

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659063

研究課題名(和文) 標的絶対プロテオミクスに基づく個別癌化学療法の新規診断基盤の樹立

研究課題名(英文) Quantitative targeted absolute proteomics-based diagnostics for personalized cancer chemotherapy

研究代表者

寺崎 哲也 (TERASAKI, TETSUYA)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60155463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：がん分子標的薬療法では、腫瘍組織における薬効標的分子の発現に基づいた個別診断の基準策定が急務である。本研究は、分子標的薬の薬効標的であり腫瘍増殖に主要な役割を果たす増殖因子受容体の自己リン酸化部位のリン酸化体の発現量を複数同時かつ高感度にLC-MS/MSを用いて定量解析する技術を構築した。さらに、悪性脳腫瘍組織における受容体発現の絶対定量情報に基づき、脳腫瘍組織の特性を層別化できる可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：There has been increasing demands for molecular-targeted drugs-based personalized cancer chemotherapy. Our findings provide the basis that the characteristics of human malignant brain tumors can be stratified according to the absolute protein expression levels of target receptors. Simultaneous and highly sensitive quantitative targeted phospho-proteomics has also been established.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：分子標的薬 定量プロテオミクス リン酸化 増殖因子受容体 個別化医療 がん

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本において死亡者総数の 28% を占め死因順位の第一位である疾患となっている(厚生労働省平成 24 年人口動態統計)。その中でも悪性脳腫瘍は、5 年生存率 6% と極めて予後不良であり、脳機能温存の観点から手術による腫瘍部の完全摘出が困難であるため、有効な薬物療法を確立することは極めて重要な課題である。現在、悪性脳腫瘍の化学療法では、アルキル化剤のテモゾロミドが第一選択薬として患者共通で使用されているが、治療奏功には個人差が大きい。そこで、近年臨床開発が飛躍的に進んでいる分子標的薬の適応が、現状の悪性脳腫瘍の化学療法に突破口を開く可能性が高い。分子標的薬は、その抗腫瘍スペクトルは狭い反面、特定の特性をもつがん組織には劇的な効果を示すという特徴を有している。つまり分子標的薬が効果を発揮するためには、がん組織において薬効標的分子が発現していることが不可欠であり、標的分子の発現プロファイルに基づいた悪性脳腫瘍の個別化療法の基準策定が急務である。網羅的な発現解析法として mRNA の定量解析が比較的簡便である。しかし、mRNA 発現は機能の実体ではなく、特に細胞膜タンパク質発現量と必ずしも相関しないことが報告されていることから、機能を直接反映するタンパク質レベルでの解析を行うことが必須である。

研究代表者の寺崎らは、液体クロマトグラフィ-質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて、トランスポーターや受容体などの膜タンパク質の絶対発現量(mol)を複数同時に計測する手法を開発した(*Pharm Res*, 25:1469-83, 2008)。この手法を悪性髄膜腫に適用し、分子標的薬の薬効標的となる増殖因子受容体の絶対発現量を一斉計測した結果、血小板由来成長因子受容体(PDGFRβ)の発現が高度に誘導されていることを見出した。そこで、PDGFRβに対する分子標的薬スニチニブを投与した結果、顕著な腫瘍縮小効果が認められた(*Neuropathol Appl Neurobiol*, 38:105-10, 2012)。以上の結果は、タンパク質絶対発現量に基づく個別化療法が有効かつ必要である事を強く示唆している。

現状では、個別化治療へ期待が集まる分子標的薬は薬価が高額であり、保険適用は、薬物毎に、特定のがん種及び進行ステージに限られており、本来の治療ポテンシャルを活かせていない。そこで、従来の遺伝子変異診断に加え、「活性と相関するタンパク質の絶対定量情報に基づくコンパニオン診断技術」を軸とした、がん分子標的薬選択基準の構築と実証が必要である。

一方で、単に増殖因子受容体のタンパク質全体の発現量だけでは、がん細胞増殖速度を説明できないケースがあること、つまりがん細胞増殖の責任受容体の同定やそれに基づく分子標的薬の選択基準の精度が十分ではない可能性が示された。従って、増殖因子受

容体を薬効標的とする分子標的薬の個別化療法を確立するためには、タンパク質全体の発現量に加えて、活性体であるリン酸化体の発現量に基づいた診断基盤を構築することが重要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、仮説「脳腫瘍細胞の増殖速度を制御する因子は、各種増殖因子受容体のリン酸化体の発現量であり、脳腫瘍細胞における定量的リン酸化プロファイルを解明することによって、脳腫瘍を精度よく個別化・層別化できる」ことを実証することを目的とする。具体的には、脳腫瘍組織特性の個別診断の実現に向けて、腫瘍増殖に主要な役割を果たす増殖因子受容体の自己リン酸化部位のリン酸化量を複数同時かつ 1% のリン酸化まで超高感度に LC-MS/MS を用いて絶対定量する技術を確立する。さらに、「脳腫瘍組織における定量的リン酸化プロファイルから、がん細胞増殖の責任受容体を同定し、最適な分子標的薬を個別に提案するための診断基準」を樹立することを最終目標とする。

