

- コンベンションセンター, 沖縄県宜野湾市, 2012.08.20-21
43. 井野洋子: Phosphoproteomic analysis of androgen-independent prostate cancer cells, HUPO 11th Annual World Congress, Hynes Convention Center, Boston, Massachusetts, 2012.09.09-13
 44. 紙田正博, 木村弥生, 井野洋子, 倉田洋一, 山田哲司, 尾野雅哉, 平野久: 出芽酵母リボソームタンパク質の N α -アセチル化とそれがタンパク質合成に及ぼす影響, 日本プロテオーム学会 2012 年会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 45. Kimura, A., Nomura, A., Kawakami, T., Arakawa, N. and Hirano, H.: Identification of the phosphoproteins implicated in the high malignancy of ovarian clear cell adenocarcinoma using comparative LC-MS/MS-based proteomic approach. 11th annual world congress HUPO 2012, Hynes Convention Center, Boston, 2012. 9. 9-13
 46. 木村鮎子, 野村文子, 川上隆雄, 荒川憲昭, 平野久: 卵巣明細胞腺癌の悪性度に関わるリン酸化タンパク質の網羅的な解析, 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 26-27
 47. 倉田洋一, 木村弥生, 紙田正博, 山中結子, 石川晃代, 岡本裕之, 正岡哲治, 名古屋博之, 荒木和男, 森山俊介, 森 司, 平野久: サケ脳下垂体プロテオームに対する成長ホルモンの影響, 日本ヒトプロテオーム研究機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.23
 48. 増石有佑, 木村弥生, 平野久: GPI アンカー型タンパク質の網羅的解析法の開発: Proteomic Analysis of GPI-anchored protein, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 49. 齋藤真奈美, 山下暁郎, 岡山明子, 和田佳行, 平野久, 島田 勝: 質量分析法でヒトパピローマウイルスの感染に関わる細胞因子の同定, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 50. 菅原経継, 木村弥生, 戸田年総, 平野久: Phos-tag 親和性電気泳動法を用いたヒトプロテオームサブユニットのリン酸化状態の解析 日本ヒトプロテオーム機構 第 10 回大会, 日本科学未来館, 東京, 2012. 7. 27
 51. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野久, 鏑木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会, みやこめっせ, 京都, 2012.4.13
 52. 高橋枝里, 久保田浩之, 奥村彰規, 佐藤恵美, 平野久, 鏑木康志: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
 53. 高橋枝里, 久保田浩之, 本間綾香, 平野久, 鏑木康志: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 54. 高橋枝里: 血清プロテオーム解析による 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 34 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2011.12.14
 55. 高橋枝里: KK-Ay マウス血清を用いた 2 型糖尿病関連因子の探索, 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, パシフィコ横浜 パンパシフィック横浜ベイホテル東急, 横浜, 2012.5.18
 56. 高橋枝里: 2DICAL を用いた糖尿病性細小血管症関連蛋白質の探索, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 日本科学未来館, 東京, 2012.7.27
 57. 野村文子, 荒川憲昭, 大胡田慎一郎, 勝山真人, 平野久: 血管型 NADPH オキシダーゼのレドックスシグナルのプロテオミクス解析, 日本生化学会大会, 第 85 回大

- 会, 福岡国際会議場, 福岡, 2012.12.14-16
58. Ono M, Kamita M, Yamada T.: A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. February 21-25, 2013 (Hyatt Regency Maui, Maui, HI)
 59. Masuda M, Honda K, Yamada T.: Pathway-based phosphoprotein profiling by high-density protein array. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. Feb. 21-25, 2013, Hyatt Regency Maui, Maui, HI.
 60. 中山敬一: ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. 基生研研究会「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」. (招待講演) 岡崎.5/14 (2012).
 61. Nakayama, K.I.: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. 10th Stem Cell Research Symposium. (Invited speaker) Awaji.5/31 (2012).
 62. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学研究の新地平: もうウェスタンブロットティングは要らない?!. 第55回日本腎臓学会学術総会. (招待講演) 横浜.6/1 (2012).
 63. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロットティングは要らない?!. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究. (招待講演) 東京.6/21 (2012).
 64. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: もうウェスタンブロットティングは要らない?!. 第22回日本サイトメトリー学会学術集会. (招聘講演) 豊中.6/29 (2012).
 65. 幡野敦, 松本雅記, 中山敬一: 定量的リン酸化プロテオミクスによる Calcineurin の網羅的基質探索. 第10回日本プロテオーム学会. 東京.7/26 (2012).
 66. 松本雅記: 定量プロテオミクスのための試料調製. 第10回日本プロテオーム学会. (教育講演) 東京.7/26 (2012).
 67. 中山敬一, 松本雅記, 押川清孝, 松崎芙美子: ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. 第10回日本プロテオーム学会. (シンポジウム) 東京.7/26 (2012).
 68. 中山敬一: プロテオームと疾患研究. ヒトプロテオゲノミクスの現状とロードマップによる推進: エピゲノムとプロテオームの統合によるヒトの生命と病気の解明. (シンポジウム) 東京.7/28 (2012).
 69. Nakayama, K.I.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomics analysis. HUPO 2012 11th World Congress. (Invited speaker) Boston, MA.9/12 (2012).
 70. 中山敬一: G0 期維持機構の解明: 癌幹細胞を撲滅できるか?. 第71回日本癌学会学術総会. (シンポジウム) 札幌.9/19 (2012).
 71. 松本雅記, 松崎芙美子, 高見知代, 小山田浩二, 中山敬一: 情報基盤プロテオミクスによるヒトプロテオームの絶対定量. 第5回定量生物学の会年会. (招待講演) 東京.11/24 (2012).
 72. 喜多泰之, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリングタンパク質 CHD7 の新規スプライシングバリエーションの発見とその機能解析. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡.12/11 (2012).
 73. 渡邊心也, 杉本のぞみ, 松本雅記, 中山敬一, 藤田雅俊: プロテオミクスアプローチを用いた新規 GRWD1 結合タンパク質の網羅的同定による GRWD1 の機能解明.

