

令和元年6月16日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15014

研究課題名(和文) 高深度キノーム解析による淡明腎細胞癌分子標的薬感受性マーカーの同定と耐性克服

研究課題名(英文) Screening of novel markers for drug sensitivity in clear cell renal cell carcinoma with deep kinome profiling

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・協力研究員

研究者番号：30731632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：淡明腎細胞癌の分子標的薬効予測を目的として、患者組織から初代細胞株の樹立を実施し、最終的に25細胞株の作成に成功した。そのうち11細胞株に対して、スニチニブ、アキシチニブ、エベロリムス、カボザンチニブの薬剤感受性を測定し、それぞれの株で異なった感受性が観察された。感受性データを得た10株のプロテオミクス解析、リン酸化プロテオミクス解析を進めた。結果、6486タンパク質、33652リン酸化部位(うちClass1部位は21407部位)がそれぞれ同定された。今後得られたデータを統合し、感受性群、耐性群それぞれにおけるキノーム活性変動を算出し、耐性群特有のリン酸化シグナル活性を導出する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎細胞癌は癌全体の3～5%を占めており、その発生率は毎年2%ずつ増加している。そのため、効率的な淡明腎細胞癌への治療戦略の構築は公衆衛生学的に大きな意義がある。本研究により患者の臨床情報と淡明腎細胞癌キノーム特性との関連に対する理解が深まり、より効率的なマルチキナーゼ標的薬による治療法の構築が期待される。またキノームは他の癌腫でも重要な治療標的として認識されているため、本研究で構築する高深度キノーム解析系は他の癌腫にも応用できる。すなわち本研究計画を遂行する事でキナーゼを標的としたプレジジョンメディスン(精密医療)の成立に繋がり、国民医療費の大幅な低減に貢献できる意義がある。

研究成果の概要(英文)：We performed primary culture from surgical tissues of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and succeeded in cloning 25 cell lines. 11 clones out of the 25 cell lines were subjected to measurement of drug sensitivity assay to Sunitinib, Axitinib, Everolimus, and Cabozantinib. We observed various patterns of drug sensitivity between each cell clone.

We conducted proteomic and phosphoproteomic analysis of the 10 clones of ccRCC primary cell lines. We identified 6,486 proteins and 33,652 phosphosites (including 21,407 class-1 sites) from the primary cell lines.

We further plan to integrate the proteomic and phosphoproteomic data, and calculate kinome activity profiling. Comparison of the kinome profiling will reveals modulated phosphosignalings that are specific to resistant groups, and lead us novel candidates as markers for drug sensitivity. We further plan to perform functional analysis of those candidates in cell lines by using siRNA or CRISPR/Cas9 system.

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 薬剤感受性 淡明型腎細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌は癌全体の3~5%を占めており、その発生率は毎年2%ずつ増加している。日本における年間死亡者数は約3,500人であり、その内70%以上が淡明腎細胞癌として分類されている。そのため、効率的な淡明腎細胞癌への治療戦略の構築は公衆衛生学的に大きな意義がある。

近年、癌部特異的な活性化リン酸化シグナル経路を標的とした分子標的薬が使用されてきた。淡明腎細胞癌では複数のキナーゼ(リン酸化修飾酵素)を阻害するスニチニブ、アキシチニブといったマルチキナーゼ標的薬が承認されてきた。しかし肝機能異常・手足症候群といった重篤な副作用を伴う事や、標的薬への耐性群が存在する事からも、薬剤感受性マーカーや耐性克服標的の整備が急務であった。

2. 研究の目的

リン酸化シグナル経路に対する分子標的薬の感受性を規定するメカニズムとして、標的以外のキナーゼ存在量、活性の変動が知られていた。すなわち、リン酸化シグナル制御因子であるキナーゼの網羅的情報(=キノーム)の取得が淡明腎細胞癌マルチキナーゼ標的薬の感受性マーカー・耐性克服標的の構築に向けて重要である。本研究では高深度キノーム解析に基づき、既存の解析では検出できなかった感受性マーカー、耐性克服標的の同定を目指して研究を実施した。

