

201220073A

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測  
診断法の開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久家貴寿

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測

診断法の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久家貴寿

平成24(2012)年5月

## 目次

I.	総括研究報告	
	キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法の開発	
	久家貴寿	———— 1
II.	分担研究報告	
1.	研究資源の確保や共同研究体制の構築などの研究全般にわたるサポート	
	朝長毅	———— 15
2.	キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチド SRM 定量法の開発に関する研究	
	足立淳	———— 20
3.	キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に用いる臨床検体の収集（実施責任者）	
	松原久裕	———— 28
4.	キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に用いる臨床検体の収集（実施者）	
	星野敢	———— 31
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	———— 34
IV.	研究成果の刊行物・別刷	———— 35

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法の開発

研究代表者 久家貴寿 独立行政法人医薬基盤研究所

プロテオームリサーチプロジェクト 研究員

### 研究要旨

抗 EGFR チロシンキナーゼ抗体薬は大腸がんなどのがん治療薬として用いられている。抗 EGFR 抗体薬の効果予測は KRAS 遺伝子変異の有無でなされているが、適応患者でも 30～40%程度の有効率である。抗 EGFR 抗体薬の耐性化メカニズムとしては、EGFR シグナル伝達機構の下流に位置するキナーゼもしくは代替するキナーゼの活性化が示唆されている。したがって、癌細胞におけるキナーゼの活性化状態を包括的に解析することができれば、抗 EGFR 抗体薬の効果予測精度が向上すると考えられる。本研究の目的は、三連四重極型質量解析計を用いた SRM 法でキナーゼの活性化状態を包括的に解析する技術を確立することであり、遺伝子検査法とは全く異なる抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法を開発することである。本研究は 2 年計画であり、一年目に技術開発を行い、二年目にその技術を検証する。一年目である平成 24 年度はキナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の基盤技術開発を行った。開発を進めた技術は大きく分けて 2 通りである。一つはキナーゼの活性化指標リン酸化修飾を直接、SRM 法で定量する技術（方法 1）であり、もう一つは活性型キナーゼをアフィニティー精製し、精製したキナーゼを SRM 法で定量する技術（方法 2）である。方法 1 については、まず、リン酸化ペプチド濃縮法や安定同位体標識内部標準ペプチド添加法などを確立し、特定のタンパク質リン酸化修飾レベルを SRM 定量する技術を確立した。さらに、キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドの SRM 測定パラメータリストを作るために、400 種類弱の活性型リコンビナントキナーゼの LC-MS/MS 測定を行った。方法 2 については、活性型キナーゼをアフィニティー精製し、LC-MS/MS で測定するプロトコルを確立した。24 種類の抗体で、少なくとも 40 種類以上の活性型キナーゼの精製が可能になった。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 24 種類を抗 EGFR 抗体薬感受性株、耐性株に分類し、活性型キナーゼ抗体を用いた解析で活性型キナーゼのプロファイリングを進めた。本研究成果により、平成 25 年度前半中に SRM 測定パラメータリストが完成し、キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法が確立する見通しとなった。

## 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

足立淳：独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクト研究員

松原久裕：千葉大学大学院 教授

星野敢：千葉大学医学部附属病院 助教

## A. 研究目的

抗 EGFR チロシンキナーゼ抗体薬は大腸がんなどのがん治療薬として用いられている。抗 EGFR 抗体薬の効果予測は、EGFR シグナル伝達機構の下流分子 KRAS の恒常的活性化型遺伝子変異の有無で行われている。KRAS 遺伝子野生型の患者が投薬適応になるが、適応となったとしても依然として 30～40%程度の有効率である。抗 EGFR 抗体薬は皮膚障害などの特徴的な副作用があり、費用も高額なため、不適切な投薬は患者にとっての不利益である。

抗 EGFR 抗体薬耐性化のメカニズムとしては、EGFR シグナル下流キナーゼの恒常的活性化や、代替キナーゼの活性化などが考えられている。EGFR シグナル下流の BRAF キナーゼの恒常的活性化が良く知られた耐性化の例である。したがって、大腸癌組織においてどのようなキナーゼが活性化状態にあるのかを包括的に解析することができれば、抗 EGFR 抗体薬の効果予測精度が向上すると考えられる。

多くのキナーゼの酵素活性は高次構造レベルで制御されており、その高次構造は活性化ループのリン酸化修飾によって制御されている。そのため、活性化ループのリン酸化修飾はキナーゼの活性化状態を知るサロゲートマーカーとなる。活性化指標リン

酸化修飾はリン酸化抗体により検出することが可能になってはいるが、依然としてキナーゼの活性化状態を包括的に解析する手法は普及していない。

本研究では、三連四重極型質量解析計を用いた SRM 法でキナーゼ活性化指標リン酸化修飾レベルを網羅的に解析する技術を開発する。その技術を、抗 EGFR 抗体薬の効果予測診断法に応用することが本研究の目的である。本研究は 2 年計画であり、平成 24 年度にキナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の技術開発を行い、平成 25 年度にその技術を抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法に応用する (図 1)。

## B. 研究方法

### <キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の開発>

本研究では EGFR シグナル伝達機構関連キナーゼの活性化指標リン酸化修飾を、SRM 法で一度に定量する技術を開発する。開始当初計画ではキナーゼの活性化指標リン酸化修飾を SRM 法で直接定量する技術 (方法 1) のみを開発する予定であったが、活性化型キナーゼのアフィニティー精製と SRM 法を組み合わせた技術 (方法 2) の開発も計画に加えた。方法 2 はリン酸化抗体を必要とするが、感度が高い。