- 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/11 (2012).
74. 中山敬一: 正常幹細胞と癌幹細胞における G0 期維持機構: "G0 期追出し療法"による癌根治の可能性. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/11 (2012).
75. 橋本寛, 松崎美美子, 細田將太郎, 大西隆史, 中山敬一, 白根道子: Protrudin が関与する遺伝性痙攣対麻痺の病態メカニズム. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/12 (2012).
76. 細田將太郎, 清水誠之, 石谷太, 中山敬一, 白根道子: 新規 FKBP38 結合タンパク質 ANKMY2 はソニックヘッジホッグシグナル伝達を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
77. 磯下理恵子, 小野山一郎, 鈴木淳史, 松本有樹修, 富田謙吾, 片桐秀樹, 尾池雄一, 中山啓子, 中山敬一: Fbxw7 はマウスの肝臓において脂質代謝及び細胞分化決定を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/13 (2012).
78. 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御と肝がん. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/13 (2012).
79. 中津海洋一, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: mTOR と転写をつなぐ新規分子 FOXK1 の発見とがん進展における促進作用. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
80. 足達俊吾, 穂本真佐江, 田中利好, 日置雄策, 村上裕, 菅裕明, 松本雅記, 中山敬一, 堀本勝久, 家村俊一郎, 夏目徹: 質量分析計による RNA 制御因子の同定法の開発とその応用. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
81. 大西隆史, 橋本寛, 細田將太郎, 中山敬一, 白根道子: 神経特異的な protrudin 新規アイソフォームの発現機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
82. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦 裕子, ランジャコーンシリバンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝: F-box タンパク質によるユビキチン化を介した CRY タンパク質の安定性制御. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/14 (2012).
83. 沖田康孝, 松本有樹修, 弓本佳苗, 磯下理恵子, 中山敬一: Fbxw7 の発現抑制は iPSC 細胞形成を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
84. 山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 弓本佳苗, 押川清孝, 中山敬一: MDM2 による RNA ヘリカーゼ DDX24 の非分解的制御機構の解明. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
85. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 小野山一郎, 森正樹, 三森功士, 中山敬一: 宿主 Fbxw7 が癌転移を抑制する. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/14 (2012).
86. 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: Fbxw7 阻害は静止期を破綻させることにより白血病幹細胞を根絶する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
87. 諸石寿朗, 西山正章, 山内隆好, 武田有紀子, 岩井一宏, 中山敬一: 生体における鉄代謝制御の中心をなす FBXL5-IRP2 系の発見. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
88. Matsumoto, M., Matsuzaki, F., Oshikawa, K., Oyamada, K., Goshima, N., Natsume, T., Nakayama, K.I.: Accurate and absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
89. Kuroda, S., Yugi, K., Kubota, H., Soga, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Unbiased identification of global

network for signaling and metabolism from trans-omic data. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).

90. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝: 時計タンパク質 CRY の安定化を担う新規ユビキチンリガーゼの同定. 第 85 回日本生化学会大会. (口頭発表) 福岡.12/16 (2012).
91. 中山敬一, 西山正章, 諸石寿朗: ユビキチン化による鉄代謝制御機構とその破綻. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/16 (2012).
92. 中山敬一: ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出. 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域・平成 24 年度公開シンポジウム. (シンポジウム) 東京.2/25 (2013).
93. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroiishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase DDX24 to regulate pre-rRNA processing. Post-GCOE Symposium & Retreat on Cell-fate decision: Function and dysfunction in homeostasis. (Oral) Singapore.3/4 (2013).
94. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A., Nakayama, K.I.: Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. Post-GCOE Symposium & Retreat on Cell-fate decision: Function and dysfunction in homeostasis. (Oral) Singapore.3/4 (2013).
95. Yamamura, S., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: Fbxw7-dependent ubiquitylation mediates the degradation of SOX9. Post-GCOE Symposium &

Retreat on Cell-fate decision: Function and dysfunction in homeostasis. (Oral) Singapore.3/5 (2013).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称: 乳がん治療の予後判定方法
発明者: 朝長 毅, 村岡 賢, 村上達夫, 加藤菊也, 宮本泰豪
出願日: 2012 年 5 月 23 日(国内出願)
出願番号: 特願 2012-117961 (国内出願)
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
- 2) 発明の名称: 結核検査用バイオマーカー
出願日: 2012/4/3 出願番号: 2012-84996
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
発明者: 仲 哲治, 藤本 穰, 世良田聡, 松本智成
- 2) 発明の名称: 膠原病のレイノー症状を診断する免疫学的手法
出願日: 2012/6/22
出願番号: 特願 2012-141434
出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所
発明者: 仲 哲治, 藤本穰, 世良田聡
- 3) 発明の名称: 組織因子経路阻害因子 2(TFPI2)測定による卵巣明細胞腺癌の検査方法および検査薬
発明者: 荒川憲昭, 平野 久, 宮城悦子, 大竹宣久
出願人: 公立大学法人横浜市立大学、東ソー株式会社
出願番号: 特願 2011-179450
出願年月日: 2011 年 8 月 19 日 国内

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

コンパニオン診断薬創出のためのリン酸化プロテオミクス基盤技術開発

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

最適な個別化医療の実現のためには、治療薬（主に分子標的薬）の効果や副作用を予測し、投薬が適切な患者を選定するためのコンパニオン診断薬の開発が急務である。現在は、標的分子の遺伝子変異の有無で薬効予測をしているが、薬が効くと診断されても実際は効かない例が多い。その理由として、遺伝子レベルだけではなく、生体内のタンパク質レベルでの変動が薬効を左右するからである。その中でも特に、生体内のシグナル伝達を担っているタンパク質リン酸化が鍵となる。本研究では、最新のプロテオミクス技術を活用して、リン酸化タンパク質によるシグナルの異常を網羅的に捉え、次世代コンパニオン診断薬を創出することを目的とする。

本年度は、iTRAQ 法とリン酸化ペプチド濃縮法を組み合わせた網羅的リン酸化タンパク質比較定量法を確立した。また、安定同位体標識内部標準ペプチド添加することで、特定のタンパク質リン酸化修飾レベルを SRM/MRM 法で定量する技術開発を行った。特に、細胞内主要シグナルを担うキナーゼに着目し、その活性化レベルの SRM/MRM 測定のための検討を行った。400 種類弱の活性型リコンビナントキナーゼを LC-MS/MS で解析し、その MS/MS データから SRM 測定パラメータリストを作成した。

また、抗 EGFR 抗体薬効果予測法における標的キナーゼを決定するための基礎検討も進めた。大腸癌培養細胞株 2 4 種類を抗 EGFR 抗体薬感受性株、耐性株に分類し、それら細胞株についてキナーゼ活性化状態のプロファイリングを進めた。抗 EGFR 抗体薬耐性株では Mek や Akt の活性化が検出できたが、これらのキナーゼの活性化以外の原因も耐性化に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

最適な個別化医療の実現のためには、治療薬（主に分子標的薬）の効果や副作用を予測し、投薬が適切な患者を選定するためのコンパニオン診断薬の開発が急務である。FDA は 2011 年 7 月に早くもコンパニオン診断薬のドラフトガイダンスを発表し、コンパニオン診断薬の開発推進に対する積極的な姿勢を示している。

既存のコンパニオン診断薬は標的分子の遺伝子変異の有無のみを調べているが、薬が効くと診断されても実際は効かない例が多い。例えば、大腸がんの分子標的薬セツキシマブは EGFR を阻害することでその下流の増殖シグナルを抑えるが、KRAS 遺伝子に変異が

あるとその下流のシグナルが恒常的に活性化されるため、EGFR を阻害しても増殖シグナルは抑えられない。そこで KRAS 遺伝子検査を行い、変異のない症例にセツキシマブが投与されているが、その中でも効果が認められるのは約 3 割に過ぎない。その理由として、KRAS 遺伝子野生型でも ERBB2/3 や MET など複数のバイパスシグナル群により、あたかも KRAS 遺伝子変異型と同様に下流のシグナルが活性化されているため、もしくは他の増殖シグナルが活性化されているためと考えられている。そのため、薬効を予測するためには、個々の遺伝子変異だけでなく、上述の未知のバイパスシグナルを調べることが必須である。生体内のシグナル伝達はタンパク

質リン酸化が主体であるため、網羅的なリン酸化タンパク質の解析を行えば、どのシグナルが薬効に重要なかを知ることができ、コンパニオン診断薬の創出につながる。このリン酸化タンパク質の解析は遺伝子変異・発現解析では困難で、プロテオミクスでしかできない。さらに、バイパスシグナルを調べることは、薬効予測だけでなく、薬剤耐性のメカニズムや耐性を克服する新規治療薬の開発につながるほか、予想外の副作用予測マーカーの同定が可能となる。

