

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659622

研究課題名(和文)リン酸化プロテオミクスを用いた進行大腸癌分子標的薬効果予測バイオマーカー探索

研究課題名(英文)Discovery of predictive biomarkers for molecular target drug effectiveness of advanced colorectal cancer using phosphoproteomics

研究代表者

朝長 毅 (Tomonaga, Takeshi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：80227644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：適切な個別化医療の実践のためには、分子標的薬の効果を予測し、患者の選別を行う必要がある。薬効は、標的分子が関与する増殖シグナルの活性化状態に依存するが、その活性化の指標として、細胞内タンパク質リン酸化が重要である。

本研究では、網羅的なタンパク質リン酸化定量法の確立およびその手法を用いた大腸癌分子標的薬の薬効予測バイオマーカーの同定を目的とした。従来のリン酸化プロテオミクス法に改良を加えた結果、世界最高レベルのリン酸化ペプチドの同定に成功した。また、抗EGFR抗体薬に対する感受性にEGFRシグナルパスウェイの下流に存在するPDPK1キナーゼの活性化が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For practice of personalized medicine, prediction of molecular target drug effectiveness and selection of sensitive patients to the drug are needed. Effect of drug depends on the activity of growth signals in which the drug is involved. Protein phosphorylation plays a crucial role for the activity of growth signals.

We aimed at establishment of comprehensive quantitation method for phosphoproteins and discovery of predictive biomarkers for molecular target drug effectiveness of advanced colorectal cancer using the method. We modified previous phosphoproteomics technologies and succeeded in identification of 30000 phosphopeptides in one experiment. This is the largest study of phosphoproteomics identification to date. We also showed that activity of PDPK1 kinase, a kinase downstream of EGFR signaling pathway, might be involved in sensitivity of an anti-EGFR antibody drug Cetuximab.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：リン酸化プロテオミクス 分子標的薬 バイオマーカー 薬効予測 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

一昔前までは、大腸癌は化学療法が効かない癌と考えられていたが、近年、新しい分子標的薬である抗 VEGF、EGFR 抗体薬が登場したことにより、進行大腸癌の生存期間が著明に延びた。

しかし、これらの分子標的薬は効果のある患者とない患者がはっきりしており、選別が非常に重要である。その選別を誤ると、治療が必要な患者さんを見逃してしまったり、無駄な治療で患者さんの苦痛を与えてしまう。また、分子標的薬は非常に高価であるため、我が国の医療費を圧迫しかねない。現在の選別の指標として、KRAS 遺伝子が正常であれば抗 EGFR 抗体薬が適用と診断されるが、KRAS 野生型でも約半数はほとんど効果が認められない。

従って、薬剤の効果予測は一つの遺伝子で決めるべきではなく、多因子評価をすべきである。特に EGFR はチロシンキナーゼあり、それらの下流のシグナル伝達の状態が薬剤感受性に関わることは容易に予想され、そのシグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質は薬剤効果予測の画期的なバイオマーカーになりうる。これはゲノムや mRNA を調べても分からない。これが、申請者がリン酸化プロテオミクスを用いた薬剤効果予測マーカー探索の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

本研究では、抗 EGFR 抗体薬感受性の異なる大腸癌細胞株および大腸癌手術組織を用いた比較定量リン酸化プロテオーム解析により、抗 EGFR 抗体薬効果予測マーカー因子の同定、機能解析を行う。また、超高感度プロテオミクスを用いたマーカー因子定量法を確立し、薬剤効果予測に対する有用性について検討する。

3. 研究の方法

1. IMAC と抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用した網羅的リン酸化ペプチド同定法の確立 (図 1)

細胞中の微量なリン酸化タンパク質のプロテオーム解析のためには、試料中からリン酸化ペプチドを濃縮して回収する必要があるが、本研究では Fe³⁺イオンとリン酸基の親和性を利用した Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) 法を用いてリン酸化ペプチドの濃縮を行った。タンパク質総量 1mg につき 250 μl の IMAC レジンを用いた。細胞抽出液をトリプシンなどで酵素消化した後に、IMAC レジンでリン酸化ペプチドを濃縮、60% アセトニトリル/0.1% TFA 溶液で洗浄後、1% リン酸溶液でリン酸化ペプチドを溶出した。その後、濃縮されたサンプルを、C18 逆相カラムを用いアルカリ条件下で HPLC 分画を行った。移動相には 20mM ギ酸アンモニウム/アセトニトリル (2%から 90%の濃度勾配)を用いた。

