

令和元年6月28日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06150

研究課題名(和文)がん分子標的探索の新戦略-ATP代謝回転プロテオミクス

研究課題名(英文)ATP turnover proteomics for cancer drug target discovery

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・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：20437255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌細胞株35株から4846個のタンパク質、16267個のリン酸化部位の定量データを取得した。リン酸化プロテオームは、細胞間で特異性が高く、EGFR、ERBB2の遺伝子増幅が認められない細胞の一部においても、活性化が認められた。個々の細胞のキナーゼ活性と439阻害剤の感受性情報を統合したPharmacoproteomicsデータを作成し、細胞毎に活性化している分子標的候補と薬剤の最適な組み合わせ情報を取得した。新既治療法開発には患者の層別化が重要であることが示唆され、今後臨床検体データから薬剤候補選択を行うための基礎データとして役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本でもがんゲノム医療が本格的に始まり、患者個別化による精密医療の時代が始まった。しかし、治療に結びつく患者の割合が限定されることが課題である。食道扁平上皮癌は未だに分子標的薬が実用化されていないが、本研究により、細胞毎にキナーゼ活性化プロファイルが極めて特異的であることが示唆された。今後、新既治療法開発を進める際に、薬剤に適した患者を層別化することが重要であると考えられ、本研究で得られた、個々の細胞のキナーゼ活性と439阻害剤の感受性情報を統合したPharmacoproteomicsデータは、臨床検体データから薬剤候補選択を行うための基礎データとして役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Quantitative data of 4846 proteins and 16267 phosphorylation sites were obtained from 35 esophageal squamous cell carcinoma cell lines. Phosphoproteome had high specificity among cells, and even in part of cells in which EGFR and ERBB2 gene amplification were not observed, kinase activation was observed. Pharmacoproteomics data integrating kinase activity of individual cells and sensitivity information of 439 inhibitors were prepared, and optimal combination information of molecular target candidates and drugs was obtained. It is suggested that stratification of patients is important for development of new treatment methods, and it is expected that our data will serve as basic data for drug candidate selection from clinical specimen data in the future.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：リン酸化 キナーゼ 食道がん 分子標的 プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌分子標的薬が登場して 15 年以上経過するが、これまで分子標的探索に大きく寄与したのは、ゲノム解析による遺伝子変異同定であった。現在もゲノム解析技術の進展とともに、新たな標的が見つかるが、遺伝子変異頻度は低くなる傾向があり、また遺伝子変異が認められない症例も多いため、今後の分子標的探索には、新たな基本原理、戦略に基づく探索手法の開発が重要である。本研究では、薬剤の直接の標的である蛋白質、とりわけ酵素活性を測定することで、ゲノム、転写、翻訳、翻訳後修飾、局在、複合体形成、細胞内シグナル伝達等の様々な変異に起因する酵素活性変化を包括的に捉え、これまで見つからなかった標的を探索する戦略を立てた。

本研究では、食道扁平上皮癌の分子標的を探索した。食道癌は日本の癌死亡者数の 6 位であり(2012 年国立がん研究センター、男性) 生存率の低い癌として知られている。食道癌は大きく分けて扁平上皮癌と腺癌に分けられる。欧米では腺癌が多いが、日本をはじめとするアジア諸国では扁平上皮癌が圧倒的に多く、食道扁平上皮癌は日本を含めたアジア特有の疾患である。治療としては術前化学療法後の外科的切除の併用が標準的であり、化学療法は、シスプラチンとフルオロウラシルの 2 剤併用療法が推奨されている。近年これにドセタキセルを加えた 3 剤併用療法も臨床試験として試みられている。しかし、それらの化学療法が効かない患者が多数存在し、また薬剤の副作用が強いことが大きな問題となっており、分子標的薬の開発が望まれている。そのため本研究では日本人由来食道扁平上皮癌細胞株 35 株を用いて分子標的の探索を行った。

2. 研究の目的

癌分子標的薬の多くは、キナーゼをはじめとする ATP 代謝酵素を標的としている。癌特異的に活性化している酵素は有望な分子標的であり、そのような酵素を見つけるためには、酵素活性を測定することが最もストレートな手法である。本研究では細胞中の個々の酵素活性変化を大規模リン酸化プロテオーム解析データから推定することによって、細胞中の酵素群の分子活性ビッグデータを取得し、癌細胞特異的に活性化している酵素及び関連経路を同定し、抗腫瘍効果の検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

