

主論文の要旨

**Quantitative Proteomic Profiling Identifies DPYSL3 as
Pancreatic Ductal Adenocarcinoma-Associated Molecule
That Regulates Cell Adhesion and Migration by
Stabilization of Focal Adhesion Complex**

〔定量的プロテオーム解析による、focal adhesion complex安定化により
細胞接着、遊走を制御する膵管腺癌関連分子、DPYSL3の同定〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

河原 健夫

【緒言】

膵癌はもっとも治療困難な癌の一つであり、その分子生物学的病態解明による新規治療法の開発が期待されている。質量分析装置を応用した網羅的タンパク質発現プロファイル解析は、精度・スループットが高く、臨床試料を用いた解析へ応用されることにより、これまでに疾患特異的発現を認める様々なタンパク質が同定されてきている。本研究では、このプロテオミクス技術を応用して膵癌の病態にかかわる分子を同定し、その機能解析を通じて膵癌発症・進展の分子機構を明らかとすることを目的としている。

【対象・方法】

手術摘出された膵癌および正常主膵管組織検体を用いて、ペプチド標識技術を応用した網羅的タンパク質発現プロファイル解析を施行した。プロファイリング結果の検証を行うため、網羅的解析に用いた試料とは異なる手術摘出組織、さらには膵癌・正常膵組織由来細胞株を用いて、ウェスタンブロットによる発現解析を進めた。

ヒト膵癌細胞株を用いて、遺伝子導入或いは siRNA による遺伝子発現抑制を行い、adhesion assay を用いた接着能の変化、*in vitro* における motility assay を用いた遊走能の変化、invasion assay を用いた浸潤能の変化について検討を行うと共に、マウスを用いた *in vivo* における転移能の変化に関する検討を行った。また、MTT assay を用いた細胞増殖能の変化、フローサイトメトリー或いはウェスタンブロット解析を用いたアポトーシス誘導に関する解析を行った。

GST 標識 DPYSL3 発現ベクターを用いて、質量分析技術を応用し、DPYSL3 結合タンパクの網羅的同定を行った。候補結合分子に対する multiple reaction monitoring (MRM) 技術を用いた検証を進めるとともに、免疫沈降-ウェスタンブロット、pull down assay による結合の確認を行った。DPYSL3 と結合分子が制御するシグナル分子の探索とその分子的機構の解明を、DPYSL3 発現抑制あるいは強制発現膵癌細胞株を用いて、ウェスタンブロットにより進めた。

【結果】

ペプチド標識技術である iTRAQ 法と質量分析技術を用いて 3 検体の正常主膵管プール試料と 7 つの膵癌組織検体におけるタンパク質発現プロファイル解析を行い、1,015 種類のタンパク (5,720 ペプチド) を同定した。これらの中で、正常主膵管プールとの発現比が平均+2SD を超え、少なくとも 2 つ以上の膵癌検体で高発現しているタンパクが 19 種類確認された (Table 1)。dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)、histone H2B type 1-J (H2BJ), glutathione S-transferase P1 (GSTP1) は 7 つの検体すべてで高発現が認められたが、H2BJ、GSTP1 は膵癌細胞分裂亢進に伴うものであると考えられたため、膵癌の発症・進展における役割・機能が解明されていない DPYSL3 に着目して以降の検討を進めることとした (Fig.1、Table 1)。

まず、ウェスタンブロットを用いて、独立した膵癌組織検体における DPYSL3 の高

発現を検証した結果、DPYSL3 は 22 検体中 16 検体で高発現が確認された (Fig. 2; 77.7%)。DPYSL3 高発現症例と DPYSL3 低発現症例に関して臨床病理学的特徴を検討したが、明らかな差異は認められなかった (Table 2)。膵癌細胞株を用いて、DPYSL3 の発現を検討したところ、Capan-1、CFPAC-1、SU86.86 細胞において高発現が認められ (Fig. 3)、これらが膵癌症例の肝転移巣から樹立された細胞株であることより、DPYSL3 が膵癌の血行性転移において重要な働きを担っている可能性を示唆するものと考えられた。

続いて膵癌における DPYSL3 の機能解析を行った。内在性 DPYSL3 高発現 CFPAC-1 細胞株を用いて、DPYSL3 特異的 siRNA (siDPYSL3) による発現抑制を行ったところ、細胞増殖能の低下が観察された (Fig. 4)。一方で、DPYSL3 発現のない MIA-PaCa2、PANC-1 細胞においては、siDPYSL3 による細胞増殖能の変化は認められなかった (Fig. 5)。さらに検討を進め、フローサイトメトリーにより DPYSL3 発現抑制による sub G1 細胞数の顕著な増加 (Fig. 6)、さらには、ウェスタンブロットにより PARP 並びに caspase-8 の cleavage form が確認されたことから (Fig. 7)、DPYSL3 の発現抑制によって、膵癌細胞に apoptosis が誘導されることが示唆された。

