

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830099

研究課題名(和文) 分子標的薬トラスツマブ抵抗性判定検査法開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic proteomic study of monitoring method for anti-cancer drug resistance via receptor tyrosine kinases signaling reactivation

研究代表者

倉田 洋一 (KURATA, Yoichi)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：70645564

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)：受容体チロシンキナーゼ(RTK)を標的とした化学療法はがんの進行や転移を抑え、がん患者のQOL向上や生存期間の延長につながる一方で、分子標的薬の継続投与はがん細胞の抗がん剤耐性を引き起こすという問題がある。そのため、生体分子によりがん細胞のRTKシグナル伝達系の活性化状態をモニタリングすることが可能となれば、RTK分子標的薬の抵抗性あるいは奏効状態やその持続を判定することができるバイオマーカーとなり、臨床上的意義は大きい。本研究ではRTKシグナル伝達系の活性化状態を反映するバイオマーカー候補タンパク質2種類を、プロテオミクス手法によりRTK標的薬耐性GIST細胞から見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Molecularly targeted therapy to receptor tyrosine kinase (RTK) suppresses the progression and metastasis of cancer and leads to improvement in QOL of patients with cancer and prolongation of survival. However long-term administration of RTK targeted drugs causes the emergence of drug-resistant cancer cells. Therefore, a biomarker, which can be to measure for the resistance or the response state against the RTK targeted drugs in the cancer cells, has great clinical significance. In this study, we found potential protein -biomarker candidates reflecting the activation state of RTK signaling in the RTK targeted drug -resistant GIST cell line by proteome analysis.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス 分子標的薬 抗がん剤抵抗性 ハウスキーピングタンパク質 リン酸化 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法はがんの進行や転移を抑え、がん患者の QOL 向上や生存期間の延長につながる。患者への最適な抗がん剤を選択するための臨床的判断の指針の一つとして、バイオマーカーによる診断が積極的に行われてきた。ホルモン受容体や HER2 タンパク質による乳がんの病理診断はその代表例である。乳がんの 20-25% が受容体型チロシンキナーゼ (RTK) HER2 を発現する。HER2 陽性乳がんは HER2 分子標的薬であるトラスツズマブが治療に導入されるまで予後不良であった。

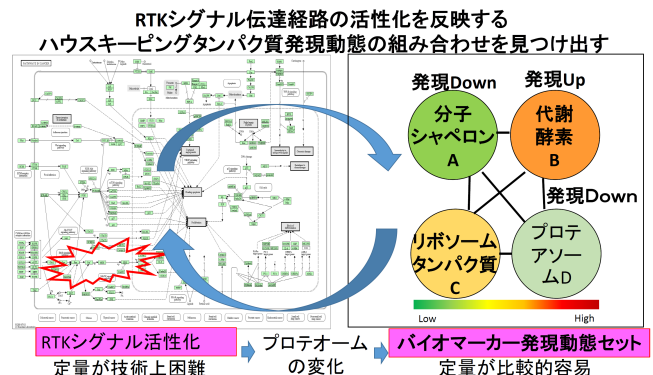
HER2 は EGFR (HER1), HER3, HER4 とのヘテロ 2 量体もしくは HER2 ホモ 2 量体を形成し、キナーゼドメインのリン酸化により活性化する。その結果、下流の ERK-MAPK 経路 (増殖シグナル経路) や PI3K-Akt 経路 (生存シグナル経路) などが活性化し、がん細胞で細胞増殖や抗アポトーシス作用が促進される。また、HER2 陽性乳がん以外の多くのがん細胞でも複数の RTK の発現により RTK 及び下流のシグナル伝達経路の活性化がみられるため、RTK を対象とした分子標的薬が様々ながん種で開発されている。

RTK の分子標的薬の継続投与により感受性を示さなくなる、あるいは、投薬初期からまったく薬剤の効果がみられないがん細胞が存在する。このような RTK 分子標的薬に対する抵抗性を獲得したがん細胞株では RTK および下流のシグナル伝達経路が再活性化をすることが Wilson ら (*Nature*, 2012) など世界の複数の研究機関で明らかにされている。そのため、がん細胞の RTK シグナル伝達系の活性化状態をモニタリングすることができれば、RTK 分子標的薬の抵抗性あるいは奏効状態やその持続を判定することができるバイオマーカーとなり、臨床上の意義は大きい。

