

# がん増殖シグナル伝達経路の 探索

# 目次

<b>1</b>	がん概論	1-1 – 1-13
----------	------	------------

---

<b>2</b>	がん増殖シグナル伝達	2-1 – 2-11
----------	------------	------------

---

<b>3</b>	PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路	3-1 – 3-18
----------	-----------------------	------------

---

<b>4</b>	Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) シグナル伝達経路	4-1 – 4-12
----------	---------------------------------	------------

---

<b>5</b>	Wnt/ $\beta$ -カテニン シグナル伝達経路	5-1 – 5-10
----------	-----------------------------	------------

---

<b>6</b>	付録	6-1 – 6-8
----------	----	-----------

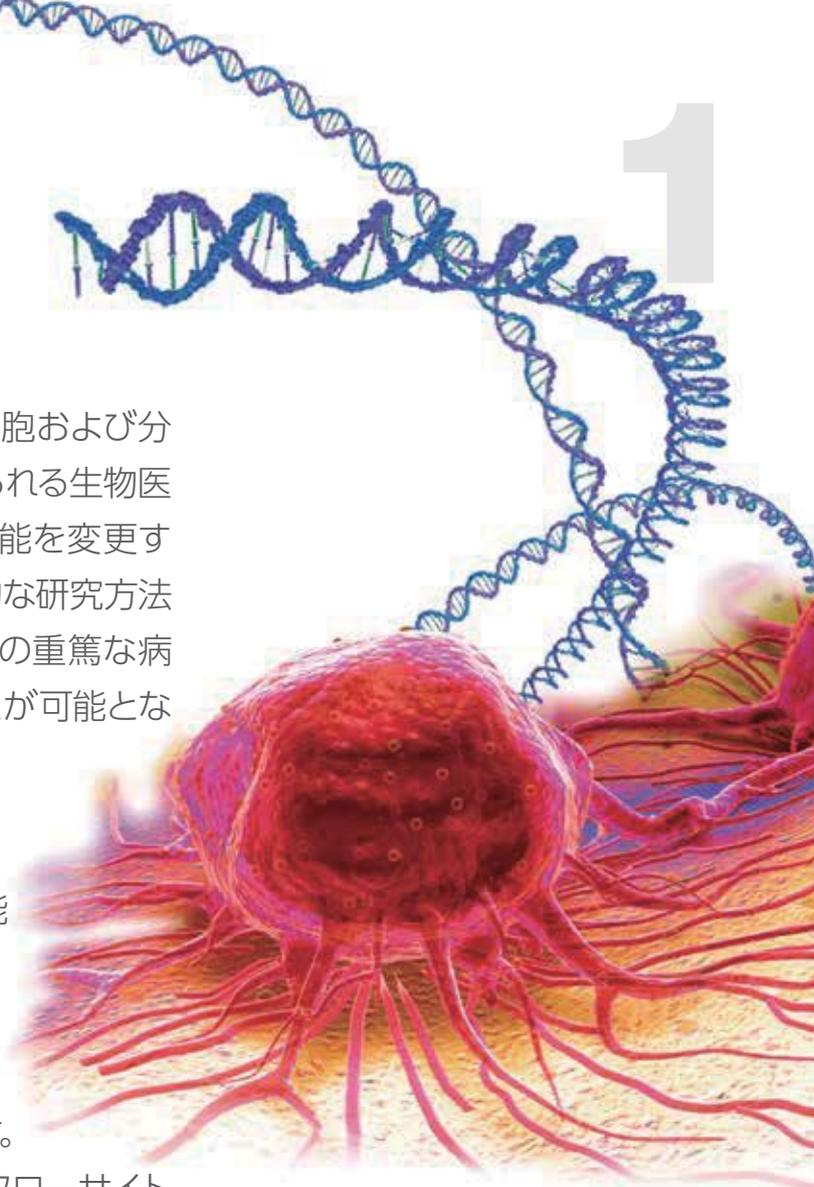
---

# がん概論

## イントロダクション

20世紀の間、科学者はがん増殖を促進する細胞および分子のメカニズムを学びました。過去50年にみられる生物医学的研究の加速で、予測可能な方法で細胞機能を変更することが可能となり、疾患の検出および革新的な研究方法が科学界および医学界に提供され、がんなどの重篤な病状を治療するための新しい方法を見つけることが可能となりました。

本ハンドブックは、以下の3部から構成されます。はじめに、がん増殖シグナル伝達の研究を可能とってきたいくつかの重要なマイルストーンについて言及します。次に、がん研究の進歩において可能となった、がん標的治療の実用化の具体的な方法を図解入りでご紹介いたします。最後に、ウェスタンブロット、免疫蛍光分析、フローサイトメトリー、ELISA、がん生物学および他の領域の生物医学的研究に常用されている幅広い実験技術の詳細なプロトコールをご紹介いたします。



## 目次

がん概論	1-2	がんの分子プロファイリング	1-10
がん研究マイルストーン	1-3	抗体：がん研究のための強力なツール	1-12
がんゲノム研究	1-5	参考文献	1-13
肺がんのサブタイプ	1-8		

# がん概論

## 一般統計

「がん」は、重要な細胞機能を制御不能とする特定の遺伝子変異を特徴とする疾患群を表す一般的用語です(図1.1)。がんは、体内のあらゆる器官に発生する可能性があり、固形腫瘍を形成するか、あるいは血液系の細胞を侵す腫瘍を形成するとされています。「悪性腫瘍」および「新生物」は、「がん」を示す別の用語です。全てのがんは、起源の組織に関わらず、細胞増殖の加速、解剖異常細胞の存在、体内の他の組織に転移または浸潤するという共通の特徴を示します。転移性疾患はがん末期に生じ、がん罹患者の主要な死亡原因となっています。世界保健機関によれば、がんは世界的に主要な死亡原因で、2012年のがん関連の死亡者数は820万人と発表されています。いくつかの一般的ながん種に関連する世界における推定年間死亡者数を表1に示します。<sup>1</sup>

医学界では、全てのがんの5%~10%が遺伝性であると認識されています(図1.2)。残りの90%~95%のがんは、毒素(タバコなど)、UV照射および他の環境要因、不健康な食事や過剰なアルコール摂取などの生活要因を始めとするさまざまな原因によって生じる遺伝子変異によって発生し、多くのさらなる要因によって、がんが発現するリスクが高まると考えられています。<sup>1,2</sup>

他のがん関連リスクファクターとして、特定のウイルスおよび細菌による感染があります。例えば、子宮頸がんおよび胃がんが発生する可能性は、それぞれヒトパピローマウイルスおよび*Helicobacter pylori*(ピロリ菌)による感染によって上昇します。*Helicobacter pylori*は、ヒトにおける消化性潰瘍および慢性胃炎の原因としてよく知られています。この細菌は十二指腸潰瘍にも関連し、腺がんおよび胃における粘膜関連リンパ組織の低悪性度リンパ腫の発生にも関与すると考えられています。<sup>3,4</sup>

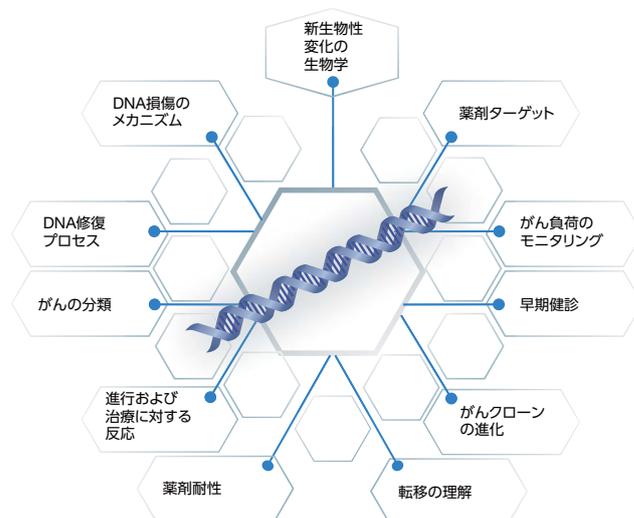


図1.1. がん研究の側面 がんは、多数の生物学的プロセスの調節不全に関する非常に複雑な疾患です。実験手法の進化によって、がんについてゲノムおよび細胞レベルでより深く理解するための道が切り拓かれました。その結果、科学者は、がん罹患者の検出、モニタリングおよび治療を行うための新しい方法の開発を支援する診断および治療アプローチを開発することが可能となっています。

表1.1.最もよくみられる致死性のがんの形態

がん種	推定年間死亡者数
肺	1.59 million
肝臓	745,000
胃	723,000
結腸直腸	649,000
乳	521,000
食道	400,000



**Helicobacter pylori** ウサギポリクローナル抗体 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) 発色基質を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋したヒト胃を anti-*Helicobacter pylori* antibody (製品番号 PA5-16813) で染色した。胃表面の胃陰窩上の *H. pylori* の染色。

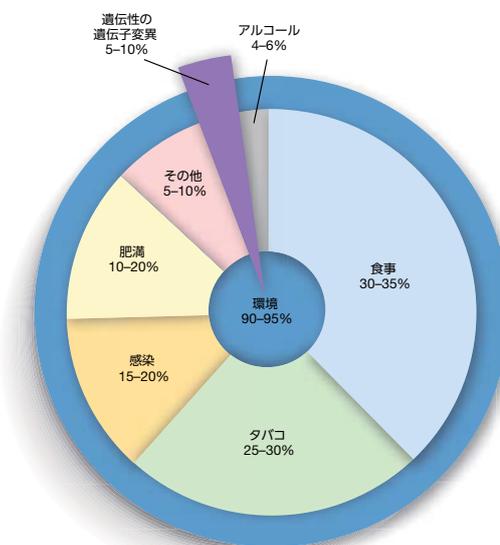


図1.2. リスクファクター がんの大部分は環境要因によって発生

# がん研究マイルストーン

## 注目すべき発見

1940年代から1950年代に研究者は、がんの発症には遺伝的背景が関与している可能性があるとして仮定し始めました。<sup>6</sup> そのような考えは、現代の分子がん研究を立ち上げたパラダイムシフトを代表するものです。がん研究の発展を支援し、腫瘍増殖を阻害する可能性を持つ分子標的治療の開発を促進してきた発見の代表例を図1.3に示します。<sup>5-13</sup>

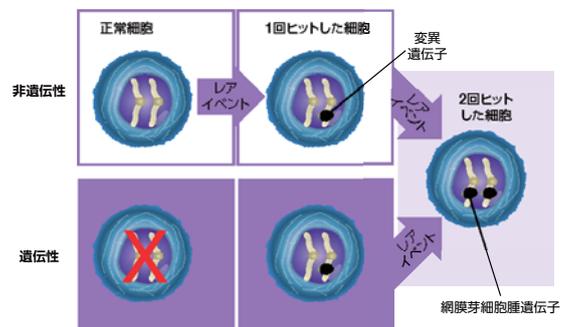
## 発がんの2ヒット説

1950年代の間は疫学データおよび数学的モデルに依存していましたが、Nordlingらは、がんは連続的な変異（すなわちヒット）によって発生すると提唱しました。これにより、高齢化に伴いさまざまなヒトがんの発生頻度が増加することの説明が可能で、Knudsonは、がんの発症に関するヒットの最小数について理解することを求めて、通常幼児期に発症する網膜の腫瘍である網膜芽細胞腫（RB）の根底にある遺伝的メカニズムについて調査する研究を開始しました（図1.4）。<sup>14,15</sup>

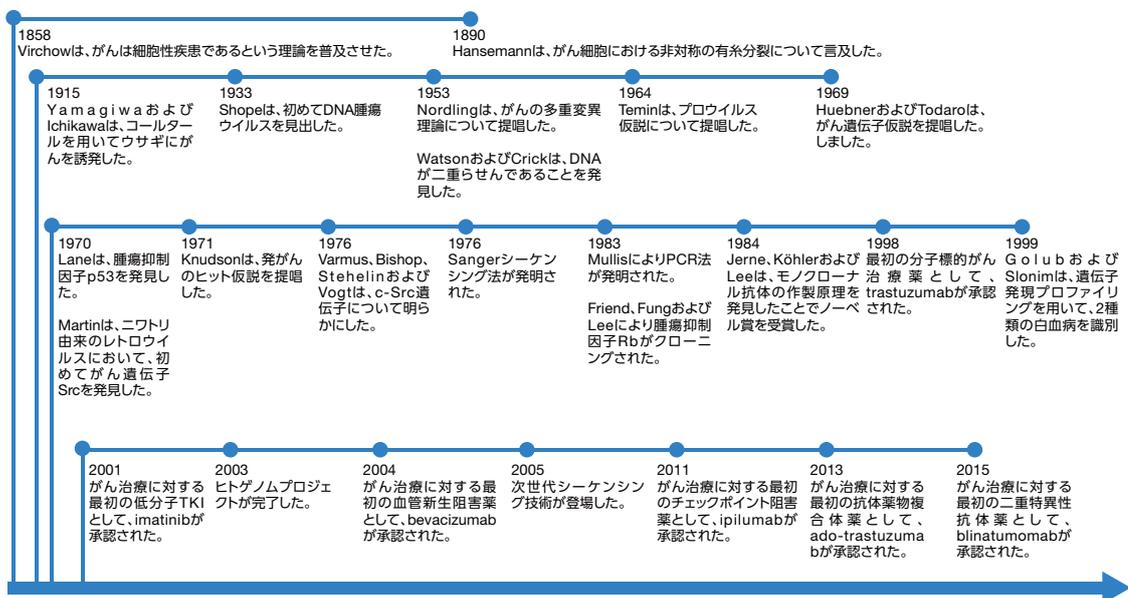
Knudsonの統計解析から、疾患には2つのヒット、すなわち変異が関与する2種類の形態が存在することが予測されました。：遺伝性網膜芽細胞腫のケースでは、最初のヒットは受精時に存在する遺伝子変異に関係していたのに対し、それに続く第2のヒットは同じ遺伝子の他方のコピーに生じる体細胞変異でした。家族性網膜芽細胞腫を受け継いだ子供が第2のヒットを発生する可能性は、変異を持たない子供の100,000倍以上です。逆に言えば、このモデルから、網膜芽細胞腫を生じる遺伝子を有する疑いのない個体において疾患が生じるには、2つの体細胞変異（類似した変異率で発生する）が必要であることが予測されました。<sup>16</sup>

1971年に、間接的に腫瘍抑制遺伝子の概念に繋がる研究が公開され、<sup>17</sup> 発がんの2ヒット説（Knudson仮説）が提唱されました。これは、網膜芽細胞腫を含む数種の主要ながんにおいて見られる変異であるRB1遺伝子が発見される15年前で、初めてヒト染色体の配列決定が行われた約28年前のことでした。<sup>17,18</sup>

これまでに複数のヒト腫瘍抑制遺伝子（いくつかは家族性がん症候群およびがんの非遺伝型）がクローニングされています。同定された新しい候補遺伝子が既知腫瘍抑制因子のリストに追加され、調査および検証されていくものと考えられます。<sup>19</sup>



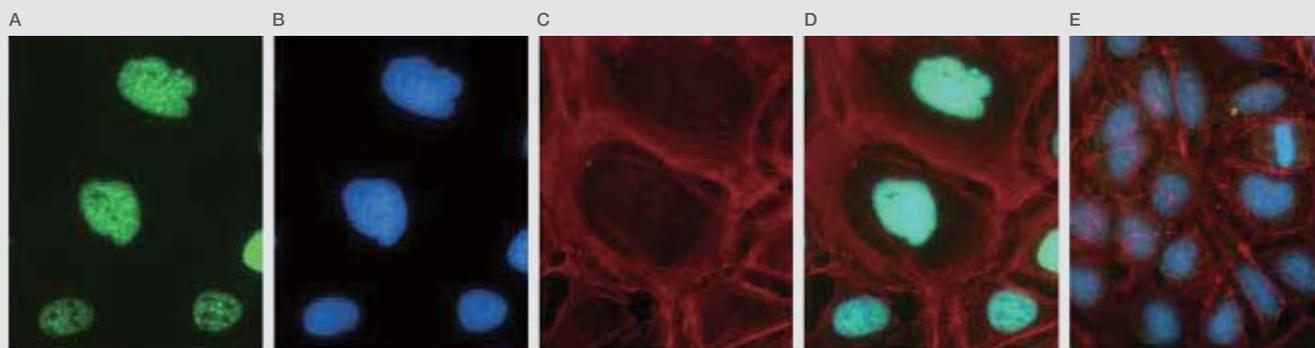
**図1.4. 2ヒット説** 2ヒット説は、家族性網膜芽細胞腫を持つ個体ではどのように両眼に複数の腫瘍が発生するのか、一方、本疾患の非遺伝型を持つ個体ではどのように片方の眼球に腫瘍が発生するのかについて説明します。**(左上)** 個体は、通常、正常な母系および父系の染色体を受け継ぎ、特定のがん種に対する遺伝的感受性を持っていません。**(左下)** 特定のがん種に対する遺伝的感受性を持つ個体は、受精時に第1の“ヒット”が生じているか、遺伝子変異を持って生まれています。**(中央の上下)** 第1の“ヒット”をもたらす稀な体細胞変異は、正常細胞を持って生まれた個体に生じ得ると考えられます。**(右)** 遺伝性および非遺伝性のがんの両方において、第2のヒット（この回は第1のヒットによって損傷した遺伝子の相同コピーに対する）を引き起こすレアイベントによって細胞の悪性形質転換が誘発されると考えられます。



**図1.3. タイムライン** がん研究分野に対する顕著な貢献の代表例

# がん研究マイルストーン

# 1



Rb [pSpT249/252] ABfinity™ Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody anti-Rb [pSpT249/252] antibody (製品番号 701059)で染色したヒト骨肉腫細胞株U2OSの免疫組織化学分析。(A) 二次抗体としてAlexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (製品番号 A11034)を使用 (緑色)。

(B) 核染色にDAPIを使用し (青色)、(C) アクチン染色にAlexa Fluor™ 594 Phalloidin (製品番号 A12381)を使用 (赤色)。(D) リン酸化Rb (pRb)の核移行を示す細胞の重ね合わせ画像。(E) *in situ* pRb1を染色する抗体に対し添加されたpRb競合物を示す細胞の重ね合わせ画像。

表1.2. 家族性がんに関連する代表的な腫瘍抑制遺伝子

症候群 / 遺伝性がん*	変異遺伝子	機能欠如
リ・フラウメニ症候群 脳腫瘍、肉腫、白血病、乳がん	<i>P53</i>	細胞周期調節、アポトーシス
家族性網膜芽細胞腫 網膜芽細胞腫、肉腫	<i>RB1</i>	細胞周期調節
ウィルムス腫瘍 複数の固形臓器関連の小児がん	<i>WT1</i>	転写制御因子
神経線維腫症 1型および2型 脳腫瘍および CNS 腫瘍	<i>NF1, NF2</i>	細胞膜とアクチン細胞骨格の連結
家族性大腸腺腫症 結腸がん	<i>APC</i>	シグナル伝達、転写制御
家族性乳がん 乳がんおよび卵巣がん	<i>BRCA1, BRCA2</i>	DNA 修復および転写、染色体維持
カウデン症候群 神経膠腫、頭頸部腫瘍	<i>PTEN</i>	転写制御因子
フォンヒッペル・リンドウ病 腎臓がん、特定の CNS 腫瘍、眼腫瘍、および副腎腫瘍	<i>VHL</i>	転写制御因子
家族性メラノーマ メラノーマ、睪臓がん、他	<i>CDKN2A</i>	細胞周期調節

略語: APC, *Adenomatous polyposis coli*; BRCA1およびBRCA2, 乳がん感受性遺伝子1および2; CDKN2A, サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A; NF1およびNF2, 神経線維腫症1および2; PTEN, ホスファターゼおよびテンシンホモログ; RB1, 網膜芽細胞腫1; WT1, ウィルムス腫瘍1  
\*各腫瘍抑制遺伝子における変異はさまざまな散発的な非遺伝性腫瘍の発症に関連します。<sup>20</sup>

*RB1*変異に関連するがんの高い発生率は、この腫瘍抑制遺伝子が重要であることを浮き彫りにしています。*RB1*の機能喪失は、小児における網膜芽細胞腫に関連します。*RB1*遺伝子によってコードされるタンパク質であるpRbは、細胞周期の制御因子であり、RB経路の調節不全はヒトがんの大部分の形態において観察されます。<sup>21</sup> 家族性がんに一般的に関連する腫瘍抑制因子の例を表1.2に示します。<sup>17,20</sup>

# がんゲノム研究

## がんのホールマーク (特徴)

がん研究者は、DNA増幅およびシーケンシング技術における大きな進展とともに、腫瘍形成過程に生じる細胞および分子の変化ならびに遺伝的不安定性に関する詳細な情報を提供してきました。がんゲノム解析は、腫瘍形成開始、がん進行、転移および薬剤耐性に関連する特定の変異の同定および機能的分類を可能にしてきました。<sup>22</sup> 大規模な研究によって、腫瘍形成過程 (増殖、エピジェネティックな修飾、成長および代謝、アポトーシス、ならびに他のプロセス) に異常性が発揮されるさまざまな細胞プロセスが同定されました。同様に、慢性炎症、病的血管新生、および免疫系回避は、集合的にがん進行および転移を促進します。<sup>23</sup>

HanahanおよびWeinbergの提唱するがんのホールマークは、腫瘍細胞が示す特徴的で補完的な能力を表し、新生物疾患の複雑さを概念的に説明するフレームワークを提供します (図1.5)。これらの組織化された原理に焦点を当てることは、新しい研究分野を探索し、がん患者のために新しい治療方針を考案できるように研究者を支援することにつながります。<sup>24</sup>

## がん: 体細胞変異の蓄積

成人および小児腫瘍の多様なアレイのゲノムワイドなシーケンシング研究により、さまざまなヒトがんに関連する体細胞変異の数およびタイプについての情報が得られました (図1.6)。<sup>25</sup> 例えば、身体のさまざまな組織や細胞に生じる体細胞変異の数は、小児ラブラドイド腫瘍に見られるわずかに4変異から、小細胞肺がんに見られる163変異までに及びます。

乳房、結腸、脳、ならびに他の器官および組織に発生する一般的な固形がんでは、タンパク質産物を変化させるわずかな体細胞変異の平均数は33から66です。これらの変異の95%以上は、1塩基置換です。約5%の変異では、欠失、転座、または挿入が観察されます。<sup>25</sup>

正常細胞において生じる点変異の割合は、腫瘍細胞において生じる点変異の割合に反映されます。しかしながら、がん細胞では染色体変化の割合が上昇します。これらの変異では、染色体の数、欠失、転座、遺伝子増幅、および他の異常において変化が生じます。<sup>26</sup>

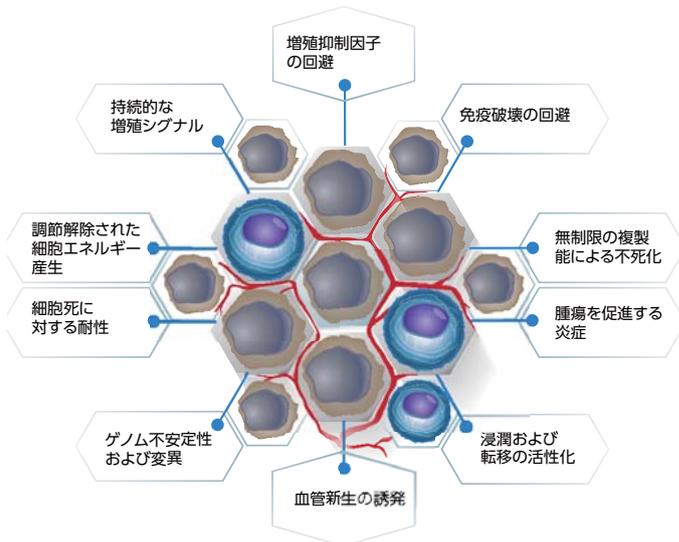


図1.5. がんのホールマーク がんのホールマークについては、2000年にHanahanおよびWeinbergによって、最初に6つの特徴 (増殖シグナルの自己充足; 増殖抑制シグナルに対する感受性の欠如; 組織への浸潤および転移; 無制限の複製能力; 持続的な血管新生; ならびにアポトーシスの回避) が発表されました。2011年にその統一概念は更新および拡大されました。これらの基本原理を深く理解することによって、科学者によるがんの研究方法が変化し、新しい治療の選択肢が開発されてきました。

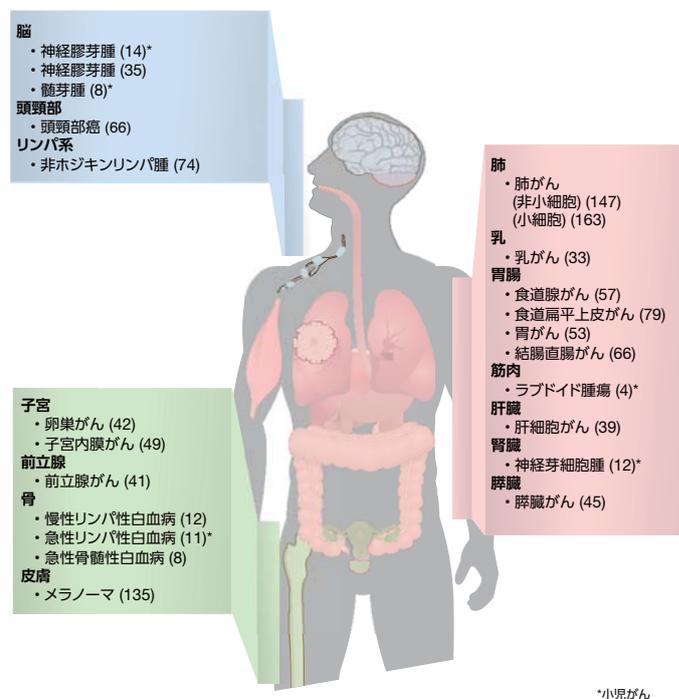


図1.6. がんは身体あらゆる組織に発症 変異の蓄積は、がんの特定の形態によって大きく異なります。

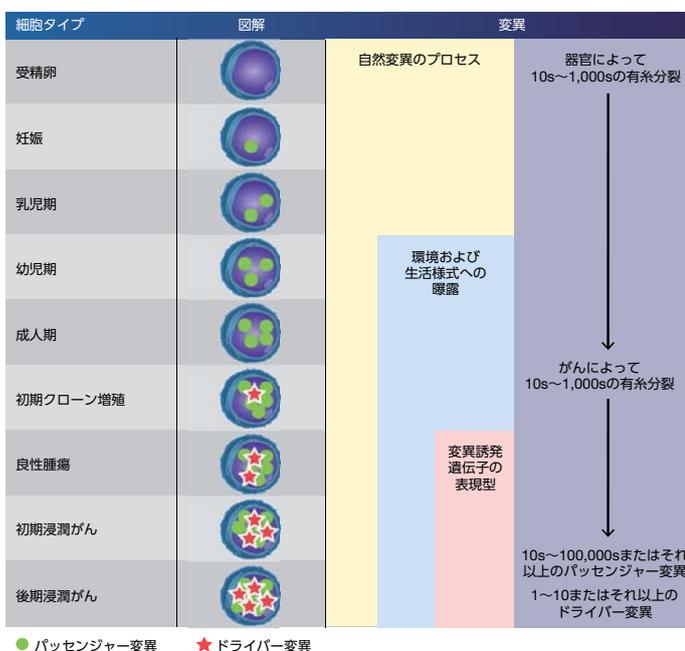
# がんゲノム研究

## がんのドライバー変異およびパッセンジャー変異

がん細胞で検出される点変異および転座において、遺伝子変異の大部分は腫瘍細胞の適応性（すなわち選択的増殖優位性）に影響しません（図1.7）。<sup>26,27</sup>

定義では、正常細胞よりも腫瘍細胞に対し増殖優位性を与えることがない変異はパッセンジャー変異と考えられます。

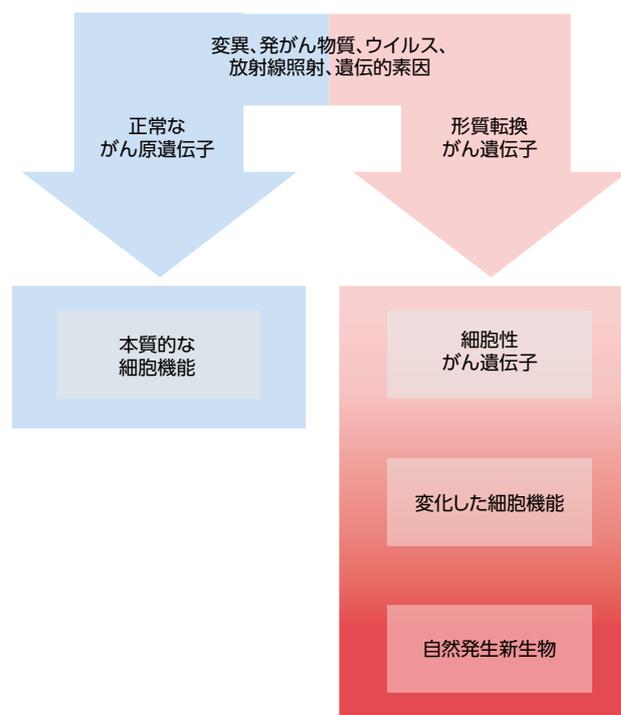
一方、正常細胞よりも腫瘍細胞に対し増殖優位性を与える遺伝子はドライバー変異と考えられます。ドライバー遺伝子の中には、ドライバー変異が含まれます。しかしながら、ドライバー遺伝子にはパッセンジャー変異も含まれ得ることに留意することは重要です。<sup>25,28</sup>



**図1.7. 悪性細胞の形質転換の進行** 各腫瘍は単一細胞から始まり、多段階プロセスを経て、正常細胞が1つの悪性細胞に形質転換されます。細胞の表現型が正常であっても、体細胞変異は蓄積されます。これらは、正常な細胞分裂の結果として自然発生する変異および細胞が外部からの侵襲に曝された際に生じる変異原性の組み合わせによって発生します。

腫瘍抑制遺伝子の変異と同様に、発がん性変異はドライバー変異として分類されます。<sup>29</sup> がん遺伝子は、正常な細胞プロセスを調節するがん原遺伝子に由来しますが、がん原遺伝子における機能獲得型変異は、腫瘍への形質転換および増殖を誘発する可能性を持つ異常な遺伝子産物を産生します（図1.8）。代表的ながん遺伝子については、表1.3を参照してください。<sup>33-35</sup>

ドライバー変異とパッセンジャー変異を同定および識別することを目的とした、大規模なゲノムデータセットを取得し解釈する能力は、がんゲノム解析に従事する研究者の重要な目標です。ドライバー遺伝子および変異について定義および検証する能力は、がんの発生、進行および薬剤耐性に関するメカニズムをさらに解明する助けとなります。<sup>30</sup>



**図1.8. がん遺伝子の二様性** ドライバー変異もがん遺伝子に分類されると考えられます。本図は、がん遺伝子とともに、腫瘍進行を導く発がん性形質転換の可能性を持つ正常ながん原遺伝子が存在するという二様性を示しています。

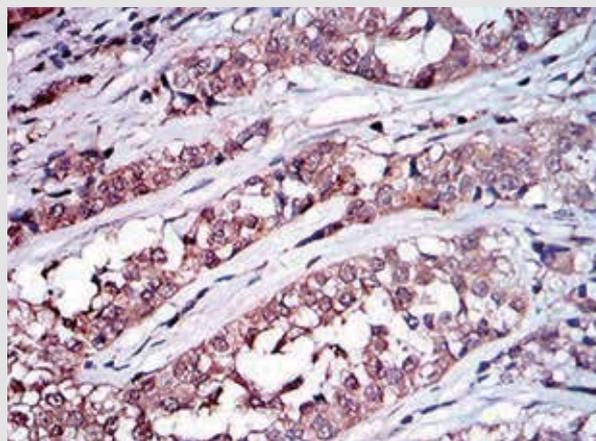
表1.3. 代表的ながん遺伝子

がん遺伝子	関連するがん	細胞機能
<i>ABL1</i>	CML および他の白血病	チロシンキナーゼシグナル伝達
<i>AKT/PKB</i>	乳がん、卵巣がん、結腸直腸がん、他のがん	セリン/スレオニン - 特異的プロテインキナーゼ
<i>BRAF</i>	結腸直腸がん、転移性メラノーマ、他の固形がん、非ホジキンリンパ腫	セリン/スレオニンキナーゼシグナル伝達
<i>CCND1</i>	乳房および他の組織の上皮性悪性腫瘍、B 細胞リンパ腫	細胞周期調節因子 / サイクリン依存性キナーゼ調節因子
<i>MYC</i>	リンパ腫および上皮性悪性腫瘍	転写因子 / 細胞周期調節因子
<i>EGFR</i>	上皮成長因子	チロシンキナーゼシグナル伝達
<i>HER2</i>	乳がんおよび特定の胃がん	チロシンキナーゼシグナル伝達
<i>KRAS</i>	結腸直腸がん	GTPase/ シグナル伝達
<i>PIK3CA</i>	結腸直腸がん	PI3K の触媒サブユニット / シグナル伝達
<i>SRC</i>	結腸直腸、肝細胞、乳、膵臓および他の肉腫	チロシンキナーゼシグナル伝達

略語: *ABL1*, Abelsonマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ1; *AKT/PKB*, *AKT*/プロテインキナーゼB; *BRAF*, *v-raf*マウス肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログB; *CCND1*, サイクリンD1; *MYC*, *v-myc*トリ骨髄球腫症がん遺伝子ホモログ; *EGFR*, 上皮成長因子受容体; *HER2*, ヒトジアミノベンジジン上皮成長因子受容体2; *KRAS*, カーステン ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ; *PIK3CA*, ホスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸 3-キナーゼ, 触媒サブユニット $\alpha$ ; *SRC*, *SRC* がん原遺伝子, 非受容体型チロシンキナーゼ

## がん遺伝子概論

数十年にわたる研究の後、1970年に*SRC*が発見され、初めてがん遺伝子が同定されました。この遺伝子は、ニワトリにおいてがんを引き起こすことで知られるラウス肉腫ウイルスの*v-src*遺伝子に非常に類似しています。このがん原遺伝子は、胚発生および細胞成長を調節する役割を果たしていると考えられます。*SRC*によってコードされるタンパク質は、チロシンプロテインキナーゼで、その活性はC末端Srcキナーゼ (CSK) によるリン酸化によって阻害されます。<sup>32,33</sup> さまざまな動物種およびヒトにおいて、*SRC*変異は、結腸、肝臓、肺、乳房、および膵臓のさまざまながんの悪性化進展に関与しています。<sup>34-36</sup>



**Src Mouse Monoclonal Antibody (1F11)** 抗Srcモノクローナル抗体 (製品番号 MA5-15924) に続いて、3,3'-ジシアミノベンジジン (DAB) 染色を使用した、パラフィン包埋膀胱がん組織の免疫組織化学分析。弊社は、SrcファミリーキナーゼおよびSrcシグナル伝達経路の関連するタンパク質メディエーターについて研究するためにデザインされた幅広い一次抗体を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。  
[www.thermofisher.com/Src](http://www.thermofisher.com/Src)

# 肺癌のサブタイプ

## 肺癌のドライバー変異

肺癌は世界的にがん関連死の原因の第1位で、喫煙と密接に関係しています。これまでに、これらの治療困難ながんに関係するいくつかの臨床的に関連するドライバー変異が同定されています。<sup>37-40</sup>

肺癌ゲノム解析は、組織学的サブタイプデータと分子生物学的サブタイプデータを結びつける手段として、がん生物学者および腫瘍学者に提供されています(表1.4および図1.9)。これらの近年の見識が、診断目的—および現在増加してきている個々の患者の治療目的に適用されることによって、よりパーソナルな治療アプローチの開拓が続けられています。<sup>37-40</sup> 例えば、2013年には、8つの個別の臨床試験において、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異陽性非小細胞肺癌(NSCLC)患者を対象とした、EGFR阻害剤と従来の化学療法と比較が行われました。各試験の結果から、この患者集団において、EGFR阻害剤は化学療法と比較して、複数のパラメータにおいて一貫して優れていることが示されました。NSCLC患者の標的治療は、奏効率、生活の質(QOL)、および無増悪生存率において統計学的に有意な改善を示しました。しかしながら、これらの臨床試験結果は、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)を投与した患者における明確な延命効果を示すことはできませんでした。研究者は、有意な治療率の達成を目指して、NSCLCに対する標的治療と併用する補助療法の開発に引き続き焦点を当てています。<sup>40,41</sup>