### 方法 1. キナーゼ活性化指標リン酸化修飾直接定量法

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し、各種キナーゼの活性化指標リン酸化修飾を含むリン酸化ペプチドを SRM 法で直接定量する。測定方法確立までの主な検討項目は、(1) リン酸化

ペプチド濃縮法および定量法、(2) 標的となるキナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドの配列情報の取得、(3) SRM測定パラメータの設定(トランジション、コリジョンエネルギー設定など)である。

#### **方法2. 活性型キナーゼアフィニティー精製とSRM法を組み合わせた技術の開発**

キナーゼ活性化指標リン酸化抗体で活性型キナーゼを精製した後に、SRM法で活性型キナーゼを定量する。開発までの検討項目は、(1) アフィニティー精製可能な抗体の選択、(2) 活性型キナーゼアフィニティー精製法の最適化、(3) SRM測定標的配列と測定条件の決定である。これらの項目を検討した。

#### **安定同位体標識内部標準を用いた定量技術開発**

キナーゼ活性化レベル測定SRM法の定量精度を高めるために、安定同位体標識内部標準ペプチド添加法あるいはSuper-SILAC法を用いる。内部標準ペプチド添加法はキナーゼを酵素消化した後に、安定同位体標識した合成ペプチドを内部標準として添加し、相対定量する。Super-SILAC法では、細胞抽出液の段階で検体に安定同位体標識した内部標準細胞抽出液を添加し、相対定量する技術である。Super-SILAC法ではアフィニティー精製などを行う前に内部標準を添加するため、測定誤差を低く抑えることができる。安定同位体標識内部標準細胞抽出液は、安定同位体標識リジン、アルギニンを含む培地で継続的に培養した細胞株から抽出する。複数の安定同位体標識細胞株の抽出液を混合し内部標準細胞抽出液とする。

#### **<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、BR AF 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。各細胞株を2000-6000個96穴プレートに撒き、0、0.5、5、50 µg/mlのセツキシマブを添加し、コントロール(0 µg/ml)との比較から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。

#### **<大腸癌外科的切除標本の収集および倫理面への配慮>**

千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科を受診する者のうち、検査結果から消化管腫瘍と診断された者の外科的切除標本を収集した。研究全般に当たり、平成17年4月1日施行の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。プロトコルは千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査委員会で承認されたもの(課題名:消化管腫瘍における遺伝子・蛋白動態解析研究)を用いた。詳細は松原久裕の分担研究報告書に記載した。

大腸癌手術切除標本をプロテオーム解析するにあたっては、独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト

研究倫理審査委員会から承認されたプロトコルに従う（課題名：プロテオーム技術を用いた消化器癌、乳癌のバイオマーカー探索研究）。詳細は、朝長毅の分担研究報告書に記載した。

#### <質量解析計>

ショットガンプロテオーム解析に用いた質量解析計

LTQ Orbitrap XL, LTQ Orbitrap Velos, Q-Exactive (全て Thermo Scientific 社製)

SRM 法に用いた質量解析計

TSQ Vantage (Thermo Scientific 社), 4000 QTRAP (AB Sciex 社)

### C. 研究結果

#### <キナーゼ活性化レベル測定SRM法の技術開発>

##### 方法 1. キナーゼ活性化指標リン酸化修飾直接定量法の開発

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直接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ため、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)法の最適化を行った。下記プロトコルにより安定して95%以上の割合でリン酸化ペプチドを濃縮することが可能になった (Narumi et al., 2012; Shiromizu et al., 2012)。

[IMAC法のプロトコル]

Ni<sup>2+</sup>イオンをキレートしたProbondレジンからIMACレジンを作成する。EDTAでNi<sup>2+</sup>イオンをはずし、その後Fe<sup>2+</sup>イオンをキレートさせる。タンパク質総量1mgにつき250 μlのIMACレジンをを用いる。サンプル添加後、60% アセトニトリル/0.1% TFA溶液で洗浄し、1% リン酸溶液で溶出する。

キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドをSRM測定するためには、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する必要がある。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)の設定に用いる(図2)。

キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドを実測するために、大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析と396種類の活性型リコンビナントキナーゼの解析を行った。活性型リコンビナントキナーゼの解析で特に良好な結果が得られており、キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドのMS/MSスペクトルを数多く取得することができた(詳細は足立淳の分担研究報告書を参照)。

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。定量の精度を高めるために安定同位体標識内部標準ペプチド添加法を確立した(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法でリン酸化

ペプチド精製し、SRM測定する(図3)。一度に数十種類のターゲットを定量することも可能になった。

## 方法2. 活性型キナーゼのアフィニティー精製とSRM法を組み合わせた方法の開発

活性型キナーゼのアフィニティー精製は活性化指標リン酸化修飾に対する抗体で行うが、一般的なプロトコルでは精製することができなかった。キナーゼの高次構造が立体障害となり抗原-抗体反応が阻害されていると考えられた。そこで、変性条件下(0.3% SDS、1 mM DTT、1% NP-40を含むPBSで煮沸)でキナーゼの立体構造を破壊した後、SDSを3倍希釈してからアフィニティー精製する方法を確立した。

40種類以上の市販抗体を用いて変性条件下アフィニティー精製法を検討した結果、24種類がアフィニティー精製可能であった(図4)。上記抗体で少なくともAkt1/2/3、Erk1/2、Mek1/2、JNK1/2/3、PKC $\alpha$ 、PKC $\gamma$ 、PKC $\mu$ 、PKC $\zeta$ 、AMPK1 $\alpha$ 、PAK4/5/6、p38、p90RSK、Lyn、BTK、MARK1、PDPK1、NAK、ISR、GCN、Eph A3/4/5、ZAP70、FAK、PRK1/2/3、TAOK1/2/3、PKA $\gamma$ のアフィニティー精製が可能になった。

