

RT-PCR 解析、ウェスタンブロット法により、RMG-I 細胞、コントロールベクター処理株 (RMG-I NC7) と比較して、RMG-I-ANXA4shRNA-Y4 (Y4) と RMG-I-ANXA4shRNA-R5 (R5) ではタンパク質レベルで ANXA4 の発現が抑制されていることが確認された (図 1)。

(2) ANXA4 の発現抑制はシスプラチンとカルボプラチンの感受性を向上させる。

これらの 4 つの細胞株について、シスプラチンとカルボプラチンの感受性を解析した。NC7 細胞におけるシスプラチンの IC_{50} (11.2 μ M) と比較して、Y4 細胞と R5 細胞ではシスプラチンの IC_{50} の有意な低下を認めた (Y4 ; 5.8 μ M, $p < 0.01$ 、R5; 5.0 μ M, $p < 0.01$) (図 2A)。

同様にカルボプラチンに対する IC_{50} も NC7 細胞の (130 μ M) と比較して、Y4 細胞と R5 細胞において有意な低下を認めた (Y4; 63 μ M, $p < 0.01$, R5; 60 μ M, $p < 0.01$) (図 2B)。ANXA4 の発現を抑制させることでシスプラチンとカルボプラチンの IC_{50} はおよそ半分程度に低下することが判明した。

(3) ANXA4 の発現を抑制した RMG-I 細胞は *in vivo* でもプラチナ製剤に対する感受性改善を示す。

卵巣明細胞腺癌において、ANXA4 の発現を抑制することが抗癌剤感受性を向上するかどうかを明らかにするため、NC7 と Y4 を ICR nu/nu マウス皮下に移植したゼノグラフトモデルを作成した。細胞を生着させた後、シスプラチンあるいは PBS を週 2 回、腹腔内投与を計 8 回行った。両者において、PBS 投与群における腫瘍の増殖速度は同程度であった。NC7 において、平均腫瘍体積は PBS 投与群で 1,233 (± 88.5) mm^3 であるのに対してシスプラチン投与群で 1,246 (± 243.8) mm^3 であり、NC7 のゼノグラフトモデルにおいて、シスプラチンによる抗腫瘍効果は認められなかった (図 3A; $p = 0.18$)。

これに対し、Y4 ゼノグラフトモデルにおい

て、平均腫瘍体積は PBS 投与群で 1402 (± 126.7) mm^3 であるのに対してシスプラチン投与群で 176 (± 28.0) mm^3 であり、Y4 ゼノグラフトモデルにおいて *in vivo* でシスプラチンに対する抗腫瘍効果の改善が認められた (図 3 B; $p < 0.01$)。

シスプラチン投与群における 46 日目の NC7 ゼノグラフトモデルにおける計算上の腫瘍体積の減少率は (3.0 $\pm 12.5\%$) であったのに対して、Y4 ゼノグラフトモデルの減少率は (72.1 $\pm 4.6\%$) であった (図 3C)。

(4) ANXA4 の各種 deletion mutant を安定発現させた NUGC3 株の樹立とプラチナ製剤感受性の解析

ANXA4 は Annexin repeat と呼ばれる 70 アミノ酸から成る配列を 4 つ含んでおり、この Annexin repeat を C 末端から 1 個ずつ削った deletion mutant を 4 つ作成した (図 4A)。

Annexin repeat を全てもつ配列を FL、1 つ削った配列を R3、2 つ削った配列を R2、3 つ削った配列を R1 とした。これらを ANXA4 低発現細胞である胃癌細胞株の NUGC3 に遺伝子導入し、安定発現株を作成した。それぞれの細胞株に対して、deletion mutant が安定発現していることを Western Blotting 法にて確認後 (図 4B)、シスプラチンおよびカルボプラチンの感受性を解析した (図 4C)。

シスプラチンの IC_{50} はそれぞれ NUGC3 親株、コントロール株 (NC-14) と比較して FL-22 株、R3-6 株、R2-13 株、R1-12 株において、約 1.7~2.2 倍と有意に上昇していた。また、カルボプラチンの IC_{50} も同様に 1.4~1.7 倍と有意に上昇しており、FL のみならず、それぞれの deletion mutant の遺伝子導入によりシスプラチンおよびカルボプラチンの IC_{50} が上昇しプラチナ感受性低下が誘導されることが示された。

シスプラチン暴露後の細胞内プラチナ濃度を測定したところ、シスプラチン暴露中の細胞内プラチナ濃度およびシスプラチン暴露後、シスプラチンを含まないメディウムで 3 時間

培養を行った双方の条件において、コントロール株(NC-14)と比較してFL-22株、R3-6株、R2-13株、R1-12株において細胞内プラチナ濃度が有意に低下していることが示された(図 4D)。

(5) ANXA4 の deletion mutant である R1 に対して、カルシウムイオン結合部位に point mutation を加えたところプラチナ抵抗性が解除された

ANXA4 の deletion mutant である R1 に対して Annexin repeat のカルシウムイオン結合部位が機能を喪失させる point mutation を加えた配列を作成し、それを R1(E70A)とした(図 5A)。

他の deletion mutant を遺伝子導入した手法と同様に NUGC3 R1(E70A)-95 株を樹立し、WB 法にて遺伝子が安定発現していることを確認した(図 5B)。

NUGC3 R1(E70A)-95 株を用いてシスプラチンおよびカルボプラチンの感受性を検討したところ他の deletion mutant 株と異なり、NUGC3 R1(E70A)-95 株はコントロール株(NC-14)と比較してシスプラチンおよびカルボプラチン双方の IC_{50} は有意な差を認めず、カルシウムイオン結合部位が機能する R1 と比較すると有意にシスプラチンおよびカルボプラチンの IC_{50} は低いことが示された(図 5C)。

シスプラチン暴露後の細胞内プラチナ濃度を測定したところ、シスプラチン暴露中の細胞内プラチナ濃度およびシスプラチン暴露後、シスプラチンを含まないメディアウムで3時間培養を行った双方の条件において、コントロール株(NC-14)と比較して R1(E70A)-95 株は細胞内プラチナ濃度に有意差を認めなかった(図 5D)。

(6) ANXA4 の deletion mutant である R1 に対して、カルシウムイオン結合部位に point mutation を加えたところ *in vivo* においてもプラチナ抵抗性が解除された

In vitro の解析に用いた NUGC3 細胞株の

コントロール株(NC-14)、FL-22 株、R1-12 株、R1(E70A)-95 株を使用し、*in vivo* におけるプラチナ感受性を検討した。それぞれの細胞株を各細胞株6匹ずつの ICR ノードマウスに皮下移植を行い、PBS を1週間に1度腹腔内投与する群とシスプラチン 3mg/kg/body を1週間に1度腹腔内投与する群の合計2群を作成し、シスプラチン投与後3週間観察を行った。コントロール株(NC-14)が $96.5 \pm 1.3\%$ 、R1(E70A)-95 株が $87.8 \pm 11.4\%$ の腫瘍増殖抑制を認めたが、FL-22 株、R1-12 株では腫瘍増殖がそれぞれ $48.5 \pm 11.7\%$ 、 $37.7 \pm 9.8\%$ であり腫瘍増殖抑制がコントロール株(NC-14)や R1(E70A)-95 株と比較し有意に低下していた(図 6A)。

これらの結果は同時に、コントロール株(NC-14)と R1(E70A)-95 株の腫瘍増殖に有意な差を認めない結果を示しており、カルシウムイオン結合部位に point mutation を加えることでプラチナ抵抗性が解除された *in vitro* の結果が、*in vivo* においても同様であったことが示された。

