペプチドの MS による検出を検討した結果、10 nM から 100 μ M の範囲での検量線で非常に良好な直線性を得られる MRM プログラムが決

定した。この MRM プログラムを用い、あらかじめ nestin の発現が高いことが明らかとなっている ACBR1513 細胞から抽出したタンパク質を MS に供したところ、nestin を検出することができた。今後は、生体組織から抽出したタンパク質からも同様に検出できるか検討していく必要がある。

< E-cadherin、vimentin の LC/MS 解析 >

Thermo Scientific 製の Accela/LTQ Orbitrap Discovery を用い、*in silico* ならびに各タンパク質のリコンビナントタンパク質のトリプシン消化産物の解析により、特異性の高い (他のタンパク質の一部と相同性の低い) ペプチド配列を決定し、それらのリコンビナントペプチドを作成した。このペプチドをスタンダードとしフラグメントイオンの中で最も高い強度で安定的に検出されるフラグメントを選定し、MRM プログラムを設定した。リコンビナントタンパク質のトリプシン消化サンプルとともに連続分析を行ったところ、両者が等しい検出パターンを示したため、この MRM プログラムの使用が可能となった。今後は、検量線の有効濃度範囲を検討し、さらに実際の細胞のクルードタンパク質でも検出できるか検討していく必要がある。また、LC/MS による絶対定量法が確立次第、次の目標である膵癌細胞における EMT 発現タンパク質の発現パターンを評価するために、膵癌以外の癌細胞の発現パターンとも比較していく予定である。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Nestin regulates epithelial mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. Hagio M, Matsuda Y, Suzuki T,

Ishiwata T. Molecular and Clinical
Oncology. 1(1):83-7, 2013. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

萩尾 真人 (HAGIO, Masahito)

東洋大学・生命科学部・助教

研究者番号 : 00623927