

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893144

研究課題名(和文)メタボローム解析による肺癌細胞の浸潤・転移に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文)Metabolome analysis of the molecular mechanism involved in the invasion and metastasis of lung cancer cells

研究代表者

笹田 伸介(SASADA, SHINSUKE)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・がん専門修練医

研究者番号：30711329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌における肺癌細胞の浸潤・転移に関わる低分子をメタボローム解析により検討すべく、肺癌細胞の培養と、遊走能の評価、および遊走に関わる低分子群の検討およびビデマスコープによる低分子細胞成分パターンの模索を行った。増殖能・遊走能が強い細胞株ではhistidine、threonine、tyrosineなどのアミノ酸類、カルニチン類などが多く存在し、これらが増殖能・遊走能に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：to analyze the molecular mechanism involved in the invasion and metastasis of lung cancer cells, lung cancer cell culture, assessment of migration ability and search for the patterns of low-molecular-weight cellular component were performed, and the analysis by vido-mass-scope was explored. In lung cancer cell lines with strong growth and migration ability, some amino acids, such as histidine, threonine and tyrosine, and carnitines were present specifically and the possibility that they were involved in proliferation and migration ability was suggested.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍学 肺がん 悪性度

1. 研究開始当初の背景

癌の転移は、癌細胞の原発巣からの離脱、間質内への浸潤、脈管・基底膜の破壊、脈管内皮への定着、脈管外への浸潤、標的臓器での増殖という多くのステップを経て成立する。各ステップにおいて様々な遺伝子やたんぱく質が関与することが明らかになっているが、細胞内の低分子動態は未知である。低分子動態の解明により、浸潤・転移のより詳細なメカニズムの考察や新たな関連因子の発見が期待される。

我々は細胞内の低分子を一斉解析する方法として液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)を利用して、胃癌細胞において5-FUの細胞死誘導にプロリン-グルタミン酸代謝や脂質代謝が密接に関連していることを見出し、関連するタンパク質の同定を可能とした(Sasada: Oncol Rep 2013;29:925-931)。

広島大学で開発されたLive single-cell video-mass spectrometryはビデオ顕微鏡下で細胞を観察しながら、必要な瞬間に1細胞を捕捉し、即座に超高感度に質量分析を行うことを可能とした世界初のシステムである(J Mass Spectrom 2008;43:1692-1700)。生きた細胞をナノスプレッチップで捕捉し、1pLに満たない超微量の試料にイオン化溶媒を添加し、そのまま質量分析が可能である。

2. 研究の目的

肺癌の浸潤・転移に関わる遺伝子およびタンパク質の研究が進められているが、より低分子であるメタボローム動態のメカニズム解析は未開拓の領域である。本研究はメタボローム解析手法を用いて肺癌細胞の浸潤・転移に関わる低分子機構を解明することを目的とする。液体クロマトグラフィータンデム質量分析法(LC-MS/MS)による解析に加えて、Live single-cell video-mass spectrometryを用いて、癌細胞の動態をリアルタイムに解析

する。このことにより、浸潤・転移に関わる特異的な因子を検出することが可能である

3. 研究の方法

メタボローム解析により肺癌細胞の浸潤・転移に関わる低分子パターンを解明する。

1) 肺癌細胞の培養と遊走能の評価

すでに4種類の肺癌細胞(A549、Calu-6、PC-9、NCI-H820)を有しており、培養に成功している。これらの細胞の増殖能、遊走能を評価する。

2) LC-MS/MSによる、増殖・遊走している細胞と増殖・遊走していない細胞の低分子パターンの解明

培養細胞のうち増殖・遊走している細胞群と増殖・遊走していない細胞群からそれぞれ細胞内低分子をメタノール抽出し、LC-MS/MSにより一斉解析する。主成分分析およびt検定を行い、それぞれに特徴的な分子を同定し、低分子パターンを模索するとともに、以後の実験で標的とする分子を抽出する。標的分子を決定しておくことで、1細胞解析をより高感度に行うことが可能となる。

Live single-cell video-mass spectrometryにより生きた個々の細胞において浸潤時期に変動する低分子を同定する。

1) ビデオ顕微鏡下に肺癌細胞の遊走を観察と1細胞評価の指摘時期を検証

顕微鏡下に肺癌細胞の遊走を観察し、遊走時間による分子変動を評価する。最も変動が特徴的な時期を決定し、以後の実験で使用する。

2) 遊走している細胞と遊走していない細胞の分子差分を検証

Live single-cell video-mass spectrometryを同一ディッシュ内において、個々の遊走している細胞と遊走していない細胞から試料を採取し、低分子パターンを検証する。