(7) 細胞内 Cl^- 濃度の上昇は、シスプラチン耐性と関連している

ANXA4 のプラチナ耐性のメカニズムとして、シスプラチン暴露後の Cl^- 濃度が上昇しているのではないかと仮説をたて、シスプラチン暴露後の Cl^- 濃度の解析を行った。コントロール株(NC-14)、FL-22 株、R1-12 株、R1(E70A)-95 株を使用し、シスプラチン $100\mu M$ を30分暴露したのちの、MQAE の蛍光強度を測定することで細胞内の Cl^- 濃度を推察した。MQAE 蛍光強度はシスプラチン暴露前の0分の値と30分後の比を解析した。解析結果は FL-22 株 (1.12 ± 0.03)、R1-12 株 (1.12 ± 0.01) あり、コントロール株(NC-14) (1.06 ± 0.01)、R1(E70A)-95 株 (1.06 ± 0.02) と比較して有意に高い値であった(図 7)。

Cl^- 濃度とシスプラチン耐性とは関連があると報告されており、ANXA4 の deletion

mutant 株ではシスプラチン暴露後の Cl⁻濃度が上昇することでプラチナ耐性が誘導されているのではないかと考えられた。また、Ca 結合部位に mutation を加え無機能化した R1(E70A)-95 株ではコントロール株と比較し有意差がなく、シスプラチン暴露後の細胞内 Cl⁻濃度の上昇と Annexin repeat に存在するカルシウムイオン結合部位との関連が示唆された。

E. 結論

プラチナ製剤耐性における ANXA4 の機能ドメインを解明する事に成功した。さらに、ANXA4 の発現抑制がプラチナ製剤感受性を高めることにつながることから、卵巣癌組織における ANXA4 の発現量を解析することがプラチナ製剤のコンパニオン診断薬となり得る事が示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Furukawa, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Tanemura, M., Tomimaru, Y., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Nonaka, Y., Takamatsu, S., Shinzaki, S., Kumada, T., Satomura, S., Ito, T., Serada, S., Naka, T., Mori, M., Doki, Y., Miyoshi, E. & Nagano, H. Clinico-pathological significance of leucine-rich alpha-2-glyco- protein-1 in sera of patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 44, 93-98 (2015).
2. Yang, L., Fujimoto, M., Murota H., Serada, S., Fujimoto, M., Honda, H., Yamada, K., Suzuki, K., Nishikawa, A., Hosono, Y., Yoneda, Y., Takehara, K., Imura, Y., Mimori, T., Takeuchi, T., Katayama, I. & Naka, T. Proteomic identification of heterogeneous nuclear

RNP-K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology (Oxford)* 54, 349-58 (2015).

3. Kawabata, A., Serada, S., Naka, T. & Mori, Y. Human herpes- virus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells. *J. Gen. Virol.* 95, 2769-77 (2014).
4. Azuma, K., Serada, S., Takamatsu, S., Terao, N., Takeishi, S., Kamada, Y., Naka, T. & Miyoshi, E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glyco- proteomic analyses. *J. Proteome Res.* 13, 4869-77 (2014).
5. Morimoto, A., Serada, S., Enomoto, T., Kim, A., Matsuzaki, S., Yokoyama, T., Takahashi, T., Ueda, Y., Yoshino, K., Fujita, M., Fujimoto, M., Kimura, T. & Naka, T. Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride- and calcium- dependent manner. *Oncotarget.* 5, 7776-87 (2014).
6. Kotobuki, Y., Yang, L., Serada, S., Tanemura, A., Yang, F., Nomura, S., Kudo, A., Izuhara, K., Murota, H., Fujimoto, M., Katayama, I. & Naka, T. Periostin accelerates human malignant melanoma progression by modifying the melanoma microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 630-9 (2014).
7. 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., Takag,i 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. & Sugiyama, H. The translation elongation factor eEF2 is a novel tumor-associated antigen overexpressed in various types of cancers. *Int. J. Oncol.* 44, 1461-9 (2014).
8. Yang, L., Murota, H., Serada, S., Fujimoto, M., Kudo, A., Naka, T. & Katayama, I. Histamine contributes to tissue remodeling via periostin expression. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2105-13 (2014).
 9. 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* 134, 1796-809 (2014).
 10. Sadaoka, T., Serada, S., Kato, J., Hayashi, M., Gomi, Y., Naka, T., Yamanishi, K. & Mori, Y. Varicella-zoster virus ORF49 functions in the efficient production of progeny virus through its interaction with essential tegument protein ORF44. *J. Virol.* 88, 188-201 (2014).
 11. Ota, M., Serada, S., Naka, T. & Mori, Y. MHC class I molecules are incorporated into human herpesvirus-6 viral particles and released into the extracellular environment. *Microbiol. Immunol.* 58, 119-25 (2014).
- G-2. 学会発表**
1. Takahashi Y., Fujimoto, M., Serada, S. & Naka, T.: Leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a potential disease activity marker under IL-6 suppression in autoimmune arthritis. ACR/ARHP Annual Meeting, November 14-19, Convention & Exhibition Center, Boston, Massachusetts, Boston, 2014.
 2. Takemoto, N., Matsumoto, T., Serada, S., Fujimoto, M. & Naka, T.: Leucine-rich alpha-2 glycoprotein promotes TGFbeta-1-induced apoptosis in the lewis lung carcinoma cell lines. ICIS annual meeting, October 26-29, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, 2014.
 3. Ohkawara, T., Fujimoto, M., Serada, S. & Naka, T.: Measurement of serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein, a novel disease activity biomarker in rheumatoid arthritis for the detection of biologic-associated tuberculosis. EULAR2014, Paris, June 11-14, 2014.
- 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：「悪性腫瘍の治療薬」

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

出願番号：特願 2013-272084

出願日：2013 年 12 月 27 日

国際出願番号：PCT/JP2014/006456

出願日：2014 年 12 月 25 日
 - 1-2.