### 3. 研究の方法

(1) 増殖因子受容体のリン酸化体及び非リン酸化体の定量標的ペプチド配列の決定と検量線の作成

増殖因子受容体について、受容体の活性化に重要と考えられる自己リン酸化部位のリン酸化体の発現量、非リン酸化体の発現量及び受容体全体の絶対発現量を区別して定量する手法を確立した。まず、各リン酸化部位について、独自に開発したペプチド選択基準(*Pharm Res*, 25:1469-83, 2008)に基づいて、*in silico* で質量分析に適した定量用のペプチド配列を選択した。選択されたペプチド(標準ペプチド: St)および同じアミノ酸配列で安定同位元素標識されたペプチド(内部標準ペプチド: IS)を化学合成し、アミノ酸分析による標準溶液の濃度決定を行った。広範なダイナミックレンジかつ高分解能の質量分析装置を用いて、ペプチドの定量条件を最適化し、検量線を作成した。

(2) Hammoc 法を用いたリン酸化ペプチドの濃縮条件の最適化と絶対定量

二酸化チタニアなどの酸化金属は、リン酸基に親和性を示す特性があり、リン酸化ペプチドの精製に用いられる。競合剤として乳酸などのアリファティックヒドロキシ酸を加えることで非リン酸化ペプチドの混入を大幅に抑え高い精製効率が期待できる、リン酸化ペプチドの濃縮方法 Hammoc(Hydroxyacid-modified metal oxide chromatography)法を用い、試料中からリン酸化ペプチドを濃縮・精製した。

(1) で作成した検量線を用い、LC-MS/MS を用いて、試料中の定量標的ペプチドの発現量を絶対定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 悪性脳腫瘍組織検体を用いた増殖因子受容体群の絶対発現量の決定

図1に示す増殖因子受容体のリン酸化割合を算出するため、まずリン酸体及び非リン酸化体を区別せず絶対定量系する系を構築した。



図1 本研究で定量対象とした増殖因子受容体

関係機関の倫理委員会の承認のもと、ヒト脳腫瘍組織検体から細胞膜画分を単離し、絶対定量値をそれぞれ算出した。悪性脳腫瘍組織における増殖因子受容体の発現には大きな個人差が認められ、上皮成長因子受容体(EGFR)は検体間で2,000倍以上もの発現量差が認められた。一方で、PDGFRやc-kitなどは発現している検体が非常に限定されていた。本研究における定量解析結果から、悪性脳腫瘍組織における分子標的薬標的分子の絶対発現量には大きな個人差が認められたことから、ヘテロな悪性脳腫瘍の集団に対して有効な分子標的薬は異なることが示唆された。特に、悪性脳腫瘍組織では、PDGFRやc-kitが高度に誘導されている群と、PDGFRやc-kitの発現誘導が示されないがEGFRが高度に誘導されている群とに層別化できる可能性が提示された。

##### (2) リン酸化EGFR定量系の構築

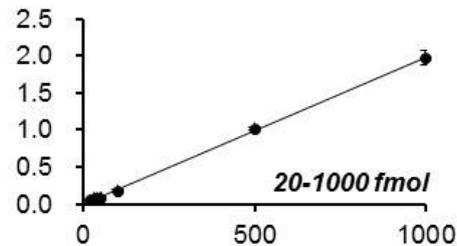
EGFR自己リン酸化部位であるpY1172及びpY1197を含む6種類のリン酸化ペプチドについて、質量分析装置に定速でインヒュージョンし、高感度に検出される4種類のプロダクトイオン(Q3)、declustering potential (DP)、及びcollision energy (CE)の最適値を選択し、イオン化条件の最適化を行った。6種類全てのリン酸化ペプチドにおいて、質量分析装置を用いた検出が可能であることが示された。図2に示すように、6種類全てのリン酸化ペプチドにおいて $R^2=0.999$ 以上の高い線形性をもつ検量線が作成可能であった。

##### (3) 生体試料を用いたリン酸化EGFRの絶対定量

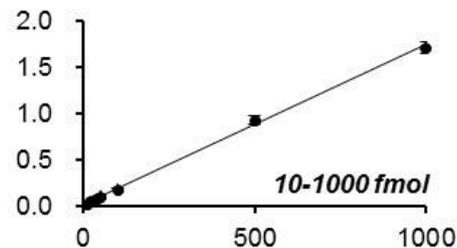
ヒト上皮様細胞がん由来細胞株でありEGFRを高発現するA431細胞のwhole cell lysateをサンプルとして用いて、EGFR自己リン酸化ペプチドの定量解析を行った。その結果、自己リン酸化部位を認識する2種類の