そこで本研究では、最新のプロテオミクス技術を活用して、リン酸化タンパク質によるシグナルネットワーク（面）の異常を網羅的に捉え、次世代コンパニオン診断薬の創出を行うことを目的とする。

B. 研究方法

B-1. SRM/MRM 法を用いたリン酸化タンパク質定量法の確立

リン酸化ペプチドの濃縮には代表的なリン酸化ペプチド濃縮法である Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) 法を用いた。Ni イオンをキレートした Probond レジンから IMAC レジンを作成し、EDTA で Ni イオンをはずし、その後 Fe²⁺ イオンをキレートさせた。タンパク質総量 1mg につき 250 μ l 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、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。

リン酸化ペプチドの SRM 測定のために、まずは標的ペプチド配列を決定し、SRM 測定パラメータを設定した。理論的な標的配列はアミノ酸配列情報から決定することができるが、実際に LC-MS/MS で検出できるかどうかの検証を行った。また、実測した MS/MS スペクトル情報は SRM 測定パラメータ（トランジションやコリジョンエネルギー）の設定に用いた（図1）。

B-2 大腸癌培養細胞株の抗 EGFR 抗体薬感受性分類とキナーゼ活性化レベルプロファイリング

大腸癌培養細胞を抗 EGFR 抗体薬に対する感受性で分類し、キナーゼ活性化レベルをプロファイリングする。その結果に基づいて抗 EGFR 抗体薬効果予測法の標的キナーゼを決定する。24 種類の大腸癌培養細胞株を抗 EGFR 抗体薬セツキシマブ感受性株、耐性株に分類した。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。感受性は、WST-8 試薬を用いた細胞増殖試験で調べた。各細胞株に 0.5~50 μ g/ml のセツキシマブを添加し、増殖抑制率を計算した。分類した細胞株を、40 種類以上のキナーゼ活性化指標リン酸化抗体で Western blot 解析する。

C. 研究結果

C-1. SRM/MRM 法を用いたリン酸化タンパク質定量法の確立

本法ではキナーゼを酵素消化した後に活性化指標リン酸化ペプチドを SRM 法で定量する。リン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドと比べてイオン化効率が著しく低い。リン酸化ペプチドを LC-MS/MS で測定する場合は、リン酸化ペプチドの濃縮が必要になる。そこで、代表的なリン酸化ペプチド濃縮法である Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) 法を用いた。

リン酸化ペプチドを実測する方法として、まずは大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析を行った。その結果、主要なキナーゼ 230 種のうち 186 種類のキナーゼのリン酸化修飾ペプチドが同定された（図2）。活性化指標リン酸化修飾に着目した場合、例えば EGFR シグナル伝達関連キナーゼ 28 種類中では 14 種類が同定されていた（図3）。

大規模ショットガンプロテオミクスで同定できなかったキナーゼに関しては、アフィニティー精製したキナーゼあるいは活性型リコンビナントキナーゼの測定で穴埋めする。2

つの方法を比較した結果、活性型リコンビナントキナーゼを用いた方が簡便で感度も優れていた(図4)。活性型リコンビナントキナーゼを解析する場合はそれらを入手する手段が必要であるが、企業との共同研究契約を結ぶことで、400種類近くのキナーゼを入手することができた(図5)。これら活性型リコンビナントキナーゼの全てをトリプシン消化、IMAC精製した後にLC-MS/MSでショットガン解析した。今後、MS/MS解析データから、SRM標的配列と測定パラメータを決定しリスト化する予定である。

SRM法でペプチドを定量する場合、測定間での誤差が生じる場合がある。そこで、安定同位体標識した内部標準ペプチドを添加することで安定して定量する技術を確認した(Narumi et al., J. Proteome Res. 2012; Muraoka et al., J. Proteome Res. 2012)。タンパク質消化物に内部標準リン酸化ペプチドを添加してからIMACリン酸化ペプチド精製し、SRM測定する(図6)。一度に数十種類のターゲットを定量することも可能である。濃度既知の安定同位体標識ペプチドを用いればSRM法で絶対定量することも可能である。

C-2 大腸癌培養細胞株の抗EGFR抗体薬感受性分類とキナーゼ活性化レベルプロファイリング

キナーゼの活性化レベルを測定することで、抗EGFR抗体薬の効果予測が可能かどうかを明らかにする必要がある。そのために、大腸癌培養細胞株を抗EGFR抗体薬感受性株と耐性株に分類し、それらのキナーゼ活性化レベルのプロファイリングを進めている。大腸癌培養細胞株に抗EGFR抗体薬セツキシマブを0、0.5、5、50 µg/mlの濃度で添加し、72時間後にWST-8試薬を用いて細胞増殖試験を行った(図7)。これまでの報告通り、KRAS G12V変異株やBRAF V600E変異株はセツキシマブに対し耐性を示した。上記のKRAS、BRAF遺伝子変異を持たない細胞株

では、感受性株と耐性株が混在していた。セツキシマブ感受性株ではセツキシマブ処理により、実際にErkなどの活性化レベルが抑制された(図8)。セツキシマブ感受性株、耐性株(KRAS G12V変異体、BRAF V600E変異体、それ以外)について、キナーゼ活性化指標リン酸化抗体を用いたWestern blot解析を進めている。その結果の一例として、BRAF V600E変異体ではMek1/2の活性化レベルが上がっており、KRAS G12V変異体ではAktの活性化レベルが上がっていた(図9)。これらの結果はキナーゼ活性化レベルのプロファイリングにより、抗EGFR抗体薬の効果予測が可能であることを示唆している。

D. 考察

D-1. SRM/MRM法を用いたリン酸化タンパク質定量法の確立

平成24年度はSRM/MRM法を用いたリン酸化タンパク質定量法の開発を進めた。SRM測定パラメータリストを作成する段階が律側となっているが、活性型リコンビナントキナーゼを用いたSRM測定パラメータ設定が可能になったので、技術開発のペースが増していくと思われる。

リン酸化タンパク質定量に関してSRM/MRM法と対比する技術は抗体アレイ法などである。SRM法は、リン酸化抗体を必要としない点、特異性が高い点、一度に多種類のリン酸化タンパク質を定量できる点など抗体アレイ法よりはるかに優れている技術である。今後は、どの程度感度を向上させることができるかが問題となる。それがクリアできれば、種々の薬剤処理に対して、細胞内シグナルがどう動くかを俯瞰的にみることが可能となり、コンパニオン診断薬の開発や薬剤耐性のメカニズムの解明に貢献できる。

D-2 大腸癌培養細胞株の抗EGFR抗体薬感受性分類とキナーゼ活性化レベルプロファイリング

活性化キナーゼレベルの解析により、

KRAS G12V 変異株、BRAF V600 変異株は Mek や Akt の活性化状態で区別できることが示唆された。上記遺伝子変異体以外の耐性株では Mek と Akt の活性化変動は比較的小さく、別の活性化キナーゼマーカを見出す必要がある。現在、40 種類以上のキナーゼ活性化指標リン酸化修飾抗体を用いたプロファイリングを進めており、今後新たな活性化キナーゼマーカが見つかることを期待している。新規活性化キナーゼマーカの発見により、遺伝子変異ではできなかった患者選別が可能になると思われる。

E. 結論

SRM/MRM 法を用いたリン酸化タンパク質定量法の開発を行った。特に活性型リコンビナントキナーゼを用いて、細胞内主要シグナルを担うキナーゼの活性化レベルの SRM/MRM 測定のための検討を行った。

大腸癌培養細胞株の抗 EGFR 抗体薬感受性株と耐性株で種々のキナーゼの活性化レベルを測定した。その結果、耐性株ではこれまで耐性の原因と考えられていた Mek と Akt の活性化以外の原因が耐性化に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Shiromizu, T., Adachi, J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S. & Tomonaga, T. 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.*, in press (2013).
2. Muraoka, S., Kume, H., Adachi, J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T.,

Ishihama, Y. & Tomonaga T. In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein list. *J. Proteome Res.* **12**, 208-13 (2013).

