

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640098

研究課題名(和文)薬効・副作用予測のためのin situファーマコプロテオミクス解析

研究課題名(英文)In situ pharmacoproteomics for the prediction of efficacy and side effects

研究代表者

足立 淳(ADACHI, JUN)

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

研究者番号：20437255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ATP拮抗型キナーゼ阻害剤とその標的となるATP結合タンパク質を対象に、細胞内での標的・阻害濃度・阻害持続性を軸とした、3次元ファーマコプロテオミクス解析手法(3D-Pharmacoproteomics; 3D-PPx)を開発した。非小細胞肺癌細胞株を用いた実証試験では、EGF受容体阻害剤エルロチニブに対する耐性株(EGF受容体変異なし)では、エルロチニブの有無によるATPプローブの標識量には有意な変化は見られなかったが、感受性株(EGF受容体変異あり)ではATPプローブの標識量が2.3倍減少し、予想通りの結果が得られた。また同時に今まで知られていないエルロチニブの標的候補も複数同定された。

研究成果の概要(英文)：We developed a 3D-Pharmacoproteomics (3D-PPx) method to identify targets of ATP-competitive kinase inhibitors at the various scale of concentrations and inhibition time points. We applied 3D-PPx to find targets of erlotinib, an EGFR inhibitor used as an anti-cancer drug. We confirmed that 3D-PPx can detect the effect of EGFR mutation using erlotinib-resistant NSCLC cells which express wild-type EGFR and erlotinib-sensitive NSCLC cells which express mutant EGFR. Furthermore, several target candidates of erlotinib were identified using 3D-PPx.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：キナーゼ阻害剤 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤の薬効・副作用予測マーカー探索において、遺伝子変異解析が既に臨床応用されている。しかし、現状では遺伝子マーカーは患者の一部しか層別化できないので、新たな基本原理に基づくバイオマーカー探索が必要である。プロテオーム解析は、薬剤の標的であるタンパク質を直接測定する手法として原理的には優れているが、感度や迅速性に欠けるため、臨床応用につながる成果はほとんど得られていない。そこで本研究では、薬効・副作用予測に直結する、キナーゼ阻害剤の標的タンパク質を効率的に濃縮し、集中的に解析することで、高感度化・迅速化を目指す。あまたあるキナーゼ阻害剤標的探索手法の中で、網羅性・迅速性を有する手法の大半は、リコンビナントキナーゼを使用しているが (*Nat. Biotech.* 2012, 29, 1039)、実際の細胞内環境との乖離が欠点である。一方で、細胞や組織を用いた標的探索では、細胞溶解液を用いて、化合物に結合するタンパクを同定する手法が主流であり、細胞内での阻害濃度・阻害持続性まで測定することができる、網羅的かつ迅速な薬剤標的解析手法は未だに開発されていない。さらに、キナーゼ阻害剤の副作用標的として、キナーゼ以外の ATP 結合タンパク質を大規模にスクリーニングする試みもされていない。

2. 研究の目的

ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤とその標的となる ATP 結合タンパク質を対象に、細胞内での標的・阻害濃度・阻害持続性を軸とした、3次元ファーマコプロテオミクス解析手法 (3D-Pharmacoproteomics; 3D-PPx) を開発することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

ATP 結合タンパクプロテオーム解析

本研究では、ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤とその標的となる ATP 結合タンパク質を解析するために、ATP-desthiobiotin probe を用いる。このプローブは、ATP とデスチオビオチンがリンカーを介して結合している。プローブがキナーゼの ATP 結合ポケットに入ると、ポケット内の保存領域に存在するリジンにデスチオビオチン部位が共有結合することで標識される。その後トリプシンで消化し、ストレプトアビジンビーズで標識ペプチドのみを濃縮して、LC-MS/MS で測定する。デスチオビオチン-ストレプトアビジンの強い親和性を利用して濃縮することで、非標識ペプチドの混

入を抑え、かつ標識ペプチドを効率良く回収することができる。

LC-MS/MS 解析については、四重極 orbitrap 型質量分析計、Q Exactive を用いた parallel reaction monitoring 法、データ依存型分析法 (DDA) を行った。

3D-PPx 法の実証試験

EGF 受容体遺伝子変異が感受性に影響を及ぼすことが知られている ATP 拮抗型 EGFR 阻害剤エルロチニブの非小細胞肺癌細胞株に対する 3D-PPx 解析を行った。具体的には EGF 受容体阻害剤エルロチニブに対する耐性株 4 株 (EGF 受容体変異なし) と感受性株 2 株 (EGF 受容体変異あり) を用いた。各細胞から得られた細胞溶解液にエルロチニブを 0 nM、100 μ M、1 mM 添加した条件下で、ATP probe を反応させた。その後上述したように、各サンプルからプローブ標識ペプチドを濃縮し、LC-MS/MS 解析を行った。データ解析は MaxQuant(1.5.1.2) を用いた。

