

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23701052

研究課題名(和文) FRETイメージングによるRas/ERKシグナル伝達系の系統的摂動解析

研究課題名(英文) Systematic analysis of Ras/ERK pathway with FRET imaging

## 研究代表者

青木 一洋 (Aoki, Kazuhiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80511427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ras/ERKシグナル伝達系の破綻は様々な腫瘍の発生に関与している。本研究では、Ras/ERKシグナル伝達系を種々の阻害薬により阻害したときのシグナル伝達分子動態をイメージングにより詳細に可視化し、そのデータを基に数理モデルを構築することを試みた。その結果、Ras/ERKシグナル伝達系には入り組んだフィードバック反応が存在しており、ある経路を阻害しても別の経路が活性化することが明らかになった。さらにこれらの結果を基に、併用療法の有効性を示唆する結果を数理モデルから得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Raf/ERK signaling pathway is involved in cell proliferation, differentiation, and tumorigenesis. In this study, we attempted to visualize activities of signaling molecules in the Ras/ERK pathway by live-cell imaging with or without chemical inhibitors, and build mathematical models based on the imaging data. We identified several feedback and feedforward reactions in the Ras/ERK pathway, and found that these feedback/feedforward reactions attenuated the effect of a molecular targeting drugs by reactivating other pathways. Based on mathematical model, we propose combination treatment of molecular targeting drugs to achieve better antitumor effect in cancer cells harboring gene mutation in the Ras/ERK pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：FRETイメージング 分子標的薬 Ras ERK PI3K mTOR シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

癌は過去20年以上にわたって日本人の死亡原因の第一位を占め、現在では年に30万人以上の方が癌で亡くなっており、「癌の克服を目指す研究」への社会的な要請はますます高まっている。

細胞は外界からの種々の刺激を細胞膜上の受容体で感知し、その情報を細胞内の分子へと伝えることで細胞機能や恒常性を維持している。これが細胞内シグナル伝達である。細胞内情報伝達の破綻は細胞の癌化を引き起こすことは衆目の一致するところである。その中でも Ras/ERK MAPキナーゼ情報伝達系は細胞の増殖、分化や生存といった根本的な細胞機能に貢献しているだけでなく、様々な腫瘍の発生に関与している。

このように、Ras/ERK シグナル伝達経路が癌化に貢献することが分かっているにも関わらず、残念ながら有効な抗癌戦略を効率的に打ち出せないでいるのが現状である。例えば、EGFR の阻害薬はある種の肺癌（非小細胞癌のうちの約10%）でのみ有効であり、MEK 阻害薬は正常細胞への副作用が大きすぎて臨床試験の段階で除外され、悪性黒色腫の治療薬として B-Raf の阻害剤が開発されたが、その阻害薬は B-Raf の変異が無い細胞ではむしろ ERK 活性を増大させ、他の腫瘍の形成を促進することが最近になって複数のグループから示された。すなわち、現状の最も大きな問題点は、抗癌剤のターゲットとなりうる分子、もしくは反応の予測・選定が困難であることである。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、Ras/ERK シグナル伝達系の系統的摂動解析により定量的シミュレーションモデルを構築し、Ras/ERK シグナル伝達系の異常によって生じた腫瘍に対する新規抗癌ターゲットを選定することである。

## 3. 研究の方法

この目的を達成するために、(1)FRET イメージングとケミカルライブラリー、shRNA ライブラリーを組合せた系統的摂動解析による Ras/ERK シグナル伝達系の網羅的解析、(2)得られた大規模データからの情報抽出、評価、検証、の二点に絞り研究を進めた。

## 4. 研究成果

(1) 系統的摂動解析による Ras/ERK シグナル伝達系の網羅的解析

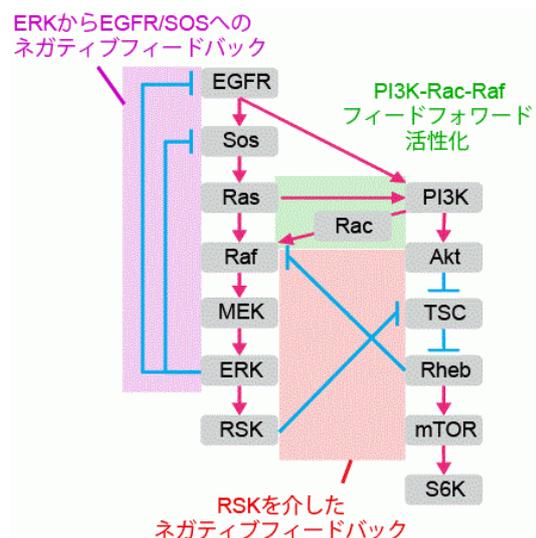
EGFR, Ras, ERK, S6K, PKA, JNK の FRET バイオセンサーを安定的に発現する HeLa 細胞を樹立し、これらの細胞を mix して 96 ウェルガラス底プレートに播種し、EGF と種々の阻害剤を添加したときのこれらの分子の活性をイメージングにより可視化した。この大量のイメージングデータを独自に開発した画像解析プログラムにより処理し、大量の画像を高速に解析することに成功した。

これらのイメージング結果から示唆されたことは、Ras/ERK 経路には多くのフィードフォワード、フィードバック制御反応が存在することであった。これらを同定するために、Ras-ERK シグナル伝達系と PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路を含むシミュレーションモデルを構築した。

(2) 大規模データからの情報抽出、評価、検証

Ras-ERK シグナル伝達系と PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路を CellDesigner によりモデル化し、さらに Matlab でより詳細に解析した。Ras-ERK 経路のパラメーターは以前に我々が定量化したパラメーターを用いた。PI3K-Akt-mTOR 経路のパラメーターはイメージング結果をフィットするように大域的に最適化することで得た。

