Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013.9.14-18.

49. Yamashita, A., Kurosawa, H., Hirano, H. and Ohno, S. An efficient affinity purification method for interaction proteomics in mammalian cells. Human Proteome Organization 12th Annual World Congress, Pasifico Yokohama, Yokohama, 2013. 9.14-18.
50. Masuda M, Honda K, Yamada T. Genomic and proteomic profiling of signaling pathways targeted by a multi-kinase inhibitor, sorafenib. AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR) ANNUAL MEETING 2013 April 6–10, 2013 (Washington DC, USA)
51. Yamada T, Masuda M, Chen W-Y, Chen C-L, Honda K. Phosphoprotein profiling with high-density fluorescence protein microarray reveals a predictor of response to the multi-kinase inhibitor sorafenib. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY (ASCO) ANNUAL 2013 MEETING May 31–June 4, 2013 (Chicago, USA)
52. Honda K, Yamada T, et al. Rapid biomarker validation by high-density plasma protein array. 3RD REVERSE-PHASE PROTEIN ARRAY GLOBAL WORKSHOP Nov 12–13, 2014 (Kobe, Japan)
53. Masuda M, Yamada T, et al. Phospho-profiling of signaling pathways targeted by a multi-kinase inhibitor, sorafenib. 3RD REVERSE-PHASE PROTEIN ARRAY GLOBAL WORKSHOP Nov 12–13, 2014 (Kobe, Japan)
54. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの秘密に迫る. 第 5 回お茶の水 Hematology セミナー, 東京, 2013 年 4 月 17 日
55. 中山敬一: 次世代プロテオミクスによる癌代謝と細胞周期の統合的理解：90 年来の謎に挑む. 第 17 回日本がん分子標的治療学会, 京都, 2013 年 6 月 13 日
56. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが解き明かすがんの秘密. 第 40 回佐島シンポジウム, 仙台, 2013 年 6 月 14 日
57. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新地平：90 年来のがんの秘密に挑む. 第 40 回 BMS コンファレンス, 宮崎, 2013 年 7 月 8 日
58. 中山敬一: ワールブルグ効果とは何か？：全てを計ることによって明らかとなったがん代謝の真実. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013 年 10 月 4 日
59. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来の謎を解く. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会・第 38 回日本比較内分泌学会大会・合同大会, 宮崎, 2013 年 10 月 25 日
60. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新地平：90 年来のがんの謎に挑む. 金沢大学がん進展制御研究所・共同利用共同研究拠点シンポジウム 2013, 金沢, 11/19, 2013.
61. 中山敬一: 次世代プロテオミクスを用いたがん代謝の統合的理解. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013 年 12 月 3 日
62. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く新たな創薬アプローチ：「ネットワーク標的創薬」の実現に向けて 次世代医薬分子解析学講座 3 周年記念シンポジウム：日本版 NIH 元年に次世代創薬を考える, 東京, 2014 年 1 月 16 日
63. Nakayama, K.I.: Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. 35th Naito Conference, Sapporo, 12 July, 2013.
64. Nakayama, K.I.: Cell cycle and cancer stem cells: Abrogation of quiescence by Fbw7 ablation eliminates leukemia stem cells. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting, Vienna, 23 August, 2013.
65. Nakayama, K.I.: Absolute quantification oh human proteome by large-scale targeted proteomics. HUPO 2013 12th Annual World

Congress, Yokohama, 17 September, 2013.

66. Nakayama, K.I.: Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. The 23rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Stem Cell Biology 2013, Fukuoka, 5 November, 2013.
67. Nakayama, K.I.: What is the Warburg effect? Next-generation proteomics uncovers the secret of cancer. 3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting, Toulouse, 21 November, 2013.
68. Nakayama, K.I.: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. Kyushu University/Academia Sinica Biliateral Mini-Symposium on Cancer and Stem Cell, Taipei, 21 January, 2014.
69. Nakayama, K.I.: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University: Cell-fate Decision: Function and Dysfunction in Homeostasis, Melbourne, 7 February, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

1 -1.
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：2013 年 6 月 11 日(国際出願)
出願番号：PCT/JP2013/003669
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

1-2.
発明の名称：「大腸がんの判定方法」
発明者：朝長 毅、久米秀明
出願日：2013 年 12 月 11 日(国際出願)
出願番号：PCT/JP2013/007292
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

1-3.
発明の名称:「気道内炎症検査用バイオマーカー」
発明者：仲 哲治、世良田聡、藤本 穣、横山彰仁
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人高知大学
出願日：2014 年 1 月 22 日
出願番号：特願 2014-009713

1-4.
発明の名称：「悪性腫瘍の治療薬」
発明者：仲 哲治、世良田聡、藤本 穣、豊浦雅義、庄屋雄二
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社ファーマフーズ
出願日：2013 年 12 月 27 日
出願番号：特願 2013-272084

1-5.
発明の名称:「食道がんのマーカーおよびその利用」
発明者：仲 哲治、世良田聡、藤本 穣、豊浦雅義、庄屋雄二
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社ファーマフーズ
出願日：2013 年 12 月 27 日
出願番号：特願 2013-272085

1-6.
発明の名称：「炎症性疾患の予防・治療剤、並びに炎症性疾患予防・治療薬のスクリーニング方法」
発明者：仲 哲治、藤本穣、世良田聡
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所
出願日：2013 年 4 月 11 日
出願番号：特願 2013-083397

1-7.
発明の名称：「卵巣明細胞癌に特異的に発現している蛋白質とその応用」
発明者：荒川憲昭、増石有佑、山中結子、平野 久、川崎博史、平原史樹、宮城悦子
登録番号：特許第 5224308 号
登録日：2013 年 3 月 22 日