表1.4.肺癌の組織学的サブタイプ

肺癌のタイプ	米国人人口における発生率
小細胞	15%
非小細胞	
大細胞	15%
扁平細胞がん	30%
腺がん	40%

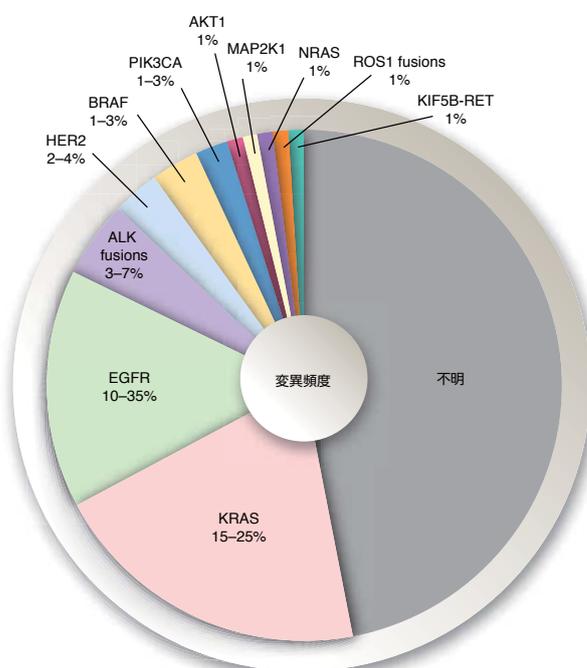


図1.9. 肺癌において同定された既知のドライバー変異の頻度 この円グラフは、肺癌関連の分子サブタイプの分布を示しています。

**肺がんにおける標的治療**

進行肺がん患者に対する治療は、現在、腫瘍学者によって標準化学療法レジメンに追加する治療オプションが拡大されています(表1.5)。食品医薬品局 (FDA) および他の世界の医薬品規制当局は、適切な臨床ガイドラインおよび進行性肺がん患者の個々の診断に基づいて、NSCLCに対する複数の標的治療法を一次療法または二次療法として承認しました。<sup>42-45,47</sup>

肺がんに対する承認済みのEGFR-および未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) を標的とする治療については最適化が進められています。また、他の薬剤—図1.9に示した他のドライバー変異の発がん促進活性を阻害すると考えられる低分子阻害剤および生物学的療法—の探索が研究者によって継続されています。<sup>48,49</sup>

異常なEGFRシグナル伝達は、NSCLCに関連するだけでなく、乳房、結腸、膵臓、頭頸部、および身体の他の部位の組織にも影響を与えます。<sup>50</sup>

表1.5.FDAで承認されたNSCLCに対する標的治療薬

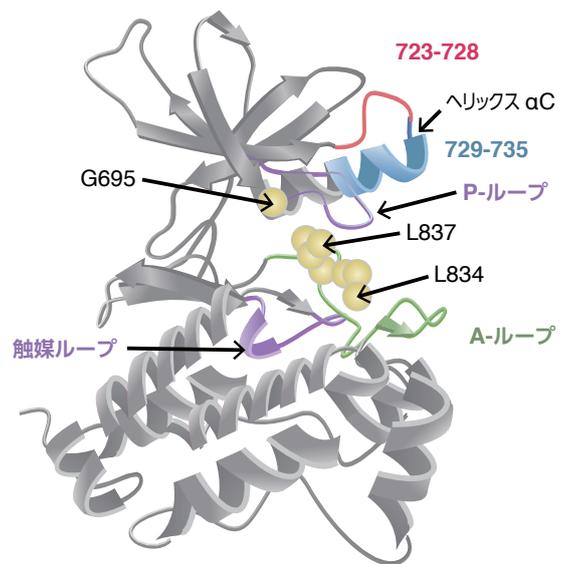
薬剤	標的遺伝子	FDA 承認
ゲフィチニブ	EGFR	2003*
エルロチニブ	EGFR	2004
クリゾチニブ	EML4-ALK- 融合	2011
アファチニブ	EGFR	2013
セリチニブ	EML4-ALK- 融合	2014

略語: ALK, 未分化リンパ腫キナーゼ; EGFR, 上皮成長因子受容体; EML4, 微小管結合タンパク質様4

\* 米国では、承認が取り消されています。



**EGFR Mouse Monoclonal Antibody (H11)** 抗EGFR抗体 (製品番号 MA5-13070) に続き、ペルオキシダーゼ標識二次抗体およびAEC発色試薬を使用した、ホルマリン固定パラフィン包埋したヒト肺扁平細胞癌の免疫組織化学 (上)。EGFR (緑色) の解析における、ヒト扁平上皮がん A431細胞株の膜染色 (右下) と一次抗体不使用のネガティブコントロール (左下) との比較。F-アクチン (赤色) は赤色蛍光ファロイジン、核 (青色) はHoechst™DyeまたはDAPI (4',6-Diamidino-2- Phenylindole, Dihydrochloride)で染色。



**図1.10. 上皮成長因子受容体の構造** 上皮成長因子受容体 (EGFR) は、膜貫通糖タンパク質の受容体チロシンキナーゼ (RTK) であり、多くの主要な細胞シグナル伝達経路を調節するのに重要な役割を果たしています。上皮成長因子 (EGF) やトランスフォーミング増殖因子α (TGF-α) のようなリガンドがEGFRに結合することによって、立体構造が変化し、受容体の二量体化および自己リン酸化を介してEGFRチロシンキナーゼが活性化されます。Tyr 1068, Tyr 1148, およびTyr 1173は、EGF依存性自己リン酸化の腫瘍部位です。EGFR上のリン酸化チロシンは、Grb2およびSHCのようなシグナル伝達タンパク質との相互作用を介してシグナル伝達を媒介します。EGFR上のTyr 1173のリン酸化は、主にMAPキナーゼ経路を介するシグナル伝達を調節します。<sup>46</sup>

# がんの分子プロファイリング

## ドライバー変異

分子プロファイリング研究によって、さまざまながんの形態においてドライバー遺伝子が重複していることが明らかにされました(図1.11)。例えば、*AKT1*、*PI3CA*および*PTEN*は特定の乳がんにおいて発現し、結腸直腸においても発現します。しかしながら、この図では、*HER2*は限局的な発現プロファイルとして乳癌の枠に表示されています(しかし、*HER2*は、特定のタイプの胃癌にも発現します)。同様に、*BRAF*および*NRAS*の変異は、結腸直腸がんおよびメラノーマ(および他のタイプのがん)にも存在します。しかしながら、メラノーマには、乳がんや結腸がんでは頻繁には検出されないドライバー変異がいくつか存在します。<sup>51</sup>

FDAで承認されている肺がんに対する標的治療薬の他に、乳、結腸、皮膚、腎臓、胃、および他の固形組織のがんに対する標的治療が承認されています。現在は特定の血液腫瘍に対する承認済みの標的治療の選択肢も存在しています。<sup>52</sup>

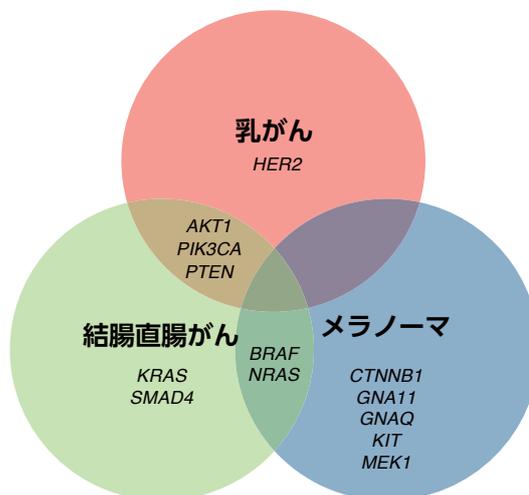
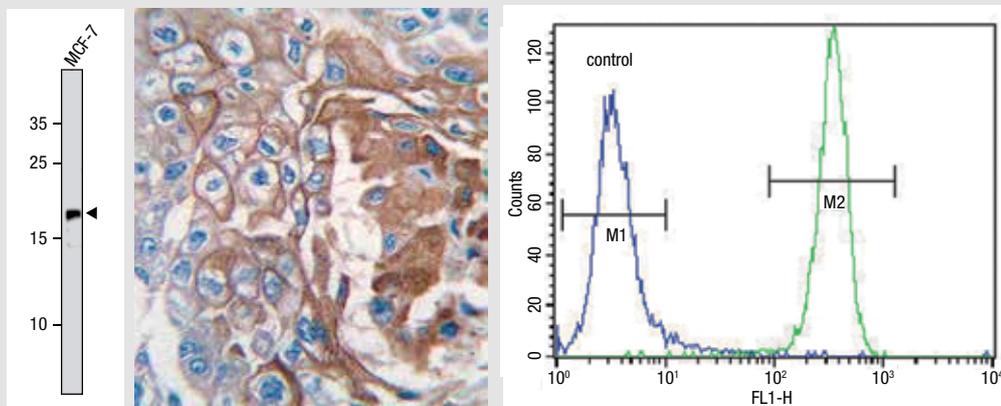


図1.11. 一般ながんのタイプにおいてよく見られるドライバー変異の分布 これらの各ドライバー遺伝子は、他のがんタイプにおいても発現している可能性がありますが、この図には示されていないことに留意することは重要です。



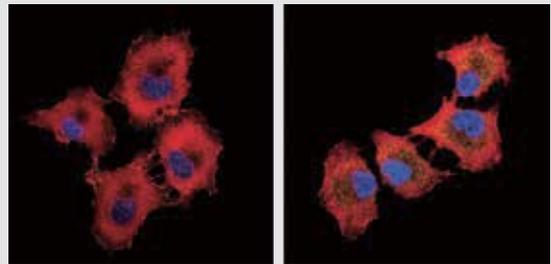
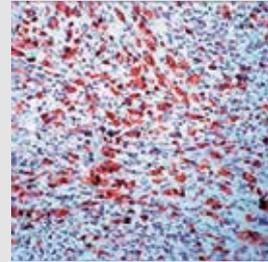
**N-RAS Rabbit Polyclonal Antibody (製品番号 PA5-14833)** 3種類の方法を使用してRAS変異を検出した。(左) MCF-7細胞(不死化ヒト乳がん)ライセートのウェスタンブロット。(中) ヒト肺扁平上皮がんの免疫組織化学。(右) (M1) アインタイプコントロール抗体で染色した、および(M2) 抗N-RAS 一次抗体に続き、FITC標識ヤギ抗ウサギIgG二次抗体で処理したヒト大細胞肺癌細胞株NCI-H460のフローサイトメトリー。

細胞周期およびDNA修復機構を調節する特定の遺伝子における変異は、異常増殖能をがん細胞に与え、正常細胞におけるアポトーシスを誘導する特定のタイプのDNA損傷の修復を妨げます。表1.2に表示されているいくつかの腫瘍抑制因子は、細胞周期調節、DNA修復機構、およびゲノム維持のための他の機構に必要とされます。<sup>53</sup>

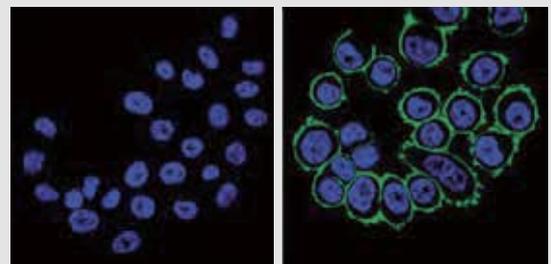
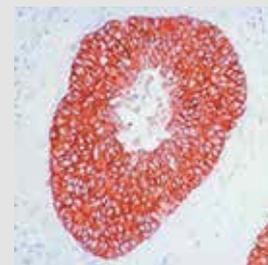
特性が決定されている特定のがんのタイプに関連するがん原遺伝子(および、それらのタンパク質産物)の例を以下に示します。<sup>54-57</sup>

- **ALK** (未分化リンパ腫キナーゼ; *EML4*と融合した**ALK**) – 非小細胞肺癌
- **GNA11** (グアニンヌクレオチド結合タンパク質サブユニット $\alpha$ 11) – メラノーマ; 特に、ぶどう膜メラノーマ
- **KRAS** (カーステンラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ) – 結腸直腸がん、肺癌、膵がん、および他のがん
- **c-KIT** (チロシンプロテインキナーゼ Kit) – メラノーマならびに消化管、肺、他の組織および血液の特定のがん
- **HER2** (ヒト上皮成長因子受容体 2) – 乳房、消化管、および精巣の特定のがん

分子プロファイリングおよびがんサブタイプの分類によって新しい情報が提供され続けているのに伴い、既存の治療オプションを改良する方法を見出し、がんの進行を促進する細胞プロセスを妨げる新しい方法を発見するための試みが研究者によって続けられています。

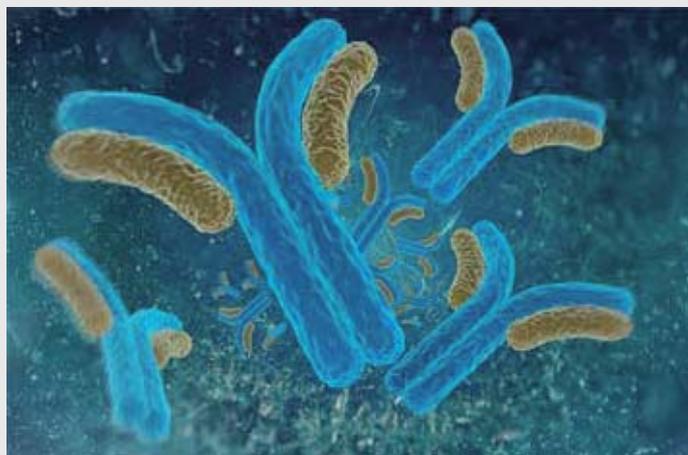


**ALK/CD246 Rabbit Monoclonal Antibody (SP8)** anti-ALK/CD246 antibody (製品番号 MA5-14528) で染色した、ホルマリン固定パラフィン包埋した未分化リンパ腫組織の免疫組織化学分析 (上)。ホルマリン固定H1299(非小細胞肺癌)細胞の一次抗体を使用しないネガティブコントロール (左下)、および一次抗体 (緑色) で染色した細胞 (右下) の免疫蛍光分析。F-アクチンは赤色蛍光ファロイジン、核はHoechst™ DyeまたはDAPI (青色) で染色。



**HER2/ErbB2 Mouse Monoclonal Antibody (e2-4001 + 3B5)** anti-HER2/ErbB2 Antibody (製品番号 MA5-14057) で染色した、ホルマリン固定パラフィン包埋したヒト乳がん組織の免疫組織化学分析 (上)。ホルマリン固定SK-BR-3 (ヒト乳腺がん)細胞の一次抗体を使用しないネガティブコントロール (左下)、および一次抗体 (緑色) で染色した細胞 (右下) の免疫蛍光分析。F-アクチンは赤色蛍光ファロイジン、核はHoechst™ DyeまたはDAPI (青色) で染色。

# 抗体：がん研究のための強力なツール



高品質な生物医学研究用抗体を提供する能力は、年を追うごとにがん生物学分野における新しい発見に貢献しています。当社では、数千ものがん研究用の一次および二次抗体を提供しています。お客様の研究のフォーカスが増殖シグナル伝達、転移、アポトーシス、オートファジー、代謝、炎症、腫瘍抑制因子、または他のどのようながん関連研究分野であっても、お客様の研究の成功を確実にする研究用抗体の幅広いラインナップを取り揃えています。

当社の抗体が幅広いアプリケーションにおいて優れた実験結果の達成に寄与していることは、世界中の数千もの文献引用により実証されています。目的の抗体を見つけるためには、こちらの抗体検索ツールをご利用ください。

[www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

表1.6. 当社の抗体が引用されている代表的な文献

製品名	参考文献	アプリケーション
<b>ALK/CD246 Rabbit Monoclonal Antibody (SP8)</b> (製品番号 MA5-14528)	Giuriato S, Foisseau M, Dejean E et al. (2010) Conditional TPM3-ALK and NPM-ALK transgenic mice develop reversible ALK-positive early B-cell lymphoma/leukemia. <i>Blood</i> 115(20):4061–4070.	IHC
<b>c-Kit/CD117 Mouse Monoclonal Antibody (K45)</b> (製品番号 MA5-12944)	Cruz AC, Frank BT, Edwards ST et al. (2004) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. <i>J Biol Chem</i> 279(7):5612–5620.	FACS
<b>EGFR Mouse Monoclonal Antibody (H11)</b> (製品番号 MA5-13070)	Kyriakakis E, Maslova K, Frachet A et al. (2013) Cross-talk between EGFR and T-cadherin: EGFR activation promotes T-cadherin localization to intercellular contacts. <i>Cell Signal</i> 25(5):1044–1053.	IP, WB, ICC
<b>HER2/ErbB2 Antibody</b> (製品番号 MA5-14057)	Jiang J, Zhang Y, Chuai S et al. (2012) Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype. <i>Oncogene</i> 9;31(6):671–82.	IHC
<b>KRAS Mouse Monoclonal Antibody (9.13)</b> (製品番号 415700)	Tomiyasu S, Miyamoto T, Mori M et al. (2013) Isolation of side population cells from endometrial cancer cells using a violet laser diode. <i>Hum Cell</i> 27(1):36–42.	ICC
<b>pan RAS Mouse Monoclonal Antibody (Ras10)</b> (製品番号 MA1-012)	Hamer PJ, Trimpe KL, Pullano T et al. (1990) Production and characterization of anti-RAS p21 monoclonal antibodies. <i>Hybridoma</i> 9(6):573–587.	FACS
<b>Retinoblastoma Mouse Monoclonal Antibody (1F8 (Rb1))</b> (製品番号 MA5-11387)	Canzonieri V, Barzan L, Franchin G et al. (2012) Alteration of G1/S transition regulators influences recurrences in head and neck squamous carcinomas. <i>J Cell Physiol</i> 227(1): 233–238.	IHC
<b>Src Mouse Monoclonal Antibody (1F11)</b> (製品番号 MA5-15924)	Doisneau-Sixou SF, Cestac P, Chouini S et al. (2003) Contrasting effects of prenyltransferase inhibitors on estrogen-dependent cell cycle progression and estrogen receptor-mediated transcriptional activity in MCF-7 cells. <i>Endocrinology</i> 144(3):989–998.	WB

略語：FACS, 蛍光標示式細胞分取器; ICC, 免疫細胞化学; IF, 免疫蛍光; IHC, 免疫組織化学; IP, 免疫沈降; WB, ウェスタンブロットニング

# 参考文献

- World Health Organization website (2015) *Cancer key facts*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- American Cancer Society website (2014) *Family cancer syndromes*. <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/geneticsandcancer/heredity-and-cancer>
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, et al. (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25(9):2097–2116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515569/>
- Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT (2010) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* 23(4):713–739. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2952980/>
- Di Lonardo A, Nasi S, Pulciani S (2015) Cancer: we should not forget the past. *J Cancer* 6(1):29–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278912/figure/F2/>
- Frank SA (2007) *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance and Evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press. pp 61–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1569/>
- Marte B (2006) (1890) Cancer as a genetic disease. *Nature Milestones: Cancer* website. <http://www.nature.com/milestones/milecancer/full/milecancer02.html>
- National Cancer Institute website (2014) *Targeted therapies for cancer*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>
- National Human Genome Research Institute website (2015) *About NHGRI: a brief history and timeline*. <http://www.genome.gov/10001763>
- Nature Publishing Group (2006) *Nature Milestones: Cancer*, April. [http://www.nature.com/milestones/milecancer/pdf/milecancer\\_all.pdf](http://www.nature.com/milestones/milecancer/pdf/milecancer_all.pdf)
- Miller MJ, Foy KC, Kaumaya PT (2013) Cancer immunotherapy: present status, future perspective, and a new paradigm of peptide immunotherapeutics. *Discov Med* 15(82):166–176.
- Stegmeier F, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M (2010) Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib. *Clin Pharmacol Ther* 87(5):543–552.
- Naidoo J, Page DB, Wolchok JD (2014) Immune modulation for cancer therapy. *Br J Cancer* 111(12):2214–2219.
- Fox Chase Cancer Center website (2015) *Alfred G. Knudson Jr.* summary page. <http://www.fccc.edu/research/research-awards/knudson/index.html>
- Marte B (2006) (1953) Two-hit hypothesis. It takes (at least) two to tango. *Nature Milestones: Cancer* website. <http://www.nature.com/milestones/milecancer/full/milecancer09.html>
- Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(4):820–823.
- Chial H (2008) Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis. *Nature Education* 1(1):177. <http://www.nature.com/scitable/topicpage/Tumor-Suppressor-TS-Genes-and-the-Two-Hit>
- National Human Genome Research Institute website (1999) *Scientists complete first chapter of book of life with decoding of first human chromosome*. <http://www.genome.gov/10002104>
- Weinberg R (2013) *The Biology of Cancer*, 2nd ed. New York (NY): Garland Science. p 269. <https://books.google.com/books?id=MzMmAgAAQBAJ&pg=PA269&pg=PA269&dq=Human+tumor+suppressor+genes+that+have+been+cloned&source=bl&ots=A0JKRa800f&sig=kKyxZPicTAIDZL6lmeHvhicd&hl=en&sa=X&ei=Z-1VPDMD4L9yQsb9oHACQ&ved=0CDDIQ6AEwAjgK#v=onepage&q=Human%20tumor%20suppressor%20genes%20that%20have%20been%20cloned&f=false>
- The Medical Biochemistry Page website (2015) *Introduction & table of familial cancer syndromes (non-inclusive listing)*. <http://themedicalbiochemistrypage.org/tumor-suppressors.php>
- Goodrich DW (2006) The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 25(38):5233–5243. <http://www.nature.com/ncj/journal/v25/n38/full/1209616a.html>
- Chin L, Hahn WC, Getz G, Meyerson M (2011) Making sense of cancer genomic data. *Genes Dev* 25(6):534–555. <http://genesdev.cshlp.org/content/25/6/534.long>
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339(6127):1546–1558.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA (2009) The cancer genome. *Nature* 458(7239):719–724. [http://www.nature.com/nature/journal/v458/n7239/fig\\_tab/nature07943\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v458/n7239/fig_tab/nature07943_F1.html)
- Heemskerk B, Kvistborg P, Schumacher TNM (2013) The cancer antigenome. *EMBO J* 32(2):194–203. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/emboj.2012.333/full>
- Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, et al. (2010) Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(43):18545–18550. <http://www.pnas.org/content/107/43/18545.abstract>
- Greenman C, Stephens P, Smith R, et al. (2007) Patterns of somatic mutations in human cancer genomes. *Nature* 446(7132):153–158.
- Chen Y, Hao J, Jiang W, et al. (2013) Identifying potential cancer driver genes by genomic data integration. *Sci Rep* 3:3538. <http://www.nature.com/srep/2013/131218/srep03538/full/srep03538.html>
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000) Section 24.2: Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. In: *Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York (NY): W. H. Freeman and Company. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>
- Martin GS (2004) The road to Src. *Oncogene* 23(48):7910–7917. <http://www.nature.com/onc/journal/v23/n48/full/1208077a.html>
- Roskoski, R Jr. (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331(1):1–14.
- Oláh E. (2005) Basic concepts of cancer: genomic determination. *J Int Fed Clin Chem* 16(2). <http://www.ifcc.org/ifccfiles/docs/160206200501.pdf>
- De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, et al. (2011) KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol* 12(6):594–603.
- National Library of Medicine (US) website (2015) *Genetics home reference*. <http://ghr.nlm.nih.gov/>
- Pao W, Hutchinson KE (2012) Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med* 18(3):349–351.
- National Cancer Institute website (2014) *Non-small cell lung cancer treatment (PDQ)®: general information about non-small cell lung cancer*. [http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/Patient/page1#\\_124](http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/Patient/page1#_124)
- American Lung Association website (2015) *Lung cancer fact sheet. Mortality*. <http://www.lung.org/lung-disease/lung-cancer/resources/facts-figures/lung-cancer-fact-sheet.html>
- Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. (2014) Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 25 Suppl 3:iii27–39.
- Chustecka Z (2013) EGFR inhibitors vs chemo in EGFR-positive NSCLC: no more trials. *Medscape Medical News* <http://www.medscape.com/viewarticle/810379>
- Genentech (2014) *Erlotinib*. [http://www.gene.com/download/pdf/tarceva\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/tarceva_prescribing.pdf)
- National Cancer Institute website (2011) *FDA approval for gefitinib*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-gefitinib>
- National Cancer Institute website (2013) *FDA approval for afatinib dimaleate*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-afatinibdimaleate>
- Novartis (2014) *Ceritinib*. <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/zykadia.pdf>
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366(1):2–16.
- Rolfo C, Passiglia F, Ostrowski M, et al. (2015) Improvement in lung cancer outcomes with targeted therapies: an update for family physicians. *J Am Board Fam Med* 28(1):124–133. <http://www.jabfm.org/content/28/1/124.full.pdf+html>
- My Cancer Genome website (2015) *Molecular profiling of lung cancer*. <http://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/>
- Life Sciences Connect website (2014) *Targeted therapy NSCLC part I: biologics*. <http://lscconnect.thomsonreuters.com/biologics-non-small-cell-lung-cancer-nsclc-part-current-status-2014/>
- Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 12(66):419–432. <http://www.discoverymedicine.com/Toni-M-Brand/2011/11/22/the-nuclear-epidermal-growth-factor-receptor-signaling-network-and-its-role-in-cancer/>
- My Cancer Genome website (2014) *Molecular profiling of melanoma*. <http://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/> (see tabs for breast cancer, colorectal cancer, and melanoma)
- National Cancer Institute website (2014) *Targeted cancer therapies*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835):366–374.
- UpToDate website (2015) *Anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion oncogene positive non-small cell lung cancer*. <http://www.uptodate.com/contents/anaplastic-lymphoma-kinase-alk-fusion-oncogene-positive-non-small-cell-lung-cancer>
- Chen X, Wu Q, Tan L, et al. Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations. *Oncogene* 33(39):4724–4734.
- Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D (2014) Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 111(5):817–822.
- Pittoni P, Piconese S, Tripodo C, Colombo MP (2011) Tumor-intrinsic and -extrinsic roles of c-Kit: mast cells as the primary off-target of tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 30(7):757–769.

詳細はこちら [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

All rights reserved. Hoechst is a trademark of Hoechst GmbH. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

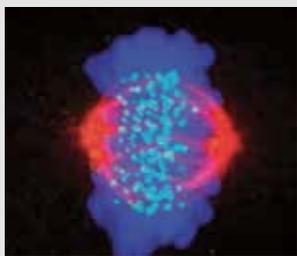
# がん増殖シグナル伝達

## がん細胞の増殖

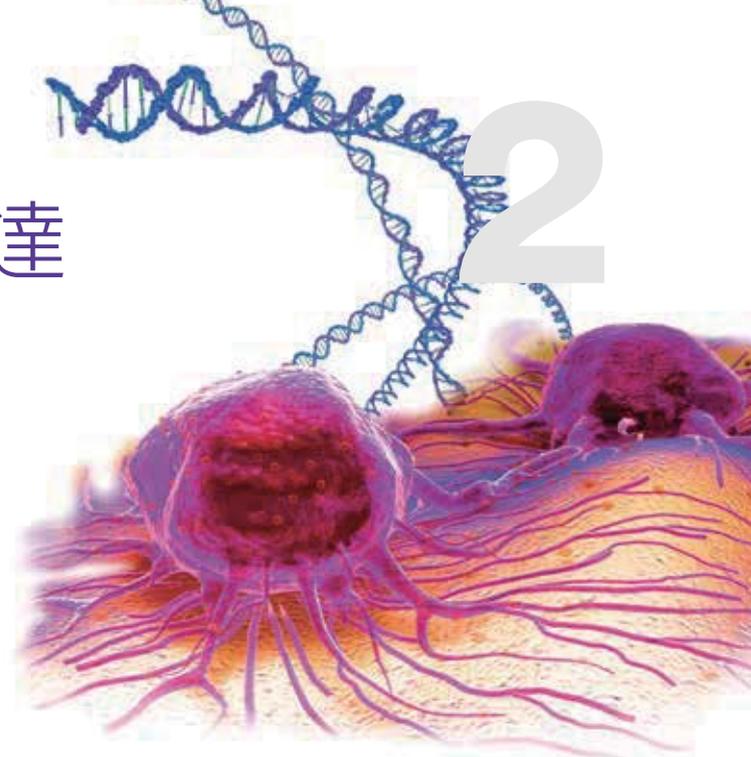
遺伝子変異の蓄積は、最終的に細胞周期調節に必要とされるメカニズムを妨げます。正常な状態では、増殖シグナルの産生および伝播ならびに細胞増殖が高度に調節されています。増殖プロセスの厳密な制御は、健全な組織の構造および機能の維持をサポートします。増殖に関連するシグナル伝達経路は、通常、必要になると活性化され、不要になると不活性化されます。

### 細胞周期調節不全

悪性細胞のホールマーク（特徴）の一つは、恒常的調節の喪失および持続的、あるいは制御不能な増殖です。正常なホメオスタシスを維持するために、細胞分裂周期は厳密に制御されています（図2.1）。ヒトがんでは、細胞周期のG1期に調節不全が生じ、そこで細胞は増殖を開始するか、細胞周期から逸脱しG0期の静止状態に入ることが研究者によって確認されました。<sup>1-3</sup>



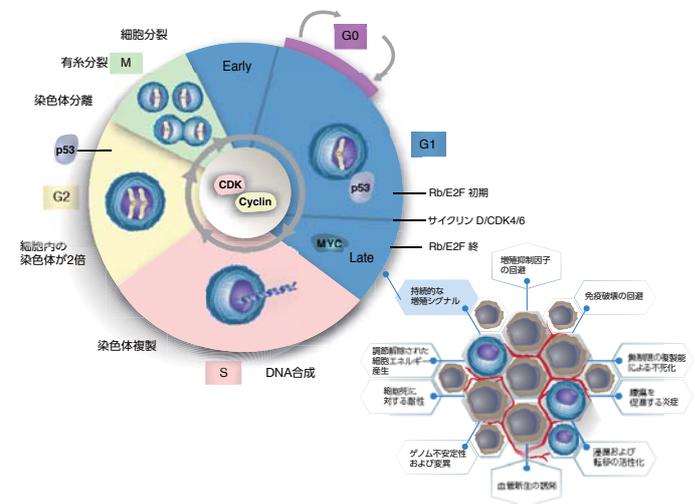
**Phospho-CENP-A pSer7 Rabbit Polyclonal Antibody**  
 抗phospho- CENP-A pSer7抗体（製品番号 PA5-17195）（緑色）およびβ-チューブリンモノクローナル抗体（赤色）を使用した、有糸分裂HeLa（不死化ヒト子宮頸がん）細胞におけるphospho-CENP-A pSer7の免疫蛍光分析。Phospho-CENP-Aシグナルは有糸分裂中期に明るいスポットとして局在。DNAは青色蛍光色素で標識。



# 2

## 目次

がん細胞の増殖	2-2
増殖因子経路の調節不全	2-3
増殖因子受容体経路へのターゲティング	2-4
がんにおける増殖シグナル伝達経路	2-8
抗体：がん研究のための強力なツール	2-10
参考文献	2-11



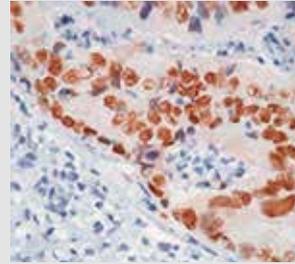
**図2.1. がんドライバーおよびその細胞周期** サイクリン依存性キナーゼ (CDK)、ならびにE2FおよびMYCなどの他の細胞周期関連タンパク質における発がん性変異は、高頻度で悪性形質転換を誘発します。細胞周期に影響を及ぼさずRb、p53、TGF-βRおよび他のタンパク質などの腫瘍抑制因子による制御の喪失は、腫瘍形成および腫瘍進行に寄与します。

# がん細胞の増殖

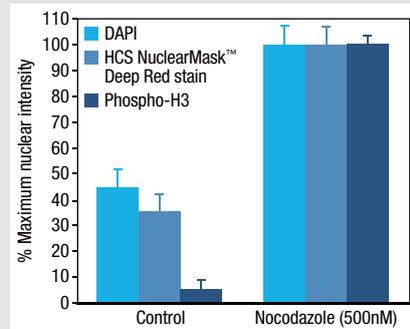
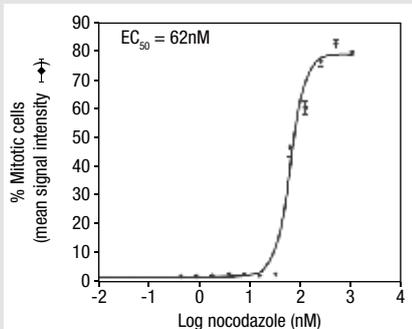
# 2

## 細胞増殖の検出

腫瘍抑制因子TP53をコードする遺伝子における体細胞変異は、ヒトゲノムの他の既知のドライバー遺伝子に影響を及ぼす変異よりも高頻度で発生します。p53シグナル伝達の調節不全は、無制御な細胞増殖を引き起こします。また、TP53における生殖細胞系列の異常は、リ・フラウメニ症候群—さまざまながんの早期発症の素因がある状態—を生じます。p53に関する情報は、1979年に初めて発表され、その数十年後に遺伝子の発がん特性について確認されました。<sup>4,5</sup>



**p53 Mouse Monoclonal Antibody (DO-7)** 抗p53抗体 (製品番号 MA5-12557) で染色したホルマリン固定パラフィン包埋したヒト結腸がん組織の免疫組織化学分析。検出は、HRP標識二次試薬に続き、発色基質を使用して実施。



**HCS Mitotic Index Kit** ノコダゾール誘発によるヒト肺がん細胞株A549の有糸分裂停止をHCS Mitotic Index Kit (製品番号H10293) で測定。(A) インキュベーション24時間後のノコダゾールに対する一次抗体用量反応をノコダゾールのEC50値の決定に使用。(B) 500 nM ノコダゾールで24時間処理した細胞の定量。HCS Mitotic Index Kitは、有糸分裂進行に影響する化合物を同定するための代表的な強力な画像ベースのアッセイです。HCS Mitotic Index Kitおよび他の細胞増殖キットに関する詳しい情報はこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/proliferation](http://www.thermofisher.com/proliferation)

当社は、哺乳類細胞における細胞増殖について研究するためのアッセイキットの幅広いセレクションを提供しています。

- 細胞増殖解析用Click-iT<sup>®</sup>ツール
- プロモデオキシウリジンの取り込みを用いる増殖アッセイ
- HCS Mitotic Index Kit
- その他のキット

## 増殖因子経路の調節不全

### 増殖因子シグナル伝達

正常細胞および多くの腫瘍において、G1初期は、マイトジェン依存性で、増殖因子の存在を必要とします。一方、G1後期はマイトジェン刺激に依存せずに継続します。しかしながら、一部の腫瘍はリガンド依存性の増殖因子シグナルの非存在下における増殖能を獲得します。腫瘍細胞増殖に関与すると考えられる増殖因子経路の多様性を図2.2に示します。<sup>6,7</sup>

上皮成長因子受容体 (EGFR) を介する腫瘍細胞シグナル伝達は、リガンド依存性およびリガンド非依存性の受容体活性化機構を介して機能します。例えば、特定のタイプの神経膠芽腫は、EGFRの細胞外ドメインの欠失を抱えているにもかかわらず、構成的活性化型のシグナル伝達を介して発現します。<sup>8</sup>

がん増殖および成長の調節不全については、多くの点において明らかにされています。<sup>2</sup>

- 腫瘍による増殖因子産生増加の可能性
- 悪性細胞表面における増殖因子受容体数増加の可能性
- 形質転換細胞における受容体構造変化の可能性
- 腫瘍微小環境において産生した増殖因子に対し、がん性細胞が不適切に反応する可能性
- 増殖因子受容体のタンパク質下流の調節不全の可能性

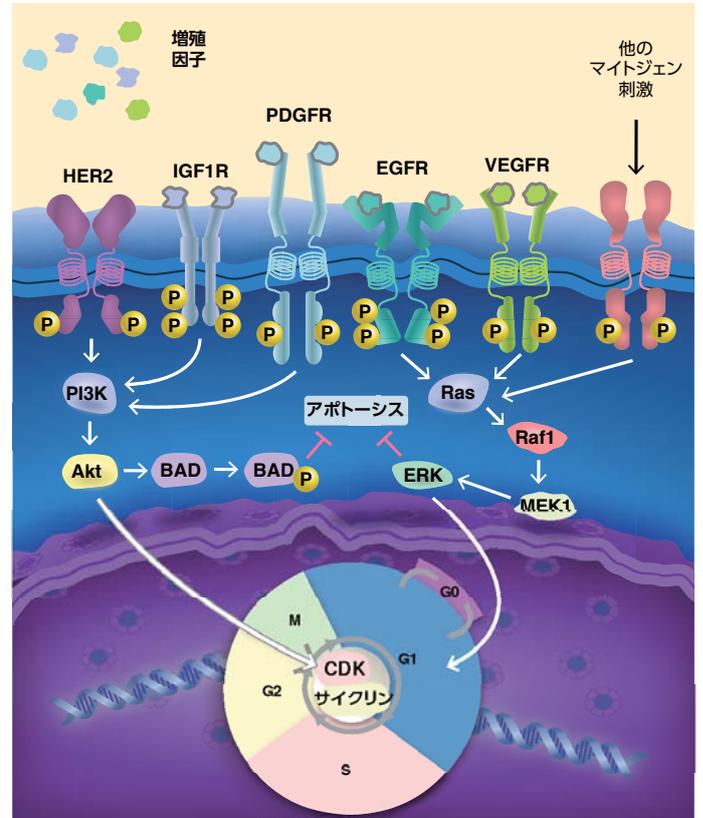


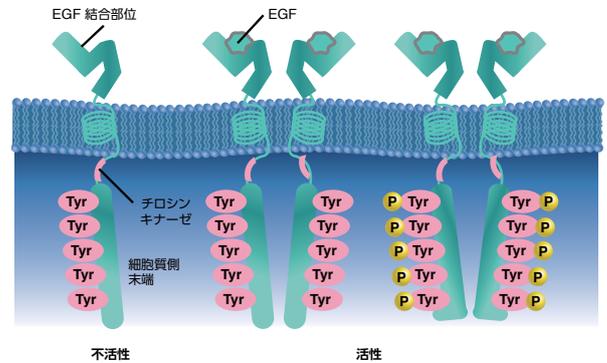
図2.2. 腫瘍形成に関与する一般的な受容体型チロシンキナーゼ経路 いくつかの増殖因子関連経路は、調節不全の際、悪性腫瘍進行を促進する無制御な細胞増殖に寄与します。過去10年の間、複数のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) がさまざまながんの治療薬としてFDAおよび他の世界の医薬品規制機関により承認されてきました。

