

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 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：26670614

研究課題名(和文)大腸癌初代培養を用いたリン酸化定量プロテオミクスによる分子標的薬効果予測

研究課題名(英文) Prediction of molecular target drug effect using quantitative phosphoproteome analysis of patient derived colorectal cancer cells

研究代表者

朝長 毅 (Tomonaga, Takeshi)

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・プロジェクトリーダー

研究者番号：80227644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、がん治療の分子標的薬の多くはキナーゼ阻害剤であるが、薬剤感受性の違いや耐性化が問題であり、薬効予測マーカーや耐性化メカニズムの解明が必要である。本研究では、それらのキナーゼの基質のリン酸化レベルを網羅的に定量しキナーゼ活性を予測することで、薬効予測マーカー探索及び薬剤耐性化のメカニズムの検討を行った。具体的には、大腸がん治療に用いられているcetuximabに対する感受性と耐性の大腸がん細胞株のリン酸化プロテオーム解析により、薬効予測マーカー候補となるリン酸化タンパク質やキナーゼを同定した。同時に、cetuximab耐性に関与するキナーゼ群を同定し、それらの阻害剤を用いた検証に成功した。

研究成果の概要(英文)：Molecular target drugs such as kinase inhibitors for cancer treatment are not uniformly clinically effective, thus sorting the patients that will benefit from the treatments is critical. Moreover, acquired resistance for the drugs is also a critical problem. Therefore, the identification of mechanisms underlying the resistance is urgent need. Systematic quantification of kinase activation is potentially predictive of the response of kinase inhibitors and it can be quantitated by phosphorylation level of their substrates. In this study, we developed a large-scale phosphoproteome quantification method for the kinase substrates and applied for prediction of the kinase activities and drug response. We also examined the mechanism of drug resistance. By the phosphoproteome analysis of several lung cancer cell lines which are sensitive or resistant for the drug currently used in clinic, cetuximab, we identified several phosphoproteins and kinases which are able to predict drug sensitivity.

研究分野：プロテオミクス 分子腫瘍学

キーワード：リン酸化プロテオミクス 薬効予測 EGFR抗体 大腸がん

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 学術的背景

近年、新しい分子標的薬が登場したことにより、進行大腸癌患者の生存期間が著明に延びた。しかし、これらの分子標的薬は感受性が人によって異なり、また使い続けると耐性化が起こるため、分子標的薬の有効性や耐性化の予測が必須である。現状ではその予測は主に遺伝子検査で行われているが、効果ありと診断されても効かないケースやその逆のケースもしばしば認められる。例えば、大腸癌の EGFR 抗体薬セツキシマブの効果予測に KRAS 遺伝子検査が用いられているが、KRAS 野生型でも効果のない症例が 65%もいると言われ、その原因として、バイパス経路や他の増殖シグナル伝達経路の活性化が報告されている (Roock et al. Lancet Oncol 2010)。

従って、分子標的薬の効果は単一の遺伝子で予測するべきでなく、多因子評価をすべきである。特に既存の分子標的薬のターゲットの多くはキナーゼであるため、分子標的薬の効果予測には、細胞内シグナルパスウェイ上のリン酸化タンパク質の活性化状態を調べることが重要である。申請者はこれまで、大規模なリン酸化タンパク質の定量法の開発を行ってきたが (Narumi et al. J Proteome Res 2012, Shiromizu et al. J Proteome Res 2013)、この成果を薬効予測マーカー開発に応用できると考えた。

また、これまでの薬効予測研究は、ほとんどが培養細胞を使った解析であり、必ずしも生体内の現象を反映しているとは限らない。それに比べて、癌細胞の新しい初代培養系 cancer tissue-originated spheroid (CTOS: Kondo et al. PNAS 2011) は生体内の状態を反映し、かつリン酸化タンパク質解析が培養細胞と同様に行える点で、生体試料と培養細胞の両方の利点を併せ持つ非常に有用なツールであり、真の薬効予測マーカー探索に最適であると考えた。

### (2) 国内外の研究動向および位置づけ

現在、薬剤感受性の指標となるバイオマーカーの探索が盛んに行われているが、その多くが遺伝子変異の網羅的解析である (Garnett et al. Nature 2012, Barretina et al. Nature 2012)。しかし、上述したように遺伝子変異は必ずしも最適な薬効予測マーカーとは言えず、薬剤の直接のターゲットであるタンパク質レベルでのバイオマーカーが必要である。