ペプチドの発現は、リガンドであるEGFで刺激を行った場合においてのみ検出された。従って、A431細胞のwhole cell lysateからEGFR自己リン酸化体は絶対定量可能であることが示された。しかし、A431細胞にEGFの刺激を行わない場合は、自己リン酸化部位のペプチドが検出限界以下であったことから、微量のリン酸化体を検出するためにHammoc法による精製濃縮が必要であることが示唆された。

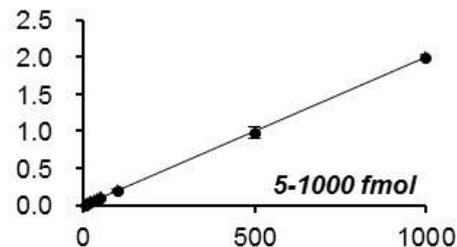
##### (A) EGFR1172 (非リン酸化)



##### (B) EGFR1172 (pY1172) (自己リン酸化)



##### (C) EGFR1197 (非リン酸化)



##### (D) EGFR1197 (pY1197) (自己リン酸化)

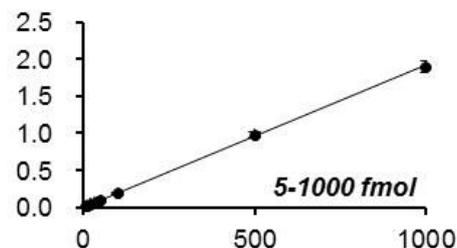


図2 EGFR自己リン酸化ペプチド及び非リン酸化ペプチドの検量線

The standard curves were prepared by plotting the peak area ratios of the standard and internal standard peptides (y-values) against the standard peptide amounts (x-values).

(4) Hammoc 法によるリン酸化ペプチド精製濃縮サンプルを用いた増殖因子受容体の自己リン酸化部位のリン酸化体発現量の高感度定量系構築

Hammoc 法を用いて、増殖因子受容体のリン酸化ペプチドの濃縮法を確立した。具体的には、EGFR をモデルケースとして、EGFR を高発現する A431 細胞の酵素消化物を用いて、濃縮効率を評価するとともに、精製担体の平衡化、洗浄および溶出条件を最適化した。さらに、定量標的とする EGFR 自己リン酸化ペプチド配列の化学合成体を用いて、検量線を用いた絶対定量を行った。その結果、EGF を処理していないサンプル及び EGFR に対する分子標的薬(EGFR チロシンキナーゼ阻害剤)であるエルロチニブ処理細胞においても EGFR 自己リン酸化体の発現が検出された。一方で、非リン酸化ペプチドについては、ピークの検出は認められなかった。

(5) リン酸化ペプチドの精製濃縮と脱リン酸化を組み合わせたリン酸化体の定量法の構築

図 3 に示すように、リン酸化ペプチドの濃縮と脱リン酸化を組み合わせることで、EGFR のリン酸化体の発現量を複数同時に高感度に定量する技術を構築した。

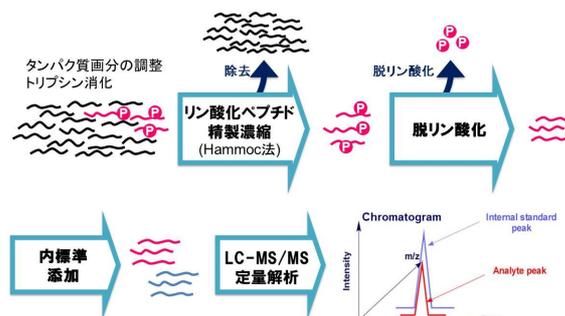


図3 リン酸化ペプチドの定量法  
Hammoc法による精製濃縮と脱リン酸化を組み合わせた、リン酸化ペプチドを非リン酸化体として定量する

本技術を EGFR の高発現細胞に適用した結果、受容体リガンドである EGF 処理に伴ってリン酸化量が増加するペプチド部位が 4 カ所で検出された。同定されたリン酸化部位の中から、EGFR に対する分子標的薬(EGFR チロシンキナーゼ阻害剤)であるゲフィティニブ処理によって、リン酸化量が減少する部位の絞り込み及び定量化に成功した。さらに、細胞増殖に対するゲフィティニブ感受性の異なるがん細胞において、ゲフィティニブ処理による自己リン酸化量の変動量に顕著な差が示された。本研究開発によって、がん組織における増殖因子受容体のリン酸化量の高感度定量法が確立され、増殖因子受容体の定量的リン酸化プロファイルに基づいた分子標的薬の有効性の検証が可能となった。