# 増殖因子受容体経路へのターゲティング

## 受容体型チロシンキナーゼ (RTK)

通常、増殖因子受容体型チロシンキナーゼの活性化は、リガンドの受容体細胞外ドメインへの結合から始まります (図2.3)。続いて、受容体の細胞質側末端のキナーゼドメインのチロシン残基の自己リン酸化が生じ、細胞増殖および他のプロセスに重要な遺伝子を制御する下流シグナル伝達タンパク質のためのドッキングステーションとして機能します。

上皮成長因子 (EGF) は、上皮腫瘍において高発現するタンパク質であるEGFRに結合します。EGFR経路は標的治療のモデルで、実際ががん治療薬の標的としての最初の増殖因子受容体として提唱されました。腫瘍細胞増殖に関与する一般的な増殖因子経路の代表例を表2.1.に示します。がん治療薬として承認されたチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の標的とされている増殖因子受容体は太字で表示しています。<sup>7</sup>



**図2.3. 上皮成長因子受容体** 受容体のリガンドへの結合 (左) は、ホモ二量体化および/またはヘテロ二量体化 (中央) を誘導します。受容体活性化は、受容体細胞質側末端に存在する鍵となるチロシン残基の自己リン酸化後に達成されます。キナーゼは、アデニン三リン酸 (ATP) から基質分子へのリン酸基の転移を触媒する酵素クラスに属します。既知のEGFRリガンドには、EGF、TGF- $\alpha$ 、アンフィレギュリン/AREG、エピジェン/EPGN、ベータセルリン/BTC、エピレギュリン/EREGおよびヘパリン結合性EGF/HBEGFがあります。

**表2.1. 腫瘍形成に関与する代表的な増殖因子および受容体型チロシンキナーゼ**

ターゲット	治療薬	がんを適応とする最初の FDA 承認 (年)
IGF/IGFR	N/A	乳がん、前立腺がん、および結腸直腸がん；肝細胞および他の悪性腫瘍 <sup>9</sup>
<b>PDGF/PDGFR*</b>	表 2.3 を参照 <sup>†</sup>	神経膠芽腫；皮膚線維肉腫；消化管間質腫瘍 <sup>10</sup>
FGF/FGFR	N/A	腎臓、胃、乳房、前立腺および他の固形腫瘍；血液腫瘍 <sup>11</sup>
<b>EGF/EGFR</b>	ゲフィチニブ (TKI) セツキシマブ (mAb) エルロチニブ (TKI) パニツムマブ (mAb) ラパチニブ <sup>§</sup> (TKI)	NSCLC (2003 <sup>‡</sup> ) <sup>12</sup> 結腸直腸がん、頭頸部がん (2004) <sup>13</sup> NSCLC (2004) <sup>14</sup> 結腸直腸がん (2006) <sup>15</sup> HER2+ 乳がん (2007) <sup>16</sup>
<b>HER2</b>	トラスツズマブ (mAb) ラパチニブ <sup>§</sup> (TKI) ペルツズマブ (mAb) Ado- トラスツズマブ エムタンシン (ADC)	HER2+ 乳がん；特定の消化管がん (1998) <sup>17</sup> HER2+ 乳がん (2007) <sup>18</sup> HER2+ 乳がん (2012) <sup>16</sup> HER2+ 乳がん (2013) <sup>19</sup>
<b>VEGF/VEGFR</b>	表 2.3 を参照 <sup>†</sup>	

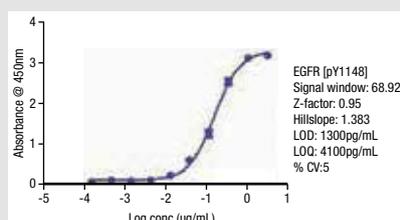
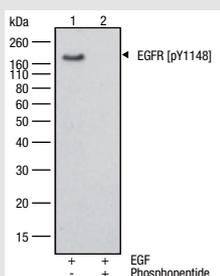
略語：ADC, 抗体薬物複合体

\* 注：PDGFR阻害は、VEGF経路を標的として開発されたマルチターゲットチロシンキナーゼ阻害剤の作用によって生じます。

† 表2.3は米国FDA (食品医薬品局) で承認されたVEGF阻害剤

‡ ラパチニブはデュアルEGFR/HER2キナーゼ阻害剤

§ 米国では、承認が取り消されています。



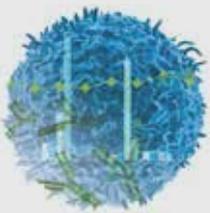
**Phospho-EGFR pTyr1148 (8HCLC) Rabbit Oligoclonal, ABfinity™ Recombinant Antibody** EGF処理した、血清飢餓状態のA431 (不死化ヒト類表皮がん) 細胞の全細胞抽出物についてウェスタンブロット解析を実施 (左)。抗EGFR pTyr1148抗体 (製品番号 710213) を使用して、175 kDa付近にリン酸化EGFRに対応するバンドを検出 (レーン1)。特異性について確認するために、リンペプチドと比較 (レーン2)。さまざまな濃度で抗体を使用して、間接ELISAを実施 (右)。

## 増殖因子受容体経路へのターゲティング がん研究のためのイムノアッセイ

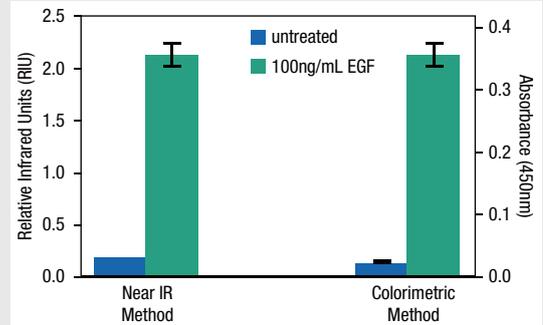
### EGFR In-Cell ELISAキット

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) は、タンパク質定量の標準的な手法です。ELISAは、比較的解析が容易で、迅速に結果が得られるため、ハイスループットスクリーニングに対応可能です。当社は、腫瘍学、免疫学、神経生物学、幹細胞研究、および他の分野におけるタンパク質の定量および解析を支援するための幅広い製品を提供しています。

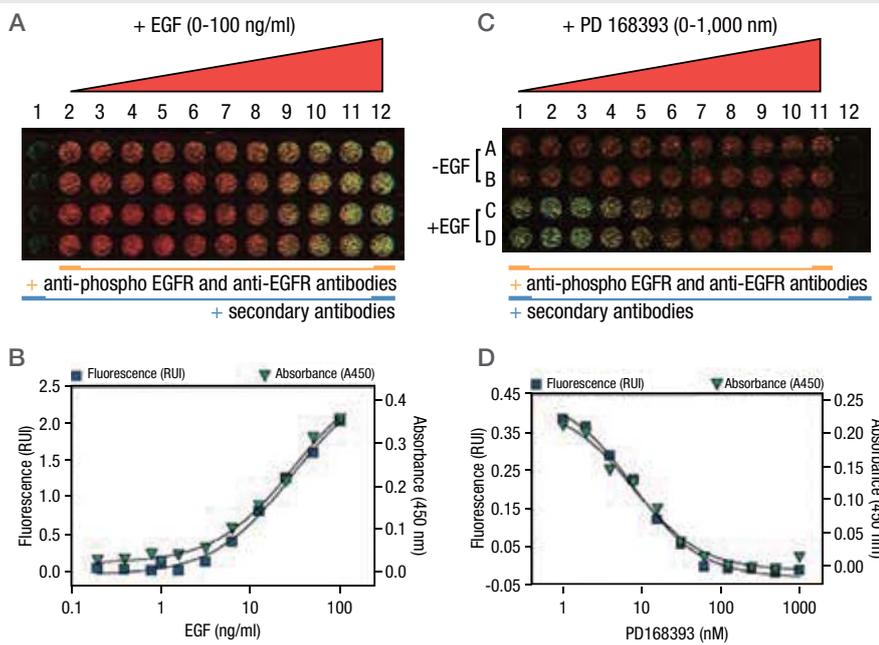
Thermo Scientific™ Pierce™ EGFR Colorimetric In-Cell ELISA Kit (製品番号 62205) に関する詳しい情報はこちらをご覧ください。www.thermofisher.com/in-cell-ELISA



また、がん研究および他の研究分野に関連する広範なターゲットを研究するための数百ものELISAキットおよび他のイムノアッセイも提供しています。当社のイムノアッセイに関する詳しい情報はこちらをご覧ください。www.thermofisher.com/antibody-assays



**Thermo Scientific Pierce EGFR in-cell ELISAキットの近赤外光検出法と比色検出法による結果は近似** In-Cell ELISA近赤外光検出キットおよびIn-Cell ELISA比色検出キットについて、A431細胞中でのEGFR活性を比較したところ、近似した誘導倍率とZ値 (それぞれ0.82および0.80) が得られ、どちらのキットとも確固たる性能を示しました。



EGFR in-cell ELISAキットは、EGFRタンパク質のレベル、活性化、および抑制を測定するための迅速かつ確実なフォーマットを提供。EGFおよびPD168393によるA431細胞におけるEGFRの用量依存的な活性化および抑制について評価しました。パネルAおよびBは、EGF用量の増加に伴い、リン酸化EGFRが増加していることを示しています。EGF誘導性のEGFRのリン酸化は、PD168393の濃度の上昇に伴い抑制されますが (パネルCのC行およびD行)、両処理でEGFR総量に著しい変化はありません。一次抗体の非存在下では顕著な染色は認められません (パネルAの1列目およびパネルCの12列目)。パネルBおよびDは、近赤外光検出法で得られた蛍光値 (RIU、左側のY軸) を、比色検出法で得られた結果 (右側のY軸) の上に重ね合わせて表示しています。

### がんにおける血管内皮増殖因子シグナル伝達

EGFRなどの受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、長い間、腫瘍細胞増殖との関連性が示唆されてきました。血管内皮増殖因子 (VEGF) およびそのRTK、VEGF受容体 (VEGFR) は、腫瘍増殖に高頻度で寄与する他のシグナル伝達ネットワークです (図2.4)。しかしながら、VEGFおよびVEGFRは、がんや糖尿病などの疾患に寄与する病的血管新生に関連する異常制御と最も密接に関係しています。

VEGF-AのVEGF受容体2 (VEGFR-2) への結合は、Ras/Raf/MAPK/ERK経路およびPI3K/Akt/mTOR経路の活性化を介する内皮細胞の増殖につながります。<sup>20</sup> 近年、血管新生およびVEGF経路を阻害する複数の薬剤が、肺、膵臓、腎臓、胃、肝臓、および他の器官の特定のがんに対する治療薬としてFDAおよび他の世界の医薬品規制当局に承認されています。完全には網羅していませんが、VEGF経路を標的とする阻害剤のリストを表2.3に示します。これらの薬剤の大部分はマルチキナーゼ阻害剤であることに注目してください。<sup>21</sup>

研究者たちは、VEGF経路が腫瘍血管新生をサポートするプロセスに極めて重要であることに加えて、VEGF経路シグナル伝達は乳がん細胞株の増殖に直接影響を及ぼす可能性についても報告しています。<sup>22</sup>

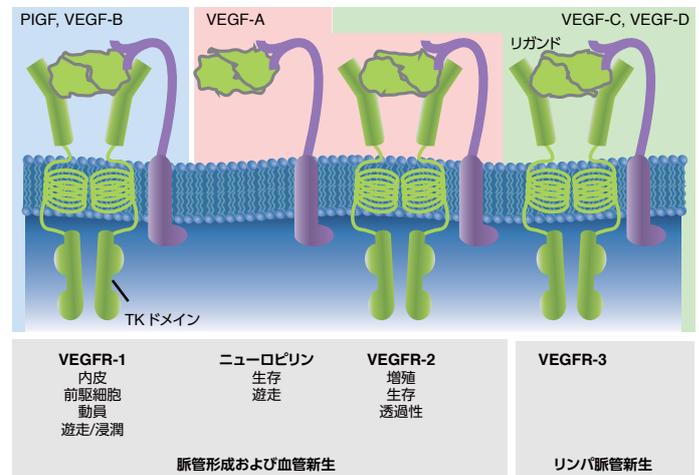


図2.4. 血管内皮増殖因子およびがん進行 VEGFファミリーはホモ二量体を形成した糖タンパク質からなり、VEGF-A、-B、-Cおよび-D、ならびにVEGF受容体1、2および3に特異的に結合する胎盤成長因子 (PGF) が含まれます。VEGF受容体2は、細胞の増殖、生存、および遊走などのVEGF-Aを介する血管新生効果を発揮する主要なメディエーターと考えられます。

表2.3. 米国FDAで承認された代表的なVEGF経路阻害剤

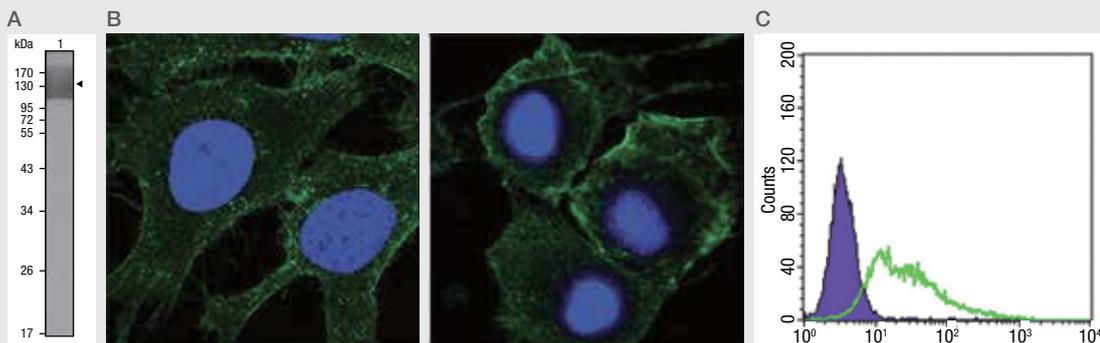
治療薬	分子ターゲット	疾患	最初の FDA 承認 (年)
ベバズマブ <sup>23</sup>	VEGF-A	結腸、直腸、肺、脳、腎臓、腹腔腔、および女性生殖器系の特定の腫瘍	2004
ソラフェニブ <sup>24</sup>	VEGFRs, Raf, PDGFRs, KIT	肝臓、腎臓、および甲状腺の特定の腫瘍	2005
スニチニブ <sup>25</sup>	VEGFRs, PDGFRs, FLT3, CSF1R	胃腸管、腎臓、および膵臓の特定の腫瘍	2006
パゾパニブ <sup>26</sup>	VEGFRs, Raf, PDGFRs, KIT	進行性腎細胞がんおよび特定の進行性軟部組織肉腫	2009
パンドタニブ <sup>27</sup>	VEGFRs, PDGFRs, EGFR	甲状腺の特定の腫瘍	2011
アキシチニブ <sup>28</sup>	VEGFRs, PDGFRs, KIT	進行性腎細胞がん	2012
Ziv- アフリベルセプト <sup>29</sup>	VEGF-A, VEGF-B, PlGF	進行性腎細胞がん	2012
ラムシルマブ <sup>30</sup>	VEGFR2	胃腸管および肺の特定の腫瘍	2014

# 増殖因子受容体経路へのターゲティング

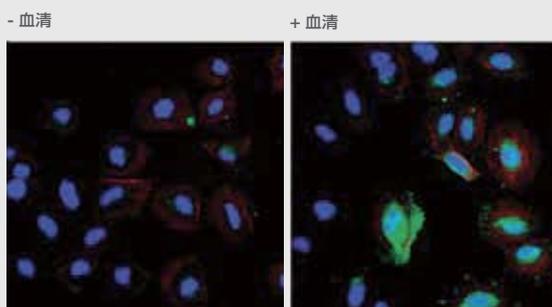
# 2

## 増殖因子および増殖因子受容体の検出

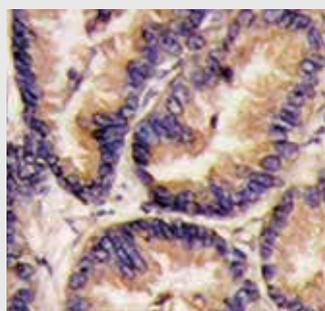
当社は、VEGFおよびVEGFRファミリータンパク質ならびに他の増殖因子スーパーファミリータンパク質を検出するための幅広い抗体を提供しています。製品に関する詳しい情報は [こちらをご覧ください](http://www.thermofisher.com/VEGF)。



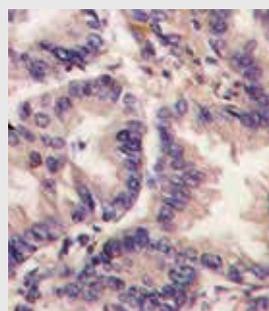
**VEGF Receptor 2/Fik-1 Mouse Monoclonal Antibody** (A) 抗VEGF受容体 2/Fik-1抗体 (製品番号 MA5-15556) を使用した、ヒトVEGFR-2 (aa 20-764)の細胞外ドメインのウェスタンブロット検出。(B) HeLa (不死化ヒト子宮頸がん、左) 細胞およびHepG2不死化ヒト肝細胞がん、右) 細胞の免疫蛍光分析。(C) HepG2細胞 (緑色) およびネガティブコントロール (紫色) のフローサイトメトリー解析。詳細なプロトコールは付録をご覧ください。



**VEGF-A Rabbit Polyclonal Antibody, Biotin Conjugate** 抗VEGF-A抗体 (製品番号 P802B) (緑色) を使用して染色した血清飢餓 (左パネル) または血清処理したHeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞の免疫蛍光分析。細胞はThermo Scientific™ DyLight™ 488 goat anti-rabbit IgG secondary antibody (製品番号 35552) ; F-アクチン (赤色) 、Thermo Scientific™ DyLight™ 554-Phalloidin (製品番号 21834) で染色し、核 (青色) はHoechst™ 33342 Dye (製品番号 62249) で染色。



**VEGF-B Rabbit Polyclonal Antibody** 抗VEGF-B抗体 (製品番号 PA5-13304) に続き、HRP標識二次抗体および3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 染色を使用した、ヒト肺がん組織の免疫組織化学分析。

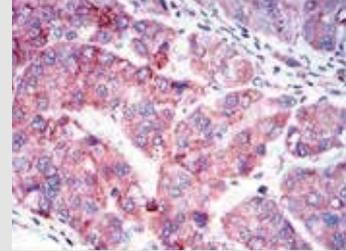


**VEGF-C Rabbit Polyclonal Antibody** anti-VEGF-C antibody (製品番号 PA5-11908) に続き、HRP標識二次抗体およびDAB染色を使用した、ヒト肺がん組織の免疫組織化学分析。

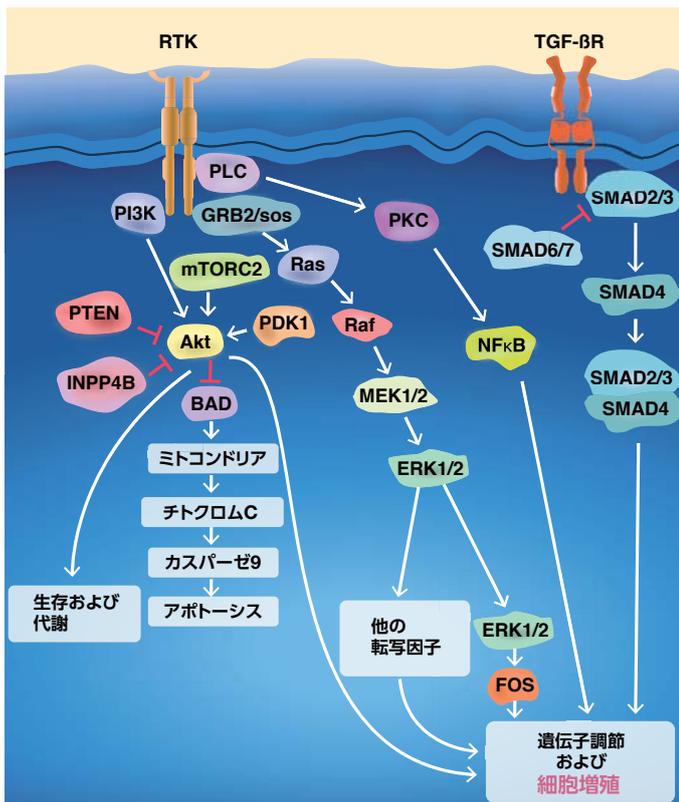
## がんにおける増殖シグナル伝達経路

### トランスフォーミング増殖因子-β

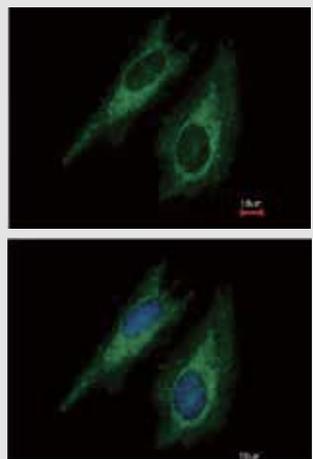
受容体型チロシンキナーゼ経路に加えて、トランスフォーミング増殖因子ファミリーにも、他の主要なシグナル伝達ネットワークが含まれており、それが障害されると、がん細胞の増殖が促進される可能性があります (図2.5)。トランスフォーミング増殖因子 (TGF-β) は、構造的にホモ二量体を形成するサイトカインのファミリーです。哺乳類アイソフォームには、TGF-β1、TGF-β2、およびTGF-β3があり、関連するセリン/スレオニン受容体とともに細胞増殖、血管新生、免疫反応、アポトーシス、および他の機能を含む複数の生物学的プロセスを制御しています。TGF-βシグナル伝達の調節不全は、創傷治癒の異常、組織線維化、心血管疾患、がん、自己免疫疾患、および他の障害に関与します。SMADは、進化的に保存された細胞内タンパク質で、セリン/スレオニンキナーゼ受容体によって活性化され、核移行が生じ、それに続きTGF-βシグナル伝達の転写制御因子として機能します。<sup>31,32</sup>



**SMAD2 Mouse Monoclonal Antibody (5G7)** 抗SMAD2抗体 (製品番号 MA5-15877) に続き、DAB染色を使用した、パラフィン包埋したヒト肝がん組織の免疫組織化学分析。タンパク質ファミリーのSMADは、*Drosophila* (ショウジョウバエ) タンパク質Mad (mothers against decapentaplegic)と*C. elegans* (線虫) タンパク質SMAから名付けられました。



**図2.5. 主要なシグナル伝達経路** 増殖因子受容体型チロシンキナーゼ経路および受容体タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ経路がどのように合流し、細胞増殖および他のプロセスを制御しているかを示す簡略図。



**TGF-β Receptor I Rabbit Polyclonal Antibody** 染色なし (上) およびTGF-β 受容体I 型抗体 (製品番号 PA5-27785) で染色した (下)、メタノール固定HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞の免疫蛍光分析。

## がんにおける増殖シグナル伝達経路

### がんにおける異常なシグナル伝達

図2.6に示したシグナル伝達カスケードは、正常な細胞プロセスを制御している複数の経路が悪性細胞の増殖にも寄与していることを示しています。成長および増殖に関与する重要な経路には、これらに限定されませんが、PI3K/Akt/mTor、Ras/Raf/MEK、およびWnt/ $\beta$ -カテニンのシグナル伝達経路があります。<sup>33-35</sup>

これらの経路は、がんの増殖および成長を制御する他に、集的に複数の生理的プロセスを調節しています。<sup>36</sup>

- アポトーシス
- 細胞周期調節
- DNAの維持
- 遺伝子転写
- 生存
- 代謝
- 血管新生
- 創傷治癒
- 細胞遊走
- 分化
- その他の機能

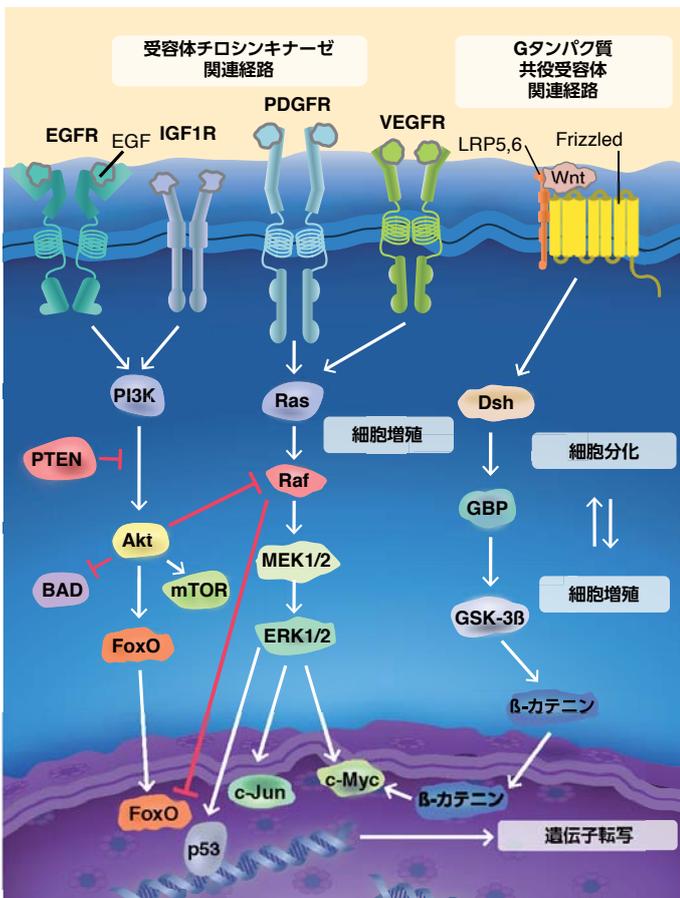
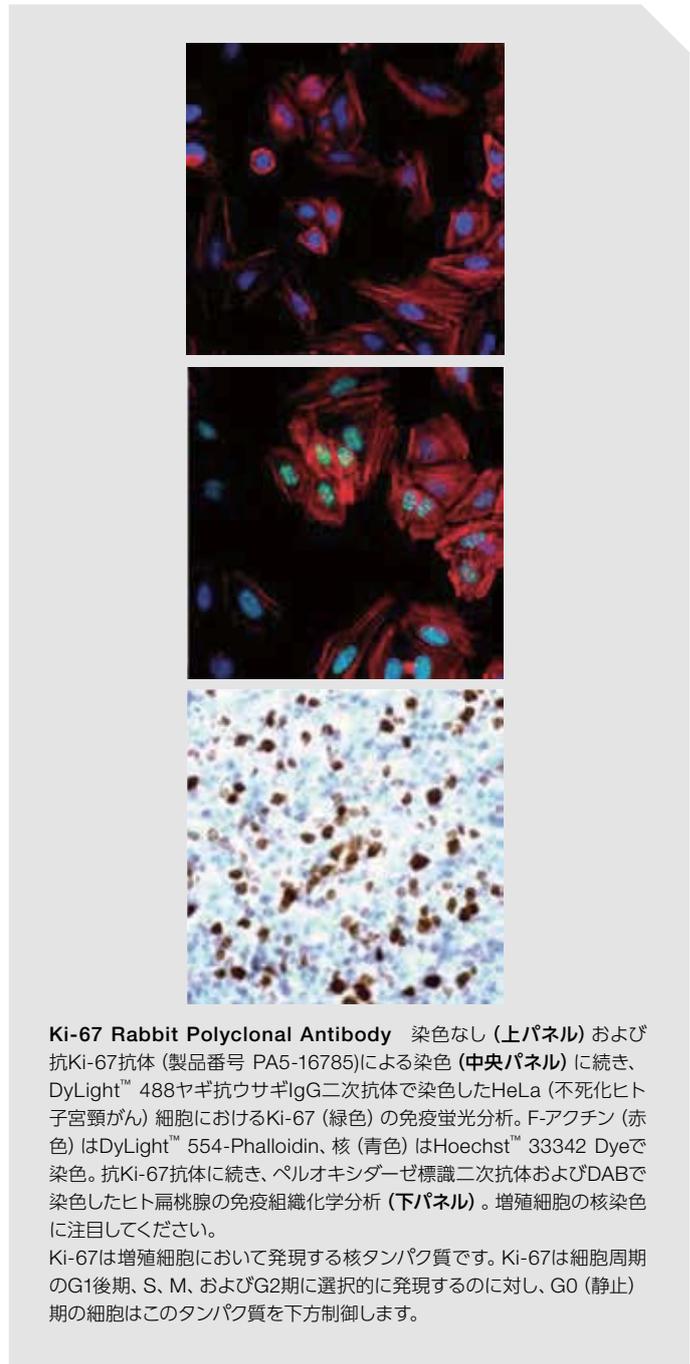


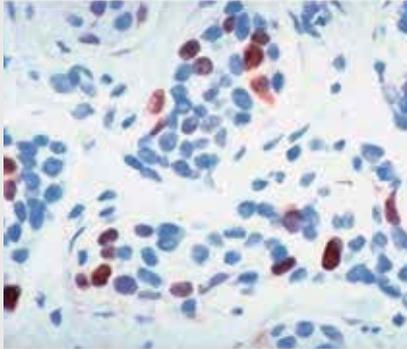
図2.6. がん細胞の増殖を促進する重要なシグナル伝達経路 受容体チロシンキナーゼががん進行において果たしている既知の役割の他に、調節不全クラスのFrizzled受容体ファミリーメンバー（Gタンパク質共役受容体ファミリーメンバーの1つ）もがん細胞の増殖を促進します。



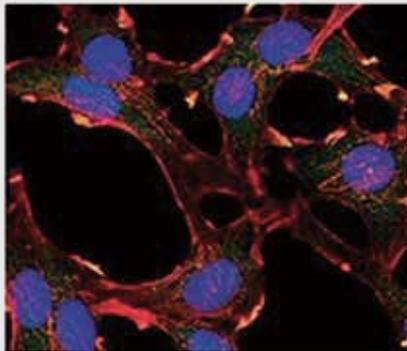
**Ki-67 Rabbit Polyclonal Antibody** 染色なし（上パネル）および抗Ki-67抗体（製品番号 PA5-16785）による染色（中央パネル）に続き、DyLight™ 488ヤギ抗ウサギIgG二次抗体で染色したHeLa（不死化ヒト子宮頸がん）細胞におけるKi-67（緑色）の免疫蛍光分析。F-アクチン（赤色）はDyLight™ 554-Phalloidin、核（青色）はHoechst™ 33342 Dyeで染色。抗Ki-67抗体に続き、ペルオキシダーゼ標識二次抗体およびDABで染色したヒト扁桃腺の免疫組織化学分析（下パネル）。増殖細胞の核染色に注目してください。  
Ki-67は増殖細胞において発現する核タンパク質です。Ki-67は細胞周期のG1後期、S、M、およびG2期に選択的に発現するのに対し、G0（静止）期の細胞はこのタンパク質を下方制御します。

# 抗体：がん研究のための強力なツール

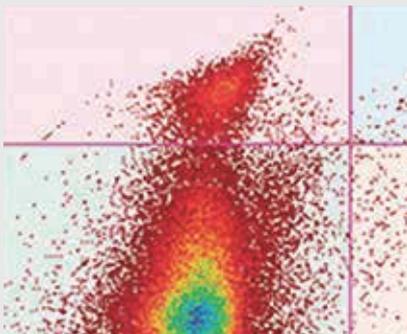
74,000種類以上の一次抗体および二次抗体を提供：



免疫組織化学

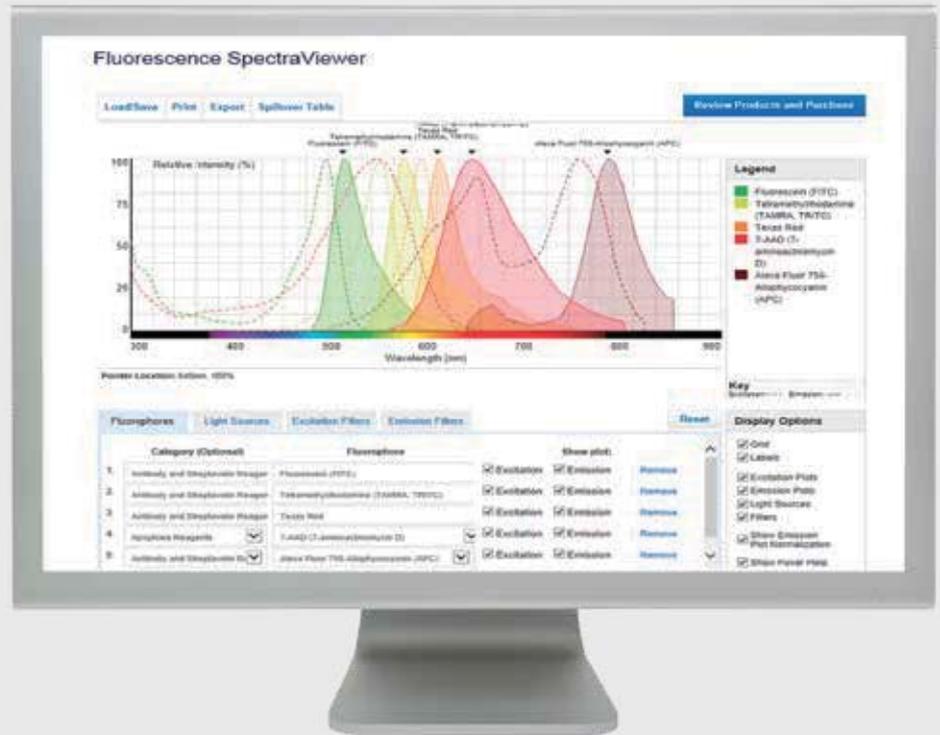


免疫蛍光分析



フローサイトメトリー

およびウェスタンブロットティング、免疫沈降、ELISAなどの他のアプリケーション



マルチカラー抗体パネルに必要とされるアプリケーションのためのSpectraViewerについてはこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/spectraviewer](http://www.thermofisher.com/spectraviewer)

- Chen HZ, Tsal SY, Leone G (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 9(11):785–797.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674.
- Gollias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K (2004) Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 58(12):1134–1141.
- Vogelstein B, Prives C (2009) The rise of p53. *Nature Publishing Group website*. <http://www.nature.com/reviews/posters/p53/index.html> (second panel)
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(1):a001008.
- Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ (2004) Therapeutic and diagnostic implications of HSP90 activation. *Trends Mol Med* 10(6):283–290.
- Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12(18):5268–5272.
- Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000) Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60(5):1383–1387.
- Li R, Pourpak A, Morris SW (2009) Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach. *J Med Chem* 52(16):4981–5004.
- Ehnmann M, Östman A (2014) Therapeutic targeting of platelet-derived growth factor receptors in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs* 23(2):211–226.
- Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC (2013) Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov* 3(3):264–279.
- National Cancer Institute website (2011) *FDA approval for gefitinib*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-gefitinib>
- Bristol-Myers Squibb (2013) *Erbix (cetuximab) prescribing information*. [http://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_erbix.pdf](http://packageinserts.bms.com/pi/pi_erbix.pdf)
- Genentech (2014) *Tarceva (erlotinib) prescribing info*. [http://www.gene.com/download/pdf/tarceva\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/tarceva_prescribing.pdf)
- Amgen (2014) *Vectibix (panitumumab) prescribing info*. [http://pi.amgen.com/united\\_states/vectibix/vectibix\\_pi.pdf](http://pi.amgen.com/united_states/vectibix/vectibix_pi.pdf)
- GlaxoSmithKline (2014) *Tykerb (lapatinib) prescribing information*. <https://www.gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/tykerb-pi-pil.pdf>
- Genentech (2014) *Herceptin (trastuzumab) prescribing information*. [http://www.gene.com/download/pdf/herceptin\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/herceptin_prescribing.pdf)
- Genentech (2013) *Perjeta (pertuzumab) prescribing information*. [http://www.gene.com/download/pdf/perjeta\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/perjeta_prescribing.pdf)
- Genentech (2014) *Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine) prescribing information*. [http://www.gene.com/download/pdf/kadcyla\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/kadcyla_prescribing.pdf)
- Grothey A, Galanis E (2009) Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules. *Nat Rev Clin Oncol* 6(9):507–518.
- National Cancer Institute website (2011) *Angiogenesis inhibitors*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/angiogenesis-inhibitors>
- Liang Y, Brekken RA, Hyder SM (2006) Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr Relat Cancer* 13(3):905–919.
- Genentech (2014) *Avastin (bevacizumab) prescribing information*. [http://www.gene.com/download/pdf/avastin\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf)
- Bayer HealthCare Pharmaceuticals (2013) *Nexavar (sorafenib) prescribing information*. [http://labeling.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Nexavar\\_PI.pdf](http://labeling.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Nexavar_PI.pdf)
- Pfizer Laboratories (2014) *Sutent (sunitinib maleate) prescribing information*. <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=607>
- Genentech (2014) *Votrient ( pazopanib) prescribing information*. <https://www.gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/votrient-pi-mg.pdf>
- AstraZeneca (2014) *Caprelsa (vandetanib) prescribing information*. <http://www.caprelsaqc.com/content/dam/physician-services/us/201-caprelsaqc-com/home/caprelsa.pdf>
- Pfizer Laboratories (2014) *Inlyta (axitinib) prescribing information*. <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=759>
- Sanofi-Aventis (2014) *Zaltrap (ziv-aflibercept) prescribing information*. <http://products.sanofi.us/zaltrap/zaltrap.html>
- Eli Lilly and Company (2014) *Cyramza (ramucirumab) prescribing information*. <http://pi.lilly.com/us/cyramza-pi.pdf>
- Samanta D, Datta PK (2012) Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17:1281–1293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4281477/>
- Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958):577–584. <http://www.nature.com/nature/journal/v425/n6958/full/nature02006.html>
- CancerLink.ru website (2013) *New molecular biomarkers candidates for the development of multiparametric platforms for hepatocellular carcinoma diagnosis, prognosis and personalised therapy*. <http://cancerlink.ru/ennew-molecular-biomarkers-for-hepatocellular-carcinoma-diagnosis.html>
- Le PN, McDermott JD, Jimeno A (2015) Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther* 146C:1–11.
- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 11(1–2):32–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2442829/pdf/nihms51320.pdf>
- Witsch E, Sela M, Yarden Y (2010) Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology* 25(2):85–101.

