活性型がん遺伝子 BRAF による
ストレス適応応答制御機構の解明と治療への応用
Regulation Mechanisms of Stress Response by Oncogenic BRAF

平成 26 年度入学

永澤 生久子（Nagasawa, Ikuko）

指導教員

冨田 章弘

目次

序章 1

1. がん化とストレス適応応答機構 1

2. Integrated Stress Response (ISR) 1

3. 活性型がん遺伝子 *BRAF*^{V600E} 3

4. 選択的 BRAF 阻害剤 vemurafenib 3

5. Vemurafenib による ISR 活性化の報告 4

本論 5

研究目的 5

第一章　BRAF 阻害剤 vemurafenib による Integrated stress response (ISR) 活性化機序の解析とその意義 6

第一節　BRAF 阻害剤は BRAF^{V600E} 変異型細胞株において ISR を活性化する 6

第二節　BRAF 下流 MEK-ERK シグナルと Akt シグナルは、vemurafenib による ISR 活性化に関与しない 8

第三節　Vemurafenib は GCN2 を介して ISR 活性化を引き起こす 10

第四節　PERK 及び小胞体ストレスは vemurafenib による短時間における ISR 活性化に関与しない 12

第五節　Vemurafenib による ISR に制御される遺伝子の解析 17

第六節　ATF4 ノックダウンは vemurafenib による細胞増殖阻害を増強する 19

第二章　Vemurafenib による ISR に対する選択的阻害剤の探索 21

第一節　mTOR 阻害剤及び PI3K 阻害剤はストレスの種類非選択的に ATF4 発現誘導を抑制する 21

第二節　AT9283 は vemurafenib による ATF4 発現誘導を選択的に抑制する 25

第三節　AT9283 は vemurafenib によって誘導されるアミノ酸代謝の恒常性を維持するための応答を抑制する 28

第四節　AT9283 は vemurafenib と併用することで相乗的に細胞死を誘導する 30

第三章　活性変異型 $BRAF^{V600E}$ による ISR 制御機構の解析.....33
第一節　$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞における BRAF ノックダウンはストレスに誘導される ATF4 発現を抑制する.....33
第二節　BRAF ノックダウンが ATF4 mRNA 及び uORF に与える影響の検討.....36
第三節　$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における BRAF ノックダウンは mTOR シグナル及び翻訳開始因子のリン酸化レベルを抑制する.....38
第四節　$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における vemurafenib の 24 時間処理は mTOR シグナル及び ATF4 発現を抑制する.....42
第五節　mTOR シグナルの阻害は GCN2 を介した ATF4 発現誘導を抑制する.....44
第六節　BRAF は mTORC1 及び GCN2 と結合し、mTOR はストレス依存的に BRAF との結合が増加する.....46

結語.....49

実験項.....55

参考文献.....65

謝辞.....71

Supplementary Data.....73

序論

1. がん化とストレス適応応答機構

がんの発生はがん遺伝子の変化の集積に起因し、がん遺伝子の変異や増幅による増殖・生存シグナルの異常な活性化は、現在のがん治療において重要な治療標的である。一方、腫瘍組織は酸素やグルコース、アミノ酸等の栄養素が不十分な特徴的な微小環境にさらされているため、がん化した細胞がそのようなストレス環境下において増殖及び生存を維持するためには、積極的なストレス適応応答機構の活性化が重要である[1)]。従って、がん細胞のストレス適応応答を理解し、制御することは有用ながん治療法として期待されるが、その詳細な分子機序はあまり明らかにされていない。特に、がん化を引き起こすドライバーがん遺伝子と代謝ストレス適応応答機構の研究は、これまで切り分けて研究が進められ、がん遺伝子によるストレス適応応答の制御メカニズムは明らかではない。そこで本研究では、新たながん治療戦略の分子基盤として、治療標的として重要ながん遺伝子 BRAF と多様なストレスに対して応答する Integrated stress response (ISR) に焦点を当て、これらを結びつける分子機序を明らかにすることを研究目的とした。

