

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890137

研究課題名(和文) 新技术レーザープロテオミクスにより同定された乳癌浸潤突起特異的分子の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of candidate pseudopodial molecules of breast cancer identified by a novel application of laser proteomics

研究代表者

見前 隆洋 (MIMAE, TAKAHIRO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00634081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：癌は浸潤をすることで命への危険が生じる。従って癌の克服において癌の浸潤を制御することは非常に重要である。本研究では培養細胞における細胞の運動や浸潤に強く関与することが知られている浸潤突起・偽足突起の機構を解析することを目的として研究を行った。

最新の精巧に浸潤突起・偽足突起のみを採取する方法を確立し、その方法により得たタンパク質を解析することにより、浸潤に強く関与することの示唆される分子を同定した。さらにその機能解析を行い英文論文や国際学会発表として報告した。こうした研究が進むことが癌克服へと繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cancer invasion has a potential to threaten the lives of patients. Therefore, the regulation of invasion will lead to conquest of cancer. In the present study, we attempted to disclose the mechanism of invadopodia or pseudopodia microprocesses formation which are known to be involved in cell motility or cancer cell invasion. We developed a novel application for precise isolation of invadopodia or pseudopodia. The protein fraction of pseudopodia was collected by this novel application, then, the candidate pseudopodial molecules were identified. In addition, the functional analysis of some candidate molecules was performed. The outcomes of the study was published in papers and annual meeting of AACR2013. The present study will provide further understandings of cancer research.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

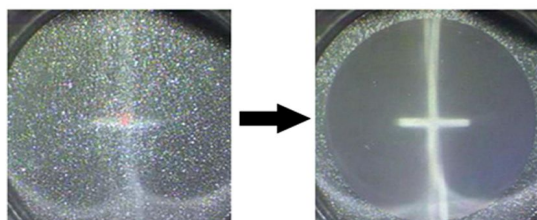
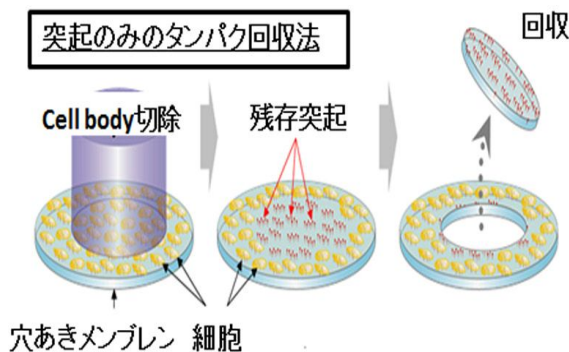
キーワード：癌浸潤 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景
乳癌における生物学的背景

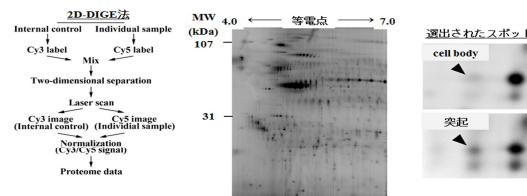
乳癌はERやHER2のステータスなどその生物学的特性による分類に応じた個別化治療が行われている。こうした分子は治療のターゲットとしてのみならずその浸潤傾向などの悪性度の診断としても実臨床で応用され、術後の補助化学療法を行うか否かなどの決定に重要な役割を担っている。しかし、現分類のみでは結果として効果のない患者にも追加治療が行われており、過不足ない最適な患者の選択には新たな悪性度規定分子の発見が最重要課題である。