3. 研究の方法

淡明型腎細胞がんのキノーム情報取得に向けて、効率的な研究遂行のため以下の3フェーズに分割して計画を進めた。

3-1 キノーム解析法と、リン酸化シグナル再構築法の確立

リン酸化プロテオミクスから効率的に活性化キノーム情報を取得し、それらに細胞内シグナル経路との関連情報を付加させるバイオインフォマティクスについて検討を進める。既存の大腸がん培養細胞を使用し、EGFR分子標的薬セツキシマブ耐性・感受性群で特有の活性化キノームを抽出し、EGFRシグナル経路との対応を検討する。また耐性への関与が推定されるキナーゼについて siRNA および CRISPR/Cas9 による機能アッセイを実施する。

3-2 淡明型腎細胞がんの初代細胞株樹立と薬剤感受性試験

淡明腎細胞がんの切除組織片から、コンディショナルリプログラミング(Conditional Reprogramming: CR)法による癌組織由来細胞株の樹立を行う。淡明腎細胞癌に対する分子標的薬であるスニチニブ、アキシチニブ、エルロチニブ、カボザンチニブを淡明腎細胞癌由来細胞株に対して処理し、細胞増殖阻害効果を増殖アッセイにて検証する。増殖アッセイの結果から算出した IC₅₀ に基づいて細胞株を薬剤感受性群と耐性群に分ける。

また別計画として進行中である淡明型腎細胞がん組織プロテオミクスデータと、対応する初代細胞株のデータを比較し、初代細胞株全般で認められる活性化シグナル経路を絞り込み、それらシグナルは培養条件に依存して活性化したもとして以降の解析から排除する。

3-3 キノーム情報の取得、感受性に相関するマーカー因子の絞り込み

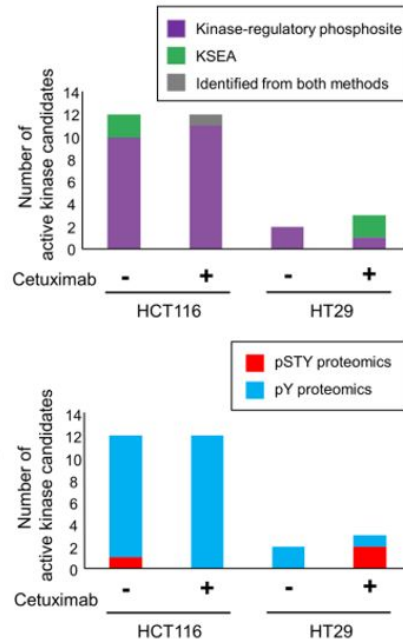
取得した高深度キノーム情報からマルチキナーゼ標的薬耐性の淡明腎細胞癌で有意に上昇している薬効予測マーカー候補群を抽出する。続けて別セットの癌組織検体を用いた検証を行い、有効な感受性予測マーカーの同定を行う。取得した高深度キノーム情報から感受性・耐性群それぞれにおいて特徴的なリン酸化シグナルネットワークを再構築する。耐性群で特に活性化されているリン酸化シグナル経路を抽出し、続けてそのシグナル経路上に位置するキナーゼを標的とした耐性克服標的の同定を行う。

4. 研究成果

まず、リン酸化プロテオミクスに基づく活性化キノーム情報取得と、既存の細胞内シグナル経路との統合解析を目的としたバイオインフォマティクス処理の検討を進めた。検討には大腸がん培養細胞を使用し、まず EGFR 分子標的薬セツキシマブ耐性・感受性群で特徴的な活性化キノーム抽出を試みた。リン酸化プロテオミクス、チロシンリン酸化プロテオミクスデータからの活性化キノームの抽出方法として、以下の2種の方法を統合的に利用した。

1. キナーゼドメインに位置するリン酸化修飾が優位に変動するキナーゼ (右上図紫色)