2. Integrated Stress Response (ISR)

Integrated stress response は様々なストレスから細胞を守るために機能する重要なストレス適応応答機構である。ISR はストレスセンサー分子である eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α) キナーゼの活性化、eIF2αのリン酸化、そして activation transcription factor 4 (ATF4) の発現上昇の順で誘導される。ISR の活性化は様々なストレスに関わる病態に関与することが報告されており、がん細胞も ISR の活性化によって腫瘍内の劣悪なストレス環境に適応し、生存及び増殖を維持することが報告されている[2-4)] (図 1)。

現在までに、哺乳類における eIF2α キナーゼとして、protein kinase-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK)[4)]、general control nonderepressible 2 (GCN2)[3)]、protein kinase double-stranded RNA-dependent (PKR)[5)]及び heme-regulated inhibitor (HRI)[6)] の 4 種類が同定されている。各 eIF2αキナーゼはそれぞれ異なるストレスを感知して活

性化することが知られ、その典型例として、PERK は小胞体ストレス、GCN2 はアミノ酸の枯渇、PKR はウィルス感染、HRI はヘムの欠乏をストレスとして感知する。活性化した eIF2αキナーゼは eIF2αの 51 番目のセリンをリン酸化し、これにより細胞内の全体的なタンパク質翻訳が抑制される。その一方で mRNA の 5'-untranslated region (5'-UTR) に upstream open reading frame 配列を有する ATF4 は選択的に翻訳が促進され、発現量が上昇する [7, 8]。ATF4 は転写因子として働き、タンパク質の折りたたみや、アミノ酸の生合成及び代謝、レドックス代謝等に機能するタンパク質の転写を促進することで、細胞のストレス適応に寄与する [9-11]。