3. 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. A Strategy for large-scale phospho-proteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-22 (2012).
4. 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. A strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 4201-10 (2012).

G-2. 学会発表

(招待講演)

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. 足立淳, 久家貴寿, 白水 崇, 橋口一成, 松

本雅記、中山敬一、井倉正枝、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。日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、2012 年 9 月 6-9 日

(一般講演)

1. 足立 淳、久家貴寿、白水 崇、久米秀明、村岡 賢、橋口一成、鳴海良平、渡邊史生、桑野晶喜、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、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。日本プロテオーム学会 2012 年会、東京、2012 年 7 月 26-27 日
2. 村上達夫、久家貴寿、足立 淳、白水 崇、宮本泰豪、加藤菊也、石飛真人、稲治英生、小寺義男、朝長毅：大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM/MRM によるヒト乳癌組織の検証法。日本プロテオーム学会 2012 年会、東京、2012 年 7 月 26-27 日
3. 足立 淳、久家貴寿、白水 崇、久米秀明、村岡 賢、橋口一成、鳴海良平、渡邊史生、桑野晶喜、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉 毅、高田 穰、朝長毅：DNA 損傷初期応答シグナル解析から創薬標的の探索へ。第 10 回北里疾患プロテオーム研究会、神奈川、2012 年 8 月 23 日
4. 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
5. 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

国際学会

(一般講演)

1. Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T,

Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M

Tomonaga T: Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network. Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) 6th congress, Beijing, China, 5-7 May, 2012.

2. 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.
3. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「乳がん治療の予後判定方法」

発明者：朝長 毅、村岡 賢、村上達夫、加藤菊也、宮本泰豪

出願日：2012 年 5 月 23 日(国内出願)

出願番号：特願 2012-117961 (国内出願)

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

I. 研究協力者

石濱 泰 京都大学大学院薬学研究科 教授
足立 淳 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
原 康洋 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
久米秀明 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
久家貴寿 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
白水 崇 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
村岡 賢 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
松原三佐子 医薬基盤研究所 プロテオーム
リサーチプロジェクト
渡部 亮介 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
橋口 一成 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
村上 達夫 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
金川 章子 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
佐野聖三 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
渡邊史生 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
川崎直子 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
橋本裕希 医薬基盤研究所 プロテオームリ
サーチプロジェクト
岸田真里菜 医薬基盤研究所 プロテオーム
リサーチプロジェクト
長野麻衣子 医薬基盤研究所 プロテオーム
リサーチプロジェクト

