

論文の内容の要旨

論文題目

高精度定量プロテオミクスによる膠芽腫幹細胞分化の リン酸化ネットワーク解析

(Analysis of protein phosphorylation networks in glioblastoma stem cell differentiation based on high-accuracy quantitative proteomics)

氏名 成島悠太

【序論】

膠芽腫(glioblastoma)は、悪性の原発性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、診断後の平均生存期間は約1年と非常に短い。周辺組織への浸潤性が高く全摘出が困難であることや、血液脳関門により薬剤が腫瘍に到達しにくいことから再発率が高く、治療成績はほとんど改善されていない。近年、がんの悪性化及び再発の原因として、自己複製能・多分化能を有する少数のがん細胞集団であり、高い腫瘍形成能や従来の化学療法・放射線療法に対する耐性を示すがん幹細胞の存在が注目されている。がん幹細胞はがん細胞集団の階層の頂点に位置する細胞として提唱され、白血病を初めとして脳腫瘍・乳がん・大腸がん等、多くの腫瘍においてその存在が実験的に証明されており、がん幹細胞の制御ががんの根治に繋がると考えられている。膠芽腫の幹細胞においては、分化誘導による腫瘍形成能の低下及び各種療法に対する耐性の減弱・喪失が報告されており、膠芽腫の克服に向けて膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持及び分化に関する制御機構の解明が希求されている。

増殖や分化等の細胞の運命決定は細胞内シグナル伝達系により制御され、タンパク質リン酸化はシグナル伝達系の活性調節に重要な役割を担っている。膠芽腫幹細胞の分化に関しては、Wnt、Notch 経路等の個々の経路においてリン酸化の関与が報告されているが、そのリン酸化ネットワ

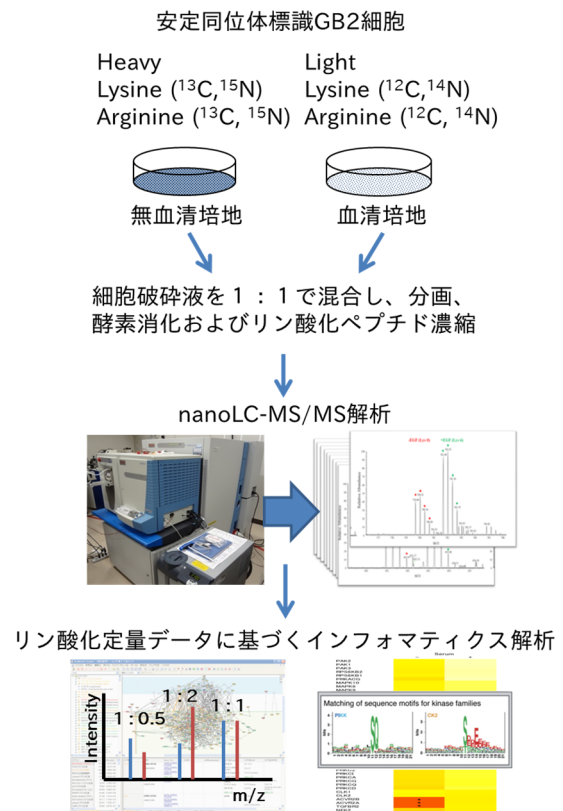


図1. 定量リン酸化プロテオーム解析の概略図

ークの全体像は未だ解明されていない。そこで本研究では、細胞内タンパク質のリン酸化状態の網羅的かつ定量的な解析が可能となっている質量分析技術を用いて、膠芽腫幹細胞の分化誘導におけるリン酸化変動の全体像を明らかにし、幹細胞性維持及び分化に関して新たな知見を見出すことを目的として、無血清培養で幹細胞性が維持された細胞と血清培養で分化誘導された細胞との比較定量リン酸化プロテオーム解析を試みた(図 1)。

【実験方法・結果】

膠芽腫幹細胞分化における比較定量解析用サンプルの調製

本研究では、東京大学医学部附属病院において膠芽腫患者組織から単離された膠芽腫幹細胞株である GB2 細胞を用いた。GB2 細胞は無血清培養では幹細胞性を維持しながら浮遊系でスフィアを形成して増殖し、血清培養では Glial fibrillary acidic protein(GFAP)陽性の接着細胞へ分化する性質を有する。まず、質量分析を利用した比較定量解析を行うため、質量の異なる安定同位体アミノ酸(図 1: Heavy)及び通常のアミノ酸(図 1: Light)を含む培地による培養で GB2 細胞を標識した。次に、無血清培養した Heavy 標識細胞及び血清培養した Light 標識細胞からタンパク質を抽出し、質量比 1:1 で混合した。液相中でタンパク質を回収可能である GELFREE 8100 システムを用いてタンパク質混合液を分子量に従い分画した後、各分画に対してトリプシンによるペプチド断片化及び TiO₂ カラムによるリン酸化ペプチド濃縮を行い、測定用サンプルを作製した。

nanoLC-MS/MS システムによる定量リン酸化プロテオーム解析

ナノ流速液体クロマトグラフ装置(Dina-2A)と高精度質量分析計(LTQ-Orbitrap Velos)を on-line で接続した nanoLC-MS/MS システムによる質量分析測定及びタンパク質同定ソフトウェアである Mascot によるデータベース検索の結果、1,584 種類のリン酸化タンパク質に由来する 19,090 個のリン酸化ペプチドが同定された(FDR < 0.01)。また、Proteome Discoverer により定量解析及びリン酸化部位の同定を

