

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24245015

研究課題名(和文) 抗がん剤投薬前診断のための次世代ペプチドアレイ

研究課題名(英文) Peptide microarray for prognosis of cancer chemotherapy

研究代表者

片山 佳樹 (Katayama, Yoshiki)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70284528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内キノームをプロファイリングできるペプチドマイクロアレイの開発に成功した。まず、キノーム評価に必要な新規キナーゼ基質ペプチドの開発を行い、このマイクロアレイを用い、実際に薬物刺激における細胞のキノーム変化を評価に成功した。さらに、制癌剤の効果をキノームをもとに評価することにも成功した。特異基質の開発が困難なチロシンキナーゼに関しては、個々のキナーゼに会合するSH2ドメインの配列をもとに、標的キナーゼを補足できるリガンドペプチドの開発に成功し、これを基質ペプチドと共固定することで、特異性を確保しつつ感度を向上させることができた。最終的にがんの治療効果判定に供しえるツールの開発を達成できた。

研究成果の概要(英文)：Peptide microarray that can profile an intracellular kinome has been established. At first we successfully developed some new substrate peptides for various protein kinases which are important to evaluate effects of anti-cancer drug. Then, by using these substrates, we prepared an peptide amicroarray and succeeded to get correct kinome profile against stimulation of drugs in living cells. Finally, kinomes of some different anti-cancer drugs, which have different specificity to EGFR and HER2, could be evaluated by the microarray. For the analysis of tyrosine kinase activities, it was difficult to make specific substrates. Thus, we developed ligand peptides which are specifically bind to target tyrisine kinases. Using the ligand peptidides, we successfully realize specific and sensitive monitoring of tyrosine kinase profiling.

研究分野：生体関連化学

キーワード：プロテインキナーゼ マイクロアレイ ペプチド 蛍光分析 薬物探索 診断 キノーム

1. 研究開始当初の背景

がん分子標的薬は、次世代の抗がん剤として期待されている。白血病における Glivec が顕著な効果を示したことから多くの分子標的薬が上市されているが、多段階の変異が蓄積した他の多くのがんでは、効果が期待できるがんは一部であり、それを見分けることが重要となっている。そのような投薬前診断としては、標的分子の遺伝子変異などを指標とする遺伝子診断が主流である。ところが、EGFR の様な標的分子に変異があり有効であると判断されても、実際には効果が見られない場合や、反復投与により標的分子の阻害は持続しているにもかかわらず耐性を示す場合等、現在の診断法では解決できない多くの問題があり、分子標的薬の効果は疑問視されている (NewEng. J. Med. 360, 563-572, 2009)。これらの原因は、がんの病態機能が単独の遺伝子産物に依存しているのではなく、異常が細胞内情報伝達ネットワーク全体に千差万別に影響し合っていることにある。プロテインキナーゼは、細胞の情報処理システムの中核を担う酵素群であり、分子標的薬の標的であることからもわかるとおり、がんの病態機能に直接関わっている。従って、プロテインキナーゼの活性を計測することは、がん細胞の状態を正確に評価するための最も直接的な方法である。ただし、キナーゼは極めて複雑なネットワークを形成して互いに関連し合っており、特定のキナーゼの異常がネットワークにどのように影響しているかは、個々のがんでは異なっていると予想できる。また、分子標的薬で特定のキナーゼを抑制しても、それを補償するネットワークが形成されることは十分に予測できる。これが、分子標的薬の効果の差異や、耐性の獲得の分子論的メカニズムであると言える。以上のことを鑑みると、キナーゼ活性の測定にはネットワーク全体としてプロファイリング(キノーム解析)することが重要であることが分かる。しかしながら現在、細胞内のキナーゼ活性を診断に供し得るレベルで総体としてプロファイリングできる手法は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究では、キナーゼ活性総体(キノーム)の細胞間比較を可能にする原理を確立する。そのために、キナーゼ活性を同時に評価可能なペプチドアレイを開発し、その有用性を検証する。また、実際に細胞内

のキノームのプロファイリングを取得するための検討を開始して、最適化を完了する。最終年度には、実際に分子標的薬耐性がん細胞を用いて耐性の評価、薬物感受性評価を実施して、本システムの有効性を実証する。