日本人由来食道扁平上皮癌細胞株計 35 株まで解析対象を拡大して、リン酸化プロテオーム解析、チロシンリン酸化プロテオーム解析、タンパク発現プロテオーム解析を実施し、クラスタリング、キナーゼ基質エンリッチメント解析、パスウェイ解析を行った。

タンパク発現プロテオーム解析は、35 株の細胞溶解液を還元・アルキル化、トリプシン消化後に TMT10plex 試薬で標識を行った。標識後に StageTip で脱塩・分画を行い、Q Exactive plus 質量分析計を用いて LC-MS/MS 解析を行った。リン酸化プロテオーム解析は還元・アルキル化、トリプシン消化後に IMAC 法を用いて、リン酸化ペプチドを濃縮し、TMT10plex 試薬で標識を行った。チロシンリン酸化プロテオーム解析は、さらに PY1000 抗体でチロシンリン酸化ペプチドを濃縮し、StageTip で脱塩を行い、Q Exactive plus 質量分析計を用いて LC-MS/MS 解析を行った(図 1)。各データについては MaxQuant(1.6.3.3)でデータ解析を行い、Perseus、R を用いてインフォマティクス解析を実施した。

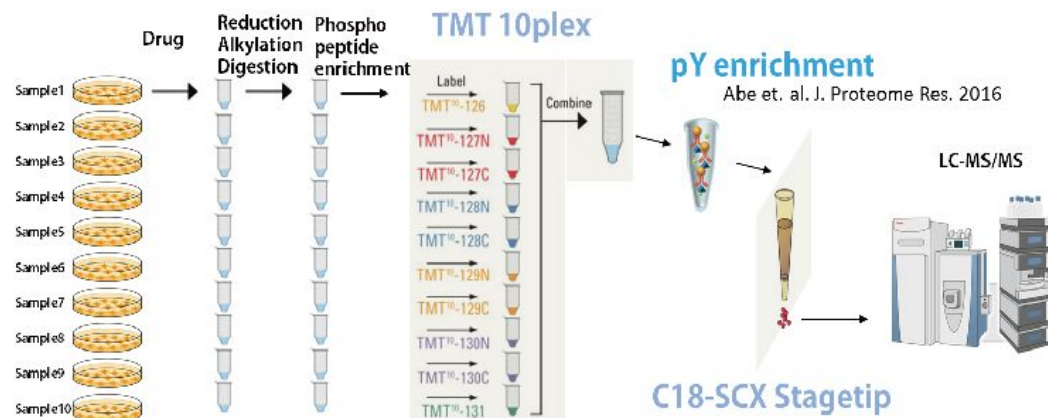


図 1 チロシンリン酸化プロテオーム解析の概略図

4. 研究成果

タンパク発現プロテオミクス解析、リン酸化プロテオーム解析、チロシンリン酸化プロテオーム解析を実施し、4846 個のタンパク質、16267 個のリン酸化部位の定量データを取得し