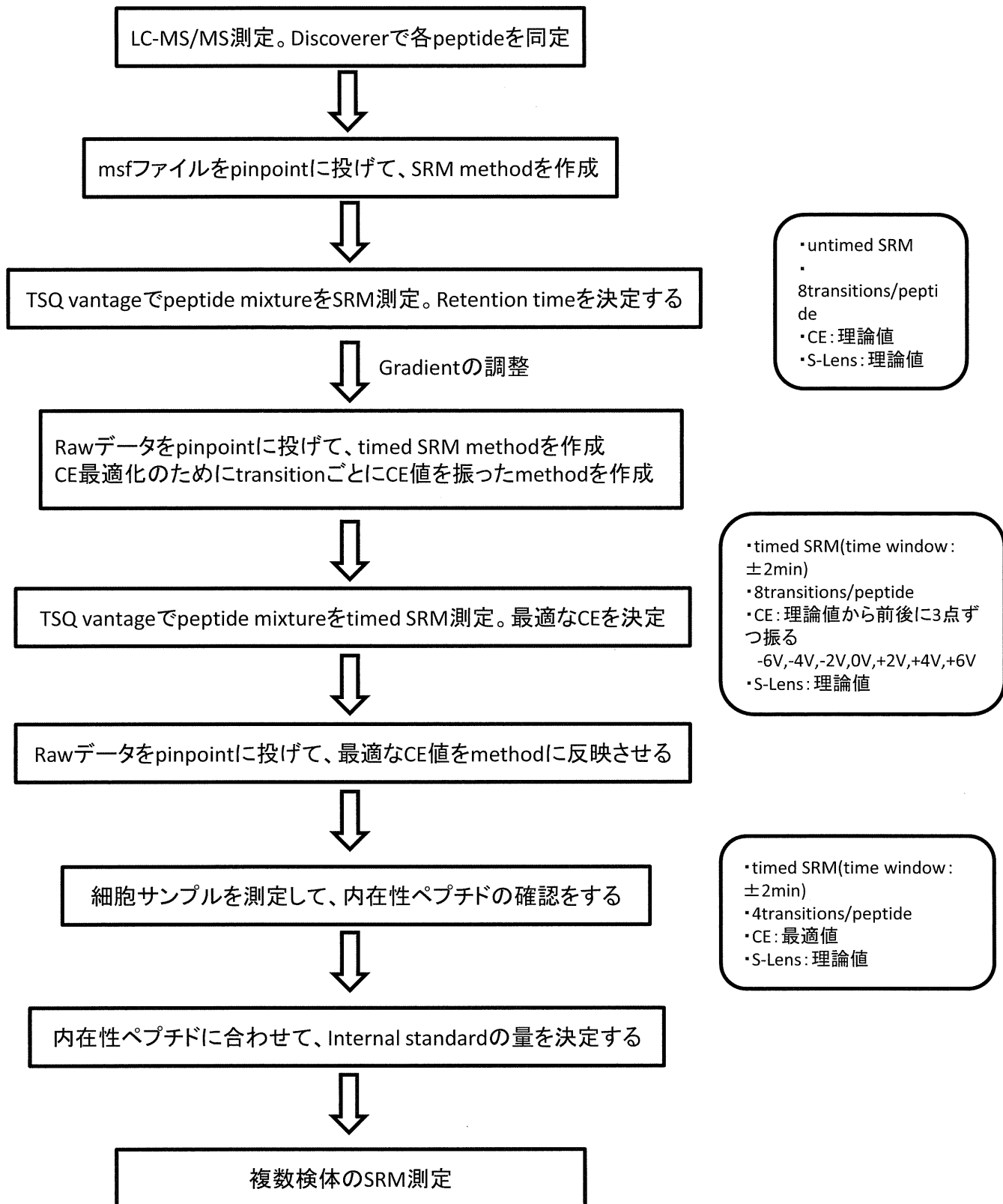


図1. SRM測定の仕事フロー

Kinase (230) 赤…1か所以上のリン酸化サイト(186)							
ARAF	CSNK1E	CHUK	MAP2K6	PFKFB2	PRKD2	ZAK	MTOR
PRKAA1	CSNK1G1	IKBKB	MAP2K7	PFKFB3	PRKD3	ZAP70	RPS6KB1
PRKAA2	CSNK1G2	IKBKE	MAP3K9	PFKFB4	PKM2	ABL1	RPS6KB2
PRKAB1	CSNK1G3	ILK	MAP3K10	PFKL	EIF2AK2	AKT1	PAK1
PRKAB2	CSNK2A1	INSR	MAP3K11	PFKM	PLK1	AKT2	PIK3C2A
PRKAG1	CSNK2B	IRAK1	MLK4	PFKP	PXN	AKT3	PIK3C2B
PRKAG2	MAP3K8	IRAK4	MKNK1	PIKFYVE	PTK2B	CAMK1	PIK3C2G
PRKAG3	CSK	LATS1	MKNK2	PIPSK1A	RAF1	PNCK	PIK3C3
MAP3K5	DAPK1	LATS2	MOS	PIP5K1B	RIPK1	CAMK1D	PIK3CA
ATM	MAP3K12	LCK	RPS6KA5	PIP4K2A	RIPK2	CAMK2A	PIK3CB
ATR	EEF2K	LIMK1	RPS6KA4	PIP4K2B	RIPK3	CAMK2B	PIK3CD
AURKB	MAPK3	LIMK2	STK4	PIP4K2C	ROCK1	CAMK2D	PIK3CG
BRAF	MAPK1	STK11	STK3	PIP5K1C	ROCK2	CAMK2G	PIK3R1
BLK	MAPK6	LYN	PKMYT1	PRKACA	RPS6KA3	CAMK4	PIK3R2
PTK6	MAPK4	MAP3K13	MAP3K14	PRKACB	RPS6KA2	CDK1	PIK3R3
BTK	MAPK15	MAP3K15	NLK	PRKACG	RPS6KA6	PRKDC	PIK3R4
BUB1	FER	MAP4K2	MAPK14	PRKARIA	SGK1	MAPK7	PIK3R5
CAMKK1	FGR	MAPKAPK2	MAPK11	PRKAR1B	SGK2	PTK2	PIK3R6
CAMKK2	FRK	MAPKAPK3	MAPK13	PRKAR2A	SGK3	GSK3A	SYK
MYLK3	FYN	MAPKAPK5	MAPK12	PRKAR2B	MYLK2	GSK3B	YES1
CDK2	GCK	MARK1	RPS6KA1	PRKCA	MYLK	JAK1	
CDK4	EIF2AK4	MARK2	PAK2	PRKCB	SRC	JAK2	
CDK6	ADRBK1	MARK3	PAK3	PRKCD	MAP3K7	JAK3	
CDK7	HCK	MARK4	PDK1	PRKCE	TAOK1	MAPK8	
CDK8	HIPK2	MAP2K1	PDK2	PRKCG	TAOK2	MAPK9	
CHEK1	HK1	MAP3K2	PDK3	PRKCH	TAOK3	MAPK10	
CHEK2	HK2	MAP3K3	PDK4	PRKCI	TBK1	MAP2K2	
CSNK1A1	HK3	MAP3K4	PDPK1	PRKCQ	TESK1	MAP2K5	
CSNK1A1L	MAP4K1	MAP3K6	EIF2AK3	PRKCZ	TESK2	MAP3K1	
CSNK1D	EIF2AK1	MAP2K4	PFKFB1	PRKD1	WEE1	MAP2K3	

図2. 大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析による同定キナーゼリスト

ABL1	Y393
AKT1	T308
AKT2	T309
AKT3	T305
CAMK1	T177
CAMK1D	T180
CAMK4	T200
CDK1	T161
GSK3A	Y279
GSK3B	Y216
JAK1	Y1034, 1035
JAK2	Y1007, 1008
JAK3	Y980, 981
MAP2K2	S222, 226
MAP2K3	S218
MAP2K5	S311
MAPK10	T221, Y223
MAPK7	Y220
MAPK8	T183, Y185
MAPK9	T183, Y185
PAK1	T423
PNCK	T171
PRKDC	T3950
PTK2	Y576, 577
RPS6KB1	T252
RPS6KB2	T228
SYK	Y525, 526
YES1	Y426

EGFR シグナル関連キナーゼの一部

赤字：同定

図3. 大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析で同定された活性化指標リン酸化修飾

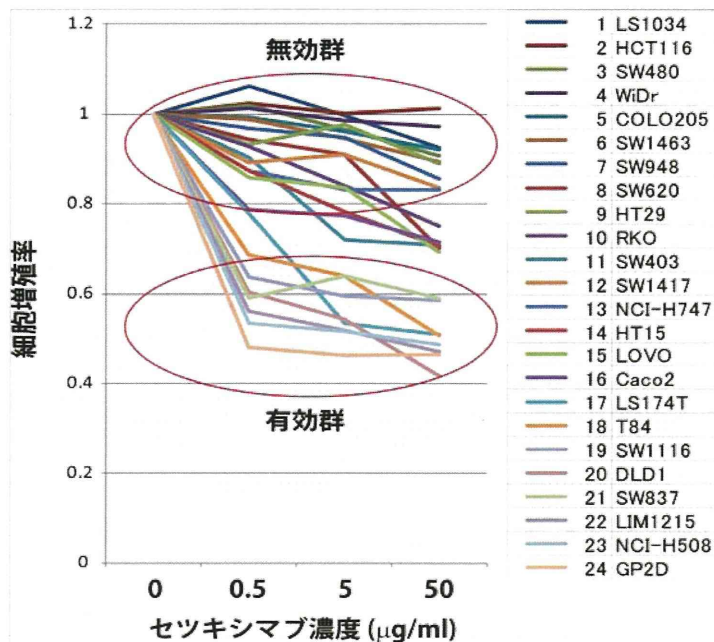


図 6. 大腸癌培養細胞株のセツキシマブ感受性解析

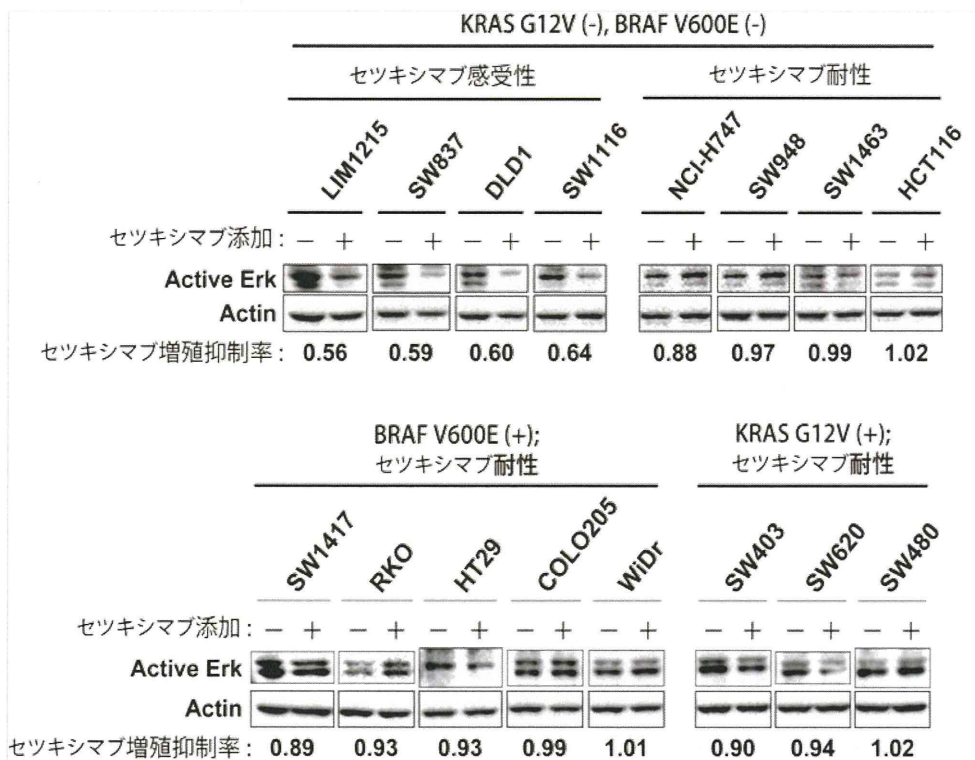


図 7. セツキシマブ添加した大腸癌培養細胞株のWestern blot解析
大腸癌培養細胞株に0.5 μg/ml セツキシマブを添加し、活性型Erk抗体でWestern blot解析した。