1-8.
発明の名称：「卵巣明細胞癌に特異的に発現している蛋白質とその応用」

発明者：荒川憲昭、増石有佑、山中結子、平野 久、川崎博史、平原史樹、宮城悦子
登録番号：特許第 5224309 号
登録日：2013 年 3 月 22 日
1-9.
発明の名称：「タンパク質の定量方法」
発明者：中山敬一、松本雅記
登録日：2014 年 2 月 7 日
登録番号：特許第 5468073 号
出願人：国立大学法人九州大学

H-2. 実用新案登録
なし。

H-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、より多くの細胞内リン酸化タンパク質・リン酸化ペプチドの定量を目指して、網羅的側面とターゲットを絞った側面からの技術的改良を加えた。網羅的リン酸化タンパク質・ペプチド解析法の改良としては、これまでリン酸化ペプチドの濃縮に用いてきたIMACだけでなく、抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用することにより、従来の2倍以上のチロシンリン酸化ペプチドを同定することに成功した。また、IMAC濃縮後のHPLC分画法の改良により、1回の実験で30,000リン酸化ペプチドの定量に成功した。ターゲットリン酸化プロテオミクスにおいては、細胞内シグナル伝達に関わる主要なキナーゼ・基質のリン酸化ペプチド287種類について、SRM/MRM法を用いた定量法の基礎検討を行った。現在までに20種類のリン酸化ペプチドの定量に成功した。

また、副作用予測の鍵となる治療薬の結合タンパク質を、簡易に同定するATP拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定手法を新規開発した。この手法を用いて、179個のキナーゼを含む361個のATP結合タンパク質を測定できることが確認された。さらにこれまでATP結合タンパク質として知られていなかった、新規ATP結合タンパク質候補178個を新たに同定した。

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. 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）

代表的なリン酸化ペプチド濃縮法である Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC)法は、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 Fe^{2+}イオンをキレートさせた Fe-IMAC を用いて行った。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。

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。

B-2. SRM/MRM 法を用いたキナーゼ活性化定量法の基礎検討

細胞内シグナル伝達を担う主要なキナーゼ活性化状態を SRM/MRM 法で定量するために、過去の文献から主要なキナーゼおよびその基質のリン酸化サイトを検索した。また、国立がん研究センターで逆相タンパク質アレイ（RPPA）を用いたリン酸化タンパク質解析のターゲットとしているリン酸化タンパク質も対象とした。その中で、実際に SRM/MRM 定量法に適した標的リン酸化ペプチドについて検討した。

B-3. ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定手法の開発

本手法の概略図（図２）に示されているように、ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤と ATP プローブを共に、細胞抽出液に加えると、阻害剤と ATP プローブが競合するために、阻害剤の標的にはプローブが標識されなくなる。一方、阻害剤を入れない場合は、プローブは標識される。この差異を質量分析計で測定することにより、簡易に ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤の標的タンパク質を同定することができる。本年度はこのアイデアを実現するための基礎検討を行った。具体的にはサンプル調製・プローブ標識反応・消化・標識ペプチド濃縮・脱塩・質量分析・データ解析の各工程の立ち上げ・最適化を行うことで、短時間により多くのキナーゼを測定することを試みた。さらに実際に阻害剤のモデルとして、ATP 自身を用いることで、測定対象となりうるキナーゼ及び ATP 結合タンパク質を同定した。

C. 研究結果

C-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、1,416個のチロシンリン酸化ペプチドの同定に成功した。

C-2. SRM/MRM法を用いたキナーゼ活性化定量法の基礎検討（図3）

過去の論文報告3報以上ある主要なキナーゼおよびその基質のリン酸化サイトは318種類あり、またRPPAを用いたリン酸化タンパク質解析のターゲットリン酸化サイトは261種類あった。両者で共通したリン酸化サイトも含め全部で433種類のリン酸化サイトのうち、我々がこれまで網羅的リン酸化タンパク質解析で同定できた287種類のサイトを最終的なSRM/MRM測定の対象とした。

C-3. ATP拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定手法の開発（表2）

サンプルはHela-S3細胞lysate 2mgを用いた場合、上記各工程を最適化することによって、2時間の解析時間で199個のキナーゼを同定することが可能になった。従来法と比較して、約16倍の同定効率の向上を達成した。さらにATPを用いたモデル試験では、179個のキナーゼを含む361個のATP結合タンパク質を測定できることが確認された。さらにこれまでATP結合タンパク質として知られていなかった、新規ATP結合タンパク質候補178個を新たに同定した。

D. 考察

D-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

チロシンのリン酸化はEGFRやSrcなど、がんの活性化に関与するタンパク質において重要な働きを担っている。しかしその存在量は、全リン酸化タンパク質の1%程度と著しく低く、質量分析計による網羅的な検出が困難であった。これまでも細胞溶液から、抗チロシン抗体を用いてチロシンペプチドの濃縮は行われてきたが、非特異的に結合された非リン酸プチドの除去のための工程を要し（*Mol. Cell.Proteomics 2010, 9, 2162, Mol Cell Proteomics 2005, 4, 721*）、細胞溶液や抗体の必要量を増やすことで対処がされてきた。本実験は、IMAC法と免疫沈降法を併用することにより、従来法よりも精製度が高く(濃縮効率90%以上)、最小限の細胞溶液や抗体量での解析が可能となった。また本手法は抗チロシン抗体だけではなく、様々なリン酸化ペプチド抗体を用いた濃縮にも応用可能である。今後は種々のリン酸化ペプチドを網羅的に定量化することで、細胞内シグナル活性化状態を俯瞰的に見られるようになることが期待される。