特に、既存の分子標的薬のターゲットは細胞内シグナルパスウェイ上のキナーゼであるため、分子標的薬の効果予測には、そのシグナルに関わるリン酸化タンパク質の活性化状態を評価することが重要である。これまで分子標的薬の効果予測をタンパク質レベルで行う研究もなされてきたが、ほとんどが、抗体を用いたターゲットキナーゼの下流の

因子の解析または一部のリン酸化タンパク質の解析であり、シグナルパスウェイ上の因子をすべて網羅しているとは言い難い (Holohan et al. Nat Cancer Rev 2013)。それに比べて、本研究では、次世代質量分析計を駆使したリン酸化定量プロテオーム技術を用いて、細胞内シグナルパスウェイ上の主要な全リン酸化シグナルタンパク質を一斉定量するというチャレンジングなテーマに挑戦する。

また、これまでの薬効予測研究は、ほとんどが培養細胞を使った解析であり、生体内の現象を反映しているとは言い難い。そのため癌組織などの生体試料を用いた解析が重要となるが、タンパク質、特にリン酸化タンパク質は採取までの時間や保存条件によって発現量が変動するため、解析には不向きである。申請者は、CTOS が培養細胞と臨床検体のそれぞれの欠点を克服できると考えている。個々の患者の癌組織から作製された CTOS は生体内の状態をよく反映している上、培養細胞のように薬剤処理の効果も評価することが可能であるため、真の薬効予測マーカー探索に最適である。実際、CTOS は非小細胞肺癌に対する分子標的薬 erlotinib の *in vivo* での効果をよく反映していることが示されている (Endo et al. J Thorac Oncol 2013)。

## 2. 研究の目的

(1) リン酸化定量プロテオーム技術を用いて、EGFR 抗体薬によって変動する全リン酸化シグナルタンパク質の一斉定量システムを構築する。

(2) 上記のシステムを用い、大腸癌組織から作製された初代培養系 CTOS を材料として、EGFR 抗体薬の薬効予測・耐性化マーカーの探索を行い、その定量系を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) ターゲット定量プロテオミクスを用いた細胞内シグナルパスウェイの主要リン酸化タンパク質一斉定量系構築

現在知られている約 500 種類のキナーゼのうち、これまでの先行研究で細胞内シグナル伝達に重要であると考えられているキナーゼやその基質のリン酸化サイト約 300 種類について、SRM/MRM 法を用いた一斉定量系を構築する。

ターゲットプロテオミクスは網羅的プロテオミクスに対比する言葉で、自分の見たいタンパク質群にターゲットを絞って定量を行うことであり、その代表的手法が SRM/MRM 法である。SRM/MRM 法は、特定の質量の親イオンと娘イオンのみを選択的に検出するため、複雑なサンプル内から標的とするタンパク質由来のペプチドを高精度に検出することができる。SRM/MRM 法の最大の強みは抗体でしばしば認められる非特異的反応を回避できることであり、特に抗

体作製が難しいリン酸化タンパク質の発現解析に威力を発揮する。申請者はこれまで、SRM/MRM 法を用いたリン酸化ペプチドの大規模定量系を確立しており (Narumi et al. J Proteome Res 2012)、本研究ではその技術を応用して、細胞内シグナルパスウェイの主要リン酸化タンパク質の一斉定量系を構築する (研究協力者: 医薬基盤研究所 足立、長野、渡部、松原、橋口)。

#### (2) EGFR 抗体薬処理によって変動するリン酸化シグナルタンパク質の網羅的解析

上記の主要リン酸化シグナルタンパク質一斉定量系構築と並行して、EGFR 抗体薬処理後に経時的に変化する大腸癌細胞中のリン酸化タンパク質およびそのリン酸化サイトの網羅的比較定量を SILAC 法を用いて行う。細胞中の微量なリン酸化タンパク質のプロテオーム解析のためには、試料中からリン酸化ペプチドを濃縮して回収する必要があるが、本研究では Fe<sup>3+</sup>イオンとリン酸基の親和性を利用した Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)法を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行う。また、リン酸化タンパク質発現の経時変化の解析は、比較したいサンプルをそれぞれ異なる同位体でラベルする SILAC 法を用いて行う。同定されたリン酸化ペプチドの中から、EGFR 阻害によって変動するリン酸化ペプチドを抽出しデータベース化する (研究協力者: 足立、長野)。

