

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18463

研究課題名(和文)高変異型RNAウイルスのゲノム変異に影響されない治療標的探索システムの構築

研究課題名(英文) Construction of screening system to identify druggable targets which are not affected by genomic mutation of highly mutated RNA virus

研究代表者

阿部 雄一 (Abe, Yuichi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト・特任研究員

研究者番号：30731632

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)：本研究計画では、高変異型 RNAウイルスのゲノム変異に影響を受けない治療標的探索システムの構築を通して、ウイルスプロテオミクス・大規模Kinome活性プロファイルへの開発貢献も進めた。平成28年度においては、先行研究の約3倍高効率にチロシンリン酸化ペプチドを濃縮可能な実験系を開発し専門誌に報告を行った。またリン酸化プロテオミクスとチロシンリン酸化プロテオミクスを組み合わせた大規模Kinome活性プロファイルも検討し、分子標的薬耐性大腸がん細胞株において新規薬剤標的候補を同定した。今後、構築したKinome解析系をHCVゲノム複製細胞解析に適用し、治療標的の探索を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：In this research plan, we aimed to develop RNA-virus proteomics and comprehensive profiling of Kinome through construction of screening system to find novel therapeutic targets. Especially, our focus is to develop a systematic screening which could find druggable targets which is not affected by genomic mutation of highly mutated RNA virus. In 2016, we developed and published an experimental system capable of enriching phosphotyrosine peptides at about 3 times higher efficiency than previous studies. We also investigated activity profile of comprehensive Kinome by combining phosphoproteomics and phosphotyrosine proteomics. Then, we identified kinases as therapeutic targets in colon cancer cell line resistant to Cetuximab. Furthermore, we plan to apply our system of Kinome profiling into an analysis of Hepatitis C virus (HCV) replicon cell lines, and search for therapeutic targets against HCV.

研究分野：プロテオミクス

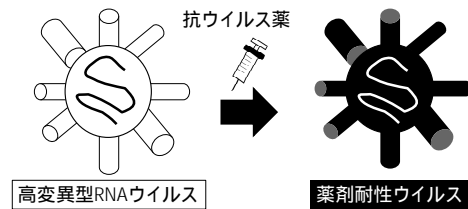
キーワード：リン酸化プロテオミクス キノーム RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

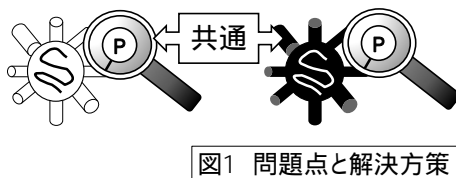
高変異型 RNA ウイルスは世界的に広く蔓延しており、感染症による死者は未だ世界的に全体の約 25% を占める。そのため、高変異型 RNA ウイルスの感染増殖を抑えることは公衆衛生学的に大きな意義がある。

高変異型ウイルスでは、そのゲノム変異性のために薬剤耐性ウイルス株の出現がしばしば認められる。HCV を例とした場合、従来の治療法が効きにくい HCV への有効な薬剤として HCV タンパク質を直接標的とした新規薬剤が開発されたが、薬剤耐性 HCV 株の出現が既に報告された。したがって、ゲノム変異に依存しない薬剤標的の探索のため、ウイルスゲノム内で変異が起こらず、かつウイルス増殖にとって重要な部位を明らかにする必要がある(図1)。

【問題点】薬剤耐性ウイルスの出現



【解決策】ゲノム変異の影響を受けない標的の探索



2. 研究の目的

申請者はこれまでに HCV 感染伝播を阻害する薬剤の探索に関わってきたが、実験系の不足から同定した薬剤が異なる遺伝子型を持つ HCV にも効果を示すのか不明であった。しかし近年になって、HCV の主要な遺伝子型 6 つ全てのウイルスゲノム複製細胞が構築され、ゲノム変異に依存しないウイルス増殖機構の解析に必要な研究材料が HCV において整った。以上より申請者は、HCV リン酸化プロテオミクス解析を基盤として、高変異型 RNA ウイルスのゲノム変異に影響を受けない治療標的探索システムの構築を目的とした本計画を立案した