高精度の癌浸潤部のみのタンパク解析技術による浸潤突起特異的候補分子の同定

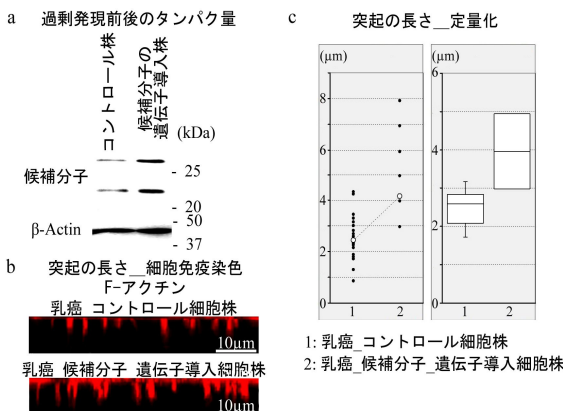
最近、我々は浸潤性乳管癌細胞株(MDA-MB-231)の浸潤突起部にあたるオルガネラのみを特殊なレーザーを用いて精巧に採取し、高感度なプロテオミクス手法である2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE) に供してタンパク発現解析を行うことで、突起部に高発現を認める分子を同定する技術を開発した(下図、次頁上図)。浸潤突起部に高発現を認める分子は浸潤の誘導・促進に強く関与していると考えられ、これら候補分子の機能解析は浸潤の制御という新たな癌治療の開発に発展し得る。また、同定された一部の分子に関してはその過剰発現が浸潤突起の伸長を促進する結果が出ており(次頁中央右図)同定された分子群は確かに癌細胞の浸潤を促進する因子群であることが強く示唆されている。



穴あきメンブレン上で培養した細胞(上左図)が特殊なレーザー照射によりcell bodyのみ綺麗に切除されている(上右図)。前後の横断面は下図参照。



左図: 2D-DIGE法、内因性のコントロール(対象サンプル全てのmixture)と個々のサンプル(cell body群と突起のみ群)をそれぞれCy3, Cy5にて標識して2次元泳動にてタンパクを分離する。分離されたタンパクはスポット状に捉えられ、それぞれのスポット全てにおいてCy3に対するCy5発現を相対的に数値化する。各々のサンプルでスポットの数値化を行い、サンプル間での相対的発現差を比較する。中央: Cy5で標識されたタンパクで2次元泳動施行。各々のタンパクはその等電点と分子量によって分離され、スポット状に認められる。右図: cell body群と突起のみ群で発現差の認められたスポットの拡大図。



同定された浸潤突起特異的な候補分子の過剰発現実験において、過剰発現群にて有意に浸潤突起が伸長していた。

2. 研究の目的

既に候補分子の同定は終了しており、一部の機能解析によりそれら候補分子群が癌の浸潤傾向の増悪に関与している可能性が強く示唆されているが、その再現性確認は一部の候補分子に留まっている。また、ヒト検体における再現性も確認出来ていない。ヒト乳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再現性を全て確認し、ヒト乳癌手術検体における浸潤部への局在(再現性)を免疫染色にて確認する。確認できた分子について、ヒト検体での染色パターンとERやHER2ステータスを含めた臨床病理学的背景について検討する。さらにその結果で浸潤をはじめとする悪性度を規定する因子と判明した分子については機能解析を行い、個別化治療に有効な新規分子標的となり得るかを模索する。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義
 これまで生きて個々の細胞において癌浸潤に関与が考えられる部分とそうではない部分との正確な分離は非常に困難であった。こ

の度我々の開発した新技術は、従来の採取法であるチップやヘラを用いた細胞の cell body のみを搔把する煩雑な手動操作と比して精巧さにおいて世界トップクラスで、同定された候補分子は乳癌浸潤に関与することが既に示唆されており高い信頼性も有している。また、分子同定後の解析では in vitro と共にヒト肺腺癌検体での再現性の確認は不可欠で、手術サンプルを豊富に得ることが欠かせない。我々の乳癌の治療実践や手術症例数（年間約 200 例）は本研究の必要症例数には十分であり、独創的な世界的最先端研究が出来る土台がある。本研究により悪性度規定因子や新規分子標的が同定されれば乳癌の治療が大きく発展し、人類が受ける恩恵は計り知れない。

3. 研究の方法

平成 24 年度

1. 乳癌細胞株の浸潤突起部、ヒト乳癌検体の浸潤部での再現性確認および臨床病理学的解析

(1) 浸潤突起特異的候補分子の乳癌細胞株における再現性確認

既に同定されている候補分子の突起への局在を浸潤性乳癌細胞株において調べる。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(下図)。