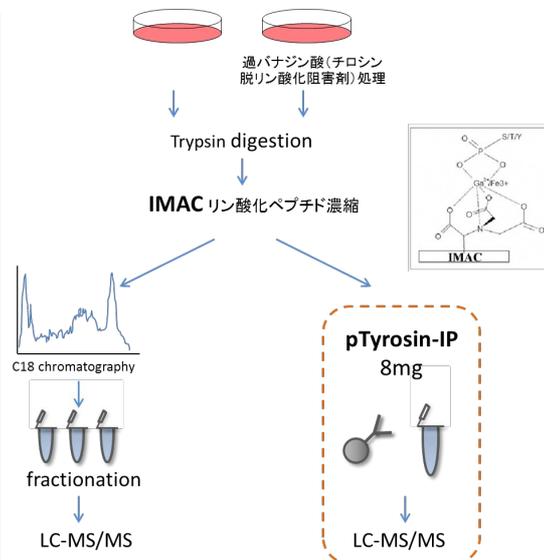


図1 IMACと抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用した網羅的リン酸化ペプチド同定法

またチロシンリン酸化ペプチドの濃縮のため、IMAC 法に加えて抗チロシン抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降にはタンパク質総量 8mg に対して、異なる 3 種類の抗体 50μg を ProteinG ビーズに付加して行った。ペプチドの溶出には 60%アセトニトリル/0.1% TFA を用いた。その後、リン酸化ペプチドと共に溶出された抗体の除去のため、IMAC 法による再精製を行った。また、細胞培地中に 1mM の過バナジジン酸(チロシン脱リン酸化阻害剤)を加えて細胞を 30 分間処理をすることで、内在性のチロシンのリン酸化を増強させた。

2. リン酸化プロテオミクスを用いた大腸癌薬剤効果予測バイオマーカーの探索

抗 EGFR 抗体薬感受性の異なる複数の大腸癌細胞株を抗 EGFR 抗体で処理し、変動するリン酸化タンパク質について、薬剤感受性株と耐性株との間で比較した。

リン酸化タンパク質発現の細胞株間の発現の違いは、比較したいサンプルをそれぞれ異なる同位体でラベルする SILAC 法または iTRAQ 法を用いて行った。その上で、上記の網羅的リン酸化ペプチド同定法を用いて薬剤効果予測バイオマーカーの探索を行った。

3. 薬剤効果予測マーカー候補タンパク質の検証

上記の探索で見つかった薬剤効果予測マーカー候補タンパク質を検証した。そのタンパク質に対する抗体があるものに対しては、ウェスタンブロットや組織免疫染色を用いた検証を行った。抗体の入手できないタンパク質に対しては、質量分析計を用いた検証法 (SRM/MRM 法)で検証できるかどうか検討した。

4. 研究成果

1. IMAC と抗チロシン抗体を用いた免疫沈

降法を併用したリン酸化ペプチドの網羅的解析 (表 1)

リン酸化ペプチドの網羅的な定量において、IMAC 濃縮後の HPLC 分画の改良により、約 30,000 個のペプチドの定量化が可能となった。またチロシンリン酸化ペプチドは、全リン酸化ペプチドの 1% 程度しか存在しないとされているが、IMAC 法に加えて、抗チロシン抗体による免疫沈降法を行うことで、8mg の細胞抽出液を用いた場合、1 時間の解析時間で 466 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定が可能となった。これは従来の IMAC 法単独の場合と比較しても 2 倍の同定率である。さらに過バナジン酸処理でチロシンの脱リン酸化を阻害させることで、1416 個のチロシンリン酸化ペプチドの同定に成功した。

表 1 IMAC と抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用したリン酸化ペプチドの網羅的解析