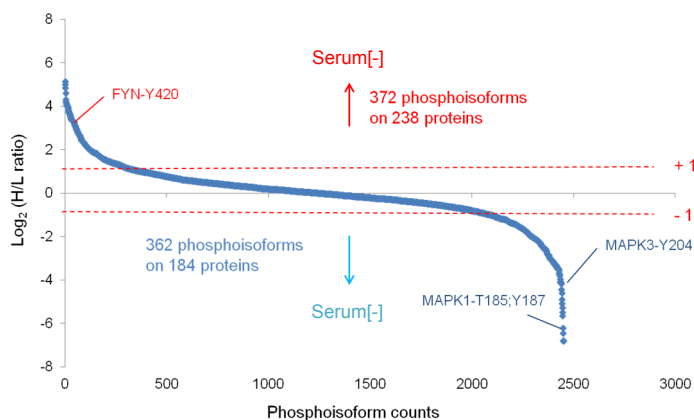


図 2. 同定されたリン酸化アイソフォームと血清培養による分化誘導における相対変動値のプロット図

を行い、リン酸化部位の定量情報をリン酸化アイソフォームとして整理した結果、1,139 種類のタンパク質における 2,452 種類のリン酸化アイソフォームが定量され、無血清培養で 238 種類、血清培養で 184 種類のタンパク質において 2 倍以上のリン酸化亢進が見られた(図 2)。その中でキナーゼの酵素活性に関するリン酸化部位の定量値に着目したところ、がん幹細胞マーカーである CD133 をリン酸化することで膠芽腫幹細胞の幹細胞性維持に関わる Fyn は、無血清培養下の GB2 細胞において 420 番目のチロシン残基(Tyr420)のリン化レベル亢進が見られ、活性化型となっていた。また、膠芽腫幹細胞の血清分化によるリン酸化の上昇が報告されている MAPK1 及び MAPK3 の活性化調節部位である Thr185/Tyr187 及び Tyr204 は、血清培養した GB2 細胞においてリン酸化レベルの亢進が見られた。

同定されたリン酸化タンパク質群の Gene Ontology 解析

Gene Ontology 解析として、3つの GO カテゴリー(Molecular function, Cellular component, Biological process)において血清培養による分化誘導で変動したリン酸化タンパク質群と有意な関連が見られる GO タームを抽出した($q\text{-value} < 0.01$)。その結果、Molecular function において protein kinase binding, cytoskeleton binding が上位の GO タームとして抽出された。Cellular component では、細胞の骨格や結合及び細胞突起に関連が見られる cytoskeleton, cell junction, cell projection に属する GO タームが高頻度で抽出された。Biological process においては、細胞の発生や分化に関わる developmental process, 細胞骨格の構築に関わる cytoskeleton organization に属する GO タームが多く抽出された。

膠芽腫幹細胞分化におけるリン酸化ネットワーク解析

血清培養による分化誘導においてリン酸化の変動が見られるシグナル伝達経路を同定するために、ネットワーク解析ツールである KeyMolnet 及び Ingenuity Pathway Analysis(IPA)による解析を行った。まず、分化誘導で変動したリン酸化タンパク質群のネットワークを KeyMolnet の相互関係検索により作成し、得られたネットワークと関連性の高いパスウェイを KeyMolnet データベースから抽出した。その結果、最も関連性の高いパスウェイとして、細胞骨格の維持とともに細胞内シグナル伝達にも関わる Intermediate filament signaling pathway が抽出された。次に、分化誘導で変動したリン酸化タンパク質群について IPA によるネットワーク解析を行った結果、最も有意な関連性を有するパスウェイとして細胞骨格の再構成に関わるパスウェイである Signaling by Rho family GTPases が抽出された。これらから GO 解析で見られた細胞骨格の構築に関わるリン酸化の変動はパスウェイ解析で上位に抽出された Signaling by Rho family GTPases 及び Intermediate filament signaling pathway により制御されている可能性が示唆された。

