

令和元年6月20日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14627

研究課題名(和文) 組織逆相タンパクアレイ基盤の確立とTNIK阻害剤コンパニオンマーカの開発

研究課題名(英文) Development of reverse-phase protein array platform for analyzing tissue samples and identification of biomarkers to guide the use of a TNIK inhibitor

研究代表者

増田 万里 (Masuda, Mari)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：70435717

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)：平成28年度は、すい臓がんの肝転移の腫瘍の生検組織検体(凍結組織)を用いてRPPAの作製を検討し、手法の基礎を構築することができた。平成29年度は、凍結検体以外にも、ホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックを用いた解析についても細胞RPPAとほぼ同じ条件でシグナル検出が可能であることを確認した。最終年度(平成30年度)、組織RPPA作製法・染色法について、技術的最適化の詳細を進め、Standard operating procedureの作成に取り掛かった。また、本基盤を用いて、TNIK阻害剤の治療効果モニタリングマーカの探索し、候補分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん精密医療はゲノム医療が中心であるが、検査後に治療が可能な症例は限られており、更なる改善が望まれている。腫瘍内のシグナル経路の異常をごく微量のサンプルから正確に把握できる逆相タンパクアレイを精密医療に応用できれば、現在、治療選択肢の無い患者にも薬剤の提示ができる可能性がある。本研究によって、組織RPPA基盤の確立することができれば、精密医療の質の向上をもたらす可能性がある。また、本基盤を用いてTNIK阻害剤のコンパニオンマーカ候補が同定できれば、薬剤開発を促進し、新たな大腸がん治療薬の創出に役立つと考えられるため社会への貢献度は高く重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Despite the early successes of targeted therapies and improvements in sequencing technology over the last two decades, genomics-driven precision oncology has helped only a minority of cancer patients. It has become apparent that genomic profiling in itself is limited with respect to optimal selection of patients for targeted therapy. Proteomics-, but not genomics-, based approaches capture biological processes that directly contribute to cancer pathogenesis. Reverse-phase protein array (RPPA) is well suited for investigating the signaling status in a limited amount of clinical samples. We have previously developed RPPA platform for analyzing cells. In this research project, we established a RPPA platform for analyzing tumor specimens. In addition, we have optimized the method of signal detection suited to RPPA analysis for tissue samples. Using this platform, we identified a potential biomarker for monitoring the effect of a TNIK inhibitor which we previously developed.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：精密医療 逆相タンパクアレイ RPPA リン酸化タンパク シグナル経路 バイオマーカ 大腸がん

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

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は細胞内や生体内のシグナル伝達機能を制御し正常細胞の恒常性を維持しているが、がん細胞では正常な分化や増殖に必要なシグナル伝達制御機構が破たんしている。よって、シグナルタンパク質のリン酸化の状態を正確に検出できれば、がん化に関わる分子経路の活性化を含め、個々のがんの特性を把握することができる。ガラス基板に細胞抽出液をアレイ化し、様々な抗体を用いて発現の検出を行う逆相タンパクマイクロアレイ法 (Reverse Phase Protein Array; RPPA) は、多数検体における標的タンパク質の発現を high-throughput かつ定量的或は半定量的に検出できる優れたプロテオーム技術であり、2001年に米国立がん研究所の研究グループによって開発された。申請者らは、2009年に日本国内で初めて独自のアレイ作製技術及びシグナル検出技術を開発し (Masuda m. et al. *Mol. Cell Proteomics*, 13:1419-1438, 2014)、ウエスタン法で必要とされる 1/10,000 以下の微量な試料でリン酸化タンパク質を正確にかつ high-throughput に解析できる基盤を確立しており、本基盤を用いて7種のがん由来の96種類のがん細胞株のリン酸化タンパクのプロファイルを取得した。更に、23種類の肝がん細胞株のリン酸化プロファイルを用いて、肝がんにおける分子標的治療薬ソラフェニブの効果予測マーカー候補としてリン酸化 RPS6 を同定している。かねてより精密医療における RPPA 法の有用性が唱えられている。例を挙げると、乳がん患者トラスズツマブ投与対象者の選択を行う HER2 検査で、投与適応外と診断された症例の中に、リン酸化 HER2 発現陽性 (IHC-, FISH-, pHER2+) のサブグループがあり、HER2 陽性症例と同様の下流遺伝子の活性化が認められることが RPPA 解析により明らかになっている。米国では、臨床試験のコンパニオン診断や、乳がんの HER2 試験の代替法として組織検体 RPPA 法を導入する試みが始まっている。組織検体を用いた RPPA 法の臨床応用は、がん精密医療のみならず、分子標的薬やコンパニオンマーカーの開発、獲得耐性の機序解明等、今後のがん医療を支える有用な技術基盤となる可能性が高く、日本国内においても早急な開発が必須であると考え本申請に至った。