Cell line	Enrichment	過バナジン酸処理	pY	P-S,T,Y	pY / p-S,T,Y
BT549 (12mg)	IMAC	-	203	29778	0.68%
HT29 (8mg)	IMAC +pY-IP	-	466	547	85.1%
DLD1 (8mg)	IMAC +pY-IP	+PV (1mM)	1416 peptide	1417 peptide	99.9%

2. リン酸化プロテオミクスを用いた大腸癌薬剤効果予測バイオマーカーの探索

抗 EGFR 抗体薬感受性の異なる複数の大腸癌細胞株を抗 EGFR 抗体で処理し、変動するリン酸化タンパク質について、薬剤感受性株と耐性株との間で比較した。

上記の網羅的リン酸化ペプチド解析法を用いて、20,000 個以上のリン酸化ペプチドが同定でき、そのうち数百個のリン酸化ペプチドが薬剤感受性株と耐性株間で共通の発現変動を示した。

3. 薬剤効果予測マーカー候補タンパク質の検証 (図 2)

上記の探索で見つかった薬剤効果予測マーカー候補タンパク質を検証した。そのタンパク質に対する抗体があるものに対しては、ウエスタンブロットを用いた検証を行った。

EGFR 下流のパスウェイ上のキナーゼに絞ってウエスタンブロットを行ったところ、リン酸化 PDPK1 は抗 EGFR 抗体薬耐性株に比して、感受性株で発現が増大していることが示された。このことから、PDPK1 キナーゼの活性化が抗 EGFR 抗体薬の感受性に関与していることが示唆された。

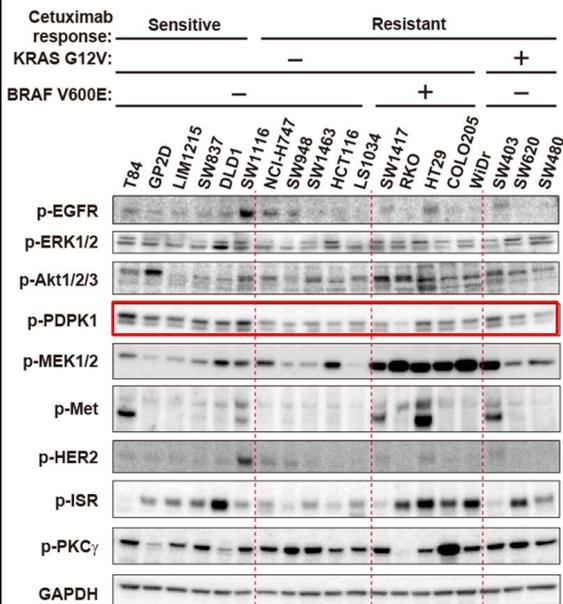


図 2 薬剤効果予測マーカー候補タンパク質の検証
セツキシマブ感受性株は耐性株に比べて、リン酸化 PDPK1 の発現増大が認められた。

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 11 件)

1. Kume H., Muraoka S., Kuga T., Adachi J., Narumi R., Watanabe S., Kuwano M., Koderia Y., Matsushita K., Fukuoka J., Masuda T., Ishihama Y., Matsubara H., Nomura F., and Tomonaga T. (2014) Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* in press.
2. Kuga, T., Nie H., Kazami T., Satoh M., Matsushita K., Nomura F., Maeshima K., Nakayama Y., and Tomonaga T. (2014) Lamin B2 prevents chromosome instability by ensuring proper mitotic chromosome segregation. *Oncogenesis* in press.
3. Sano S., Tagami S., Hashimoto Y., Yoshizawa-Kumagaye K., Tsunemi M., Okochi M., and Tomonaga T. (2014). Absolute quantitation of low abundance plasma APL16 peptides at sub fmol/mL level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J Proteome Res* in press.
4. Yamaguchi S., Zhang B., Tomonaga T., Seino U., Kanagawa A., Segawa M., Nagasaka H., Suzuki A., Miida T.,