D-2. SRM/MRM法を用いたキナーゼ活性化定量法の基礎検討

上記の網羅的リン酸化ペプチドの同定・定量法と比較して、SRM/MRM法を用いたキナーゼや基質の主要リン酸化サイトの定量は、キナーゼの活性化状態をダイレクトにみることができる。しかし、細胞内の主要キナーゼや基質は非常に微量で、SRM/MRM法を用いても定量が困難であることが予想される。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-3. ATP拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定手法の開発

ATP拮抗型キナーゼ阻害剤の標的探索については、ATPプローブを用いる方法以外にも数多くの手法が開発されているが、網羅性、迅速性を有する技術の大半は、リコンビナントキナーゼを使用している（*Nat. Biotech.* 2012, 29, 1039, *Nat. Biotech.* 2012, 29, 1046）。これらの技術は有用な情報をもたらすが、全長配列を発現させることが難しく、キナーゼ活性部位のみを発現させたリコンビナントキナーゼも多い。また細胞内では他因子との相互作用、翻訳後修飾等によるダイナミックな制御が行われているが、リコンビナントキナーゼを用

いたアッセイ系は、そのようなキナーゼの機能・制御の複雑性を反映していない。一方、本手法は細胞溶解液中の内在性タンパク質を測定対象とするため、細胞内環境をより反映した結果が得られると期待される。さらに本手法ではキナーゼのみならず、その他の ATP 結合タンパク質も対象とするため、より広範囲な副作用予測に適用されることが期待される。今後は、様々な阻害剤を用いて、データを収集・蓄積することで、副作用予測に役立つツールとして発展していくことが期待される。

E. 結論

本年度は、網羅的リン酸化タンパク質解析手法の改良を行い、リン酸化タンパク質の同定数を飛躍的に向上させることに成功した。また、SRM/MRM 法を用いて、細胞内シグナルを担う主要リン酸化タンパク質の定量のための準備を行った。さらに、キナーゼ阻害剤の副作用予測に有用と思われる ATP 拮抗型キナーゼ阻害剤結合タンパク質の簡易同定法の開発に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 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 analysisand subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarrayanalysis. 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 APL1β 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. Oji Y., Tatsumi N., Fukuda M., Nakatsuka S., Aoyagi S., Hirata E., Nanchi I., Fujiki F., Nakajima H., Yamamoto Y., Shibata S., Nakamura M., Hasegawa K., Takagi S., Fukuda I., Hoshikawa T., Murakami Y, Mori M, Inoue M., Naka T., Tomonaga T., Shimizu Y., Nakagawa M., Hasegawa J., Nezu R., Inohara H., Izumoto S., Nonomura N, Yoshimine T., Okumura M., Morii E., Maeda H., Nishida S., Hosen N, Tsuboi A, Oka Y., and Sugiyama H. (2014) The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. Int J Oncol in press.
6. Matsushita K., Shimada H., Ueda Y., Inoue M., Hasegawa M., Tomonaga T., Matsubara H., and Nomura F. (2014) Non-transmissible Sendai virus vector encoding c-myc suppressor FBP-interacting repressor for cancer therapy. World J Gastroenterology in press
7. Liu, Y., Sogawa, K., Sunaga, M., Umemura, H., Satoh, M., Kazami, T., Yoshikawa, M., Tomonaga, T., Yokosuka, O., and Nomura, F. (2014) Increased concentrations of Apo A-I and Apo A-II fragments in the serum of patients with hepatocellular carcinoma by magnetic beads-assisted MALDI-TOF mass spectrometry. Am J Clin Pathol 141, 52-61.
8. Hara Y., Kawasaki N., Hirano K., Hashimoto Y., Adachi J., Watanabe S., and Tomonaga T. (2013). Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. Orphanet Journal of Rare Diseases 8, 197.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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. (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.
13. Guo, F., Hiroshima, K., Wu, D., Satoh, M., Abulazi, M., Nomura, F., Yoshino, I., Tomonaga, T., and Nakatani, Y. (2013). Prohibitin and its rapidly emerging role as a biomarker of systemic malignancies-reply. Hum Pathol 44, 679-680.
14. Matsushita, K., Tamura, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Levens, D., He, L., Liu, J., Yoshida, M., and Nomura, F. (2013). Interactions between SAP155 and FUSE-Binding Protein-Interacting Repressor Bridges c-Myc and P27Kip1 Expression. Mol Cancer Res 11, 689-698.

G-2. 学会発表

招待講演

1. 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
2. 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
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. 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

一般講演

1. 村岡 賢，久米秀明，西塚 哲，若林 剛，星野 ，松原久裕，朝長 ：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
2. 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
3. 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
4. 風見 隆浩，朝長 毅，川崎 直子，佐藤 守，久家 貴寿，松下 一之，野村 文夫：annexin A2 の核内蓄積は coilin を介したセントロメア損傷によって染色体不安定性に関与する 第 36 回日本分子生物学会，神戸，2013 年 12 月 3-6 日
5. 原 洋，川﨑直子，平野賢一，橋本裕希，朝長 ：ATGL ノックアウトマウス心筋のプロテオーム解析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. 第 36 回日本分子生物学会，神戸，2013 年 12 月 3-6 日

国際学会

1. Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. Biomarker Discovery for Triglyceride deposit Cardiomyovasculopathy using proteome and transcriptome analysis. The 2nd International Symposium on Triglyceride

Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease, Osaka, Japan, April 19-20, 2013

2. 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
3. Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. Proteomic and transcriptomic analysis of Triglyceride deposit Cardiomyovasculopathy for discovery of novel biomarkers. Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1 -1.

