

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

臨床検体と蛍光二次元電気泳動法を用いた  
大腸がんのプロテオーム解析

**Proteomic study of tumor tissues using  
2D-DIGE revealed novel molecular  
backgrounds of colorectal cancer**

申請者

杉原 豊

Yutaka SUGIHARA

生命理工学専攻 生体制御研究

2012年12月

大腸がんは、世界で4番目にがんの死亡者数の中で多い疾患である。日本において、大腸がんはがんの死亡者数の中で3番目に多い疾患であり、年間4万人以上もの人が大腸がんを原因として死亡している。大腸がんの罹患数は年々増えており、2020年には、がんの中で罹患率が1番高くなると考えられている。近年、大腸がんの治療法は進歩してきたが、リンパ節転移を伴った進行期における治療成績はいまだに悪い。大腸がんの治療成績向上のためには、新しい診断法や再発予測・予後予測する技術の開発、新規の治療標的を発見することが期待されている。

第一章では、研究背景と目的について述べている。がんは遺伝子に変異が蓄積することで起こる疾患であり、ゲノムの広範囲にわたって生じた遺伝子の異常によって正常細胞はがん細胞になる。ゲノムの異常は最終的には機能的な異常としてがんの臨床病理学的特性を決定しており、ゲノムの異常に基づいた臨床的な特性を反映する。ゲノムの機能的な翻訳産物はプロテオームであることより、がんの悪性度に関わる性質はプロテオームが直接影響を与えていると考えられる。そのため、ゲノムに蓄えられた生物学的機能を解釈するにはプロテオームの情報は必須であり、がん細胞においてゲノムの異常がどのようにがん細胞の形質に反映されているかを知るために、プロテオーム解析は重要である。特に、臨床検体を使ったプロテオーム解析は、バイオマーカー候補や治療標的を同定すること、がんの発生や進行の分子背景を理解する上で重要である。現在まで、がんの分子背景を調べる研究の多くは、細胞株を用いていたが、*in vivo*と*in vitro*で細胞の性質が異なっていることが知られている。さらに、臨床検体を用いたプロテオーム解析は、臨床病理学的なパラメータとタンパク質発現の対応を知る上でも重要である。本研究では、大腸がんの臨床検体を対象に、蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、大腸がん組織のタンパク質の発現状態を調べた。異常を来たしたタンパク質が大腸がんの発生や進展に関与しているのかを解明することを目的として本研究を行った。

第二章では、本研究で同定した大腸がんの悪性度に関わる新しいタンパク質について述べている。大腸がん組織と正常組織をそれぞれすり潰した検体を用いたタンパク質発現解析を行った。59症例の大腸がん組織と正常組織のタンパク質発現プロファイルを蛍光二次元電気泳動法により観察した。まず、内部標準サンプルの作製を行った。これは、全ての症例から等量ずつタンパク質を混ぜ合わせることで作製した。内部標準サンプルはCy3で、大腸がん組織または正常組織といった個別サンプルはCy5で蛍光標識し、これら内部標準サンプルと個別サンプルを混ぜ合わせて二次元電気泳動をすることにより、タンパク質分離を行った。一枚のゲル画像から3458個のタンパク質スポットを検出した。個々のスポットについてCy5とCy3のスポットのシグナル強度を測定し、Cy5の強度をCy3の強

度で割った割合を計算することで、ゲル間のばらつきの補正を行った。同一サンプルを3回泳動し、実験系の再現性を調べたところ、3458個のタンパク質スポットのうち98.8%以上のタンパク質スポットのシグナル強度が2倍差以内に収まっており、相関係数は0.9以上であったことより、実験間で再現性が良いことが示唆された。正常組織とがん組織のタンパク質発現を比較し、統計学的に有意な発現差 ( $p < 0.01$  かつ 2.5倍差以上) があるタンパク質スポットを調べたところ、110個のタンパク質スポットが有意な発現差のあるタンパク質スポットであった。質量分析法により110個のタンパク質スポットは67種類のタンパク質から構成されていることが明らかとなった。これらのタンパク質のうち、研究室で使用できた抗体を用いて、ウェスタンブロット法による発現検証を行った。ウェスタンブロット法による発現検証されたタンパク質のうち、Wnt経路に関わり、大腸がん以外のがんで悪性度に関わることが知られている、APC-binding protein EB1 (EB1)に注目した。EB1の発現異常と臨床病理学的悪性度の関係、生物学的悪性度の関係を132症例の大腸がん組織検体を用いて、免疫染色法で解析を行った。免疫染色法により、EB1の発現異常は、リンパ管侵襲や血管侵襲に関わっていることが明らかとなった。また、EB1のタンパク質発現が高いと、予後不良であることを明らかとした。EB1の機能を調べるために、大腸がん細胞株 Colo320細胞とRNA干渉法を用いたEB1の発現抑制実験を行った。EB1の発現を抑制すると、大腸がん細胞の増殖や浸潤能が抑制された。以上より、EB1の発現上昇は、増殖や浸潤に関わり、大腸がんの予後に相関するタンパク質であることを明らかとした。

