

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：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790184

研究課題名(和文) 抗EGFR抗体薬の大腸癌治療効果予測を可能にするリン酸化バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Discovery of protein phosphorylation markers to predict the efficacy of anti-EGFR antibody drugs in colorectal cancer patients

研究代表者

久家 貴寿(Kuga, Takahisa)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：20551857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：抗EGFR抗体薬は転移性大腸がんで使用されているが、EGFRシグナル伝達経路が、EGF非依存的に活性化している患者では効果がない。このEGFRシグナル経路異常は、KRAS遺伝子変異検査により検出されているが、KRAS遺伝子が正常でも半数以上は奏功しない。本研究では、EGFRシグナル関連キナーゼの包括的活性測定が抗EGFR抗体薬の効果予測の改善に繋がる可能性を示した。その他、抗EGFR抗体薬の新規作用機構を示した。

研究成果の概要(英文)：Anti-EGFR antibody drugs have been approved for metastatic colorectal cancer (mCRC) therapy, but the drugs are ineffective for CRC exhibiting EGF-independent activation of the EGFR signaling pathway. Although a part of the patients with the aberrant EGFR signaling can be detected by the KRAS mutation testing, further improvement of the method detecting the EGFR signaling-aberrant patients is needed. In this study, using colorectal cancer cell lines, we examined whether comprehensive analysis of activation levels of kinases related to the EGFR signaling could potentiate to predict the efficacy of the anti-EGFR drugs. In addition, I found a novel mechanism by which the anti-EGFR drugs inhibit proliferation of CRC cells. This study showed several biomarker candidates to predict the efficiency of the anti-EGFR antibody drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

抗 EGFR 抗体薬は転移性大腸がんの治療薬として承認されているが、EGFR シグナル伝達経路が、EGF 非依存的に活性化している大腸がんでは効果が得られない。EGFR シグナル経路に異常を持つ患者の一部は、KRAS 遺伝子変異検査で発見する事ができる。しかし、KRAS 遺伝子が正常でも、過半数の患者では抗 EGFR 抗体薬が効かない事が分かっている。したがって、さらなる予測精度の改善が望まれていた。

EGFR シグナル経路では、B-raf、Mek、Erk、Akt などのキナーゼが中心的な役割を担っている。KRAS 遺伝子変異は B-raf、Akt の活性化を介して抗 EGFR 抗体薬の耐性を引き起こす事が明らかになっており、B-raf の恒常的活性化遺伝子変異が抗 EGFR 抗体薬の耐性化の原因になる事も分かっていた。しかし、実際に、それらキナーゼの活性測定が抗 EGFR 抗体薬の効果予測法になりえるのかどうかは明らかにされていなかった。

また、抗 EGFR 抗体薬がどのようにして抗がん作用を発揮しているのか、と言う点についても未だに不明な点が多かった。大腸がん培養細胞に抗 EGFR 抗体薬を添加しても、一見、増殖抑制効果は小さく、臨床での効果を十分に説明する事はできていなかった。抗 EGFR 抗体薬の抗がん作用の仕組みを明らかにすることは、抗 EGFR 抗体薬の効果予測バイオマーカーを開発するうえで重要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR シグナル経路に関連するキナーゼの活性化状態を包括的に調べる事で、抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能かどうかを検討した。加えて、抗 EGFR 抗体薬の抗がん作用機構の解明を目的とした研究も行った。これらの結果に基づいて、新たな抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法を開発する事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん培養細胞株のキナーゼ活性プロファイリング

大腸がん培養細胞株を、抗 EGFR 抗体薬に対する感受性に基づき分類し、それら細胞株のキナーゼ活性プロファイル調べた。そして、そのプロファイルから、抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能かどうかを考察した。

抗 EGFR 抗体薬に対する感受性は、WST-8 試薬を用いた細胞増殖抑制試験で調べた。大腸がん培養細胞株 24 種類を、それぞれ 2000 ~ 6000 個 96 穴プレートに撒き、0、0.5、5、50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で抗 EGFR 抗体薬セツキシマブを添加し、72 時間細胞を培養した。その後、コントロール (0 $\mu\text{g/ml}$) の増殖を 1 とした時の増殖抑制率を計算した。耐性株に関しては、KRAS G12V 変異型、BRAF V600E