(2) ヒト浸潤性乳管癌組織における浸潤部にての候補分子の発現を確認

上記の実験にて乳癌細胞株で再現性が確認された分子に関してヒト乳癌検体において免疫組織学的染色にて、浸潤部で高発現を認めるかに関して確認する。既に一部の候補分子ではその傾向が確認されており(次頁の図)その他の候補分子に関して行う意義が強いことが示唆される。

(3) 浸潤突起特異的候補分子のタンパク発現パターンと臨床病理学的背景との関係を検討

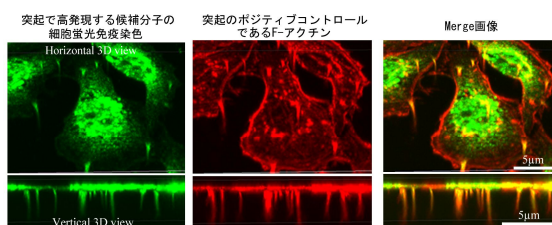
浸潤突起特異的候補分子の発現パターンと ER や HER2 ステータスといった既知の生物学的特性を含めた臨床病理学的背景との関係を解析し、悪性度規定因子の同定を模索する。

平成 25 年度

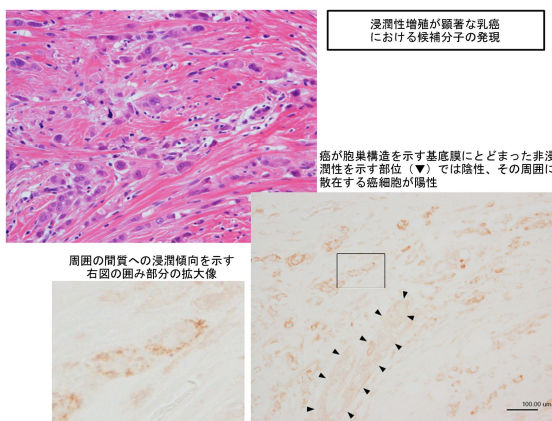
2. 浸潤、悪性度を規定する候補分子の機能解析

(1) 有望な分子に関して浸潤・転移に関する機能解析

前年度の結果から悪性度を規定する可能性が示唆された分子に関してその後の解析を進める。この時、複数候補があれば特に(a)発現の変化が大きい、(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さら



突起部で高発現を認めた候補分子の突起への局在が認められ、発現解析結果の再現性が確認された。



浸潤性増殖が顕著な乳癌における候補分子の発現

癌が胞巣構造を示す基底膜にとどまった非浸潤性を示す部位(▼)では陰性、その周囲に散在する癌細胞が陽性

周囲の間質への浸潤傾向を示す
右図の囲み部分の拡大像

に絞り込む。分子生物学・細胞生物学及び実験病理学的手法を駆使してその分子の機能を明らかにする。

(2) 個別化治療のターゲットになるか否かの検討

上記実験で浸潤に関わることが確認された分子に関しては抑制実験(例えば浸潤傾向の強いヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 などを用いて)などを追加し、ヒト乳癌において新規治療標的となるか否かの可能性を模索する。

研究が当初計画通りに進まない時の対応

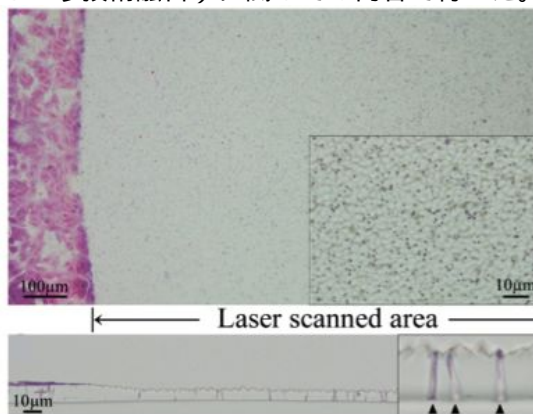
我々の研究室では、免疫染色や細胞培養を用いた実験をはじめとして様々な悪性度に関する研究や分子の機能解析を行ってきており、技術的な不安はない。本研究で対象とするタンパクは既に一部は再現性が確認されており、残りの候補分子も非常に有望である可能性が高いが、少ないながらも期待通りに再現性の確認や悪性度との関係を示せない可能性がある。その場合は、最初の候補分子同定に用いる細胞株を変更することで再度候補分子を同定しなおすなどの対応を考えている。