#### (3) EGFR 抗体薬感受性株と耐性株間のリン酸化タンパク質比較定量

上記のリン酸化プロテオーム解析を、EGFR 抗体薬に対する感受性株と耐性株においても行う。この解析は、解析対象となる細胞株が多数になるため、すべての細胞株を同位体でラベルした mixture をコントロールとして (super-SILAC 法)、ラベルしていない各感受性株、耐性株の薬剤処理後のリン酸化タンパク質発現の経時変化を解析し、感受性株群と耐性株群で差のあるタンパク質を抽出する。そのリン酸化タンパク質 (ペプチド) を薬効予測マーカー候補とする (研究協力者: 足立、長野)。

#### (4) 薬効予測マーカー一斉定量系の確立

上記 3. で同定された薬効予測マーカー候補因子を 1. の主要リン酸化シグナルタンパク質一斉定量系に加えて薬効予測マーカー一斉定量系を構築する (研究協力者: 足立、長野)。

#### (5) 大腸癌組織からの CTOS の作製

CTOS (cancer tissue-originated spheroid) は、癌組織の破碎、組織分散酵素リペラーゼによる消化後、メッシュフィルターにかけ、フィルターを通過しなかった塊を ES 細胞用培地でカルチャーしてできた細胞

塊である (Kondo et al. PNAS 2011)。この細胞の利点は、細胞 - 細胞間接着を保持したまま培養することであり、通常の培養細胞と異なり、樹立元の腫瘍の性質を保持していることである。また、組織検体と異なり、培養細胞と同様に継代・保存ができ、in vitro の実験も可能である点で優れている。腫瘍の種類によって成功率の差はあるものの、胃癌、大腸癌などの消化器癌は比較的作製しやすい。本研究では、大腸癌の CTOS を数十例作製する予定である (研究協力者: 大阪府立成人病センター 井上)。

#### 4. 研究成果

##### (1) ターゲット定量プロテオミクスを用いた細胞内シグナルパスウェイの主要リン酸化タンパク質一斉定量系構築

SRM/MRM を用いた細胞内シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質の定量法の確立に関しては、SRM/MRM による細胞内リン酸化タンパク質の定量解析が予想に反して難易度が高かったため、Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) 法を用いたリン酸化ペプチドの濃縮と安定同位体標識 TMT10 を用いたショットガン定量リン酸化プロテオミクスの手法の解析に切り替えた。

リン酸化ペプチドの網羅的な定量において、IMAC 濃縮後の HPLC 分画の改良により、約 30,000 個のペプチドの定量化が可能となった。

また、より多くの細胞内リン酸化タンパク質・リン酸化ペプチドの定量を目指して、前処理法の改良を行った。具体的には、リン酸化ペプチドの濃縮に、IMAC 法と抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用することで、チロシンリン酸化ペプチドの同定率を上げた。8mg の細胞抽出液を用いた場合、1 時間の解析時間で 466 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定が可能となった。これは従来の IMAC 法単独の場合と比較しても 2 倍の同定率である。さらに過バナジン酸処理でチロシンの脱リン酸化を阻害させることで、1416 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定に成功した。

さらに、リン酸化ペプチド濃縮後の分画法を、HPLC の代わりにイエローチップを用いた簡易分画法を開発した。この方法により、従来約 1 日かかっていた分画を 1 時間に短縮でき、かつ、常時約 15,000 種類のリン酸化ペプチドの定量、また約 500 種類のチロシンリン酸化ペプチドの定量ができる系を確立することができた。

##### (2) EGFR 抗体薬処理によって変動するリン酸化シグナルタンパク質の網羅的解析

EGFR 抗体薬処理によって変動するリン酸化シグナルタンパク質の網羅的解析に関しては、上記の手法を用いて、大腸癌細胞株のセツキシマブ処理後のリン酸化タンパク

質の定量を行った。その結果、薬剤処理により、各薬剤のターゲットとして知られているリン酸化タンパク質の低下が認められただけでなく、未知のリン酸化タンパク質も変化することが確認された。

### (3) EGFR 抗体薬感受性株と耐性株間のリン酸化タンパク質比較定量

大腸がんセツキシマブ感受性株 2 株、耐性株 2 株に対して、24 時間セツキシマブ暴露あり、暴露なしサンプルをそれぞれ回収し、解析に使用した。感受性株、耐性株で各条件間において有意差を示し、かつキナーゼ活性制御に関わるチロシンリン酸化部位を抽出した。

