

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) 酵素活性プロテオミクスを用いた新規がん治療標的の探索と治療法開発  
(英語) Development of activity - based proteomics and its application for cancer drug discovery.

研究開発担当者 (日本語) プロテオームリサーチプロジェクト プロジェクト研究員 足立 淳  
所属 役職 氏名： (英語) Laboratory of Proteome Research, Senior Researcher, Jun Adachi

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) 酵素活性プロテオミクスを応用した肺がんの分子標的薬耐性細胞の性状解析と  
新規治療標的の探索

開発課題名： (英語) Study of resistance mechanisms to molecular target drugs and therapeutic strategies to overcome the resistance in lung cancer using groundbreaking proteomic technologies.

研究開発分担者 (日本語) (公財) がん研究会 がん化学療法センター基礎研究部 主任研究員  
片山量平

所属 役職 氏名： (英語) The Cancer Chemotherapy Center of JFCR, Senior staff scientist,  
Ryohei Katayama

II. 成果の概要 (総括研究報告)

がんの本態解明のため、様々なオミクス技術を用いて遺伝子・タンパク質・代謝物など様々な物質の動態が大規模に定量されている。我々は新たな切り口として、薬剤の直接の標的であるタンパク質に焦点をあて、存在量ではなく、活性をプロテオーム解析することにより、細胞内でどのタンパク質がどれくらい活性を有しているか、また薬剤の刺激により活性がどのように経時変化するかを詳細に

調べ、インフォマティクス解析と組み合わせることで分子活性情報に基づいた次世代型創薬戦略の構築を目指している。

具体的には、分子標的薬の主要な標的である ATP をエネルギー源とする代謝酵素群を測定対象にして、分子標的薬の大きな問題である耐性獲得とその克服をメインテーマとして、耐性機構が不明である同一患者由来薬剤感受性・耐性肺がん細胞株を解析することで肺がんにおける分子標的薬に対する未同定の耐性メカニズムを明らかにし、分子標的薬に対して不応となった際の新たな治療法の開発につながる成果を得ることを目的とする。

平成 28 年度は主に酵素活性プロテオミクス解析基盤の改良、肺がん細胞株の樹立及びその応用を行った。

#### ○酵素活性プロテオミクス解析基盤の改良

酵素活性プロテオミクス解析基盤の改良については、反応条件の改良とマルチプレックス技術による新たな定量測定系の導入による、高感度化、迅速化を実施した。酵素活性の精確な測定には、反応中にキナーゼ活性の初期状態をなるべく維持することが重要であるが、ATP 及び ATP probe の濃度の抑えること、還元剤 (TCEP) を添加することで試験管内でのリン酸化反応を抑制できることが確認された。しかし一方で、ATP 及び ATP probe の濃度の抑えることはプローブ標識量の減少を招き、感度が下がることにより、定量対象キナーゼが減少してしまうことにつながった。そこで、酵素活性プロテオミクス解析の感度向上と迅速化を目指して、10 サンプルを混合して解析を行うことでシグナル増強効果および解析の迅速化が期待されるマルチプレックス技術 (TMT 10plex) による 10 サンプル一斉比較手法を本解析に導入し、測定感度、同定数が改善することを確認した。

さらに酵素活性を測定するもう一つのアプローチとして、リン酸化プロテオミクスによる解析も行い、その有効性が確認された。

#### ○肺がん細胞株の樹立及びその応用

また肺がん臨床検体からの PDC (がん細胞株) を複数樹立することに成功し、治療前後のペアでの樹立にも 2 ペア (4 株) で成功した。さらに一部ではその耐性機構の同定に成功し、プロテオミクスデータから予測される耐性機構と一致することが確認できた。

In order to elucidate the true nature of cancer, various omics technologies are used to quantify genes, proteins, metabolites. In this study, we focus on the activity-based proteomics, instead of molecular amount-based proteomics, to reveal differences in protein activity between resistant and sensitive cancer cells and also reveal the dynamics of protein activity by drug stimulation. Combining these activity data with informatics, we will try to establish a new strategy for drug discovery.

In this study, we select ATP-dependent enzymes which are major targets of molecular targeted drugs as an object of measurement. The purpose of our study is to elucidate the mechanism of resistance to molecular target drugs and to obtain evidence that leads to the development of new therapies for patients who are resistant to molecular targeted drugs.

In FY 2016, we mainly focused on improvement of activity-based proteome analysis, establishment of patient-derived lung cancer cells and application of the proteomic technology to the established lung cancer cells.