変異型、それ以外に細分類した。

キナーゼの活性化状態は、約 40 種類の活性化型キナーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法で行った。

(2) 抗 EGFR 抗体薬の作用メカニズム解析

細胞間接着に依存した細胞増殖抑制に関する解析

大腸がん培養細胞株を培養ディッシュ上で培養すると、盛んに細胞増殖が起こり、やがて、培養ディッシュの一面が細胞で覆われる。その後も、細胞増殖に必要な因子を嫌氣的代謝で作り返す事で、培地は酸性化し、培地中のフェノールレッドが黄色を呈するようになる。セツキシマブを添加した条件下でも同様に培養ディッシュの一面を覆うまでがん細胞が増殖を続けたが、その後、培地が黄色を呈する事は無かった。この結果は、セツキシマブ添加時では、細胞が密な状態になると細胞増殖が停止する事を示唆していた。

正常な上皮細胞では細胞同士が接着すると、それが刺激となり細胞増殖が停止する。一方、がん細胞では、この細胞間接着依存性の細胞増殖抑制機構が破綻している。そのため、細胞間接着形成後も、がん細胞は引き続き盛んに増殖する。この事と上述のセツキシマブの効果とを勘案すると、セツキシマブによって、がん細胞の、細胞間接着に依存した細胞増殖抑制作用が回復するという仮説が立てられた。

上述の仮説を明らかにするための実験を行った。抗 EGFR 抗体薬感受性の大腸がん細胞株である DLD1 細胞と Caco-2 細胞を、培養ディッシュの一面を覆うまで培養した。その際、セツキシマブの添加が、細胞密度、細胞増殖にどのような影響を与えるのかを調べた。細胞密度は顕微鏡観察で調べ、細胞増殖は細胞数計数法や BrdU 取込み解析で行った。

プロテオーム解析

上述の解析により、セツキシマブは細胞間接着に依存した細胞増殖抑制機構を回復させている事が明らかになる。そこで、その回復機構を分子レベルで明らかにするために、プロテオーム解析を行った。

異なる細胞密度の条件下 (40 ~ 50% vs 80 ~ 90%) にある DLD1 細胞と Caco2 細胞にセツキシマブを添加し、その細胞からタンパク質を抽出した。また、セツキシマブを添加していない時の細胞抽出液も同時に作成した。これらの検体を、iTRAQ 法を使って、定量的大規模タンパク質発現解析を行った。細胞密度が高い時に、セツキシマブで抑制もしくは誘導されるタンパク質を、細胞接着に依存して細胞増殖を抑制する因子候補とした。

4. 研究成果

(1) 大腸がんキナーゼ活性プロファイリングによる抗 EGFR 抗体薬の効果予測

セツキシマブ感受性株 5 種、耐性株 13 種 (KRAS、BRAF 両野生型、5 種; KRAS G12V 型、3 種; BRAF V600E 型、5 種) のキナーゼ活性プロファイリングの結果、セツキシマブ耐性株では、Mek と Src の活性化、PDPK1 の活性抑制が観察された。Mek の活性化は特に BRAF V600E 変異型の耐性株で顕著であり、これは、Mek が B-raf の下流シグナル分子であることと合致する結果である。また、これまでに、Src の活性化が抗 EGFR 抗体薬の耐性化に関わっている事を示唆した報告がいくつかなされており、Src が耐性株で活性化しているという今回の結果は過去の報告と一致する。PDPK1 に関しては、抗 EGFR 抗体薬との関連が報告されておらず、新たな耐性化メカニズムである可能性がある。これらの結果は、EGFR シグナル関連キナーゼの活性化状態を包括的に解析する事が、抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有効である可能性を示唆している。

現在、我々は、EGFR シグナル関連キナーゼの活性化状態を、LC-MS/MS で一度に、包括的に解析する技術の開発を進めている。本研究を踏まえると、包括的キナーゼ活性測定が容易に行う事ができるようになれば、抗 EGFR 抗体薬の新たな効果予測診断法が開発できるものと考えている。