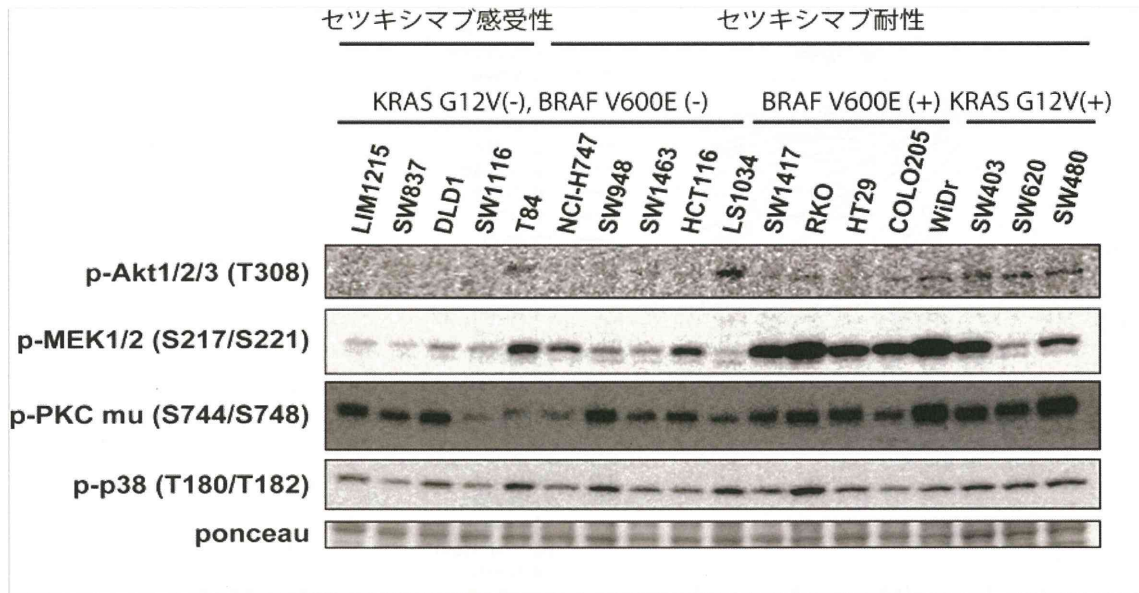


図 8. 活性化型キナーゼ抗体を用いた大腸癌培養細胞株のWestern blot解析

KRAS G12V変異株ではAktの活性化が見られ、BRAF V600E変異株ではMekの活性化が見られた。一方で、PKC mu、p38の活性化には大きな差が無かった。

定量的リン酸化プロテオミクス技術の開発と GIST における imatinib 耐性克服を目指した
コンパニオン診断薬開発への応用

研究分担者 仲哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部
免疫シグナルプロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨

チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は肺癌、消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal Stromal Tumor : GIST)、白血病等に対して、画期的治療効果を示すことが報告された。しかし、獲得耐性と共に治療が無効となるため、耐性克服は進行がん患者にとって重要である。GIST 患者のおよそ 20～50%の頻度において、c-kit の 2 次変異を持たず、Imatinib に獲得耐性を示す患者の存在が報告されている。このような GIST 患者においては、Imatinib 作用時、KIT 以外に生存・増殖に関係するタンパク質 (キナーゼ) が GIST 細胞の survival signal となり、バイパス経路として活性化していることが考えられるが、これまで Imatinib 耐性 GIST 患者におけるバイパス経路の解析は報告されていない。従って、survival signal であるバイパス経路を同定することは新規キナーゼ阻害剤の開発、さらにはコンパニオン診断薬の開発につながるものと期待される。

GIST 細胞は Imatinib 処理により全ての細胞が死滅するわけではなく、濃度依存性に腫瘍細胞は死に至るが必ず生細胞が存在する。従って、これら生細胞には GIST 細胞が Imatinib に対する耐性を獲得する以前に、Imatinib 処理に対し抵抗性—survival signals を持っていると考えられる。そこで、Imatinib 暴露前と暴露直後に c-Kit 以外のタンパク質のリン酸化レベルの変動を検索し、バイパス経路として、細胞の増殖・生存シグナルが活性化している経路を探索した。

まずリン酸化チロシンタンパク質を質量分析計にて網羅的に定量することができる技術の確立を試みた。抗チロシンリン酸化抗体ビーズを用いたチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と iTRAQ 法を組み合わせることで、複数サンプル間におけるチロシンリン酸化レベルを相対定量することが可能となった。本手法により、GIST-T1 細胞に 400nM の Imatinib を 0 時間、1 時間、6 時間、24 時間処理した後に発現変動を示す分子を網羅的に解析した結果、Imatinib 処理 0 時間と比較し、1 時間、6 時間、24 時間後に KIT のチロシンリン酸化が低下する一方で、Fyn, JAK2, Tyk2, FAK のチロシンリン酸化のレベルは、それぞれ 24 時間後に 17.2 倍、5.765 倍、5.64 倍、1.7 倍に上昇していることを明らかにし、ウェスタンブロットでも同様の結果を確認した。この結果を踏まえ、Fyn、FAK に着目し、Imatinib 治療による KIT 阻害に加えこれらをターゲットした治療の可能性を探索した。GIST-T1 細胞に shRNA を組み込み Fyn の発現を抑えた株においては、Imatinib の効果が親株に比べて上昇している結果を得た。さらに、親株に対して、Imatinib に加えて FAK に対する低分子阻害剤 (TAG) を加えたダブルットの治療がより効果的であるという結果を得た。これらの結果、Imatinib 感受性の GIST-T1 細胞を用いた *in vitro* での実験結果ではあるが、Imatinib による KIT のキナーゼ活性の阻害により活性化する Fyn および FAK の阻害は、survival signal のバイパスを遮断することで imatinib 耐性を抑制できる可能性が考えられた。すなわち、GIST において imatinib 処理時に活性化する Fyn および FAK を示す細胞は imatinib 耐性のバイパス経路を遮断する治療標的として、コンパニオン診断薬となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