- Yamada S., Sasaguri Y., Doi T., Saku K., Okazaki M., Tochino Y., and Hirano K. (2014) Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique. *J Lipid Res* in press.
5. Kuga, T., Kume, H., Kawasaki, N., Sato, M., Adachi, J., Shiromizu, T., Hoshino, I., Nishimori, T., Matsubara, H., and Tomonaga T. (2013). A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I alpha and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci* 126, 4721-31.
 6. Aoyama K., Yuki R., Horiike Y., Kubota S., Yamaguchi N., Morii M., Ishibashi K., Nakayama Y., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., and Yamaguchi N. (2013). Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase. *Exp Cell Res* 319, 3251-68.
 7. Kubota, S., Fukumoto, Y., Aoyama, K., Ishibashi, K., Yuki, R., Morinaga, T., Honda, T., Yamaguchi, N., Hashimoto, Y., Kuga, T., Tomonaga T., and Yamaguchi, N. (2013). Phosphorylation of KRAB-associated Protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by Nuclear Tyrosine Kinases Inhibits the Association of KAP1 and Heterochromatin Protein 1alpha (HP1alpha) with Heterochromatin. *J Biol Chem* 288, 17871-17883.
 8. Muraoka, S., Kume, H., Adachi, J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T., Ishihama, Y., and Tomonaga T. (2013). In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. *J Proteome Res* 12, 208-213.
 9. Shiromizu, T., Adachi, J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S., and Tomonaga T. (2013). Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J Proteome Res* 12, 2414-2421.
 10. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Adachi J, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Kodera Y, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Tomonaga T. (2012). A strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J Proteome Res* 11, 4201-4210.
 11. Narumi R, Murakami T, Kuga T, Adachi J, Shiromizu T, Muraoka S, Kume H, Kodera Y, Matsumoto M, Nakayama K, Miyamoto Y, Ishitobi M, Inaji H, Kato K, Tomonaga T. (2012). A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples. *J Proteome Res* 11, 5311-5322.
- 〔学会発表〕(計 31 件)
平成 25 年度
1. 朝長 毅：質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化 . 第 11 回 北里疾患プロテオミクス研究会 神奈川, 2014 年 3 月 28 日
 2. 足立 淳、朝長 毅：ターゲットプロテオミクス ~ Beyond SRM ~ . 第 86 回 日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 13 日
 3. 朝長 毅：質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化への挑戦 . 第 10 回 千葉疾患プロテオミクス研究会, 東京, 2013 年 11 月 9 日
 4. 村岡 賢, 久米秀明, 西塚 哲, 若林剛, 星野 敢, 松原久裕, 朝長 毅：自己抗体ファージライブラリを用いたスキルス胃癌の診断バイオマーカーの探索 第 72 回日本癌学会学術総会 横浜, 2013 年 10 月 3-5 日
 5. 白水 崇、足立 淳、八木 滋雄、朝長 毅：マウス同所移植モデルによる大腸癌高浸潤性細胞のプロテオーム解析 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013 年 10 月 3-5 日
 6. 久家 貴寿, 久米 秀明, 川崎 直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原 久裕, 齊藤 洋平, 中山 祐治, 朝長 毅：大腸癌細胞における FAM83H と casein kinase Iα を介したケラチン骨格制御機構の解明 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日
 7. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T. ATP Accessibility Screening (AAS), A High-Throughput and High-Resolution Kinase Analysis Platform for Signaling Research. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 8. Kume H, Muraoka S, Hashimoto Y, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Fukuoka J, Kodera Y, Matsushita K, Matsubara H, Tomonaga T. Discovery and subsequent validation of biomarkers

