

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) がんリン酸化シグナル伝達因子の活性定量に基づく新次元薬効予測診断システムの開発
(英語) Development of a novel tool for prediction of drug response based on activity of phospho-signaling molecules responsible for carcinogenesis
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクト プロジェクトリーダー 朝長毅
- 所属 役職 氏名：(英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition Laboratory of Proteome Research Project Leader Takeshi Tomonaga
- 実施期間：平成28年12月 1日 ～ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 本研究の実施と統括
開発課題名：(英語) Implementation and supervision of this research
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 プロテオームリサーチプロジェクト プロジェクトリーダー 朝長毅
- 所属 役職 氏名：(英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition Laboratory of Proteome Research Project Leader Takeshi Tomonaga
- 分担研究 (日本語) プロテオミクスを用いた薬効予測法の開発とその診断システムの構築
開発課題名：(英語) Development of a method for predicting drug efficacy using proteomics and construction of diagnostic system
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 医薬基盤研究所 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) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition Laboratory of Proteome Research Senior Researcher Jun Adachi

- 分担研究 (日本語) 臨床検体からの培養細胞株・PDX モデルの樹立と性状解析を通じた新規治療標的・治療法の開発
- 開発課題名: (英語) Development of novel therapeutic targets and treatments through establishment and characterization of cultured cell lines / PDX models from clinical specimens
- 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) Japanese Foundation For Cancer Research The Cancer Chemotherapy Center Laboratory of Experimental Chemotherapy Senior Staff Scientist Ryohei Katayama
- 研究開発分担者 (日本語) (公財) がん研究会 有明病院 大腸外科 医長 長山 聡
- 所属 役職 氏名: (英語) The Cancer Institute Hospital of Japanese Foundation For Cancer Research Gastroenterology Center Head Satoshi Nagayama
- 分担研究 (日本語) 大腸がん手術検体の提供と臨床情報の解析
- 開発課題名: (英語) Provision of surgical specimen for colorectal cancer and analysis of clinical information
- 研究開発分担者 (日本語) (公財) がん研究会 有明病院 呼吸器内科 部長 西尾 誠人
- 所属 役職 氏名: (英語) The Cancer Institute Hospital of Japanese Foundation For Cancer Research Thoracic Medical Oncology Department Director Makoto Nishio
- 分担研究 (日本語) 肺がん組織検体の提供と臨床情報の解析
- 開発課題名: (英語) Provision of lung cancer tissue specimens and analysis of clinical information

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究では、高品質な臨床情報が付随した進行大腸がん、進行肺がん検体から各患者由来の培養細胞株やPDXモデルを作製し、その個々の患者由来細胞を用いたプロテオゲノミクス解析（遺伝子変異解析とリン酸化プロテオミクス解析）及び薬剤スクリーニングを行い、得られた結果と臨床情報とを組み合わせることで、大腸がん・肺がんの分子標的薬の薬効を規定する因子群を同定し、分子標的薬のより正確な薬効予測法及びその診断システムを開発することを目的とする。

研究開発の主な項目は以下のとおりである。

1. 大腸がん、肺がん臨床検体の収集と臨床情報の取得
2. 臨床検体からの培養細胞株・PDX モデルの樹立と遺伝子変異解析・薬剤感受性試験による新規治療標的・治療法の開発
3. プロテオミクスを用いた薬効予測法の開発とその診断システムの構築

それぞれの項目に対する成果は以下のとおりである。

1. 研究分担者の（公財）がん研究会有明病院大腸外科長山医長はこれまでに大腸癌細胞株樹立のために、大腸癌 192 症例（男性 102 名、女性 90 名、21 歳－91 歳、平均年齢 55 歳）の切除標本から、正常大腸粘膜および癌組織をペアーで採取し、これらの症例の臨床病理所見データの収集を完了した。採取した症例の最終 Stage 別内訳は、Stage0 (2)、Stage1 (22)、Stage2 (41)、Stage3a (36)、Stage3b (12)、Stage4 (79)となっている。

研究分担者の（公財）がん研究会有明病院呼吸器内科西尾部長は、2014 年 1 月から 2016 年 9 月までに当院で EGFR-TKI 治療を受けた EGFR 変異陽性非小細胞肺癌患者 235 例のうち、EGFR-TKI が無効となった 127 例で再生検を行い、組織検体を収集するとともに臨床情報の集積を行った。また、2016 年 1-12 月に新規肺癌薬療法を 250 例で施行し、その症例の組織検体の収集および臨床情報の集積を行った。

2. 研究分担者の（公財）がん研究会がん化学療法センター片山主任研究員は、（1）上記の進行肺癌患者ならびに進行大腸がん患者の体腔液検体、生検検体、または手術検体を用いて、これまでに培養細胞株：肺がん細胞株（6 株）・大腸がん細胞株（12 株）を樹立した。PDX モデルに関しては、現在 2 ラインについて腫瘍の生着を確認中である。（2）がん臨床検体を用いた遺伝子変異解析（ターゲットシーケンス）と各種阻害剤感受性試験を大腸がん初代培養細胞株で測定を行い現在解析中である。