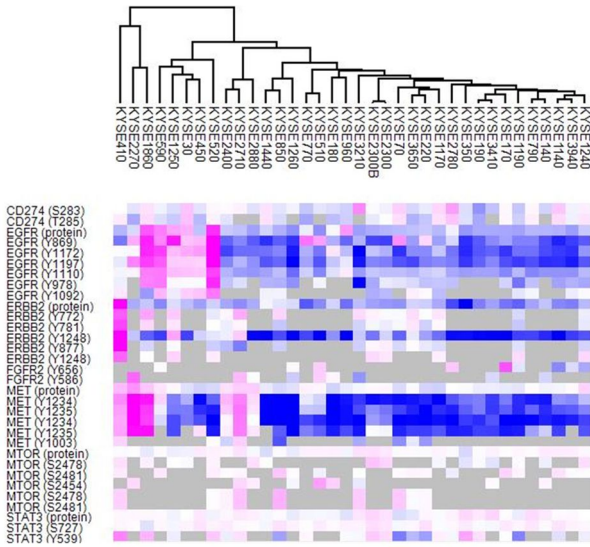


図2 分子標的薬の標的タンパク質のタンパク質発現、リン酸化修飾のプロファイル

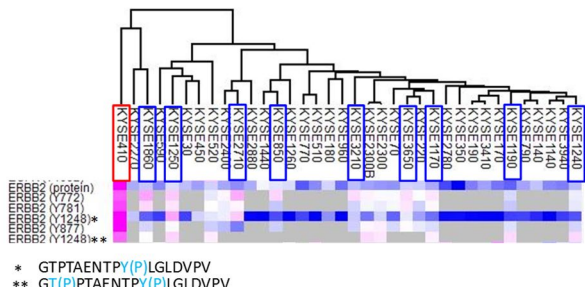


図3 ERBB2(Her2)のタンパク質発現、リン酸化修飾のプロファイル

た。リン酸化プロテオームは、タンパク質発現プロテオームと比較して、細胞間で特異性が高く、両プロテオームにおいて、分化型による明確な差は見られなかった。

さらにこれまでに食道がんにおいて臨床試験が成功しなかった分子標的薬の標的タンパク質のタンパク質発現、リン酸化修飾のプロファイル(図2)は、細胞毎にリン酸化修飾状態が大きく異なることが示された。また図3に示すようにERBB2の遺伝子増幅が認められた細胞(KYSE410)ではプロテオーム、リン酸化プロテオームも発現とリン酸化が亢進していた。しかし、増幅が認められない細胞においても、青色で示される9株においてリン酸化が亢進していた(図3)。それぞれの細胞において、5種類のチロシンリン酸化部位(Y772, Y781, Y877, Y1248-1, Y1248-2)のプロファイルは異なっていた。それぞれの部位のキナーゼ、フォスファターゼの関与が細胞ごとに異なることが示唆されるが、詳細については今後の課題である。上記の結果から、本研究の特色である酵素活性に着目したアプローチにより、これまで遺伝子増幅等している細胞に加えて、遺伝子増幅していても、活性化している細胞を捉えられることが示された。

