

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 標的タンパク質絶対定量情報を基盤とする悪性脳腫瘍の分子標的療法に関する臨床的特性の分子基盤解明  
(英語) Application of clinical quantitative targeted absolute proteomics to the molecular targeted drug therapy of malignant brain cancers
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院薬学研究科 准教授 立川正憲  
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Masanori Tachikawa
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 悪性脳腫瘍の検体収集と臨床データの集積  
開発課題名： (英語) Collection of glioblastoma tissues and related clinical data
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 医薬保健研究域医学系 教授 中田光俊  
所属 役職 氏名： (英語) Kanazawa University, Faculty of Medicine, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Professor, Mitsutoshi Nakada

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

悪性脳腫瘍は、脳機能温存の観点から手術による完全摘出が困難であり、外科的根治療法の限界がある。さらに現状の化学療法では、アルキル化剤テモゾロミドが第一選択薬として使用されるが、治療効果に個人差が大きい。一方で、個別化治療へ期待が集まる分子標的薬は、薬物毎に特定のがん種及び進行ステージに適応が限られており、本来の治療ポテンシャルを活かせていない。そこで、従来の遺伝子変異診断に加え、「機能と相関するタンパク質の絶対定量情報に基づくコンパニオン診断技術」を軸とした、がん分子標的薬選択基準の構築と実証が急務である。

そこで本研究は、質量分析装置を用いた標的タンパク質の高感度絶対定量法(Quantitative targeted absolute proteomics, QTAP)によって決定される発現量プロファイルを基盤として、膠芽腫(glioblastoma multiform, GBM)を中心とする悪性脳腫瘍の、分子標的療法に関する臨床特性の分子基盤を解明することを目的とした。GBM 手術検体及び Patient-Derived Xenograft (PDX)を用いて、分子標的薬の標的となる増殖因子受容体及び下流シグナルタンパク質(キナーゼなど)の一斉定量系を構築し、EGFR、PDGFR、IGFR、RET、c-kit など 14 種類の絶対発現量プロファイルを決定した。EGFR は、ほぼ全例で検出され、発現量は最大で約 2,000 倍の個人差が存在した。EGFR の低発現群の検体では、PDGFR など他の増殖因子受容体が高発現する傾向が示された。本結果から、GBM 手術検体における薬効標的タンパク質 EGFR 及びその他の増殖因子受容体の絶対発現量プロファイルに基づいて、分子標的薬適応対象の GBM 患者を 2 グループに層別化できることが示された。一方で、活性本体であるリン酸化修飾体・非リン酸化体を区別しない EGFR の発現量は、無増悪生存期間との間に顕著な相関性は検出されなかった。がん分子標的薬の多くはキナーゼ阻害剤であることから、活性本体となるリン酸化修飾体の発現プロファイルが、薬効予測因子となる可能性が高い。そこで、分子標的薬の薬効標的となる EGFR の複数のリン酸化部位に対する絶対定量系を構築するとともに、GBM 組織検体を用いて EGFR リン酸化修飾体の絶対発現量を決定した。特に、EGFR キナーゼ阻害剤の阻害標的となる EGFR の自己リン酸化部位 2 カ所の修飾率について、個人差を解明した。さらに、薬効標的タンパク質の発現が検出されず、治療標的候補を同定できなかった GBM 手術検体を用いて、リン酸化タンパク質の網羅的定量プロテオミクス(SWATH)解析を行った。パスイエイ解析から見出された細胞増殖活性化経路に着目し、GBM 組織検体のリン酸化タンパク質の定量プロファイルを構築した。腫瘍/非腫瘍部位におけるリン酸化ペプチドの発現量比が 4 倍以上のペプチドは、細胞質画分では 7 種類同定された。細胞増殖に関連する特定のタンパク質のリン酸化レベルが GBM 腫瘍部位で上昇していることが見出されたことから、リン酸化タンパク質の網羅的定量が、分子標的療法の標的的同定に有用であることが示唆された。

分子標的薬に対する感受性の異なる PDX 及び glioblastoma 細胞株を用いて、薬効標的となる増殖因子受容体等のタンパク質の絶対発現量を一斉分析し、発現量プロファイルに基づく分子標的薬の選択基準作成のための基盤を構築した。具体的には、glioblastoma 細胞株において、スニチニブの細胞増殖阻害活性は、薬効標的である増殖因子受容体の絶対発現量を指標とした場合に予測可能な傾向にあった。EGFR 全体の発現量に対する EGFR 自己リン酸化発現割合が高い PDX 検体では、EGFR キナーゼ阻害剤に対する感受性が高くなる傾向が示された。以上の結果から、リン酸化修飾体を含めた、薬効標的タンパク質の絶対発現量プロファイルが、異なる臨床薬理特性を有する患者群の層別化を規定する因子であることが示唆された。

