

論文内容の要旨

論文題目 高精度質量分析システムを用いた膠芽腫幹細胞情報
伝達系の包括的蛋白質ネットワーク解析

(Global protein network analysis of glioblastoma stem
cells by high-resolution mass spectrometry)

氏名 秦 裕子

序論

膠芽腫は最も悪性度の高いがんの一種で、診断確定後の平均生存期間は約 1 年である。当該腫瘍に関する精力的な研究にもかかわらず、過去 10 年以上にわたってその治療成績はほとんど改善されていない。従来、がん組織は不均一な細胞集団から成り立つものの、組織を構成する全ての細胞が異常増殖を繰り返す能力を備えていると考えられていた。しかしながら、近年、がん組織にも自己複製能と多分化能を有する幹細胞が存在するというがん幹細胞の概念が支持され、脳腫瘍においてもその存在が実験的に証明された。この概念は、がん組織にも幹細胞を頂点とする階層性が存在し、通常の腫瘍細胞を供給しながら組織の維持増殖を行っているという現象を想定させるものである。従ってがんの根治のためには腫瘍組織全体をターゲットとする従来の抗がん剤治療並びに放射線治療に基づく手法を見直し、がん幹細胞に焦点を絞った新たな治療戦略の展開が必要である。

がん幹細胞の機能維持に必須となる細胞内情報伝達システムの特徴を理解し、組織幹細胞や分化した腫瘍細胞との違いを見出すためには、まず当該システムの全体像を把握しそこから特徴を抽出するオミックス及びバイオインフォマティクス的手法が非常に有効である。近年、解析技術の進歩により従来限定された細胞表面マーカーのみで定義されていたがん幹細胞集団のトランスクリプトーム解析が広く行わ

れるようになってきた。しかしながら発現蛋白質の網羅的解析、並びにシグナル伝達の全体像を俯瞰する研究はほとんど行われていないのが現状である。

そこで本研究では、高感度、高精度測定を可能とする次世代型質量分析計 (LTQ-Orbitrap Velos ETD) にナノ流速液体クロマトグラフ装置 (Dina-2A) を on-line で接続した nanoLC-MS/MS システムを用いて、膠芽腫幹細胞の情報伝達系に関する蛋白質ネットワーク解析を行い、当該細胞の幹細胞性維持に関わる制御機構の特徴を抽出することを目的とした。

1. 膠芽腫幹細胞における包括的蛋白質ネットワーク解析

膠芽腫幹細胞における発現蛋白質の全体像を俯瞰するために、nanoLC-MS/MS システムを用いて患者由来の膠芽腫幹細胞 (GB2) に関するショットガンプロテオーム解析を行った。(なお、当該細胞は東京大学医学部附属病院にて膠芽腫の患者から摘出された脳腫瘍組織から樹立したものであり、本研究は東京大学医科学研究所倫理委員会の承認のもと実施された。) その結果、ペプチドレベルでは 8,896 種類、蛋白質レベルでは 2,089 種類の分子群が同定された。

次に Human Protein Reference Database (HPRD) の Gene Ontology (GO) 情報に基づいて、同定された全ての蛋白質を molecular function, biological process 及び cellular component の GO タームで分類した。molecular function による分類では RNA/DNA binding, transcription regulator/factor activity, transporter activity に属する因子がそれぞれ全体の 9%, 6%, 5% を占めていた。biological process による分類では signal transduction, regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism, protein metabolism, metabolism/energy pathways に属する因子がほぼ同率 (約 16%) であった。また細胞内局在 (cellular component) に関しては、主に cytoplasm (37%), nucleus (30%), plasma membrane (8%) に分布していた。

同定されたプロテオーム情報の特徴をより詳細に明らかにするために、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) によるパスウェイ解析を行った。その結果、glycolysis/gluconeogenesis, pyruvate metabolism, pentose phosphate pathway 等の Warburg 効果に関連する様々な代謝経路が modified Fisher's exact test を用いて $p < 0.0001$ の高い有意水準を持って抽出された。また興味深いことに、ribosome, spliceosome 及び proteasome システムに関しては $p < 1 \times 10^{-15}$ の極めて高い有意水準を持つことが明らかになった。

2. 膠芽腫幹細胞における包括的リン酸化ネットワーク解析

膠芽腫においては Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) に増幅や変異が存在することが知られ、異常な EGFR シグナルが膠芽腫の悪性化に多大な影響を及ぼす可能性が指摘されている。また神経幹細胞の維持にはチロシンキナーゼ受容体に関

わるシグナルが重要な役割を果たすことが知られているが、近年種々の増殖因子の中でも Epidermal Growth Factor (EGF) が幹細胞性の維持に特に重要であるという報告がなされている。そこで本研究では nanoLC-MS/MS システム及び高精度相対定量法である Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture (SILAC) 法を併用して、GB2 細胞における EGF 刺激依存的なリン酸化活性の変動を異なる 2 種類のフラグメント開裂法を用いて包括的に定量解析を行った。その結果、2,282 種類のリン酸化蛋白質に由来する 6,073 種類のリン酸化ペプチドが同定され、その中でリン酸化部位が 1 か所同定されたペプチドは 5,497 種類、2 か所以上同定されたペプチドは 576 種類であった。また SILAC 法に基づく高精度定量解析の結果、EGF 刺激に応じて 516 か所のリン酸化レベルが上昇し、275 か所が低下していた。大変興味深いことに代表的な神経幹細胞マーカーの一つである nestin に関しては 36 か所のリン酸化部位が同定され、11 か所の新規リン酸化部位を含む多くのアミノ酸配列が種間でよく保存されていた (図 1)。