第三章では、大腸がん組織内の局在が異なるがん細胞がどのように生物学的特性に違いがあるかについて述べている。がん組織は、構造的に不均一な細胞集団である。がん組織内には、間質細胞や血管、炎症細胞、細胞外マトリックスなどが含まれている。そのため、がん細胞の進行は、変異といった遺伝的背景に依存するだけでなく、がん組織の微小環境にも依存すると考えられる。そのため、がんの進行を促進させる分子背景を理解するためには、遺伝子発現パターンとともにがん組織内でのがん細胞の局在を考慮すべきである。そこで、がん組織内の異なる部位のがん細胞におけるタンパク質発現プロファイルを調べた。19症例の大腸がん組織と正常サンプルから目的とする細胞を回収した。大腸がん組織からは、表層部、中心部、浸潤部に局在するがん細胞をレーザーマイクロダイセクション法で回収し、タンパク質抽出を行った。国立がん研究センター研究所の近藤らが開発したレーザーマイクロダイセクションにより回収したサンプルを蛍光二次元電気泳動法により分離・観察する技術を用い、微量なタンパク質サンプルのタンパク質発現を観察した。解析対象としたタンパク質スポットは3578スポットである。サンプルが正常組織とがん組織の表層部、中心部、浸潤部の4つの群に分

かれるかどうかを調べるために主成分分析を行った。その結果、正常組織群とがん組織群の大きく 2 群に分かれ、組織内の局在によるがん細胞の分類は観察されなかった。がん細胞の局在はプロテオームデータ全体の特徴に影響を与えていないことが考えられた。がん組織の部位によるタンパク質発現の比較では有意差 ( $p < 0.01$  かつ 2 倍差以上) のあるタンパク質スポットが観察されなかった。主成分分析の結果、正常組織とがん組織間で異なるスポット強度があるタンパク質スポットが存在することが示唆されたことより、正常組織とがん組織内の異なる部位のがん細胞を区別することで新しい知見が得られるかどうかを調べた。その結果、正常細胞とがん細胞を比較すると有意に発現差 ( $p < 0.01$  かつ 2 倍差以上) のあるタンパク質スポットが観察された (表層部; 151 個、中心部; 133 個、浸潤部; 145 個)。この中には、部位特徴的に発現しているタンパク質スポットが含まれていた。次に、発現異常のみられたタンパク質スポットを質量分析法でタンパク質同定を行った。同定されたタンパク質のうち、部位特徴的に発現異常がみられたタンパク質の機能分類を DAVID database を用いた Gene Ontology 解析を行ったところ、表層部ではストレス応答に、中心部ではグルコース代謝、浸潤部ではアポトーシスのタンパク質が関わっていた。さらに、同定したタンパク質の一部を、ウェスタンブロット法で発現検証を行ったところ、二次元電気泳動法の結果と相関するタンパク質が観察された。これらの結果より、がん細胞のプロテオームは、がん組織の微小環境の影響を反映しているかもしれないこと、正常細胞とがん細胞のタンパク質発現を比較するときはサンプル回収を考慮するべきであることが示唆された。

最終章では、本研究の成果を総括して考察し、今後の展望を示している。本研究では、大腸がんの悪性度に関わる APC-binding protein EB1 を同定した。EB1 は大腸がんの増殖や浸潤に関わるタンパク質であることを明らかとした。今後、多数症例を用いた免疫染色法による検証実験や他施設での検証実験が必要であろう。また、がん組織内のがん細胞の不均一性の分子背景の新しい知見が得られた。本研究で得られた大腸がんにおけるタンパク質発現異常の報告や研究成果は、生物学や腫瘍学の領域にがんの分子背景を理解することに貢献する。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 杉原 豊 印