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：2013 年 6 月 11 日(国際出願)
出願番号：PCT/JP2013/003669
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

1-2

発明の名称：「大腸がんの判定方法」
発明者：朝長 毅、久米秀明
出願日：2013 年 12 月 11 日(国際出願)
出願番号：PCT/JP2013/007292
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
渡邊　千尋　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
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
深水　和菜　医薬基盤研究所　プロテオームリサーチプロジェクト

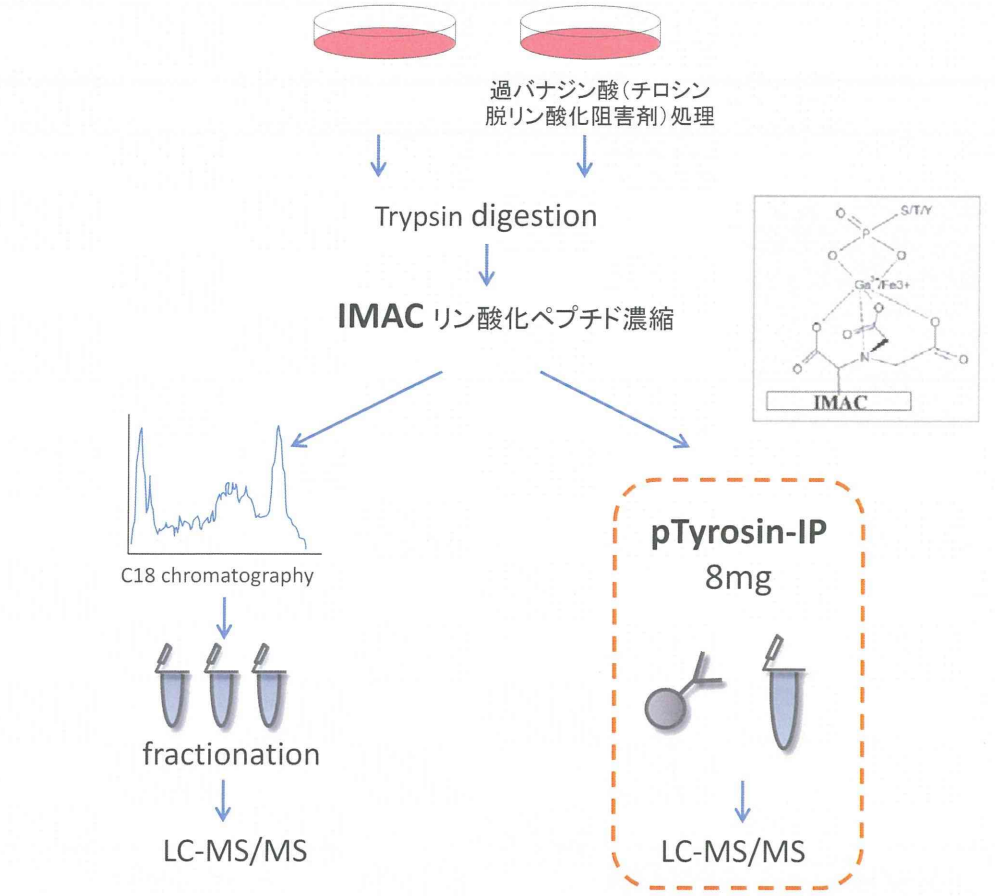


図1IMACと抗チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用した網羅的リン酸化ペプチド同定法

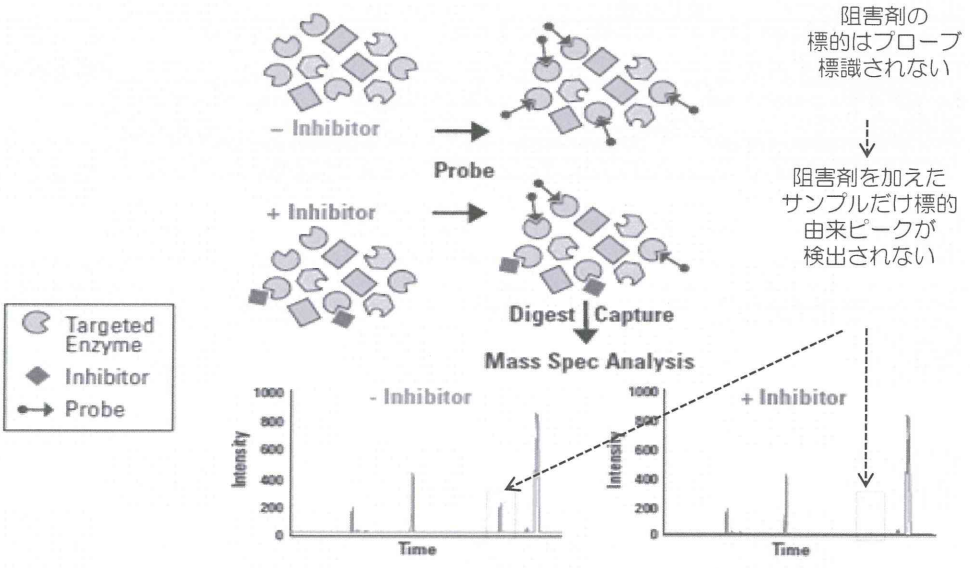


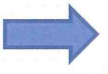
図2　ATP拮抗型阻害剤の標的を同定する仕組み

表1IMAC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%

	リン酸化サイト	同定されたサイト
論文報告3報以上	318	209
タンパクアレイ使用抗体（180リン酸化タンパク質）	261	174

計433リン酸化サイト
（キナーゼ123、基質58）



同定されたサイト：287

論文3報以上　タンパクアレイ使用抗体



287リン酸化サイト
（キナーゼ121、基質13）
を解析対象とする。

図3　SRM/MRM法を用いたキナーゼ活性化定量法の基礎検討

表2　従来法と新手法のキナーゼ同定効率の比較

	従来法	新手法
Kinases	296	199
Other proteins	8570	2396
Hela-S3 lysate	0.2 mg	1 mg
Offline Fractionation	SCX (24 fra.)	-
MS run time (hr)	48	2
Kinase identification rate (/hr)	6.2	99.5