3. 研究の方法

まず、十分な HCV リン酸化修飾部位を同定できるウイルスプロテオミクス解析系の構築を試みた。特に、通常のリン酸化プロテオミクスで検出の困難なチロシンリン酸化プロテオミクス解析系の改良に焦点をあて研究を進めた。

次に、構築したチロシンリン酸化プロテオミクス解析系を、セツキシマブ耐性大腸がんにおける網羅的キナーゼ活性プロファ

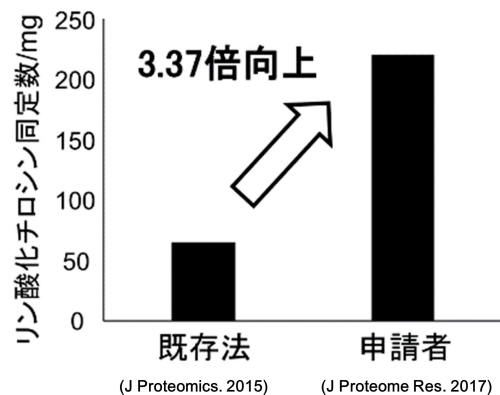
アイリングに応用した。

さらに薬剤標的の抽出から検証実験への工程を検討するため、セツキシマブ耐性大腸がんの解析から明らかになったセツキシマブ耐性大腸がん特有の活性化キナーゼに対する siRNA/低分子化合物処理による細胞増殖に与える影響を検討した。

4. 研究成果

IMAC レジンを用いて通常大規模リン酸化プロテオミクスを行った場合、同定された全リン酸化サイトに対するチロシンリン酸化サイトの割合は 1% 未満である。そのため、細胞制御に重要なチロシンリン酸化修飾データはほとんど得る事ができなかった。そのため、リン酸化チロシン抗体を用いたチロシンリン酸化ペプチド免疫沈降法の改良を行った。免疫沈降ビーズからのペプチド溶出条件、溶出後の抗体除去法、質量分析計の条件検討を行った結果、既存法に比べて 3 倍を超える高効率なチロシンリン酸化ペプチド濃縮法を構築した(図2)。この改良型チロシンリン酸化濃縮に関する研究結果は、国際誌である Journal of Proteome

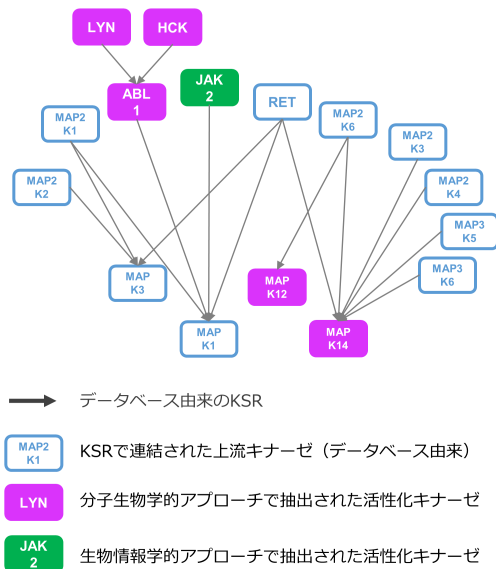
図2 チロシンリン酸化同定効率の比較



Research に掲載された。

次に、通常の大規模リン酸化プロテオミクスと改良型チロシンリン酸化プロテオミクスを組み合わせ、網羅的なリン酸化修飾情報の取得、ならびにキナーゼ活性プロファイリングを試みた。実験モデルとして、大腸がん分子標的薬セツキシマブ感受性・耐性培養細胞株を用意し、耐性克服標的となり得るキナーゼの探索を試みた。得られた高深度リン酸化プロテオミクス情報を元に感受性・耐性細胞におけるキナーゼ活性プロファイリングを比較し、活性化キナーゼ間の Network 構造を PhosphositePlus 登録 Kinase-Substrate 関係情報に基づいて構築した。得られた活性化キナーゼ Network 構造から、セツキシマブ耐性細胞で活性化が推定されるリン酸化シグナルパスウェイを抽出した(図3)。