Glioblastoma multiform (GBM) is the most malignant form of brain tumors. Although surgical resection is a first line therapy for the malignant brain tumor, the complete dissection of the tumor regions is difficult due to the highly invasive characteristics of tumor cells and the conservation of important brain region. There is an urgent need to establish the personalized medicine with the molecular-targeted drugs based on the molecular characteristics of GBM. Quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) have enabled us to clarify the molecular basis of the functional protein expression by determining the individual protein expression levels, which would affect the efficacy of the molecular-targeted drugs. Hence, the direct quantification of the efficacy-related functional proteins in clinical human samples would be the most suitable approach to overcome the essential problems. The purposed of the present study was to apply the clinical quantitative targeted absolute proteomics to the molecular targeted drug therapy of malignant brain cancers.

The absolute protein expression levels of molecular targets of molecularly targeted agents and their related proteins, e.g., EGFR, PDGFR, IGFR, RET, and c-kit, in the frozen GBM tissues and patients-derived xenografts (PDX) were determined by QTAP. There were maximal 2,000-fold differences in the protein levels of EGFR among the GBM tissues. The GBM tissues were able to be divided into the group with the high EGFR expression and low PDGFR expression and the group with the low EGFR expression and high PDGFR expression. These results suggest the stratification of the GBM patients based on the absolute protein expression levels of molecular targets of molecularly targeted drugs. Furthermore, the protein expression levels of total EGFR protein, which includes non-phosphorylated and phosphorylated forms, did not show the significant correlation with the clinical output. This raised the possibility that the phosphorylated protein expression profiles of molecular targets of molecularly targeted drugs such as tyrosine kinase inhibitors would be a prediction marker for the efficacy. The quantification of the phosphorylated proteins revealed the inter-individual differences in the phosphorylation ratio of EGFR in the GBM tissues. Furthermore, a combination of HAMMOG-based concentration of phosphorylated peptides and comprehensive quantitative proteomics (SWATH method) enabled us to identify the upregulated phosphorylation of cell proliferation-related proteins using the GBM tissue which does not exhibit any protein expressions of the molecular targets of molecularly targeted drugs. This result suggests the usefulness of the profiling of phosphorylated proteins for the discovery of the new molecular target(s) in the GBM tissues. The selection criteria of molecular targeted drugs was determined based on the profiling of the protein expression levels in the PDXs and glioblastoma cell lines with the different susceptibility for the molecular targeted drugs. This analysis showed that the inhibition activity of sunitinib in the glioblastoma cell proliferation tended to be predicted based on the protein expression profile as markers and the phosphorylation ratio of EGFR tended to be sensitive to an EGFR kinase inhibitor. These lines of evidence could establish the concept that the profile of the protein expression levels in the GBM tissues is a determinant factor of the personalized molecular-targeted therapy for GBM.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. Armania N, Hoshi Y, Yoneyama T, Miyauchi E, Tachikawa M, Watanabe M, Terasaki T. Global and Targeted Proteomics of Prostate Cancer Cell Secretome: Combination of 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (2DICAL) and In Silico Selection SRM Analysis. J Pharm Sci. 2016, 105, 3440-3452.
2. 立川正憲. 質量分析を用いた標的タンパク質絶対定量技術とがん化学療法の層別化・個別化への応用. Cancer Board Square. 2016, 3, 149-153.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 網羅的定量プロテオミクス SWATH 法および定量的標的プロテオミクスを用いた一次性膠芽腫の血漿診断タンパク質候補の同定, 口頭, 宮内英輔、立川正憲、米山敏広、内田康雄、古田拓也、中田光俊、大槻純男、寺崎哲也, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3/26, 国内.
2. Clinical Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) for membrane transporters, metabolic enzymes and drug targets: its potential application to human intestinal absorption prediction and brain cancer molecular targeted therapy, 口頭(招待講演), Tachikawa M, The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceuticals, 2016/6/24, 国内.

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 標的定量プロテオミクスで何が、かわるか, 立川正憲, 第 12 回東北大学学際科学フロンティア研究所セミナー, 2016/8/10, 国内.

#### (4) 特許出願

該当なし。