3. 研究の方法

まず、基質のリン酸化を検出する手法として、チロシンキナーゼの場合は、Cy3 修飾抗リン酸化チロシン抗体が利用可能であるが、セリン/スレオニンキナーゼの場合には、抗体が利用できないため、PhosTag と Cy3 標識ストレプトアビジンを用いた。しかし、感度が低いという問題が生じ、これを解決するため、PhosTag とストレプトアビジンの混合条件を種々検討した。

また、対象とするキナーゼとしては、制癌剤に関わるチロシンキナーゼとして、EGFR、JAK、ALK、Src の 4 種のキナーゼ、セリン/スレオニンキナーゼとしては、PKA、CAMKII、Akt、ERK2、PKCa、p70S6K、AMPKa の 7 種のキナーゼについて基質探索を行なった。すなわち、種々結成したペプチドライブラリを用い、精製酵素によるリン酸化をマイクロアレイで検出して、最適な基質を選別した。また、リン酸化が確かにアレイ上で蛍光シグナルとして評価できていることを、 ^{32}P -ATP を用いたオートラジオグラフィーによって確認した。さらに、実際に細胞の破碎液を用いて、含まれる標的キナーゼの活性の評価を試みた。この場合、細胞をイレッサ、あるいはメトフォルミンで刺激した場合と無刺激の場合でのアレイ上に固定化した基質群のリン酸化プロフィールの変化を本システムで評価可能であることを確かめた。実際の細胞内のキナーゼ活性はウェスタンブロット法で確認して、結果の妥当性を確認した。次に、抗がん剤耐性細胞のキノーム解析を実施し、感受性細胞との識別を確認後、種々の EGFR 阻害方制癌剤の薬効キノームプロファイルを評価し、本アレイの制癌剤に対する薬効評価ツールとしての妥当性を確認した。また、チロシンキナーゼの相互識別を k な王にする手法として、種々のキナーゼに関与する分子間相互作用にかかわるアミノ酸配列をもとに、各キナーゼに結合可能なペプチドの設計を試み、これを基質ペプチドと共固定することで、細胞破碎液中の標的キナーゼを該当する基質スポットに濃

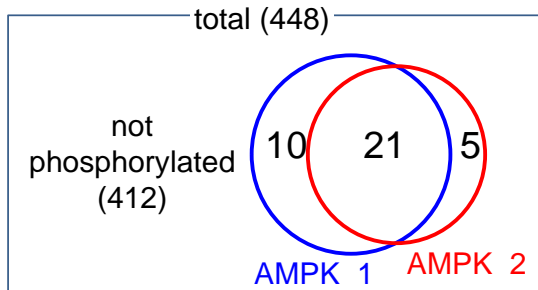
縮することを検討した。

4. 研究成果

セリン/スレオニンキナーゼ検出系の感度向上の検討

本項目では、種々検討の結果、PhosTag での検出感度の低下は、化学両論で添加しているはずの PhosTag がストレプトアビジンに結合しないで存在している画分が存在し、これが単独でリン酸化ペプチドに結合することが原因であることを突き止め、予め、PhosTag をストレプトアビジンと混合後、ゲルろ過カラムにより未反応の PhosTag を除去することで、感度の向上を達成した。

また、基質探索に関してもいくつかの新規な基質を見出すことに成功した。得られたアレイ上でのリン酸化シグナルは、オートラジオグラフィーでの結果とほぼ一致しており、正確にリン酸化を蛍光シグナルとしてアレイ上で検出できており、そこから基質を中質することが可能な方法論を確立することができた。例えば、AMP キナーゼに関しては、スクリーニングした 448 種類のペプチド中、数に示すとおり、36 種のリン酸化可能な基質ペプチドを見出し、しかも、そのうち AMPK 1 に関しては 10 種、AMPK 2 に関しては 5 種のサブタイプを識別できる基質を見出せた。