名称：「食道がんのマーカールおよびその利用」

発明者：仲哲治、世良田聡、藤本穰、豊浦雅義、庄屋雄二

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

出願番号：特願 2013-272085

出願日：2013 年 12 月 27 日

国際出願番号：PCT/JP2014/006455

出願日：2014 年 12 月 25 日

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

I. 研究協力者

藤本 穰 医薬基盤研究所 免疫シグナル
プロジェクト 主任研究員

世良田 聡 医薬基盤研究所 免疫シグナル
プロジェクト 研究員

森本晶子 医薬基盤研究所 免疫シグナル
プロジェクト 大学院生

松崎慎哉 大阪大学大学院 医学系研究科
産婦人科教室 助教

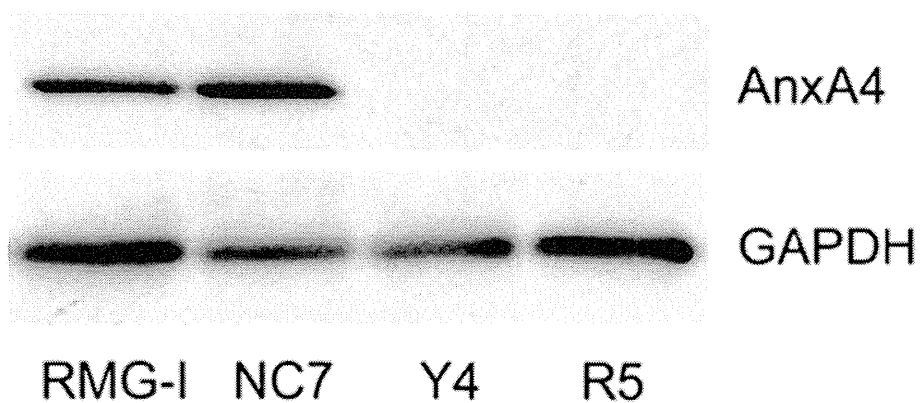


図1. ANXA4ノックダウンRMG-I細胞の作成

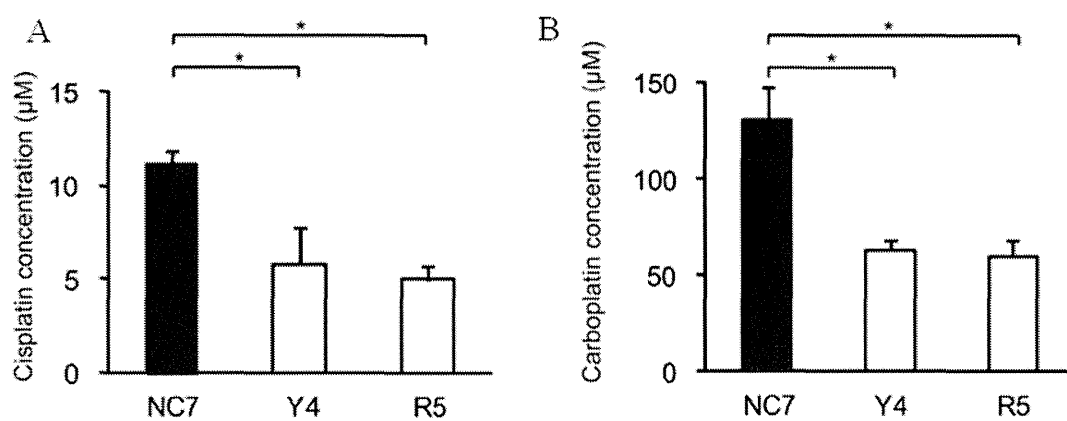


図2. ANXA4ノックダウンRMG-I細胞はシスプラチン、カルボプラチン感受性が*in vitro*で向上する

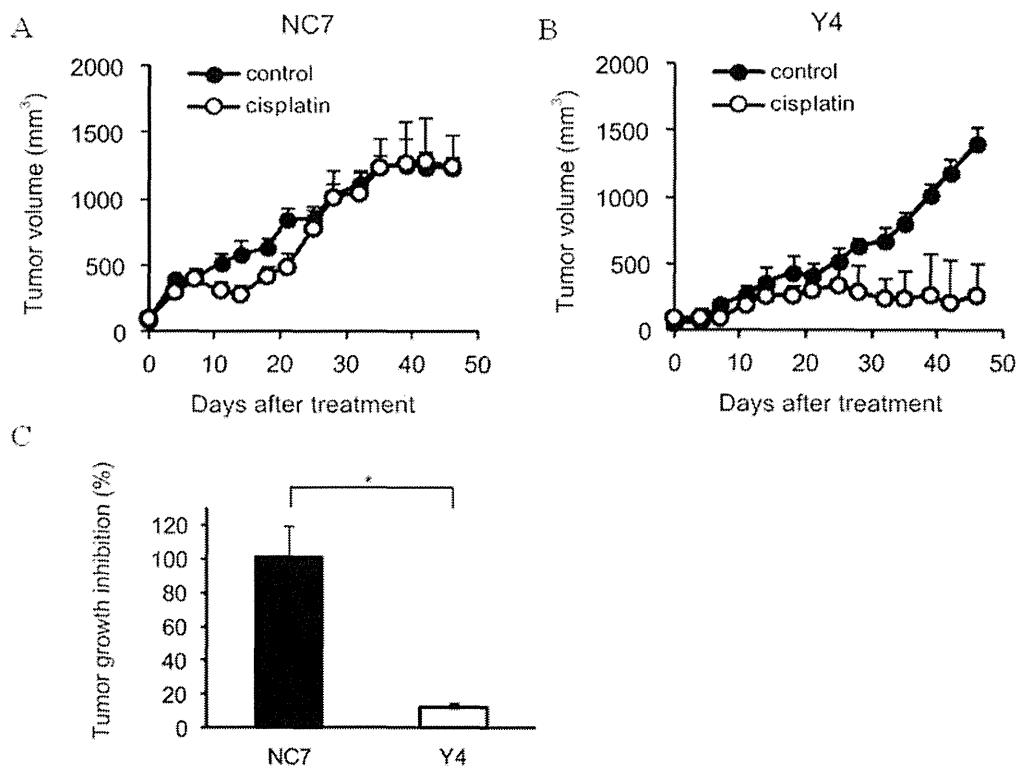


図3. ANXA4ノックダウンRMG-I細胞はシスプラチン感受性が *in vivo*で向上する

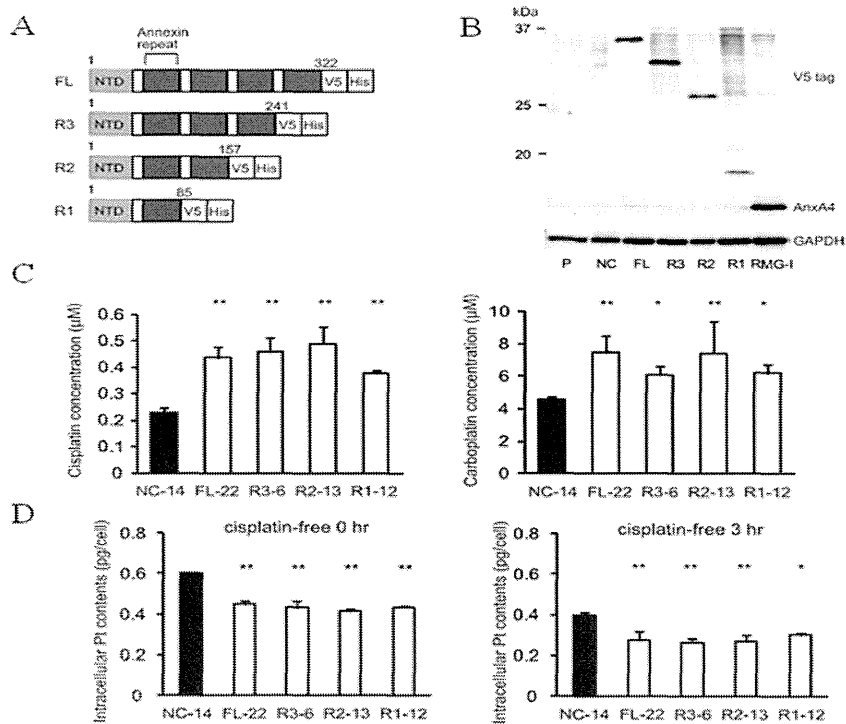


図4. ANXA4deletion mutant発現細胞において、ANXリピートを1つでも有するとシスプラチン抵抗性を示す

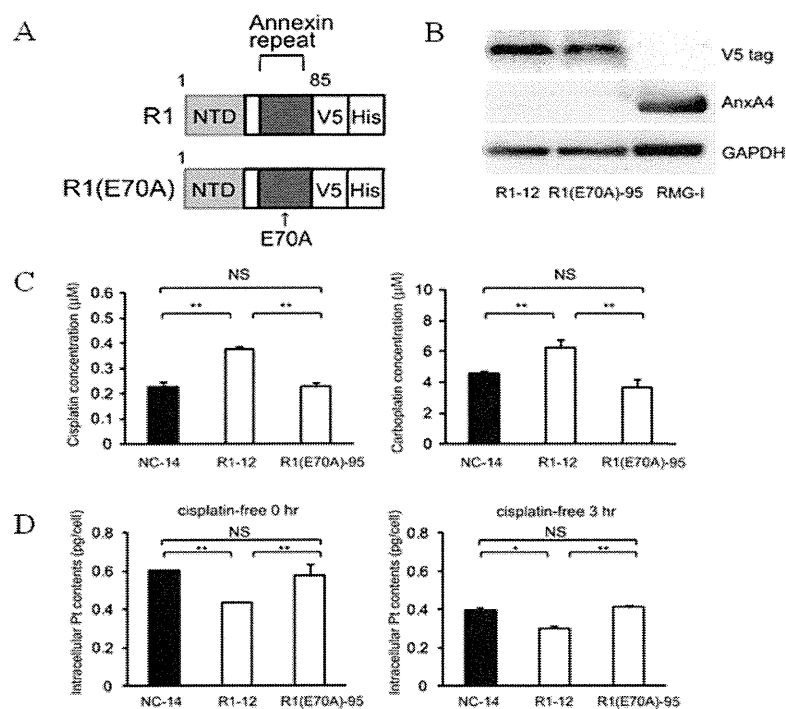


図5. ANXRリピートのカルシウムイオン結合能を欠損したANXA4 deletion mutant 発現細胞において、シスプラチン、カルボプラチン抵抗性が見られなくなる

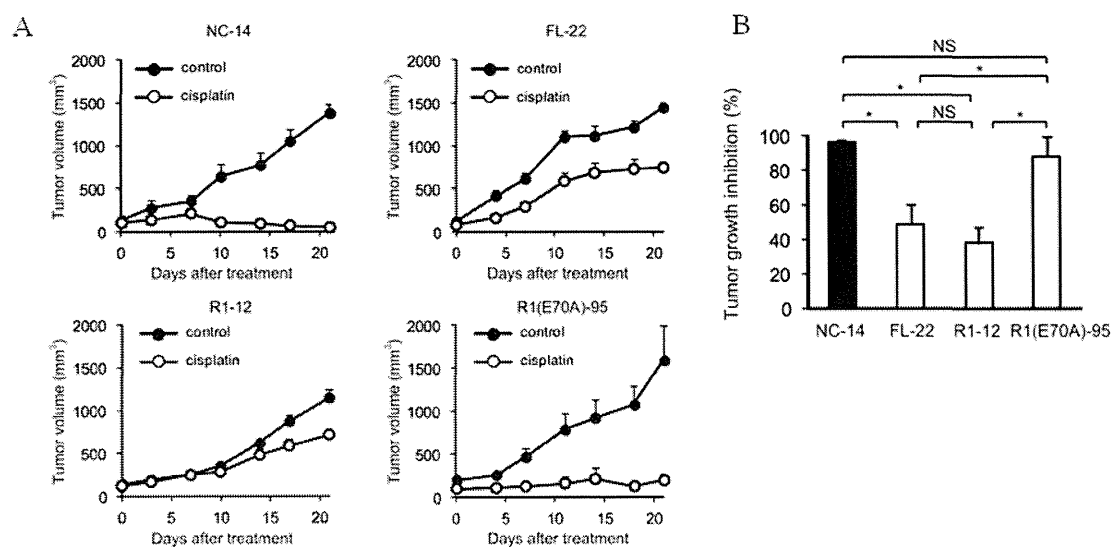


図6. ANXA4全長およびR1発現細胞はin vivoでシスプラチンに抵抗性を示すのに対し、カルシウムイオン結合能を欠損したR1(E70A)発現細胞ではシスプラチン抵抗性が見られなくなる

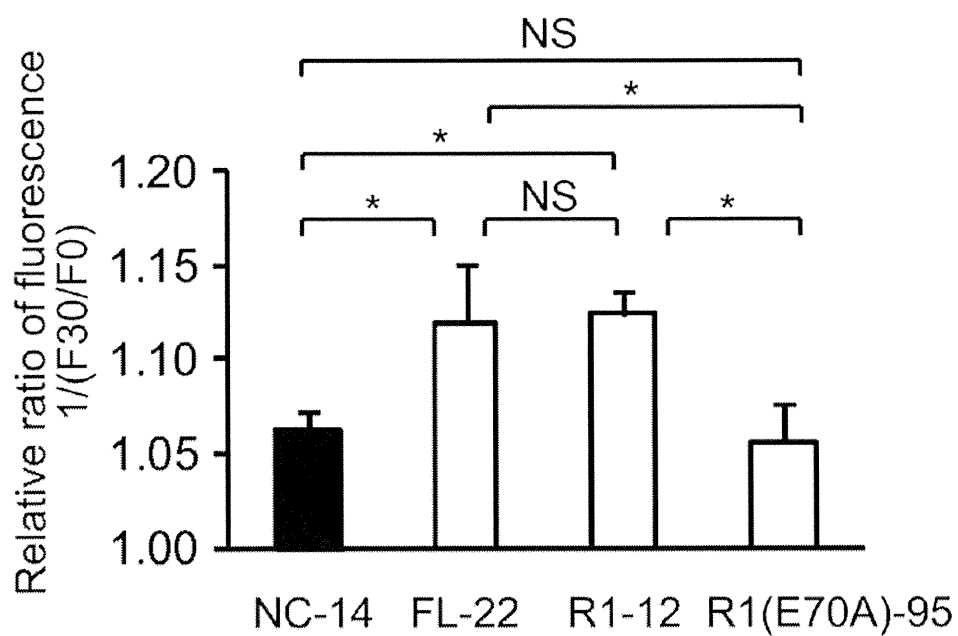


図7. ANXA4全長およびR1発現細胞はシスプラチン処理時に細胞内塩化物イオン濃度が上昇するが、に抵抗性を示すのに対し、R1(E70A)発現細胞では細胞内塩化物イオン濃度の上昇が見られない