(2) 抗 EGFR 抗体薬の新規作用メカニズムの解明

抗 EGFR 抗体薬感受性細胞が細胞ディッシュの一面に、限界まで増殖した時の細胞密度を、セツキシマブ添加時と非添加時とで比較した。顕微鏡下での観察の結果、セツキシマブ添加細胞では、低密度の状態、細胞増殖が止まっている事が示唆された。さらに、細胞が培養ディッシュ、一面に増殖した時の細胞増殖を、細胞計数法や BrdU 取込み解析で調べた結果も、セツキシマブ存在下では細胞間接着形成後、より早い時期に細胞増殖が停止している事を示唆した。細胞間接着に依存した細胞増殖抑制機構の破綻は、がん細胞の大きな特徴の一つであるが、本研究結果は、セツキシマブがその細胞増殖抑制機構破綻を修正している事を示唆した。

興味深い事に、大腸がんあるいは肺がん患者の臨床検体を使った過去の報告では、EGFR 標的薬無効群において、細胞間接着制御因子である E-cadherin の発現低下が観察されている。これらの報告と、上述の本研究成果を合わせて考えると、細胞間接着機構が異常になったがんでは、抗 EGFR 抗体薬による細胞抑制効果が発生しなくなるものと思われる。細胞間接着因子の異常を検出する事が、抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有効である可能性が示唆された。

さらに、抗 EGFR 抗体薬がどのようにして、細胞間接着依存性の細胞増殖抑制を誘導しているのかを明らかにするために、プロテオーム解析を行った。細胞密度が高い時にだけ、

セツキシマブ処理で発現変動するタンパク質を探索したところ、NFXL1 などが見つかった。現在、これらの高細胞密度時発現変動タンパク質の機能解析を行っており、今後それらが抗 EGFR 抗体薬の効果予測バイオマーカーになるのかどうかを探っていく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件) 全て査読有り

Yamagishi N., Nakao R., Kondo R., Nishitsuji M., Saito Y., **Kuga T.**, Hatayama T., and Nakayama Y. (2014) Increased expression of sorcin is associated with multidrug resistance in leukemia cells via up-regulation of MDR1 expression through cAMP response element-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 13, 430-436.

Kume H., Muraoka S., **Kuga T.**, Adachi J., Narumi R., Watanabe S., Kuwano M., Kodera 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. DOI: 10.1074/mcp.M113.037093.

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* 3, e94.

Nakayama Y., Saito Y., Soeda S., Iwamoto E., Ogawa S., Yamagishi N., **Kuga T.**, and Yamaguchi N. (2014) Genistein induces cytokinesis failure through RhoA delocalization and anaphase chromosome bridging. *J Cell Biochem* 115, 763-771.

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, 4721-4731.

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.

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, 3251-3268.

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.

Sogawa K., Noda K., Umemura H., Seimiya M., **Kuga T.**, **Tomonaga T.**, Nishimura M., Kanai F., Imazeki F., Takizawa H., Yoneda M., Nakajima A., Tsutsumi M., Yokosuka O., and Nomura F. (2013) Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomics Clin Appl* 7, 424-431.

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., and **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 13 件)

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 I 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

久家貴寿, **朝長 毅**, 齊藤洋平, 三上俊成, 武田泰典, 中山祐治: FAM83H 遺伝子変異に起因するエナメル質形成不全症の発症メカニズム研究. 日本薬学会第 134 年会 熊本, 2014 年 3 月 27-30 日

久家貴寿: 新規大腸癌関連タンパク質の予後予測マーカー応用を目指した取り組み. 第 9 回千葉疾患プロテオミクス研究会, 東京, 2012 年 11 月 24 日

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

久家貴寿, 久米秀明, 川崎直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原久裕, **朝長 毅**: 大腸癌手術標本の発現解析とインタラクトーム解析による新規癌関連タンパク質の同定. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日

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

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

名称: 大腸癌治療剤
発明者: **朝長 毅**, **久家貴寿**, 久米秀明
権利者: 独立行政法人医薬基盤研究所
種類: 特許(発明)
番号: PCT/JP2013/003669
出願年月日: 2013 年 6 月 11 日
国内外の別: 国際出願

名称: 大腸癌治療剤
発明者: **朝長 毅**, **久家貴寿**, 久米秀明
権利者: 独立行政法人医薬基盤研究所
種類: 特許(発明)
番号: 特願 2012-135619
出願年月日: 2012 年 6 月 15 日
国内外の別: 国内出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久家貴寿 (KUGA, Takahisa)
独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員
研究者番号: 20551857

(2) 研究協力者

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