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

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、画期的な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 80%の頻度において、*c-kit* 遺伝子に 2 次変異を有することでイマチニブに獲得耐性を示すことが報告されている。しかしながら、GIST 患者においてイマチニブ投与により *c-kit* 遺伝子 に 2 次耐性を有する獲得耐性がどのような機序により発生するのかについての詳細は解明されていない。イマチニブ投与時における *c-kit* 遺伝子に 2 次変異を有する獲得耐性の機序解明は、その阻害剤を開発することにより、獲得耐性の発生を防ぐ事につながり、さらにコンパニオン診断薬の開発にも結び付くものと期待されるため、重要な課題である。本研究では次世代シーケンサーを用いて GIST における *c-kit* 遺伝子の 2 次変異によるイマチニブ獲得耐性機序の解明を試みた。

GIST 細胞株として、GIST-T1 株を用いて、imatinib 濃度を徐々に増加させることで IC_{50} 値が 1,000 倍以上に増加したイマチニブ耐性株を樹立した(c-kit 遺伝子に 2 次変異を有することを遺伝子配列解析より確認済み)。イマチニブ処理前、及び、処理後(49 日)の 2 次耐性を獲得する前の persistent GIST-T1 細胞、及び、これらのイマチニブ耐性株より DNA を抽出し、次世代シーケンサーによりゲノム DNA の配列を解析した。この結果、GIST-T1 親株に対して、persistent 株ならびに耐性株に新たに出現した共通の遺伝子変異を検討した。

Persistent 株ならびに耐性株に共通に認められる遺伝子変異を 19 個検出した。さらに、イマチニブ耐性株にのみ共通に認められる遺伝子変異を 20 個認めた。これらの遺伝子変異が *c-kit* 遺伝子の 2 次変異と関係している事が示唆された。

また、2 次変異による獲得耐性の機序解明は GIST におけるイマチニブ治療のみならず、肺癌におけるゲフェチニブなど他の分子標的薬に対する獲得耐性の克服にも期待される。すなわち、イマチニブに対する獲得耐性の克服、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。

A. 研究目的

イマチニブは 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* 遺伝子や *PDGFR-α*遺伝子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）においてもイマチニブ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 においてイマチニブが奏功するかどうかは腫瘍細胞中の *c-kit* 遺伝子や *PDGFR-α*遺伝子の遺伝子変異の有無を確認することが可能である。しかし GIST 患者のおよそ 80%においてイマチニブが使用中に *c-kit* 遺伝子に 2 次変異を有する獲得耐性を示すが、その詳細な機序は不明である。そのため、イマチニブ投与時における *c-kit* 遺伝子に 2 次変異を有する獲得耐性の機序解明は、

その阻害剤を開発することにより、獲得耐性の発生を防ぐ事につながると期待されるため、重要な課題である。

近年、次世代シーケンサーの性能の向上により、全ゲノムにおける遺伝子の変異をハイスループットで解析することが可能となってきている。遺伝子の変異の多くは発がんとは無関係(パッセンジャー変異)であるが、一部の遺伝子はドライバー変異として発がんに直接関与する。一方で次世代シーケンサーによる遺伝子変異の網羅的な解析はイマチニブ投与時に *c-kit* 遺伝子に2次変異を誘導する機序の解明につながる可能性がある。

本研究では次世代シーケンサーを用いて、GIST 患者由来の細胞株である GIST-T1 株を用いて、イマチニブ投与時に起きる遺伝子変異の網羅的な解析を行うと共に、*c-kit* 遺伝子の2次変異発生機序の解明を目的とした。

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 *c-kit* 遺伝子のエクソン 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、イマチニブ感受性の細胞株である。GIST-T1 にイマチニブを低濃度で暴露して徐々に濃度を高めることにより、イマチニブ耐性株として、GIST-T1R2、GIST-T1R8、R9、RA2 を樹立した。それぞれの耐性株のイマチニブに対する IC50 値は 30μM であり、親株の GIST-T1 の 1,000 倍高い値であった。

(2) 次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子変異の解析

DNeasy mini kit(Qiagen)を用いて細胞より DNA を抽出した。得られたゲノム DNA の内二本鎖 DNA3μg を用い、Agilent 社 SureSelect Human All Exon V5+UTRs を用いて全エクソンを濃縮し、Illumina 社 HiSeq1500 を用いて 100bp、paired end で DNA シーケンス解析を行った。

(3) DNA シーケンス解析

次世代シーケンサーにより検出された遺伝子変異を有する分子について、プライマーを設計し、3130XL(ABI)を用いて遺伝子配列解析を行った。

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) 次世代シーケンサー（NGS）によるゲノム DNA 遺伝子変異解析

GIST-T1 細胞に 1μM イマチニブを添加前（GIST-T1）と添加後 49 日目残存している細胞（T1-117）、及びイマチニブ耐性株（T1-R2、T1-R8、T1-R9、T1-RA2）（表１）について、全エキソーム解析を行った。細胞株にイマチニブ投与すると、ほとんどの細胞は細胞死を起こし、ごく一部が生き残る。分子進化の図(図１)に示すように、NGS の結果からは 19 遺伝子変異がイマチニブ処置下に生存する細胞に共通して見られた。GIST T1 細胞株にイマチニブ投与、生き残った細胞化群からイマチニブ耐性株ができるまでに、更に共通の 20 遺伝子変異を確認した。