詳細はこちら [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

All rights reserved. Hoechst is a trademark of Hoechst GmbH. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

# PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路

## イントロダクション

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/プロテインキナーゼB/哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (PI3K/Akt/mTOR) 経路は、広範な正常細胞機能に必要とされる主要なシグナル伝達ノードです。この経路の変化が腫瘍形成の一因であることはよく知られています。なぜなら、この経路は、大部分のがんのホールマーク (代謝、成長および増殖、ならびに転移) の制御に極めて重要で、腫瘍の血管新生やがん関連炎症などの腫瘍促進プロセスにも関与しているからです。PI3K/Akt/mTOR経路は、この経路のいくつかのメディエーターにおいてさまざまな発がん性変異および腫瘍抑制機能喪失につながる変異が同定されたことから、徹底的に探究されてきました。実際、がんゲノム研究では、ヒトがんではこの経路において最も頻繁に変化が生じていることが示されています。

PI3K/Akt/mTORシグナル伝達を制御する細胞機構および分子機構に関する豊富な情報は、経路の阻害剤の開発をサポートし、分子標的抗がん剤の利用可能性の増加に寄与してきました。

## 目次

PI3K/Akt/mTORシグナル伝達ノード	3-2	Akt/プロテインキナーゼB	3-10
ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K)	3-4	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR)	3-12
がんにおけるPI3Kの役割	3-6	がんにおけるmTORの役割	3-15
ホスファターゼテンシンホモログ (PTEN)	3-8	参考文献	3-18

# PI3K/Akt/mTORシグナル伝達ノード

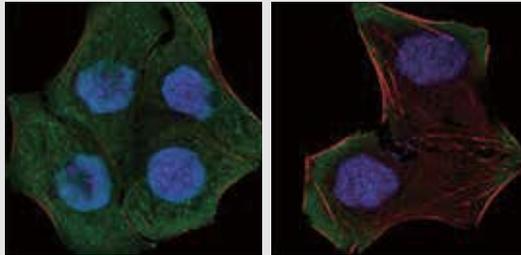
## プロトタイプの生存経路

正常なホメオスタシス状態で細胞機能のさまざまな側面をサポートし、細胞生存に寄与する細胞シグナル伝達経路の変化は、腫瘍形成の進行の一因とされます。<sup>1,2</sup>

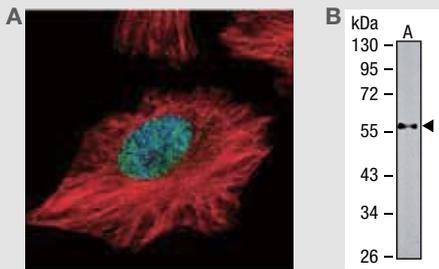
腫瘍細胞生物学において、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/プロテインキナーゼB/哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (PI3K/Akt/mTOR) カスケードが中心的役割を果たしているという仮定のもと、この基本的なシグナル伝達経路について明らかにするために注力されてきました (図3.1)。多数の研究において、PI3K/Akt/mTOR関連遺伝子に生じた体細胞変異によってさま

ざまなタイプのがん経路の恒常的活性化が誘導され、腫瘍細胞増殖、成長、分化、代謝、アポトーシス、および腫瘍細胞生存をサポートする他の機能の調節不全が引き起こされている可能性が示されています。<sup>3</sup>

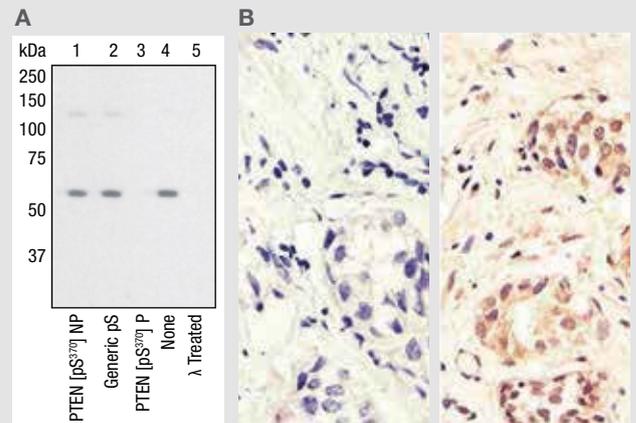
PI3K/Akt/mTOR経路に影響する生殖細胞系列の変異は、特定の遺伝性がんに関与します。例えば、腫瘍抑制因子ホスファターゼテンシンホモログ (PTEN) の喪失は、カウデン症候群 (多発性過誤腫症候群) を発症させます。この常染色体優性疾患は、皮膚および粘膜の良性病変 (過誤腫) の存在を特徴とし、乳房、甲状腺、および他の器官のがんの発生を増加させる可能性があります。<sup>4</sup>



**PTEN Mouse Monoclonal Antibody (1B8)** 抗PTEN抗体 (製品番号 MA5-15560) (緑色) およびDRAQ5™ fluorescent DNA Dye (青色) を使用した、HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞 (左) およびHepG2 (不死化ヒト肝細胞がん) 細胞 (右) の免疫蛍光分析。アクチンフィラメントはDyLight™ 554-Phalloidinで標識 (赤色)。



**PTEN Rabbit Polyclonal Antibody** (A) 抗PTEN抗体 (製品番号 PA5-27304) (緑色) を使用した、HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞の免疫蛍光分析。αチューブリンフィラメントも標識 (赤色)。(B) 抗PTENポリクローナル抗体をプローブとして使用した、NIH/3T3 (不死化マウス胚線維芽細胞) の細胞ライゼートのウェスタンブロット解析。



## Phospho-PTEN pSer370 Rabbit Polyclonal Antibody

(A) 3T3-L1 (マウス脂肪) 細胞抽出物のウェスタンブロット解析における抗体ペプチド競合試験およびホスファターゼ処理の評価。メンブレンは、未処理 (レーン1-4) またはλホスファターゼ処理 (レーン5) を行い、抗リン酸化PTEN pSer370抗体 (製品番号 44-1060G) とともにインキュベーション。本データは、PTENに対応するリンペプチドのみが抗体シグナルをブロックし、抗体に対し特異性を示すことを表示しています。(B) 抗リン酸化PTEN pSer370抗体を使用したパラフィン包埋したヒト乳がん (右) と一次抗体不使用のネガティブコントロール (左) の免疫組織化学分析における比較。



# ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K)

## PI3Kの機能およびシグナル伝達

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) は、細胞膜の構成要素でホスホイノシチドの代謝前駆体であるホスファチジルイノシトールの3'-水酸基をリン酸化するシグナル伝達タンパク質で、広範な細胞活性を調節することによって細胞生存および細胞死を制御する生物活性脂質分子です (図3.2)。<sup>5,6</sup> PI3Kは、細胞機能の制御において幅広い役割を持つ他、リンパ球の活性化およびシグナル伝達に関与しています。<sup>7,8</sup>

PI3Kは、サイトカイン、インテグリン、B細胞受容体 (BCR) 活性化、あるいはGタンパク質共役受容体 (GPCR) リガンドなどの複数の上流シグナルを介して活性化されます。PI3Kがリガンドに結合すると、受容体チロシンキナーゼ (RTK) -および (GPCR) -誘導性のPI3K活性化が細胞膜で生じます。活性化されたPI3Kは、ホスファチジルイノシトール-4,5- ニリン酸 (PtdIns[4,5]P<sub>2</sub>、またはPIP<sub>2</sub>) をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール- 3,4,5-三リン酸 PtdIns[3,4,5]P<sub>3</sub>、またはPIP<sub>3</sub>) を産生させます。続いて、PIP<sub>3</sub>の蓄積、ならびにAktおよび3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ1 (PDK1) などのプレクストリン相同 (PH) ドメインを持つタンパク質の動員がシグナル伝達カスケードを誘発し、細胞成長および生存ならびにカルシウム動員、細胞運動性、小胞輸送および細胞増殖、アポトーシス、および他の機能を含む多くのその他の重要な細胞機能に影響を及ぼします (図3.3)。<sup>9</sup>

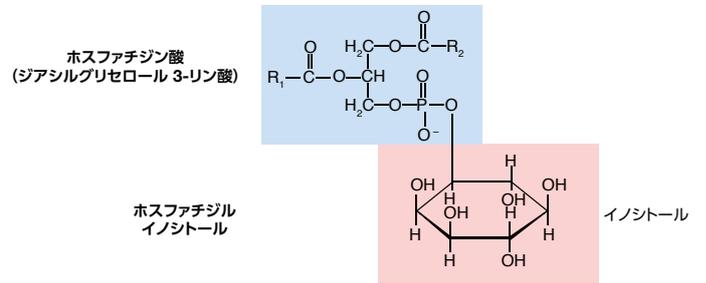


図3.2. ホスファチジルイノシトール (PI) の化学構造 ホスホグリセリドの中心は、ホスファチジン酸部分から構成され、環式アルコールのイノシトールと結合し、リン酸エステル結合を形成しています。PIのC1およびC2の水酸基は、R1およびR2の位置で2つの脂肪酸—通常、ステアリン酸およびアラキドン酸—のカルボキシル基に結合します。

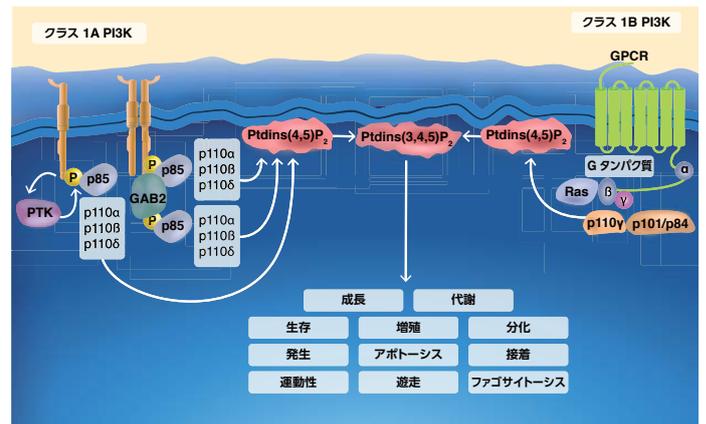


図3.3. クラスI ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) の細胞内相互作用 クラスIA PI3Kは、受容体チロシンキナーゼと相互作用します。PI3Kを活性化すると、PIP<sub>2</sub>がリン酸化され、PIP<sub>3</sub>が合成されます。クラスIA PI3Kのアイソフォームには、触媒サブユニット: p110α、p110βおよびp110δが含まれ、それぞれがPI3Kの調節サブユニットp85を含有します。クラスIB PI3KのアイソフォームPI3KγはGタンパク質共役受容体と相互作用し、触媒サブユニットp110γおよび調節サブユニットp101/p84を含有します。このシグナル伝達カスケードの伝播によって、重要な生物学的機能を制御するさまざまな下流ターゲットが調節されます。

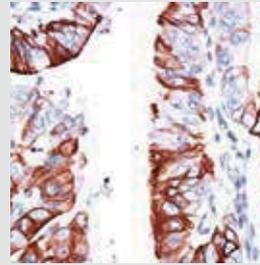
脂質キナーゼのPI3Kには、3種類のクラスが特定されています。図3.3に示したクラスI PI3Kシグナル伝達がヒトがんにも果たす役割はよく認識されています。クラスII PI3Kのシグナル伝達（数種のアイソフォームが存在）についてはあまり解明されておらず、ヒト腫瘍進行との関連性は全く知られていません。クラスIII PI3Kで唯一知られているのは、オートファジー—リソソーム内で細胞質成分を分解するシステム—の制御で、腫瘍形成における中心的役割を担っています。PI3Kに影響を及ぼすがんのドライバー変異には、触媒サブユニットの活性化変異やPI3Kヘテロ二量体の調節ドメインに影響を及ぼす機能喪失型変異が含まれます。<sup>3</sup>

腫瘍細胞進行に関与する一般的な受容体チロシンキナーゼについては第2節で紹介しました。多くのGタンパク質共役受容体は、増殖や腫瘍増殖に寄与する他のプロセスの調節不全と関係していることはよく知られています（表3.1）。<sup>10</sup>

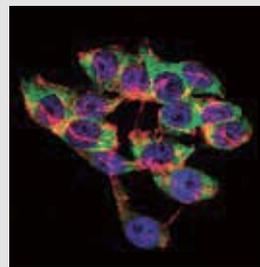
表3.1.腫瘍によって発現する代表的なGPCR

がん種	GPCR/ リガンド
乳房	GPER/ エストロゲン
結腸	PAR1/ トロンビン
非小細胞肺	EP 受容体 /PGE2
卵巣	LPA1-LPA3/LPA
前立腺	AT1/ アンジオテンシン II

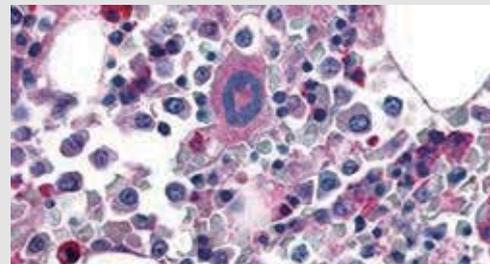
AT, アンジオテンシン; EP, プロスタグランジン E; GPER, Gタンパク質共役エストロゲン受容体; LPA, リゾホスファチジン酸; PAR, プラダー・ウィリー/アンジェルマン領域; PGE2, プロスタグランジン E2.



**GPR30 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗GPR30抗体（製品番号 PA5-28647）を使用した、パラフィン包埋したヒト子宮内膜組織の免疫組織化学分析。



**LPA Mouse Monoclonal Antibody (4H1)** 抗LPA抗体（緑色）（製品番号 MA5-17111）で染色した、HepG2（不死化ヒト肝細胞がん）細胞の免疫蛍光分析。核はDRAQ5™ Dye（青色）、アクチンフィラメントは蛍光ファロイジンコンジュゲート（赤色）で染色。



**Thrombin Receptor/PAR1 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗PAR1抗体（製品番号 PA5-34263）を使用した、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト骨髄の免疫組織化学分析。

# がんにおけるPI3Kの役割

## ヒト腫瘍に関連するPI3K変異

クラスI PI3Kとがんとの関連性については広く報告されており、いくつかのさまざまなタイプのヒト固形がんにおけるPI3K変異の役割が実証されています。さまざまなPIK3CA変異は非ホジキンリンパ腫とも関連しています。<sup>11</sup>

## PIK3CA (触媒ドメイン p110 $\alpha$ ) 変異を持つ

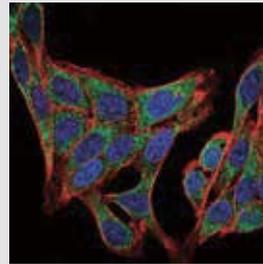
### ヒト腫瘍タイプ

- 乳房
- 子宮内膜 尿路
- 子宮頸部 皮膚
- 卵巣
- 胃
- 胆道
- 上気道
- 小腸
- 食道

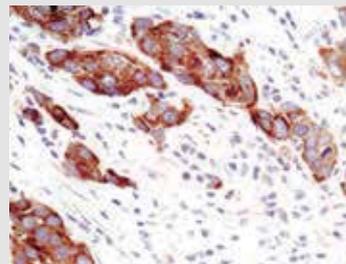
## PIK3R1 (調節ドメイン) 変異を持つヒト腫瘍タイプ

- 子宮内膜 結腸直腸 子宮頸部
- 上気道
- 中枢神経系
- 髄膜
- 乳房
- 食道
- 尿路
- 肺
- 卵巣
- 肝臓

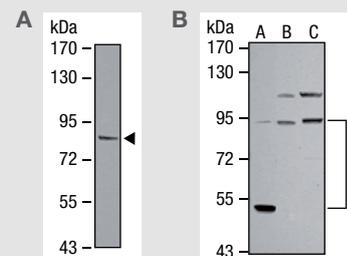
リストの並び順は、PI3K変異の検出頻度が高いがん種から順番に上から下へ向かって表示しています。<sup>3</sup>



**PIK3R1 Mouse Monoclonal Antibody (6G10)** 抗PIK3R1抗体 (製品番号 MA5-17150) (緑色) で染色した、HepG2 (不死化ヒト肝細胞がん) 細胞の免疫蛍光分析。核はDRAQ5™ fluorescent DNA Dye (青色)、アクチンフィラメントはファロイジン (赤色) で染色。



**PI3 Kinase p110-alpha Rabbit Monoclonal Antibody (H.843.0)** 抗PI3キナーゼp110- $\alpha$ 抗体 (製品番号 MA5-14870) を使用した、パラフィン包埋したヒト乳がんの免疫組織化学分析。



**PI3 Kinase p85 Alpha Rabbit Polyclonal Antibody** (A) 抗PI3キナーゼp85 $\alpha$ 抗体 (製品番号 PA5-29220) をプローブとして使用した、BCL-1 (マウスBリンパ球) 細胞ライセートのウェスタンブロット解析。(B) 抗PI3キナーゼp85 $\alpha$ 抗体を使用した、a) Jurkat (不死化ヒトTリンパ球)、b) K562 (不死化ヒト骨髄性白血病)、および c) THP-1 (不死化ヒト単球性白血病) の細胞ライセートのウェスタンブロット解析。

当社は、この主要なシグナル伝達経路のPI3Kおよびメディエーターを検出するための幅広い抗体を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/PI3K](http://www.thermofisher.com/PI3K)

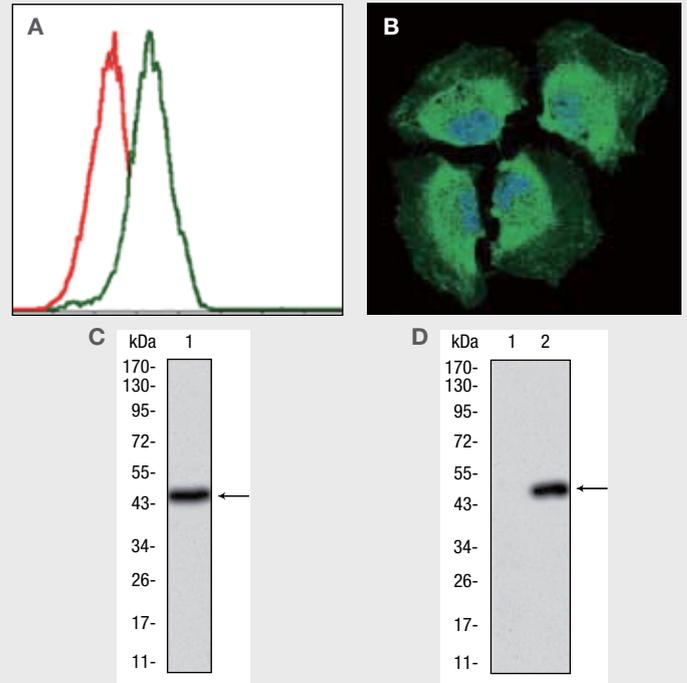
### PIK3CA Mouse Monoclonal Antibody (4F3)

製品番号 MA5-17149

アプリケーション: FC、IF、WB

PI3Kは、がん遺伝子として機能する可能性があります。結腸、脳、乳房、胃、肺、および他の器官のがんにおいて、体細胞変異 (*PI3K* 遺伝子座における特異的増幅および遺伝子内の欠失) が、PI3K (*PIK3CA*) の触媒サブユニット110 $\alpha$ の活性の上昇を誘導することは多くの研究で確認されています。<sup>12</sup>

詳細な技術プロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。



PIK3CAに対する抗体を使用した、(A) Jurkat (不死化急性T細胞白血病) 細胞 (緑色) およびネガティブコントロール (赤色) のフローサイトメトリー解析、(B) HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞 (緑色) の免疫蛍光分析、(C) ヒトPIK3CAのウェスタンブロット検出、および (D) 1) HEK293 (不死化ヒト胚腎臓) ならびに2) PIK3CAを導入したHEK293細胞ライゼートにおけるPIK3CAのウェスタンブロット解析。

# ホスファターゼ テンシンホモログ(PTEN)

## PTENの構造、機能およびシグナル伝達

腫瘍抑制因子PTENは、PI3Kを介するシグナル伝達の活性を抑制することによって、Aktを阻害します。PTENは、脂質ホスファターゼとして機能し、PIP<sub>3</sub>のイノシトール環の3位の水酸基を脱リン酸化し、PIP<sub>2</sub>を生成します。PTENは、PI3K/Akt/mTORシグナル伝達カスケードの負の制御因子として、増殖、生存、およびエネルギー代謝などの基本的な細胞機能の制御において極めて重要な役割を果たしています(図3.4および3.5)。<sup>11,13</sup> PTENは、PIP<sub>3</sub>と相互作用する他に、PI3Kおよび接着斑キナーゼ(FAK)などのチロシンリン酸基を持つ特定のタンパク質も認識し、シグナル伝達タンパク質Shcなどのセリン残基およびスレオニン残基を持つ特定のタンパク質に対するホスファターゼとしても作用します。<sup>14</sup>



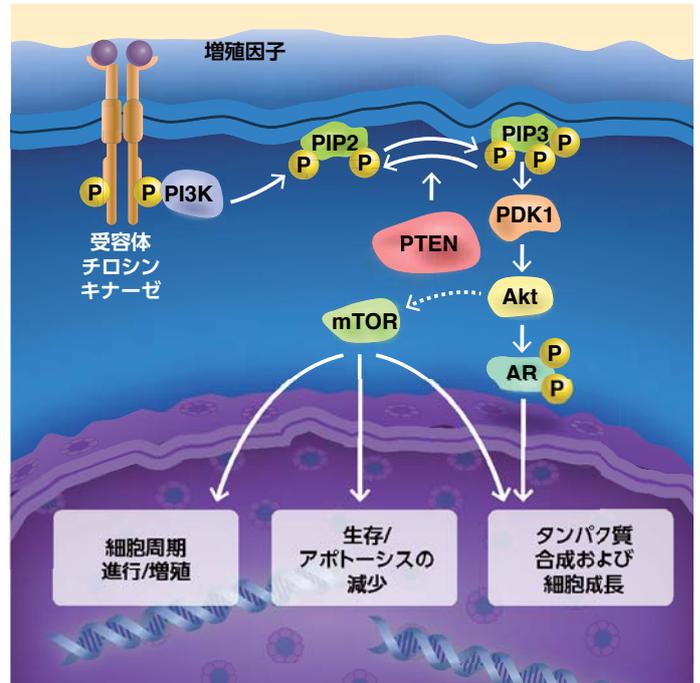
**PTEN Mouse Monoclonal Antibody (17.A)** 抗PTEN抗体(製品番号 MA5-12278)を使用した、MCF-7(不死化ヒト乳がん)細胞の免疫蛍光分析。(右)細胞質内のPTEN(緑色)と(左)一次抗体不使用のネガティブコントロールとの比較。

## がんにおけるPTENの役割

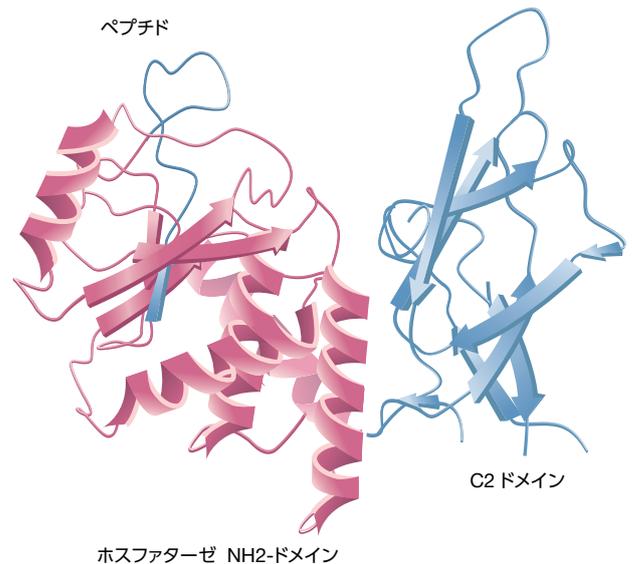
PTEN変異を持つヒトがん

- 子宮内膜
- 中枢神経系
- 皮膚
- 結腸直腸
- 前立腺
- 胆道
- 唾液腺
- 眼
- 子宮頸部
- 乳房
- 卵巣
- 胃

PTEN調節の喪失につながる生殖細胞系列変異は、カウデン症候群やバナヤン・ライリー・ルバルカバ症候群などの遺伝性疾患に関係します。これらの状態の影響を受けた個体は、皮膚や体のさまざまな器官に非がん性病変を発現します。これらの遺伝性疾患は、特定のタイプの悪性腫瘍の発現可能性の増加にも関係します。多数のヒトがんにおいて、ホモ欠失、トランケーション変異、点変異、および他の異常を含む体細胞変異が同定されてきました。PTENは、腫瘍抑制因子p53と同様に、最も一般的ながん関連遺伝子の一つです(図3.5)。<sup>3,15</sup>



**図3.4. 調節経路におけるPTENの役割** 腫瘍細胞によるPTEN調節の喪失は、多くのタイプの固形腫瘍および血液系腫瘍におけるAkt活性化の増加に寄与します。



**図3.5. PTENの構造** このタンパク質は403アミノ酸から構成されます。主要な機能ドメインには、N末端PIP<sub>2</sub>結合ホスファターゼドメイン(赤)、C2ドメイン、およびPTEN制御に関するC末端テール(青)が含まれます。腫瘍検体において検出される主要なPTENミスセンス変異は、ホスファターゼドメインを標的とし、PTENホスファターゼ活性の喪失をもたらします。

### がんにおけるPTENの役割

当社は、PTENおよびホスファターゼの直接標的、ならびにPI3K/Akt/mTOR経路が関係する関連タンパク質を検出するための幅広い抗体を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。  
[www.thermofisher.com/PTEN](http://www.thermofisher.com/PTEN)



**PTEN Rabbit Monoclonal Antibody (PN37)** 抗PTEN抗体 (製品番号 18-0256) を使用した、ヒト前立腺組織の免疫組織化学染色。

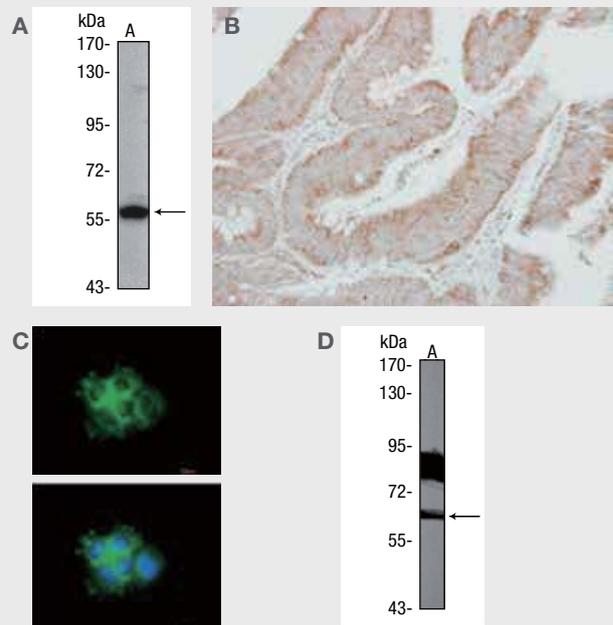
### SHC1 Rabbit Polyclonal Antibody

製品番号 PA5-27310

アプリケーション: WB、IHC (P)、IF

PTENとPI3Kとの相互作用については十分に解明されているのに加えて、アダプター分子SH2ドメインタンパク質C1 (Shc1) は、PTENの直接の基質です。3種類の主要なアイソフォームがShc遺伝子によってコードされています。p52Shc およびp46Shcは、増殖因子受容体の下流で機能し、Rasシグナル伝達経路を介するシグナル伝達を促進します。<sup>16</sup> p66Shcアイソフォームは、Shc1による活性酸素種の制御を介する細胞寿命の延長に関係します。いくつかのタイプの固形がんにおいて、Shc1アイソフォームががんの進行に関与している可能性が複数の研究で示されています。<sup>17</sup>

詳細な技術プロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。



**SHC1に対する抗体**を使用した、(A) A431 (不死化ヒト類表皮がん) 細胞のウェスタンブロット解析、(B) パラフィン包埋した結腸がん切片の免疫組織化学分析、(C) A431細胞の免疫蛍光分析、および (D) NIH/3T3 (不死化マウス胚線維芽細胞) 細胞由来SHC1のウェスタンブロット検出。

# Akt/プロテインキナーゼB

## Aktの構造、機能およびシグナル伝達

セリン/スレオニンキナーゼAkt（プロテインキナーゼBとも呼ばれる）は、広範囲に影響を及ぼすシグナル伝達ネットワークの中心的存在（収束ノード）です。本酵素は、プロテインキナーゼのAGCファミリーのメンバーで、60種類以上のヒトプロテインキナーゼが含まれます。Akt活性化はこれらの細胞シグナル伝達経路のマスタースイッチとして機能し、さまざまな下流ターゲットや相互作用パートナーを介して数多くの細胞内反応を引き起こします。Aktは細胞シグナル伝達における中心的役割を果たし、これらのシグナル伝達の異常はがんおよび糖尿病から神経変性に至る広範囲の疾患に影響を及ぼします。そのため、Aktは、基礎研究および薬剤開発の両分野において最も積極的に研究されているキナーゼの一つです（図3.6）。<sup>19</sup>

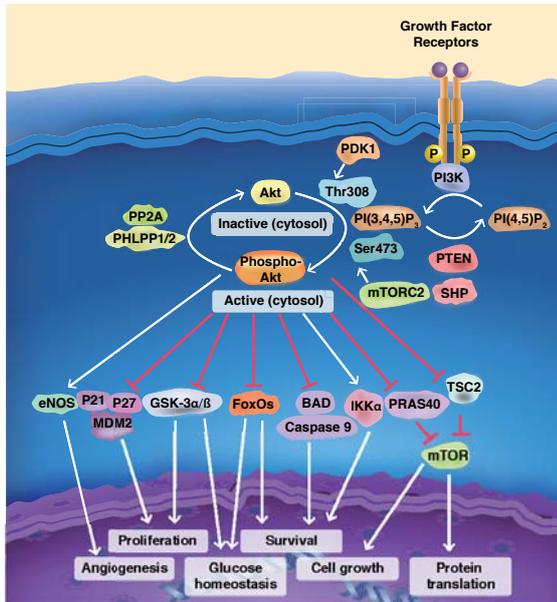


図3.6. Aktはマスター制御因子 Akt経路の活性化は幅広い生命細胞機能に影響。

Aktは、Akt1/PKB $\alpha$ 、Akt2/PKB $\beta$ 、およびAkt3/PKB $\gamma$ の3種類のアイソフォームとして発現します。3種類のアイソフォームには全てに、アミノ末端プレクストリン相同（PH）ドメイン、中央のセリン/スレオニン触媒ドメイン、および小さなカルボキシル末端調節ドメインが存在します。PHドメインは、PI3K産物であるPIP<sub>2</sub>およびPIP<sub>3</sub>に結合します（図3.7）<sup>18,19</sup>。これらの相互作用によりAktの細胞膜への移行が誘導され、ホスホイノシチド依存性キナーゼ1（PDK1）によって触媒ドメインの活性化ループ中のThr308がリン酸化されます。<sup>20</sup>

完全な活性化には、第二の部位Ser473のリン酸化反応が必要とされます。現在の研究では、mTOR-Rictor複合体（mTORC2）が第二の部位でのリン酸化反応に関与する主要なキナーゼであることが示唆されていますが、Akt活性化にはインテグリン結合キナーゼ（IkK）PDK1、DNA依存性プロテインキナーゼ（DNA-PK）、および血管拡張性失調症変異（ATM）といった他のキナーゼも関与していると考えられています。<sup>21</sup>

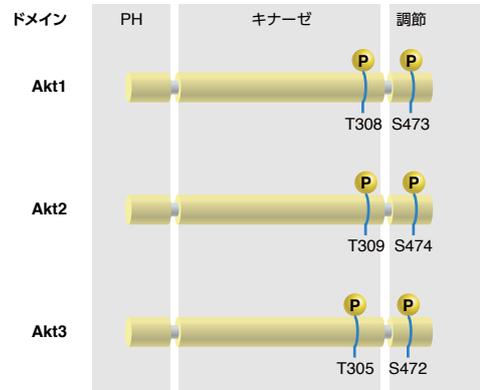


図3.7. Aktの哺乳類アイソフォーム Akt1およびAkt2は身体の大部分の組織において普遍的に発現するのに対し、Akt3は神経組織および精巣において選択的に発現します。Akt1およびAkt2はさまざまな組織に発生するがんに関連します。メラニン細胞は、神経堤細胞に由来し、Akt3はメラノーマで高発現しています。

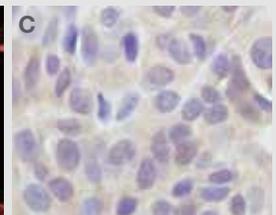
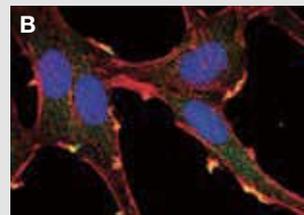
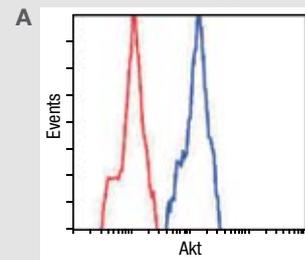
当社は、Aktを検出するための幅広い抗体および試薬を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。  
[www.thermofisher.com/AKT-Signaling](http://www.thermofisher.com/AKT-Signaling)

詳細な技術プロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。

### AKT1 + AKT2 + AKT3 Rabbit Monoclonal Antibody (E.32.10)

製品番号 MA5-14999

アプリケーション: WB, IF, IHC (P), FC, IP, ChIP



AKT1 + AKT2 + AKT3に対する抗体を使用して以下の解析を実施。  
 (A) フローサイトメトリー解析における未処理Jurkat細胞（青色）と非特異的ネガティブコントロール（赤色）の比較。

(B) 抗pan Akt抗体（緑色）を使用して細胞染色したHeLa（不死化ヒト子宮頸がん）細胞の免疫蛍光分析。アクチンフィラメントは赤色蛍光ファロイジンで標識。DNAは青色蛍光色素で標識。(C) パラフィン包埋したヒトメラノーマの免疫組織化学分析。

### がんにおけるAktの役割

PTENの機能不全はAktの制御不能な活性化に密接に関係しており、腫瘍細胞増殖につながります。活性化されたAktは、アポトーシス、遺伝子転写、細胞周期進行、および細胞代謝の制御因子を含む腫瘍の発生に関連するプロセスを制御する下流のシグナル伝達基質を標的とします。Aktの基質となる分子は50種類以上知られており、細胞増殖の制御に関与する直接的なAkt基質にはMDM2、p21、およびp27が含まれます(図3.8)。<sup>22</sup>

Aktアイソフォームに影響する増殖および活性化変異は、複数のタイプのヒトがんにおいて同定されてきました。そのため、Aktシグナル伝達経路、ならびに下流経路における調節不全は多くのがんのホールマークの1つであり、Aktは抗がん剤および治療法の開発のための重要な標的となっています。<sup>3</sup>