RTK や下流シグナル伝達経路のタンパク質活性化レベルは特異的抗リン酸化ペプチド抗体や三連四重極型質量分析計などにより定量を行うことができる。しかし、細胞内のリン酸化タンパク質は全タンパク質の 30% 程度であり、シグナル伝達にかかわるリン酸化タンパク質はそのうちの 2% と推定されごく微量である。また、シグナル伝達系のタンパク質のリン酸化はリガンドなどの刺激に依存して起こり、リン酸化状態は数分以内に变化してしまう上、脱リン酸化されやすい。そのため、シグナル伝達系タンパク質のリン酸化状態は試料の保存方法などによっても大きく影響を受け変化してしまう。従って、RTK や下流のシグナル伝達経路の活性化状態を特異的抗リン酸化抗体などによりモニタリングすることは臨床検体試料では困

難を伴う事例が多い (Gerber, HUPO2013 など)。

そこで本研究では、RTK や下流のシグナル伝達経路のタンパク質の活性化と同調して発現変動するタンパク質 (のセット) を発見できれば、RTK シグナル伝達系の活性化状態をモニタリングするための有用なバイオマーカーとなりうると考えた。その候補としてハウスキーピングタンパク質を提案する。ハウスキーピングタンパク質はこれまで、細胞種や生体の状態に依存せず発現量が一定と考えられてきた。しかし、ハウスキーピングタンパク質も生理活性物質による刺激やアルツハイマー病などの疾患により発現量が変動する。種々のがんでも同様に、代謝酵素 (GAPDH, IDH) や分子シャペロン (HSP) あるいはペルオキシレドキシシン (PRDX) などのレドックスタンパク質の発現量もしくはリン酸化状態が変動することが報告されている。このことはがん細胞においてハウスキーピングタンパク質の発現変動が重要であることを示唆している。また、ハウスキーピングタンパク質は細胞あたりの存在量がシグナル伝達系のタンパク質に比べると圧倒的に多く安定性も高いため、タンパク質発現動態の解析が比較的容易であることも、バイオマーカーとしての大きな利点となる。



2. 研究の目的

RTK シグナル伝達系の活性化状態を反映するバイオマーカー候補を、様々ながん種における抗がん剤抵抗性や術後予後と関連して発現変動するハウスキーピングタンパク質を中心にオミクス解析データから *in silico* 解析で選抜し、質量分析装置を用いた定量解析により特定する。特定したタンパク質による 1) RTK シグナル伝達系モニタリングシステムの構築及び 2) 特異的抗体によるトラスツズマブや他 RTK 分子標的薬抵抗性判定検査法の実現につながる基礎的知見を整備することを本研究の目的とした。本研究で、HER2 陽性乳がん に比べ研究報告が比較的少ない消化管間質腫瘍 (GIST) を実験対象としたところ、RTK 分子標的薬イマチニブ抵抗性で活性化するシグナル伝達系および同調して発

現が変化するハウスキーピングタンパク質を見出せたので、GIST の研究結果に焦点を絞り報告する。

3. 研究の方法

1) 実験対象

細胞株は、GIST 患者から樹立された GIST882 細胞株(WT) 及び WT を 200 nM メシル酸イマチニブ存在下で長期培養し樹立したイマチニブ二次耐性細胞株 GIST882-R (R) を使用した。またイマチニブ奏功状態対照として、WT に 200 nM でメシル酸イマチニブを添加後、6 時間培養したものを GIST882-IM6 (IM6) とした。また、WT と R のゲノムシーケンスを行い、RTK などの付加変異有無を確認した。

2) プロテオーム解析用試料調整

三種類の細胞株からそれぞれタンパク質を抽出し、トリプシン消化によりペプチドに断片化した。得られたペプチドを C18 逆相クロマトグラフィーで精製した後、二通りの手法でリン酸化ペプチドを濃縮精製した。チタニアカラムに吸着させ、5%アンモニア水溶液、5%ピペリジン水溶液で溶出し総リン酸化ペプチドを得た。得られたリン酸化ペプチドを C18 逆相クロマトグラフィーで脱塩し総リン酸化プロテオーム解析用試料とした。抗チロシンリン酸化(pY)抗体を用いて免疫沈降にて濃縮後、チタニアカラム・C18 逆相カラムで脱塩精製し、チロシンリン酸化プロテオーム解析用試料とした。また、並行して各群の総タンパク質のプロテオーム解析用試料も調整した。

3) 質量分析装置による測定とデータ解析

精製したリン酸化もしくは総ペプチドを Nano-LC LTQ Orbitrap Velos(Thermo Scientific)を用いてショットガン分析を行った。得られたピークリストについて、MASCOT ソフトウェア(Matrix Science)により Swiss-prot データベースを用いて、(リン酸化)ペプチドを同定した。得られた質量分析結果を Progenesis LC-MS(Nonlinear Dynamic)ソフトウェアを用いて各細胞株間で比較定量解析を行った。