これらの結果から、ERK から EGFR への負ネガティブフィードバック、PI3K-Rac-Raf のフィードフォワード活性化ループ、RSK を介したネガティブフィードバック、の3つのフィードバック・フィードフォワード制御反応が大きく寄与していることを見出した(下図)。さらにこれらのフィードバック・フィードフォワード制御反応の強さは EGF 刺激からの時間により大きく変化することを見出した。



さらに、ここで作成したシミュレーション

モデルを用いて、抗癌剤として使われる分子標的薬が癌細胞内の Ras-ERK 経路、および PI3K-Akt-mTOR 経路にどのような影響を与えるのかについてシミュレーションで再現することを試みた。シミュレーションモデルに遺伝子変異と分子標的薬を導入し、異なる遺伝子変異を持つ細胞内の分子活性が分子標的薬によってどのように抑制されるのかをシミュレーションした。その結果、BRaf または KRas 変異の癌細胞株に対して分子標的薬を単剤投与および併用した際の反応が再現できた。これにより、このモデルに含まれるフィードバック制御が、遺伝子の転写、翻訳を伴わない薬剤耐性 (Intrinsic resistance) に関与していることが示唆された。将来的に、定量的シミュレーションモデルの構築が、一人一人異なる性質を持つ癌に対して、最適な抗癌剤の組み合わせを予測する技術につながる事が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Komatsu, N., Fujita, Y., Matsuda, M., Aoki, K. mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cells. *Oncogene*, (2015), in press, doi: 10.1038/onc.2015.16.

Fujita, Y., Komatsu, N., Matsuda, M., Aoki, K. FRET-based quantitative analysis of feedforward and feedback loops in EGFR signaling and the sensitivity to molecular targeting drugs. *FEBS Journal*, (2014), 281; 3177-92. doi: 10.1111/febs.12852.

Aoki, K., Kumagai, Y., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C., Matsuda, M. Stochastic ERK activation induced by noise and cell-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Mol. Cell*, (2013), 52; 529-40. doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.015.

Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases, *Mol. Biol. Cell*. (2011), 22:4647-56. doi: 10.1091/mbc.E11-01-0072.

〔学会発表〕(計 1 4 件)

青木 一洋, FRET イメージングを用いた分子標的薬における癌細胞の内因的抗性的の定量解析, がん研セミナー, 2015 年 02 月 09 日, がん研究所 (東京都・江東区)

Kazuhiro Aoki, Quantitative analysis of ERK signaling with live cell imaging, 「修飾シグナル病」第 2 回国際シンポジウム, 2015 年 01 月 24 日, 東京大学医科学研究所 (東京都・港区)

青木 一洋, KRas 変異または BRaf 変異癌細胞における分子標的薬抵抗性のシステム解析, 第 24 回 日本循環薬理学会, 2014 年 12 月 05 日, 山形テルサ (山形県・山形市)

青木 一洋, FRET イメージングによる EGF シグナル伝達系のフィードフォワード・フィードバック経路の定量解析と分子標的薬感受性の予測, 第 87 回日本生化学会年会, 2014 年 10 月 15 日, 京都国際会館 (京都府・京都市)

青木 一洋, イメージングによる細胞内シグナル伝達系と分子標的薬抵抗性の定量解析, 第 11 回日本病理学会カンファレンス, 2014 年 08 月 01 日, 六甲山ホテル(兵庫県・神戸市)

青木 一洋, Systems analysis of intracellular signaling by live cell imaging., The Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology, 2014 年 07 月 31 日, 中之島センタービル (大阪府・大阪市)

青木 一洋, イメージングによる細胞内シグナル伝達系の定量解析, Research PlaNet 2014, 2014 年 05 月 10 日, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区)

青木 一洋, Toward a Quantitative Simulation Model of Ras-ERK Signaling Pathway, The MAPK workshop, 2014 年 04 月 07 日, Institute for Genomic Regulation (Barcelona, Spain)

青木 一洋, Stochastic ERK activation induced by noise and cell-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 03 月 19 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

青木 一洋, 分子標的薬抵抗性のシステム解析, 【がん支援活動】冬期公開シンポジウム, 2014 年 01 月 30 日, 一橋講堂 学術総合センター (東京都・千代田区)

青木 一洋, Stochastic ERK activity pulses induced by intrinsic noise and cell-to-cell propagation regulate cell density-dependent proliferation., 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 03 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

青木 一洋, ノイズと伝搬による確率的な ERK 活性化と細胞増殖制御, 第六回定量生

物理学の会年会, 2013 年 11 月 23 日, 大阪大学  
銀杏会館 (大阪府・吹田市)

青木 一洋, Stochastic ERK activity pulses  
induced by noise and cell-to-cell propagation  
regulate cell density-dependent proliferation., 第  
51 回日本生物物理学会年会, 2013 年 10 月 28  
日, 京都国際会館 (京都府・京都市)

青木 一洋, KRas 遺伝子、または BRaf 遺  
伝子変異陽性がん細胞株の生細胞イメージ  
ングによる MEK 阻害剤感受性のシステム解  
析, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10  
月 03 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

小林徹也、青木一洋、バイオ画像解析 手と  
り足とりガイド、2014 年、221 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/qsimulationproject/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 一洋 (AOKI, Kazuhiro)

京都大学・大学院医学研究科・特定准教授  
研究者番号: 80511427

### (2) 研究分担者

該当しない

### (3) 連携研究者

該当しない