Regarding the improvement of activity-based proteome analysis, we carried out optimization of reaction parameters and introduced multiplexing technology for peptide quantitation to gain the sensitivity and increase the throughput of the analysis. For accurate measurement of enzyme activity, it is important to maintain the initial state of kinase activity as much as possible during the reaction. We confirmed that in vitro phosphorylation can be inhibited by decreasing the concentration of ATP and ATP probes in the reaction mixture or by adding reducing agent (TCEP). However, intensity of labeled peptides by ATP probe was also decreased by decreasing the concentration of ATP and ATP probes. This leads to a decrease of the sensitivity and a decrease in quantitative target kinase. Therefore, in order to improve sensitivity and speed of the analysis, we introduced multiplexing technology (TMT 10plex) which can obtain signal enhancement effect by mixing 10 samples and we confirmed the improvement in measurement sensitivity and the number of identified kinases.

In addition, as another approach to measure enzyme activity, phosphoproteomics was also conducted and its effectiveness was confirmed.

We succeeded in establishing multiple PDCs from lung cancer clinical specimens including two pairs (4 strains) obtained from clinical specimens before and after treatment of the same patient. In addition, we succeeded in identifying its resistance mechanism in part, and it was confirmed that it agrees with the resistance mechanism predicted from proteomics data.

### 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 0件、国際誌 6件）

1. Abe Y, Nagano M, Tada A, \***Adachi J**, Tomonaga T. Deep phosphotyrosine proteomics by optimization of phosphotyrosine enrichment and MS/MS parameters. *J Proteome Res.* 2017, 16, 1077-1086. (\* corresponding author)
2. \***Adachi J**, Hachiguchi K, Nagano M, Sato M, Sato A, Fukamizu K, Ishihama Y, Tomonaga T. Improved Proteome and Phosphoproteome Analysis on a Cation Exchanger by Combined Acid and Salt Gradient. *Anal Chem.* 2016, 8816, 7899-7903. (\* corresponding author)
3. Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, **Katayama R**, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H. APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017, 16(4):752-762.

4. Uchibori K, Inase N, Araki M, Kamada M, Sato S, Okuno Y, Fujita N, \***Katayama R**. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Commun.* 2017, 8:14768., (\* corresponding author)
5. \***Katayama R**. Therapeutic strategies and mechanisms of drug resistance in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged lung cancer. *Pharmacol Ther.* 2017, Feb [Epub ahead of print], Review
6. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, **Katayama R**, Dagogo-Jack I, Gadgeel S, Schultz K, Singh M, Chin E, Parks M, Lee D, DiCecca RH, Lockerman E, Huynh T, Logan J, Ritterhouse LL, Le LP, Muniappan A, Digumarthy S, Channick C, Keyes C, Getz G, Dias-Santagata D, Heist RS, Lennerz J, Sequist LV, Benes CH, Iafrate AJ, Mino-Kenudson M, Engelman JA, Shaw AT. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2016, 6(10):1118-1133.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. エルロチニブ処理時の非小細胞肺癌培養細胞株におけるリン酸化経時変化大規模情報の取得と活用, ポスター発表, **足立 淳**, 阿部雄一, 朝長 毅, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/6-8, 国内.
2. System-wide temporal characterization of the phosphoproteome of non-small-cell lung cancer cells treated with erlotinib. 口頭, **Adachi J.**, Abe Y., Nagano M., Kishida M., Sato A., and Tomonaga T. 1st Symposium of Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society, 2017/2/7, 国内.
3. System-wide temporal characterization of the phosphoproteome of non-small-cell lung cancer cells treated with erlotinib. 口頭, **Adachi J.**, Abe Y., Nagano M., Kishida M., Sato A., and Tomonaga T. 3rd International Symposium of Medicinal Sciences, 2017/3/26, 国内.
4. Tumor cell and stromal cell mediated drug resistance in driver oncogene positive non-small cell lung cancer, シンポジウム口頭, **片山量平**, 第74回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
5. ALK 戦線異常アリ: 多様な TKI 耐性機構とその克服, シンポジウム口頭, **片山量平**, 第57回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/19, 国内.
6. ドライバーがん遺伝子陽性がんにおける分子標的薬耐性機構とその検索, 口頭, **片山量平**, 第1回 Liquid Biopsy 研究会, 2017/1/21, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 質量分析計を用いたプロテオミクスの医療応用, **足立 淳**, メディカルジャパン 2017, 2017/2/16, 国内.

(4) 特許出願

該当なし