また、同定されたリン酸化ペプチド(基質)の情報から、キナーゼ活性を予測する手法(KSEA 法: Kinase-Substrate Enrichment Analysis)及びキナーゼに対する ATP 結合能を指標にしたキナーゼ活性化予測法に基づいて行った。

その結果、耐性株にて 13 キナーゼの活性化が予測でき、これらのキナーゼの活性化がセツキシマブ耐性に重要であると考えられた。さらに、上記の解析で、セツキシマブ耐性細胞株で活性が高いと予測されたキナーゼに対する阻害剤を用いて、マーカーキナーゼが本当に薬剤耐性に関与しているかどうかの検証を行った。それらの阻害剤を耐性株に用いたところ、いくつかのキナーゼ阻害剤処理によって細胞の増殖が抑えられた。このことから、それらのキナーゼが大腸がん細胞株のセツキシマブ耐性に関与していることが検証できた。

リン酸化プロテオミクスを用いて薬剤効果予測マーカー群の探索、耐性化に関与するキナーゼの同定とその検証に成功した例は世界的にみても初めての成果である。この解析系を臨床検体とくに薬剤耐性症例の組織バイオプシーに応用できれば、画期的な耐性克服治療法の選択が可能になると考えられる。

### (4) 薬効予測マーカー一斉定量系の確立

(1)で述べたように、SRM/MRMを用いた薬効予測マーカー一斉定量系の確立に関しては、SRM/MRMによる細胞内リン酸化タンパク質の定量解析が予想に反して難易度が高かったため行わなかった。その代わりに、上述したように、同定されたリン酸化ペプチド(基質)の情報からキナーゼ活性を予測することで、活性の高いキナーゼが薬効予測マーカーとなりうると考えられた。

### (5) 大腸癌組織からの CTOS の作製

研究計画では、CTOSを用いた解析を予定していたが、CTOSのリン酸化プロテオーム解析に技術的な問題があり、解析法の確立ができなかった。そこで、三次元培養を用いた解析を行う前に、平面培養細胞を用いて解析

を進めた。

大腸がん組織検体約 40 例から初代培養細胞を樹立した。それらの症例中には現在大腸がん治療に用いられているセツキシマブの他に抗 VEGF 抗体薬ベバシマブに対する感受性の情報が含まれている症例が約 20 例あり、これらの症例から樹立した初代培養細胞を用いて、薬剤効果予測マーカー、薬剤耐性関連キナーゼの探索が現在進行中である。

### 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 20 件)

1. Adachi, J., Narumi, R., and Tomonaga, T\*. (2016) Targeted Phosphoproteome Analysis Using Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM). *Methods Mol Biol* 1394, 87-100. DOI: 10.1007/978-1-4939-3341-9\_7
2. Narumi, R., and Tomonaga, T\*. (2016) Quantitative Analysis of Tissue Samples by Combining iTRAQ Isobaric Labeling with Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM). *Methods Mol Biol* 1355, 85-101. DOI: 10.1007/978-1-4939-3049-4\_6
3. 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. DOI: 10.1016/j.dib.2015.10.018 S2352-3409(15)00266-8 [pii]
4. Kazami, T., Nie, H., Satoh, M., Kuga, T., Matsushita, K., Kawasaki, N., Tomonaga, T\*, and Nomura, F. (2015). Nuclear accumulation of annexin A2 contributes to chromosomal instability by coilin-mediated centromere damage. *Oncogene* 34, 4177-4189. DOI: onc2014345 [pii] 10.1038/onc.2014.345
5. Sato, M., Matsubara, T., Adachi, J., Hashimoto, Y., Fukamizu, K., Kishida, M., Yang, Y.A., Wakefield, L.M., and Tomonaga, T\*. (2015). Differential Proteome Analysis Identifies TGF-beta-Related Pro-Metastatic Proteins in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. *PloS one* 10, e0126483. DOI: 10.1371/journal.pone.0126483 PONE-D-14-55506 [pii]
6. Aoyama, K., Yamaguchi, N., Yuki, R., Morii, M., Kubota, S., Hirata, K., Abe, K., Honda, T., Kuga, T., Hashimoto, Y., and Tomonaga, T\*. (2015). c-Abl