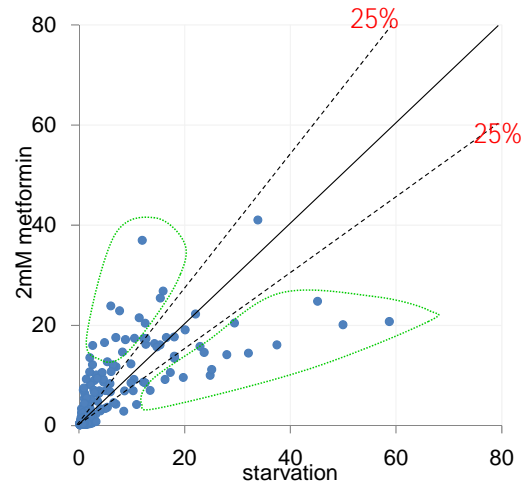
リン酸化のしきい値を3000

その他探索したすべてのキナーゼに対する基質についても、そのピックアップされた基質のアミノ酸配列をウェブプロゴ表示すると、すでに示唆されている各々のキナーゼに対する基質のコンセンサス配列と一致しており、妥当な基質が探索できたことが示唆された。

次に、得られた基質のセットを用いて、マイクロアレイを作成し、実際に細胞に薬物を投与した際のキノーム変化を検証した。まず、HepG2 細胞を用い、メトフォルミンを投与の有無によるキノーム変化を調べた。細胞を飢餓状態に置き、AMPK パスウェイを活性化した際と、正常状態でのアレイ上でのリン酸化効率を個々の基質で比較した。飢餓によりリン酸化が亢進する基質が見出され、これらは予想通り、AMPK パスウェイの活性化を示していると評価できた。

次に、飢餓状態においてメトフォルミンを

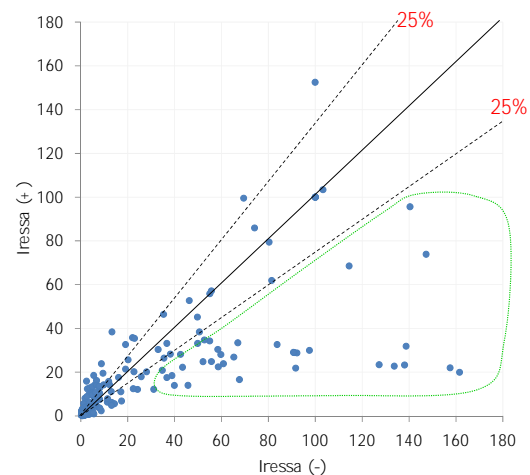
投与した場合と、投与のない場合でのキノームを比較した結果が下図である。



メトフォルミンの投与によるキノーム変化

この場合、メトフォルミン刺激により、リン酸化がむしろ亢進する基質群と、リン酸化が低下する基質群があり、AMPK パスウェイが亢進される一方、抑制されるパスウェイが示唆された。このキノームプロフィールは、メトフォルミンの薬効そのものを表現していると考えられ、このプロフィールを基にして、同様のプロフィールを与える薬物を探索することで、同様の薬品を探索可能であると期待される。亢進された基質は、いずれも確かに AMPK キナーゼ経路に関する基質であり、得られた結果は妥当なものであるといえる。

分子標的型抗がん剤であるイレッサの刺激に伴うキノーム変化も評価した。結果を以下に示す。イレッサ感受性の HCC827 細胞を



イレッサ投与前後でのキノーム比較

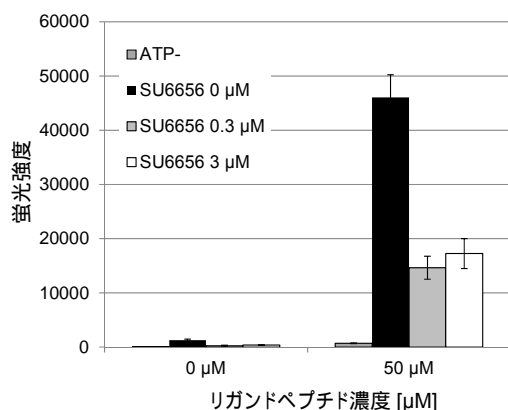
用い、種々の濃度で刺激し、無刺激の場合のキノームと比較した。本細胞でのイレッサの IC50 より高濃度の 300 nM のイレッサで刺激すると、図のように多くの EGFR 関連パスウェイの基質群のリン酸化が低下し、正確にイレッサの薬効を表現できることがわかった。