次に、WT に対し、R または IM6 で有意に量差が検出されたペプチド(ANOVA $p < 0.05$) に関して DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) および統計解析ソフト R により Gene ontology(GO) 解析と Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)を行い、各群で有意差のあったタンパク質セットの GIST 細胞における機能を推定した。

4. 研究成果

1) GIST-R における RTK 活性化

GIST の約 90% は c-kit 遺伝子の機能獲得型突然変異により、RTK の一種である KIT

タンパク質がリガンドによる刺激なしで、自己リン酸化を起こして恒常的に活性化することが原因で発症していると考えられている。R では WT に比べ、KIT タンパク質のリン酸化が亢進されていた。WT と R のゲノムをシーケンスしたところ、c-kit 遺伝子遺伝子および PDGFR をはじめとした RTK 遺伝子にも付加変異がないことが確認でき、R では RTK 遺伝子の付加変異以外の機構で、イマチニブ存在下でも KIT の活性化が起きていることが分かった。

2) リン酸化プロテオーム解析

リン酸化 25 μ g 分の細胞抽出液からリン酸化ペプチドの濃縮を行った試料を質量分析装置測定したところ、総リン酸化プロテオーム解析では 3468 種類 (MASCOT SCORE26 以上)、チロシンリン酸化プロテオーム解析では 472 種類のリン酸化が同定された。このうち、WT, IM6, R のいずれかの群で有意に量差が検出されたペプチド (ANOVA $p < 0.05$) は、総リン酸化プロテオーム解析では 1036 種類、チロシンリン酸化プロテオーム解析では 210 種類であった。また、リン酸化レベルの変動パターンも様々であった。また、KIT タンパク質のシグナル伝達に重要な 703 残基目のチロシンの定量データも得られており、ウエスタンブロットの結果と同様の変動を示していることも確認された。

3) R のイマチニブ耐性獲得に関するリン酸化タンパク質の特定

定量解析データを用いて、GSEA を行ったところ、WT もしくは IM6 と比べ R で有意に発現変動し、R の表現型に寄与するリン酸化ペプチドとして ErbB シグナル、MAPK シグナル、mTOR シグナル関連タンパク質が見出された(図 2)。

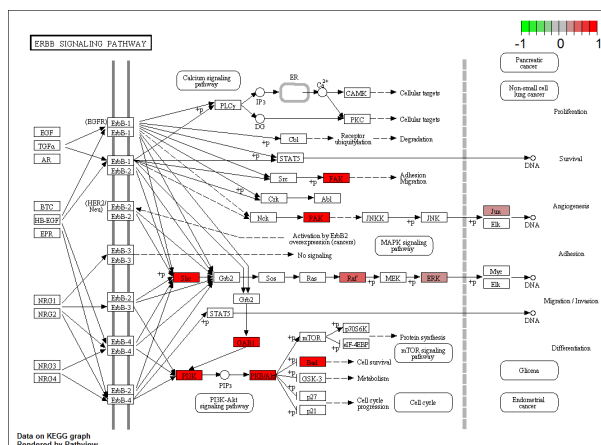


図 2: GSEA による R 細胞での ErbB シグナルの活性化の模式図

このことから、イマチニブ存在下においても R では ErbB シグナルの活性化を起点として MAPK シグナルをはじめとした複数の細胞増殖経路などの再活性化がイマチニブニ

次耐性獲得に関わっていることが示唆された。また、R でリン酸化レベルが上昇しているペプチドの中に ErbB シグナルの起点となる受容体である EGFR が検出されていた。そこで R に EGFR の分子標的薬ゲフィチニブとイマチニブを併剤投与すると、細胞増殖が抑えられた。従って、イマチニブ存在下での EGFR の活性化が R の KIT の活性化および ErbB や MAPK シグナルの活性化に重要であることが明らかになった。