4. 研究成果

3D-PPx 法のための情報基盤及び解析基盤の構築については、6 種類の非小細胞肺癌細胞株を解析し、ATP プローブで標識されたキナーゼ由来ペプチドのナノ液体クロマトグラフィーの溶出時間、質量分析計で取得される質量電荷比についての情報基盤を取得した。

解析基盤については四重極 orbitrap 型質量分析計、Q Exactive を用いて、parallel reaction monitoring 法を試行したが、シグナル強度の弱い解析対象は、1 回の測定に 200 ミリ秒から 2 秒程度時間をかける必要があることがわかった。この条件では解析のスループット性が失われるので、代替法として MS 解析にデータ依存型分析法 (DDA) 法を採用することにした。DDA 法で取得したデータ解析について Maxquant サーバーのペプチドピークマッチング機能を使用することで、定量対象ペプチドが約 30% 増加し、定量データの網羅性が向上した。

3D-PPx 法の実証試験については、非小細胞肺癌細胞 6 株に対して行った。具体的には EGF 受容体阻害剤エルロチニブに対する耐性株 4 株 (EGF 受容体変異なし) と感受性株 2 株 (EGF 受容体変異あり) を用いて解析を行ったところ、EGF 受容体に関しては、エルロチニブ 100 μ M 添加時と未添加時を比較すると、耐性株においては ATP プローブの標識量には有意な変化は見られなかったが、感受性株では ATP プローブの標識量が 2.3 倍減少した ($p < 0.01$)。この結果は、EGF 受容体の変

異体ではエルロチニブが ATP 結合ポケットとの親和性が高く、変異が入っていない場合には親和性が低いことを意味する。これはリコンビナントキナーゼを用いた既存研究と一致する結果であることから、3次元ファーマコプロテオミクス解析の概念が実験的に実証されたと言える。3次元ファーマコプロテオミクス解析は分子標的薬の主標的(エルロチニブの場合は EGF 受容体)以外の副標的も同定できる特徴を有するため、EGF 受容体以外にも、感受性株と耐性株で違いが見られるエルロチニブの標的候補因子を探索したところ、TTLL12、PNP、CPNE3 が検出された。これらのタンパク質はエルロチニブとの相互作用は報告されていない新規標的候補因子であり、今後検証を行っていく予定である。

本研究で構築した3次元ファーマコプロテオミクス解析法は、細胞の中でATP拮抗型阻害剤がどの濃度でどのタンパク質をどの位阻害しているかを定量できるため、新規薬効・副作用マーカーの創出、作用機序解明、さらに新規創薬標的の同定に貢献することが期待される。

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2件)

すべて査読有り

1. Adachi, J., Kishida M., Watanabe, S., Hashimoto, Y., Fukamizu, K., and Tomonaga, T. (2015) Data for Proteomic Analysis of ATP-Binding Proteins and Kinase Inhibitor Target Proteins Using an ATP Probe. **Data in Brief**, 5: 726–729.
2. Adachi J., Kishida M., Watanabe S., Hashimoto Y., Fukamizu K., and Tomonaga, T (2014) Proteome-wide discovery of unknown ATP binding proteins and kinase inhibitor target proteins using ATP probe. **J Proteome Res**, 13 (12), 5461–5470.

[学会発表] (計2件)

1. 足立淳、橋口一成、佐藤美佐子、長野麻衣子、橋本裕希、深水和菜、佐藤彩子、石濱泰、朝長毅 C18-SCX StageTip を用いた新規ペプチド分画法の開発、日本プロテオーム学会 2015 年会、2015 年 7 月 23 日
2. Jun Adachi, Kazunari Hashiguchi, Misako Sato, Kazuna Fukamizu, Takeshi Tomonaga, Simplified and minimized fractionation using StageTips for in-depth proteome and

phosphoproteome analysis、Human Proteome Organization (HUPO) 13th annual congress, Madrid, Spain, 2014 年 10 月 6 日

3. Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Kinome and ATPome-wide selectivity profiling of ATP-competitive kinase inhibitors. 第 73 回 日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 26 日

[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/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 淳 (ADACHI JUN)

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

研究者番号：20437255

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：