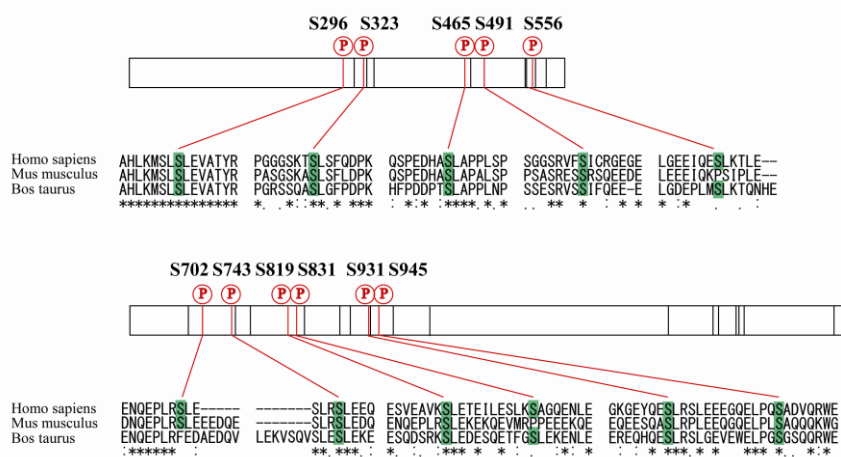


図 1 膠芽腫幹細胞由来 nestin のリン酸化部位に関する種間アミノ酸配列比較解析

次に、同定された全てのリン酸化蛋白質に関して HPRD の GO 情報に基づいて分類を行ったところ、molecular function では transcription activity に関する因子が最も多かった (13%)。このグループには histone deacetylase、histone-lysine N-methyltransferase、zinc finger proteins 等の様々な転写関連因子が含まれていた。biological process による分類では、signal transduction (23%)、regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (23%)、cell growth and/or maintenance (8%) に多くの因子が属していた。また cellular component では nucleous (48%) や cytoplasm (31%) に局在する蛋白質が多いことが示された。

同定されたリン酸化プロテオーム情報から細胞機能に関する特徴を明らかにするために、DAVID を用いてパスウェイ解析を行った。その結果、Notch, ErbB, mTOR 等のがんの増殖や幹細胞の制御にかかわる様々な経路が有意に抽出された。さらに

EGF 依存的なリン酸化活性の変動をパスウェイレベルで俯瞰するために Ingenuity Pathways Analysis (IPA) による解析を行ったところ、代表的な Canonical Pathway に属する Molecular mechanisms of cancer を構成するシグナル因子 SHC1 (Src homology 2 domain containing) transforming protein1) において Y427 のリン酸化活性が EGF 依存的に約 18 倍上昇していた。また、mTOR signaling に属する因子である RPS6 (ribosomal protein S6) の S235 及び S236 のリン酸化活性が EGF 依存的に約 30 倍の制御を受けていることも明らかとなった。

3. 膠芽腫幹細胞の情報伝達系を規定する新規シグナル制御因子の探索

近年、miRNA が幹細胞の制御に積極的に働いていることが報告されており、RNA レベルのみならず蛋白質レベルでの新規制御因子の探索を行うことが非常に重要であると考えられる。そこで、得られた大容量のスペクトル情報をヒト蛋白質データベース及びヒト RNA データベースに対して検索をかけ、ヒト RNA データベースのみにヒットしたペプチドを抽出した。その結果、

従来非コード領域と規定されていた領域に由来する 3 種類のペプチドのセリン残基がリン酸化を受け、さらにその中の 1 ペプチドのリン酸化活性が EGF により制御されていることが明らかとなった (図 2)。

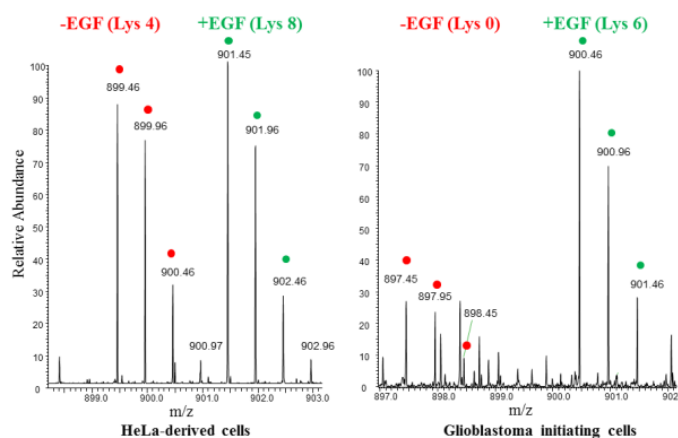


図 2 Supervillin-like (LOC645954) によりコードされた新規リン酸化ペプチドの細胞種依存的活性変動

結論

膠芽腫幹細胞における包括的蛋白質ネットワーク解析の結果、ribosome、spliceosome 及び proteasome システムに属する蛋白質が細胞内で高度に濃縮されていることが明らかとなった。またリン酸化ネットワーク解析の結果、がんや幹細胞に関わる種々の経路が活性化され、神経幹細胞マーカーの nestin をはじめとする幹細胞関連因子に関して非常に多くのリン酸化部位の存在が明らかになった。また従来、蛋白質をコードしていないと考えられていた RNA 配列由来の新規ペプチドのセリン残基がリン酸化を受け、その活性が EGF 依存的に変動するという興味深い事実も見出した。これらの結果から、膠芽腫幹細胞の性質を規定する情報伝達制御機構が蛋白質ネットワークレベルで従来の想定を超える多様性を持つことが示された。