図3 活性化キナーゼNetworkを再構築



その結果、耐性細胞である HCT116 において SRC-PRKCD カスケードの活性化を見出し、SRC に対する siRNA・特異的阻害剤処理が HCT116 細胞の細胞増殖阻害を引き起こす事を明らかにした。以上の成果から、リン酸化プロテオミクス解析、特にチロシンリン酸化プロテオミクス情報が TKI の耐性克服標的の探索へ利用出来る事が明示されたこれらの研究結果については現在論文投稿中である。

一連の結果から、本研究計画で構築した高深度チロシンリン酸化プロテオミクス解析系を用いることで新規薬剤標的に貢献可能な事が示された。現在までに、HCV ゲノム複製細胞を用いてリン酸化プロテオミクス解析を進めた所、10,000 部位以上の宿主リン酸化修飾・ならびに 10 部位以上の未報告 HCV タンパク質リン酸化修飾サイトを検出している。従って、将来的にはチロシンリン酸化プロテオミクス解析データを統合することで、網羅的キノーム活性プロファイリングが HCV ゲノム複製細胞解析にて可能となると考えられる。さらに、他の高変異型 RNA ウィルス実験系への応用を進め、汎用的な治療標的探索システムへの構築を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Abe Y, Nagano M, Tada A, Adachi J*, Tomonaga T*. Deep phosphotyrosine proteomics by optimization of phosphotyrosine enrichment and MS/MS parameters. J Proteome Res. 査読有, 2017 Feb 3;16(2):1077-1086.

[学会発表](計 7 件)

阿部雄一、長野麻衣子、足立淳、朝長毅、

がん細胞におけるチロシンリン酸化プロテオミクス解析法の構築、日本プロテオーム学会 2015、7 月 23、24 日、くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市)、2015 Yuichi Abe, Maiko Nagano, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Development of a global phosphotyrosine proteomic method for analysis of cancer cell lines, The 14th Human Proteome Organization World Congress, September 27-30, 2015, Vancouver, Canada

阿部雄一、長野麻衣子、多田亜沙、足立淳、朝長毅、チロシンリン酸化プロテオミクスによる大腸がん Cetuximab 耐性克服標的の探索、日本プロテオーム学会 2016、7 月 28、29 日、北里大学薬学部(東京都港区白金)、2016

Yuichi Abe, Maiko Nagano, Asa Tada, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Phosphotyrosine proteomics reveals modulation of kinase activity in colorectal cancer cell lines with the resistance to Cetuximab, The 15th Human proteome Organization World Congress, September 18-21, 2016, Taipei, Taiwan

Yuichi Abe, Maiko Nagano, Asa Tada, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Phosphotyrosine proteomics reveals modulation of kinase activity in colorectal cancer cell lines with the resistance to Cetuximab, The 8th Asia Oceania Human proteome Organization Congress, September 22-23, 2016, Sun Moon Lake, Taiwan

阿部雄一、長野麻衣子、多田亜沙、足立淳、朝長毅、大規模チロシンリン酸化プロテオミクスによるセツキシマブ処理時キノームリプログラミング機構の解析、第 75 回日本癌学会学術総会、10 月 6~8 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016

阿部雄一、長野麻衣子、多田亜沙、足立淳、朝長毅、高深度リン酸化プロテオミクス定量データに基づいた活性化キナーゼネットワーク構築と、治療抵抗性癌克服標的の探索、第 8 回定量生物学会、1 月 8、9 日、自然科学研究機構 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)、2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibiohn.go.jp/proteome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部雄一（Abe Yuichi）

医薬基盤・健康・栄養研究所・プロテオ
ームリサーチプロジェクト・特任研究員

研究者番号：30731632

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

(4) 研究協力者

（ ）