ImatinibはBcr-Ablを標的とした分子標的治療薬として開発され、慢性骨髄性白血病の治療薬として使用されている。その後、c-kitやPDGF-R α に機能獲得型遺伝子変異を有する消化管間質腫瘍（Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST）においてもimatinibがキナーゼ活性を特異的に阻害することで劇的な治療効果を発揮することが明らかにされた。GISTにおいてimatinibが奏功するかどうかは腫瘍細胞中のc-kitやPDGF-R α の遺伝子変異の有無を確認することが可能である。大半のGIST患者においてimatinib使用中に獲得耐性を示すが、その詳細な機序は不明である。そのため、現在、GIST再発患者においてはimatinibとは別の薬剤を使用する必要が生じる。Imatinib獲得耐性の発生はimatinib使用時に生存するGIST細胞が存在するためであるが、このような細胞を死滅させることができれば獲得耐性の発生を抑えることが可能と考えられる。GIST患者より樹立されたGIST-T1細胞はimatinib感受性の細胞株である。GIST-T1にimatinibを処理すると、濃度依存性に腫瘍細胞が死に至るが必ず生細胞が存在することを確認している。そこで、この生存細胞に対して癌細胞の増殖と関係するチロシンキナーゼなどシグナル伝達経路を明らかにすることができれば、そのようなキナーゼ活性を阻害する化合物とimatinibを併用することで、imatinib獲得耐性の発生を抑制する上で有効性を示すことが期待される。

近年、質量分析計によりタンパク質のリン酸化などの翻訳後修飾をハイスループットで解析することが可能となってきた。質量分析計によるリン酸化タンパク質の解析は既知のリン酸化部位のみならず、新規リン酸化部位を決定することも可能であるという利点を有する。ここ数年の間に、金属イオンアフィニティーカラムなどを用いたリン酸化ペプチドの濃縮方法が改良された結果、従来よりも高い純度でリン酸ペプチドの濃縮が可能と

なった。しかし、タンパク質におけるセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化の内、チロシンのリン酸化は存在量のごくわずかであるため、金属イオンアフィニティーカラムによるリン酸化ペプチドの濃縮ではリン酸化チロシンの検出は効率が悪いという問題があった。

本研究では抗チロシンリン酸化抗体ビーズを用いたチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と、iTRAQ法によるリン酸化ペプチドの網羅的定量解析法の確立を試みた。そして、本手法を用いて、GISTにおけるimatinibの獲得耐性に関するキナーゼの同定を目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞

GISTの培養細胞株として、GIST-T1を用いた(GIST-T1細胞は高知医科大学、田口尚弘先生より供与)。GIST患者より樹立されたGIST-T1細胞はKITのエクソン11のV570からY578を欠損することにより機能獲得型変異を有し、imatinib感受性の細胞株である。GIST-T1にimatinibを低濃度で暴露して徐々に濃度を高めることにより、imatinib耐性株として、GIST-T1R2とGIST-T1R8を樹立した。それぞれの耐性株のimatinibに対するIC50値は30 μ Mであり、親株のGIST-T1の1000倍高い値であった。

(2) iTRAQ法によるチロシンリン酸化タンパク質の網羅的解析

imatinib投与前後で発現変動を示すチロシンリン酸化タンパク質を定量的に解析するため、Imatinib(ノバルティスファーマより提供)投与前、及び、1 μ M imatinib投与1時間、6時間24時間後の細胞を回収した。細胞は9.8M尿素、1xプロテアーゼインヒビターカクテル(ナカライテスク社)、1xフォスファターゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク社)を用いて溶解し、超音波処理する事でタンパク質を抽出した。遠心分離後、上清タンパク質を定量し、40mgのタンパク質に統一した。TEABの最終濃度を250mMに調節し、タン

パク質を 4.5mM DTT で還元、10mM ヨードアセトアミドでアルキル化した。100mM TEAB を用いて尿素濃度を 1M まで希釈し、1mg/ml の trypsin-TPCK 液を 40 µg 添加し、37 度で一晩酵素消化した。消化後、サンプルは 10% TFA で pH を 2 に下げた。定量解析時にサンプル間のばらつきを補正する目的で、内部標準物質として 30µl の 0.25 µM チロシンリン酸化ペプチド(NVPLyK) を添加した。ペプチドの精製 Sep-Pak C18 カラムを用いて行った。ペプチドは 0.1% TFA/ 40% acetonitrile で溶出し、凍結乾燥を行った。チロシンリン酸化ペプチドの濃縮は PhosphoScan pTyr100 Kits の手順に従って実施した。溶出したチロシンリン酸化ペプチドは peptide cleanup C18 spin tubes (Agilent Technologies) を用いて脱塩し、SpeedVac を用いて乾燥させた。

iTRAQ 試薬で標識した。8 サンプルを 1 つに混合し、イオン交換 HPLC にて 24 個のフラクションに粗分画し、それぞれの分画を脱塩後、質量分析計(LTQ Orbitrap XL)解析にて測定した。得られたデータを proteome discovererver1.3 にてデータベースサーチすることで、タンパク質の同定と定量を行った。リン酸化部位については、Proteome Discoverer software v.1.3 に搭載されている phosphoRS アルゴリズムを用いて解析し、同定されたリン酸化ペプチドの内、site probability <75%、及び、phosphoRS score <50 は削除した。

(3) ウェスタンブロット解析

SDS-PAGE(5-20%グラジエントゲル(和光純薬))には、10µg のタンパク質をアプライした。40mA で 50 分間泳動し、PVDF 膜に 120mA、1 時間転写した。転写後、1% BSA/TBST(TBS+ 0.1% Tween20)にて室温で 1 時間ブロッキングした。抗-phospho-p44/42 抗体、抗-p44/42 抗体、抗-YES 抗体、抗-Lyn 抗体、抗-Lck 抗体、抗-pSrc 抗体、抗-phospho-Src Family(Y416)抗体は

Cell Signaling Technology より購入した。抗 KIT 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 phospho-FAK (Tyr397) は Biosource 社より、抗 FAK 抗体は BD Transduction Laboratories 社より購入した抗-phosphotyrosine (clone 4G10)は Upstate Biotechnology 社より購入した。メンブレンを各種 1 次抗体で、1 時間、室温でインキュベートした。TBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、TBST で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ抗体あるいは抗マウス抗体(GE healthcare)を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、蛍光反応システム(PerkinElmer 社)により、反応したタンパク質を検出した。ローディングコントロールとして、抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を用いた。

(4) 細胞増殖阻害アッセイ

GIST-T1 細胞を、96 ウェルプレートに 2000cells/well でまいた。翌日、細胞に各種濃度のキナーゼ阻害剤を添加し、72 時間後に、Cell Counting Reagent SF (ナカライテスク社)を加えることで発色させ、Microplate reader (Bio-Rad Model 680)にて 450nm の吸光度を測定した。

(5) FAK siRNA と imatinib による増殖阻害アッセイ

FAK の発現を抑制するため、lipofectamine 2000 を用いて GIST-T1 細胞に FAK の siRNA(QIAGEN 社) および、negative control siRNA(QIAGEN 社)をトランスフェクションした。トランスフェクション後、FAK の発現抑制をウェスタンブロット法で確認した。Imatinib を用いた増殖阻害アッセイは、6 ウェルプレートにてし RNA をトランスフェクションした GIST-T1 細胞を、トランスフェクション 4 時間後に 96 ウェルプレートに 2000cells/well でまき、上記方法で細胞増殖アッセイを実施した。