3) 同一細胞において、遊走している時期と遊

走していない時期の分子変動を検証

1 個の細胞において、遊走する前に試料を採取した後に観察を続け、遊走を始めてから再び試料を採取し、前後の低分子パターンを検証する。同一細胞で検証することは、遊走に関わるより特異的な因子の評価につながる事が期待される。しかし、この検証をするためには初回の試料採取後も細胞が一定期間の生存を続け、遊走を開始することが条件であるため、試料採取後の細胞の動態を観察する必要がある。

4)同一細胞において、遊走時の浸潤突起と細胞質での分子分布を検証

遊走している細胞の浸潤突起部と他の細胞質からそれぞれ試料を採取し、分子分布に差異があるかを検証する。

・代謝経路データベースによる考察

上記の実験から得られた細胞遊走に関わる因子を代謝経路データベースを参照することにより、どのような代謝の変動があるかを考察する。

4. 研究成果

研究の目的である肺癌における肺癌細胞の浸潤・転移に関わる低分子をメタボローム解析により検討すべく、肺癌細胞の培養と、遊走能の評価、および遊走に関わる低分子群の検討を行った。

肺癌細胞株は既に有しており、即座に使用可能な Calu-6、A549、PC-9、NCI-H820 の 4 種類の細胞株を使用した。まず、細胞株の培養を行い、それぞれの増殖能・遊走能を評価した。Calu-6 と NCI-H820 の 2 株、A549 と PC-9 の 2 株はそれぞれ同程度の増殖能・遊走能を有しており、前者と比較して後者の増殖能・遊走能は強い結果であった。この結果から、まず遊走能の異なる細胞集団を比較することで、遊走に関わる分子の拾い上げを行った。質量分析法を用いた 2 群の培養細胞株の細胞内低分子パターンの検索を行うにあたって、

1 細胞探索の前段階としてそれぞれの細胞集団から得た細胞内抽出液を用いて、細胞内低分子パターンの網羅的解析を行った。液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS 法) を用いて高感度解析を行った。タンデム質量分析法 (MS/MS 法) により分子構造の決定を行い、分子を同定した。得られたデータを主成分分析することにより、細胞株毎にグループ化することができ、細胞株および EGFR 変異別に特徴的な分子が存在することが判明した。遊走能の強い細胞株には histidine、threonine、tyrosine といったアミノ酸類、カルニチン類および Octadecanamide などの有機酸が多く存在した。一方、各種 glycerol、sphingosin などの脂質類、pantothenate といったビタミン類やある種のアミノ酸は少ない結果であった。

しかしながら、細胞株毎に内在するアミノ酸類やカルニチン類などの配分は異なっていることも確認され、細胞の特徴と増殖・遊走に関わる特徴を明確に区別することは困難であった。また、遊走している細胞群と遊走していない細胞群を比較する際に、遊走している細胞群の検体量が少なくなり、両者の LC-MS 法による測定感度が無視できない程度に異なっていた。測定条件の調整が必要であったが、現時点では十分に信頼できるデータは得られておらず、1 細胞における検討には応用できていない。

検体作成から測定条件を含めた機器設定まで、克服すべき課題が残っているが、本研究目的は細胞の遊走能・増殖能、ひいては肺癌の浸潤・転移に関わる分子の根底に光を当てることが可能を有しており、より実現可能性が高く、普遍的な実験体系を検討中である。

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2件)

1. Sasada S, Miyata Y, Tsubokawa N, Mimae T, Yoshiya T, Okada M. Role of positron emission tomography/computed tomography findings for indications of adjuvant chemotherapy in T1b-2aNOMO lung adenocarcinoma. Ann Thorac Oncol, 査読有, 98, 2014, 417-422.

2. Sasada S, Nakayama H, Miyata Y, Tsubokawa N, Mimae T, Yoshiya T, Murakami S, Ito H, Okada M. Comparison of malignant grade between pure and partially invasive types of early lung adenocarcinoma. Ann Thorac Oncol, 査読有, 99, 2015, 956-960.

〔学会発表〕(計2件)

1. Sasada S, Nakayama H, Miyata Y, Tsubokawa N, Mimae T, Yoshiya T, Murakami S, Ito H, Okada M. Comparison of malignant grades between pure and partially invasive types of clinical stage IA lung adenocarcinoma. ESMO 2014, Madrid, Spain, 2014.9.29.

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹田 伸介(SASADA SHINSUKE)

独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・がん専門修練医

研究者番号:30711329

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし