

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18444

研究課題名(和文) トランスレートーム解析による分子標的薬の効果予測因子の探索

研究課題名(英文) Screening of biomarkers to predict the drug efficacy based on translation profiling

研究代表者

築茂 由則 (Tsukumo, Yoshinori)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：40469630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR阻害剤はその標的となるEGFRに特定の変異がある場合に効果があるため、投与前に変異の有無を検査する必要がある。多くの場合、腫瘍を直接採取するため、患者にとっては苦痛や、腫瘍組織の癒着、合併症などのリスクを伴う。申請者は低侵襲な方法で治療薬の効果予測に役立つバイオマーカー開発を目的として研究を進めた。まず、治療薬感受性化変異を有するがん細胞株をゲノム編集により作製した。さらにこの細胞を用いて翻訳システムに着目した遺伝子発現解析を行い、EGFR変異により発現が変化する分泌性タンパクや新規ペプチドを複数同定した。これらは新規バイオマーカー候補として利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：EGFR inhibitors become highly effective molecular targeted drugs if the tumor harbors EGFR-activating mutation such as L858R or del 19. Therefore, the EGFR mutation test is essential for treatment decision. Currently, direct sampling of tumor tissue is being performed in many cases. However, such invasive method is accompanied with pain and the risk of complications including spreading or adhesion of tumor tissue. In this research, we aimed to identify novel biomarkers applicable for low-invasive approach. Using genome editing, we succeeded in establishment of new cell lines harboring EGFR-L858R mutation. We performed screening of mRNAs which are translationally upregulated or down regulated in EGFR mutation-dependent manner using the technique called ribosome profiling. Finally we found several candidates including secreted proteins and exosome components.

研究分野：分子細胞生物学、分子標的治療、分子診断

キーワード：肺がん バイオマーカー EGFR 分子標的薬 翻訳

1. 研究開始当初の背景

肺がんの治療薬として知られる EGFR 阻害薬は、EGFR に特定の変異がある場合に高い抗腫瘍効果を発揮するため、投与前に変異の有無を検査する必要がある。多くの場合、腫瘍組織を直接採取する必要があり、患者にとっては苦痛や合併症のリスクなどを伴うものとなっている。そのため、低侵襲な方法で変異の有無を判別可能にする代替法の開発は喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

EGFR 阻害薬への感受性がよく知られている EGFR-L858R 変異を導入した細胞を樹立し、EGFR 変異に依存して発現変化を起こす遺伝子を抽出することで EGFR 阻害薬の効果を予測可能なバイオマーカーを同定することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ゲノム編集により肺がん細胞株 A549 に EGFR 変異 (L858R) を導入した。EGFR リン酸化を指標としたウェスタンブロット法や細胞生存率を測定することで EGFR 阻害薬への感受性を検討した。親株と変異導入細胞を用い遺伝子発現解析を行った。発現解析にはリボソームに保護された mRNA を RNA-seq にて解析するリボソームプロファイリングを用いた。本法では各 mRNA のタンパク産生効率を網羅的に把握でき、アイソフォームの判別や未知の読み枠、新規ペプチドの同定も可能である。データ解析には Galaxy などの解析サーバーを利用した。