(2) 次世代シーケンサーにより検出された遺伝子変異の、DNA シーケンサーによる確認

次世代シーケンサーにより検出された遺伝子変異について、臨床検体（同一患者での初発切除病変とイマチニブ耐性切除病変）を用いた DNA シーケンサーによる解析により、遺伝子変異の検出を行った。その結果、ISGF10、LOXL4 遺伝子において同一の変異を確認した。

E. 結論

次世代シーケンサーにより、GIST-T1 親株と比較して、イマチニブ耐性株にて遺伝子変異を有する分子を複数種類検出した。これら

の一部においては、イマチニブ処理早期においても遺伝子変異が検出されており、イマチニブ処理時における *c-kit* 遺伝子の２次変異と直接関係している可能性がある。現在、*c-kit* 遺伝子の２次変異とこれらの分子との関係を解析している段階である。

F．健康危険情報

なし。

G．研究発表

G-1．論文発表

1. Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, Yoshino K, Nagamori S, Morimoto A, Yokoyama T, Kim A, Kimura T, Ueda Y, Fujita M, Fujimoto M, Kanai Y, Kimura T, Naka T. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. Int J Cancer. 2013, in press.
2. Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh K, Kishimoto T, Naka T. The molecular mechanism underlying anti-proliferative effect of SOCS-1 in non-small cell lung cancer cells. Cancer Sci. 2013, in press.
3. Sadaoka T, Serada S, Kato J, Hayashi M, Gomi Y, Naka T, Yamanishi K, Mori. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. Journal of Virology. 2013, in press.
4. Umegaki-Arao N, Tamai K, Nimura K, Serada S, Naka T, Nakano H, Katayama I. Karyopherin alpha2 is essential for rRNA transcription and protein synthesis in proliferative keratinocytes. PLoS One. Oct 3; **8**(10):e76416 (2013).
5. Takahashi T, Serada S, Ako M, Fujimoto M, Miyazaki M, Nakatsuka R, Ikezoe I, Yokoyama A, Taguchi T, Shimada K, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Naka T, Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. Int J Cancer. **133**(11): 2737-43 (2013)
6. Nishioka C, Ikezoe T, Furihata M, Yang J, Serada S, Naka T, Nobumoto A, Kataoka S, Tsuda M, Udaka K, Yokoyama A. CD34(+) /CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. Int J Cancer. **132**(9):2006-19 (2013)

G-2．学会発表

1. Maiko Ako, Tsuyoshi Takahashi, Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Yasuaki Miyazaki, Kazuki Shimada, Takayuki Ikezoe, Takahiro Taguchi, Yukinori Kurokawa, Makoto Yamasaki, Hiroshi Miyata, Kiyokazu Nakajima, Shuji Takiguchi, Masaki Mori, Yuichirou Doki, Tetsuji Naka, Toshirou Nishida. New findings of kinase switch in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis.104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 09, 2013; Washington, DC
2. Akiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Shinya Matsuzaki, Kousuke Hiramatsu, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Masami Fujita, Takuhei Yokoyama, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura. Functional domain of Annexin A4: which domain is indispensable for chemoresistance to platinum drugs? 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 09, 2013; Washington, DC
3. Shinya Matsuzaki, Akiko Morimoto, Satoshi Serada, Takuhei Yokoyama, Toshihiro Kimura, Eiji Kobayashi, Yutaka Ueda, Kiyoshi Yoshino, Masami Fujita, Takayuki

Enomoto, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Apr 09, 2013; Washington, DC

4. Tsuyoshi Takahashi, Maiko Ako, Satoshi Serada, Takahiro Taguchi, Yukinori Kurokawa, Makoto Yamasaki, Hiroshi Miyata, Kiyokazu Nakajima, Syuji Takiguchi, Masaki Mori, Yuichirou Doki, Tetsuji Naka, Toshirou Nishida. The analysis of kinase resistance in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic methods. 第 72 回日本癌学会　パシフィコ横浜 2013 年 10 月 3 日
5. Akiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Tetsuji Naka, Tadashi Kimura. Functional domain of Annexin A4:Which domain is indispensable for chemoresistance to platinum drugs? 第 72 回日本癌学会　パシフィコ横浜 2013 年 10 月 5 日

H．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

1-1.

発明の名称:「気道内炎症検査用バイオマーカー」

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穣、横山彰仁

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人高知大学

出願日：2014 年 1 月 22 日

出願番号：特願 2014-009713

1-2.

発明の名称：「悪性腫瘍の治療薬」

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穣、豊浦雅義、庄屋雄二

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社ファーマフーズ

出願日：2013 年 12 月 27 日

出願番号：特願 2013-272084

1-3.

発明の名称:「食道がんのマーカーおよびその利用」

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穣、豊浦雅義、庄屋雄二

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社ファーマフーズ

出願日：2013 年 12 月 27 日

出願番号：特願 2013-272085

1-4.