## 2. 研究の目的

逆相タンパクアレイ法 (RPPA) は、ごく微量の検体からシグナルタンパク質の発現やリン酸化を正確かつ high-throughput に検出できる技術である。本基盤を用いて個々の腫瘍のシグナルプロファイリングを行い、特性を把握することができれば、分子標的治療薬による適切な治療戦略の提示や治療後の獲得耐性の克服が可能となることが期待される。

本研究課題では ホルマリン固定・パラフィン包埋組織、或は凍結組織を用いた逆相タンパクマイクロアレイ (RPPA) 法の技術開発を第一目的 とし、更に、確立した基盤を用いて、申請者が分担研究者として先行研究で開発に携わってきた大腸がん分子標的治療薬 TNIK 阻害剤のコンパニオンマーカー (効果予測マーカー及び治療効果モニタリングマーカー) の開発と検証を行うことを第二の目的としていた。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織検体を用いた RPPA 法の最適化

#### [組織検体取り扱い法の最適化]

最適化には、確立されたマウス皮下腫瘍モデルより摘出した腫瘍を用いる。肺腺癌由来 PC9 細胞株は *EGFR* の exon19 に決失変異を有し上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) チロシンリン酸化酵素阻害薬に高い感受性を示すことが知られている。ヌードマウスに PC9 細胞を皮下注射し、皮下腫瘍の形成が確認されたところで vehicle 及び EGF-TKI (ゲフィニチブ) を投与し、腫瘍を摘出する。摘出した腫瘍の半量は液体窒素により直ちに凍

結後-80C 保存し、他の半量は一晩ホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックを作製する。リン酸化タンパク質の脱リン酸化を防ぎ、リン酸化の維持をするため、脱リン酸化酵素阻害薬を抽出時に使用する。

#### **[組織抽出液の調整法最適化、アレイの作製、シグナル検出法の最適化]**

凍結組織を数種の組織抽出バッファーを用いて組織抽出液を調整する。RPPA スライドにアレイ化の際、抽出液濃度の至適化も必要なため希釈系列を作成し、スライドに打ち込みを行う。PC9 のマウス皮下腫瘍モデルより摘出した腫瘍では EGF-TKI の処理によって、腫瘍組織における EGFR,ERK,AKT のリン酸化が減少することが報告されており RPPA 法にてそれらを total 抗体とリン酸化抗体を用いて検証する。シグナル検出を行うための免疫染色増感法は、培養細胞 RPPA 法で使用しているチラミドを用いたシグナル増感法で行う。RPPA 法で得られた結果はウエスタン法で検証を行い、高い相関及び、より高いシグナルのダイナミックレンジが得られる条件を選択する。ホルマリン固定後ラフィン包埋ブロックを用いて同様の検討を行っていく。最終年度に時間的余裕ができた場合は、手術による切除検体のみならず、針生検や穿刺吸引細胞診等ごく微量検体の本基盤への応用を検討し、個別医療に応用しうる基盤確立を名指す。臨床検体は国立がん研究センター・パイオバンクの試料を使用して行う。