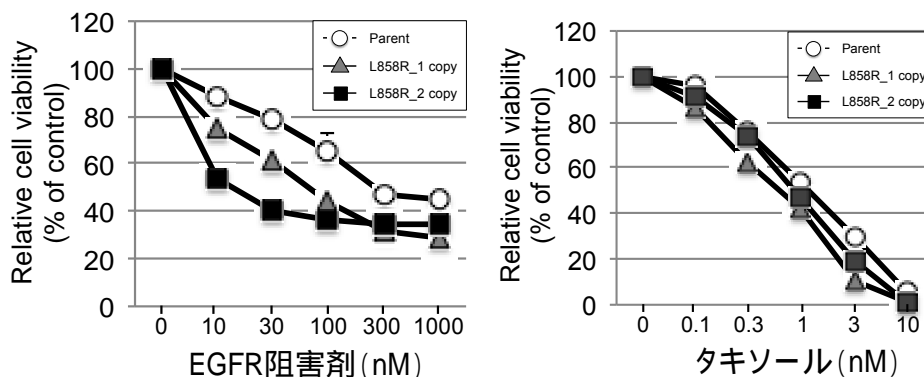
4. 研究成果

1)ゲノム編集により、肺がん細胞株への EGFR-L858R 変異導入に成功し、複数の L858R 変異導入クローンを樹立した。変異導入部位近傍のゲノム配列をサブクローニングし、サンガー法にて確認したところ、L858R 変異以外にもその周辺で欠失または挿入変異をもつアレルが混在することがわかった。各細胞ごとに約 30 サンプルをシーケンスしたところ、L858R 変異は 25-50% のアレルに導入されていることがわかった。また、qPCR の結果から、いずれのクローンも EGFR 遺伝子を 4 コピー持つことがわかった。以上の結果から、樹立したクローンは L858R 変異を 1 コピーまたは 2 コピーもつことが明らかになった。

EGFR-L858R の発現を mRNA、タンパクレベルでの発現を変異特異的プライマーと抗体で検討したところ、L858R 変異体の発現量はコピー数と相関した。

各クローンの EGFR 阻害剤への感受性について、EGFR リン酸化を指標に検討したところ、親株と比較し L858R 変異導入株では低濃度の EGFR 阻害薬存在下でもリン酸化が有意に抑制されていた。また、L858R 変異を 2 コピー持つクローンでは 1 コピー持つクローンと比べてさらに低濃度でリン酸化が抑制されていた。

さらに、阻害剤存在下における細胞増殖について検討したところ、いずれの L858R 変異クローンも親株に比べて感受性化していた。特に、L858R 変異を 2 コピー持つクローンでは高い感受性を示した。一方で、従来の抗がん剤タキソールに対しては、親株と同様の感受性を示した (図)



以上の結果から、EGFR 変異の有無に加え変異アレルのコピー数も治療薬の効果に関わる可

能性が考えられた。

2 EGFR-L858R 変異導入細胞株と親株 A549 を用いリボソームプロファイリングを行い、翻訳レベルで発現変化が起こっている遺伝子群および新規読み枠の同定に成功した。

L858R 変異導入細胞株において 426 遺伝子が転写レベルで発現上昇し、205 遺伝子が発現低下していた。さらに解析を進め、46 遺伝子の翻訳が亢進し、75 遺伝子の翻訳が低下していることがわかった。

翻訳変化を起こした遺伝子群には分泌タンパク、エクソソーム構成タンパクなども含まれており、これらのタンパクは肺癌患者の血中バイオマーカーとして利用できるかもしれない。

今後は、EGFR 変異肺癌細胞や患者由来血漿サンプルを用い検証作業を進め、治療効果予測に有用な新規バイオマーカー確立を目指す。

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)

査読あり

コンパニオン診断薬の現状と今後の課題

築茂 由則, 鈴木 孝昌, 内藤 幹彦

レギュラトリーサイエンス学会誌 7 巻 (2017) 2 号 p. 71-80

<https://doi.org/10.14982/rsmp.7.71>

査読あり

Transcriptional induction of 4E-BP3 prolongs translation repression.

Tsukumo Y, Sonenberg N, Alain T.

Cell Cycle. 2016 Dec 16;15(24):3325-3326. doi: 10.1080/15384101.2016.1224786.

査読あり

Translation control during prolonged mTORC1 inhibition mediated by 4E-BP3.

Tsukumo Y, Alain T, Fonseca BD, Nadon R, Sonenberg N.

Nat Commun. 2016 Jun 20;7:11776. doi: 10.1038/ncomms11776.

[学会発表](計 1件)

築茂由則, 鈴木孝昌, 内藤幹彦: ゲノム編集を用いた EGFR L858R 変異導入細胞の作製と EGFR 阻害剤感受性の解析

第 76 回日本癌学会学術総会 (2017)

[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

6．研究組織

(1)研究代表者

築茂 由則 (TSUKUMO, Yoshinori)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

研究者番号：40469630

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()