

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16116

研究課題名（和文）プロテオーム情報を用いた共発現解析およびキナーゼ活性推定による癌細胞の薬効予測

研究課題名（英文）co-expression analysis and kinase activity estimation using proteomic data of cancer cells toward drug efficacy prediction

研究代表者

鳴海 良平（Narumi, Ryohei）

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：60582202

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）：大腸がんの薬効予測の開発に向け、高分解能な分画法を構築し、従来よりリン酸化サイトの同定数が1.2倍向上した。次に35種類の大腸がん細胞のプロテオームおよびリン酸化プロテオームを行い、各細胞株で、8,800タンパク質、3万リン酸化サイトを定量することができた。また検出の難しいリン酸チロシンも1,500サイト定量することができ、薬効予測に有用な高深度のデータ取得に成功した。リン酸化サイトの定量値から、キナーゼ活性予測を行い、114個のキナーゼ活性プロファイルが得られ、各細胞のプロファイルの特徴はCDK1、CDK2、SRC、EGFR、METのキナーゼ活性が代表していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、分子標的薬により癌治療の効果が高まり、さらに、遺伝子解析技術の発展により、個々の患者の分子標的薬を予測し、個別化医療の道が開けつつある。しかし、その予測精度はまだ十分でなく、分子標的薬の効かない患者も多数存在することが問題となっている。本研究では、細胞内の化学反応を担っているタンパク質や、それらを制御するリン酸化を、大規模に比較解析することで、個々の大腸がん細胞株の増殖や薬剤感受性といった性質の理解を深め、個々の患者に治療効果のある分子標的薬を精度の高い予測に繋げようと考えた。本研究で得られたデータは、薬効予測に繋がる有用なデータとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To develop drug efficacy prediction for colorectal cancer, a high-resolution fractionation method for a deep phosphoproteomics was constructed, and the number of kinases at phosphorylated sites was increased by 1.2 times. By using this method, 8,800 proteins and 30,000 phosphorylated sites including 1,500 phospho tyrosin were indentified in each cell line. From this data, kinase activity was predicted resulting in 114 kinase activity profiles, suggesting that the profile characteristics of each cell are represented by the kinase activities of CDK1, CDK2, SRC, EGFR, and MET.

研究分野：腫瘍プロテオミクス

キーワード：リン酸化プロテオミクス 薬効予測 プロテオミクス 癌細胞 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的薬の開発により癌治療の効果が高まり、さらに、遺伝子解析技術の発展や癌研究の進展により、個々の患者に合う分子標的薬を予測して治療を行う、個別化医療の道が開けつつある。しかし、その予測精度はまだ十分でなく、分子標的薬の効かない患者も多数存在する。このことから、個々の患者の疾患状態をより正確に把握し、精度よく薬効予測できるバイオマーカー、および、新たな分子標的を同定することが求められている。

一方、細胞の増殖能や薬剤感受性といった性質は、細胞内に多数存在する生物学的プロセスやシグナル伝達から成り立っているが、タンパク質は、その生物学的プロセスの大部分を担っている。またタンパク質のリン酸化は、細胞内シグナル伝達を制御しており、特に、リン酸化チロシンは、受容体チロシンキナーゼなど、シグナル伝達の調節において中心的な役割を担っている。この細胞シグナルの異常は、多くの癌のメカニズムの原因となっていることから、癌細胞の異常な性質や、薬剤感受性を理解するために、タンパク質や、そのリン酸化を網羅的に解析することが有用であると考えられる。

そこで、近年発展している、質量分析によるプロテオミクスを利用し、癌細胞のタンパク質やリン酸化を網羅的かつ定量的に解析することによって、癌の薬効予測に繋がると考えた。また最近、阿部らにより、これまで難しかったチロシンのリン酸化を高感度な定量解析が可能となった()。これらの技術を利用し、多数の癌細胞の高深度のプロテオームデータを得ることができれば、細胞内シグナルをより詳細に解析でき、薬剤感受性の予測に有用であると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、日本の死亡者数の第2位である大腸がんについて焦点を当て、多種類の大腸がん細胞のプロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクスの大規模なデータを取得し、それを利用して大腸がん細胞の薬剤感受性の予測法を開発することを最終的な目標とした。