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

分子標的治療薬を有効活用するためには、その薬効が期待される症例を選定するためのコンパニオン診断薬の開発が重要であり、分子標的治療薬の開発と両輪となっている。がんに対する分子標的治療薬のコンパニオン診断は、バイオプシーから得られた組織における標的分子の発現に基づいて判断される場合が多い。しかし、一般にバイオプシーは侵襲性が高く、経時的・頻回検査ができないなどの問題を抱えている。そのため、上記の課題を克服できるような、低侵襲なコンパニオン診断技術の開発が求められている。本観点から、当該研究では、近年、がん細胞から多く分泌されることが報告されている Exosome に着目し、肺がん発症のドライバー遺伝子の 1 つである EML4-ALK 融合遺伝子を血中から検出可能な系の確立を試みた。

本年度は、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の NCI-H2228 細胞と、その対照として EML4-ALK 陰性の NCI-H460 を用い、当該融合遺伝子の検出系の確立と、培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出を図った。その結果、NCI-H2228 細胞の培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出に成功した。今後、血液検査レベルで検出可能な感度としていく必要はあるものの、本結果は血中 Exosome から EML4-ALK 融合遺伝子の存在を検出できる可能性を示しており、これまでのバイオプシーに代わる低侵襲なコンパニオン診断薬の開発への応用が期待される。

A. 研究背景・目的

近年の分子標的治療薬の台頭により、各種がんの予後が改善されている。特に、本邦で最も死亡者数の多い肺がんにおいても、EGFR に対するチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)や、2007 年に間野らが同定した EML4-ALK に対する TKI が臨床に供され、優れた治療効果を発揮している。一方で、分子標的治療薬の薬効は一般に、標的分子が発現した症例に対して発揮されるため、無用な副作用を回避する観点からも、予め、有効性が認められることが予測される症例を選定する必要がある。このような背景のもと、FDA において、分子標的治療薬を開発する際には同時に、その薬効が発揮される症例を選定するためのコンパニオン診断薬の開発を求めており、コンパニオン診断薬の開発は、分子標的治療薬の開発と両輪となっている。一般