#### **(2) TNIK 阻害剤バイオマーカーの探索**

TNIK 阻害剤の治療効果モニタリングマーカーの探索は Wnt シグナルの活性化が認められる大腸がん細胞 HCT-116 或は DLD-1 細胞株を用いて培養細胞 RPPA 法を行う。申請者らが見出した TNIK 阻害剤には構造異性体が存在し、その構造異性体には TNIK 阻害効果が無いことを確認している。よって、TNIK 阻害剤、TNIK 阻害剤異性体及び DMSO で細胞を処理後 4 時間、24 時間で細胞抽出液を調整し、RPPA を作製する。約 200 種類のリン酸化部位特異抗体を用いて解析を行い、TNIK 阻害剤処理によりリン酸化タンパクの発現が有意に減少或は増加したリン酸化タンパク質をマーカー候補分子として選択する。リン酸化タンパクに加え、TNIK を含む Wnt シグナルのシグナル伝達タンパク及び Wnt シグナルの標的遺伝子産物 (c-myc,Axin 等) は治療効果モニタリングマーカーとなる可能性が高く、これらの発現についても同様に RPPA 解析を行う。

一方、効果予測マーカーについては、現在のところ TNIK の発現及びリン酸化 TNIK の高発現がマーカー候補として考えられるが、他のマーカー分子の可能性も探る。約 20 種類の大腸がん細胞において TNIK 阻害剤の感受性 (IC50 値) を細胞増殖アッセイにより測定し、それらの細胞の阻害剤未処理状態でのシグナルプロファイルを RPPA 法により取得し、感受性と相関の高いリン酸化タンパク及びタンパクを候補分子として同定する。得られた効果予測マーカー分子候補に関しては、国立がん研究センター・パイオバンクの大腸がん切除標本の免疫染色を行い、マーカー候補分子の発現頻度や、臨床情報との相関を明らかにし、TNIK 阻害剤の臨床試験におけるマーカーとしての可能性を検討する。

#### **4 . 研究成果**

初年度(平成 2 8 年度)は、組織検体を用いた RPPA の最適化を行うため、マウスの xenograft の腫瘍組織を用いて行う予定であったが、すい臓がんの肝転移の腫瘍の生検組織検体(凍結組織)で RPPA の作製を行うことができた。そのため、凍結組織を用いた組織 RPPA 法が可能であることを証明し、方法の基礎を構築することができた。平成 29 年度は、RPPA 法を高精度医療の技術基盤として臨床試験に既に組み込んでいる米 George Mason 大学で技術研修を受け、凍結検体以外にも、ホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックを用いた解析についても細胞 RPPA

とほぼ同じ条件でシグナル検出が可能であることを確認した。最終年度(平成30年度)、組織RPPA作製法・染色法について、技術的最適化の詳細を進め、Standard operating procedureの作成に取り掛かった。現在も続行中であるが、将来的に臨床試験の付随試験等でも使用可能な技術基盤を目指し、適切な陰性・陽性コントロールの検討も含め更なる基盤整備を続けている。一方、TNIK阻害剤の治療効果モニタリングマーカーの探索については、平成28年度はNCB-0846及びNCB-0970(構造異性体でTNIK阻害活性の無い)で処理した大腸がん細胞株のリン酸化プロファイルをRPPAで取得した。平成29年度は、得られたデータを用いて比較解析を行い、NCB-0846で有意に変動するリン酸化タンパクを同定し、ウエスタン法で発現の検証を行い、更に共焦点顕微鏡によって発現及び細胞内局在の検証を行った。NCB-0846はDNA損傷・修復シグナルの活性化を誘導することが明らかになり、最終年度(平成30年度)からは、本作用機序の詳細について解析を進めている。一方、TNIK阻害剤のコンパニオンマーカーの探索については、薬剤感受性と高い相関を示すリン酸化タンパクは現在のところ同定されていないが、臨床検体におけるTNIKの発現を免疫染色法によって確認した。Wntシグナルは約90%の大腸がんでは活性化されていることが知られており、Wntシグナルの制御因子として我々が同定したTNIKは検討したほぼ全例で染色が認められ、今後臨床情報を含めた検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. **Masuda M.** Hunting hidden pieces of signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2019, Feb;8(1):74-76.
2. **Masuda M.**, Yamada T. Signaling pathway profiling using reverse-phase protein array and its clinical application. *Expert Rev Proteomics.* 2017, Jul;14 (7):607-615.
3. **Masuda M.**, Yamada T. The emergence of TNIK as a therapeutic target for colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017, Apr;21(4):353-355
4. Yamada T, **Masuda M.** The emergence of TNIK inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Sci.* 2017, May;108(5):818-823.
5. **Masuda M.**, Uno Y, Ohbayashi N, Ohata H, Mimata A, Kukimoto-Niino M, Moriyama H, Kashimoto S, Inoue T, Goto N, Okamoto K, Shirouzu M, Sawa M, Yamada T. TNIK Inhibition Abrogates Colorectal Cancer Stemness. *Nature Commun.* 2016 Aug 26;7:125867