これらの結果を踏まえ、種々の EGFR 阻害

方制癌剤のキノーム比較を試みた。すなわち、EGFR に特異的な阻害薬と、HER2 に選択的な阻害薬、および双方を阻害する薬剤について4種類の阻害剤を評価した。その結果、阻害剤の特異性を評価可能であることが示され、本ペプチドアレイが、制癌剤の効果を評価可能なツールであることを実証することができた。

しかしながら、チロシンキナーゼの場合には、基質間の配列が似通っており、基質のリン酸化のみから明確に作用したキナーゼを絞り込むことが困難であることも分かってきた。このことを解決するには、基質の配列の更なる探索では限界があると予想され、他の方法論を検討する必要があると示唆された。そこで、Src、Abl、JAK の3種のチロシンキナーゼをもとに、それぞれに相互作用するSH2ドメインの相互作用面に必須のアミノ酸配列をもとに、それぞれのキナーゼと結合できるペプチドを開発した。例えば、次に示す図は、Src に対する相互作用ペプチドを基質ペプチドと共固定した場合と、基質ペプチドの場合とのリン酸化シグナル、および Src 阻害剤刺激時のリン酸化シグナル変化である。図から明らかなように、相互作用ペプチドの濃度を最適化することで、大きな感度の上昇と、特性の向上を実現することに成功した。同様の結果は、JAK や Abl でも得られ、本方法論がチロシンキナーゼのアレイ上での特異性確保に一般性のあるものであることを示すことができた。

以上のように、本研究により、制癌剤の作用機序を踏まえながら、その効果の予測を可能とするペプチドマイクロアレイを開発することに成功した。



リガンドペプチドによるリン酸化効率の増強の例 (Src)

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9件)

T. Nobori, S. Shiosaki, T. Mori, R. Toita, C-W. Kim, Y. Nakamura, A. Kishimura, T. Niidome,

Y. Katayama, Fluorescent Polyion Complex Nanoparticle That Incorporates an Internal Standard for Quantitative Analysis of Protein Kinase Activity, *Bioconjugate chemistry*, 25, 869-872 (2014)

doi: 10.1021/bc500142j

H. Ikeda, Y. Yayama, A. Hata, J. Kamimoto, T. Yamamoto, T. Mori, Y. Katayama, PNA-tagged peptide microarrays for ratiometric activity detection of cellular protein kinases, *Anal. Sci.* 30, 631-635 (2014)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24919666>

D. Asai, R. Toita, M. Murata, H. Katayama, Y. Nakashima, and J.H. Kang, Peptide substrates for G protein-coupled receptor kinase 2, *FEBS Lett.*, 588, 2129-2132 (2014)

doi:10.1016/j.febslet.2014.04.038

J.H. Kang, R. Toita, D. Asai, T. Yamaoka, and M. Murata, Liver cell-specific peptides derived from the PreS1 domain of human hepatitis B virus, *J. Virol. Methods*, 201, 20-23 (2014)

doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.013

Otsubo Y., Ikeda H., Kamimoto J., Niidome T., Mori T., Katayama Y., A rapid and quantitative detection of cellular protein kinase activity based on MALDI-TOF-MS, *Chem. Lett.* doi:10.1246/cl.131227 (2014)

S. Shiosaki, T. Nobori, T. Mori, R. Toita, Y. Nakamura, C. W. Kim, T. Yamamoto, T. Niidome, Y. Katayama, A protein kinase assay based on FRET between quantum dots and fluorescently-labeled peptides, *Chem. Commun.*, 49, 5592-5594 (2013)

doi: 10.1039/c3cc41680a

H. Ikeda, J. Kamimoto, T. Yamamoto, A. Hata, Y. Otsubo, T. Niidome, M. Fukushima, T. Mori, Y. Katayama, A peptide microarray fabricated on a non-fouling phosphatidylcholine-polymer-coated surface for a high-fidelity analysis of a cellular kinome, *Current Med Chem.* 20, 4419-25 (2013)