リン酸化プロテオームデータに基づいた分化に関わるキナーゼ及び上流制御因子の解析

定量リン酸化プロテオームデータに基づき、GB2 細胞分化におけるリン酸化の変動を制御するキナーゼを抽出するため、リン酸化部位情報に基づく上流キナーゼ予測及びその予測結果とリン酸化定量値に基づく統計解析が可能なプログラムである PhosphoSiteAnalyzer (Bennetzen, et al., *J Proteome Res.*,11:3480-3486, 2012)を用いた解析を行った。その結果、1,468ヶ所のリン酸化部位から 72 種類の上流キナーゼが予測され、上流キナーゼとして TGF-beta receptor type-2 (TGFB2)及び Activin receptor type-2A/B (ACVR2A/B)が予測されたリン酸化部位は、無血清培養した GB2 細胞においてリン酸化が有意に亢進していた($p\text{-value} < 0.05$)。血清培養による分化誘導で変動したリン酸化タンパク質を制御している因子をさらに抽出するために IPA の上流制御因子解析を行った。その結果、上流制御因子として TGFB2 のリガンドである TGF- β 1 が分化誘導におけるリン酸化変動と最も有意な関連性が見られた。TGFB2 及び ACVR2A/B の GB2 細胞における発現量を western blotting により定量したところ、TGFB2 が分化誘導により著増していることが明らかとなった。

膠芽腫幹細胞分化における TGFBR2 の寄与に関する実験的検証

TGFBR2 は TGF- β 1 の結合により TGFBR1 及びその下流のリン酸化を促し、古典的な TGF- β シグナル経路である SMAD 経路の他に、パスウェイ解析で見られた RhoGTPase を含む non-SMAD 経路の活性化に参与している。そこで、膠芽腫幹細胞分化における TGFBR2 の寄与を実験的に検証するため、TGFBR1 阻害剤 (SB431542) 及び TGFBR1/2 二重阻害剤 (LY2109761) の GB2 細胞への影響を検討した。スフィアアッセイにより無血清培養時における GB2 細胞の自己複製能を評価したところ、TGFBR1/2 二重阻害剤添加時においてコントロール (DMSO) に比べスフィア形成数が増加し、自己複製能の亢進が見られた (図 3A)。また、幹細胞マーカー (Sox2, c-Myc) 及び分化マーカー (GFAP) の発現レベルを western blotting により定量したところ、血清培養下の GB2 細胞において TGFBR1/2 阻害剤添加による Sox2, c-Myc 発現量上昇及び GFAP 発現量低下が見られ、TGFBR1/2 二重阻害剤は分化の抑制効果を示すことが明らかとなった (図 3B)。一方、TGFBR1 阻害剤添加時ではコントロールに比べて変化が見られないことから、TGFBR2 の活性が膠芽腫幹細胞の分化における幹細胞性の喪失に参与していることが示された。

【結論】

本研究は、膠芽腫幹細胞の分化誘導における包括的なタンパク質リン酸化の定量データを取得し、多角的なインフォマティクス解析により分化に重要なパスウェイとして Signaling by Rho family GTPases 及び Intermediate filament signaling pathway、分子として TGFBR2 を抽出した。特に TGFBR2 についてはその活性が膠芽腫幹細胞の分化の制御に関わることを示した初めての報告であり、膠芽腫幹細胞分化を標的とした治療法に向けて新たな知見を提供できたとともに、今回の手法はがん幹細胞に対する新規薬剤標的の同定に広く貢献しうると考えられる。

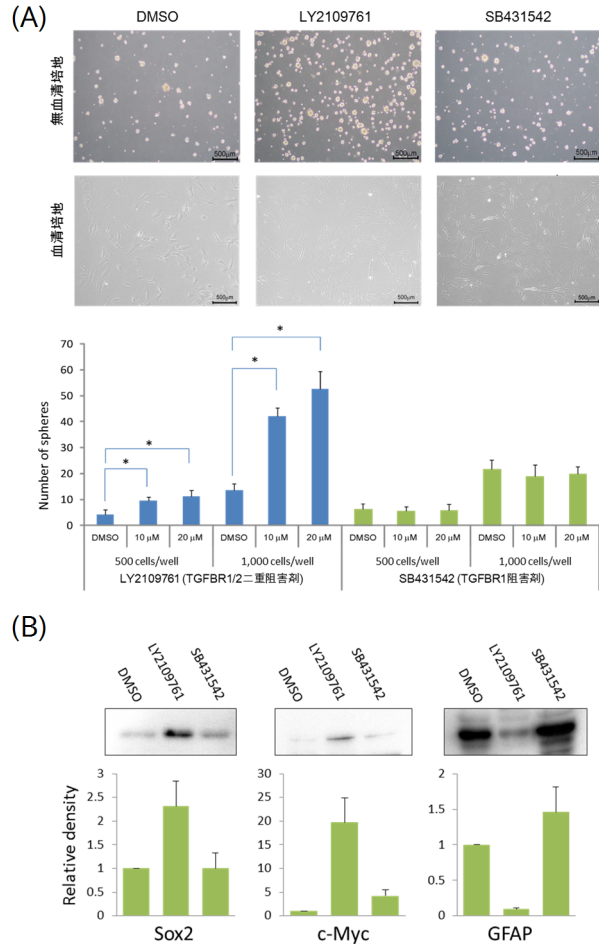


図 3. TGFBR 阻害剤による GSC sphere 形成能及び幹細胞・分化マーカー発現量の解析 (*: $p < 0.05$)