発明の名称：「炎症性疾患の予防・治療剤、並びに炎症性疾患予防・治療薬のスクリーニング方法」

発明者：仲哲治、藤本穣、世良田聡

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

出願日：2013 年 4 月 11 日

出願番号：特願 2013-083397

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

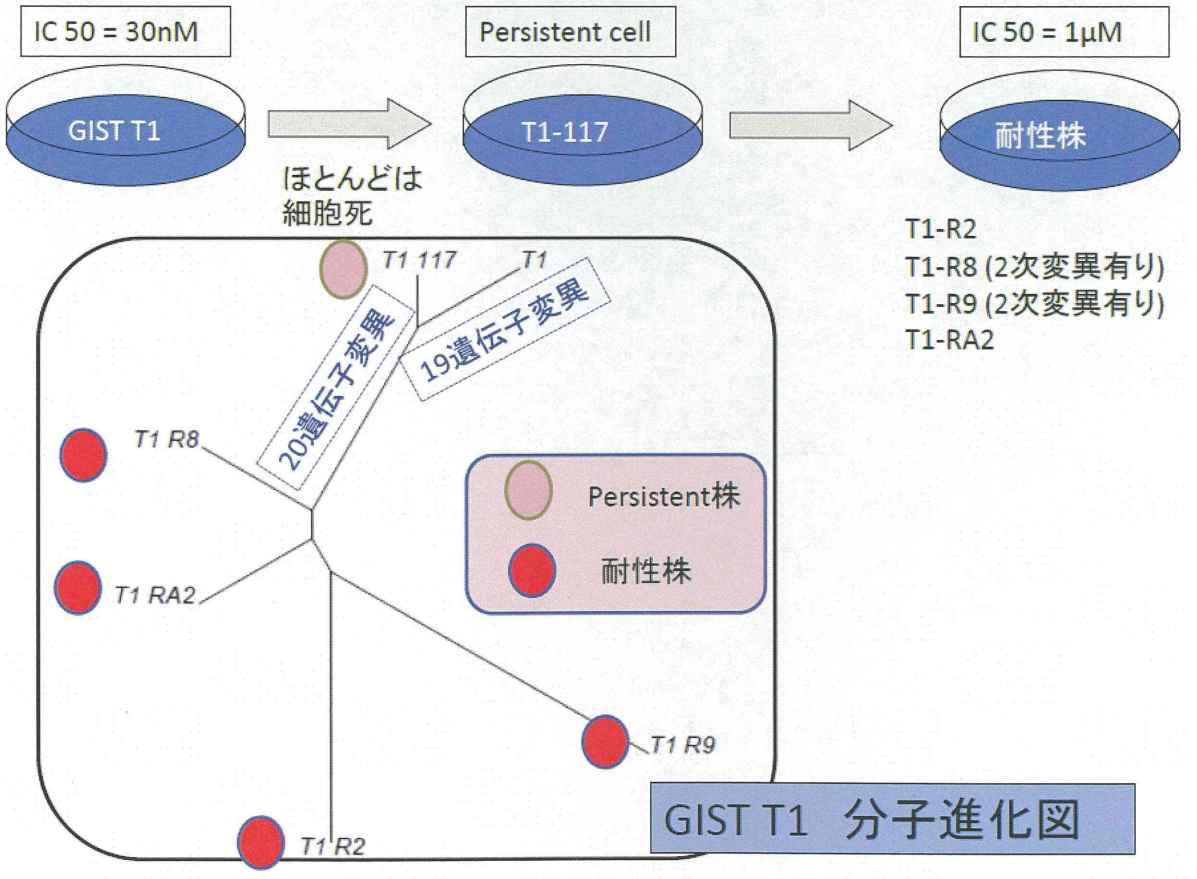
なし。

表１

検体サンプル

		KIT	
		exon11	exon17
1	GIST-T1	57-nucleotide (V570-Y578) in-frame deletion	
2	GIST-T1 R2	57-nucleotide (V570-Y578) in-frame deletion	
3	GIST-T1 R8	57-nucleotide (V570-Y578) in-frame deletion	820Asp⇒Tyr
4	GIST-T1 R9	57-nucleotide (V570-Y578) in-frame deletion	820 Asp⇒Val
5	GIST-T1 RA2	57-nucleotide (V570-Y578) in-frame deletion	
6	GIST-T1 117	57-nucleotide (V570-Y578) in-frame deletion	

図１



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開発のための基盤技術に関する研究

研究分担者　角田　慎一　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

がんの個別化医療を実現するためには、抗がん剤の感受性（抵抗性）を予測・評価しうるバイオマーカーの同定と、それに基づくコンパニオン診断薬の開発が鍵となる。そして、抗がん剤感受性バイオマーカーに基づくコンパニオン診断薬を開発する際には、臨床予測性に優れた評価系を用いたバイオマーカーの検証が必要となってくる。本観点から当該研究では、がん患者由来の腫瘍組織を生体内での特性を保持した状態で in vitro で培養可能とする技術、CTOS（Cancer Tissue-Originated Spheroid）法が、抗がん剤感受性バイオマーカーの評価系となりうるものと考え、その有用性の評価と評価検証系としての確立を目指している。本年度は、がん細胞の培養法の違いによるプロテオームの変化と抗がん剤感受性に及ぼす影響について解析を試みた。

通常、培養細胞株（セルライン）とプライマリーのがん細胞では、形態や増殖性などの特性に違いがあることが知られている。とりわけ in vitro における細胞の培養は、一般に平面単層培養にて行われるが、がんを含めた体内での組織構造は立体的であることから、培養法の違いが、がん細胞の性質に大きく影響を及ぼすことが示唆される。これらを踏まえ、本研究では、肺がん由来の腫瘍組織を CTOS として培養し、平面培養あるいはスフェロイド培養することで、そこにどのような違いが認められるのか検討した。3 種類の分子標的治療薬（Gefitinib, Erlotinib, Imatinib）に対する感受性を解析したところ、スフェロイド培養と平面培養との違いによって、各抗がん剤（thymidine kinase inhibitor; TKI）に対する感受性が変化することが明らかとなった。また、これらの感受性の違いを生じるメカニズムを調べるための一つの方法としてプロテオミクス解析を実施した。肺がん CTOS と同 CTOS 由来の平面培養がん細胞で細胞膜に発現するタンパク質の違いを解析した結果、約半数のタンパク質が共通して発現する一方で、1/3 程度のタンパク質のタンパク質の発現がダイナミックに変化していた。これらの結果から、抗がん剤感受性バイオマーカー評価系として CTOS の有用性を示唆するものと考えられる。