<http://dx.doi.org/10.2174/09298673113209990142>

H. Kitazaki, T. Mori, J-H. Kang, T. Niidome, M. Murata, M. Hashizume, Y. Katayama, A colorimetric assay of protein kinase activity based on peptide-induced coagulation of gold nanorods, *Coll. Surf. B*, 99,7-11(2012)

doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.08.028

[学会発表](計31件)

Yoshiki Katayama, How we can access to

cancers? ~Development of cancer treatment strategies using cell signal engineering~, Biomedical Engineering Seminar, 2015年03月18日, Mahidol University, Thailand

Yoshiki Katayama, Small Molecule that Exerts a Similar Activity to Antibody Drug, JSPS A3 Foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine, 東京女子医科大学, 2014年10月09日

Yoshiki Katayama, Design of Highly Cancer Cell Specific Gene Delivery System using Intracellular Signal-Responsive Gene Regulation Carrier, The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, Chang Gung University, Taiwan, 2014年08月28日

Yoshiki Katayama, Design of Molecular Systems for Modulation of Immune System, 2014 CYCU Biomaterials Summer Workshop, Chung Yuan Chroistian University, Taiwan, 2014年08月27日

Yoshiki Katayama, Intracellular Signal-Responsive Carriers as New Strategy to Secure Cell Specificity in Tumor Gene Delivery, Controlled Release Society Annual Meeting and Exposition, Hilton Chicago, USA, 2014年07月14日

Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responsive gene regulation delivery to address recent problem in cancer targeting, A3 Foresight Symposium, Sichuan University, China, 2013年12月18日

池田 広夢, 石田 郁実, 山本竜広, 森 健, 岸村 顕広, 片山 佳樹、非特異吸着作用を持つペプチドアレイを用いた細胞内プロテインキナーゼ活性の検出、第36回日本分子生物学会年会、神戸国際交流会館、2013年12月03日

Eunkeon Lee, Takeshi Mori, Tatsuhiro Yamamoto, Akihiro Kishimura, Yoshiki Katayama, Disease signal-responsive siRNA: Silenced siRNA awakened by cellular protease, 2013 Kyushu-Seibu/Pusan-Kyeongnam Joint Symposium on High Polymers (16th) and Fibers (14th), 佐賀大学本庄キャンパス, 2013年11月09日

Yoshiki Katayama, Cell signal-responsive gene regulation delivery for tumor-specific therapy and imaging, International Symposium on Theranostics Nanomolecules (Fall Meeting, Polymer Society of Korea), Changwon Exhibition Convention Center, Korea, 2013年

10月10日

Yoshiki Katayama, Cell signal-responsive gene delivery for tumor-specific theranostics, 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Korea Institute Science and Technology, 2013年10月08日

石田 郁実, 池田 広夢, 大坪裕紀, 山本竜広, 岸村 顕広, 森 健, 片山 佳樹、ペプチドマイクロアレイによる細胞内シグナル関連プロテインキナーゼの活性検出、第7回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学、2013年09月27日

大坪裕紀, 河村明, 山本竜広, 加藤昌彦, 志波公平, 池田 広夢, 森 健, 岸村 顕広, 片山 佳樹、キノーム解析に向けたプロテインマイクロアレイ技術の開発、名古屋大学、2013年09月27日

Ikumi Ishida, Hiromu Ikeda, Yuki Otsbo, Tatsuhiro Yamamoto, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Development of kinome peptide microarray as a tool for drug development, ASIANALYSIS XII The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences, Kyushu University, 2013年08月22日

Hiromu Ikeda, Ikumi Ishida, Tatsuhiro Yamamoto, Takeshi Mori, Akihiro Kishimura, Yoshiki Katayama, Peptide Microarray for Analyzing Intracellular Protein Kinome, ASIANALYSIS XII The Twelfth Asian Conference on Analytical Sciences, Kyushu University, 2013年08月22日

石田郁実, 池田広夢, 大坪裕紀, 山本竜広, 森 健, 岸村 顕広, 片山 佳樹、新規薬剤探索のためのペプチドマイクロアレイ、第31回九州分析化学若手の会夏季セミナー、長崎ホテル清風、2013年07月26日