[学会発表](計10件; 初年度・次年度は筆頭者のみ記載)

1. **Masuda M.** Application of the TNIK inhibitor, NCB-0846, to colorectal cancer treatment and beyond. *8<sup>th</sup> Global Reverse Phase Protein Array Workshop, 3月24 - 25日, 2019. 東京* (招待講演/国際学会)
2. **増田万里**, 弘實透, 宇野佑子, 澤匡明, 山田哲司. 大腸がん幹細胞の遺伝子転写を標的とした新規分子標的治療薬の開発. *第14回日本がん分子標的治療学会・TRワークショップ, 1月18日, 2019. 東京*
3. 宮永晃彦, **増田万里**, 蔦幸治, 西島伸彦, 清家正博, 浅村尚生, 弦間昭彦, 山田哲司. 網羅的ゲノム解析を用いた肺カルチノイドの新規治療標的遺伝子の同定. *第59回日本肺癌学会学術総会, 11月29日 - 12月1日, 2018. 東京*
4. **Masuda M.**, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Naoko Goto, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada.

Clarification of the Signaling Network Affected by the TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-phase Protein Array. The Human Proteome Organization (HUPO) 2018 meeting, 9月30 - 10月3日, 2018. オランダ、フロリダ、米国

5. 増田万里. がん精密医療における逆相タンパクアレイ基盤の有用性. 第15回北里疾患ポロテオーム研究会, 神奈川, 2018年3月20日 (招待講演)
6. Masuda M., Yuko Uno, Hideki Moriyama, Toru Hirozane, Naoko Goto, Masaki Sawa and Tesshi Yamada Preclinical development of NCB-0846, a novel TNIK inhibitor that blocks Wnt signaling in colorectal cancer. The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, Sep. 28-30, 2017.
7. Masuda M.; Elucidation of Signaling Pathways Affected by TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-Phase Protein Array. 7<sup>th</sup> Global Reverse Phase Protein Array Workshop 2017, Dublin, Ireland, Sep. 14-16, 2017 (招待講演/国際学会)
8. Masuda M.; Application of Proteomic Technology in Development of Novel TNIK Inhibitor Blocking Wnt Signaling. 日本プロテオーム学会 2017年大会 JHUPO 第15回大会、千里、大阪府、2017年7月27日 (招待講演/国際学会)
9. Masuda M., Takeomi Inoue, Yuko Uno, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada. Preclinical Characterization of Novel TNIK Inhibitor, NCB-0846, by Proteomic Profiling of Signaling Pathways Using Reverse-Phase Protein Array. 6<sup>th</sup> Global Reverse Phase Protein Array Workshop, Tubingen, Germany, Oct. 24-25, 2016. (招待講演/国際学会)
10. Masuda M., Yuko Uno, Hirokazu Ohata, Hideki Moriyama, Naoko Goto, Koji Okamoto, Masaki Sawa and Tesshi Yamada. Developing Therapeutic Intervention of Wnt Signaling Pathway in Colorectal Cancer. The 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, Oct. 6-8, 2016.

[図書](計2件)

1. Masuda M., Yamada T. Utility of reverse-phase protein array for refining precision medicine. Reverse-phase protein array, advances in experimental medicine and biology, Springer Nature, *in press*.
2. Miyanaga A., Masuda M., Yamada T. Biomarkers of lung cancer: liquid biopsy comes of age. Biomarkers in Cancer Therapy. 2019, pp105-113.

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

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：該当なし

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。