LC-MS/MS測定ではアフィニティー精製に用いた抗体の持ち込みが測定の妨げになる。そこで、アフィニティー精製用レジンと抗体とをクロスリンクする方法を検討した。Protein G beadsにDimethyl pimelimidate(DMP)で抗体をクロスリンクする方法は抗体活性の低下が著しく使用

不可能であった。いくつかのレジンを検討した結果、M270 Epoxy DynabeadsもしくはHydrazide修飾ビーズを用いることで、抗体の活性低下を抑えてクロスリンクできることが分かった。

活性型キナーゼをアフィニティー精製した後、トリプシン消化し、ショットガンLC-MS/MS解析するとペプチドフラグメントが得られる。これらのMS/MSデータから最適なSRM標的ペプチドを選択し、Pinpoint softwareでSRMトランジションを設定する(図5)。平成25年度の前半中に、各種活性型キナーゼについてのSRM標的配列と測定パラメータをリスト化する。

活性型キナーゼアフィニティー精製-SRM法では、定量法としてSuper-SILAC法を活用する。現在までに、HCT116, SW480, SW620, HeLaS3, U2OS, HEK293の安定同位体標識細胞株を作成し、さらに12種類のSILACラベル乳癌培養細胞株も調整中である。これら細胞株の抽出物を混合して内部標準とする。

## <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、24種類の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(図6)、キナーゼ活性化指標リン酸化抗体のWestern blot法でそれらのキナーゼ活性化レベルをプロファイリングする。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(図7)。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7)。キナーゼ活性化指標リン酸化抗体を用いた Western blot 解析は現在進行中であるが、BRAF V600E 変異体では Mek1/2 の活性化レベルが上がっていること、KRAS G12V 変異体では Akt の活性化レベルが上がっていることなどが推測通りに検出されている(図8)。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が、抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有用であることを示唆している。

#### <大腸癌外科的切除標本の収集>

平成25年度の検証で用いる大腸癌外科的切除標本を千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科で収集した。約一年間で70症例の大腸癌組織とその周辺非癌部組織を収集した。できる限り切除後迅速に組織を凍結保存することを心がけた。38症例は、切除後1時間以内に凍結保存した。セツキシマブもしくはパニツムマブを実際に投与した症例は6症例であった。

#### D. 考察

平成24年度はキナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の基盤的技術開発を進めた。技術の革新性と難易度を考慮し、2つの異なるアプローチで技術開発を進めた。

一つはキナーゼ活性化指標リン酸化ペプチド直接定量法であり、リン酸化抗体を必要としない点が革新的である。リン酸化ペ

プチドは、非リン酸化ペプチドが大量に存在する条件下では質量解析計での検出が困難であるため、比較的難易度は高い。リン酸化ペプチドの検出を可能にするために、IMAC 法を用いた高効率リン酸化ペプチド濃縮法を確立し、特定のリン酸化ペプチドを SRM 法で定量する技術を本年度に完成させた。SRM 測定パラメータリストを作成する段階が技術開発の律速となるが、活性型リコンビナントキナーゼの MS/MS スペクトルを用いることで SRM 測定パラメータ設定が簡便になった。400 種類弱の活性型リコンビナントキナーゼについて MS/MS スペクトルの取得が終わったため、平成25年度前半中に SRM 測定パラメータリストが完成するものと思われる。

もう一つの方法は活性型キナーゼアフィニティー精製-SRM 法である。リン酸化抗体を必要とする点では革新性に劣るが、技術的な難易度は比較的低い。活性化リン酸化ペプチド直接定量法とは異なり、SRM 標的ペプチドを自由に選べる点が難易度を下げる理由である。リン酸化抗体を必要とする点では抗体アレイ法などと同じではあるが、サンドイッチする抗体を必要としない点が優位点と言える。本測定技術開発では活性型キナーゼのアフィニティー精製法の確立が律速となるが、本年度にその方法(変性条件下精製法)を確立した。本法で測定できるキナーゼの種類は、アフィニティー精製用キナーゼ活性化指標リン酸化抗体のレパートリーに依存する。現在のところ、使用可能な抗体は24種類であり、少なくとも40種類以上のキナーゼが標的となる。本法では、活性型キナーゼを精製した後に特異的なペプチド配列を標的として SRM 定量す

るため、精製用抗体に要求される特異度はそれほど高くは無い。したがって、比較的容易に精製用抗体のレパートリーを増やしていけるのではないかと考えている。

抗 EGFR 抗体薬に耐性である KRAS G12V 変異株、BRAF V600E 変異株では Mek や Akt の活性化レベルが推測通り亢進しており、キナーゼの活性化状態を調べるのが抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有用であ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ーが存在する可能性がある。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で、新規活性化キナーゼマーカーの探索を進めている。

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法は抗 EGFR 抗体薬だけでなく、その他のキナーゼ標的薬の効果予測診断法にも応用できると考えられる。現在、様々な種類のキナーゼ標的抗がん剤の開発が進められており、将来的には、キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法を用いることでがん患者が最適なキナーゼ阻害薬を選択できるようになっていくと期待している。

## E. 結論

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の基盤技術の開発が進展した。また、キナーゼの活性化状態を調べるのが抗 EGFR 抗体薬の効果予測に有用である可能性も示唆された。これらの成果から、平成 25 年度前半にキナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の技術が完成し、抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法への応用化が進む見込みとなった。

## F. 健康危険情報

特記事項は無い。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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. *Journal of Proteome Research*, DOI: 10.1021/pr300825v, 2013

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, Nomura F. Serum fibrinogen alpha C-chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9) as a biomarker for early detection of hepatic fibrosis related to hepatitis C virus. *Proteomics Clinical Applications*, DOI: 10.1002/prca.201200094, 2013

