

平成 30 年 3 月 27 日

平成 29 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 慶應義塾大学医学部整形外科学教室・助教
氏 名 菊 田 一 貴

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 粘液線維肉腫浸潤性関連候補糖タンパク質同定を目指したプロテオーム解析 (英文名) Proteomic Study to identify proteins related to high invasive activity of myxofibrosarcoma
2. 研究実施期間 平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 3 1 日
3. 助成金額 1,000 千円
4. 研究の目的 本研究の目的はプロテオーム解析の手法を用いて、粘液線維肉腫浸潤性機構に関わるタンパク質を同定し、そのメカニズムを明らかにすることである。中高齢者の四肢に好発する悪性軟部腫瘍である粘液線維肉腫は、その高い浸潤性による外科的切除後の高い再発率が問題となる。再発例における治療成績は不良であり、最終的に切断や腫瘍死に至る例が極めて多い。しかしながら、本腫瘍の浸潤性機構の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。そのため、粘液線維肉腫の予後改善には、高い浸潤性の分子機構解明が必須である。本研究により、浸潤性機構に関わる糖タンパク質を明らかにすることで、新規創薬治療ターゲットとしての応用が期待される。研究代表者は、既にポリアクリルアミドゲルを用いた 2 次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により、浸潤性粘液線維肉腫において特徴的に発現量が増加する 36 タンパク質を見出し、これらの中から、免疫組織学的に粘液線維肉腫の浸潤性に強く相関するタンパク質を同定している。しかしながら、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動では粘液線維肉腫が産生する粘液内の糖タンパク質を解析することは技術的に困難である。粘液中には多くの糖タンパク質が含まれており、悪性腫瘍の病態に関与する可能性があることが報告されている。近年、粘液中の糖タンパク質を標的とした従来のポリアクリルアミドゲル電気泳動とは異なる新たなプロテオーム解析技術として、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜を利用した新しい膜電気泳動法である分子マトリックス電気泳動が開発されている。 そこで、本研究では粘液線維肉腫の産生する粘液基質をターゲットとし、分子マトリックス電気泳動法を用いて浸潤性機構に関わる糖タンパク質を同定し、粘液線維肉腫浸潤性機構を明らかにすることを旨として本研究プロジェクトを立案するに至った。本研究により、粘液線維肉腫における浸潤性分子機構の解明が進めば、将来的に粘液線維肉腫に対する新規治療戦略の開発が可能となり、粘液線維肉腫患者の治療成績向上につながることを期待される。

5. 研究概要報告

はじめに既にポリアクリルアミドゲルを用いた2次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析により、浸潤性粘液線維肉腫において特徴的に発現量が増加していることを確認した36タンパク質からDCBLD2というタンパク質が粘液線維肉腫の浸潤性に強く相関している可能性を見出した。そこで、粘液線維肉腫21症例のパラフィン包埋ブロック新規追加検体を用いたDCBLD2発現に関する免疫染色実験を施行し、臨床病理学的因子との比較から、DCBLD2が粘液線維肉腫の浸潤性に強く相関するタンパク質であることを証明した。これらの検証実験は腫瘍細胞自身が発現しているタンパク質が、粘液線維肉腫が産生する粘液中の糖タンパク質と相互作用している可能性があるため、その候補として、腫瘍細胞が発現しているタンパク質の浸潤性との関係の解明は、粘液線維肉腫の浸潤性機構解明には必須であると考えられるために施行した。DCBLD2は腫瘍の細胞膜に発現しているタンパク質であり、様々な癌腫の腫瘍の進行に関係するEGFRと相互作用するタンパク質であることが知られており、粘液線維肉腫の浸潤性解明には重要なタンパク質であると考えられる。

次に予備実験として、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜を利用した新しい膜電気泳動法である分子マトリクス電気泳動の実験系を確立するため、市販されているウシおよびブタのムチンを用いて、膜電気泳動法によりこれらのムチンが検出可能であることを確認し、検出されたムチンから糖タンパク質を抽出し、解析可能であることを確認し、実験系が使用可能であることを確認した。

そこで、粘液線維肉腫の糖タンパク質の解析をおこなうために、実際に生検によって、粘液線維肉腫から採取された検体のうち、臨床的に浸潤性を示した粘液線維肉腫5例を用いて分子マトリクス電気泳動をおこなった。結果は、粘液線維肉腫が産生する粘液の中にはほとんどムチンは含まれておらず、ヒアルロン酸から形成されていることが明らかになった。現在、分子マトリクス電気泳動法で解析可能な糖タンパク質はムチンから抽出された糖タンパク質のみであり、ヒアルロン酸を解析するためには、新たにヒアルロン酸から糖タンパク質を抽出するための実験系の開発が必要であり、現在、鋭意解析をおこなっている。

これまでの研究により、粘液線維肉腫の浸潤性に関わるタンパク質としてDCBLD2の発現を同定し、粘液線維肉腫多数検体を用いて検証証明した。DCBLD2は腫瘍の細胞膜に発現しており、粘液線維肉腫の浸潤性に関わるタンパク質であるとともに、新規治療ターゲットとしての応用が期待されることが明らかとなった。また、分子マトリクス電気泳動法により、他の癌腫では癌が産生する粘液にはムチンが多く含まれているが、粘液線維肉腫においては、ムチンではなくヒアルロン酸が粘液として産生されていることが明らかとなった。これらの知見は、いずれもこれまで報告がないものであり、腫瘍中のDCBLD2あるいはヒアルロン酸の糖タンパク質を解析していくことで粘液線維肉腫の浸潤性機構解明の一助になる可能性が示された。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 慶應義塾大学医学部整形外科学教室・助教
氏 名 菊田 一貴

○論文発表 なし

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

1. **菊田一貴** 窪田大介 吉田朗彦 森岡秀夫 中村雅也 松本守雄 中馬広一 川井章 近藤格、○軟部肉腫の浸潤性予測バイオマーカー開発のためのプロテオーム解析、第68回日本電気泳動学会、2017年11月
2. **菊田一貴** 窪田大介 吉田朗彦 森岡秀夫 中村雅也 松本守雄 中馬広一 川井章 近藤格、○プロテオミクス解析により同定した粘液線維肉腫の浸潤性評価バイオマーカー候補 DCBLD2、第76回日本癌学会、2017年7月
3. **菊田一貴** 窪田大介 吉田朗彦 森岡秀夫 中村雅也 松本守雄 中馬広一 川井章 近藤格、○蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析により同定した粘液線維肉腫浸潤性評価バイオマーカー-Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2(DCBLD2)-、第15回日本プロテオーム学会、2017年7月
4. **Kikuta K**, Kubota D, Yoshida A, Morioka H, Nakamura M, Matsumoto M, Chuman H, Kawai A, Kondo T, ○DCBLD2 is a novel biomarker of myxofibrosarcoma invasion identified by global protein expression profiling, Connective Tissue Oncology Society 2017, 2017 Nov
5. **Kikuta K**, Kubota D, Yoshida A, Morioka H, Nakamura M, Matsumoto M, Chuman H, Kawai A, Kondo T, ○DCBLD2 is a novel biomarker of myxofibrosarcoma invasion identified by global protein expression profiling, 16th Human Proteome Organization, 2017 Sep

○著 書 なし

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。