siDPYSL3 を用いた DPYSL3 の発現抑制によって、CFPAC-1 細胞の形態変化と浮遊細胞の増加が観察されたことから (Fig. 8)、DPYSL3 の発現抑制は、細胞接着を減弱させ、足場を失わせることにより、細胞死を誘導するものと推測した。そこで、DPYSL3 の発現抑制を行った CFPAC-1 細胞を用いて、接着細胞のみと、接着細胞と浮遊細胞の両者を合わせた試料を調整し、蛍光標識 annexin-V を用いて、フローサイトメトリーにより検討した結果、浮遊細胞における顕著な apoptosis の増加が確認された (Fig. 9)。DPYSL3 発現抑制によって浮遊細胞は顕著に増加するが、それらの 60-70%程度の細胞においてのみ apoptosis が観察されることから (Fig. 10)、DPYSL3 の発現抑制により、まず、細胞接着の減弱が惹起され、その後に apoptosis が誘導されるものと考えられた。次に、DPYSL3 の細胞接着制御機構における役割について検討を行った。内在性 DPYSL3 を発現していないヒト膵癌細胞株 (PANC-1) を用いて DPYSL3 安定発現株を樹立し、fibronectin を基質とする adhesion assay を行った結果、外来性 DPYSL3 発現細胞株において、基質への接着能が亢進することが明らかとなった (Fig. 11)。さらに、抗 Vinculin 抗体を用いた蛍光染色によって外来性 DPYSL3 発現細胞において focal adhesion complex が増加していることが確認されたことから (Fig. 12)、DPYSL3 が細胞接着能の制御に深く関与することが示唆された。細胞接着は、細胞増殖のみならず、遊走能・浸潤能と深く関連することが知られている。そこで、DPYSL3 発現の遊走能、浸潤能への影響に関する検討を、*in vitro* motility assay、並びに invasion assay により行った結果、Figure 13 に示すように、DPYSL3 発現 PANC-1 細胞において、遊走能・浸潤能の亢進が確認された。さらに、DPYSL3 発現を特異的 siRNA により抑制した CFPAC-1 細胞を用いた *in vivo* metastatic assay を行った結果、DPYSL3 発現低下により、肺組織への接着・浸潤細胞が顕著に減少することが確認された (Fig. 14)。以上の結果より、DPYSL3 は、膵癌細胞の接着能・遊

走能・転移能の制御に深く関与することが示されたことから、その分子メカニズムの解明を目指して、質量分析装置を応用した DPYSL3 結合分子の網羅的探索をさらにすすめた。

GST 標識 DPYSL3 タンパク、コントロールとして GST タンパクを精製し、CFPAC-1 細胞溶解物とそれぞれ混合、グルタチオンビーズを用いた精製を行い、質量分析装置による解析を行った結果、17 種類の DPYSL3 結合候補分子を同定した。MRM 技術を応用した検証により、Ezrin (EZR), neuroblast differentiation associated protein (AHNK), Vimentin, Lamin-A との結合が確認された (Fig. 15 と Fig. 16)。そこで、DPYSL3 が接着能、遊走能、転移能の制御に深く関与するというこれまでの結果から、adhesion complex を形成することにより FAK、c-Src を活性化して、細胞接着能・遊走能を制御することが知られている EZR に着目し、さらなる検討を進めた。

myc タグ付き DPYSL3 安定発現 PANC-1 細胞を用いて、抗 myc 抗体による pull down - ウェスタンブロットを行い、DPYSL3 と EZR の結合を確認した (Fig. 17)。また、抗 EZR 抗体を用いた免疫沈降-ウェスタンブロットにおいても、DPYSL3 と EZR の結合が確認された (Fig. 17)。さらに、adhesion complex を形成している構成分子である、FAK, TLN1, c-Src についても検討した結果、DPYSL3 とこれら adhesion complex の構成分子との結合が確認された。以上の結果より、DPYSL3 が adhesion complex に含まれ、その結合を安定化していることが示唆された (Fig. 17)。

c-Src は EZR と結合し、EZR のチロシン残基 (Y145) をリン酸化することが知られている。リン酸化を受けた EZR は、c-Src のリン酸化 (Y416) を維持することにより、c-Src の持続的な活性化に関与することが知られている。そこで、c-Src と EZR のリン酸化状態について、siDPYSL3 処理を行った CFPAC-1 細胞を用いて検討した。その結果、c-Src と EZR 両分子のリン酸化が、顕著に減弱することが確認された (Fig. 18)。さらに、DPYSL3 安定発現 PANC-1 細胞株を用いて検討した結果、DPYSL3 の発現上昇により、リン酸化 c-Src とリン酸化 EZR の発現増加が認められ、この変化が特異的 siRNA を用いた DPYSL3 の発現抑制によりキャンセルされることが明らかとなった (Fig. 18)。以上の結果より、DPYSL3 を高発現する膵癌細胞において、DPYSL3 が EZR と結合し、adhesion complex を安定化させ、c-Src、EZR のリン酸化を促進することにより、細胞接着能・遊走能・浸潤能が亢進することが示された。

【結語】

プロテオミクス技術を応用したタンパク解析により、膵癌で高発現する DPYSL3 を同定した。DPYSL3 は EZR と共に adhesion complex を形成し、その安定化を促進することによって膵癌細胞の接着、浸潤能に寄与していることが示された。本研究結果より、DPYSL3 は、膵癌臨床における最も重要な課題である転移を制御する治療標的となりうる可能性が示唆された。