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 phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *Journal of Proteome Research*, 11: 5311-5322, 2012

### 2. 学会発表

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

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

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

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

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, 渡邊史夫, 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

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

発明の名称: 「大腸癌治療剤」

発明者: 朝長 毅、久家貴寿、久米秀明

出願日: 2012年6月15日(国内出願)

出願番号: 特願 2012-135619 (国内出願)

出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所

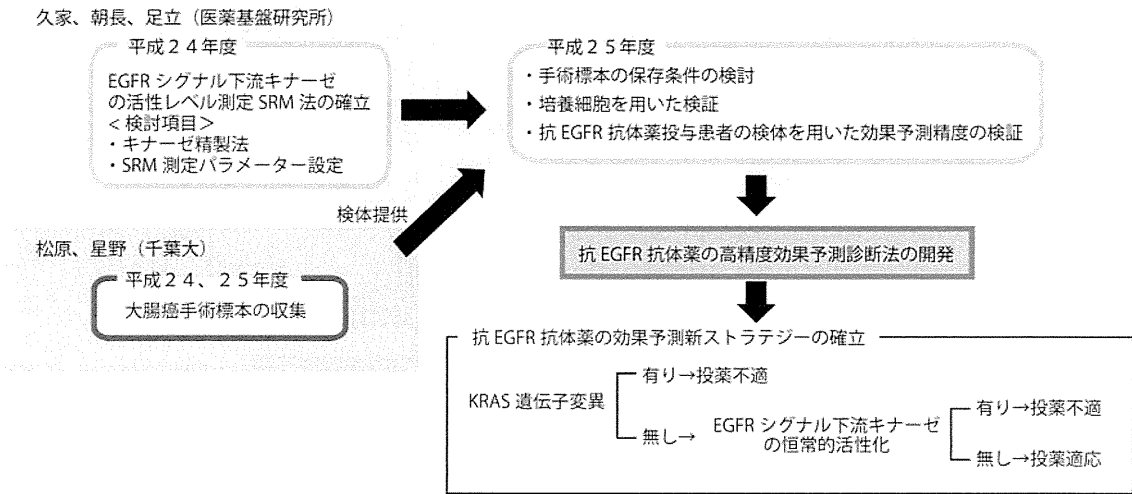
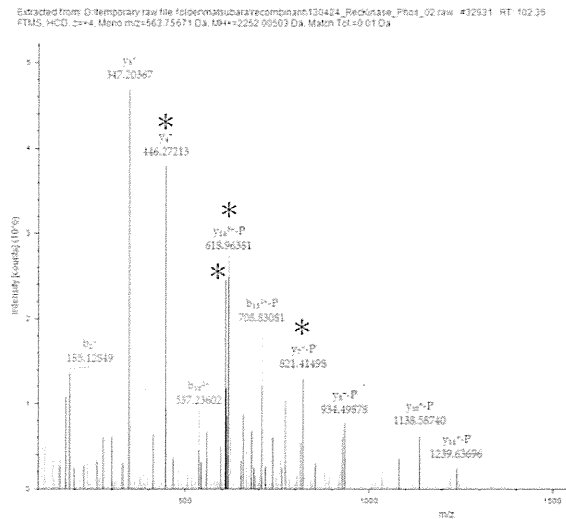


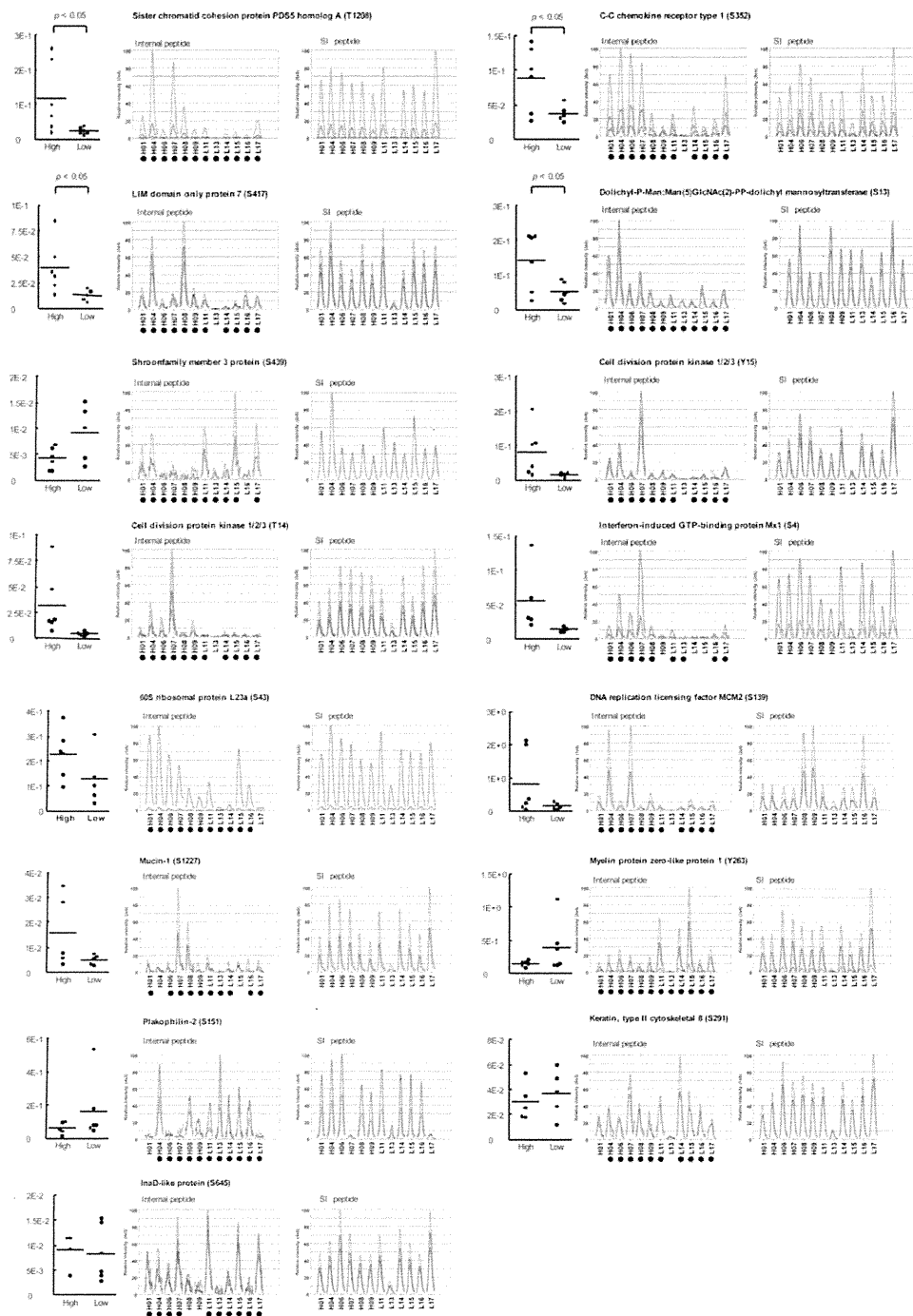
図 1. キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果予測法開発のロードマップ