その目標に向けて、(1) ハイスループットに高感度なリン酸化プロテオミクスを行うため、マイクロ流速 HPLC による分画システムを開発すること、(2)多数の大腸がん細胞株のプロテオミクスおよびリン酸化プロテオミクスを大規模に行うことによりデータ取得すること、(3)そのデータを利用し、タンパク質レベル、リン酸化レベルにおける癌細胞の特徴と、薬剤感受性との関連性を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)少量の試料でも利用でき、ハイスループットに分画できる、マイクロ流速の HPLC を用いて、高 pH 逆相クロマトグラフィを行った。分離カラムは内径 0.3 mm の C18 (L-column3, 0.3 mm × 150 mm, 化学物質評価研究機構)を用い、溶離液は pH9.2 でアセトニトリル濃度の勾配を用いて分離した。今回、チップカラムと、マイクロ流速 HPLC による分画法を比較するため、Hela 細胞のタンパク質のトリプシン消化物を Fe-IMAC (Fe-immobilized metal affinity chromatography)によりリン酸化ペプチド濃縮を行い、そのリン酸化ペプチドを、それぞれ7分画し、LC-MS 解析を行った。

(2)ブロード研究所の Cancer Cell Line Encyclopedia(CCLE)において、薬剤感受性のデータベースが公開されている、35種類の大腸がん細胞株について、各種、3サンプルずつ用意した。各サンプルから抽出した 1.6mg のタンパク質を用い、TMT 法によるプロテオーム解析およびリン酸化プロテオーム解析を行った。リン酸化プロテオミクスには、今回開発した、マイクロ流速 HPLC 分画および、Abe らが開発した、高感度チロシンリン酸化解析法()を用いた。

4. 研究成果

(1)マイクロ流速 HPLC を利用した二次元分画によるリン酸化プロテオミクスの高感度化

質量分析によるプロテオミクスでは、サンプルを LC-MS 測定する前に、あらかじめ分画を行い二次元分画にすることで、高感度な解析ができる。しかしリン酸化タンパク質は量が少ない為、一般的な HPLC(流速 0.2 mL/min)を用いて、多検体を分離することは困難であった。そこで、最近、足立らにより、簡便かつ微量サンプルで利用可能なチップカラムによる分画法が開発された()。しかしながら、チップカラム法には HPLC に比べると分離能が限られている点がデメリットであった為、今回、微量のリン酸化プロテオミクスのサンプルでも高分解能に分画でき、かつ多検体でも使用可能なマイクロ流速の HPLC を使用した。この HPLC は、2 μ L/min の流速であり、接触面積が、通常の HPLC より 1 オーダー以上少ないため、微量サンプルの分画に適している。今回、チップカラム法と、マイクロ流速 HPLC を比較するため、Hela 細胞のリン酸化プロテオーム解析を行ったところ、それぞれ、14419 (\pm 449)リン酸化サイトと 17106 (\pm 309)リン酸化サイトが同定され、マイクロ流速 HPLC により、1.19 倍の向上が見られた。

(2)プロテオミクスデータの定量性と深度

プロテオミクスにおける、タンパク質の定量値は、複数のペプチド断片の値の総和であるが、それに対して、リン酸化サイトの定量値は、多くの場合、1個のペプチド断片の値である。そのため定量性が必然的に低下する。そこで、今回得たリン酸化プロテオミクスデータの定量性を確認する為、35細胞で各3検体(計105検体)のリン酸化サイト定量値のクラスタリングを行った(図1)。その結果、樹形図中で35細胞中34細胞の Triplicate は同じクラスターとなった。そのことから、高い定量性が示された。

さらに、データのカバレッジを向上させるため、各細胞の3検体の値を組み合わせた。その結果、各細胞の平均同定数は、タンパク質で8814(±65)個。リン酸化サイトで30848(±1047)個。リン酸化サイトのアミノ酸の内訳は、セリン24729(±814)個、スレオニン4571(±196)個、チロシン1548(±57)個であった。最近、Frejinoらが報告した、65種類の大腸がん細胞でリン酸化プロテオミクスを行った研究においては、各細胞のリン酸化サイトの同定数は約15000個であった()。解析した細胞数の点においては及ばないながらも、リン酸化サイトの同定数はおよそ倍であった点、またこの先行研究ではラベルフリー定量法であるのに対し、こちらは定量精度に優れたTMT法を用いている点において、本研究のプロテオミクスデータは、高い深度と定量精度だと考えられる。その上、リン酸化プロテオミクスで同定されるリン酸化サイトのうち、リン酸化チロシンの割合は、通常1%であるが、本研究では、5%であった。これは、高感度チロシンリン酸化解析法おこなったためであり、一般的なプロテオミクスデータと比較して、はるかに高深度のリン酸化チロシンのデータであるといえる。