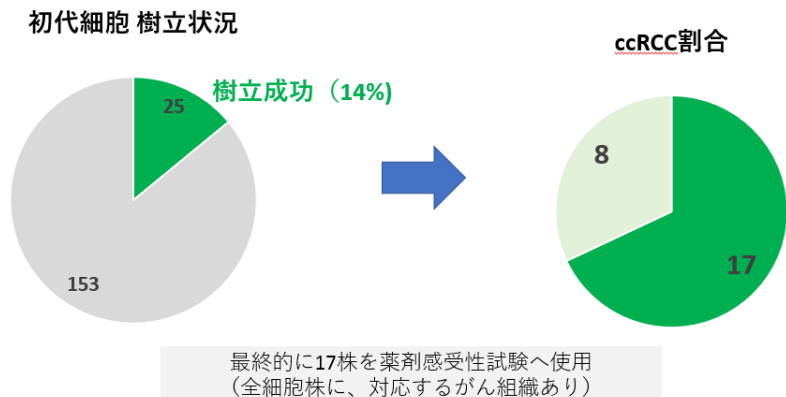
2. キナーゼ 基質関連情報を利用した上流キナーゼ解析で優位な変動スコアを示したキナーゼ (右上図緑色)
その結果、HCT116 細胞において、特に多くの活性化キナーゼが抽出できた。また、抽出されたキナーゼの多くがチロシンリン酸化プロテオミクスデータ由来であることが明らかとなり (右下図水色)、キノーム活性プロファイルにおけるチロシンリン酸化データの重要性が示された。



次に、HCT116 細胞において得られた活性化キナーゼについて、siRNA による発現阻害時に細胞増殖能に与える影響を検討した。その結果、耐性細胞である HCT116 において EGFR 下流の 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。また Src Family Kinase の 1 つである YES1 特異的阻害剤も Cetuximab 耐性培養細胞の細胞増殖を阻害する事が明らかになった。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 の耐性克服標的探索へ利用出来る事が明示された。また、細胞内リン酸化シグナルネットワーク理解への貢献も同様に期待される。以上の研究結果を Scientific Reports 誌に報告した。また、得られた成果を国内・国際特許に出願中である。

これらバイオインフォマティクス環境の整備と並行して、初代細胞株の樹立を 2018 年 10 月まで進めた。その結果、178 個の患者癌検体から 25 細胞株の樹立に成功した。このうち 17 株が淡明型腎細胞がん由来であり、これら全てに元組織のプロテオミクスデータが付随できることが明らかとなった (下図)。17 株の凍結ストックから再融解後、一部の細胞株では再融解後に細胞増殖が認められなかったため、今回の解析計画から除外した。その結果、11 株で薬剤感受性データの測定に成功し、それぞれの細胞株で異なった感受性パターンが観測された。すなわち、当初の狙いである

淡明型腎細胞がん薬剤感受性メカニズムの比較解析を実施し得るサンプル(感受性株、耐性株)が、本研究の遂行によって整備できたと考えている。



薬剤感受性データを取得した 11 株のうち、十分なタンパク質量の確保できた 10 株についてプロテオミクス解析、リン酸化プロテオミクス解析を進めた。LC-MS/MS による測定の結果、プロテオミクス解析からは 6486 タンパク質、リン酸化プロテオミクス解析では 33652 リン酸化部位（うち Class1 部位は 21407 部位）がそれぞれ同定された。今後、得られたデータを統合し、薬剤感受性群、耐性群それぞれにおけるキノーム活性変動を算出する。また、基質タンパク質側のリン酸化ネットワーク構造の変化について、PHOTON 法（2016, Cell Systems）によって検討し、活性化キノーム情報との統合的解析を実施する。以上の解析から得られたキナーゼ群と、薬剤感受性データとを相関解析し、優位な相関を示すキナーゼを絞り込む予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) **Abe Y**, Nagano M, Kuga T, Tada A, Isoyama J, Adachi J, Tomonaga T.
Deep Phospho- and Phosphotyrosine Proteomics Identified Active Kinases and Phosphorylation Networks in Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to Cetuximab.
Sci Rep. 2017 Sep 5;7(1):10463. doi: 10.1038/s41598-017-10478-9.
- 2) **Abe Y**, Tada A, Isoyama J, Nagayama S, Yao R, Adachi J, Tomonaga T.
Improved phosphoproteomic analysis for phosphosignaling and active-kinome profiling in Matrigel-embedded spheroids and patient-derived organoids.
Sci Rep. 2018 Jul 30;8(1):11401. doi: 10.1038/s41598-018-29837-1.
- 3) Sato Y, Watanabe T, Suzuki C, **Abe Y**, Masud HMAA, Inagaki T, Yoshida M, Suzuki T, Goshima F, Adachi J, Tomonaga T, Murata T, Kimura H.
S-Like-Phase Cyclin-Dependent Kinases Stabilize the Epstein-Barr Virus BDLF4 Protein To Temporally Control Late Gene Transcription.
J Virol. 2019 Apr 3;93(8). pii: e01707-18. doi: 10.1128/JVI.01707-18.
- 4) Tiwari P, Nagatake T, Hirata SI, Sawane K, Saika A, Shibata Y, Morimoto S, Honda T, Adachi J, **Abe Y**, Isoyama J, Tomonaga T, Kiyono H, Kabashima K, Kunisawa J.
Dietary coconut oil ameliorates skin contact hypersensitivity through mead acid production in mice Allergy. 2019 Mar 6. doi: 10.1111/all.13762.

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) **阿部雄一**、松井佑介、植村元秀、多田亜沙、足立淳、朝長毅
リン酸化プロテオゲノミクスにより暴かれる淡明腎細胞がん Kinotype と層別化治療戦略の構築
日本プロテオーム学会 2017、7 月 27~29 日、大阪、2017
- 2) **Yuichi Abe**, Maiko Nagano, Asa Tada, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga
Deep Phospho- and Phosphotyrosine Proteomics Identified Active Kinases and Phosphorylation Networks in Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to Cetuximab
The 16th Human proteome Organization World Congress, September 17-21, 2017, Dublin, Ireland
- 3) **阿部雄一**、足立 淳、朝長 毅
Optimized phosphoproteomic analysis method for Spheroids and Patient-Derived Organoids embedded in Matrigel.
第 76 回日本癌学会学術総会、9 月 27-30 日、横浜、2017
- 4) **Yuichi Abe**, Hirokazu Shoji, Hidekazu Hirano, Jun Adachi, Narikazu Boku, Takeshi Tomonaga
Comprehensive phosphoproteomics from endoscopic biopsies
Mass Spectrometry and Proteomics 2018, Osaka, 2018
- 5) **阿部雄一**、多田亜沙、磯山純子、長野麻衣子、久家貴寿、佐藤彩子、足立淳、朝長毅
網羅的チロシンリン酸化プロテオミクス解析法の構築
MSP2018、5 月 15-18 日、大阪、2018
- 6) **Yuichi Abe**, Asa Tada, Junko Isoyama, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga
Improvement of proteomic analysis targeting multiple post-translational modification using immunoprecipitation with pan-PTM antibodies
22th International Mass Spectrometry Conference, August 26-31, 2018, Florence, Italy
- 7) **阿部雄一**、朝長毅、足立淳
薬剤感受性システム生物学を切り開くマルチ翻訳後修飾の薬理プロテオーム解析
日本癌学会、第 77 回日本がん学会学術総会、9 月 27 日 - 30 日、大阪、2018
- 8) **Yuichi Abe**, Asa Tada, Junko Isoyama, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga
薬剤感受性システム生物学を切り開くマルチ翻訳後修飾の薬理プロテオーム解析

日本分子生物学会, 横浜、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 治療標的である活性化キナーゼのスクリーニング方法

発明者: 朝長毅、阿部雄一

権利者: 国立研究開発法人医薬基盤健康栄養研究所

種類: 出願中

番号: 特願 2018-037894

出願年: 2018 年 3 月 2 日

国内外の別: 国内特許

名称: 治療標的である活性化キナーゼのスクリーニング方法

発明者: 朝長毅、阿部雄一

権利者: 国立研究開発法人医薬基盤健康栄養研究所

種類: 出願中

番号: PCT/JP2019/0078

出願年: 2019 年 2 月 28 日

国内外の別: 国際特許

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。