(2013 年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<p>1. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal proteomic intra-tumor heterogeneity in colorectal cancer. J Proteomics. 2013 Jan 14;78:134-47. <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Fujita S, Kondo T.</p> <p>○ 2. Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. J Proteomics. 2012 Sep 18;75(17):5342-55. <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Kubota D, Ichikawa H, Sakamoto K, Nakamura Y, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p>
講演	<p>1. プロテオーム解析によるがん微小環境の違いに対応するタンパク質の同定 Proteomic approach towards further understanding of tumor microenvironment 第 71 回 日本癌学会学術総会（札幌） 2012 年 9 月 <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, Fujita S, Kondo T.</p> <p>2. Proteomic study identified APC-binding protein EB1 has malignant potentials of colorectal cancer. 9th Siena Meeting FROM GENOME TO PROTEOME: OPEN INNOVATIONS, Siena, Italy, August 26-30, 2012 <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p> <p>3. 蛍光二次元電気泳動法(2D-DIGE)による大腸がんの発生・進展関わるタンパク質 APC-binding protein EB1 の同定 第 63 回 日本電気泳動学会総会（宜野湾） 2012 年 8 月 <b>杉原豊</b>、谷口浩和、市川寛、窪田大介、藤田伸、近藤格</p> <p>4. Proteomic study revealed APC-binding protein EB1 has malignant potentials of colorectal cancer 日本プロテオーム学会 2012 年大会 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会(10th JHUPO)（台場） 2012 年 7 月 <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa I, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p> <p>5. Proteomic approach to heterogeneity of proteome contents in tumor tissues using laser microdissection and 2D-DIGE identified metastasis-associated proteins in colorectal cancer. EUPA/BSPR Proteomics Meeting, Glasgow, Scotland, July 9-12, 2012 <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, and Kondo T.</p> <p>6. Proteomic study identified APC-binding protein EB1 as a novel biomarker for malignant potentials of colorectal cancer. AOHUPO 6th Congress, Beijing, China, May 5-7, 2012 <b>Sugihara Y</b>, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa I, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>7. 大型蛍光二次元電気泳動法による大腸がんの発生に関わる分子の同定とその機能解析 第 62 回日本電気泳動学会総会（横浜） 2011 年 11 月 <u>杉原豊</u>、谷口浩和、窪田大介、米森啓貴、木村一哉、津田均、藤田伸、近藤格</p> <p>8. Proteomics for biomarker study in colorectal cancer 第 70 回 日本癌学会学術総会（名古屋） 2011 年 10 月 <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p> <p>9. PROTEOMIC STUDY OF TUMOR TISSUES USING 2D-DIGE REVEALED NOVEL MOLECULAR BACKGROUNDS OF COLORECTAL CANCER. HUPO2011, Geneva, Switzerland, September 4-7, 2011 <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Kubota D, Yonemori H, Haga A, Fujita S, Kondo T.</p> <p>10. Proteomics for biomarker study in colorectal cancer. 2011 Annual Meeting of KSMS &amp; 2nd AOMSC, Busan, Korea, August 17-19, 2011 <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p> <p>11. 蛍光二次元電気泳動法による大腸がんの発生に関わる新規タンパク質の同定 日本プロテオーム学会 2011 年大会（新潟） 2011 年 7 月 <u>杉原豊</u>、谷口浩和、窪田大介、菊田一貴、芳賀絢子、木村一哉、藤田伸、近藤格</p> <p>12. Colorectal Cancer Proteomics for Heterogeneous Background of Tumor Tissue. 7th CNHUPO, Hangzhou, China, April 14-18, 2011 <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Yonemori H, Fujita S and Kondo T.</p> <p>13. COLORECTAL CANCER PROTEOMICS FOR HETEROGENEOUS PROTEOME BACKGROUND OF TUMOR TISSUE. 4th EuPA Scientific Meeting, Estril, Portugal, October 23-27, 2010 <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Yonemori H, Haga A, Muto T, Hirohashi S, Fujita S, Kondo T.</p>
その他 (賞)	<p>1. <b>Excellent Poster Award (AOHUPO 2012)</b> (6th Congress, Asia-Oceania HumanProteome Organization 2012, May 5-7, 2012, Beijing, China) Proteomic study identified APC-binding protein EB1 as a novel biomarker for malignant potentials of colorectal cancer. <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p> <p>2. <b>Travel Award (AOHUPO 2012)</b> (Japanese Human Proteome Organization, May 1<sup>st</sup>, 2012) Proteomic study identified APC-binding protein EB1 as a novel biomarker for malignant potentials of colorectal cancer. <u>Sugihara Y</u>, Taniguchi H, Kubota D, Ichikawa H, Tomonaga T, Fujita S, Kondo T.</p> <p>3. <b>Best Poster Prize (6<sup>th</sup> Central and Eastern European Proteome Conference, 14<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> October 2012, Budapest, Hungary)</b> Proteomic approach toward biomarker development for differential diagnosis in malignant pleural mesothelioma <u>Sugihara Y</u>, Mukaihara K, Kondo T</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他 (論文)	<p>1. Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. J Proteomics. 2011, 16;74(6):858-73. Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, <b>Sugihara Y</b>, Sakamoto K, Kobori Y, Palmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, Tanaka H, Mizushima H, Fujita S, Kondo T.</p>
その他 (特許)	<p>1. 「APC-binding protein EB1 を用いた大腸癌の診断、治療法」 特開 2012-225822 近藤格、藤田伸、谷口浩和、<b>杉原豊</b></p>
その他 (講演)	<p>1. PROTOMIC APPROACH TOWARD BIOMARKER DEVELOPMENT FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS IN MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA. 6th CENTRAL AND EASTERN EUROPEAN PROTEOMIC CONFERENCE, Budapest, Hungary, October 14-17, 2012 <b>Sugihara Y</b>, Mukaiharu K, Kondo T.</p> <p>2. 蛍光二次元電気泳動法を用いた横紋筋肉腫における組織診断バイオマーカーの開発 日本プロテオーム学会 2011 年大会 (新潟) 2011 年 7 月 窪田大介、末原義之、吉田朗彦、菊田一貴、<b>杉原豊</b>、木村一哉、芳賀綾子、川井章、金子和夫、近藤格</p> <p>その他講演 9 件</p>