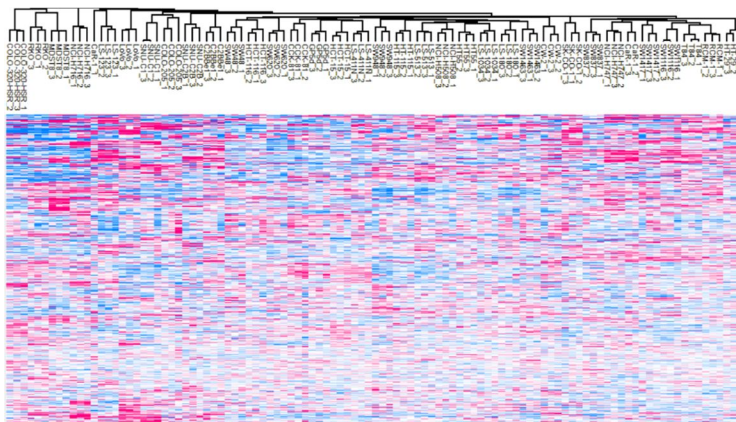


図 1. 35 細胞 (N=3) のリン酸化サイト定量値によるクラスタリング

以上のことから、本研究で得られた、大腸がん細胞のプロテオミクスデータは、がん細胞の細胞内シグナルの解析や、さらには薬剤感受性の予測において、有用なデータであると考えられる。

以上のことから、本研究で得られた、大腸がん細胞のプロテオミクスデータは、がん細胞の細胞内シグナルの解析や、さらには薬剤感受性の予測において、有用なデータであると考えられる。

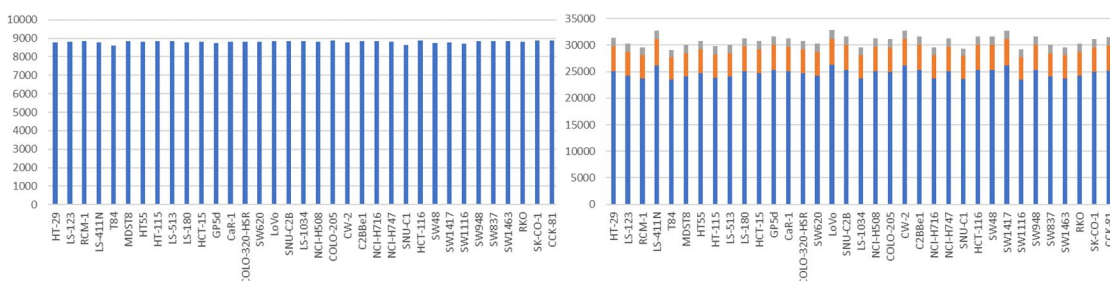


図 2. タンパク質(左)、リン酸化サイト(右)の同定数

(3)キナーゼ活性予測データによる 35 大腸がん細胞の主成分解析(PCA)

リン酸化サイトの定量値から、Kinase Substrate Enrichment Analysis (KSEA) によりキナーゼ活性予測を行った。その結果、114 個のキナーゼ活性予測を行うことができた。この活性の指標である KSEA スコアで、PCA を行うと、大腸がん細胞は、第1主成分(横軸)に沿って並ぶ傾向にあった(図3左)。またこの傾向に強い影響を与えるキナーゼは、CDK1、CDK2、SRC、EGFR、MET であった(図3右)。すなわち、これら5個のキナーゼが、大腸がん細胞におけるキナーゼ活性プロファイルの特徴を代表している可能性が示唆された。これらのキナーゼは、細胞増殖や、発がんと強く関与する遺伝子であることが知られており、今回のデータの信頼性を示していると考えられる。今後、さらなるデータ解析を行い、薬剤感受性との関連性を解析する予定である。

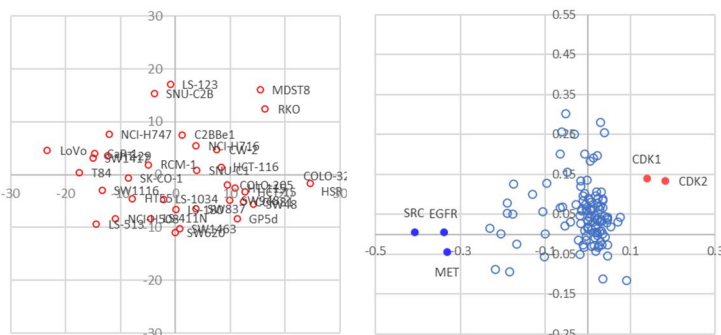


図 3. KSEA スコアによる PCA(左)、114 キナーゼの PC への影響度(右)

Abe et al. Improved phosphoproteomic analysis for phosphosignaling and active-kinome profiling in Matrigel-embedded spheroids and patient-derived organoids. **Sci Rep.** (2018) 8(1):11401.

Adachi et al. Improved Proteome and Phosphoproteome Analysis on a Cation Exchanger by a Combined Acid and Salt Gradient. **Anal Chem** (2016) 88(16):7899-903

Frejino et al. Proteome activity landscapes of tumor cell lines determine drug responses. **Nat Commun.** (2020) 11(1):3639.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鳴海良平
2. 発表標題 Characterization of patient-derived colorectal cancer cells using the phosphoproteome information
3. 学会等名 The 16th Human Proteome Organization World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------