#### Akt変異を持つヒトがん

- 髄膜
- 皮膚
- 乳房
- 肺
- 子宮内膜
- 卵巣
- 尿路
- 造血器およびリンパ系
- 甲状腺
- 腎臓

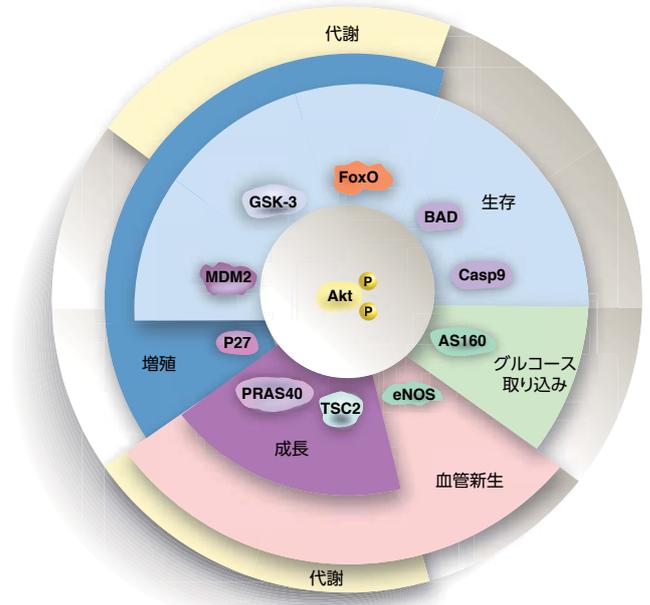


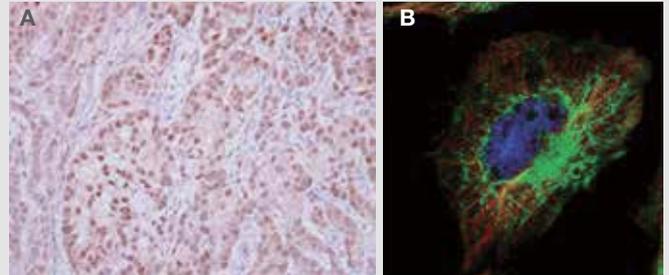
図3.8. Aktの分子標的 代表的なAkt基質および関連する細胞機能

### MDM2 Rabbit Polyclonal Antibody.

製品番号 PA5-27237

アプリケーション: IHC (P)、IF

E3ユビキチン-タンパク質リガーゼのマウス二重微小染色体2ホモログ (MDM2) は、MDM2遺伝子によってコードされ、がん遺伝子として機能します。このタンパク質はAktの直接的な基質で、細胞増殖を制御します。AktによるMDM2のリン酸化は、腫瘍抑制因子遺伝子TP53のユビキチン化および分解を誘導します。<sup>23</sup>



MDM2に対する抗体を使用した、(A) パラフィン包埋したA549 (ヒト肺がん) 異種移植片の免疫組織化学分析。(B) 抗MDM2抗体 (緑色) を使用して染色した、パラホルムアルデヒド固定HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞の免疫蛍光分析。αチューブリンフィラメントは赤色、核は青色で標識。

# 哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR)

## mTORの構造、機能および調節

ラパマイシン—抗真菌性抗生物質でTリンパ球活性の強力な阻害剤—に関する研究は、mTORの発見およびシグナル伝達経路の解明につながります。<sup>24-26</sup> (図3.9および図3.10)。mTORは、PI3K関連プロテインキナーゼ (PIKK) ファミリーのメンバーで、血管拡張性失調症変異 (ATM)、DNA依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) および核酸の監視および修復プロセスに関連するいくつかの他のタンパク質が含まれます。mTORは、増殖因子経路のシグナルを伝播する機能を持ち、それによって細胞の成長、増殖、および生存をサポートします。さまざまながんにおいて、上方制御されているmTORシグナル伝達が検出されており、mTORを標的とする創薬努力が成功を収めています。<sup>27,28</sup> 現在、進行性腎細胞がん、ならびに乳房、膵臓、および他の器官の特定の固形がんに対する治療薬として、2つのmTOR阻害剤が医薬品規制機関に承認されています(表3.2)。

シロリムス

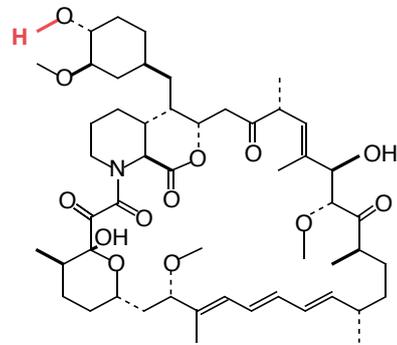


図3.9. ラパマイシン (シロリムス) の化学構造 本薬剤は、細菌種 *Streptomyces hygroscopicus* から最初に単離された、インターロイキン-2および免疫反応を制御する他のサイトカインの強力な阻害剤です。ラパマイシンは、移植片拒絶反応を抑制するために頻繁に処方されています。

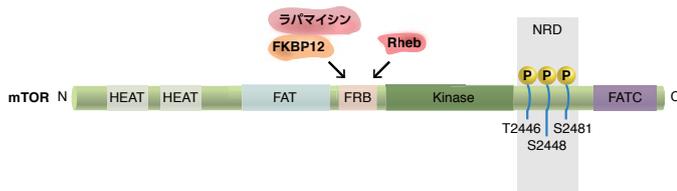


図3.10. mTORの構造 複数のドメインからなる巨大タンパク質 (2,549 aa, ~250 kD) で、N末端ドメインは複数のHEATリピート (Huntingtin, elongation factor 3, PP2A、およびTOR1の頭文字に由来) から構成されます。mTORは、Raptor (regulatory-associated protein with TOR) やRictor (rapamycin-insensitive companion of TOR) と相互作用し、複合体を形成します。mTOR触媒機能の活性化には、2つのFRAP (FKBP12-ラパマイシン関連タンパク質)/TOR)、ATM (毛細血管拡張性失調症変異)、TRRAP (トランス活性/形質転換ドメイン関連タンパク質) (FAT)ドメインが必要で、C末端側にあるFATドメインがFATCです。FKBP12-ラパマイシン結合 (FRB)ドメインには、FKBP12-ラパマイシン複合体が結合する他に、Raptorを含むmTORCメンバーも相互作用します。キナーゼ (KIN) ドメインおよび関連NRD領域にはセリン/スレオニン活性が存在します。

	mTORC1	mTORC2
構成要素	Raptor mTOR mLST8	Rictor Protor-1 mTOR mLST8 mSIN1
既知の基質	4E-BP1 S6K1	Akt PKC-α
生物学的プロセス	Cap依存性翻訳 リボソーム生合成 オートファジー 低酸素適応	増殖因子シグナル伝達/生存 細胞骨格再構築

図3.11. タンパク質RaptorおよびRictorは、それぞれ複合体mTORC1およびmTORC2のコアコンポーネントで、mTORシグナル伝達に不可欠です。

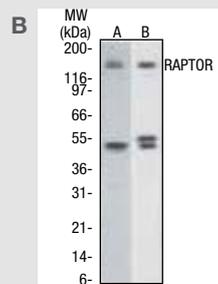
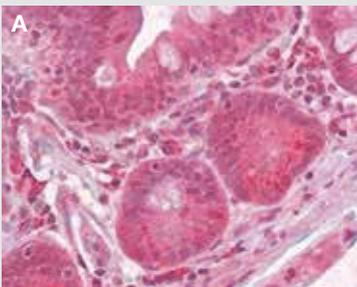
当社は、Raptor、Rictor およびmTORシグナル伝達経路のメディエーターを検出するための他のタンパク質を検出するための幅広い抗体および試薬を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

#### RAPTOR Rabbit Polyclonal Antibody

製品番号 PA1-41269

アプリケーション: IHC、WB

Raptorに対する抗体を使用した、(A) ヒト小腸組織の免疫組織化学分析なら



びに (B) (a) HEK293 (不死化ヒト胚腎臓) および (b) NIH/3T3 (不死化マウス線維芽細胞) の細胞ライセートにおけるRaptorのウェスタンブロット検出。

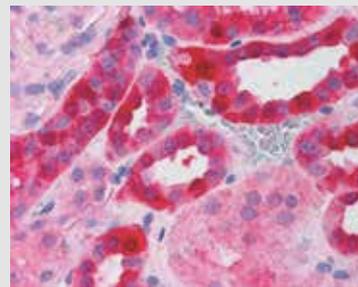
詳細な技術プロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。

#### RICTOR Goat Polyclonal Antibody

製品番号 PA5-18370

アプリケーション: IHC

Rictorに対する抗体を使用した、パラフィン包埋したヒト腎臓の免疫組織化学



分析。

# 哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR)

## mTORの機能および制御

PI3K/Akt経路の下流エフェクターであるmTORは、複合体を形成し、複数のメカニズムによって活性化されます。mTORは、mTORシグナル伝達の種々の側面を制御するさまざまな調節タンパク質のサブユニットと複合体を形成します(図3.9および3.10)。mTORは、2種類のタンパク質複合体mTORC1およびmTORC2のコア触媒ユニットです。mTORC1複合体は、ラパマイシン感受性で、mTOR、Raptor、およびmLST8から構成されます。mTORC1は、翻訳抑制因子4E-BP1およびリボソームタンパク質S6キナーゼ(S6K)の両方をリン酸化することによって、細胞の成長および増殖を制御します。翻訳、リボソーム生成、オートファジー、グルコース代謝、低酸素に対する細胞反応、および転移などのさまざまな腫瘍細胞特異的なプロセスを含むその他の生物学的プロセスもmTORC1によって制御されます。<sup>30</sup> mTORC2複合体は、ラパマイシン抵抗性で、mTOR、Rictor、mLST8、およびmSin1から構成されます。mTORC2複合体は、複数のタンパク質—S473上のセリンおよびスレオニンキナーゼAkt、血清グルココルチコイド調節キナーゼ1(SGK1)、ならびにプロテインキナーゼC α(PKCα)—をリン酸化します。mTORC2は、細胞の生存および増殖を制御するために機能します(図3.12)。<sup>27</sup>

これらのシグナル伝達経路について詳細に理解することによって、腫瘍進行に関連するキーマediatorを標的として阻害する薬剤の合理的な医薬品開発が可能となりました。<sup>31</sup> 例えば、VEGF、PDGFR、EGF、およびPI3K/Akt/mTOR経路を活性化する多くの他の経路を介するシグナル伝達を制限するチロシンキナーゼ受容体阻害剤が開発されてきました(表2.1)。同様に、mTORシグナル伝達を直接阻害する薬剤が腎細胞がんおよび他の固形腫瘍患者に対する治療薬として開発され、承認されています。

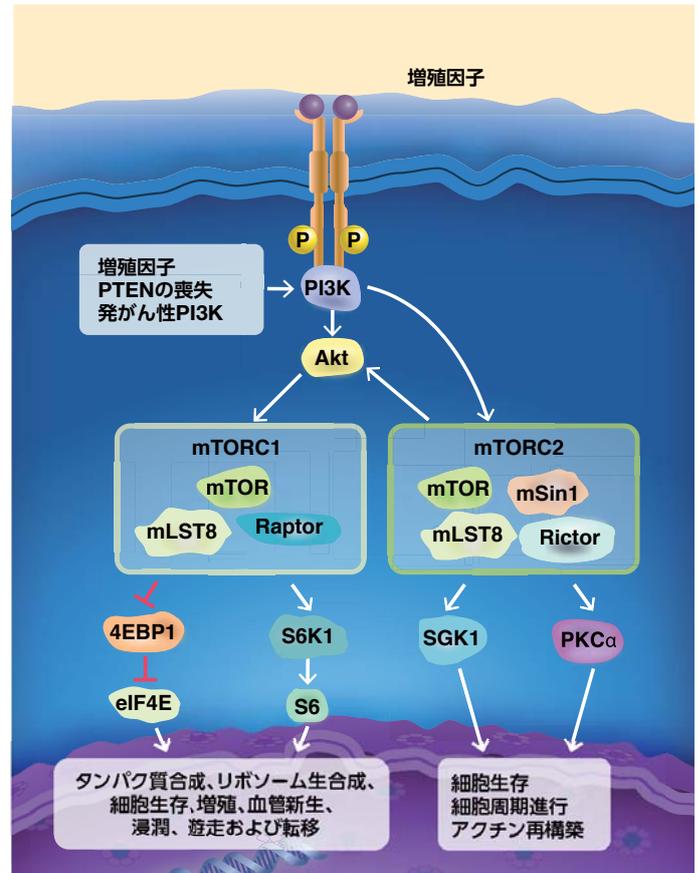


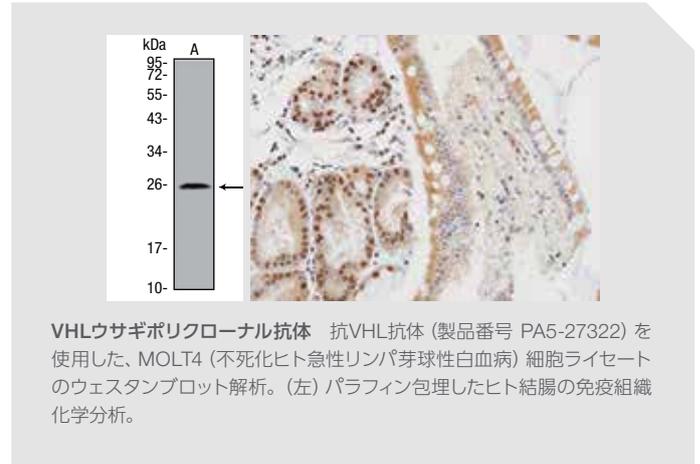
図3.12. mTOR複合体のmTORC1およびmTORC2は、細胞維持の大きく異なる側面を調節 増殖因子、PTEN喪失、または体細胞変異によって活性化したPI3Kは、AktおよびmTORC複合体の活性化に寄与します。



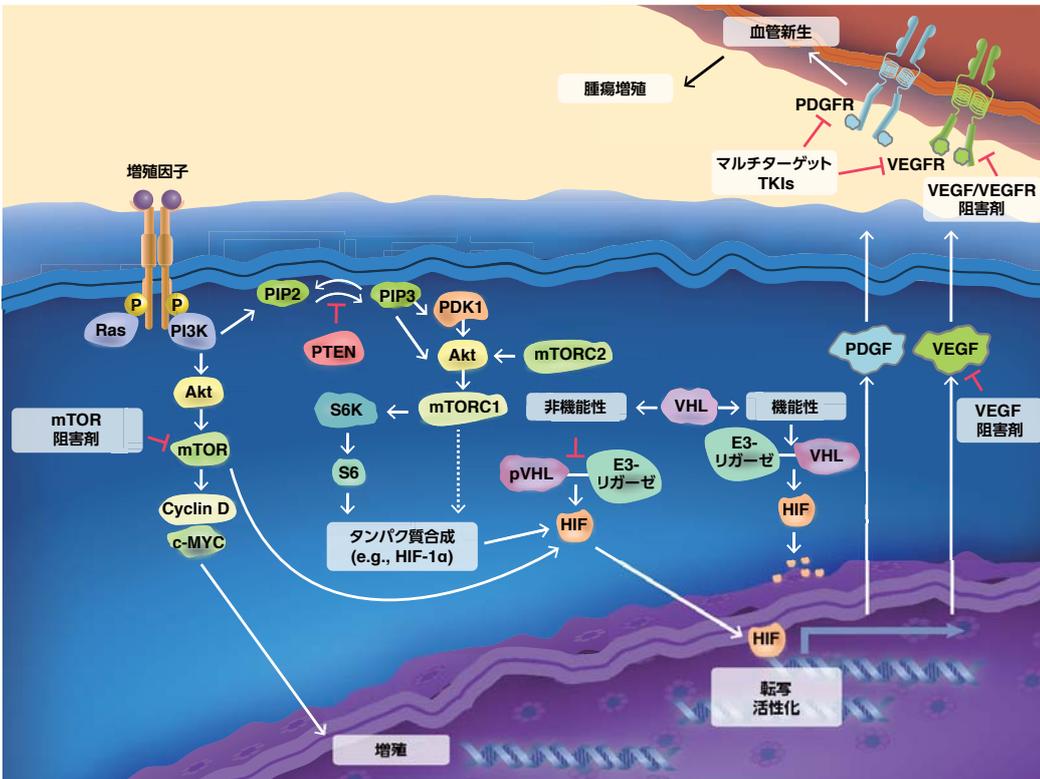
# がんにおけるmTORの役割

## mTORの阻害

増殖因子経路はmTORによって活性化される他に、低酸素状態およびアミノ酸の低レベル状態によって開始されます(図3.12)。<sup>32,33</sup> 低酸素状態の持続は生命に関わる可能性があり、がん細胞は酸素正常状態を維持するための生存戦略に対応しています。転写因子の低酸素誘導因子1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )は、血管新生の主要な制御因子で、低酸素に対する細胞反応に必要とされます。PI3K/Akt/mTOR経路は、HIF-1遺伝子発現レベルを増大させ、低酸素条件下での腫瘍細胞増殖に対する生存シグナルを伝達します。VHL遺伝子は、HIF-1 $\alpha$ の分解に必要とされるフォンヒッペル・リンドウ腫瘍抑制因子をコードします。低酸素条件下において、HIF-1 $\alpha$ はVEGF、PDGF、および血管新生を媒介する他のタンパク質を制御する遺伝子の転写を促進します。HIF-1 $\alpha$ 、mTOR、および関連する調節タンパク質の発現は、腫瘍細胞が低酸素状態に対応し、克服することを可能とします。<sup>34</sup> 低酸素は血管新生の強力なインデューサーであるため、HIF-1 $\alpha$ の制御因子であるTORは医薬品開発の標的となります。現在、2種類のmTOR阻害剤—いずれもrapalogs (ラパマイシンのアナログ)—が固形腫瘍に対する抗血管新生療法への使用について承認されています(表3.2)。<sup>28</sup>



フォンヒッペル・リンドウ症候群は、VHL遺伝子における生殖細胞系列変異によって引き起こされる家族性がん症候群です。本症候群は、特定のタイプの悪性腫瘍および良性腫瘍を発現するリスクを増加させます。VHLの孤発性変異は、腎臓のさまざまながんにも関連します。<sup>37</sup> この遺伝子にコードされるタンパク質は、ユビキチンリガーゼE3活性を持ち、エロンギンB、エロンギンC、およびカリン-2のタンパク質を含む複合体を形成します。VHLタンパク質は、低酸素状態で生じる特定の細胞反応を制御する転写因子である低酸素誘導因子(HIF)のユビキチン化および分解に必要とされます。<sup>38</sup>



**図3.13. mTORシグナル伝達カスケード** PI3K/Akt/mTOR経路の増殖因子誘導性アームを介するシグナル伝播は、最終的に細胞増殖を誘導します。低酸素または低栄養条件下で、本経路はVHL、HIF-1、および広範なmTOR経路メディエーターの協調的制御を介して血管新生プロセスを活性化します。血管新生阻害剤は、mTOR、VEGF、PDGF、および腫瘍関連血管形成に関与する他の増殖因子シグナル伝達経路を妨害します。mTOR阻害剤は、血管新生阻害効果の他に、腫瘍細胞における直接的な抗増殖効果を持つ可能性が前臨床試験において示されています。

表3.2. 悪性腫瘍治療薬として米国FDAで承認されたmTOR阻害剤

mTOR阻害剤	がん	FDA承認年
テムシロリムス <sup>35</sup>	進行性腎細胞がん	2007
エベロリムス <sup>36</sup>	進行性腎細胞がん	2009
	膵神経内分泌腫瘍	2011
	進行性エストロゲン受容体陽性、HER2陰性乳がん	2012
	結節性硬化症に伴う小児上衣下巨細胞性星状細胞腫 (SEGA)	2012

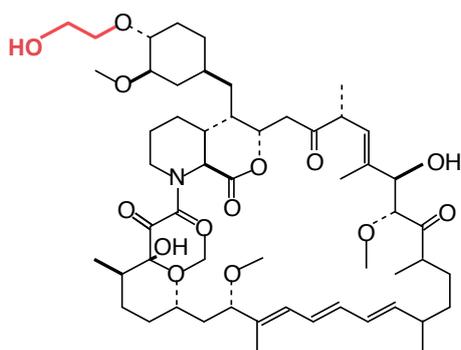
mTOR阻害剤ががん治療薬として現在承認されている部位以外にも、他の身体領域の組織においてmTORシグナル伝達に影響を及ぼす変異が検出されています。<sup>3</sup>

### mTOR変異を持つヒトがん

- 子宮内膜
- 腎臓
- 結腸直腸
- 肺
- 皮膚
- 食道
- 上気道
- 尿路
- 乳房
- 卵巣
- 造血器およびリンパ系
- 肝臓
- 膵臓
- 脳

PI3K/Akt/mTOR調節と他の経路間のクロストークを制御するプロセスを解明することによって、医薬品規制当局に承認される、さまざまながんを治療標的としたmTOR阻害剤を合理的に開発することが可能となりました。第一世代のmTOR阻害剤は、特定の条件下で有効性を示しますが、主としてmTORC1媒介性プロセスを阻害します。両方のmTORC複合体を標的とする第二世代の阻害剤は、開発中で、腫瘍誘導性Akt/mTORプロセスをブロックする効果がより高いと考えられます。<sup>39</sup>

エベロリムス



テムシロリムス

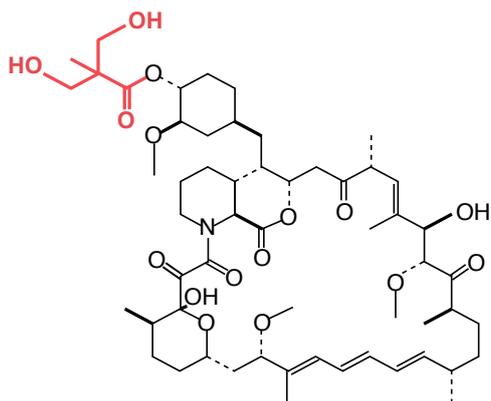


図3.14. テムシロリムスおよびエベロリムスの化学構造

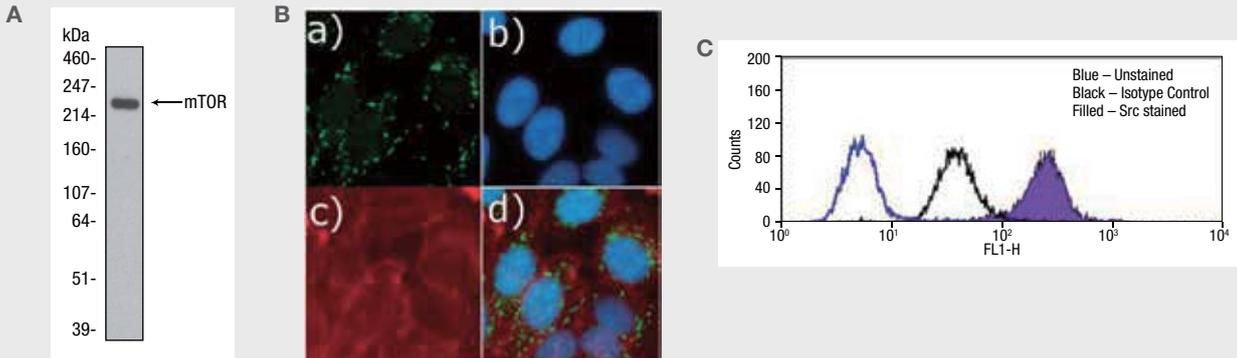
当社は、mTOR経路を検出するための幅広い抗体および試薬を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。

[www.thermofisher.com/mTOR-Signaling](http://www.thermofisher.com/mTOR-Signaling)

### mTOR Rabbit Monoclonal Antibody (7H13L18) ABfinity™ Recombinant

製品番号 701483

アプリケーション: WB、ICC、FC



mTORに対する抗体を使用した、(A) HEK293 (不死化ヒト胚腎臓) 細胞抽出物におけるmTORのウェスタンブロット解析、(B) HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞におけるmTORの免疫細胞化学分析において、細胞をさらにAlexa Fluor™ 488標識ヤギ抗ウサギ二次抗体で染色して検出(a); 核をDAPIで染色(b); アクチンをAlexa Fluor™ 594 ファロイジンで染色(c); 細胞質および核局在を示す重ね合わせ画像(d)、(C) フローサイトメトリー解析における抗mTOR抗体標識HeLa細胞 (塗りつぶし) と非染色細胞 (青) およびアイソタイプコントロール (黒) との比較。

詳細な技術プロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。

- Frumand DA, Rommel C (2014) PI3K and Cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 13(2):140–156.
- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 11(1–2):32–50.
- Polivka J Jr, Janku F (2014) Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Pharmacol Ther* 142(2):164–175.
- National Library of Medicine (US), Genetics Home Reference website (2012) *Cowden syndrome*. <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/cowden-syndrome>
- Stryer, L (1995) *Biochemistry* 4th ed, New York (NY): WH Freeman and Company, pp 265 and 344.
- Rommel C, Camps M, Ji H (2007) PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* 7(3):191–201.
- Grabon A, Khan D, Bankaitis VA (2015) Phosphatidylinositol transfer proteins and instructive regulation of lipid kinase biology. *Biochim Biophys Acta* 1851(6):724–735.
- Koyasu S (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4(4):313–319.
- Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P (2012) PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3):195–203.
- Dorsam RT, Gutkind SJ (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7(2):79–94.
- Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, Hochhaus A (2014) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Haematologica* 99(1):7–18.
- Karakas B, Bachman KE, Park BH (2006) Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 94(4):455–459.
- Song MS, Salmena L, Pandolfi PP (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(5):283–296.
- Gu J, Tamura M, Pankov R et al. (1999) Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 146(2):389–403.
- National Library of Medicine (US), Genetics Home Reference website (2012) *Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome*. <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/bannayan-riley-ruvalcaba-syndrome>
- Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G et al. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in the activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360(6405):689–692.
- National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information website, gene database (2015) SHC1 SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 [*Homo sapiens* (human)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6464>
- Davies MA (2011) Regulation, role, and targeting of Akt in cancer. *J Clin Oncol* 29(35):4715–4717.
- Arencibia JM, Pastor-Flores D, Bauer AF et al. (2013) AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1834(7):1302–1321.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9(1):59–71.
- Riaz A, Zeller KS, Johansson S (2012) Receptor-specific mechanisms regulate phosphorylation of AKT at Ser473: role of RICTOR in  $\beta$ 1 integrin-mediated cell survival. *PLoS One* 7(2):e32081.
- Crowell JA, Steele VE, Fay JR (2007) Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 6(8):2139–2148.
- Ogawara Y, Kishishita S, Obata T et al (2002) Akt enhance Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 277(24):21843–21850.
- Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28(10):721–726.
- Sehgal SN (2003) Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanisms of action. *Transplant Proc* 35(3 Suppl):7S–14S.
- Hoeffler CA, Klann E (2010) mTOR Signaling: at the crossroads of plasticity, memory, and disease. *Trends Neurosci* 33(2):67–75.
- Ballou LM, Lin RZ (2008) Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol* 1(1–4): 27–36.
- Houghton PJ (2010) Everolimus. *Clin Cancer Res* 16(5):1368–1372.
- Carracedo A, Pandolfi PP (2008) The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27(41):5527–5541.
- Lu M, Wang J, Ives HE, Pearce D (2011) mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 286(35):30647–30654.
- Furman DA, Rommel C (2014) PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 13(2):140–156.
- Serova M, de Gramont A, Tijeras-Raballand A et al. (2013) Benchmarking effects of mTOR, PI3K, and dual PI3K/mTOR inhibitors in hepatocellular and renal cell carcinoma models developing resistance to sunitinib and sorafenib. *Cancer Chemother Pharmacol* 71(5):1297–1307.
- Nishikawa T, Takaoka M, Ohara T et al. (2013) Antiproliferative effect of a novel mTOR inhibitor temsirolimus contributes to the prolonged survival of orthotopic esophageal cancer-bearing mice. *Cancer Biol Ther* 14(3):230–236.
- Harris AL (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2(1):38–47.
- Pfizer Laboratories (2014) *Torisel (temsirolimus) prescribing information*. <http://labeling.pfizer.com/showlabeling.aspx?id=490>
- Novartis (2015) *Afinitor (everolimus) prescribing information*. <https://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/afinitor.pdf>
- Neumann HP, Zbar B (1997) Renal cysts, renal cancer and von Hippel-Lindau disease. *Kidney Int* 51(1):16–26.
- Ivan M, Kondo K, Yang H et al. (2001) HIF1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 292(5516):464–468.
- Zhang YJ, Duan Y, Zheng XF (2011) Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discov Today* 16(7–8):325–331.

詳細はこちら [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

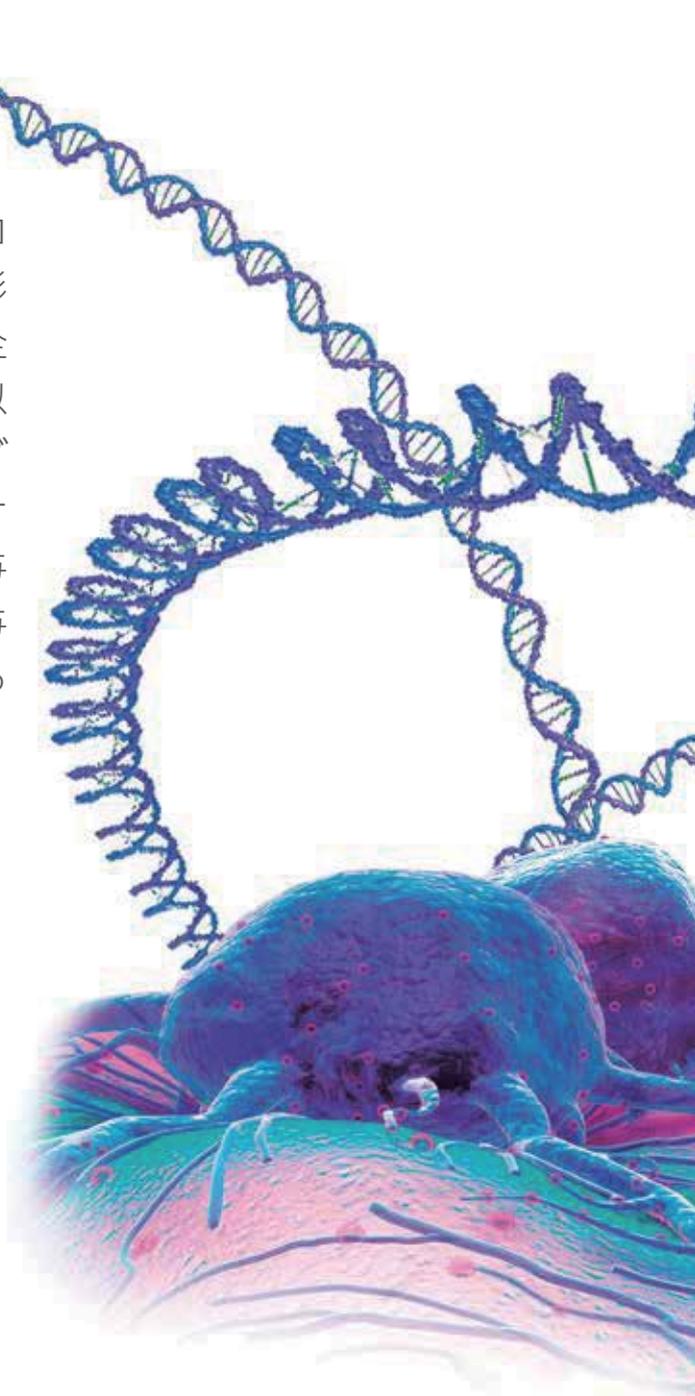
All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. DRAQ5 is a trademark of Biostatus Limited.

# Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) シグナル伝達経路

# 4

## イントロダクション

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) カスケードは、細胞増殖、成長、分化、形質転換およびアポトーシスなどの多種多様な細胞プロセスを制御する複雑なシグナル伝達ネットワークを形成します。MAPK経路のキーマediatorの調節不全は、腫瘍形成のドライバーとして関与し、がん細胞に以下の能力—マイトジェンシグナルからの独立、増殖シグナル伝達の維持、アポトーシス回避能力、抗増殖シグナルに対する感受性、転移能、および血管新生能—を付与します。MAPK経路の変異が腫瘍促進プロセスに寄与しているという仮定のもと、本経路の阻害剤を開発するための研究に多くの力が注がれています。



## 目次

概要：MAPKシグナル伝達	4-2	Ras/Raf/MEK/ERKシグナル伝達の阻害剤	4-8
Ras/Raf/MEK/ERK経路の調節	4-4	参考文献	4-12
がんにおけるRas/Raf/MEK/ERK経路の役割	4-5		

## 概要：MAPKシグナル伝達

### 主要なMAPK経路の構築

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) シグナル伝達のノードは、酵母からヒトにいたる真核生物における増殖、細胞分裂、代謝、運動性、自然免疫、細胞ストレス反応、アポトーシス、および生存機能を含む極めて重要な細胞機能を制御、微調整するための細胞外刺激を伝達し、調節します。MAPK経路には、4種類の主要な分岐経路、および十数種類のMAPK酵素の存在が知られており、少なくとも7種類の異なるグループに分類されます (図4.1)。

1-3

ERK経路は典型的に増殖シグナル伝達に関する増殖因子によって誘導されるのに対し、JNK、p38、およびERK5経路は主にアポトーシス、増殖阻害、自然免疫、および細胞ストレス反応関連の刺激によって活性化します。これらのそれぞれの古典的MAPKカスケードは、二重特異性セリン/スレオニンプロテインキナーゼ (MAPK、MAPK活性化因子 (MEK、MKK、またはMAPK キナーゼ)、ならびにMEK活性化因子 (MEKキナーゼ [MEKK]またはMAPKキナーゼキナーゼ) を介する3種類のプロテインキナーゼによる連続的な活性化を特徴とします。古典的MAPK経路の活性化は細胞膜において開始され、そこで低分子量GTPアーゼおよびさまざまなプロテインキナーゼによってMAPKKKがリン酸化されることで活性化されます。続いて、MAPKKKによってMAPKKが直接リン酸化され、活性化されたMAPKKはMAPKをリン酸化します。活性化されたMAPKは、多数の細胞質内基質と相互作用してリン酸化を行い、最終的に状況特異的な遺伝子発現を誘導する転写因子を調節します。この結果、次々に多様な生物学的反応、例えば、浸透圧ショック、細胞周期進行、あるいはインターフェロン産生の誘導が生じます。<sup>3,4</sup>

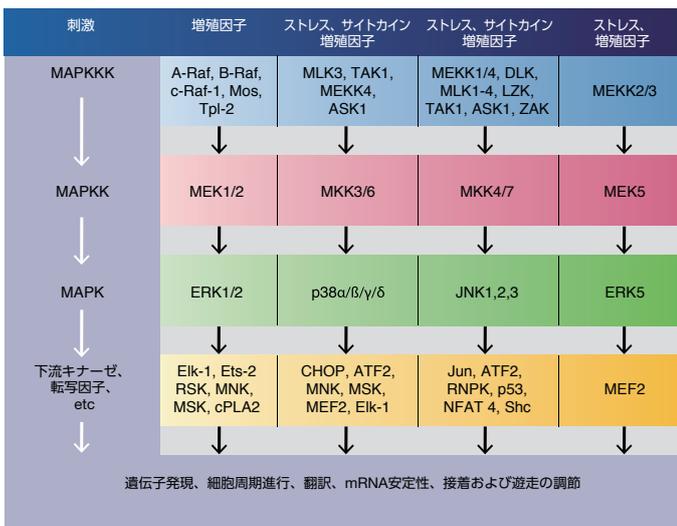
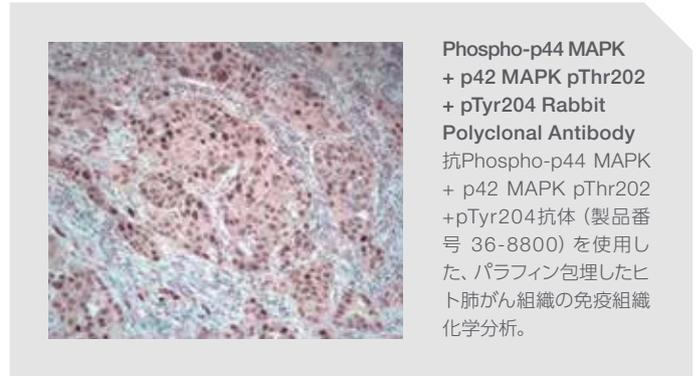
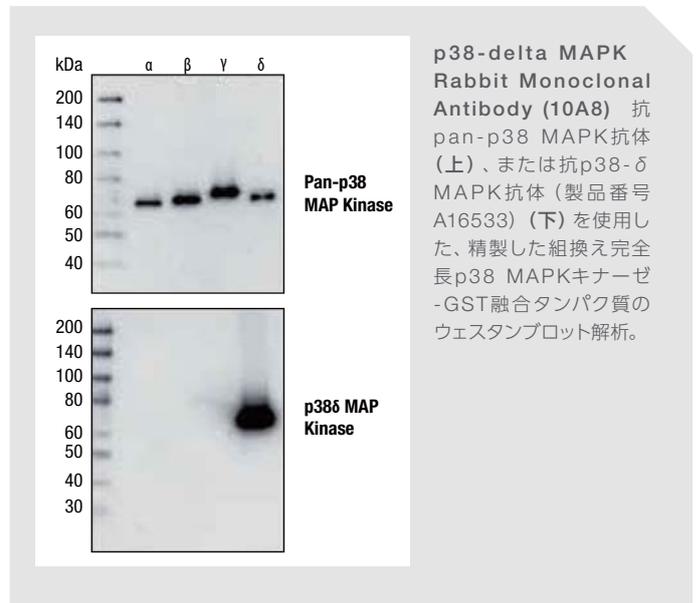