- for colorectal cancer by large-scale proteomic analysis and tissue microarray analysis. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
9. Shiromizu T, Adachi J, Yagi S, Hoffman RM, Tomonaga T. Proteomic Analysis of Highly Invasive Colorectal Cancer Cells Established by Orthotopic Xenograft Mouse Model. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 10. Muraoka S, Kume H, Saitoh H, Enomoto Y, Ito Y, Nishizuka S, Wakabayashi G, Hoshino I, Matsubara H, and Tomonaga T. Development of High-throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhous Gastric Cancer Biomarker. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 11. Hashiguchi K, Muraoka S, Adachi J, Sato M, Kuga T, Watanabe R, Shiromizu T, Hashimoto Y, Nagano M, Kishida M, Tomonaga T. Quantitative Phosphoproteome Analysis of Cultured Stomach Cancer Cell Lines Aimed at Development of Biomarkers for Prediction of Drug Efficacy. Human Proteome Organization (HUPO) 12th annual world congress, Yokohama, Japan, 14-18 Sep, 2013.
 12. Sato M, Adachi J, Tomonaga T. Quantitative Proteome Analysis with Isotope Dimethyl Labeling to Identify TGF-beta-mediated Tumor Proteins Using the Metastatic Mouse Breast Cancer Model. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 13. Watanabe R, Hashimoto Y, Kishida M, Matsubara M, Adachi J, Tomonaga T. Phospho-profiling of mTOR inhibitor-treated renal cell carcinoma (RCC) cell lines and its application for drug response-efficacy biomarkers. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 14. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Matsubara H, Tomonaga T. A Novel Mechanism of Keratin Cytoskeleton Organization Through Casein Kinase I Alpha and FAM83H in Colorectal Cancer: Interactome Analysis of FAM83H. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 15. Sano S, Tagami S, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M, Tomonaga T. Absolute quantitation of plasma biomarker peptides APL1b for Alzheimer disease at fmol/ml level using SRM. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
 16. Nagano M, Kuga T, Adachi J, Tomonaga T. A Kinase Activity-Estimating Method Using LC-MS/MS. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
- 平成 24 年度
1. 朝長 毅: 最近のプロテオミクス技術の進歩とがん研究への応用. 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 千葉, 2012 年 4 月 14 日
 2. 朝長 毅: 真のバイオマーカーの発見を目指して. 第 10 回日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日.
 3. 朝長 毅: 疾患プロテオミクスの基礎と Human Proteome Project. 第 19 回日本遺伝子診療学会, 千葉, 2012 年 7 月 26-28 日.
 4. 朝長 毅: プロテオミクスを用いた新規腫瘍マーカーの探索と実用化. 第 32 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 札幌, 2012 年 9 月 18 日.
 5. 久米秀明, 村岡賢, 小寺義男, 松下一之, 松原久裕, 朝長毅: 大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索とその検証. 第 71 回日本癌学会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
 6. 村岡 賢, 久米秀明, 足立 淳, 宮本 泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: A strategy for validation of biomarker candidates combining iTRAQ and SRM/MRM assay in breast cancer tissue samples. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
 7. 久家貴寿, 久米秀明, 足立淳, 星野敢, 松原久裕, 朝長毅: オミックス技術を駆使した新規大腸癌関連タンパク質の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
 8. 足立淳, 久家貴寿, 白水崇, 久米秀明, 村岡賢, 中山敬一, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 日
 9. 村上達夫, 久家貴寿, 足立淳, 白水崇, 中山敬一, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長毅: ヒト乳がん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM を

- ベースにした検証法.第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
10. 白水崇, 足立淳, 朝長毅 “Proteomic analysis of highly metastatic colorectal cancer cells established from orthotopic metastatic mouse model.” 第71回日本癌学会学術総会 北海道, 2012年9月19-21日
 11. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 12. Adachi J, Kuga T, Shiromizu T, Kume H, Muraoka S, Hashiguchi K, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T “Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling” HUPO2012 11th World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.
 13. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based systematic validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in breast cancer tissue samples.” HUPO2012 11th World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.
 14. Shiromizu T, Adachi J, Tomonaga T “Quantitative proteomic profiling of orthotopic xenograft mouse model of colorectal cancer metastasis.” HUPO2012 11th World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.
 15. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y Tomonaga T “ATP Accessibility Screening (AAS), a high-throughput and high-resolution kinase analysis platform for signaling research” 2nd Copenhagen Bioscience Conference, Copenhagen, Denmark, 2-5 December, 2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nibio.go.jp/proteome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝長 毅 (TOMONAGA TAKESHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部
プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号: 80227644