

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：83802

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25710013

研究課題名(和文) FFPE組織とがん細胞株を利用したがん幹細胞とその微小環境のプロテオミクス解析

研究課題名(英文) Proteomics analysis of cancer stem cell and its microenvironment using FFPE tissue and cancer cell line

研究代表者

畠山 慶一 (Hatakeyama, Keiichi)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：20564157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請は、がん幹細胞とその微小環境のプロテオミクス解析を行うことで、固形がんにおける予後予測に利用できる候補分子を探索することを目的としている。本研究では、主にFFPE組織と細胞株を対象とした解析を行っている。  
この解析の結果、一部の大腸がんの細胞集団でのみ特異的に分泌している分子を同定することができた。この成果から、単一細胞解析の新たな研究の展開が見えてきた。

研究成果の概要(英文)：This research aim is discovery of molecules for prognostic prediction using proteome analysis of cancer stem cell and its microenvironment. This approach focuses on analysis of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue and cancer cell line.  
We identified proteins secreted from unique cell population in colorectal cancer. Furthermore, this achievement progressed a new research to analyze single cancer cell, resulting winning next grant-in-aid.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：プロテオミクス解析 単一細胞解析 がん

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞(cancer stem cell)と呼ばれる細胞集団の研究が盛んに行われている。この細胞は、がん細胞中に数%またはそれ以下の割合で含まれており、幹細胞様の挙動を示したり、高い薬剤耐性能を有するなど、通常のがん細胞には見られない特徴を持つ。このがん幹細胞を治療標的とした研究は、慢性骨髄性白血病において一定の成果を上げてきている(Naka et al. *Nature*, 2010)。そのため、造血器腫瘍におけるがん幹細胞の存在の有無は、治療や予後診断をする上で重要な指標の1つとなると考えられている。

一方で、2000年以降に様々な固形がんにおいてもがん幹細胞の存在が確認されはじめてきているが、未解明の部分が多い。例えば、メラノーマやその細胞株において、がん幹細胞を頂点とした明確な階層構造をとらないといった現状のがん幹細胞モデルから逸脱している報告もみられる(Roesch et al. *Cell*, 2010)。がん幹細胞における周囲の微小環境(ニッチ)からのシグナルの重要性が指摘されているものの、その詳細については不明な点が多い。そのため、固形がんにおけるがん幹細胞の存在の有無を予後診断に利用するには、がん幹細胞とそのニッチとの関連性について詳細に調べる必要があると考えられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、固形がんにおける予後予測診断システムの構築を最終目的とした、がん幹細胞様細胞とその微小環境のプロテオミクス解析を行う。はじめに、ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE)組織とがん細胞株を用いて、がん幹細胞とその周辺組織のプロテオミクスを主軸に置いたマルチオミクス解析を行う。FFPE組織の解析は、Laser microdissection (LMD)を用いて、既知のがん幹細胞マーカーを発現している(または、発現していない)細胞とその周辺領域を切り出したサンプルで行う。その結果を基に、がん細胞株を用いてそこから同定された分子の機能解析を行い、がん幹細胞様細胞が周囲から受ける影響及び周囲へ与える影響を調査する。また、周辺環境の影響を受けやすい細胞群の同定も試みる。次に、同定された分子群のがん幹細胞様細胞及びその周辺での分布パターンから、もっとも予後不良または良好となるパターンの抽出を行う。これから、固形がんにおけるがん幹細胞様細胞の存在とその周辺環境と予後との関係を明らかにする。最後に、以上の結果を基に固形がんにおける新規予後予測診断システムのプラットフォームの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

はじめにホルマリン固定されたがん細胞株を用いて、タンパク質抽出法及びLC-MS解析の最適化を行った。その後、FFPE組織切片を用いた検討も行った。次に、文献等を用いた分泌タンパク質の探索を行った。その後、C1システム(Fluidigm)を用いて単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を試みた。

### 4. 研究成果

プロテオーム解析において、LC-MS測定前の前処理がタンパク質の同定数に大きく関わると考えられている。そこでタンパク質の同定効率の向上を目指して、細胞から抽出されたタンパク質の分画条件の検討を行なった。その結果、アセトンを用いた細胞からのタンパク質抽出が、少ない細胞数で効率よく行えることが明らかになった。しかしながら、1,000細胞からの抽出では、 $1 \times 10^6$ 個以上の細胞を用いたプロテオミクス解析と比較して、タンパク質同定数が1/10程度になることが分かった(図1)。以上のことから、FFPE組織からタンパク質の抽出を行う場合も、かなりの細胞数が必要となることが示唆された。

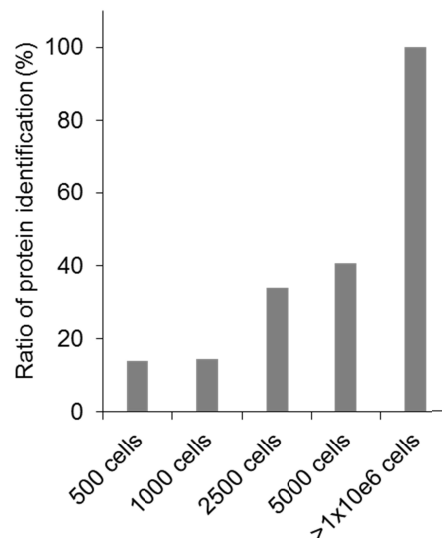


図1. 少ない細胞数からのタンパク質抽出。

この結果を踏まえて、FFPE組織からの抽出も試みた(図2.)。その結果、安定的にタンパク質をFFPE組織から抽出するには、部位(浸潤部、正常部、充実性部)によらず、20,000細胞以上必要であることが示された。この値は、質量分析装置のスペックにも大きく依存すると考えられる。さらに、少ない細胞数でプロテオーム解析を行うには、ハイスペックな質量分析装置を用いる必要がある。

細胞と微小環境との関係を明らかにするために注目すべき分子の1つに、分泌タンパク質が挙げられる。そこで、公共データベースと文献検索を利用して、分泌タンパク質群の候補リストを作成した。分泌タンパク質には、エクソソーム由来のタンパク質も含まれる。また、血中に分泌されていることが確認されているタンパク質も含むものとした。

このリストを基に候補タンパク質を絞り込む。

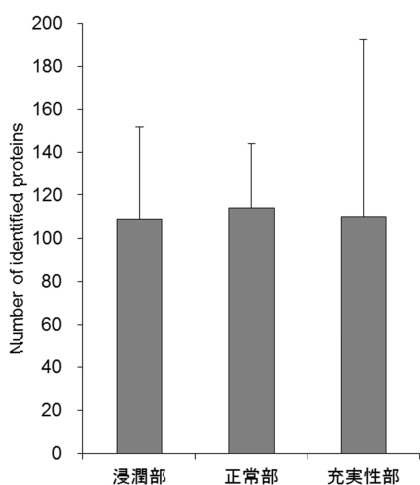


図 2. 少ない細胞数からのタンパク質抽出。

上記で作成したリストを用いて絞り込んだ分泌タンパク質群の一部を対象として、C1システムによる単一細胞の遺伝子解析を行った。この解析には、大腸がん細胞株であるSW480とSW620を用いることとした。この解析の結果、SW480に特異的に発現している遺伝子Xを見いだした(図3)。SW480においてm高発現( $Ct < 15$ )を示した細胞は26%(7/27)であった。SW620には、高発現を示す細胞はみつからなかった。以上の結果から、この遺伝子Xは、SW480においてのみ、特定の細胞集団で高発現していることが示された。

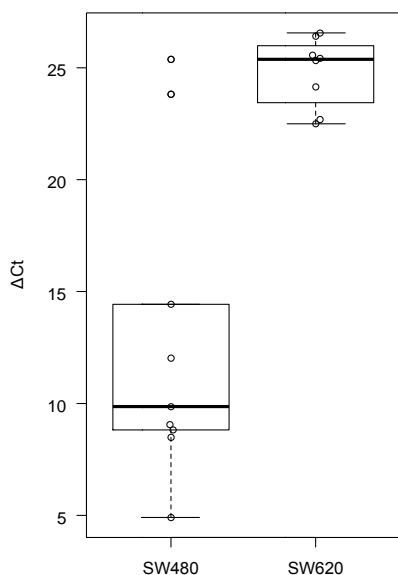


図 3. SW480とSW620の単一細胞解析. C1システムとqRT-PCRを用いて、遺伝子Xの発現量を調べた。Ct値が低い方が、発現量は高いことを示す。

さらに、これら細胞上清のプロテオミクス

解析の結果から、SW480の上清中にはこの遺伝子Xから翻訳されたタンパク質が豊富に存在することが示された。これらの結果は、SW480の特定の細胞集団が、積極的に細胞上清へこの分子を分泌していることを示唆している。しかしながら、しかしながら、目的の遺伝子発現が高い細胞だけが本当に、その目的のタンパク質を多く分泌しているのかまでは、確認することができなかった。それを確認するための、新たな測定方法を提案し、基板研究(C)に採択された。今後は、提唱した測定法を用いて単一細胞解析の新たな展開を目指す。

本研究では、プロテオミクス解析を用いてがん幹細胞と微小環境の関係を明らかにすることで、新たな予後予測因子となりえる分子の探索を試みた。候補分子の発見までは至らなかったものの、単一細胞解析から興味深い遺伝子が同定された。さらにこの研究から、新たな研究が立ち上がり、単一細胞解析分野で興味深い結果が得られつつある。以上のことから、本研究の実施は腫瘍診断学分野の発展のみならず、他の分野の発展にも寄与したと考えられる。

#### 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)

Keiichi Hatakeyama, Yushi Yamakawa, Yorikane Fukuda, Keiichi Ohshima, Kanako Wakabayashi-Nakao, Naoki Sakura, Yutaka Tanizawa, Yusuke Kinugasa, Ken Yamaguchi, Masanori Terashima and Tohru Mochizuki. A novel splice variant of XIAP-associated factor 1 (XAF1) is expressed in peripheral blood containing gastric cancer-derived circulating tumor cells. *Gastric Cancer*. 2015 18:751-61. 査読有り Doi: 10.1007/s10120-014-0426-3.

[学会発表](計 9件)

Masanori Terashima, Keiichi Hatakeyama, Yushi Yamakawa, Norihiko Sugisawa, Yuichiro Miki, Rie Makuuchi, Hironobu Goto, Masanori Tokunaga, Yutaka Tanizawa, Etsuro Bando, Taiichi Kawamura, Keiichi Ohshima and Toru Mochizuki. Survivin expression in circulating tumor cells of patients with gastric cancer. 2014 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium (国際学会), 2014, Jan., San Francisco, CA.

M. Terashima, K. Hatakeyama, Y. Yamakawa, N. Sugisawa, Y. Miki, R. Makuuchi, H. Goto, M. Tokunaga, Y. Tanizawa, E. Bando, T. Kawamura, K.

Oshima, T. Mochizuki. Survivin expression in peripheral blood is a significant prognostic marker in patients with gastric cancer. American Society of Clinical Oncology (国際学会). 2014, May. Chicago, IL. Keiichi Hatakeyama, Yushi Yamakawa, Keiichi Ohshima, Kanako Nakao, Yutaka Tanizawa, Yusuke Kinugasa, Ken Yamaguchi, Masanori Terashima, Tohru Mochizuki. Novel splice variant of XIAP-associated factor 1 (XAF1) is expressed in peripheral blood of patient with gastric cancer. 第73回日本癌学会学術総会. 2014, Sep. 神奈川県, 横浜市.

M. Terashima, K. Hatakeyama, Y. Yamakawa, Y. Miki, R. Makuuchi, S. Honda, T. Tsubayashi, M. Tokunaga, Y. Tanizawa, E. Bando, T. Kawamura, K. Oshima, T. Mochizuki. Prognostic significance of survivin expression in patients with gastric cancer. European Society for Medical Oncology (国際学会). 2014, Sep. Madrid, Spain. 畠山慶一、大島啓一、長嶋剛史、大浪澄子、大浪俊平、丸山宏二、秋山靖人、浦上研一、楠原正俊、山口建、望月徹. CEA family profiling in 1,000 cancer patients based on somatic mutations associated with gene expression alteration. 第74回日本癌学会学術総会. 2015, Oct. 愛知県, 名古屋市.

Rie Makuuchi, Masanori Terashima, Shinsaku Honda, Taichi Tsubayashi, Makoto Hikage, Masanori Tokunaga, Yutaka Tanizawa, Etsuro Bando, Taiichi Kawamura, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Oshima, Kennich Urakami, Masatoshi Kusuhara, Ken Yamaguchi. Genomic profiling of gastric cancer using High-tech Omics-based Patient Evaluation (HOPE). 第53回癌治療学会学術集会. 2015, Oct. 京都府, 京都市. 大島啓一、長嶋剛史、畠山慶一、下田勇治、田邊智絵、大浪澄子、大浪俊平、芹澤昌邦、浦上研一、秋山靖人、楠原正俊、望月徹、山口建. Gene expression profiling: a single institution study of 1,000 cancer patients. 第74回日本癌学会学術総会. 2015, Oct. 愛知県, 名古屋市.

Masanori Terashima, Rie Makuuchi, Masanori Tokunaga, Yutaka Tanizawa, Etsuro Bando, Taiichi Kawamura, Makoto Hikage, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Shumpei Ohnami, Kennich Urakami, Masatoshi Kusuhara, Ken Yamaguchi. Gene expression profiling of Japanese gastric cancer

using Asian Cancer Research Group classification. 2016

Gastrointestinal Cancers Symposium (国際学会). 2016, Jun. Moscone West Building, Sun Francisco, CA.

Rie Makuuchi, Masanori Terashima, Keiichi Hatakeyama, Masanori Tokunaga, Yutaka Tanizawa, Etsuro Bando, Taiichi Kawamura, Keiichi Ohshima, Kenichi Urakami, Masatoshi Kusuhara, Ken Yamaguchi. Whole exome sequencing and gene expression profiling of neuroendocrine carcinoma in the stomach. 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium (国際学会). 2016, Jun. Moscone West Building, Sun Francisco, CA.

〔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 1件)

名称：甲状腺髄様がん判定方法  
発明者：中尾 香菜子, 望月 徹, 畠山 慶一  
権利者：静岡県  
種類：特許  
番号：特許公開 2013-255485  
取得年月日：2013年12月26日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畠山 慶一 (HATAKEYAMA, Keiichi)  
静岡県立静岡がんセンター研究所・遺伝子  
診療研究部・主任研究員  
研究者番号：20564157