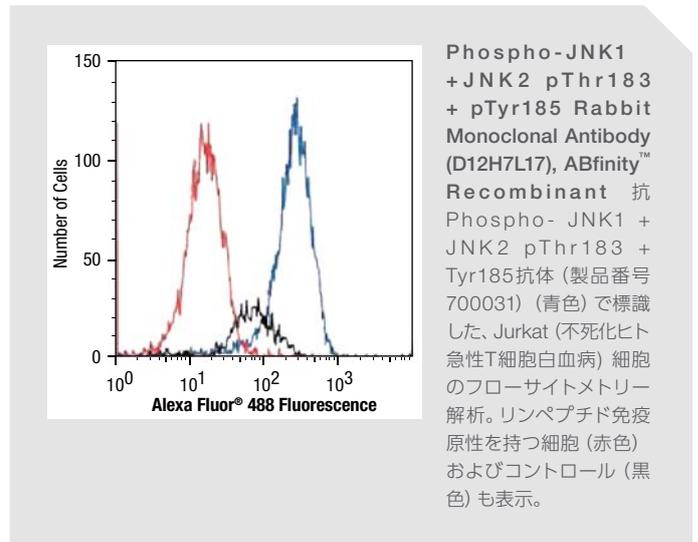
図4.1 哺乳類のMAPKシグナル伝達カスケード タンパク質アレイは、ERK、p38、JNK、およびERK5を含む4種類の主要なMARKカスケードから構成されます。ERK経路は増殖因子によってシグナル伝達が開始されるのに対し、JNK、p38、およびERK5経路はサイトカイン、環境ストレス (浸透圧ショックや電離放射線など)、および他の刺激によって活性化されます。<sup>1</sup> がん、免疫障害、および神経変性疾患におけるMAPK経路の役割については十分理解されています。



Phospho-p44 MAPK + p42 MAPK pThr202 + pTyr204 Rabbit Polyclonal Antibody 抗Phospho-p44 MAPK + p42 MAPK pThr202 + pTyr204抗体 (製品番号 36-8800) を使用した、パラフィン包埋したヒト肺がん組織の免疫組織化学分析。



p38-delta MAPK Rabbit Monoclonal Antibody (10A8) 抗 pan-p38 MAPK抗体 (上)、または抗p38-δ MAPK抗体 (製品番号 A16533) (下) を使用した、精製した組換え完全長p38 MAPKキナーゼ-GST融合タンパク質のウェスタンブロット解析。



Phospho-JNK1 + JNK2 pThr183 + pTyr185 Rabbit Monoclonal Antibody (D12H7L17), ABfinity™ Recombinant 抗 Phospho- JNK1 + JNK2 pThr183 + Tyr185抗体 (製品番号 700031) (青色) で標識した、Jurkat (不死性ヒト急性T細胞白血病) 細胞のフローサイトメトリー解析。リンペプチド免疫原性を持つ細胞 (赤色) およびコントロール (黒色) も表示。

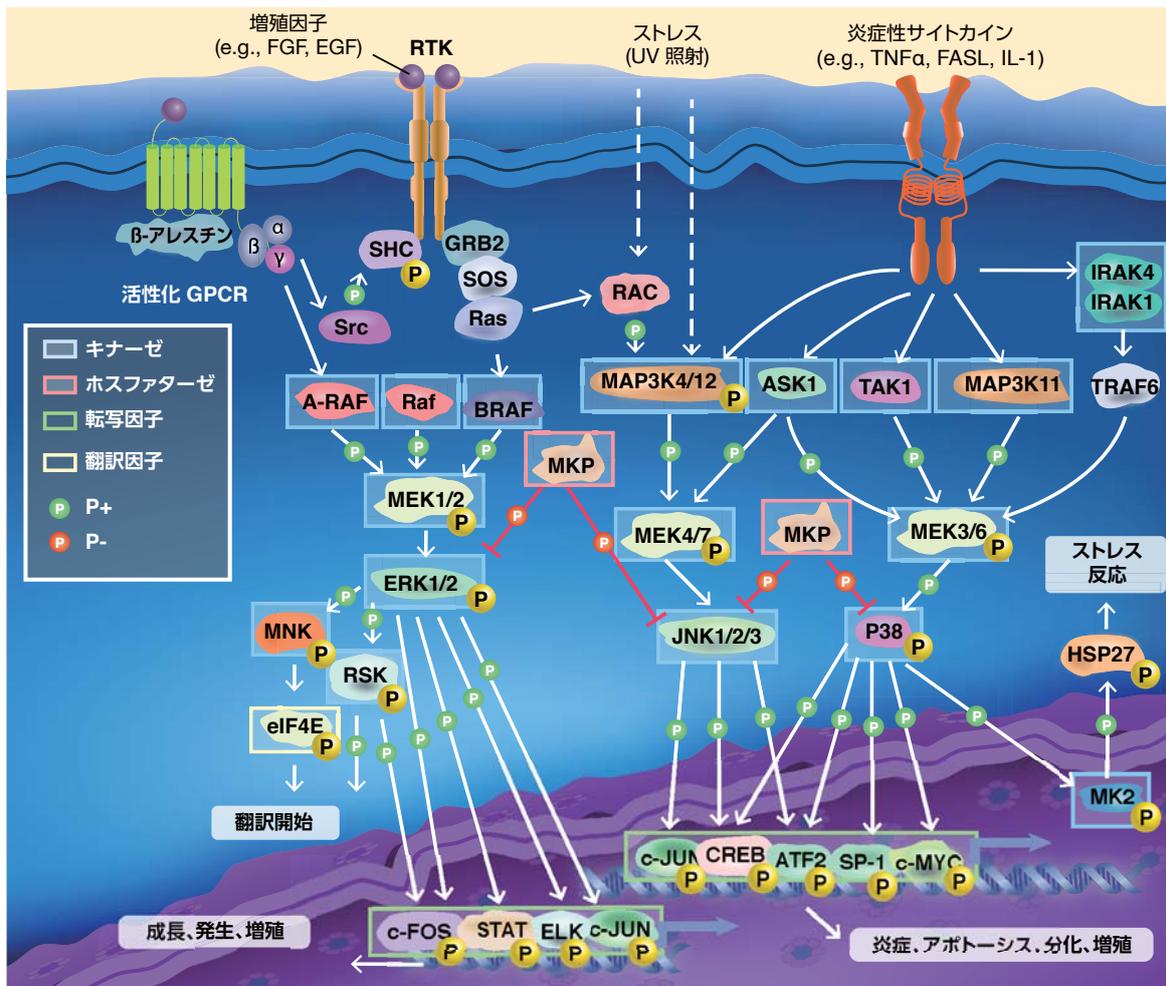
## MAPK経路の複雑性

MAPKシグナル伝達カスケードは、シンプルで直線的で一方方向性のプロテインキナーゼ群として表されますが、その経路は非常に複雑です。MAPKカスケードおよび他のシグナル伝達ネットワークの中には、程度の大きいクロストークが存在します。例えば、MAPK、PI3Kネットワーク、NFκB、およびJAK-STAT経路のメディ

エーター間の相互作用については十分に立証されています。<sup>17</sup>

当社が提供しているMAPKシグナル伝達カスケードについての実験ツールに関する詳しい情報はこちらをご覧ください。

[www.thermofisher.com/mapk](http://www.thermofisher.com/mapk)



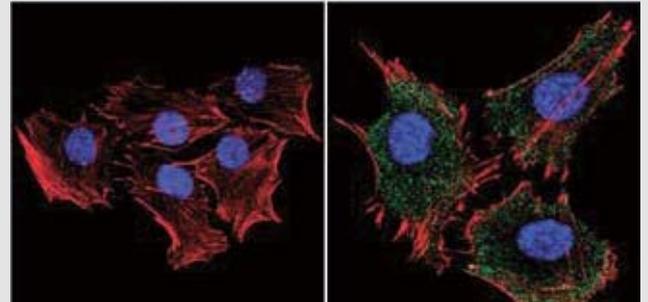
**図4.2. MAPK経路** 4種類の主要なMAPKカスケード—ERK、p38、JNK、およびERK5—については、過去25年にわたって明らかにされ、十分に特徴づけられてきました。これらのカスケードの命名には、関連するコタンパク質（コンポーネント）（例 Raf/MEK/ERK）が反映されています。これらのシグナル伝達経路の一部は、その系列の階層におけるカスケード特異的なキナーゼの活性化につながる複数のリン酸化イベントの活性化を介して機能します。これらのカスケードは、細胞外シグナルの応答、増幅、およびバランスの調節と連携して機能し、細胞の増殖、分化、生存、発生、ストレス反応、およびアポトーシスなど、広範囲の異なる、それらはしばしば相反する生物学的プロセスを制御することを可能にします。関連キナーゼが別々のグループに分類されながら、モジュールは相互に関係した状態で存在することは、一つのメカニズムであり、これによって、カスケードにおいて開始刺激に対する適切な反応が提供されます。MAPK経路は、選択的スプライシングアイソフォームをコードする少なくとも70種類の遺伝子から構成され、幅広い多様なタンパク質によってMAPK関連機能が調節されています。<sup>5</sup> MAPKシグナル伝達は、特定のセリン残基、スレオニン残基、およびチロシン残基においてMAPKを脱リン酸化するMAPKホスファターゼ（MKP）に媒介されるネガティブフィードバックによるコントロールを介してさらに調節されています。<sup>6</sup>

# Ras/Raf/MEK/ERK経路の調節

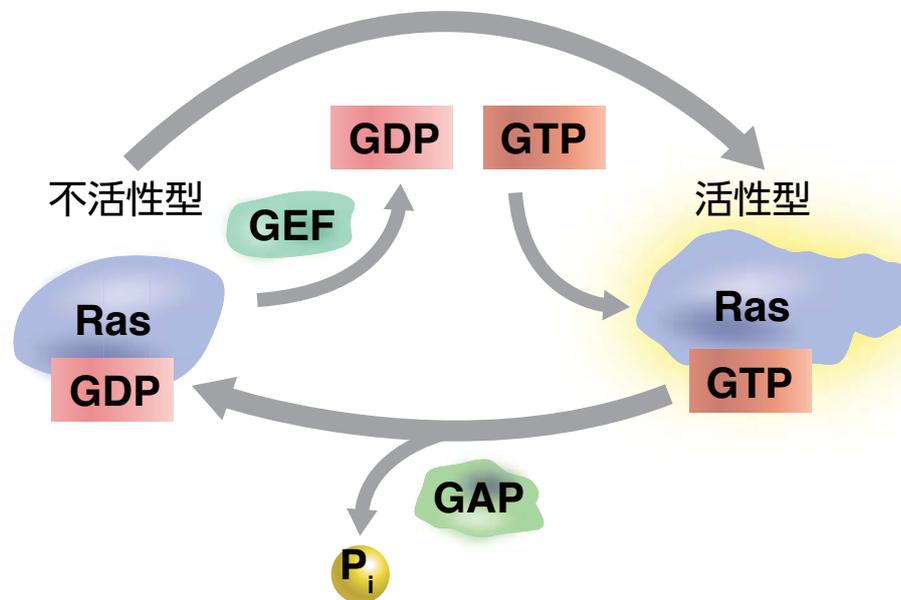
## Ras活性化

Rasタンパク質は、HRAS、KRASおよびNRASの3種類のアイソタイプが発見されており、細胞周期進行、細胞移動、アポトーシス、老化、および他の生体機能に關与する多くのシグナル伝達経路に關連する低分子量グアノシントリホスファターゼ (GTPアーゼ) です。Ras活性化の簡単な説明図を図4.3に示します。<sup>8,9-10</sup> SRCは最初のがん遺伝子として同定されていますが、Rasは最初の人がん遺伝子として同定されています。また、Rasファミリーメンバーにおける変異はヒト腫瘍の約30%において検出されています。<sup>11-13</sup>

多数の細胞表面分子によりRasタンパク質が活性化されると、がんにおける役割が明確となっているRasの主要なエフェクター経路であるRaf/MEK/ERKなどのMAPKカスケードが次々に活性化されます。PI3K/Akt/mTOR経路は、Ras依存性およびRas非依存性のメカニズムによって活性化され、増殖因子およびGタンパク質共役受容体のMAPK経路下流と収束点を共有します。<sup>11</sup> シグナル伝達イベントは、Raf、MEK、およびERK1/2 (MAPK1/3とも呼ばれる) を介して導入されるRasによって開始され、核まで伝達されます。そこで、FOS、MYC、ELK、および c-JUNなどの転写因子が制御されることで、細胞増殖および生存に必要な遺伝子発現が調節されます。(図4.2および図4.4)。<sup>6,11,14</sup>



**GTPase Activating Protein Mouse Monoclonal Antibody (B4F8)**  
抗GTPアーゼ活性化タンパク質抗体 (製品番号 MA4-001) (緑色) を使用したC2C12 (不死化マウス筋芽細胞) 細胞 (右) と一次抗体不使用のネガティブコントロール (左) の免疫蛍光分析における比較。細胞はThermo Scientific™ Dylight™ 488標識ヤギ抗マウスIgG (H+L) 二次抗体、F-アクチンはファロイジン (赤色) および核はDAPI (青色) で染色。



**図4.3. Ras活性化および不活性化** 低分子量GTPアーゼのRasスーパーファミリーのメンバーは、共通の保存された機構を持ちます。GTPアーゼは、不活性型のGDP結合状態と、活性型のGTP結合状態の切り替えを行います。グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) は、GDPをGTPと交換します。GTPアーゼ活性化タンパク質 (GAP)

は、GTPのGDPへの加水分解を触媒します。Ras 発がん性変異は、GAPによるGTPの加水分解を妨げ、Rasタンパク質の恒常的な活性化状態および持続的な増殖シグナル伝達を導きます。

# がんにおけるRas/Raf/MEK/ERK経路の役割

## Ras活性化のエフェクター

Ras変異は、血液腫瘍および固形腫瘍の両方において同定されています。NRASは、血液腫瘍およびメラノーマにおいて最も高頻度で変異が見られるアイソフォームであるのに対し、KRASは、結腸がんおよび肺がんにおいて高頻度で変異が見られます。完全には網羅していませんが、Ras変異を持つことが知られているヒトがんのリストを表4.1に示します。アイソフォーム特異的なRas変異の頻度および他のMAPK経路の遺伝子を図4.5に示します。これまでにRas阻害剤は開発されていませんが、下流のRas/Raf/MEK/ERKメディエーターについてはいくつかの阻害剤を開発することに成功しています。<sup>15-17</sup>

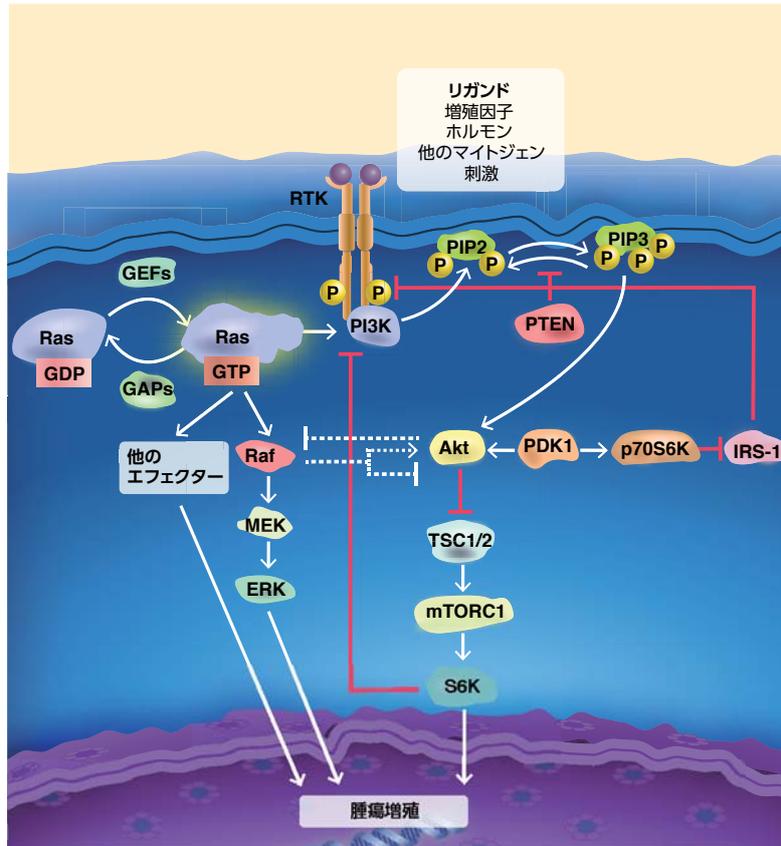


図4.4. Rasによって活性化されるカスケード Ras-GTPは、2つの主要なシグナル伝達カスケードであるRaf/MEK/ERKおよびPI3K/Akt/mTORを活性化します。これらのカスケードは、悪性細胞において高頻度で妨害されます。

表4.1. 選択されたヒトがんにおけるRas変異

がん種	全変異の頻度
膵臓	88%
結腸直腸	52%
多発性骨髄腫	43%
肺腺がん	32%
メラノーマ	28%
甲状腺	13%
胃	12%
乳房	2%

# がんにおけるRas/Raf/MEK/ERK経路の役割

# 4

当社は、*Ras*および他のがん遺伝子によってコードされるタンパク質を検出するための幅広い抗体を提供しています。広範な製品に関する詳しい情報はこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/ras](http://www.thermofisher.com/ras)

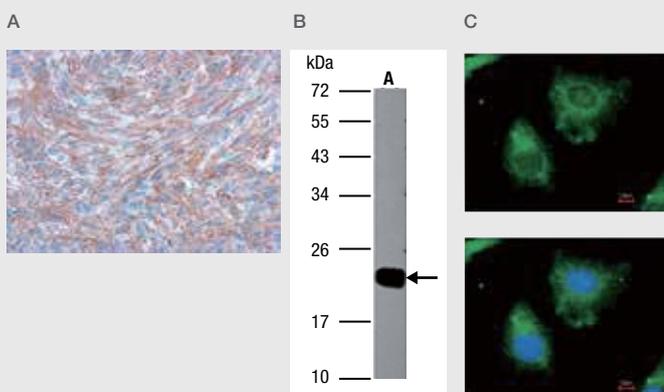
## KRAS Rabbit Polyclonal Antibody

製品番号 PA5-27234

アプリケーション: WB, IF, ICC, IHC (P), IP, ELISA

*Ras*がん遺伝子ファミリー（そのメンバーは哺乳類肉腫レトロウイルスのトランスフォーミング遺伝子に関係）は、膀胱がん、濾胞性甲状腺がん、および口腔扁平上皮がんなどのさまざまながんに関与しています。*Ras*変異は、コステロ症候群の原因でもあります。

詳細なプロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。



KRASに対する抗体を使用した、(A) パラフィン包埋したU373（不死化ヒト星状細胞腫）異種移植片の免疫組織化学分析。(B) KRAS変異型HCT116（ヒト不死化結腸直腸がん）細胞抽出物のウェスタンブロット解析。(C) HeLa（不死化ヒト子宮頸がん）細胞におけるRas（緑色）の免疫蛍光分析。核（青色）はHoechst™ 33342 Dyeで染色。

## Ras/Raf/MEK/ERKシグナル伝達の阻害剤

Rasシグナル伝達の下流エフェクターを阻害する薬剤が開発されつつあります。現在、3種類のRas/Raf/MEK/ERK経路阻害剤が医薬品規制機関に承認されています。2種類はBRAFを標的としませんが、このMAPKKKは活性型Rasタンパク質の直接的な基質として働きます。3番目の阻害剤は、BRAFの下流で機能するMEKを標的とします(図4.6および図4.7)。

BRAFがん原遺伝子は、ARAF、BRAF、およびCRAF (RAF1とも呼ばれる)の3種類のアイソフォームが知られるRafファミリーメンバーをコードします。これらの高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼは、MAPK [Ras/Raf/MEK/ERK] 経路のメディエーターです。Rafタンパク質は、上流キナーゼRasの基質、およびMEKの直接的な活性化因子として働きます。Rafの過剰活性化は増殖、分化、およびアポトーシスの調節不全につながり、発がん性Ras変異は種々のヒトがんにおいて同定されています。BRAFアイソフォームの変異は、悪性腫瘍—特に、メラノーマならびに甲状腺がんおよび結腸がんにおいて最も高頻度に認められますが、ARAFやCRASにも発がん性変異は生じます。<sup>18</sup>

2002年、一塩基のミスセンス置換(1,799位のヌクレオチドにおけるT→A)によって、BRAFのコドン600においてバリンがグルタミン酸に置換される(V600E)ことが研究者により報告されました。全BRAF変異の80%は高い発がん性を示します。BRAF変異の残りの20%は、V600の近くに位置するエキソンにおいてミスセンス変異が生じています。これらのBRAF変異は、BRAFキナーゼ活性を損なわせる、MAPK経路の持続的な活性化因子です(図4.5)。<sup>18,19</sup>

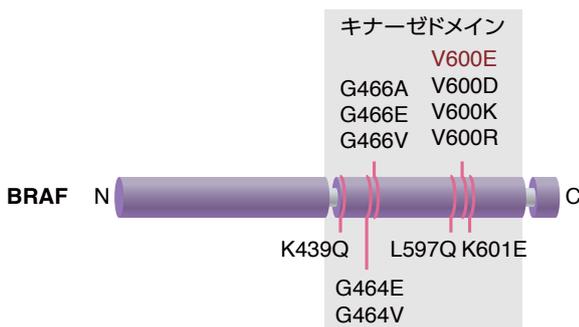


図4.5. BRAFタンパク質の図解 766アミノ酸から構成され、分子量が約84 kDのタンパク質。全ての変異がキナーゼドメインにおいて発現。

## BRAF阻害剤

RasおよびBRAFの変異はいずれも強い発がん性を示し、正常細胞における悪性形質転換を誘導することで知られています。Rasの低分子阻害剤については、これまでの臨床研究で進展がみられていませんが、2種類のBRAF阻害剤—ベムラフェニブおよびダブラフェニブ—については、現在、特定の型のメラノーマ患者を対象とした使用が可能となっています(図4.6)。

ベムラフェニブは2011年に、続いてダブラフェニブは2013年に、V600E変異を有する切除不能または転移性メラノーマに対する治療薬として承認されました。いずれのBRAF阻害剤も、野生型BRAFを有するメラノーマの治療には使用されません。<sup>20-23</sup>

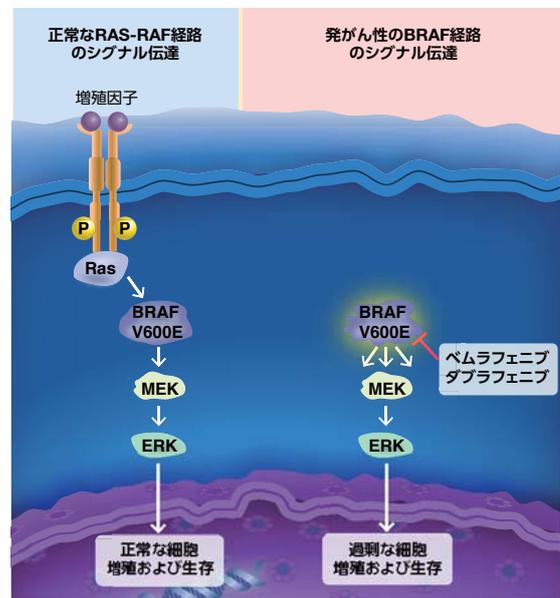
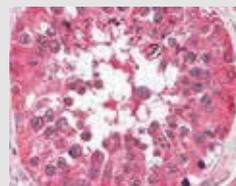
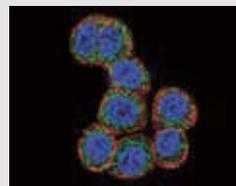


図4.6. BRAF阻害剤: ベムラフェニブおよびダブラフェニブ BRAFV600Eのキナーゼドメインを標的とする可逆的ATP競合阻害剤である、低分子BRAF阻害剤、ベムラフェニブおよびダブラフェニブの提唱されている作用機序の概略図。活性化されたBRAF変異を持つ細胞において、ダブラフェニブおよびベムラフェニブはともにMEK1/2のBRAFリン酸化を阻害し、過剰な腫瘍細胞増殖を抑制します。



BRAF Mouse Monoclonal Antibody (1H12F1, 1H12G10, 1F12F11C9)

抗BRAF抗体(製品番号 MA5-15317)を使用した、パラフィン包埋したヒト精巢の免疫組織化学分析。



RAF1 Rabbit Polyclonal Antibody

抗RAF1 (CRAF) 抗体(製品番号 PA5-14941)(緑色)で染色したHeLa(不死化ヒト子宮頸がん)細胞の免疫蛍光分析。アクチンフィラメントは蛍光ファロイジン(赤色)、核はDAPI(青色)で染色。

# Ras/Raf/MEK/ERKシグナル伝達の阻害剤

## BRAF Rabbit Polyclonal Antibody

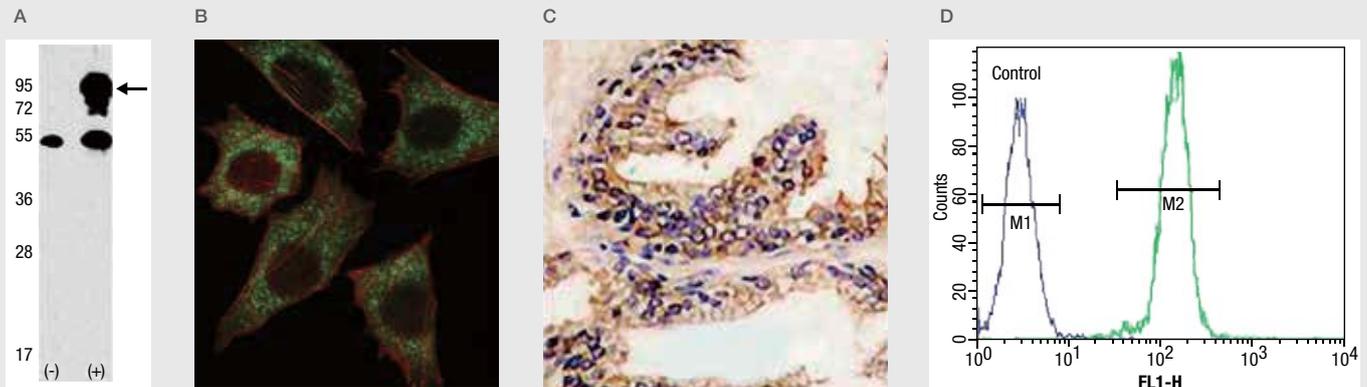
製品番号 PA5-14926

当社は、BRAFおよびセリン/スレオニンプロテインキナーゼのRafサブファミリーの他のメンバーを検出するための幅広い抗体を提供しています。製品に関する詳しい情報はこちらをご覧ください。

[www.thermofisher.com/raf](http://www.thermofisher.com/raf)

BRAFは、セリン/スレオニンプロテインキナーゼのRafサブファミリーのメンバーであり、細胞膜から核までのマイトジェンシグナル伝達に関与します。BRAFの異常は、肺がんおよび非ホジキンリンパ腫 (NHK) などの広範囲のがんに関与します。

詳細なプロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。



**BRAFに対する抗体**を使用した、(A) HEK293 (不死化ヒト胚腎臓) 細胞ライセートにおけるBRAFのウェスタンブロット検出。レーン1:トランスフェクションなし、レーン2: BRAF遺伝子を一過性トランスフェクション。(B) C2C12 (不死化マウス筋芽細胞) 細胞におけるBRAF (緑色) の免疫蛍光分析。

アクチンフィラメントはファロイジン (赤色) で標識。(C) ホルモン固定したパラフィン包埋ヒト前立腺がん組織の免疫組織化学分析。(D) HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞のフローサイトメトリー解析。蛍光抗BRAF抗体で染色した細胞 (緑色) およびコントロール細胞 (青色) を表示。

## MEK阻害

MAPKKs、MEK1およびMEK2は、ERK1およびERK2上のセリン残基およびスレオニン残基を選択的にリン酸化するキナーゼであり、Ras/Raf/MEK/ERKシグナル伝達カスケードの末端キナーゼです。いったん活性化されると、ERK1およびERK2は、細胞周期進行、分化、運動性、代謝、および血管新生などの幅広い細胞プロセスを調節している複数の基質-核および細胞質のリン酸化を触媒します。MEK1およびMEK2キナーゼ遺伝子に遺伝子変異が生じることは稀ですが、原発ヒト腫瘍の解析においてMEK活性の上方制御が頻繁に認められています。トラメチニブは、V600EまたはV600K BRAF変異陽性のメラノーマに対する阻害活性が示されているMEK阻害剤です (図4.7)。<sup>16,24-25</sup>

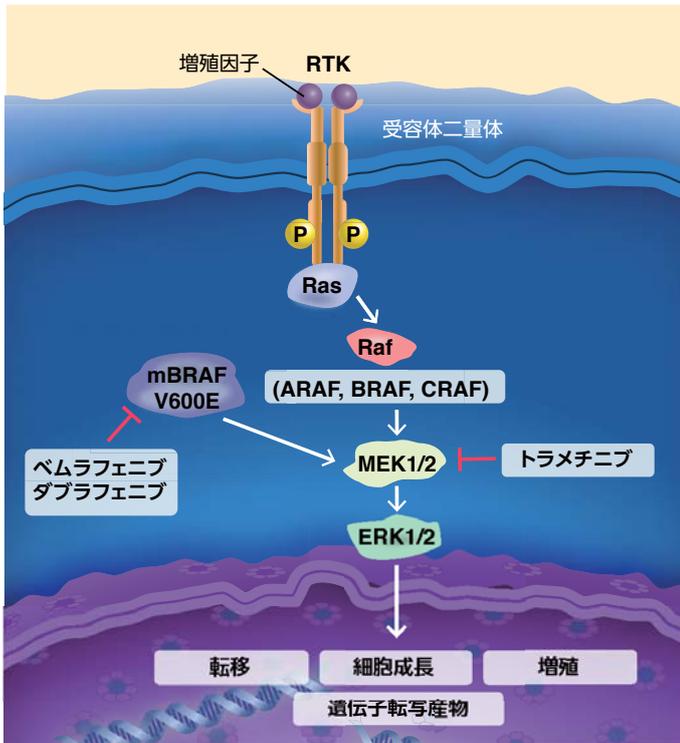


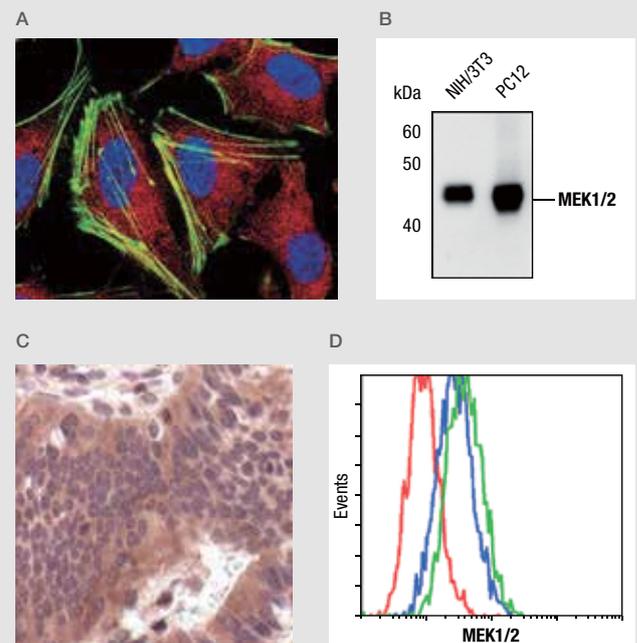
図4.7. MEK1およびMEK2の低分子による阻害の提唱されている作用機序  
MEK1およびMEK2の高選択的かつ可逆的なアロステリック阻害剤であるトラメチニブは、RAF依存性MEK1のニリン酸化を阻害し、MEK活性化を妨害することにより、腫瘍細胞増殖を減少させます。

当社は、MEK1/2および二重特異性プロテインキナーゼファミリーの他のメンバーを検出するための幅広い抗体を提供しています。広範な製品に関する詳しい情報についてはこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/mek](http://www.thermofisher.com/mek)

## MEK1 + MEK2 Mouse Monoclonal Antibody (J.653.9)

製品番号 MA5-15135

MEK1/2は、マイトジェン活性化プロテイン (MAP) キナーゼキナーゼとして機能する二重特異性プロテインキナーゼファミリーのメンバーです。MAPキナーゼは、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) としても知られ、複数の生化学的シグナルの統合ポイントとして作用します。これらのキナーゼは、MAPキナーゼシグナル伝達経路の必要不可欠な要素として、増殖、分化、転写調節、および発生などの多くの細胞プロセスに関与しています。



MEK1 + MEK2 Mouse Monoclonal Antibody (J.653.9)を使用した、(A) HeLa (不死化子宮頸がん) 細胞における免疫蛍光分析。MEK1/2 (緑色)、アクチンフィラメント標識ファロイジン (赤色)、核 (青色)。 (B) NIH/3T3 (不死化マウス胎仔線維芽細胞) 細胞 (左) およびPC12 (不死化ラット褐色細胞腫) 細胞 (右) の細胞抽出物におけるMEK1/2のウェスタンブロット検出。 (C) パラフィン包埋したヒト結腸がんの免疫組織化学分析。 (D) U0126処理 (青色) またはPMA処理 (緑色) したJurkat (急性T細胞白血病) 細胞のフローサイトメトリー解析。非特異的ネガティブコントロール細胞 (赤色) も表示。

詳細なプロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。

## Ras/Raf/MEK/ERKシグナル伝達の阻害剤

### ERK阻害

MAPK ERK1およびERK 2 (MAPK3およびMAPK1とも呼ばれる) は、G0/G1期からS期までの細胞周期進行を誘導するセリンおよびスレオニンキナーゼです (図4.8)。ERK1およびERK2 (ERK1/2) シグナル伝達は、正の細胞周期制御因子であるサイクリンD1およびc-MYCの活性を調節し、Tob1、FOXO3a、およびp21などの負の制御因子を下方制御します。ERK1/2 MAPキナーゼ経路は、細胞分裂周期における直接的な役割の他に、さまざまな機構によって細胞成長および増殖を制御します。すなわち、ERK1/2は、細胞周期メディエーターを直接調節、タンパク質およびヌクレオチドの合成を促進し、TSC2 (ツベルンとも呼ばれる) などのタンパク質との相互作用を介してmTORシグナル伝達を上方制御します。<sup>26</sup>

さまざまながん細胞株におけるERK1/2シグナル伝達の低分子による阻害は、ERK1/2の封鎖が細胞周期停止を引き起こし、アポトーシスを誘導することを示します。マウス異種移植片モデルを用いた*In vivo*薬理試験においても、MEK1/2低分子阻害剤が腫瘍成長の阻害を促進することが示されています。ERK1/2がRas/Raf/MEK/ERK経路の調節およびさまざまながんモデルにおける着実な前臨床試験結果に重要な役割を果たしているとする、ERK1/2キナーゼを標的とする薬剤の開発を追求するための強い理論的根拠が存在すると言えます。

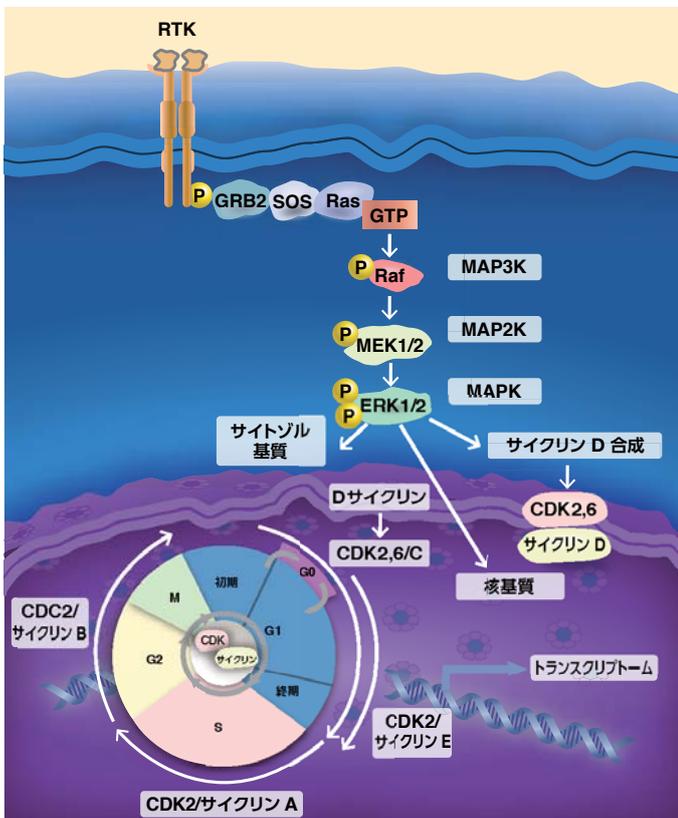


図4.8. ERK1およびERK2 (ERK1/2) シグナル伝達 サイクリンD1および他の細胞周期進行に関連するタンパク質の活性を制御するERK1/2のシグナル伝達の異常の結果生じた無制御な細胞増殖。

ERK阻害剤については、さまざまながんに対する単独および併用療法について臨床試験が進められています。<sup>27-29</sup>

ソラフェニブは、医薬品規制機関による承認済みのERK1/2キナーゼに対する活性を示すRAF阻害剤で、腎臓や肝臓のがん治療に使用されます。しかしながら、ソラフェニブは、複数標的のチロシンキナーゼ阻害剤であるため、ERK1/2活性を下方制御する他に、以下の受容体—VEGFR、PDGFR、FLT3、RET、およびc-Kitも標的とします (図4.9)。<sup>30</sup> ソラフェニブは数種の異なるタンパク質を標的とするため、いずれのタンパク質を標的としたERK1/2阻害がどの程度ソラフェニブの有効性に寄与しているかは明らかになっていません。選択的ERK阻害剤は開発努力が続けられています。<sup>31,32</sup>

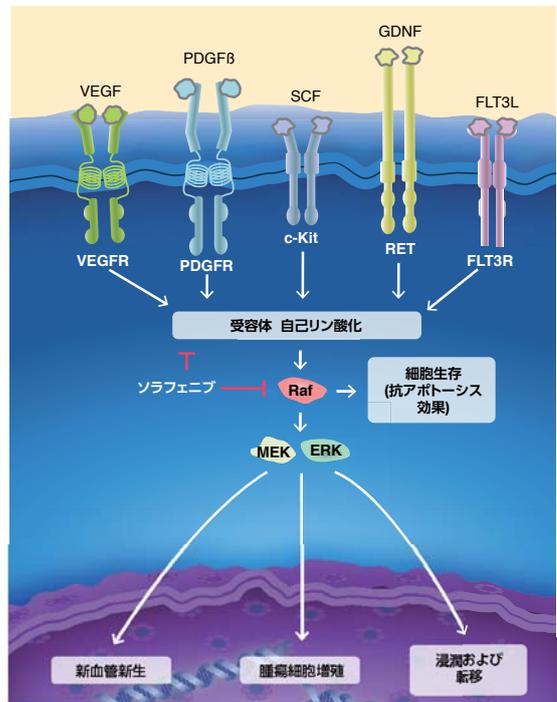
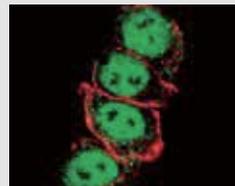
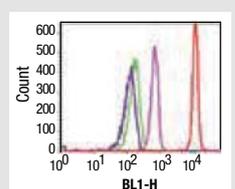


図4.9. Ras/Raf/MEK/ERKおよび他の経路の阻害剤として十分に特性が明らかにされている複数標的のキナーゼ阻害剤であるソラフェニブによって標的とされる主要な経路の模式図



**Cyclin D1 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗サイクリンD1抗体 (製品番号 PA5-12256) (緑色) を使用した、HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞の免疫蛍光分析。アクチンフィラメントはファロイジンで標識 (赤色)。



**p21 Monoclonal Antibody (2H2L13), ABfinity™ Recombinant** 抗p21抗体 (製品番号 701151) (赤色) を使用したHeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞、またはウサギアインタイプコントロール (ピンク色) のフローサイトメトリー解析。非染色コントロール細胞 (紫色) および一次抗体不使用のコントロール (緑色) も表示。

当社は、ERK1/2を検出するための幅広い抗体を提供しています。広範な製品に関する詳しい情報についてはこちらをご覧ください。  
[www.thermofisher.com/erk](http://www.thermofisher.com/erk)

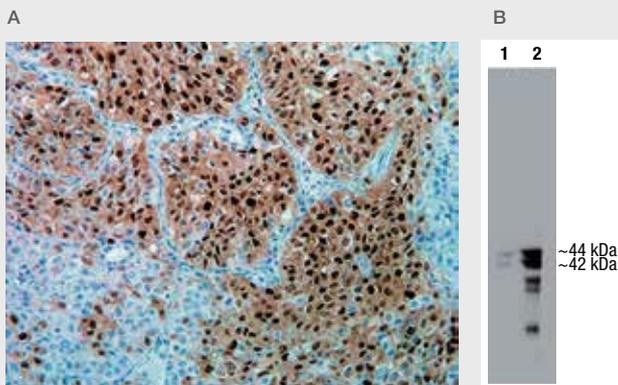
### Phospho-p44 MAPK + p42 MAPK pThr185 + pTyr187 (15H10L7), ABfinity™ Rabbit Monoclonal Antibody

製品番号 700012

ERK (細胞外シグナル制御キナーゼ) は、MAPK (マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) としても知られ、密接に関連する44 kDa および42 kDaの2つのアイソフォームが存在します。これらのキナーゼは、セリン/スレオニンファミリーに属し、マイトジェン、ホルモン、増殖因子、サイトカイン、および生理活性ペプチドなどの多種多様の刺激で細胞を処理することによって活性化します。細胞刺激は、シグナル伝達カスケードの活性化を誘導し、その下流への

影響は細胞成長、分化、および細胞骨格に関係します。ERK1およびERK2は、MEKs (MAPKまたはERKキナーゼ) によりスレオニン残基およびチロシン残基上の活性化ループのThr-Glu-Tyrモチーフ内のリン酸化によって完全に活性化され、それにより、ERK1/2酵素活性が大幅に上昇します。

詳細なプロトコールおよびリソースは付録をご覧ください。



Antibody to Phospho-p44 MAPK + p42 MAPK pThr202 + pTyr204を使用した、(A) ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト肺がん組織の免疫組織化学分析。(B) 抗Phospho-p44 MAPK + p42 MAPK pThr202 + pTyr204抗体をプローブとして使用した、Jurkat [不死化ヒトTリンパ球; (レーン1)、刺激なし (レーン2)、PMA-刺激] 細胞ライセートのウェスタンブロット解析。

# 参考文献

1. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK-mitogen-activated protein kinase cascade for treatment of cancer. *Oncogene* 26(22):3291–3310.
2. Morrison DK (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11). pii:a011254.
3. Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1):50–83.
4. Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19(4):2435–2444.
5. Keshet Y, Seger R (2010) The Map kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661:3–38.
6. Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 12(2):186–192.
7. Carracedo P, Pandolfi PP (2008) The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27(41):5527–5541.
8. Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2:289–305.
9. Santaripa L, Lippman SM, El-Naggar AK (2012) Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16(1):103–119.
10. McArthur GA (2014) The RAS/RAF/MEK/ERK pathway in cancer: combination therapies and overcoming feedback. *ASCO Daily News*, June 2, 2014. p 38B.
11. Castellano E., Downward J (2011) Ras interaction with PI3K: more than just another effector pathway. *Genes Cancer* 2(3):261–274.
12. Martin GS (2004) The road to Src. *Oncogene* 23(48):7910–7917.
13. Goymer P (2006) (1979) First human oncogene: an important difference. *Nature Milestones: Cancer* website. <http://www.nature.com/milestones/milecancer/full/milecancer17.html>
14. Giltmane JM, Balko JM (2014) Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med* 17(95):275–283.
15. National Cancer Institute (US) website (2013) *MEK: a single drug target shows promise in multiple cancers*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/research-updates/2013/MEK>
16. Cheng Y, Zhang G, Li G (2013) Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev* 32(3–4):567–584.
17. Der C (2014) Are All RAS Proteins Created Equal in Cancer? *National Cancer Institute* website. <http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/ras/advance-research/ras-blogs/ras-proteins-created-equal>
18. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949–954.
19. Domingo E, Schwartz S Jr (2004) BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 8(4):294–298. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRAFID828.html>
20. Flaherty KT (2012) Vemurafenib: a first in class serine-threonine protein kinase inhibitor for the treatment of malignant melanoma with activating BRAF mutations. *AccessMedicine*, McGraw-Hill. <http://www.medscape.com/viewarticle/771620>
21. Genentech (2014) *Zelboraf (vemurafenib) prescribing information*. [http://www.gene.com/download/pdf/zelboraf\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/zelboraf_prescribing.pdf)
22. GlaxoSmithKline (2013) *Tafinlar (dabrafenib) prescribing information*. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/202806s000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/202806s000lbl.pdf)
23. Menzies AM, Long GV, Murali R (2012) Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther* 6:391–405.
24. GlaxoSmithKline (2014) *Mekinist (trametinib) prescribing information*. <https://www.gsksource.com/gskprm/htdocs/documents/MEKINIST-PI-PL.pdf>
25. Hilal-Dandan R (2014) Trametinib: a first in class oral MEK inhibitor approved for treatment of metastatic melanoma with BRAF V600 mutations. *AccessMedicine*, McGraw-Hill. <http://www.medscape.com/viewarticle/822974>
26. Frémin C, Meloche S (2010) From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 3:8.
27. Davies BR, Logie A, McKay JS et al. (2007) AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action *in vivo*, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 6(8):2209–2219.
28. Wong DJ, Robert L, Atefi MS et al. (2014) Antitumor activity of the ERK inhibitor SCH722984 against BRAF mutant, NRAS mutant and wild-type melanoma. *Mol Cancer* 13:194.
29. ClinicalTrials.gov website (2015) Selumetinib. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Selumetinib>
30. Wilhelm S, Carter C Lynch M, et al. (2006) Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5(10):835–844.
31. Liu L, Cao Y, Chen C et al. (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 66(24):11851–11858.
32. Morris EJ, Jha S, Restaino CR et al. (2013) Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discov* 3(7):742–750.

詳細はこちら [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

All rights reserved. Hoechst is a trademark of Hoechst GmbH. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

# Wnt/ $\beta$ -カテニン シグナル伝達経路

# 5

## イントロダクション

Wntタンパク質は、分泌性糖タンパク質のファミリーで、個体発生における多種多様な生物学的プロセスに重要な役割を果たしています。Wntタンパク質は、受容体に結合すると、最終的に細胞運命、増殖および遊走などの細胞プロセスに影響を与える、非常に複雑な連続するシグナル伝達イベントを開始します。Wntシグナル伝達に関連するいくつかのメディエーターにおける遺伝子変異は、遺伝性がんと自然発生がんの両方を引き起こすドライバーとして関与するとされています。

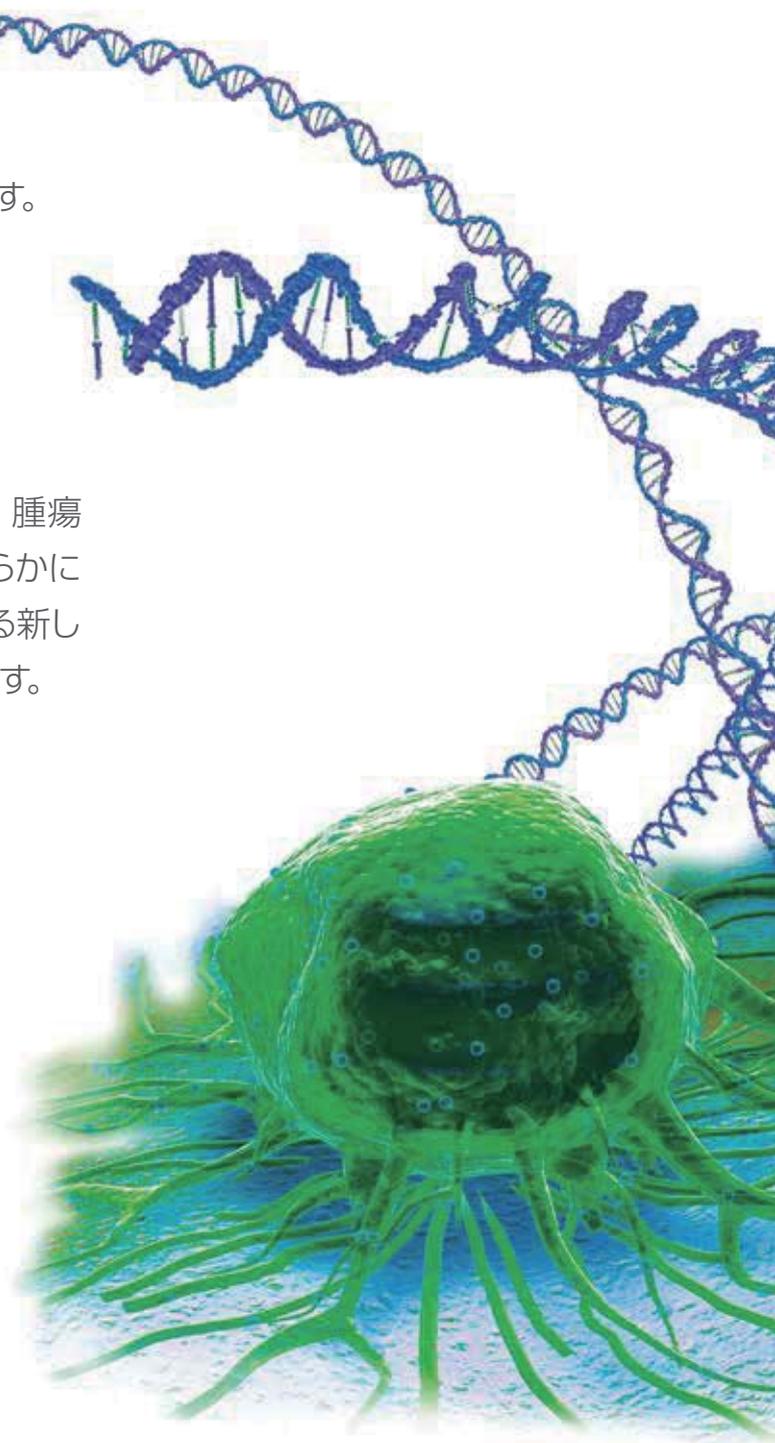
Wntシグナル伝達の制御機構を解明することは、腫瘍形成における十分に確立されたWntの役割を明らかにする活動的な研究領域です。この経路を標的とする新しい治療薬を開発するための研究が進められています。

---

## 目次

概要: Wnt経路	5-2
Wnt/ $\beta$ -カテニン経路	5-3
がんにおけるWnt経路	5-8
参考文献	5-10

---

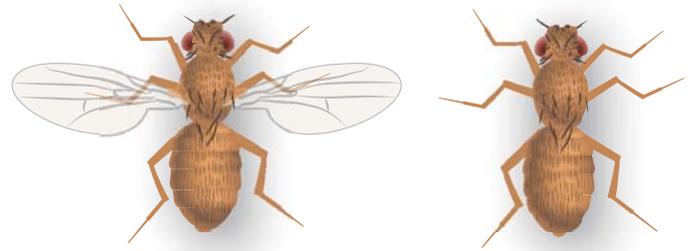


# 概要：Wnt経路

## 健常および疾患におけるWntの機能

*Drosophila* (ショウジョウバエ) 遺伝子wingless(wg)は、哺乳類のint1遺伝子のオルソログで、マウスにおいて乳がんを誘発する発がん性レトロウイルスであるマウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) の挿入部位として最初に同定されました。がん原遺伝子のwgおよびint1は、進化的に保存された、無脊椎動物および脊椎動物の初期胚発生に必要とされるWntファミリーのシグナル伝達タンパク質メンバーをコードします (図5.1)。<sup>1-3</sup> 中枢神経系、神経堤、および四肢の発生はWnt経路によって制御される正常なプロセスの例であり、Wnt遺伝子の機能を変化させる変異は先天性異常に関連します。<sup>3-5</sup> 分泌性糖タンパク質のWntファミリーのメンバーは、シグナル伝達イベントの引き金となり、成人組織の恒常性維持に不可欠で、細胞の増殖、分化、および遊走に関連します。<sup>6,7</sup>

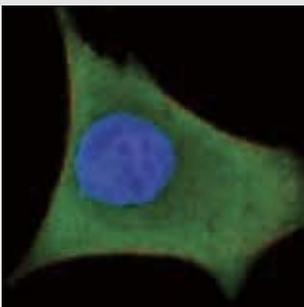
Wnt遺伝子は、マウスおよびヒトにおいて19種類のアイソフォームが知られていますが、いくつかのファミリーメンバーの機能を変化させる遺伝子変異に関連する医学的病状を表5.1に示します。<sup>8</sup>



**図5.1. Winglessの表現型** *Drosophila melanogaster*において、セグメントポラリティー遺伝子wingless (wg)の発現消失は、成体の翅の発生および眼の発生過程に極度な奇形を引き起こします。wgにおける機能喪失型変異は、胚のボディープランを障害し、胚性致死を生じさせる可能性があります。Wnt遺伝子は、wgと、脊椎動物のホモログintegrated 1またはint1を組み合わせて名付けられています。

表5.1 Wntシグナル伝達不全に関連する医学的症状

医学的症状	説明
骨形成不全症	先天性骨疾患
無四肢症	四肢の欠損
ミューラー管退縮および男性化	生殖器形成異常
SERKAL 症候群	女性から男性への性転換ならびに腎臓、副腎および肺の発育不全
2型糖尿病感受性	インスリン調節異常
フルーマン症候群	重篤な四肢奇形
歯 - 爪 - 皮膚異形成	頭髮、皮膚、舌、歯および他の身体部位の組織の発達異常
肥満	過剰な脂肪蓄積
裂手裂足症	欠指症：手足の形成不全
骨の異常	海綿骨量の減少、骨密度の低下および他の異常を含む
がん	特定のがんに対する感受性



### WNT1 Mouse Monoclonal Antibody (10C8)

抗WNT1抗体 (製品番号 MA5-15544) (緑色) を使用した、HeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞の免疫蛍光分析。核はDRAQ5™ fluorescent DNA Dye (青色) で染色。アクチンフィラメントはDyLight™ 554-Phalloidin (赤色) で標識。

# Wnt/ $\beta$ -カテニン経路

## シグナル伝達カスケード

Wntシグナル伝達経路には、古典的経路と非古典的経路が存在します(図5.2)。<sup>7</sup> それぞれのWntシグナル伝達カスケードは、細胞外Wntタンパク質リガンド—および関連共役受容体(LRP5,6)—が細胞膜上の7回膜貫通型Frizzled(FZD)受容体に結合すると開始されます(図5.3)。それに続き、膜近傍の細胞質タンパク質Dishevelled(Dvl/Dsh)を介して、Wntシグナルカスケードの下流メディエーターにシグナルが伝達されます。<sup>9</sup>

Dvlシグナルは、RhoAおよびROCKなどの細胞質タンパク質を介して、平面内細胞極性(PCP)に伝播します。これは組織の平面における細胞の空間的構成を生じさせるプロセスです。PCPにおける混乱は、秩序が乱れた組織構造を引き起こし、脊椎動物では、神経管欠損および多発性嚢胞腎疾患の発症などの幅広い異常状態に関連します。<sup>5</sup> Dvlもまた、細胞遊走の正の制御因子です。

Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の制御は複雑で、複数のサイトゾルタンパク質と相互作用する足場タンパク質として機能するDvlを必要とします。

これらのタンパク質は、 $\beta$ -カテニンの正および負の制御因子として機能する、複数の標的遺伝子(その一部はアポトーシスや細胞増殖に関与)の転写を制御する多機能タンパク質です。<sup>10</sup> Dvlは、足場タンパク質としての役割を果たす他に、細胞膜において、細胞内カルシウムやカルシニューリンなどのタンパク質とともにシグナル伝達イベントに関わることによって、細胞運命の決定および遊走に必要なとされる活動も促進します。<sup>7</sup>

歴史的に、Wnt/ $\beta$ -カテニン経路は、古典的Wnt経路と考えられており、その混乱はがんを含むさまざまな疾患の発症に寄与することが知られています。非古典的Wnt経路—PCPシグナル伝達経路およびWnt/ $\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達経路—は、生物学的状況によって、 $\beta$ -カテニン非依存性あるいはWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達に拮抗して機能すると考えられています。Wnt経路と、増殖因子やサイトカインシグナル伝達経路を調節するような他のシグナル伝達ノード間で高レベルのクロストークが生じていることについては複数のエビデンスが存在します。個々のWntシグナル伝達を活性化するのに必要とされる特別な機構を解明することを目的とした研究が進められています。<sup>7,11</sup>

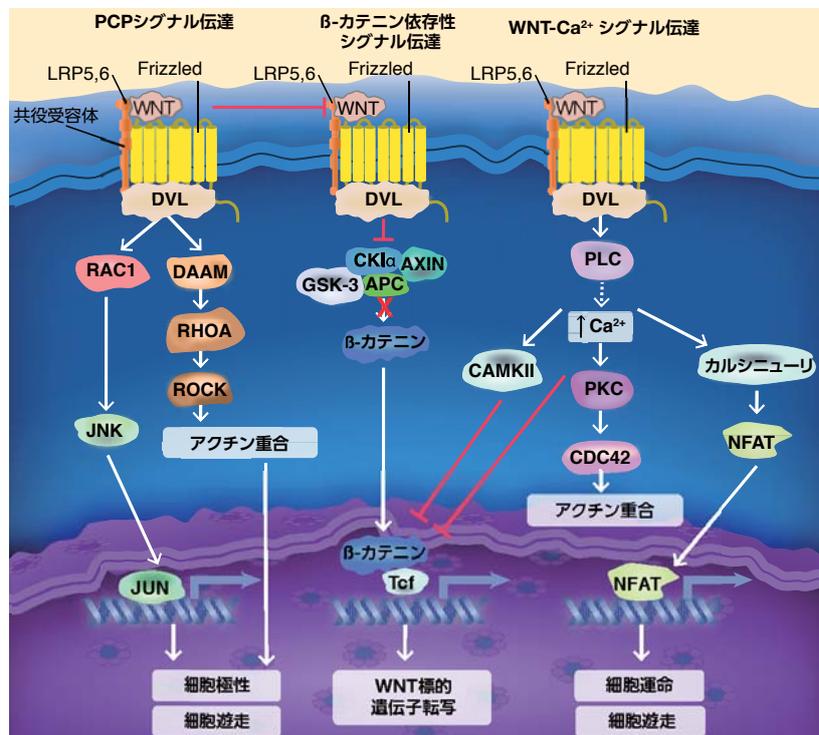


図5.2. Wnt経路のシグナル伝達の多様性 Wnt経路の活性化は、Wnt/FZDと膜結合型共役受容体(低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質LRP5/6)との相互作用によって開始されます。平面内細胞極性(PCP)シグナル伝達は、最終的に、細胞極性および遊走に必要なとされるアクチン重合および微小管安定化を誘導します。

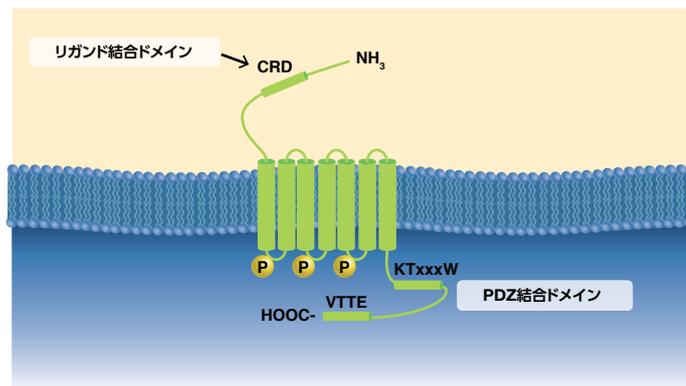
細胞質タンパク質 $\beta$ -カテニンは、発生、細胞周期制御、およびがんに関する遺伝子を制御する複数の転写因子の活性を調節します。 $\text{Ca}^{2+}$ -依存性のカルシニューリンの調節を介して、転写因子のNFATファミリーは、細胞運命の決定および遊走に関連する遺伝子の発現を制御します。

# Wnt/ $\beta$ -カテニン経路

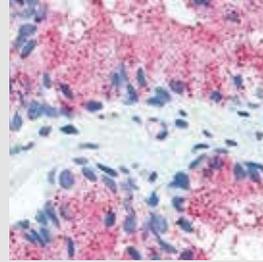
## Frizzled受容体

クラスFZD受容体は、Gタンパク質共役受容体の古典的クラスA, B, Cファミリーと関連しています。FZD受容体はWntシグナル伝達に不可欠であることが知られていますが、Wnt-FZD活性化の基本的メカニズムについては明らかにされていません。リガンドの選択性については情報が不足しており、どのようなWnt-FZDの組み合わせによる様式で特異的かつ協調的にWntネットワークの分岐経路における下流イベントに働いているかについてはよく理解されていません。<sup>14</sup>

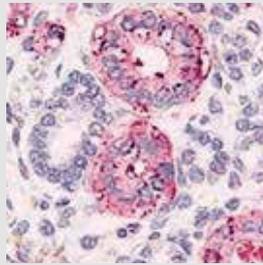
Frizzledファミリーの受容体および他のWnt経路エフェクタータンパク質を検出するための一次抗体および二次抗体ならびにイムノアッセイに関する詳しい情報はこちらをご覧ください。  
[www.thermofisher.com/fzd](http://www.thermofisher.com/fzd)



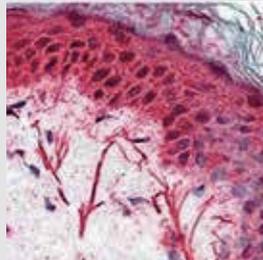
**図5.3. Frizzledタンパク質の模式図** 細胞膜において、7回膜貫通型受容体のFrizzledタンパク質は、Wntタンパク質などの複数のさまざまなリガンドに結合します。N末端細胞外システインリッチドメイン (CRD) は、リガンド結合部位として働きます。Frizzledには3つの細胞内ループが存在し、KTxxxWモチーフはDishevelledの相互作用およびシグナル伝達に必要なものとされます。C末端PDZ結合ドメインは、サイトゾルタンパク質との相互作用のためのインターフェースを供給します。<sup>12</sup> 19種類の Wntアイソフォームと10種類のFrizzledアイソフォームは、広範な細胞反応を集合的に媒介します。<sup>13</sup>



**FZD1/Frizzled 1 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗FZD1抗体 (製品番号 PA5-33550) を使用した、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト前立腺の免疫組織化学分析。



**FZD2/Frizzled 2 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗FZD2抗体 (製品番号 PA5-33543) を使用した、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト胎児腎臓の免疫組織化学分析。



**FZD3/Frizzled 3 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗FZD3抗体 (製品番号 PA5-33552) を使用した、ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト皮膚の免疫組織化学分析。

## Dishevelled

*Drosophila*を用いた遺伝子実験において、DvlのホモログであるDshは、体および翅毛の方向を維持する役割を持つことが明らかにされました。マウスおよびヒトにおいては、Dvlのアイソフォームが3種類 (DVL1、2および3) 存在することが知られています。Dvlタンパク質は、約750アミノ酸から構成され、3分の1のタンパク質ドメイン-N末端のDvl-AXIN (DIX) ドメイン、中央のPDZドメイン、およびC末端のDvl-Egl-10-プレクストリン (DEP) ドメインが保存されており、広範な細胞質タンパク質と相互作用します。Dvlは、Wntシグナル伝達経路の正の制御因子および負の制御因子に結合する他に多様なタンパク質アレイと相互作用します (表5.2)。<sup>9</sup>

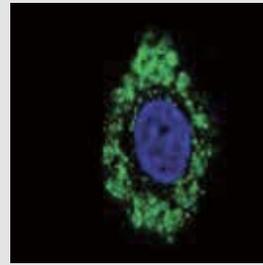
Wntシグナル伝達経路において、Dvlは重合し、Wnt/FZD/LRP5/6シグナルソームのマルチユニットタンパク質クラスターと連携して下流エフェクターへのシグナル伝達を促進します。膜近位の足場タンパク質としての役割に加え、Dsh/Dvlには核輸送配列および核移行配列が含まれ、核における転写機能を媒介している可能性についても研究において示されています。<sup>9</sup>

DVLタンパク質を検出するための一次抗体および二次抗体に関する詳しい情報はこちらをご覧ください。

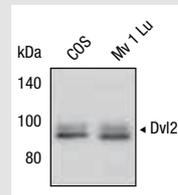
[www.thermofisher.com/dvl](http://www.thermofisher.com/dvl)

表5.2 代表的なDvl-相互作用タンパク質

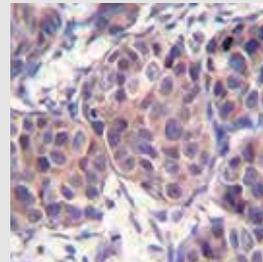
タンパク質	機能
AXIN	$\beta$ -カテニンの安定化
BP75	$\beta$ -カテニンの安定化; GSK-3 $\beta$ の不活性化
c-Jun	$\beta$ -カテニンの安定化; 核におけるTCF複合体
Dapper	Dvl分解
Diego	ショウジョウバエの翅毛の方向および個眼の配置
IDAX/CXXC4	二次軸 / 前方神経構造形成; 腎細胞がん
KITENIN	結腸直腸がん細胞転移
Prickle	Dishevelled 3分解、神経突起伸長、細胞極性
Smad1	Wnt および骨形成タンパク質間のクロストーク
Smad2	Wnt および TGF- $\beta$ 間のクロストーク
XRN185	細胞遊走



**DVL1 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗DVL1抗体 (製品番号 PA5-35116) による染色に続き、蛍光色素標識二次抗体 (緑色) を使用して検出したHepG2 (不死化ヒト肝細胞がん) 細胞株の免疫蛍光分析。核はDAPI (4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩) (青色) で染色。



**DVL2 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗DVL2抗体 (製品番号 PA5-17471) を使用した、アフリカミドリザル腎臓線維芽細胞株COS、およびミンク肺上皮細胞株Mv 1 Lu由来の全細胞抽出物におけるDVL2のウェスタンブロット解析。



**DVL3 Rabbit Polyclonal Antibody** 抗DVL3抗体 (製品番号 PA5-35096) をプローブとして使用し、続いてペルオキシダーゼ標識二次抗体および3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) 染色した、ホルマリン固定パラフィン包埋したヒト乳がんの免疫組織化学分析。

# Wnt/ $\beta$ -カテニン経路

## Wnt/ $\beta$ -カテニン活性化機構

Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の制御機構は非常に複雑です。 $\beta$ -カテニンは、*Drosophila* (ショウジョウバエ) 属で最初に発見された、一連の核となる発生関連シグナル伝達タンパク質の一部です。<sup>15,16</sup> カテニン ( $\alpha$ ,  $\beta$ , および  $\gamma$ ) は、 $Ca^{2+}$ -依存性細胞間接着を媒介するE-カドヘリンが関与する細胞質タンパク質を遍在的に発現します。カドヘリンタンパク質は、細胞増殖および細胞間接着の制御による上皮細胞層の形成および維持に必要な接着結合の形成に部分的に必要とされます。 $\beta$ -カテニン—*Drosophila* アルマジロの哺乳類ホモログ—はまた、アクチン骨格を繫留し、上皮シートが完成した際に細胞の分化を停止させる接触阻止シグナルを伝達していると考えられます。 $\beta$ -カテニンは、E-カドヘリンとの相互作用の他に、N-カドヘリン、 $\alpha$ -カテニンおよび腫瘍抑制因子遺伝子産物 APC (大腸腺腫症) などのいくつかの他のタンパク質にも関与しています。<sup>17</sup> 古典的Wnt/ $\beta$ -カテニン経路がオン状態において、 $\beta$ -カテニンは、複数のサイトゾルタンパク質と複合体を形成します (図5.4)。<sup>15</sup>

オフ状態では、細胞質および核の $\beta$ -カテニンのレベルは低く、細胞外Wntの分泌型Frizzled関連タンパク質 (sFRP) およびDickkopf (DKK) タンパク質への結合によって、この経路の活性化が妨げられます。Wntリガンドの存在比がFRPやDKKタンパク質などの阻害剤の存在比を上回ると、Wnt/ $\beta$ -カテニンの活性化が生じます。WntがLRP5/6に結合するとともに、FZD受容体を占拠すると、Dvlタンパク質の動員が誘導されます。これらのイベントに続いて、AXINおよび分解複合体が細胞膜に動員され、そこで、AXINの分解およびGSK-3 $\beta$ の阻害がともにサイトゾル $\beta$ -カテニン濃度の上昇に寄与します。 $\beta$ -カテニンの蓄積およびその核内移行は、標的遺伝子の転写に必要とされる、DNAに結合するTCF/LEFファミリーメンバーとの相互作用を促進します (図5.5)。 $\beta$ -カテニンの標的遺伝子は、多種多様な細胞タイプおよび組織を制御します。TCF/LEFアイソフォームを選択することによって制御される標的遺伝子の代表例を表 5.3に示します。<sup>15</sup>

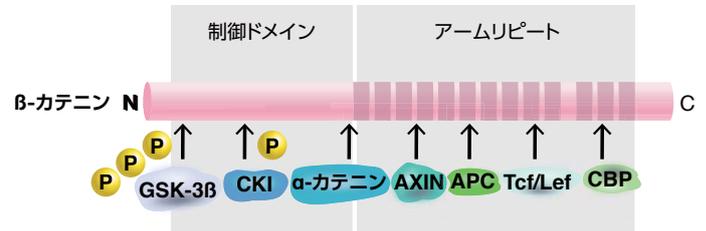


図5.4. Wnt/ $\beta$ -カテニン制御に関連するタンパク質 古典経路を介するシグナル伝達の調節に必要とされる重要なサイトゾルタンパク質および核タンパク質の図解

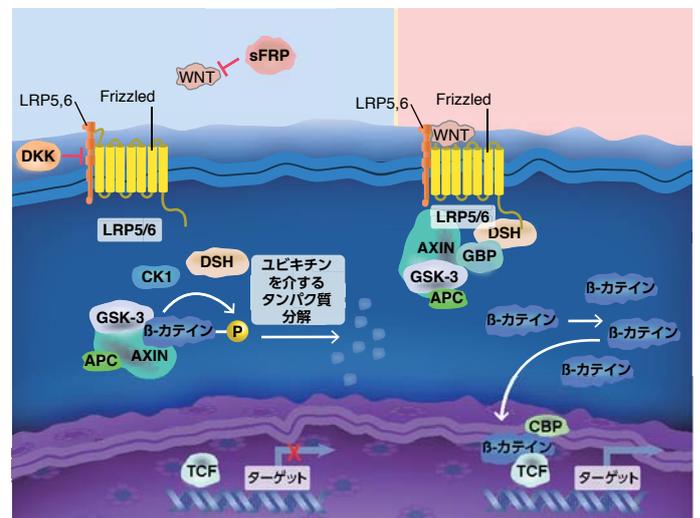


図5.5. Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の抑制および活性化 Wnt結合の不在下において、この経路はオフ状態にあります。 $\beta$ -カテニンは分解複合体 (CK1, AXIN, GSK-3, およびAPC) によって抑制され、細胞質および核の $\beta$ -カテニンレベルが低下します。オン状態において、WntがFZD受容体を占拠すると、 $\beta$ -カテニンが分解複合体から遊離し、最終的に $\beta$ -カテニンを介する標的遺伝子の転写が誘導されます。

APCは、Wnt経路シグナル伝達の重要な制御因子で、conductinを含む構造成分の細胞間結合に関与し、 $\beta$ -および $\gamma$ -カテニンの特定の内部領域への結合においてE-カドヘリンと競合します。APCは、活性型 $\beta$ -カテニン-TCF複合体の形成を制御します。APCは、明確になっている腫瘍抑制因子で、APCタンパク質の喪失または減少につながる生殖細胞系列変異は大腸および直腸のがんに関連する家族性大腸腺腫症 (FAP) に関連します。<sup>18</sup> APCにおける体細胞変異は、肺、乳房、結腸、直腸、および他の器官の悪性腫瘍にも関連します。<sup>19,20</sup>

グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK-3) は、2種類のアイソフォーム ( $\alpha$ および $\beta$ ) を有する多機能セリン/スレオニンプロテインキナーゼで、グリコーゲン代謝における鍵となる酵素として最初に発見されました。その後、GSK-3は細胞分裂、増殖、運動性、および生存において機能することが示されました。GSK-3は、がん、糖尿病、および特定の神経障害などの数多くの病態に関与しています。Wntシグナル伝達経路において、APCおよびGSK-3 $\beta$ はともに足場タンパク質AXINIに動員され、 $\beta$ -カテニンの負の制御因子として必要とされます。<sup>20,21</sup>

表5.3.TCF/LEFによって制御される標的遺伝子の代表例

TCF/LEF 転写因子	標的遺伝子 / 対応するタンパク質産物の機能
LEF-1	サイクリン D1/ 細胞周期調節因子 ; E-カドヘリン / 細胞膜接着 ; T細胞受容体 $\alpha$ / T細胞分化
TCF-1	T細胞およびナチュラルキラー細胞によって発現された遺伝子 / 多種多様なT細胞機能を制御するT細胞表面糖タンパク質との相互作用 ; ナチュラルキラー細胞表面タンパク質との相互作用
TCF-4	<i>c-myc</i> / 細胞周期調節因子

# がんにおけるWnt経路

## Wntシグナル伝達の調節不全

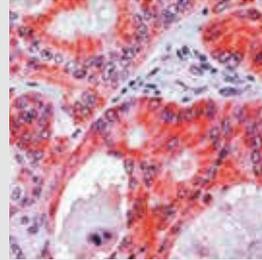
がんにおけるWntシグナル伝達の調節不全の役割については十分に立証されており、がんにおけるWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の調節不全につながるさまざまなメカニズムが研究者によって実証されています。APCに関与する機能喪失型変異は、分解複合体の分解、 $\beta$ -カテニンの持続的な蓄積、およびWnt/ $\beta$ -カテニン経路によって制御される標的遺伝子の構成的発現を引き起こします。 $\beta$ -カテニンにおける変異の活性化は、ユビキチン化を介する $\beta$ -カテニン分解を妨げ、FZD受容体またはWntリガンドの過剰発現の結果として、無制御な経路の活性化を生じる可能性があります。最終的に、分泌型FZD-関連タンパク質における混乱に関与するWntリガンド阻害の減少は、経路の活性化の増加に寄与すると考えられます。<sup>22</sup>

Wnt経路に関する複雑さは、悪性腫瘍の誘発について数多くのエビデンスが明らかにされ、Wnt経路エフェクタータンパク質を標的とする薬剤が開発されています。Wnt経路エフェクタータンパク質を予想通りに調節する能力が好都合であることは実証可能なことですが、研究者は限られた成果しか挙げられていません。その一因として、研究対象の経路を効率的に阻害するための利用可能な薬剤が不足していることが挙げられます。他にもWnt標的療法の開発を困難にするいくつかの要因が存在します。<sup>20,22-24</sup>