Sequence	Transition 1	Ch.	Transition 2	Frg.	Ch.	Intensity	CE
IADPEHDHTGFLT[Phosphoryl]EYVATR	563.7559	4	446.2716	y4	1	3800000	21.0372
			618.9636	Y_neutral16	3	2700000	
			609.335	y5	1	2500000	
			821.4146	Y_neutral7	1	1300000	

図 2. 活性化指標リン酸化ペプチドの SRM 測定条件パラメーター設定例

Erk1 の MS/MS スペクトルデータを Pinpoint Software で解析し、トランジションとコリジョンエネルギー (CE) を決定する。Ch.、イオン価数; Frag.、MS/MS フラグメントイオン; アスタリスク、トランジション 2 のピーク。



### 図3. リン酸化ペプチドのSRM測定

12検体の乳癌組織抽出液 500  $\mu$ g をトリプシンで消化した後に、15種類の安定同位体標識内部標準ペプチドを添加した。IMAC法でリン酸化ペプチドを精製した後、TSQ Vantageを使ってSRM測定を行った。中央のグラフは内在性のリン酸化ペプチドの存在量をピークエリアで示しており、右のグラフは内部標準ペプチドのピークエリアを示す。内在ペプチドのピークエリアを内部標準で補正した定量値が左のドットプロットデータである。これらのデータは乳癌予後良好群と不良群を比較したデータである。

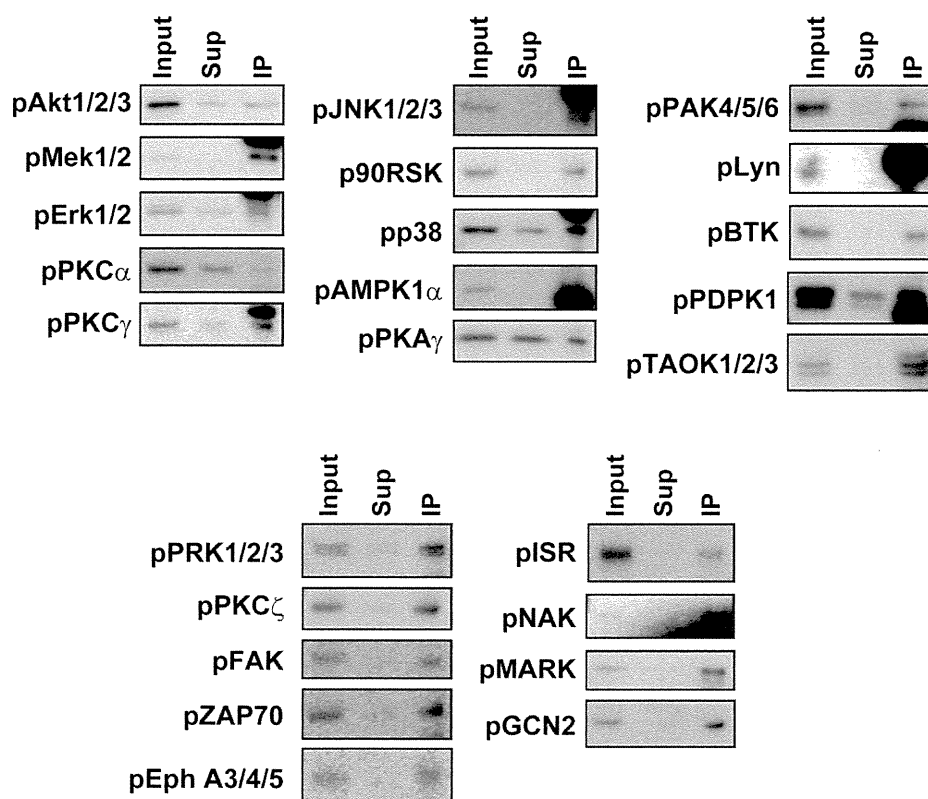


図4. キナーゼ活性化指標リン酸化抗体によるアフィニティー精製  
 活性化型キナーゼを変性条件下精製法で精製し Western blot 解析を行った。免疫沈降前 (Input) と後 (Sup) の細胞抽出液、免疫沈降ビーズ (IP) に存在する活性化型キナーゼの量を比較した。24 種類の抗体がアフィニティー精製に使用可能であることが示唆された。一部の免疫沈降ビーズフラクションでは免疫沈降の用いた抗体のバンドが検出されている。