A. 研究背景・目的

近年のがんの化学療法においては、がん特異的に発現する分子の活性や機能を阻害する分子標的治療が脚光を浴びている。この分子標的治療は、がんに特異的あるいは選択的に発現する分子をターゲットとすることにより、副作用が少なく、鋭い治療効果を発揮させうることから、がんの画期的治療薬として期待されている。しかし、この切れ味鋭い分子標的治療薬においては、薬物標的となる分子が発現しない、あるいは効果を発揮できないがんの患者に対する投与は無意味であることから、当該薬物の感受性（抵抗性）を知るためのコンパニオン診断薬の開発が不可欠である。昨今の抗がん剤の開発は、上述のように抗体医薬やチロシンキナーゼ阻害剤等の分子標的治療薬に大きくシフトしつつあるが、これら分子標的薬の標的となる分子の発現レベル、薬物感受性等の指標となるバイオマーカーを用いたコンパニオン診断薬が求められており、FDA のガイドラインでも示されているように、新薬承認の際にはコンパニオン診断薬との同時申請が世界的に必須条件となっている。

このようなコンパニオン診断に資するバイ

オマーカーの開発には、がん細胞に発現する様々な分子の中から、候補となる分子を同定する必要があるものの、セルラインなど培養細胞を用いた検討では、培養を重ねることで本来がん細胞が有していた性質を既に喪失している場合があり、有用なバイオマーカー候補を見逃す可能性がある。その点、井上博士らによって開発された CTOS（cancer tissue originated spheroid）法は、種々摘出がん組織をもとに、スフェロイドとして in vitro 培養する手法であり、がん関連タンパク質の発現レベルや、遺伝子変異の状態など、患者生体内でのがんの特性を保持した状態で in vitro、in vivo で維持できることが報告されている。従って、CTOS は多様ながんの特性を in vitro で再現できるものであることから、コンパニオン診断のためのバイオマーカーの評価・検証系として極めて有用であると考えられる。

そこで本研究では、患者組織から調製した CTOS を有効活用し、有望な診断マーカータンパク質を探索および評価系としての応用を図る。その一環として、本年度は、通常汎用されている平面（二次元）細胞培養とスフェロイド培養等の三次元細胞培養とのプロテオームレベルでの特性比較を行い、基礎情報収集を図った。

B. 研究方法

B-1. CTOS の調製

肺がん組織由来 CTOS（大阪府立成人病センター 井上正宏博士より分与）を免疫不全マウスで移植増殖させた組織を摘出し、DMEM/F12 培地 20 mL に浸漬した。腫瘍組織をシャーレ（非接着性；non-treated φ10 cm；イワキ）に移した。なお、固形腫瘍は基底部の繊維芽細胞が混入しないように新鮮な増殖性の高い表面部をできるだけ採取するよう心がけた。ピンセットとメスを用いて約 1 mm 角に細片化し、腫瘍組織を 50 mL 遠心管へ移した。1～2 分静置させることで、断片化された腫瘍組織を沈殿させ、上清を取り除いた。その後、HBSS にて洗浄し、200 g, 2 分間遠心した。HBSS を用いた洗浄操作を 3 回行い、40 mL の DMEM/F12 に Final 0.26 U/mL になるよう Liberase DH リサーチグレード(Roche) 400 μL を入れて混和して、滅菌済み 100 mL キャップ/ねじ付きガラス製ビンへ移した。インキュベーター内にてスターラーで攪拌しながら 37°C 1.5 時間反応させた。消化後の腫瘍組織をステンレスメッシュ（500 μm; 滅菌済み）に通し、50 mL 遠心管に回収した。さらに回収した懸濁液を 250 μm メッシュ→100 μm・40 μm セルストレーナー（BD Falcon）の順に通した。100 μm と 40 μm のセルストレーナーに捕捉された細胞塊をピペッティングにより 50 mL チューブに回収した。200 g, 2 分間（4°C）で遠心することで上清を除き、StemPro 培地にて、37°C 5% CO_2/95% Air 条件下で培養した。

B-2. CTOS ならびに接着 CTOS の培養

CTOS の培養には、StemPro hESC SFM (Invitrogen)を用いた。この培地の組成を以下に示す。

Reagent	Final Conc.
DMEM/F-12 + GlutaMax (1x) Kit	1x
StemPro hESC SFM Growth Supplement (50x) (Kit)	1x
BSA 25% (Kit)	1.8%
bFGF (100 μg/mL) (Invitrogen)	8 ng/mL
EGF (1000 μg/mL) (Invitrogen)	20 ng/mL
2-Mercaptoethanol (55 mM in DW)	0.1 mM
PenStrep (100x) (Invitrogen)	Penicillin 100 unit/mL Streptmycin 100 μg/mL
Y-27632	10 μM

一方、CTOS 由来平面培養がん細胞の調製は以下の手順で行った。まず、上記の方法で CTOS を回収し、死細胞ならびに CTOS 以外の細胞を除くために StemPro hESC SFM 培地にて一晩培養した。培養後の CTOS を 50ml