- induces stabilization of histone deacetylase 1 (HDAC1) in a kinase activity-dependent manner. *Cell Biol Int (IF:1.9)* 39, 446-456. DOI: 10.1002/cbin.10413
7. Kubota, S., Morii, M., Yuki, R., Yamaguchi, N., Yamaguchi, H., Aoyama, K., Kuga, T., and Tomonaga, T\*. (2015). Role for Tyrosine Phosphorylation of A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8) in Its Dissociation from Chromatin and the Nuclear Matrix. *J Biol Chem (IF:4.6)* 290, 10891-10904. DOI: M115.643882 [pii] 10.1074/jbc.M115.643882
  8. Yamaguchi, N., Yuki, R., Kubota, S., Aoyama, K., Kuga, T., Hashimoto, Y., and Tomonaga, T\*. (2015). c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21. *Biochem J (IF:4.4)* 471, 67-77. DOI: BJ20150372 [pii] 10.1042/BJ20150372
  9. 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 an ATP Probe. *J Proteome Res.* 13:5461-70. doi: 10.1021/pr500845u
  10. Kume, H., Muraoka, S., Kuga, T., Adachi, J., Narumi, R., Watanabe, S., Kuwano, M., Kodera, Y., Matsushita, K., Fukuoka, J., Masuda, T., Ishihama, Y., Matsubara, H., Nomura, F., and Tomonaga, T\*. (2014). Discovery of Colorectal Cancer Biomarker Candidates by Membrane Proteomic Analysis and Subsequent Verification using Selected Reaction Monitoring (SRM) and Tissue Microarray (TMA) Analysis. *Mol Cell Proteomics* 13, 1471-1484. doi: 10.1074/mcp.M113.037093
  11. Sano S., Tagami S., Hashimoto Y., Yoshizawa-Kumagaye K., Tsunemi M., Okochi M., and Tomonaga T. (2014). Absolute quantitation of low abundance plasma APL18 peptides at sub fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J Proteome Res* 13, 1012-20. DOI: 10.1021/pr4010103
- [学会発表](計 34 件)
1. 朝長 毅: 定量プロテオミクスの創薬及び個別化医療への応用 第 13 回 神戸ポートアイランド創薬フォーラム 2016 年 1 月 26 日 神戸臨床研究情報センター
  2. 朝長 毅: プロテオミクスを用いたバイオマーカー探索と Precision Medicine への応用 第 44 回 京阪泌尿器腫瘍セミナー 2016 年 2 月 8 日 大阪
  3. 朝長 毅: 定量プロテオミクスの医療への応用 第 42 回 BMS カンファレンス 2015 年 7 月 6 日~8 日 岐阜グランドホテル
  4. 朝長 毅: 定量プロテオミクスを用いた疾患バイオマーカー探索とその医療への応用 日本プロテオーム学会 2015 年会 2015 年 7 月 23 日~24 日 くまもと森都心プラザ
  5. Tomonaga T., Kume H. Verification of predictive biomarker candidates of colorectal cancer metastasis in serum extracellular vesicles by selected reaction monitoring based targeted proteomics. International Extracellular Vesicles Conference, Washington DC, USA, 23-26 April, 2015
  6. 朝長 毅: 定量プロテオミクスの医療への応用 第 150 回 質量分析関西談話会、大阪、2015 年 3 月 14 日
  7. Tomonaga T. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis of human tissue samples and subsequent verification using SRM/MRM The 13th HUPO World Congress Post Congress Workshop, Segovia, Spain, 9 September, 2014
  8. 朝長 毅: 質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化(医療への応用) レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会、宮崎、2014 年 8 月 22 日
  9. 朝長 毅: 質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の創薬への応用を目指して 第 12 回日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月 17 日
  10. 朝長 毅: 質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化(医療への応用) 第 14 回日本蛋白質科学会、神奈川、2014 年 6 月 25 日
  11. 朝長 毅: 質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の医療への応用 第 10 回日本臨床プロテオーム研究会、東京、2014 年 5 月 10 日
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]  
出願状況(計 2 件)
1. 発明の名称:「ペプチド又はタンパク質の分画方法」  
発明者: 朝長 毅、足立 淳、宮崎将太  
出願日: 2015 年 7 月 3 日

出願番号：特願 2015-134482  
出願人：ジーエルサイエンス 株式会社  
国内

2. 発明の名称：「大腸がんの転移検出法」  
発明者：朝長 毅、久米秀明  
出願日：2014年5月28日  
出願番号：特願 2014-110293  
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、  
塩野義製薬(株)  
国内

取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)  
国立研究開発法人医薬基盤研究所・プロテ  
オームリサーチプロジェクト・プロジェク  
トリーダー  
研究者番号：80227644