(6) Fyn shRNA 安定発現株の樹立

Fyn ノックダウン RMG-I 細胞株を樹立するため、GISTT-I 細胞を Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) を用いて市販の Fyn short hairpin RNA をコードする plasmid (shRNA Fyn, plasmid KH00147N, SABiosciences [Qiagen], Frederick, MD, USA) をトランスフェクションし、600 $\mu\text{g/ml}$ の Geneticin (Invitrogen) を用いることでセクションした。3 つの GIST-T1-Fyn shRNA クローンを樹立し、B1, B2, B3 と名付けた。コントロールとして、空ベクターをトランスフェクションし、クローン C を樹立した。

(7) アポトーシスアッセイ

GIST-T1 細胞を 6 ウェルプレート 3×10^5 個まき、imatinib あるいは TAG372 (FAK 選択的阻害剤: ノバルティスファーマより提供) を 2 日間処理した。PBS で細胞を洗浄し、caspase-3 fluorometric assay キット (R&D systems 社) を用いて測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

(1) iTRAQ 法によるチロシンリン酸化タンパク質の網羅的解析技術の開発と、imatinib により発現差が変動するリン酸化タンパク質の探索

GIST-T1 細胞に $1\mu\text{M}$ imatinib を添加前と添加後 1, 6, 24 時間後のタンパク質について、imatinib の標的である KIT のチロシンリン酸化レベルとその下流の p44/42 の活性化をウェスタンブロット法により確認した。その結果、GIST-T1 において、時間依存的に c-KIT、および、p44/42 のリン酸化レベルの低下より、活性化が阻害されていることが確認された (図 1)。

そこで、imatinib 暴露時に変動するチロシンリン酸化タンパク質のレベルの網羅的な定

量解析を行う手法の開発を試みた。方法としては、抗チロシンリン酸化抗体ビーズによるチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と、ポストラベル法として使用されている定量的プロテオーム解析試薬である iTRAQ 試薬を組み合わせることとした。GIST-T1 細胞に $1\mu\text{M}$ imatinib を添加前と添加後 1, 6, 24 時間後のタンパク質 40mg を調製し、還元アルキル化・トリプシン消化を行った。抗チロシンリン酸化抗体ビーズによるチロシンリン酸化ペプチドの濃縮時におけるロスの違いがサンプル間でばらつきの原因となることが考えられる。そこで、酵母のエノラーゼタンパク質の配列に由来するチロシンリン酸化ペプチドを合成し、4 種類に等量ずつ加え、質量分析計による測定とデータ解析時に、内部標準ペプチドの発現比率が 1:1 となるように補正した。チロシンリン酸化抗体ビーズを用いたチロシンリン酸化ペプチドの濃縮と、iTRAQ 法による解析の結果、171 種類のチロシンリン酸化ペプチド (134 種類のチロシンリン酸化タンパク質) が同定された。定量解析の結果、各種サンプルに等量ずつ加えた内部標準ペプチドのばらつきは 25% 以下であり、補正を行った。その結果、GIST-T1 細胞に対して、imatinib 処理前と比較して処理後に 11 種類のチロシンリン酸化ペプチド (11 種類のチロシンリン酸化タンパク質) が 1.5 倍以上に上昇する事が明らかになった (表 1)。一方で、21 種類のチロシンリン酸化ペプチド (15 種類のチロシンリン酸化タンパク質) が 0.3 倍以下に低下する事が明らかになった (表 2)。

(2) iTRAQ 法により検出されたタンパク質のチロシンリン酸化の変動のウェスタンブロット法による確認

代表的な結果として、KIT については、Y609, Y703, Y747, Y823, Y936 のチロシンリン酸化の減少が認められた。対照的に、imatinib 処理によって、FYN (Y420) と FAK (Y576) のリン酸化レベルの上昇が検出された。imatinib 処理により FYN (Y420) のリン

酸化レベルの上昇はウェスタンブロット法でも確認されたが、その他の Src ファミリーキナーゼのリン酸化レベルの上昇は認められなかった(図 2-A)。同様に、imatinib 処理により FAK (Y576)のリン酸化レベルの上昇とともに(図 2-B)、iTRAQ 解析では検出されなかったが、FAK の活性化と関係する FAK (Y397)のリン酸化上昇がウェスタンブロット法でも確認された(図 2-B)。このことから、iTRAQ 法によるチロシンリン酸化タンパク質の網羅的な解析は抗癌剤処理時に変動するタンパク質のチロシンリン酸化レベルを探索する上で適した手法である事が確認された。

(3) Fyn のノックダウンにより imatinib 感受性が向上する

GIST-T1 は imatinib 処理によって Fyn 及び、FAK の活性化が生じる。これらの活性化を抑制することが imatinib の感受性を向上させることにつながるか検討することとした。GIST-T1 において、Fyn の shRNA 安定発現株を樹立する事で、Fyn の発現を持続的にノックダウンさせたクローン B1, B2, B3 及び、コントロールベクター由来のクローン C を樹立した。クローン C に対して、クローン B1, B2, B3 は Fyn の発現が低下していることがウェスタンブロット法で確認された(Fig3-A)。さらに、これらのクローンに対して imatinib の IC₅₀ を測定した結果、クローン C に比べてクローン B1, B2, B3 では imatinib の IC₅₀ が有意に低下していることが確認された(Fig3-A)。

(4) FAK のノックダウンにより imatinib 感受性が向上する

続いて GIST-T1 において FAK の siRNA を用いて、FAK の発現をノックダウンさせることが imatinib の感受性を向上させることにつながるか検討することとした。その結果、FAK の siRNA をトランスフェクションさせ、imatinib の IC₅₀ を測定した結果、コントロール siRNA 処理群と比較して FAK の siRNA

処理群では imatinib の IC₅₀ が有意に低下することが明らかとなった(Fig3-B)。さらに、GIST-T1 において FAK 特異的阻害剤である TAG372 を用いて FAK の活性阻害と imatinib を併用すると、imatinib の感受性が高まることが明らかとなった(Fig3-C)。

(5) imatinib 耐性株において FAK の活性化が検出される

GIST-T1 に imatinib を低濃度で暴露して徐々に濃度を高めることにより、GIST-T1R2 と GIST-T1R8 の 2 種類の imatinib 耐性株を樹立した。これらの耐性株においては親株と比較して FAK の恒常的な活性化が検出された(Fig4-A)。GIST-T1R2 に TAG372 を処理すると濃度依存的な FAK の活性化の阻害が核にされた(Fig4-B)。そこで、imatinib 耐性 GIST-T1 株において、TAG372 処理が imatinib の感受性を高めるかどうかを解析した結果、GIST-T1R2 に対して、TAG372 は濃度依存的に imatinib の感受性を高める効果を示すことが明らかとなった(Fig4-C)。さらに、GIST-T1R2 に対して、TAG372 は imatinib と併用することで、アポトーシスを誘導する事で imatinib 耐性株に対して抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった(Fig4-D)。

E. 結論

チロシンリン酸化ペプチドの濃縮と iTRAQ 法により、チロシンリン酸化ペプチドの網羅的定量法を確立した。本手法により、GIST における imatinib 獲得耐性のバイパス経路として Fyn と FAK の活性化の関与を明らかにした。GIST の imatinib 獲得耐性に Fyn、および、FAK が創薬標的分子、および、コンパニオン診断薬となり得る可能性が示唆された。

今回、GIST 細胞株を使用した。細胞株よりも癌の性質を保持している事で知られている GIST 患者より調製した Cancer Tissue-Originated Spheroids (CTOS) を用