## Akt1

```

1  MSDVAIVKEG WLHKRGEYIK TWRPRYFLLK NDGTFIGYK RPQDVQOREA
51  PLNNFSVAQC QLMKTERPRP NTFIIRCLQW TTVIERTFHV ETPEEEEWT
101 TAIQTVADGL KKQEEEEEMDF RSGSPSDNSG AEEMEVSLAK PKHRVTMNEF
151 EYLKLLGKGT FGKVLVKEK ATGRYYAMKI LKKEVIVAKD EVAHTLTENR
201 VLQNSRHPFL TALKYSFQTH DRLCFVMEYA NGGELFFHLS RERVFSEDRA
251 FYGAEIVSA LDYLVHSEK VYRDLKLENL MLDKDGHIKI TDFGLCKEGI
301 KDGATMKTFC GTPEYLAEV LEDNDYGRAV DWWGLGVVMY EMMCGRLPFY
351 NQDHEKLFEL ILMEEIRFPR TLGPEAKSLI SGLLKKDPKQ RLGGSSEDAK
401 EIMQHRFFAG IVWQHVEKK LSPPFKPQVT SETDTRYFDE EFTAQMITIT
451 PPDQDSSMEC VDSERRPHFP QFSYSASGTA
  
```

Sequence	Transition 1	Ch.	Transition 2	Frg.	Ch.	Intensity	CE
NDGTFIGYK	507.7481	2	785.4186	y7	1	10215	20.3275
			627.3495	y5	1	4274	20.3275
			367.1971	y3	1	3115	20.3275
			480.2811	y4	1	1486	20.3275
EEWTTAIQTVADGLK	831.4226	2	944.5406	y9	1	15714	28.7107
			1015.578	y10	1	10519	28.5549
			703.3979	y7	1	8439	28.7107
			1116.625	y11	1	6820	27.5444
FYGAEIVSALDYLVHSEK	647.9912	3	816.4171	y15	2	189399	21.2984
			897.9488	y16	2	17026	21.2984
			631.3245	y11	2	14027	21.2984
			752.3878	y13	2	9475	21.2984

EEWTTAIQTVADGLK の MS/MS スペクトル

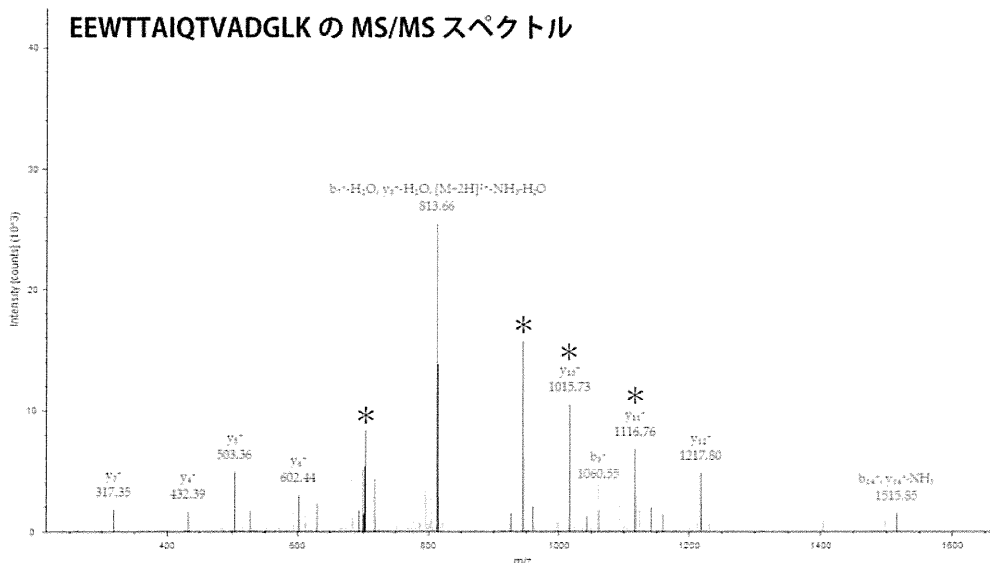


図 5. Akt1 の SRM 測定パラメータ設計

活性型 Akt をアフィニティー精製し LTQ Orbitrap Velos で解析した。同定されたペプチドの中から、1. ユニーク配列である、2. メチオニンを含まない、3. イオン強度が高い等の条件で標的配列を決定する。MS/MS スペクトルデータを Pinpoint Software で解析し、トランジションとコリジョンエネルギー (CE) を決定する。枠で囲んだ配列、標的配列; Ch.、イオン価数; Frag.、MS/MS フラグメントイオン; アスタリスク、トランジション 2 のピーク。