4) GIST におけるイマチニブ耐性獲得と関連するハウスキーピングタンパク質の探索

分子標的薬の継続投与に伴う RTK 再活性化に関与する微量リン酸化タンパク質と発現が連動するハウスキーピングタンパク質の探索を行った。GIST WT, IM6, R の総タンパク質を用いたプロテオーム解析結果を用いて、階層型クラスター解析を行い、R>WT>IM6 と発現が変動しているタンパク質群の中からハウスキーピングタンパク質を抜粋し、「RTK シグナル再活性化を反映するタンパク質セット」の候補とした。WT, R, IM6 を無血清培地で培養後、培養上清から細胞外小胞(EV)を回収し、プロテオーム解析に供したところ、「RTK シグナル再活性化を反映するタンパク質セット」に含まれるハウスキーピングタンパク質 X, Y が検出された。タンパク質 X および Y は RTK シグナルの活性化と連動して発現動態が変化し、かつ、EV に含まれることから、侵襲性が比較的低い血液などによるイマチニブ抵抗性判定検査法の開発へ展開できる可能性が高い。また、本研究で用いた手法により、HER2 陽性乳がんにおけるトラスツズマブ抵抗性、あるいは他がんにおける RTK 分子標的薬の抵抗性と関連するハウスキーピングタンパク質を探索し、バイオマーカー開発の基盤研究へ応用することが期待できる。

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 3 件)

Ayuko Kimura, Yoichi Kurata, Jun Nakabayashi, Hiroyuki Kagawa, Hisashi Hirano, N-myristoylation of the Rpt2 subunit of the yeast 26S proteasome is implicated in the subcellular compartment-specific protein quality control system; *J. Proteomics*, 130, 33–41, 2016. 査読有, DOI:10.1016/j.jprot.2015.08.021.

Akiko Okayama, Yohei Miyagi, Fumihito Oshita, Hiroyuki Ito, Haruhiko Nakayama, Mayuko Nishi, Yoichi Kurata, Yayoi Kimura, Akihiko Ryo, Hisashi Hirano, Identification of

Tyrosine-Phosphorylated Proteins Upregulated during Epithelial-Mesenchymal Transition Induced with TGF- β ; *J Proteome Res*, 14 (10), 4127–4136, 2015. 査読有, DOI:10.1021/acs.jproteome.5b00082.

Kayoko Nagata, Takao Kawakami, Yoichi Kurata, Yayoi Kimura, Yusuke Suzuki, Takashi Nagata, Yuji Sakuma, Yohei Miyagi, Hisashi Hirano, Augmentation of multiple protein kinase activities associated with secondary imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors as revealed by quantitative phosphoproteome analysis; *J. Proteomics*, 115, 132–142, 2015. 査読有, DOI:10.1016/j.jprot.2014.12.012

〔学会発表〕(計 7 件)

Hisashi Hirano, Yayoi Kimura, Ayuko Kimura, Yoko Ino, Akiko Okayama, Yoichi Kurata, Hiroyuki Kagawa, Toshifusa Toda, Effects of Co-/Post-Translational Modifications on Protein Function, The 15th Human Proteome Organization World Congress in 2016 (HUPO 2016), 2016 年 9 月 18 日 ~ 22 日, Taipei International Convention Center (Taipei, Taiwan)

木村 鮎子、倉田 洋一、香川 裕之、平野久 酵母 26S プロテアソームサブユニットの N-ミリスチル化修飾とタンパク質品質管理機構, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 2015 年 12 月 1 日 ~ 4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

倉田洋一、木村弥生、菅原経継、得津奏子、井野洋子、平野久 Phos-tag 技術を利用したヒト 26S プロテアソームのリン酸化修飾動態解析, 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(熊本県・熊本市)

岡山 明子、宮城 洋平、尾下 文浩、伊藤宏之、中山 治彦、西 真由子、倉田 洋一、木村 弥生、梁 明秀、平野 久 上皮間葉系移行 (EMT) を利用した肺癌予後予測リン酸化タンパク質マーカーの検出, 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(熊本県・熊本市)

生駒桂子、倉田洋一、井野洋子、木村弥生、小野知二、村越倫明、杉山圭吉、平

野久、西野輔翼 ラクトフェリンの脂肪分解促進作用に關与する脂肪細胞表層局在タンパク質の同定,日本ラクトフェリン学会第6回學術集会,2014年11月18日,エポカルつくば(茨城県・つくば市)

得津奏子、菅原経継、井野洋子、倉田洋二、木村弥生、平野久ヒト 26S プロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析,第65回日本電気泳動学会総会シンポジウム,2014年10月24日~25日,横浜情報文化センター(神奈川県・横浜市)

生駒 桂子、倉田 洋一、井野 洋子、木村 弥生、小野知二、村越倫明、杉山圭吉、平野久、西野輔翼 プロテオミクスを活用した脂肪細胞におけるラクトフェリン結合タンパク質の同定,日本プロテオーム学会 2014 年会,2014 年 7 月 17 日~ 18 日,つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉田 洋一 (KURATA, Yoichi)
横浜市立大学・医学研究科・特任助教
研究者番号:70645564