に、がんに対する分子標的治療薬のコンパニオン診断は、バイオプシーから得られた組織における標的分子の発現に基づいて判断されている。しかし、バイオプシーは侵襲性が高く、特に肺がんのバイオプシーでは以下の問題点が考えられる。①口などから気管支鏡を挿入して、気管の様子を確認しながら組織を採取するが、気管支鏡が到達できる範囲に限りがあり、気管支の末梢にあるがんは採取自体困難。②経皮穿刺吸引肺生検のように経皮的に刺針する場合は、気胸になるリスクがある。③経時的・頻回検査ができない。そのため、上記の課題を克服できるような、低侵襲なコンパニオン診断技術の開発が求められている。

このような背景のもと、近年、各種細胞から分泌され、核酸や蛋白質が含有されたナノベシクルである Exosome は、遠隔細胞や組織への

情報伝達因子として働いていることが示唆されており、注目が集まっている。特に、がん細胞から分泌される Exosome では、①Her2 といったがん特異膜抗原が発現していることや、②がん患者の血中 Exosome 量は、健常者に比べて増加し、そのレベルと予後が相関することが報告されており、腫瘍組織を反映した血中因子として、コンパニオン診断薬の格好のターゲットと考えられる。

そこで本研究では、バイオプシーに代わりうる低侵襲なコンパニオン診断技術の開発を目的に、がん細胞から血中に分泌される Exosome に着目し、ALK-TKI の標的である EML4-ALK 融合遺伝子の検出を試みた。

B. 研究方法

B-1. 細胞株

EML4-ALK valiant3 陽性株として、NCI-H2228 細胞を用いた。また、EML4-ALK valiant3 陰性株として、NCI-H460 細胞を用いた。両細胞はともに、ATCC より購入し、10% FCS 含有の RPMI1640 培地で培養した。

B-2. NCI-H2228・NCI-H460 細胞からの total RNA の抽出と cDNA の合成

NCI-H2228 細胞と NCI-H460 細胞をそれぞれ、B-1 で示した条件で培養し、サブコンフルエントになった細胞から RNeasy mini kit (Qiagen)のプロトコルにしたがい、total RNA を調製した。さらに、得られた total RNA をもとに、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies)を用いて、cDNA を合成した。

B-3. RT-PCR による EML4-ALK 融合遺伝子の検出

合成した cDNA 中に含まれる EML4-ALK 融合遺伝子の検出は、以下のプライマーと KOD FX を使い、融合遺伝子を増幅することによって評価した。KOD FX のプロトコルにしたがい、PCR 反応溶液を調製し、アニーリング温度として 64℃、伸長温度として 68℃で、

40 サイクル行なった。PCR 産物は、アガロースゲルによる電気泳動で、増幅遺伝子を検出した。

B-4. Exosome の回収

培養上清およびマウス血清を 2,000g で 10 分、20,000g で 20 分遠心し、上清を回収することで、それぞれ細胞成分・デブリスを除去した。続いて、100,000g で 70 分超遠心することで、Exosome 画分を沈殿させた。PBS で 1 度、洗浄し、再度、100,000g で 70 分超遠心することで、Exosome を精製した。Exosome ペレットを PBS で懸濁し、特性解析・total RNA の回収に供した。

B-5. Exosome の特性評価

上記で回収した Exosome 画分の特性を評価するため、Exosome マーカーとして知られる TSG101 の発現を Western Blot (WB)にて評価した。1 次抗体・2 次抗体にはそれぞれ、マウス抗ヒト TSG101 モノクローナル抗体 (Abcam)・HRP 標識抗マウス IgG モノクローナル抗体 (Sigma Aldrich)を用いた。また、回収した Exosome 粒子を観察するため、透過型電子顕微鏡を用いて、粒子径や形態を解析した。

B-7. Exosome からの total RNA の抽出と cDNA の合成、EML4-ALK 融合遺伝子の検出
Exosome からの total RNA の抽出には、Total Exosome RNA Protein Isolation Kit を用いた。また、得られた total RNA からの cDNA 合成には、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies)を用いた。

B-8. NCI-H2228 細胞・NCI-H460 ゼノグラフィモデルマウスの作製

BALB/c nu/nu マウス(日本 SLC・6wks・♀)に対し、NCI-H2228 細胞と NCI-H460 細胞をそれぞれ、 5×10^6 cells/mouse、 1×10^6 cells/mouse となるように Matrigel (BD Bioscience)と等量混合して、左脇腹と右脇腹の皮下に移植した。生着したのを確認し、移植

後 19 日目にがん組織と血液を回収した。血液はヘパリンをいれたシリンジにて心臓から採血し、血漿成分を実験に供した。

C. 研究結果

C-1. モデル細胞株における EML4-ALK 融合遺伝子の検出

血中 Exosome 中で、EML4-ALK 融合遺伝子の存在を解析する系を確立するため、EML4-ALK 陽性のモデル細胞として NCI-H2228 を選択した。また、その対照として EML4-ALK 陰性のモデル細胞に NCI-H460 を用いた。まず、これら細胞における EML4-ALK 融合遺伝子の有無と検出系を確立するため、各細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により解析を試みた。その結果、NCI-H2228 細胞では、PCR サイクル数依存的に EML4-ALK 融合遺伝子が増幅されたのに対し、NCI-H460 細胞では、EML4-ALK 融合遺伝子のバンドは観察されなかった(図 1)。以上の結果から、既存の報告通り、NCI-H2228 細胞は EML4-ALK 融合遺伝子陽性で、NCI-H460 細胞は陰性であることが確認された。また、EML4-ALK 融合遺伝子を検出可能な RT-PCR の条件が設定できた。

C-2. EML4-ALK 陽性・陰性細胞株の培養上清中 Exosome の精製と融合遺伝子の検出解析

上記の条件検討の結果をもとに、NCI-H2228 細胞と NCI-H460 細胞から分泌される Exosome 中の EML4-ALK 融合遺伝子の解析を試みた。まず、両細胞の培養上清から、超遠心法により、Exosome 画分を精製し、その特性を評価した。電子顕微鏡で観察した結果、既存の報告通り、両画分には 100 nm 前後の球状の粒子が数多く存在していた(図 2(A))。さらに、Exosome マーカーとして知られている TSG101 の発現を WB で解析したところ、両画分ともに、TSG101 の発現が確認された(図 2(B))。これらの結果から、本手法によって Exosome が回収・精製できていることが示唆された。

そこで、両細胞から分泌された Exosome 中の EML4-ALK 融合遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。その結果、NCI-H2228 細胞から分泌された Exosome では、EML4-ALK 融合遺伝子が増幅されたのに対し、NCI-H460 細胞由来 Exosome では、バンドは検出されなかった(図 3)。以上の検討から、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の細胞から分泌される Exosome には、当該融合遺伝子が含有されていることが示唆された。

C-3. 担がんモデルマウスの血中 Exosome からの融合遺伝子の検出解析

上記の結果から、EML4-ALK 陽性のがん細胞から分泌される Exosome を血中から回収することで、がん組織における EML4-ALK 融合遺伝子の存在を解析できる可能性が示されたため、両細胞を移植したゼノグラフトモデルマウスを作製し、血中からの当該融合遺伝子の検出を試みた。心臓より採血した血液から血漿を調製し、超遠心法により、Exosome 画分を回収した。また、Cell Free RNA の影響も解析するため、超遠心した上清も回収し、それぞれから cDNA を合成した。RT-PCR により、EML4-ALK 融合遺伝子の検出を試みた結果、NCI-H2228 細胞のゼノグラフトモデルマウスの血液から回収した Exosome 画分では EML4-ALK 融合遺伝子が増幅されたのに対し、上清画分では融合遺伝子の増幅は検出されなかった。また、NCI-H460 細胞のゼノグラフトモデルマウスの血液から回収した Exosome 画分および上清画分はいずれも当該融合遺伝子のバンドは観察されなかった(図 4)。

D. 考察

C. 研究結果に記載

E. 結論

低侵襲な次世代コンパニオン診断法の開発に向け、近年、がん細胞から多く分泌されることが報告されている Exosome に着目し、肺がん発症のドライバー遺伝子の 1 つである

EML4-ALK 融合遺伝子を血中から検出可能な系の確立を試みた。本年度は、EML4-ALK 融合遺伝子陽性の NCI-H2228 細胞と、その対照として EML4-ALK 陰性の NCI-H460 を用い、当該融合遺伝子の検出系の確立と、培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出を図った。その結果、NCI-H2228 細胞の培養上清中およびゼノグラフトモデルマウスの血漿中 Exosome からの EML4-ALK 融合遺伝子の検出に成功した。今後、血液検査レベルで検出可能な感度を求めていく必要はあるものの、本結果は血液から EML4-ALK 融合遺伝子の存在を検出できる可能性を示しており、これまでのバイオプシーに代わる低侵襲なコンパニオン診断薬の開発に資する知見と考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Nagano, K., Yamashita, T., Inoue, M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y. & Tsunoda, S. Eph receptor A10 has a potential as a target for a prostate cancer therapy., Biochem. Biophys. Res. Commun. 450, 545-9 (2014).
2. Nagano, K., Maeda, Y., Kanasaki, S., Watanabe, T., Yamashita, T., Inoue, M., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Abe, Y., Mukai, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Ephrin receptor A10 is a promising drug target potentially useful for breast cancers including triple negative breast cancers. J. Controlled Release 189, 72-9 (2014).
3. Kamada, H., Taki, S., Nagano, K., Inoue,

M., Ando, D., Mukai, Y., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Generation and characterization of a bispecific Diabody targeting EPH receptor A10 and CD3. Biochem. Biophys. Res. Commun.456, 8-12 (2015).

G-2. 学会発表

1. Nagano, K., Kanasaki, S., Kamada, H., Yamashita, T., Mukai, Y., Higashisaka, K., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S.: Function of tumor cell-derived exosomes during angiogenesis. 第 8 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 熊本(熊本), 2014 年 11 月.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

I. 研究協力者

鎌田 春彦	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
長野 一也	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
井上 雅己	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト

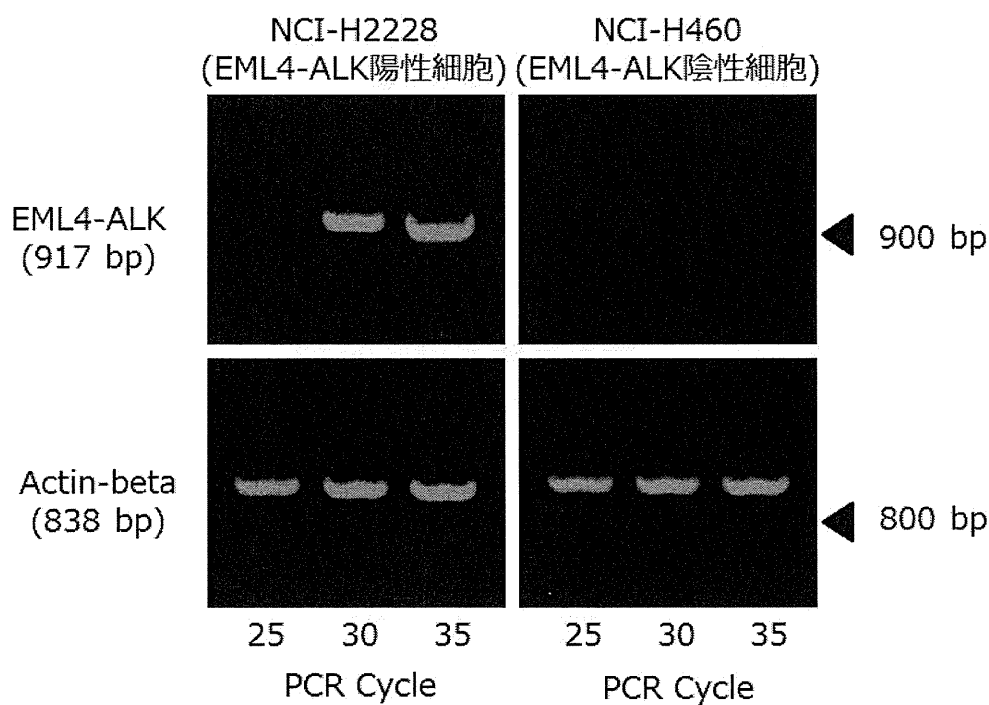


図 1 肺がん細胞株における EML4-ALK 融合遺伝子の検出

EML4-ALK Valient 3 陽性細胞として知られる NCI-H2228 細胞と、その対照として、EML4-ALK Valient 3 陰性の NCI-H460 細胞を用い、EML4-ALK Valient 3 の発現とその検出系の確立を図った。RT-PCR により、当該融合遺伝子を増幅(40 サイクル)し、そのサンプルをアガロース電気泳動した。

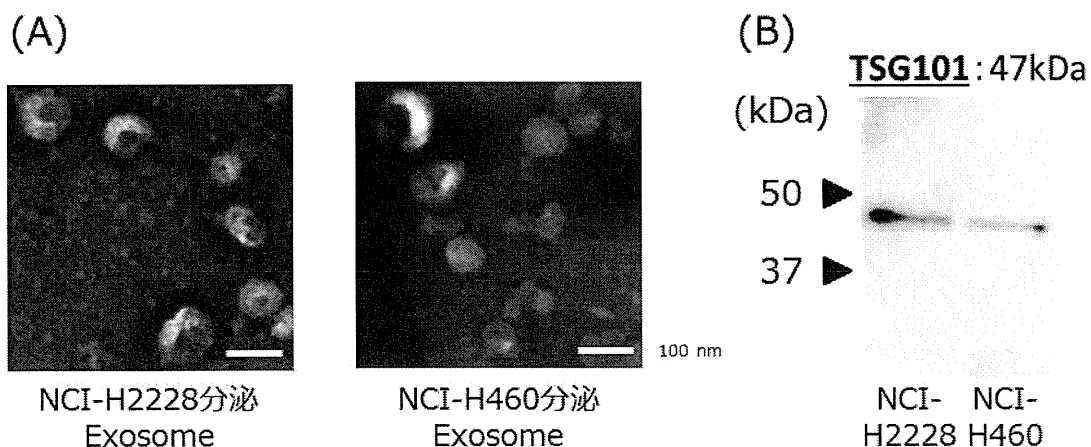


図 2 NCI-H2228 細胞・NCI-H460 細胞分泌 Exosome の特性評価

(A)両細胞の培養上清から超遠心法により、Exosome 画分を回収した。(A) 透過型電子顕微鏡による観察。白色のバーは、100nm。(B)Exosome マーカーとして知られる TSG101 の発現を WB にて評価。

卵巣明細胞腺癌、前立腺癌及び肺腺癌薬剤効果予測マーカーの開発

研究分担者 平野 久 横浜市立大学先端医科学研究センターセンター長・
大学院生命医科学研究科 教授

研究要旨

卵巣明細胞腺癌(CCA)由来の細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析により、癌抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下していることが明らかになった。また、上皮間葉移行(EMT)を利用して肺腺癌予後予測マーカー候補リン酸化タンパク質を検出することができた。

A. 研究目的

A-1. 卵巣明細胞腺癌診断マーカーの開発

<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解析>

昨年度までに、卵巣明細胞腺癌(CCA)由来の細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析により、癌抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下することを明らかにした。この結果を基に今年度は、免疫沈降と多重反応モニタリング(MRM)法によってリン酸化及び非リン酸化ペプチドの同時定量を行い、ARID1A・Brg1 のリン酸化レベルの低下を検証することを目的として研究を行った。

A-2. 肺癌の予後予測マーカー及び治療標的候補分子の探索

上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)は、上皮細胞が間葉系様(非上皮)細胞に形態変化する現象で、EMTによって癌の浸潤、転移が誘導されることが報告されている。また、EMT と線維症との関連も明らかにされている。

EMT 誘導の分子機構については完全に解明されていないが、EMT の誘導に最も重要な因子として、β型変異増殖因子(TGF-β)が知られている。EMT が誘導される時には TGF-β産生が増大する。TGF-βを上皮培養細胞に添加すると、

E-カドヘリンのような細胞接着因子が減少し、細胞の線維化が起こる。

従って、TGF-βによって誘導される EMT において発現が変動するタンパク質は、癌の浸潤、転移と関係している可能性がある。癌関連タンパク質は、診断マーカーとして利用できる可能性がある。そこで、TGF-βによって EMT を誘導した培養細胞と誘導していない A549 培養細胞間のタンパク質チロシンリン酸化修飾の量的変化を調べ、EMT 関連チロシンリン酸化タンパク質、すなわち、癌関連チロシンリン酸化タンパク質を検出することを目的として研究を行った。また、検出された癌関連タンパク質を利用した肺腺癌予後予測の可能性を明らかにすることも研究の目的とした。

B. 研究方法

B-1.卵巣明細胞腺癌診断マーカーの開発

<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解析>

特異性抗体を用いた免疫沈降と三連四重極型質量分析装置を用いた MRM 法によってリン酸化及び非リン酸化ペプチドの同時定量を行い、癌抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下しているかどうかを調べた。

B-2.肺癌の予後予測マーカー及び治療標的候

補分子の探索

TGF- β を上皮培養細胞に添加して EMT を誘導した。E-カドヘリンのような細胞接着因子の減少や、細胞の線維化が起こっているか検証した。

TGF- β によって誘導される EMT において肺腺癌特異的に発現するチロシンリン酸化タンパク質を検出するため、TGF- β 処理下細胞と処理していない細胞からタンパク質を抽出し、トリプシンで消化した。消化物から抗リン酸化チロシン抗体ビーズを用いてチロシンリン酸化ペプチドを濃縮精製した。そして、MRM 法を用いて同ペプチドを定量解析した。

さらに、肺腺癌術後 5 年目で再発が認められた予後不良患者 9 名及び再発が認められない予後良好患者 9 名について、術後切除し、5 年間冷凍保存した癌組織中のリン酸化タンパク質の発現状況を MRM 法を用いて比較した。

(倫理面への配慮)

提供者の同意が得られ、倫理委員会で承認が得られた試料を使用した。

C,D. 研究結果及び考察

C,D.-1. 卵巣明細胞腺癌診断マーカーの開発

<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解析>

昨年度、癌抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下していることを明らかにした。この結果を基に、特異性抗体を用いた免疫沈降と三連四重極型質量分析装置を用いた MRM 法によってリン酸化及び非リン酸化ペプチドの同時定量を行ったところ、CCA では非 CCA 細胞株と比べて Brg1 のリン酸化レベルが 10%以下にまで低下していることが明らかになった。一方、CCA の症例において高頻度 (約 50%) の遺伝子変異が報告されている ARID1A については、CCA 細胞株でも同程度の頻度で欠失が見られることを免疫ブロット解析により確認した。これに対し、ARID1A のリン酸化修飾レベルには CCA 及び非 CCA 細胞株間で有意差が見られな

いことが MRM 法によって確認された。これらの結果から、CCA の約半数では ARID1A の欠失が、残り半数の CCA では Brg1 のリン酸化レベル低下が生じており、このことが ARID1A・Brg1 を主要構成因子とする SWI/SNF クロマチン再構成複合体の癌抑制機能の低下を招き、CCA の悪性化を引き起こしている可能性があると考えられた。

C,D.-2. 肺癌の予後予測マーカー及び治療標的候補分子の探索

TGF- β を上皮培養細胞に添加したところ、E-カドヘリンのような細胞接着因子が減少し、細胞の線維化が起こった。従って、TGF- β によって EMT が誘導されていると考えられた。

次に、TGF- β によって EMT を誘導した培養細胞と誘導していない A549 培養細胞間のタンパク質チロシンリン酸化修飾の量的変化を調べた。その結果、94 の発現変動チロシンリン酸化タンパク質を検出した。そして、特に発現が増加する 3 種類のタンパク質を見いだした。MRM 定量解析の結果、これらのタンパク質は、早期肺腺癌組織の予後良好、不良と関連して変動することが確認された。従って、これらのチロシンリン酸化タンパク質は、予後予測診断マーカーとして利用できる可能性があると考えられた。

E. 結論

1) CCA 由来の細胞株を用いたリン酸化プロテオームの比較定量解析により、癌抑制因子 ARID1A・Brg1 のリン酸化ペプチドレベルが CCA 特異的に低下していることが明らかになった。今後、これらのタンパク質が診断マーカーとして利用できるかどうか検証する必要がある。

2) EMT を利用して肺腺癌予後予測マーカー候補チロシンリン酸化タンパク質を検出した。今後、これらのタンパク質が薬剤効果予測マーカーとして利用できるかどうか検討する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Fujioka, Y., Suzuki, S.W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y. & Noda, N. N. Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 513-21 (2014).
2. Imanishi, T., Ishihara, C., Badr Mel, S., Hashimoto-Tane, A., Kimura, Y., Kawai, T., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Taniguchi, S., Noda, T., Hirano, H., Brombacher, F., Barber, G. N., Akira, S. & Saito, T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat. Commun.* 5, 3566 (2014).
3. Ino, Y., Ishikawa, A., Nomura, A., Kajiwar, H., Harada, K. & Hirano, H. Phosphoproteome analysis of *Lotus japonicus* seeds. *Proteomics* 14, 116-20 (2014).
4. Kimura, A., Arakawa, N. & Hirano, H. Mass spectrometric analysis of the phosphorylation levels of the SWI/SNF chromatin remodeling/tumor suppressor proteins ARID1A and Brg1 in ovarian clear cell adenocarcinoma cell lines. *J. Proteome Res.* 13, 4959-69 (2014).
5. Masaki, T., Matsunaga, S., Takahashi, H., Nakashima, K., Kimura, Y., Ito, M., Matsuda, M., Murayama, A., Kato, T., Hirano, H., Endo, Y., Lemon, S.M., Wakita, T., Sawasaki, T. & Suzuki, T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I- α in infectious virus production. *J. Virol.* 88, 7541-55 (2014).
6. Matsunaga, S., Kawakami, S., Matsuo, I., Okayama, A., Tsukagoshi, H., Kudoh, A., Matsushima, Y., Shimizu, H., Okabe, N., Hirano, H., Yamamoto, N., Kimura, H. & Ryo, A. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3 for generation and characterization of monoclonal antibody. *Front Microbiol.* 5:208 (2014).
7. Nagata, K., Kawakami, T., Kurata, Y., Kimura, Y., Sakuma, Y., Nagata, T., Miyagi, Y. & Hirano, H. Augmentation of multiple protein kinase activities associated with secondary imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors as revealed by quantitative phosphoproteome analysis. *J. Proteomics* 115, 132-42 (2014).
8. Okayama, A., Miyagi, Y., Oshita, F., Nishi, M., Nakamura, Y., Nagashima, Y., Akimoto, K., Ryo, A. & Hirano, H. Proteomic analysis of proteins related to prognosis of lung adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* 13, 4686-94 (2014).
9. Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Oikawa, Y., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H. & Ohsumi, Y. Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 3350-5 (2014).