## 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 4 件)

Obuchi W, Ohtsuki S, Uchida Y, Ohmine K, Yamori T, Terasaki T, Identification of transporters associated with etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics. *Mol Pharmacol*, 査読有, 83(2):490-500, 2013

Sakamoto A, Matsumaru T, Yamamura N, Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Terasaki T, Quantitative Expression of Human Drug Transporter Proteins in Lung Tissues: Analysis of Regional, Gender and Inter-individual differences by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. E-pub ahead of print. *J Pharm Sci*, 査読有, 102(9):3395-3406, 2013

Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T, A Study Protocol for Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: Application for Inter-Strain Differences in Protein Expression Levels of Transporters, Receptors, Claudin-5, and Marker Proteins at the Blood-Brain Barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids and Barriers of the CNS*, 査読有, 10(1):21, 2013

小淵航, 寺崎哲也, 定量的標的プロテオミクスに基づく胃癌・乳癌薬剤感受性関連トランスポートの解明, *医学のあゆみ*, 査読無, 245(1):135-141, 2013

[学会発表](計 12 件)

内田康雄, 立川正憲, 小淵航, 大槻純男, 中田光俊, 濱田潤一郎, 寺崎哲也, 標的絶対定量プロテオミクスに基づくがん分子標的の化学療法の個別・層別化基盤の構築, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 29 日, 熊本

佐藤和貴, 立川正憲, 内田康雄, 大槻純男, 寺崎哲也, 血液脳関門-白血球細胞遊走に関わる接着分子の標的定量プロテオミクス解析, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 29 日, 熊本

米山敏広, 大槻純男, 尾野雅哉, 大峰健, 内田康雄, 立川正憲, 寺崎哲也, 前処理自動化と質量分析を組み合わせたハイスループット MRM 法の開発, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 29 日, 熊本

寺崎哲也, 定量的標的絶対プロテオミクスに基づく癌化学療法の新展開, 公益社団法人・日本薬剤学会主催 APSTJ WG 2025 シンポジウム「バイオとナノが拓く医療イノベーション」, 2013 年 12 月 3 日, 東京

Terasaki T, Obuchi W, Ohtsuki S, Nakada M, Uchida Y, Tachikawa M, Hamada J, Quantitative targeted absolute proteomics of the malignant brain tumors towards molecular-targeted chemotherapy. 10th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting, 2013年9月30日, Toronto, Canada

寺崎哲也, Pharmacoproteomics: 定量的標的絶対プロテオミクスに基づく薬剤学の新展開、薬剤学教科担当教員会議、2013年08月30日、富山

Terasaki T, Pharmacoproteomics: Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) based Pharmacokinetics as A New Path to the Drug Discovery and Development and the Personalized Medicine. International Symposium for the retirement of Professor Chang Koo Shim, 2013年7月10-11日, Seoul National University, Seoul, South Korea

小淵航、大槻純男、中田光俊、内田康雄、立川正憲、濱田潤一郎、寺崎哲也、膜タンパク質を標的とした定量的標的プロテオミクスに基づく悪性脳腫瘍に対する個別化分子標的療法、日本薬剤学会第28年会、2013年5月23日、名古屋

黒田広樹、立川正憲、内田康雄、寺崎哲也、膵癌細胞のゲムシタピン感受性増強を目的とした併用薬のスクリーニング、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、横浜

佐藤和貴、立川正憲、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也、仮想 selective reaction monitoring 法を用いた白血球細胞膜上タンパク質の高感度標的プロテオミクス、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、横浜

Ebata Y, Ohtsuki S, Tachikawa M, Uchida Y, Terasaki T, Targeted quantitative LC-MS/MS methods of bevacizumab, a therapeutic monoclonal antibody. 日本薬物動態学会第27年会、2012年11月21日、千葉

Tachikawa M, Proteomics-based technology as a new path to toxicological evaluation. 2012 International Symposium on Green Toxicology & Technology: Prediction of Kidney Toxicity, 2012年09月7日、Seoul, South Korea

〔図書〕(計 1件)

Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Terasaki T, Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: a new research field opened up by quantitative targeted absolute proteomics (QTAP). Drug Delivery to the Brain-Physiological Concepts, Methodologies and Approaches, Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, and

Thorne R (Ed), Springer, New York, 2014, pp63-100

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺崎 哲也 (TERASAKI, TETSUYA)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：60155463

### (2) 研究分担者

内田 康雄 (UCHIDA, YASUO)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70583590

中田 光俊 (NAKADA, MITSUTOSHI)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：20334774

立川 正憲 (TACHIKAWA, MASANORI)  
東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：00401810

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：