大坪裕紀, 河村明, 山本竜広, 加藤 昌彦, 志波公平, 池田広夢, 森 健, 岸村 顕広, 片山 佳樹、プロテインマイクロアレイによるキナーゼ活性の網羅的測定法の開発、第31回九州分析化学若手の会夏季セミナー、長崎ホテル清風、2013年07月26日

Yoshiki Katayama, Satoyuki Kushio, Akira Tsuchiya, Takuro Niidome, T. Mori, pH-Sensitive PEG-modification onto cell signal-responsive polyplex for improved colloidal stability and cell specificity in gene delivery, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Hawaii Convention Center, 2013年07月21日

石田郁実, 池田広夢, 大坪裕紀, 山本竜広, 森 健, 岸村 顕広, Takuro Niidome, 片山佳樹、創薬ツールとしてのキノーム解析用ペプチドアレイ、第 50 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2013 年 07 月 06 日

池田広夢, 石田郁実, 山本竜広, 森 健, 岸村 顕広, 片山 佳樹、ペプチドアレイによる細胞内プロテインキナーゼ活性の同時測定、第 50 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2013 年 07 月 06 日

Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responsive gene regulation delivery to address recent problem in cancer targeting, 2013 Global Innovation Research Center Symposium, Korea Institute of Science and Technology, 2013 年 07 月 02 日

片山佳樹、ペプチドノ高分子材料を用いる疾患特異的医療システムの創製、日本学術振興会・分子ナノテクノロジー第 174 委員会 研究会、東京、2012 年 12 月 14 日

片山佳樹、創薬及び診断のためのキノーム解析用ペプチド・プロテインアレイ、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012 年 12 月 11 日

片山佳樹、創薬・診断・リスク評価のための細胞機能評価用バイオチップ、福岡新テクノロジー創成シンポジウム、福岡市産学連携センター、2012 年 11 月 27 日

片山佳樹、診断・創薬のための新しい細胞シグナルセンシング、日本分析化学会第 61 年会、金沢大学角間キャンパス、2012 年 09 月 19 日

Yoshiki Katayama, New methodologies for evaluation of cellular signaling for drug discovery and diagnostics, The workshop on advanced nanomaterials for biomedical application, Chung Yuan Christian University, Taiwan, 2012 年 08 月 28 日

Yoshiki Katayama, Cellular signal-responsive molecular system for disease cell-specific gene delivery and imaging., The 2nd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, Taipei Medical University, Taiwan, 2012 年 08 月 29 日

Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responding materials for new strategy of cell-specific gene delivery and in vivo imaging of disease functions, The 1st International Symposium on Polymer Ecomaterials, Changchun Institute of Applied Chemistry,

China, 2012 年 08 月 20 日

Shujuro Shisaki, Masanori Kuramoto, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Protease imaging system by using polyion-complex and its application to prostate cancer, 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, The Centre des Congres de Quebec City, Canada, 2012 年 07 月 17 日

大坪裕紀、森健、新留琢郎、片山佳樹、MALDI-TOF-MSを用いる迅速なプロテインキナーゼ活性測定法の開発、第 49 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、2012 年 06 月 30 日

大坪裕紀、森健、新留琢郎、片山佳樹、新規ペプチドのアフィニティー精製および細胞内プロテインキナーゼ活性のMALDI-TOF-MSによるディファレンシャル計測、第 72 回分析化学討論会、鹿児島大学工学部、2012 年 05 月 20 日

池田広夢、森健、新留琢郎、片山佳樹、ペプチドアレイによる投薬前診断を目指した多種キナーゼ活性の同時検出、第 72 回分析化学討論会、鹿児島大学工学部、2012 年 05 月 20 日

〔図書〕(計 1 件)
片山佳樹、アレイチップでのセンシング(バイオセンシング・バイオイメージングのニュートレンド)、化学同人、2012 年 7 月

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 佳樹 (KATAYAMA YOSHIKI)
九州大学大学院工学研究院・教授
研究者番号：70284528

(2) 研究分担者

森 健 (MORI TAKESHI)
九州大学大学院工学研究院・准教授
研究者番号：70335785

浅井 大輔 (ASAI DAISUKE)
聖マリアンナ医科大学微生物学教室・助教
研究者番号：10423485

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENOKI)
九州大学大学院医学研究院・講師
研究者番号：20452708