3. 研究代表者の医薬基盤・健康・栄養研究所プロテオームリサーチプロジェクトの朝長リーダーと足立プロジェクト研究員は（1）チロシンリン酸化濃縮技術の検討を進め、既存法に比べて約 2.9 倍の高効率なチロシンリン酸化ペプチド濃縮法を構築した（J Proteome Res in press）。また、100 検体以上のプロテオーム・リン酸化プロテオーム解析に対応可能なサンプル処理の自動化装置と前処理法について独自設計を行い、平成 28 年度末に導入した。（2）患者由来細胞を用いた薬効予測法の開発の予備検討として、エルロチニブ感受性・耐性肺がん細胞株およびセツキシマブ感受性・耐性大腸がん細胞株を用いたプロテオーム・リン酸化プロテオーム解析を行った。取得した解析データをバイオインフォマティクスを用いて解析し、感受性と耐性を見分け、かつ耐性克服標的となる候補因子およびパスウェイを複数見出した。それらの候補が薬効予測や耐性克服標的となるかどうか、siRNA や阻害剤を用いて検証を行った。（3）上記の手法を患者由来細胞に応用した。大腸がん手術検体から樹立した培養細胞を用い、BRAF 阻害薬・MEK 阻害剤・EGFR 抗体薬等の薬効を規定する因子の解析を行った。

英文

In this study, we aim at development of an accurate prediction method for drug sensitivity and its diagnostic system. Cultured cell lines and PDX models derived from specimens obtained from advanced colorectal cancer and lung cancer patients are subjected to genomic, proteomic and phosphoproteomic analysis combined with drug screening. From the obtained results along with clinical information, we identify biomarkers that reflect the efficacy of molecular targeted drugs for colorectal cancer and lung cancer.

Main themes of research and development are as follows.

1. Collection of clinical specimens of colorectal, lung cancer as well as acquisition of clinical information
2. Establishment of cultured cell line / PDX model from clinical specimens and development of novel therapeutic targets / therapeutic methods by genomic analysis and drug screening.
3. Development of a method for predicting drug efficacy using proteomics and construction of its diagnostic system

The results for each theme are as follows.

1. Pairs of normal colon mucosa and cancer tissue with clinical pathology data from 192 cases of colorectal cancer patients (102 males, 90 females, 21 - 91 years old) were collected for establishing patient-derived colorectal cancer cell lines. Tissue specimens and clinical information were collected from 127 non-small cell lung cancer patients in whom EGFR-TKI was ineffective among 235 patients treated with EGFR-TKI from January 2014 to September 2016. Tissue specimens and clinical information were also collected from 250 lung cancer patients treated with new molecular targeted drugs from January to December 2016.
2. Using body cavity fluid, biopsy or surgical specimens of the advanced lung cancer and colorectal cancer patients, patient-derived cultured cell lines (6 lung cancer cell lines and 12 colon cancer cell lines) were established. Regarding the PDX model, we are currently confirming the engraftment of tumors on 2 lines. Genetic analysis by targeted sequence and drug efficacy tests of various inhibitors was performed using patient-derived cultured cell lines.
3. We have established a novel tyrosine phospho-proteomic method (J Proteome Res in press). It can identify tyrosine phospho-peptides about three times more efficient than previous methods. In addition, we have designed sample processing automation equipment that can support pretreatment and proteome/phospho-proteome analysis of more than 100 samples. As a preliminary study of the development of a prediction method for drug sensitivity using patient-derived cells, proteome/phospho-proteome analysis was performed using erlotinib sensitive/resistant lung cancer cell lines and cetuximab sensitive/resistant colon cancer cell lines. Using obtained data combined with bioinformatics, we identified biomarkers that reflect the efficacy of erlotinib for lung cancer cell lines and cetuximab for colorectal cancer cell lines. Then, we verified using siRNAs or inhibitors whether these candidates will be useful for prediction of drug sensitivity or overcome resistance. The above method was applied to patient-derived cell lines established from colon cancer patient specimens to identify biomarkers that reflect the efficacy of BRAF, MEK inhibitors or anti-EGFR antibody.

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 4件）

1. 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.
2. 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.
3. Nishio M, Goto K, Chikamori K, Hida T, Katakami N, Maemondo M, Ohishi N, Tamura T. Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Serum Among Japanese Patients Treated With First-Line Erlotinib for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 2016, 17, 24-29 e21.
4. Takeuchi K., Togashi Y, Kamihara Y, Fukuyama T, Yoshioka H, Inoue A, Katsuki H, Kiura K, Nakagawa K, Seto T, Maemondo M, Hida T, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Yamamoto N, Nishio M, Tamura T. Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). *Ann Oncol* 2016, 27, 185-192.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 質量分析計を用いたクリニカルプロテオミクスの可能性を探る。口頭発表、朝長 毅、第36回日本分子腫瘍マーカー研究会，2016年10月5日、国内。
2. 先端プロテオーム解析技術を用いた新規創薬標的因子の探索。口頭発表、朝長 毅、彩都産学官連携フォーラム2017，2017年1月25日、国内。
3. 大腸がんの早期診断・再発診断バイオマーカーの探索。口頭発表、朝長 毅、日本臨床検査医学会・日本臨床化学会 第13回合同地方会，2017年2月12日、国内。
4. 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。
5. 大規模チロシンリン酸化プロテオミクスによるセツキシマブ処理時キノームリプログラミング機構の解析，ポスター発表，阿部雄一、長野麻衣子、多田亜沙、足立淳、朝長毅，第75回日本癌学会学術総会、2016/10/6-8、国内
6. System-wide temporal characterization of the phosphoproteome of non-small-cell lung cancer cells treated with erlotinib. ポスター発表、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。

7. System-wide temporal characterization of the phosphoproteome of non-small-cell lung cancer cells treated with erlotinib. ポスター発表, Adachi J., Abe Y., Nagano M., Kishida M., Sato A., and Tomonaga T. 3rd International Symposium of Medicinal Sciences, 2017/3/26, 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

無し