次にリン酸化プロテオームデータを元に、キナーゼ基質エンリッチメント解析を用いて各細胞において特異的なキナーゼ活性推定プロファイルを作成した(図4)。

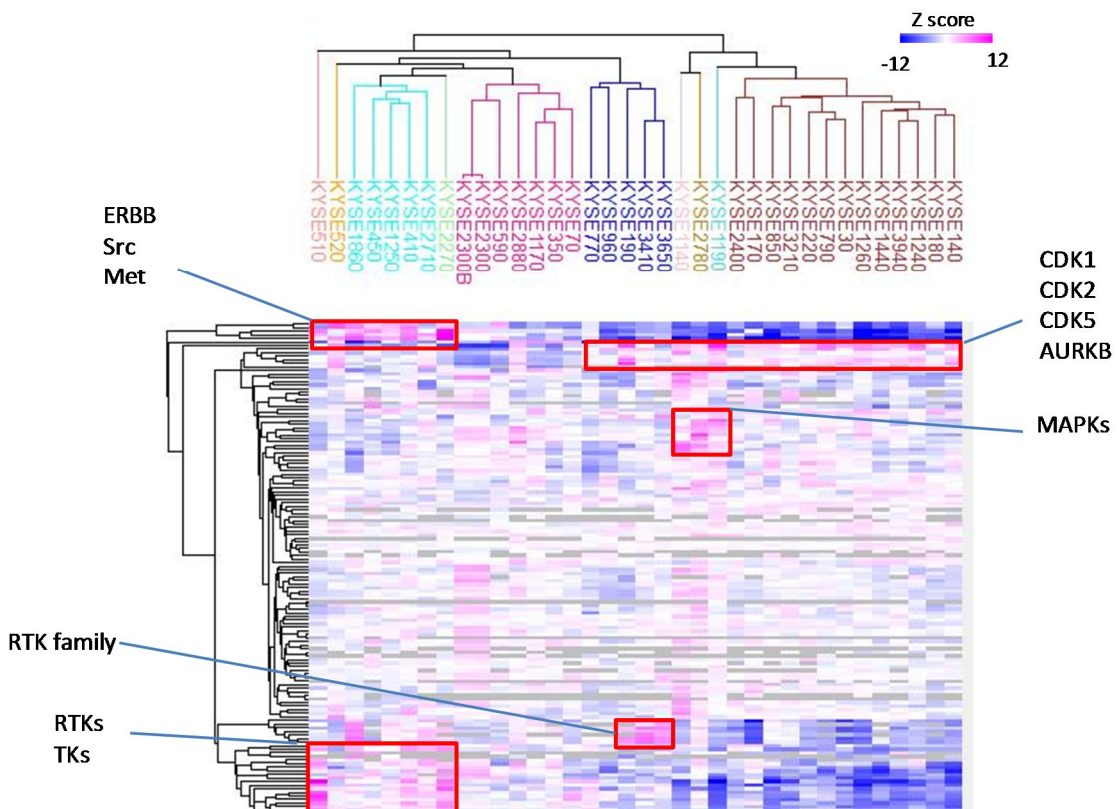


図4 食道扁平上皮癌細胞株におけるキナーゼ活性プロファイル

キナーゼ活性プロファイルも、各細胞における特異性が高く、これまでに報告されているキナーゼの活性化に加えて、未報告のキナーゼの活性化も複数見出された(図4)。

さらにキナーゼ活性情報から、その細胞の増殖を抑制することができる薬剤を選択するために、個々の細胞のキナーゼ活性と439阻害剤の感受性情報を組み合わせることで、個々の細胞のキナーゼ活性と薬効情報を統合したPharmacoproteomicsデータを作成し、細胞毎に活性化している分子標的薬と薬剤の最適な組み合わせ情報を取得した。例えば、AKT-1阻害剤MK-2206とRaf1活性は強く相関(相関係数0.915)するなど、分子標的候補因子と薬効を予測するマーカー候補を抽出することが可能になった。キナーゼ活性プロファイルは細胞毎に特異性が高く、新既治療法開発には患者の層別化が重要であること、単剤では限界があることが示唆された。今後は臨床検体のリン酸化プロファイルと、本研究で得られたPharmacoproteomicsデータを用いて、がん個別化医療を推進していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Abe, Y., Tada, A., Isoyama, J., Nagayama, S., Yao, R., Adachi, J.*, and Tomonaga, T.* (2018). Improved phosphoproteomic analysis for phosphosignaling and active-kinome profiling in Matrigel-embedded spheroids and patient-derived organoids. *Sci Rep* 8, 11401.
2. Narumi, R., Masuda, K., Tomonaga, T., Adachi, J., Ueda, H.R., and Shimizu, Y. (2018). Cell-free synthesis of stable isotope-labeled internal standards for targeted quantitative proteomics. *Synth Syst Biotechnol* 3, 97-104.
3. Abe, Y., Nagano, M., Tada, A., Adachi, J.*, and Tomonaga, T.* (2017). Deep Phosphotyrosine Proteomics by Optimization of Phosphotyrosine Enrichment and MS/MS Parameters. *J Proteome Res* 16, 1077-1086.
4. Adachi, J.*, Hashiguchi, K., Nagano, M., Sato, M., Sato, A., Fukamizu, K., Ishihama, Y., and Tomonaga, T.* (2016). Improved Proteome and Phosphoproteome Analysis on a Cation Exchanger by Combined Acid and Salt Gradient. *Anal Chem* 88, 7899-7903.

〔学会発表〕(計7件)

1. 足立 淳：プロテオミクスを駆使したがん最適医療への挑戦，第25回日本質量分析学会 北海道談話会，札幌，2019年
2. J. Adachi, Y. Abe, M. Nagano, J. Isoyama, M. Kishida, T. Tomonaga : Phosphoproteomics of non-small-cell lung cancer cells treated with erlotinib reveals drug-resistant signatures and potential targets. THE 22nd INTERNATIONAL MASS SPECTROMETRY CONFERENCE (IMSC) Firenze, Italy 2018年
3. 足立 淳, 阿部雄一, 朝長 毅 : Phosphoproteomics of non-small-cell lung cancer cells reveals drug-resistant signatures and potential targets. 第76回日本癌学会学術総会、横浜、2017年
4. 足立 淳, 阿部雄一, 朝長 毅 : リン酸化プロテオーム解析を用いた肺がん細胞株の薬剤応答解析. 第65回質量分析総合討論会，つくば，2017年
5. 足立 淳, 阿部雄一, 朝長 毅 : エルロチニブ処理時の非小細胞肺癌培養細胞株におけるリン酸化経時変化大規模情報の取得と活用. 第75回日本癌学会学術総会、横浜、2016年
6. Adachi J., Hachiguchi K., Nagano M., Sato M., Sato A., Fukamizu K., Ishihama Y., and Tomonaga T. Acid-based SCX fractionation for in-depth proteome and phosphoproteome analysis. HUPO 15th Annual World Congress, Taipei, 台湾. 2016年
7. Adachi J., Hachiguchi K., Nagano M., Sato M., Sato A., Fukamizu K., Ishihama Y., and Tomonaga T. Acid-based SCX fractionation for in-depth proteome and phosphoproteome analysis. the 64th ASMS Conference, San Antonio, U.S.A. 2016年

〔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：
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：
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) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。