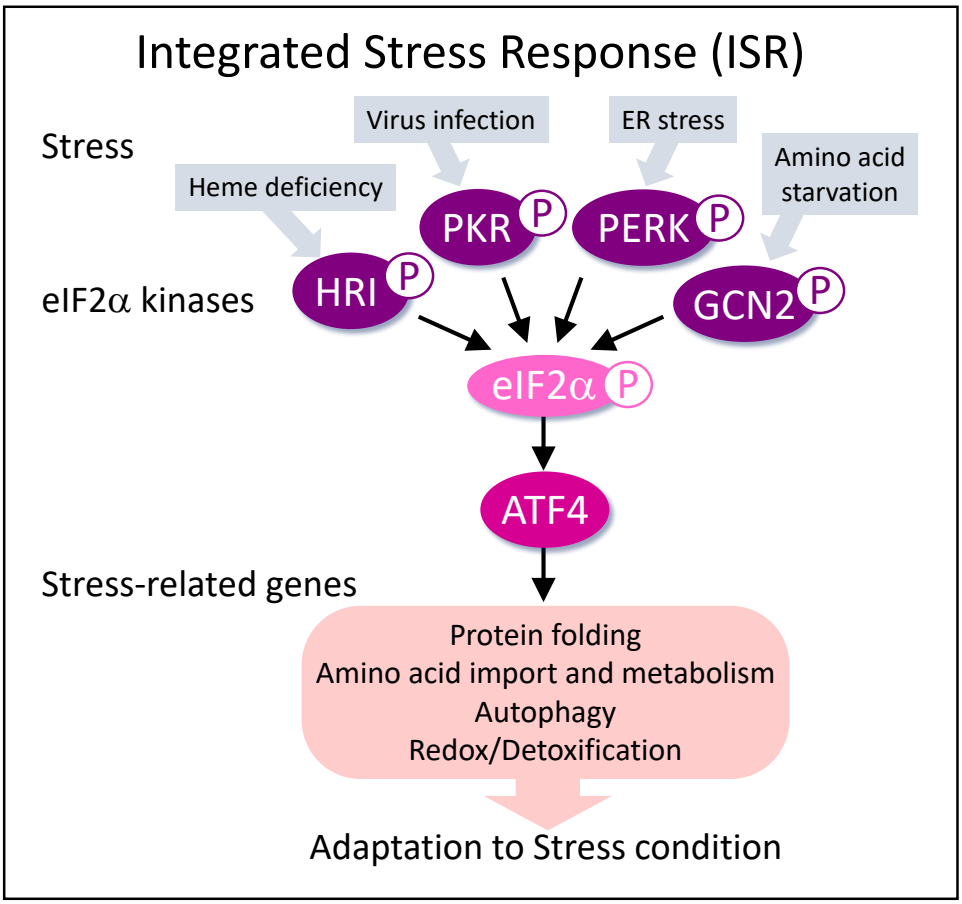


図 1. Integrated Stress Response は多様なストレスに応答し、ストレス環境下における細胞生存に寄与する。

3. 活性型がん遺伝子 *BRAF*^{V600E}

がん遺伝子の異常な活性化は、現在のがん治療において重要な治療標的であり、これまでにオンコジェニックシグナルを阻害する多数の薬剤が承認され、今もなお開発が進められている。例えば、*EGFR* (epidermal growth factor receptor)、*KRAS* (V-Ki-Ras2 kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog)、及び *BRAF* (V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) 等のがん遺伝子の変異や増幅は、各がんの特徴となり、それに合わせた阻害剤を選択することで、高い治療効果を得ることに貢献している [12]。

活性型がん遺伝子 *BRAF*^{V600E} はがん全体の 8%に認められ、メラノーマでは 50%、甲状腺乳頭がんでは 30-70%、卵巣がんでは 30%、大腸がんでは 10%の割合で認められる [13-15]。*BRAF*^{V600E} は 600 番目のアミノ酸残基のバリンがグルタミン酸へ置換することで、本来 BRAF の活性化に必要な 599 番目のスレオニンと 602 番目のセリンのリン酸化を模倣し、Ras 非依存的な恒常的活性化により野生型 BRAF に比べ 500 倍のキナーゼ活性を保持すると考えられている [16]。BRAF は mitogen-activated protein kinase (MEK) をリン酸化し、MEK は mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) をリン酸化することで細胞増殖及び生存シグナルを伝達する [17]。活性変異型 BRAF によって MEK-ERK シグナル経路が恒常的に活性化され、がん細胞の増殖が促進される。

4. 選択的 BRAF 阻害剤 vemurafenib

BRAF 阻害剤 vemurafenib (商品名 Zelboraf) は V600 変異を有する BRAF キナーゼを選択的かつ強力に阻害することで、がん細胞の増殖を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することから、BRAF V600 変異を有するメラノーマに対する治療薬として開発された [18]。Vemurafenib は BRAF 変異型メラノーマ患者の治療において奏効率 60-80%の非常に高い治療効果が報告されているが [19]、完全にがん細胞を死滅させることはできず、最終的には vemurafenib の作用から免れたがん細胞が再び増殖する。また、再増殖したが

ん細胞が獲得する vemurafenib 耐性の分子機序として、*MEK1* 変異や neuroblastoma Ras viral oncogene homolog (*NRAS*) 変異等による増殖シグナルの再活性化が明らかとなっている[20, 21]。そのため、2015 年には vemurafenib に MEK 阻害剤である cobimetinib (商品名 Cotellic) の併用療法が承認され、治療効果の改善が報告されている[22]。しかし、さらなる変異やバイパスシグナルによる増殖シグナルの再活性化が繰り返され、根本的な解決には至っていない。そこで、最初の vemurafenib 治療の効果を増強させる標的分子や、耐性を獲得した細胞に有効な標的分子の発見が期待されている。