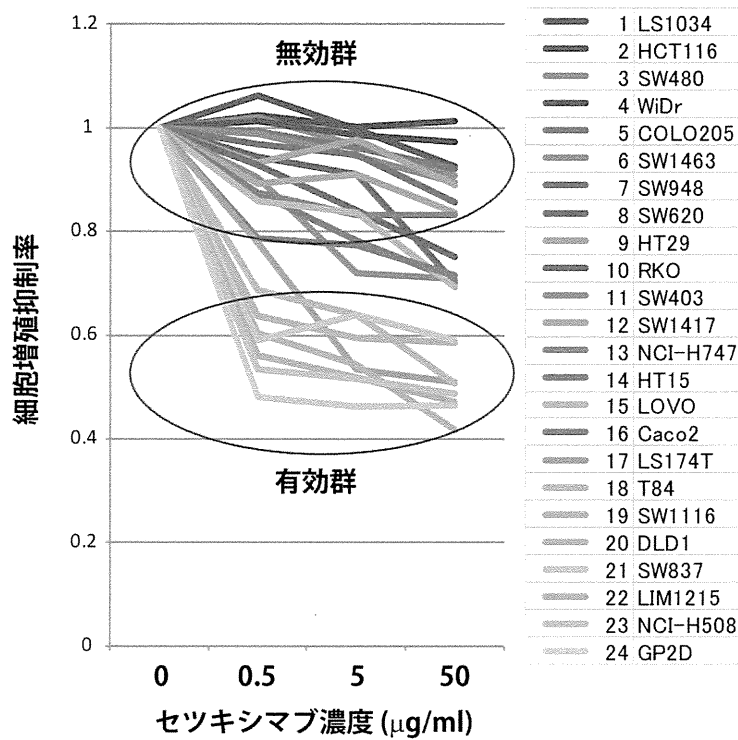


図6. 大腸癌培養細胞株のセツキシマブ感受性分類

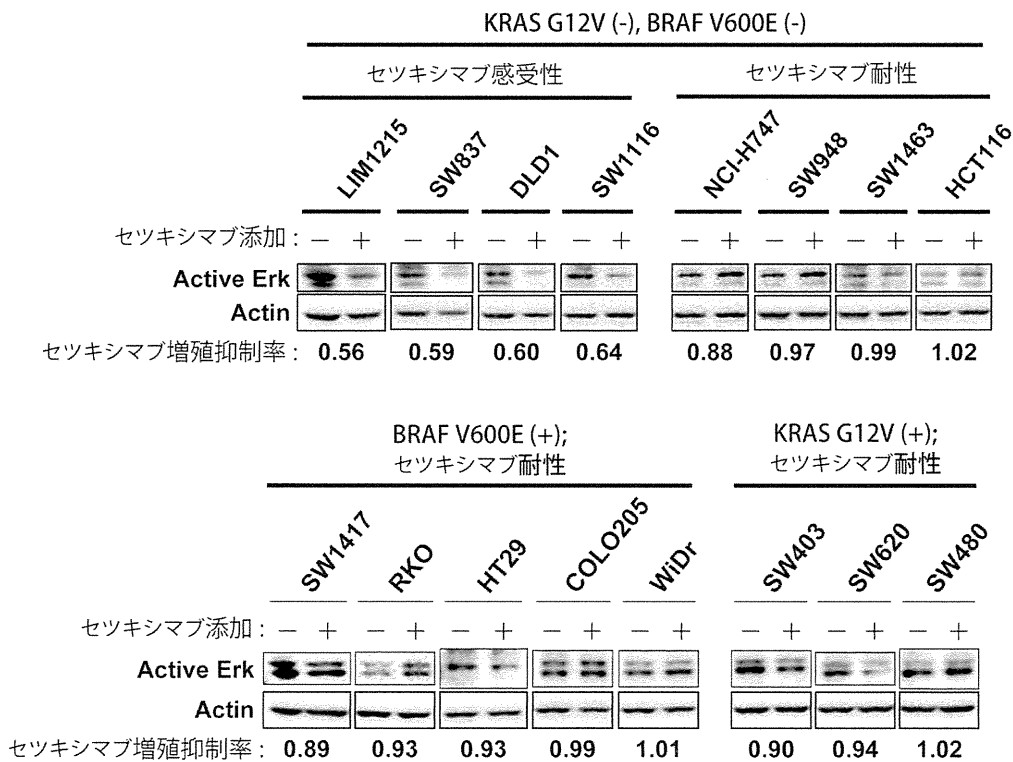


図7. セツキシマブ処理した大腸癌培養細胞株の Western blot 解析

各種大腸癌培養細胞株を 0.5  $\mu\text{g/ml}$  セツキシマブで処理し、Western blot 解析を行った。



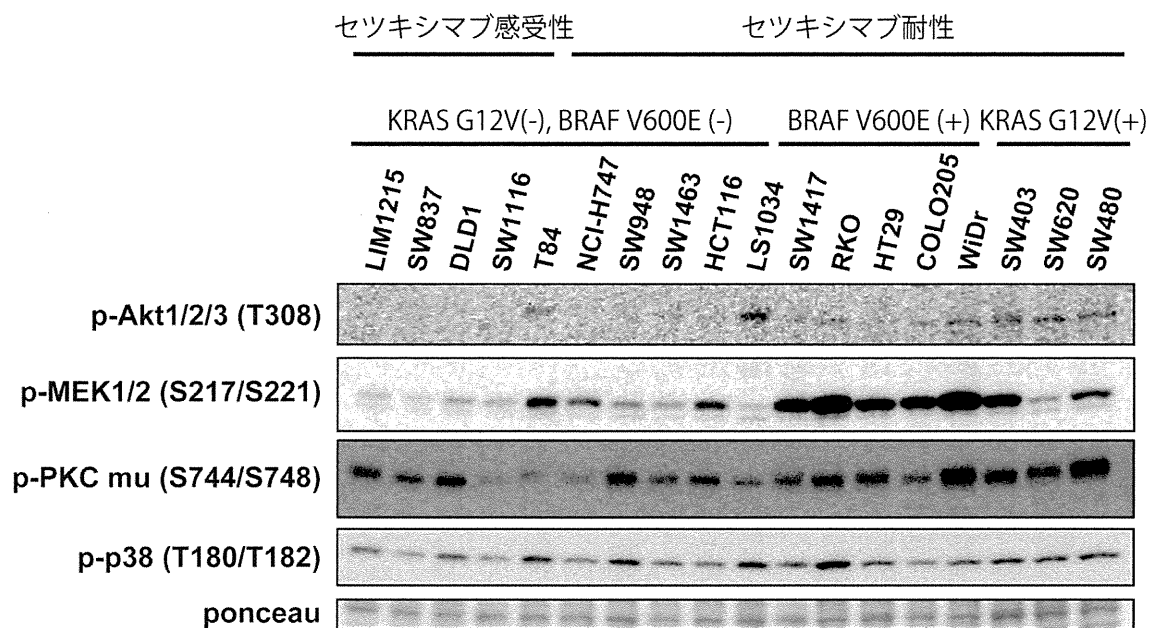


図8. 活性型キナーゼ抗体を用いた大腸癌培養細胞株の Western blot 解析

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

研究資源の確保や共同研究体制の構築などの研究全般にわたるサポート

研究分担者 朝長毅 独立行政法人医薬基盤研究所  
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

### 研究要旨

本研究課題の全般をサポートする。1. 質量解析計などの大型研究機器の配備、2. 共同および協力研究体制の構築、3. 研究生命倫理規定の策定、4. 研究計画立案への参画などが主な内容である。これらにより、キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の開発が円滑に進んだ。

### A. 研究目的

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法による抗 EGFR 抗体薬効果診断法を開発するには、質量解析計などの大型研究機器の配備、臨床検体入手・解析などのための共同研究体制構築および研究生命倫理規定の策定、質量解析計運用のための協力研究員の整備が欠かせない。上記研究体制を構築し、研究立案に参画することで本研究課題の円滑な進行を促すことが目的である。

#### <共同研究体制の構築>

1. 千葉大学：臨床検体の収集
2. メルクセローノ社：セツキシマブの入手
3. カルナバイオサイエンス社：活性型リコンビナントキナーゼの入手

#### <協力研究員体制の構築>

質量解析計の運用にあたり、研究員 2 人、技術補佐員 2 人を配備した。

### B. 研究方法

#### <大型研究機器の配備>

本研究で用いる大型研究機器を配備した。

1. 質量解析計

LTQ Orbitrap XL 1 台、LTQ Orbitrap Velos 1 台、Q Exactive 1 台、TSQ vantage 2 台、4000 QTRAP 1 台。

2. その他

遠心乾燥機 4 台、島津 Prominence UFLC 3 台、細胞培養クリーンベンチ 3 台など。

#### <大腸癌組織の使用に関する研究生命倫理規定の策定>

千葉大学医学部附属病院で収集された大腸癌外科的切除標本を独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームプロジェクトで解析するに当たって研究生命倫理規定を策定し、研究実施責任者として独立行政法人医薬基盤研究所プロテオームリサーチプロジェクト倫理審査委員会の承認を得た（課題：プロテオーム技術を用いた消化器癌、乳癌のバイオマーカー探索研究）。

### <個人情報保護の方法>

得られた研究成果は、対象者の同意のもとに研究目的のみに使用される。個人を特定して公表されることは無いので、プライバシーは保護される。研究成果は漏洩のないように厳重に管理されるため、提供者が不利益を受ける危険性は極めて低い。

### C. 結果と考察

質量解析計などの大型研究機器を安定運用させた。それにより、キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に関するサンプルの LC-MS/MS 解析が滞りなく行われた。千葉大学との共同研究体制構築により、臨床検体を用いた検証が可能になった。メルクセローノ社との共同研究により、抗 EGFR 抗体薬を用いた研究が可能になり、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が進展した。カルナバイオサイエンスとの共同研究により、活性型リコンビナントキナーゼの入手が可能になった。活性型リコンビナントキナーゼを用いることにより、活性化指標リン酸化ペプチドの SRM 測定パラメータ設定が簡便に行えるようになった。大腸癌外科的切除標本の使用に関して、研究生命倫理規定を策定し、研究実施における責任を負った。研究期間内で研究倫理的な問題は一切起こっていない。