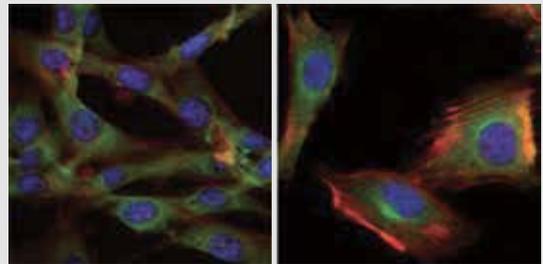
- 多数のWntリガンドおよび経路-関連タンパク質 (i.e., Wntリガンド、DvlおよびFZDタンパク質ならびに他の経路のメディエーター) が存在することから、経路内に機能的冗長性が高い可能性で存在する
- Wnt/ $\beta$ -カテニнкаスケード (およびその他の経路との関連性) は遍在し、成体組織に見られる造血幹細胞および幹細胞を含む、体内の数多くの細胞タイプおよび組織を制御している。
- Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の調節不全は経時的に変化し得る：腫瘍形成初期に生じるWnt依存的なイベントは、腫瘍進行が進むのに従い、Wnt標的に対する感受性を欠如させる方法によって変化すると考えられる
- がんバイオマーカーに関する知識の欠如と、Wnt/ $\beta$ -カテニン阻害の影響を受けると考えられる分子サブタイプに関する理解の欠如が、創薬努力の妨げとなり得る

## Wnt/ $\beta$ -カテニン経路が関与する前臨床実験

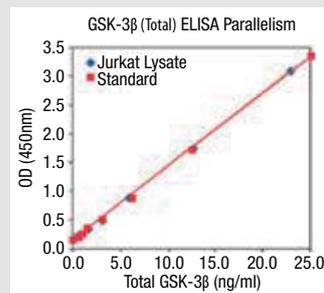
大多数の前臨床がんモデルでは、恒常的なWnt活性化と腫瘍細胞の進行との関係性が示唆されていますが、相反する報告も存在します。ヒト腫瘍サンプルを解析するいくつかの試験では、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の活性化および $\beta$ -カテニンの発現増加と予



**APC (Adenomatous Polyposis Coli) Rabbit Polyclonal Antibody**  
抗APC抗体 (製品番号 PA5-16883) で染色し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体および3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) を使用して発色させた、ホルマリン固定パラフィン包埋したヒト結腸がん。腫瘍細胞の細胞質染色に注目してください。



**GSK-3 $\beta$  Mouse Monoclonal Antibody (3D10)** 抗GSK-3 $\beta$ 抗体 (製品番号 MA5-15597) (緑色)、DRAQ5<sup>TM</sup> 蛍光DNA色素 (青色)、およびフルオロフォア標識ファロイジン (アクチンフィラメント染色、赤色) を使用した、NIH/3T3 (不死化マウス胎仔線維芽) 細胞 (左) およびU251 (不死化ヒト神経膠芽腫) 細胞 (右) の免疫蛍光分析。



**GSK-3 $\beta$  (Total) ELISA Kit** Jurkat (不死化ヒトTリンパ球) 細胞ライセート由来の天然型GSK-3 $\beta$ をスタンダード希釈バッファーで段階希釈し、GSK-3 $\beta$  ELISA Kit (製品番号 KHO0451) を使用して測定。各希釈液の吸光度をGSK-3 $\beta$  (トータル) のスタンダード曲線に対してプロットした。

後改善との相関性が示唆されています。Wntは細胞分化および細胞運命決定に関与することから、一説では、この逆説的な知見は、悪性細胞におけるWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の時間的・空間的な細胞状況は機能的帰結に影響すると考えられるため、Wntシグナル伝達の状況はこの経路が腫瘍抑制または発がん過程のいずれを誘導するかを決定していると考えられます。<sup>25</sup>

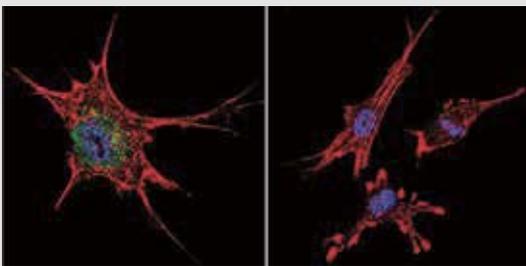
Wnt/ $\beta$ -カテニン変異を持つ腫瘍を特異的に標的とする承認済みの治療薬は存在しませんが、このカスケードを標的とする実現可能性について検討するための初期の臨床試験が開始されています。例えば、抗FZD7ヒトモノクローナル抗体のパンチクツマブは、進行性固形腫瘍患者を対象とした化学療法との併用について第I相試験が実施されています。<sup>26</sup> 同様に、生物学的Wnt阻害剤—FZD8-Fc融合タンパク質—については、承認済みの抗がん治療薬との併用療法による固形腫瘍患者を対象とした、第I相用量漸増試験において安全性および有効性の評価が行われています。<sup>27,28</sup>

前臨床試験では、限定された化学的化合物の組み合わせにおいて、腫瘍細胞におけるWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の阻害が示されています。より有効な阻害剤を調査する研究試験が継続されており、この複雑な経路の制御機構の理解が進むにつれて、この経路を標的とする新しい治療法が出現するものと考えられます。<sup>29,30</sup>

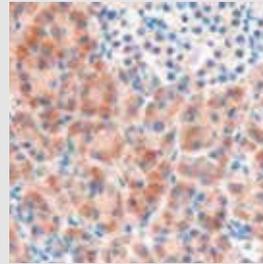
当社は、 $\beta$ -カテニン/Wnt経路のメディエーターを検出するための幅広い一次抗体および二次抗体を提供しています。広範な製品に関する詳しい情報については [こちらをご覧ください](http://www.thermofisher.com/antibodies)。

[www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

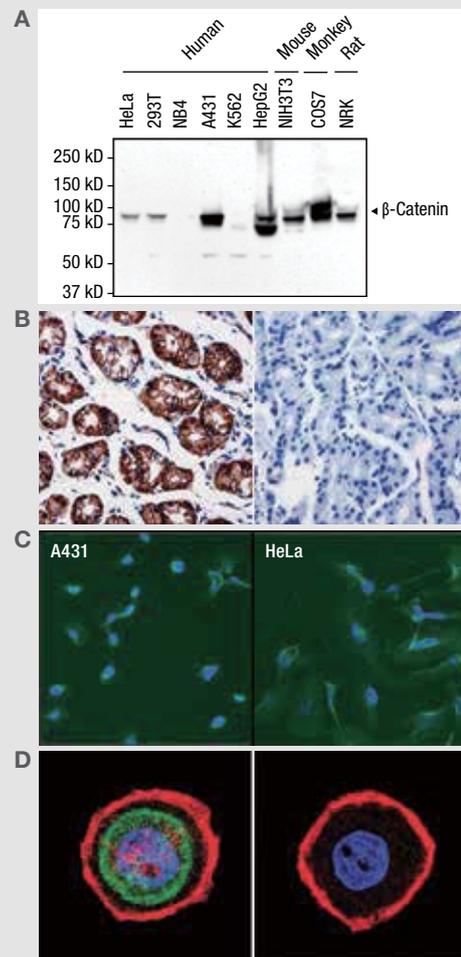
$\beta$ -カテニンは、細胞間コミュニケーションおよび接着、ならびに場合によっては細胞形態に関与します。核において、 $\beta$ -カテニンは、細胞増殖を促進するサイクリンDおよびc-mycをコードする遺伝子を含む標的遺伝子の転写を促進するLEF/TCF転写因子のファミリーを同時に活性化するように働きます。増殖へのこの影響は、特に、乳房、結腸、肝臓、肺、胃、前立腺、および皮膚の固形腫瘍の腫瘍形成における $\beta$ -カテニンの役割の分子基盤です。<sup>31,32</sup>



**NIH/3T3 (不死化マウス胎仔線維芽細胞) 細胞の免疫蛍光分析** 抗 $\beta$ -カテニン抗体 (製品番号 MA1-300) で標識 (左) または一次抗体非染色 (右) に続き、Thermo Scientific™ DyLight™ 488標識二次抗体 (緑色) で検出したホルムアルデヒド固定細胞。核はDAPI (青色) およびF-アクチンはファロイジン (赤色) で染色。



**FZD8/frizzled 8 Goat Polyclonal Antibody** 抗FZD8抗体 (製品番号 PA5-18456) で染色した、パラフィン包埋したヒト臓器の免疫組織化学染色。



**$\beta$ -catenin Mouse Monoclonal Antibody (15B8)** (A) 抗 $\beta$ -カテニン抗体 (製品番号 MA1-301) を使用した、 $\beta$ -カテニンのウェスタンブロット検出。(B) ヒト胃組織の免疫組織化学分析、(C) A431 (不死化ヒト類表皮がん) 細胞 (左) およびHeLa (不死化ヒト子宮頸がん) 細胞 (右) の免疫蛍光分析。 $\beta$ -カテニンは緑色、核は青色に染色、ならびに (D) mA431細胞の免疫蛍光分析。 $\beta$ -カテニンは緑色、核は青色、およびF-アクチンは赤色に染色。

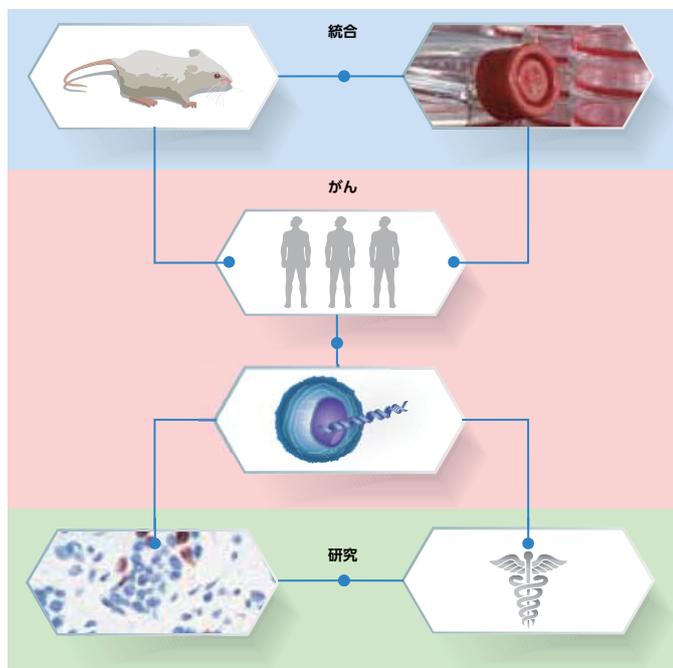
1. Bejsovec A (2006) Flying at the head of the pack: Wnt biology in *Drosophila*. *Oncogene* 25(57):7442–7449.
2. Miller JR (2002) The Wnts. *Genome Biol* 3(1):REVIEWS3001.
3. Nusse R, Varmus HE (1992) Wnt genes. *Cell* 69(7):1073–1087.
4. Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11(24):3286–3305.
5. Simons M, Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* 42:517–540.
6. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3):469–480.
7. Niehrs C (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(12):767–779.
8. Nusse R (2014) The Wnt homepage: Human Wnt genes. <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/human>
9. Gao C, Chen YG (2010) Dishevelled: the hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22(5):717–727.
10. Olmeda D, Castel S, Vilaró S, Cano A (2003) Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 14(7):2844–2860.
11. Thompson M, Nejak-Bowen K, Monga SPS (2011) Crosstalk of the Wnt Signaling Pathway. In: Gross KH, Kahn M (editors), *Targeting the Wnt Pathway in Cancer*. New York (NY): Springer. pp 51–80.
12. Schulte G, Bryja V (2007) The Frizzled family of unconventional G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28(10):518–525.
13. Macor JE, editor (2012) *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Volume 47. San Diego (CA): Academic Press.
14. Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G (2014) WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br J Pharmacol* 171(5):1195–1209.
15. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5(9):691–701.
16. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell* 149(6):1192–1205.
17. Thorstensen L, Lothe RA (2003) The WNT signaling pathway and its role in human solid tumors. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 7(2):144–159. <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/WNTSignPathID20042.html>
18. National Library of Medicine (US), Genetics Home Reference website (2012) *Familial adenomatous polyposis*. <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/familial-adenomatous-polypsis>
19. Virmani AK, Rath A, Sathyanarayana UG, et al. (2001) Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 7(7):1998–2004.
20. Polakis P (2012) Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(5).
21. Luo J (2009) Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 273(2):194–200.
22. Voronkov A, Krauss S (2013) Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des* 19(4):634–664.
23. Gurney A, Axelrod F, Bond C.J, et al. (2012) Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(29):11717–11722.
24. Chien AJ, Dawson DW (2014) Wnt signaling pathways in cancer: a new hope. *ASCO Daily News*. May 31, 2014. p 4C.
25. Lucero OM, Dawson DW, Moon RT, Chien AJ (2010) A re-evaluation of the “oncogenic” nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. *Curr Oncol Rep* 12(5):314–318.
26. ClinicalTrials.gov website (2015) Vantictumab. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vantictumab&Search=Search>
27. National Cancer Institute (US) website (2015) NCI drug dictionary entry: Fzd8 fusion protein OMP-54F28. <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=734935>
28. ClinicalTrials.gov website (2015) OMP-54F28. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=OMP-54F28&Search=Search>
29. Liu J, Pan S, Hsieh MH, et al. (2013) Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50):20224–20229.
30. Hitt E (2013) Wnt signaling inhibition: will decades of effort be fruitful at last? *OncLive website*. <http://www.onclive.com/publications/oncology-live/2012/december-2012/wnt-signaling-inhibition-will-decades-of-effort-be-fruifull-at-last/2>
31. Sampson EM, Haque ZK, Ku MC, et al. (2001) Negative regulation of the Wnt-beta-catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1. *EMBO J* 20(16):4500–4511.
32. Polakis P (2007) The many ways of wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17(1):45–51.

詳細はこちら [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

All rights reserved. DRAQ5 is a trademark of Biostatus Limited. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

# 付録

## 要約



### 基礎研究、分子革命、および創薬

細胞には、生存に必要とされるシグナル伝達経路の複雑なネットワークが存在します。細胞増殖を維持し、悪性細胞に頻繁に利用される主要なシグナル伝達ノードには、これらに限定されませんが、PI3K/Akt/mTOR経路、MAPK経路、およびWnt/ $\beta$ -カテニン経路の3例があります。<sup>1,2</sup>

長年にわたる基礎的な生物医学研究におけるシグナル伝達カスケードの重要な構成要素の探索は、がんゲノム解析における進歩を促進し、がん治療の個別化アプローチに前進をもたらしました。調節経路について詳細に理解することは、トランスレーショナル研究（橋渡し研究）の成果—基礎研究、臨床研究、および集団ベースの研究の統合を推進する取り組み—を支援することにつながり、それら全てがヒトの健康の改善という目標の達成に貢献します。

基礎研究における発見の応用は、シグナル伝達経路を特異的に標的とする医薬品および生物学的製剤の開発の劇的な増加に寄与してきました。そのいくつかについては本ハンドブックで紹介しています。がん研究分野では、腫瘍形成を誘導する腫瘍タンパク質や主要なシグナル伝達ノードを特異的に阻害する生物学的抗体、ペプチドおよび低分子製剤の開発において大きな成果が得られています。しかしながら、以下に示すような重要な課題が残されています。<sup>3</sup>

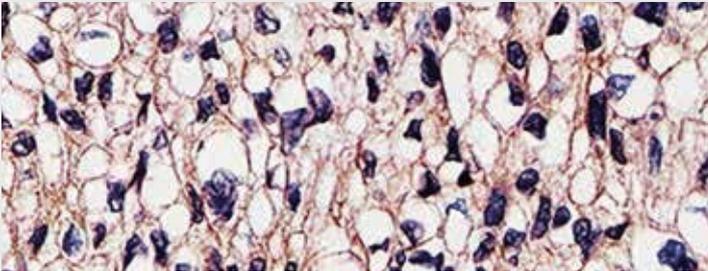
- 前臨床疾患モデルはヒト疾患を正確には反映しない
- 薬剤感受性および有効性の決定に関する明確さの欠如
- 薬剤耐性
- 不均一な患者集団
- 疾患の予後バイオマーカーおよび効果予測バイオマーカーに関する不完全な知識
- 長期にわたる薬剤探索および薬剤開発プロセス

基礎研究およびトランスレーショナル研究における研究用抗体の役割は非常に重要です。高度に精製された標的的特異的抗体を生産する能力は、組織、細胞、および細胞外コンパートメント内の特定のタンパク質の機能を検出、定量、および観察することを可能とします。研究用抗体の使用は、強力な前臨床がんモデル、ゲノムおよびプロテオミクスツール、ならびに継続的に基礎科学および医学の進歩を促進させる細胞イメージング法において重要な役割を果たします。

## 目次

抗体：がん研究のための強力なツール	6-2	プロトコールおよびリソースガイド	6-6
一次抗体アプリケーション	6-3	技術リソース	6-7
二次抗体アプリケーション	6-5	参考文献	6-8

# 抗体：がん研究のための強力なツール



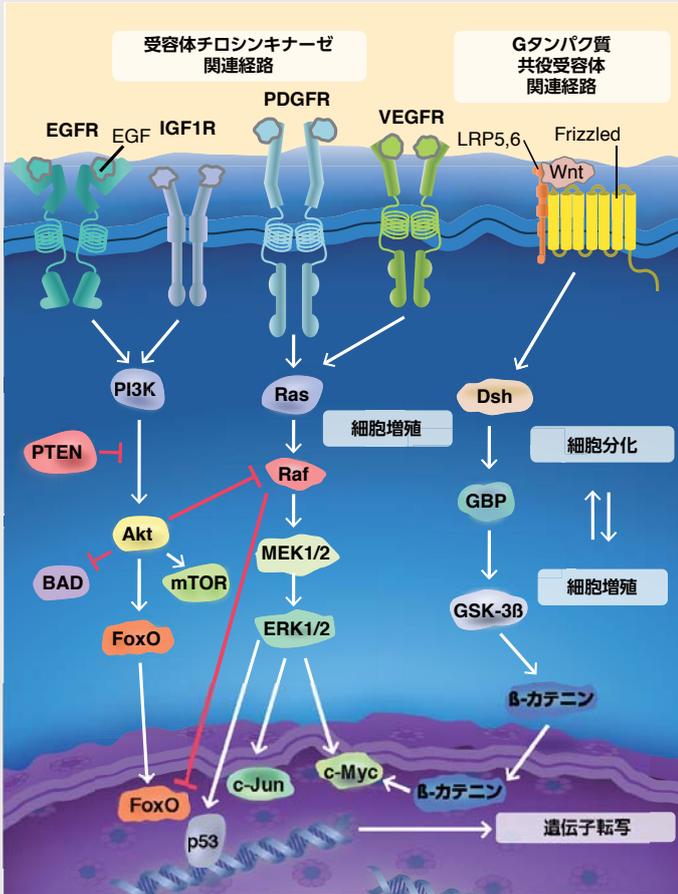
当社の抗体アッセイが幅広い抗体アプリケーションにおいて優れた実験結果の達成に寄与していることは、世界中の数千もの文献引用により実証されています。抗体検索ツールにアクセスし、目的の研究に適した抗体を見つけるためには、こちらをご利用ください。[www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

表6.1.当社の抗体が引用されている代表的な文献

製品名	参考文献	アプリケーション
<b>Bcl-2 Mouse Monoclonal Antibody (100/D5)</b> (製品番号 MA5-11757)	Singh B, Cook KR, Vincent L, et al. (2008) Cyclooxygenase-2 induces genomic instability, BCL2 express, doxorubicin resistance, and altered cancer-initiating cell phenotype in MCF7 breast cancer cells. <i>J Surg Res</i> 15:147(2):240-6.	IHC
<b>Bax Mouse Monoclonal Antibody (6A7)</b> (製品番号 MA5-14003)	Xinxing W, Hong F, Rui Z, et al. (2012) Phosphorylated nerve growth factor-induced clone B (NGFI-B) translocates from the nucleus to mitochondria of stressed rat cardiomyocytes and induces apoptosis. <i>Stress</i> 15(5):545-553.	WB
<b>Cyclin D1 Rabbit Monoclonal Antibody (SP4)</b> (製品番号 MA1-39546)	Butte JM, Torres J, Veras EF, et al.(2013) Regional differences in gallbladder cancer pathogenesis: insights from a comparison of cell cycle-regulatory, PI3K, and pro-angiogenic protein expression. <i>Ann Surg Oncol</i> 20(5):1470-1481.	IHC
<b>EGFR Rabbit Polyclonal Antibody</b> (製品番号 PA1-1110)	Yao Y, Wang G, Li Z, et al. (2010) Mitochondrially localized EGFR is independent of its endocytosis and associates with cell viability. <i>Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)</i> 42(11):763-770.	WB
<b>eNOS Rabbit Polyclonal Antibody</b> (製品番号 PA3-031A)	Récalde A, Richart A, Guérin C, et al. (2012) Sympathetic nervous system regulates bone marrow-derived cell egress through endothelial nitric oxide synthase activation: role in postischemic tissue remodeling. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> 32(3):643-653.	ICC
<b>HIF-1 alpha Mouse Monoclonal Antibody (mgc3)</b> (製品番号 MA1-516)	Mandl M, Kapeller B, Lieber R, Macfelda K, et al. (2013) Hypoxia-inducible factor-1 $\beta$ (HIF-1 $\beta$ ) is upregulated in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 434(1):166-172.	IHC
<b>Mannose 6 Phosphate Receptor/ CD222 Rabbit Polyclonal Antibody</b> (製品番号 PA3-850)	Lu X, Ferreira PA (2005) Identification of novel murine- and human-specific RPGRIP1 splice variants with distinct expression profiles and subcellular localization. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 46(6):1882-1890.	ICC
<b>c-Myc Mouse Monoclonal Antibody (9E10)</b> (製品番号 MA1-980)	Gleyzer N, Scarpulla RC (2013) Activation of a PGC-1-related coactivator (PRC)-dependent inflammatory stress program linked to apoptosis and premature senescence. <i>J Biol Chem</i> 288(12):8004-8015.	WB

FACS, 蛍光標示式細胞分取器; ICC, 免疫細胞化学 IF, 免疫蛍光; IHC, 免疫組織化学; IP, 免疫沈降; WB, ウェスタンブロットニング

# 一次抗体アプリケーション



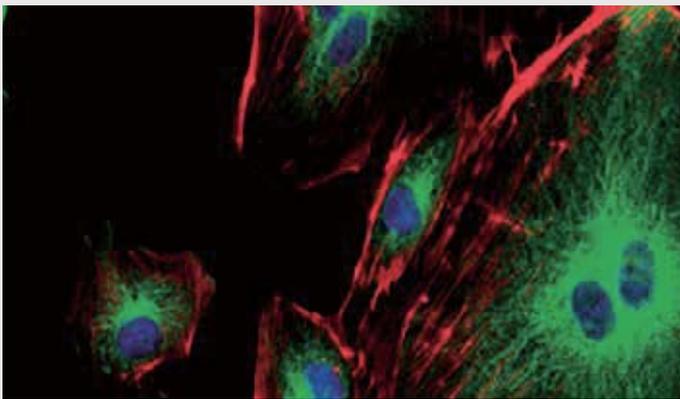
## がん細胞タンパク質解析

がん細胞解析は、増殖、転写、成長、遊走、分化、および細胞死の通常のプログラムを変更する細胞間コミュニケーションにおける特異的な異常について理解するために必要とされます。変更されたがん経路およびそれらの経路の相互接続に関する理解をより深めることによって、分子標的治療の開発が加速し、がん研究が向上することにつながると考えられます。

がん細胞ネットワークについて観察、追跡、および徹底的な調査を行うためには、ツールと技術を正しく組み合わせることが必要とされます。当社では、迅速なタンパク質検出および細胞イメージングのためのツール、ならびにお客様の研究目標の達成を支援するためにデザインされた他の高品質製品を提供しています。詳しい情報はこちらをご覧ください。 [www.thermofisher.com/antibody-applications](http://www.thermofisher.com/antibody-applications)

## アプリケーション

- 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)
- 免疫染色
- 増殖
- フローサイトメトリー
- ウェスタンブロットティング
- 免疫沈降
- Luminex™ アッセイ



# 一次抗体アプリケーション



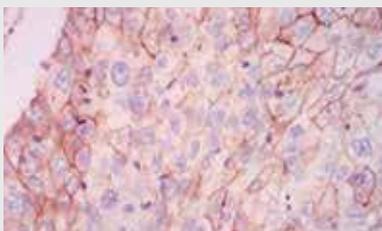
当社は、複数のアプリケーションに使用可能な一次抗体を提供しています。お客様の研究に関連する標的に関する情報は、抗体検索ツールで検索してください。[www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

表 6.2 がん研究用の代表的な標的

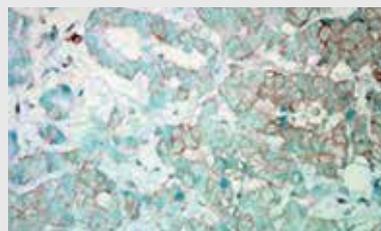
製品名	ターゲットとなる生物種	アプリケーション	製品番号
Bad Polyclonal Antibody	ヒト	WB, IHC	PA5-11393
Bax Monoclonal Antibody (6A7)	マウス、ヒト、ラット	WB, IF, ICC, IHC (P), FACS	MA5-14003
Bcl-2 Monoclonal Antibody (100/D5)	マウス、ヒト	WB, IF, ICC, IHC (P), FACS, IP	MA5-11757
c-FOS Polyclonal Antibody	マウス、ヒト	WB, IF	PA1-830
c-Myc Monoclonal Antibody (9E10)	ヒト	WB, IF, ICC, IHC (P, F), FACS, ChiP, ELISA	MA1-980
*EGFR Polyclonal Antibody	マウス、ヒト、ラット、霊長類	WB, IF, IHC, IP	PA1-1110
eNOS Polyclonal Antibody	マウス、ヒト、ラット、イヌ、ウシ	WB, IF, ICC, IHC, IHC (P)	PA3-031A
FGF1 Polyclonal Antibody	ヒト	WB, IF, IHC	PA5-13394
FGFR1/CD331 Polyclonal Antibody	マウス、ヒト	WB, IHC, FACS	PA5-25979
HIF-1 alpha Monoclonal Antibody (mgc3)	マウス、ヒト、ブタ、霊長類	WB, IF, ICC, IHC, IHC (P), IP, GS, IE	MA1-516
IGF1 Monoclonal Antibody (1C5-1A2)	ヒト	WB, ELISA	MA1-088
IGF1R Oligoclonal Antibody (23HCLC), ABfinity™ Recombinant	ヒト	WB, ELISA	710065
IGF2 Monoclonal Antibody (8H1)	ヒト	WB, IF, ICC, IHC, FACS	MA5-17096
p27 Kip1 Polyclonal Antibody	マウス、ヒト	WB, IF, ICC, IHC (P)	PA5-27188
PDGFA Polyclonal Antibody	ヒト	WB, IHC	PA5-11722
PDGFRA/CD140a Monoclonal Antibody (7H13L1), ABfinity™ Recombinant	ヒト	WB, ICC, ELISA	701142
† PI3 kinase p110 alpha Polyclonal Antibody	マウス、ヒト	WB, IHC (P)	PA5-27192
Raptor Polyclonal Antibody	マウス、ヒト	WB, IF, ICC	PA5-20126
‡ RICTOR Monoclonal Antibody (7B3)	マウス、ヒト、霊長類	WB, IF, ICC, IHC (P), FACS	MA5-15681
STAT1 Monoclonal Antibody (15H3)	ヒト、霊長類	WB, IF, IP	MA1-037

FACS, 蛍光標示式細胞分取器; ICC, 免疫細胞化学 IF, 免疫蛍光; IHC, 免疫組織化学; IP, 免疫沈降; WB, ウェスタンブロットニング

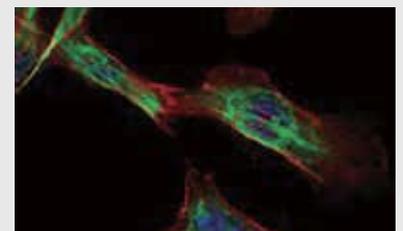
\* 以下の関連画像を参照してください。



EGFR Polyclonal Antibody  
(製品番号 PA1-1110)\*

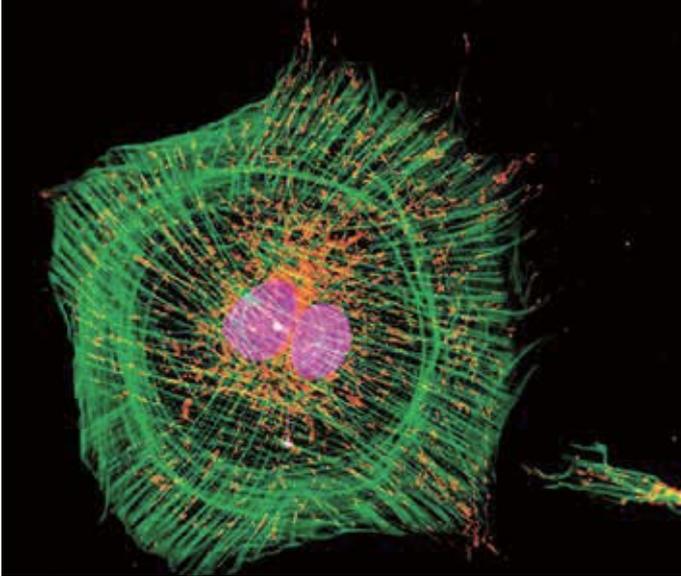


PI3 Kinase p110 alpha Polyclonal  
Antibody (製品番号 PA5-27192)†

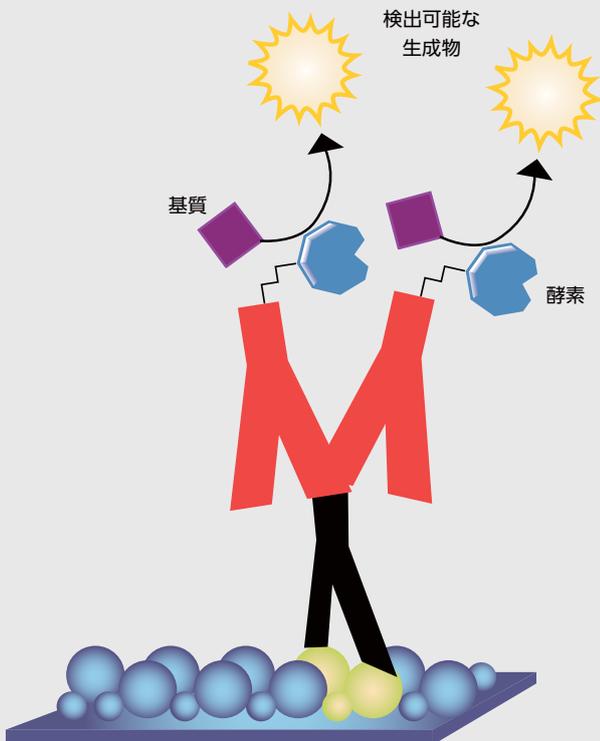


RICTOR Monoclonal Antibody (7B3)  
(製品番号 MA5-15681)‡

# 二次抗体アプリケーション



## 間接的



## アプリケーション

二次抗体は標的抗原の間接的な検出に使用されます。二次抗体の使用には一次抗体単独での使用に比べてより多くのステップが必要とされますが、シグナル増幅を通して増強された感度や、ラベリングおよび検出のオプションに幅広い柔軟性があります。詳しい情報はこちらをご覧ください。[www.thermofisher.com/Secondary-antibody](http://www.thermofisher.com/Secondary-antibody)

当社は、蛍光分析、比色分析、および化学発光分析に使用できる高品質の標識および非標識二次抗体を多彩に取り揃えており、細胞イメージング、フローサイトメトリー、およびウェスタンブロッティングなど幅広い用途に対応しています。多くの文献に引用されている研究用抗体を提供しており、その多くは広範な色素および酵素を標識します。

- Alexa Fluor 色素
- 一般的な蛍光色素
  - フルオレセインイソチオシアネート (FITC)
  - R-フィコエリトリン (RPE)
  - アロフィコシアニン (APC)
- 酵素コンジュゲート
  - 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)
  - アルカリホスファターゼ (AP)

二次抗体は、宿主動物を別種の抗体を用いて免疫することで作製されます。例えば、抗マウス抗体は、精製された特異的のマウス抗体をマウス以外の動物に注入することによって生成されます。二次抗体を生成するための宿主動物種としては、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ニワトリ、およびウサギを用いるのが一般的ですが、ウマ、リヤマ、ネコ、ウシ、およびイヌなど、その他の動物種由来のものもご用意しております。

詳細情報：

- 二次抗体の選択
- 二次抗体の作製方法
- 二次抗体の精製

[www.thermofisher.com/Secondary-antibody-selection](http://www.thermofisher.com/Secondary-antibody-selection)

# プロトコールおよびリソースガイド

# 6

## 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

- Overview of ELISA Technology
- Assay Development Technical Handbook
- ELISA Development and Optimization
- ELISA Enzyme Substrates Selection Guide

## 免疫染色

- Immunostaining Guide
- Cell Staining Simulation Tool
- Immunofluorescence Imaging
- Immunohistochemistry
- Molecular Probes School of Fluorescence

## フローサイトメトリー

- Molecular Probes Flow Cytometry Products and Research Guide
- Molecular Probes Flow Cytometry Reagent Guide and Protocols App
- Fluorescence SpectraViewer

## ウェスタンブロットティング

- ウェスタンブロットティングの概要
- ウェスタンブロットワークフロー選択ガイド
- Western Blot Chemiluminescent Substrate Selection Guide
- Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide

## 免疫沈降 (IP)

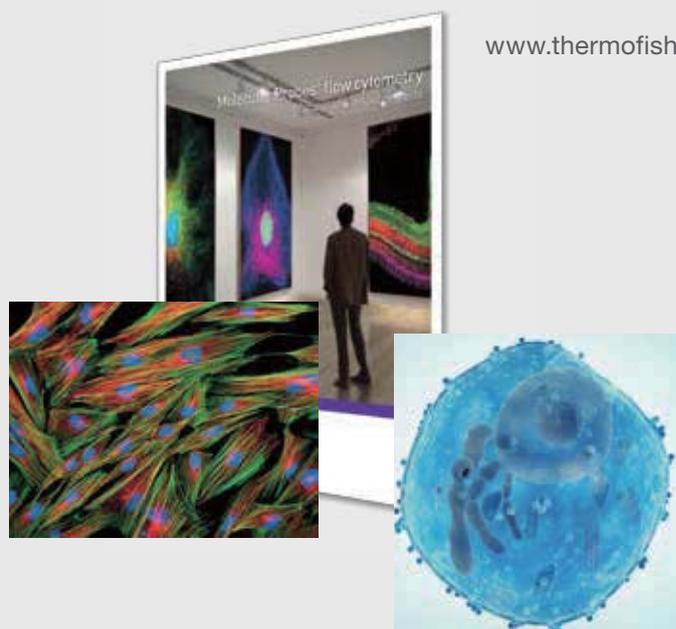
- IP with Dynabeads and Other Magnetic Beads
- IP with Agarose and Other Resins
- ChIP, RIP, and Protein-Nucleic Acid Pull-Down Magnetic Beads and Kits

## Luminexアッセイ

- How Luminex Technology Works
- Measure Multiple Signaling Proteins in a Single Microplate Well
- Luminex FAQs

## タンパク質解析および抗体精製の無料ガイド

## イメージギャラリー



[www.thermofisher.com/tech-library](http://www.thermofisher.com/tech-library)



オンライン検索をご利用ください

アプリケーションごとにリソースを表示 >

弊社ホームページ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com))から「サービス&サポート」をお選びください。

# 参考文献

1. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. (2011) Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy—implications for cancer and aging. *Aging* (Albany NY) 3(3):192–222.
2. Luu HH, Zhang R, Haydon RC, et al. (2004) Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 4(8):653–671.
3. Schilsky RL, Allen J, Benner J, et al. (2010) Commentary: tackling the challenges of developing targeted therapies for cancer. *Oncologist* 15(5):484–487.

詳細はこちら [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

All rights reserved. Luminex is a trademark of Luminex Corporation. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.



# 失敗しない抗体選びなら Invitrogen™ におまかせ!

抗体検索はこちらから

[www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)



当社のラインナップからお客様の研究に適した抗体を見つけてください。当社は、74,000を超える抗体を取り揃えており、オンラインで簡単に検索・注文いただけます。また、カスタム抗体サービスも提供しています。

詳細はこちらをご覧ください。 [www.thermofisher.com/antibodies](http://www.thermofisher.com/antibodies)

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。  
記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。  
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
DRAQ5 is a trademark of Biostatus Limited. Hoechst is a trademark of Hoechst GmbH Corporation. Luminex is a trademark of Luminex Corporation. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries.  
記載の価格は2017年1月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。  
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますので予めご了承ください。  
標準販売条件はこちらをご覧ください。 [www.thermofisher.com/jp-tc](http://www.thermofisher.com/jp-tc)

販売店

PA037-A1702OB

## サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ [jptech@thermofisher.com](mailto:jptech@thermofisher.com)

オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584

営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan)

[@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC