

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： プロテオミクスを活用した次世代コンパニオン診断薬の創出に向けた基盤技術研究
2. 研究開発代表者： 米田 悦啓 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
3. 研究開発の成果

①リン酸化プロテオミクスを用いたコンパニオンマーカーの同定と検証

種々のがん細胞株の薬剤感受性株と耐性株を用いて、リン酸化プロテオーム解析を行い、その薬剤のコンパニオンマーカー候補となるリン酸化タンパク質の同定を行った。また、タンパク質の各リン酸化レベルからその上流のキナーゼの活性が予測できることから、薬剤感受性株または耐性株でのキナーゼ活性の違いを調べることにより、コンパニオンマーカーとなるキナーゼの同定も試みた。肺癌治療に用いられているチロシンキナーゼ阻害剤エルロチニブと大腸がん治療に用いられている抗 EGFR 抗体薬セツキシマブについて、上記の解析を行ったところ、エルロチニブ感受性、耐性細胞株を用いた解析から、18 種類のマーカーキナーゼ候補が、セツキシマブ感受性、耐性細胞株を用いた解析から、13 種類のマーカーキナーゼ候補が同定された。

次に、上記のコンパニオンマーカー候補キナーゼについて、阻害剤を用いた検証実験、すなわち、それぞれのキナーゼ阻害剤によって培養細胞の薬剤感受性が変化するかどうか検討した。肺癌については、18 種類のキナーゼ阻害剤がエルロチニブ感受性を、大腸がんについては、Src 阻害剤がセツキシマブ感受性を変化させることを明らかにした。以上のキナーゼが、肺癌、大腸がんのコンパニオンマーカー候補となることが示唆された。

②シスプラチンのコンパニオン診断薬としてのアネキシン A4 の検討

コンパニオン診断薬としてアネキシン A4 の有用性について、人工核酸を用いて検討した。約 2,100 塩基から構成されるアネキシン A4 について、*in silico* で mRNA 構造の解析、アンチセンスオリゴの物性評価を考慮し、6 種類のアンチセンス配列を選択し、安定性を向上させた架橋型人工核酸(LNA)を合成した。これらの LNA がアネキシン A4 をノックダウンできることを確認した。

続いて *in vitro* でプラチナ製剤感受性のアッセイを実施した。コントロール LNA トランスフェクション群と比較して、アネキシン A4 をノックダウンした群では、シスプラチンやカルボプラチンに対する感受性の向上が認められた。このことから、アネキシン A4 がプラチナ系薬剤のコンパニオン診断薬として有用であることが示唆された。

③タンパク質マイクロアレイを用いたリン酸化タンパク質量とコンパニオン診断への応用

昨年度までに前臨床段階と早期の臨床試験に入った段階の 9 種類の低分子化合物に対するスキル胃がん 15 株と中皮腫の細胞 19 株の IC50 値を決定し、個々の細胞で感受性と相関するシグナル伝達経路と相関することができた。特に、有効な分子標的治療薬が同定されていない中皮腫の一部に対し、高い効果を示す薬物を同定できた。

④mTOR 阻害剤のコンパニオン診断薬としての FOXK1 の有用性の検討

昨年度までに mTOR 複合体 1 (mTORC1) が多くの未知のタンパク質をリン酸化し、その分子機能を制御していることを発見した。そのうち、がんとの関連が高い転写因子 FOXK1 が mTORC1 の活性化によって変動することを確認した。このことから、FOXK1 は mTOR 阻害剤のコンパニオン診断薬の標的分子候補となることが示唆された。

⑤コンパニオン診断に資するバイオマーカーの血中測定法技術の開発

がん細胞由来のエクソソームの回収法として、①超遠心法(UC法)、②ExoQuick-TC(System Biosciences)(EQ法)、③ Total exosome isolation Kit (Thermo fisher) (TI法)、④EV second (ジーエルサイエンス)(EV法)の4つの方法を検討した。その結果、UC法は他の方法に比べて最も種類の異なるタンパク質が同定されており、より精製度の高いエクソソームの回収法であることが示唆された。