G-2. 著書・総説

1. 木村 鮎子, 平野 久 「9 章. 疾患研究における翻訳後修飾の解析」 医学のあゆみ 251, 「疾患研究に応用されるプロテオーム解析」 医歯薬出版, 東京, 2014.

G-3. 学会発表

1. 藤本龍洋, 及川 優, 木村弥生, 平野 久, 山本 林, 大隅良典: 出芽酵母を用いたオートファゴソーム膜のプロテオーム解析, 日本分子生物学会, 2014. 11. 25-27.
2. 生駒桂子, 倉田洋一, 井野洋子, 木村弥生,

- 小野知二, 村越倫明, 杉山圭吉, 平野 久, 西野輔翼: プロテオミクスを活用した脂肪細胞におけるラクトフェリン結合タンパク質の同定, 日本プロテオーム学会, 2014 年会 2014. 7. 17-18.
3. 生駒桂子, 倉田洋一, 井野洋子, 木村弥生, 小野知二, 村越倫明, 杉山圭吉, 平野 久, 西野輔翼: ラクトフェリンの脂肪分解促進作用に關与する脂肪細胞表層局在タンパク質の同定, 日本ラクトフェリン学会, 2014. 11. 8.
 4. 石川智弘, 木村弥生, 平野 久, 東 昌市: MMP-7 により切断修飾を受ける細胞表層タンパク質の同定, 日本病態プロテアーゼ学会, 2014. 8. 8-9.
 5. 平野 久: 分析技術の発達により見えてきた翻訳後修飾異常と疾患 日本医用マススペクトル学会, 2014. 10. 16-17.
 6. 平野 久: トランスレーショナルリサーチと産学連携, International Symposium for Life Design and Engineering, パシフィコ横浜, 2014. 3. 7.
 7. 平野 久: イノベーション創出をめざすプロテオミクスのこれから, 新潟大学第 9 回 頭脳循環プロジェクト・シンポジウム「生体試料のマイクロプロテオミクス研究基盤の確立による疾患の病因・病態の解明」 新潟大学, 2014.3.31.
 8. 平野 久: タンパク質翻訳後修飾の網羅的な解析とその役割, 第 14 回 日本蛋白質科学会年会, 横浜産業貿易センター, 2014.6.25.
 9. Hirano, H., Okayama, A., Masuishi, Y., Ino, Y., Kimura, A., Kimura, Y., Arakawa, N. & Toda, T.: Recent advance in clinical proteomics of protein post-translational modifications. 7th Asia and Oceania Human Proteome Organization Congress, Bangkok, 2014. 8. 6-8.
 10. 木村鮎子, 荒川憲昭, 平野 久, MRM 法による卵巣明細胞腺癌細胞株特異的な SWI/SNF クロマチン再構成複合体因子 Brg1 のリン酸化レベル低下の解析, 日本ヒトプロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
 11. 木村鮎子, 荒川憲昭, 平野 久: 卵巣明細胞腺癌細胞株特異的なクロマチン再構成因子 Brg1 のリン酸化レベル低下, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014. 11. 25-27.
 12. 木村弥生: 質量分析装置を用いた翻訳後修飾解析, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
 13. 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, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
 14. Masuishi, Y., Kimura, Y. & Hirano, H.: Strategies for The Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Sites Using TiO₂ based affinity purification., 7th Asia and Oceania Human Proteome Organization Congress, Bangkok, 2014. 8. 6-8.
 15. 持田啓佑, 及川 優, 木村弥生, 平野 久, 大隅良典, 中戸川 仁: 選択的オートファジーによる小胞体の分解機構, 日本分子生物学会, 2014. 11. 25-27.
 16. 得津奏子, 菅原経継, 井野洋子, 倉田洋一, 木村弥生, 平野 久: ヒト 26S プロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析, 日本電気泳動学会総会, 2014. 10. 24-25.
 17. 山本 林, 鈴木 翔, 藤岡優子, 木村弥生, 平野 久, 野田展生, 大隅良典: オートファジー関連タンパク質のリン酸化による機能制御, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014. 7. 17-18.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
 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

タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量

研究分担者 山田 哲司 国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野 分野長
研究協力者 増田 万里 国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野主任研究員

研究要旨

がんの個別化医療の実現のためには、特定の治療薬の効果や副作用を治療開始前に予測し、投与が適切あるいは不適切な症例を選定する必要がある。本研究課題ではこのような個別化医療のためのコンパニオン診断薬の開発を最終的な目標として、分子標的治療薬が標的とするリン酸化タンパク質のプロファイリングを行い、シグナルネットワークの変化を網羅的に捉える基盤技術の開発を行うことを目的とする。

本研究分担者らは逆相担体がコートされたガラススライドに高密度にタンパク質検体を微量定量スポットする独自のタンパク質マイクロアレイ技術を開発し、血清・血漿タンパク質の定量解析が可能であることを示してきた。本法は従来のイムノブロット法などに比べ格段に感度が高く、微量なタンパク質検体でも可能なことから、生検組織などの臨床検体に応用が可能と考えられる。

本分担研究では、分子標的治療薬のコンパニオンバイオマーカーを開発する基盤技術として、タンパク質マイクロアレイを用いた網羅的なリン酸化タンパク質のプロファイリングを行うことで、シグナルネットワークの変化を捉える方法の分担開発を行う。

平成 26 年度は本技術を用いて、95 のがん細胞株（肝細胞がん 23 株、卵巣がん 16 株、胃がん 15 株、大腸がん 9 株、すい臓がん 9 株、肺がん 8 株、骨肉腫 8 株、口腔がん 7 株）の大規模なリン酸化プロファイルを解析した。一部の細胞株で MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)/ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) と mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル伝達経路の強い活性化が見られたが、肝細胞がん由来の細胞株では統計学的に優位に頻度が高かった。肝細胞がんの特異的な変化と考えられ、本経路の制御が治療となることを示唆した。

A. 研究目的

特定のシグナル伝達分子を標的としたがん分子標的治療薬の開発が進み、効果をあげている。さらに効果が期待できる可能性の高い患者をあらかじめコンパニオン診断薬を用いて絞り込むことであれば、より個々の症例に適した薬剤を選択する最適化医療が期待されている。

多くの分子標的治療薬が制御する生体内のシグナル経路、とりわけシグナルのスイッチとなるタンパク質のリン酸化を検出する方法は、ゲノム・トランスクリプトーム解析技術ほどは

進んでいなかった。我々は、疎水性の表面を持つ逆相スライドガラスに高密度に細胞抽出液をアレイ化（3,072 spots/slide）する技術確立し、リン酸化特異抗体を用いて数百から数千の試料における約 200 個のシグナル伝達のキーとなるタンパク質のリン酸化状態を把握できる逆相タンパクアレイ（Reverse Phase Protein Array : RPPA）基盤を作成した。

今年度はこの基盤技術を用いて、様々な腫瘍由来の細胞株のシグナル伝達系路を網羅的に解析し、腫瘍に特徴的な経路の活性化がないか