4. 研究成果

癌は浸潤をすることで命への危険が生じる。従って癌の克服において癌の浸潤を制御することは非常に重要である。本研究では培養細胞における細胞の運動や浸潤に強く関与することが知られている浸潤突起・偽足突起の機構を解析することを目的として研究を行った。

最新の精巧に浸潤突起・偽足突起のみを採取する方法を確立し、その方法により得たタンパク質を解析することにより、浸潤に強く関与することの示唆される分子を同定した。さ

らにその機能解析を行い英文論文や国際学会発表として報告した。国際学会での発表は主にこれまでに確立した新規技術（エキシマレーザーを用いた偽足突起（微細構造物）の採取と2D-DIGEを用いた特異タンパクの同定という技術融合）に関しての内容で行った。

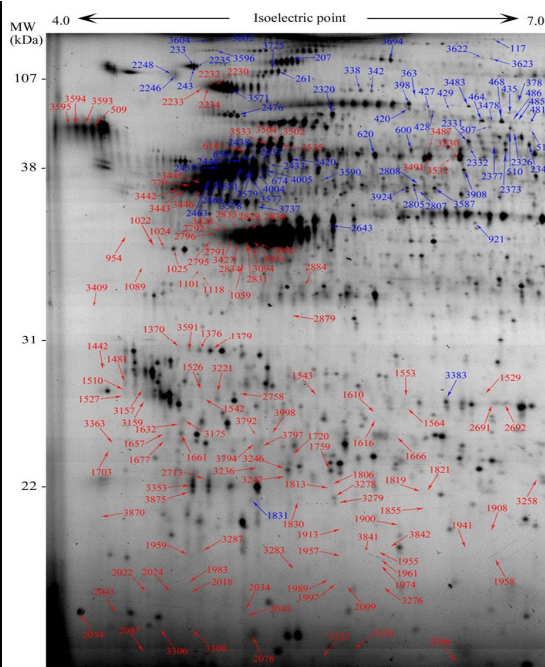


さらにこの方法において、偽足突起の伸長能を評価する新たな手法として共焦点顕微鏡を用いた方法を提案し、一定の評価が得られた。

我々の研究グループはこれらの結果を踏まえた研究の一つとして、上記の方法を用いて同定された偽足突起特異的な分子である -parvin に関する機能解析実験を行い、論文として報告した。この機能解析においては、*in vitro*の実験として先に述べた方法での偽足突起伸長能の評価実験や、wound healing assay による浸潤・移動能の評価実験を行い、 -parvin が確かに細胞の運動を促進する方向に作用することが明らかとなった。また、ヒト乳癌手術検体において悪性度が高い症例群で有意に -parvin タンパク発現が高率に認められ、これらのことは -parvin が乳癌の浸潤・転移において非常に重要な役割を担っていることが示されたと言える。

ヒトにおいても有効な結果が得られたことは、本研究において同定された偽足突起特異的な候補分子群が非常に有望な浸潤に關与する分子群であるという speculation を裏付けたと言える。

従って本技術を用いた研究が進むことが癌克服へと繋がると考えられ、更なる発展につながるよう研究を今後も継続する価値があると考えられた。



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 1 件)

Masaaki Ito, Man Hagiya, Takahiro Mimae, Takao Inoue, Takashi Kato, Azusa Yoneshige, Jun Nakanishi, Tadashi Kondo, Morihito Okada, Akihiko Ito. -Parvin, a pseudopodial constituent, promotes cell motility and is associated with lymph node metastasis of lobular breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144(1):59-69. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Takahiro Mimae, Akihiko Ito, Man Hagiya, Tadashi Kondo, Morihito Okada. Novel application for pseudopodial proteomics using excimer laser ablation and two-dimensional difference gel electrophoresis. AACR Annual Meeting 2013. 2013.04.09. Washington D.C.

〔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：
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

見前 隆洋 (Mimae, Takahiro)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00634081

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：