### D. 結論

研究基盤を構築することにより、キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法の開発が円滑に進んだ。

### E. 研究発表

#### 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 Phosphoproteomics 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).

#### 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 朝長 毅, 佐野聖三, 渡邊史生, 田上真次, 大河内正康, 武田雅俊, 熊谷久美子, 常見雅彦: アルツハイマー病サロゲートマーカーの定量系の確立と診断への応用. 第 31 回日本認知症学会, つくば, 2012 年 10 月 26-28 日.

⑥ 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 久米秀明, 渡邊史生, 村岡 賢, 石濱 泰, 小寺義男, 松下一之, 松原久裕, 朝長 毅: 大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索とその検証. 第 10 回日本プロテオーム学会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日

② 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. 日本ヒトプロテオーム機構第 10 回大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日

③ 村岡 賢, 久米秀明, 渡邊史生, 桑野晶喜, 足立 淳, 佐藤三佐子, 川崎 直子, 石濱 泰, 石飛真人, 稲治英生, 小寺義男, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅: 乳癌膜タンパク質の大規模 iTRAQ-shotgun と SRM 解析によるバイオマーカータンパク質の検証. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日

④ 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

⑤ 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, 渡邊史夫, 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

⑥ 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

⑦ 佐野聖三, 田上信次, 大河内正康, 渡邊史生, 熊谷久美子, 常見雅彦, 朝長 毅: Immuno-SRM/MRM 法を用いた血漿中のアルツハイマー病サロゲートマーカーペプチド APL1  $\beta$  定量のための前処理法の検討. 第 10 回日本プロテオーム学会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日

⑧ 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅: 同所性移植モデルによる大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日

⑨ 川崎直子, 平野賢一, 原 康洋, 足立 淳, 渡邊史生, 朝長 毅: プロテオミクス, トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26 日-27 日

⑩ 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

⑪ 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