5. Vemurafenib による ISR 活性化の報告

近年、vemurafenib が BRAF 変異型メラノーマ細胞において ISR を活性化させることが報告された[23, 24]。ISR は先に述べたようにストレス環境下における細胞生存に重要なストレス適応応答機構であることから、ISR が vemurafenib の治療効果を向上させる標的分子として注目されている。しかし、先行研究の報告では vemurafenib による ISR 活性化の分子機序及び vemurafenib の薬理効果における意義についてもあまり明らかにされていなかった。そこで、本研究では活性変異型 BRAF による ISR 制御機構解明の足がかりとして、はじめに vemurafenib が誘導する ISR の分子機序について検討することとした。

本論

研究目的

本研究では、活性型がん遺伝子 *BRAF* によるストレス適応応答機構 Integrated stress response（ISR）の制御メカニズムの解明に基づいて、ストレス適応応答を標的とした新しいがん治療戦略の分子基盤を築くことを研究目的とした。これまでの研究では、活性型がん遺伝子は増殖・生存シグナルの制御が話題の中心にあり、一方、がん細胞の代謝ストレス適応応答に関しても下流で働くストレス関連分子や代謝経路の解析が精力的に行われてきた。今回新たに、がん細胞における代謝ストレス適応応答の制御機構をがん遺伝子の機能と関連付けることは、がんの幅広い研究分野に重要な知見を与えることができると考えられる。さらに、BRAF 阻害剤 vemurafenib を用いた解析を行うことで、実際の臨床における治療効果を改善することに役立つ標的分子を見出すことが期待できる。本研究により、これまで以上に、がんの代謝ストレス適応応答を標的とする治療戦略の重要性を提示できるものと考えられる。

第一章では、vemurafenib による ISR 活性化の分子機序とその意義について検討し、第二章では vemurafenib に誘導される ISR に対する選択的阻害の探索を行い、その有用性を評価した。最後に、第三章では活性変異型 BRAF の新たな機能として，ATF4 の発現を制御するメカニズムの解析を行った。

第一章　BRAF 阻害剤 vemurafenib による Integrated stress response (ISR) 活性化機序とその意義

第一節　BRAF 阻害剤は $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株において ISR を活性化する

これまでに BRAF 阻害剤 vemurafenib は、$BRAF^{V600E}$ 変異型メラノーマ細胞株において ISR を活性化させることが報告されていたため [23, 24]、我々は BRAF 変異と ISR 活性化の関係性について検討した。$BRAF^{V600E}$ を発現するメラノーマ細胞株 A375 と野生型 BRAF ($BRAF^{WT}$) を発現するメラノーマ細胞株 SK-MEL-2 及び MeWo を用いて、vemurafenib を処理した時の薬剤感受性及び ISR 活性化の指標となる eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現誘導について検討した。A375 細胞は vemurafenib に対し高い感受性を示し、それに比べて SK-MEL-2 及び MeWo 細胞では vemurafenib 処理による細胞増殖阻害作用は認めなかった (Fig. 1A)。これらの細胞株に vemurafenib 10 μM を 4 時間処理した時の ISR 活性化についてウェスタンブロッティング法により検討したところ、A375 細胞では vemurafenib 処理による顕著な eIF2αのリン酸化と ATF4 発現の誘導を認め、一方で SK-MEL-2 及び MeWo 細胞ではそれらの誘導は非常に弱かった (Fig. 1B)。A375 細胞と同様に、$BRAF^{V600E}$ を発現し、vemurafenib に対し高い感受性を示す他の $BRAF^{V600E}$ 変異型メラノーマ細胞株 G-361、WM-115、SK-MEL-1 及び $BRAF^{V600E}$ 変異型大腸がん細胞株 HT-29 においても、vemurafenib 処理によって eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現が誘導された (Fig. 1C 及び 1D)。これらの結果より、vemurafenib は $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株選択的に、4 時間以内に ISR 活性化を引き起こすことを明らかとした。また、他の選択的 BRAF 阻害剤 dabrafenib も vemurafenib と同様に、$BRAF^{V600E}$ 変異型メラノーマ細胞株に対して細胞増殖阻害作用を示し、A375 及び G-361 細胞において 4 時間以内に ISR を活性化させることを見出した (Fig. 1E-1G)。

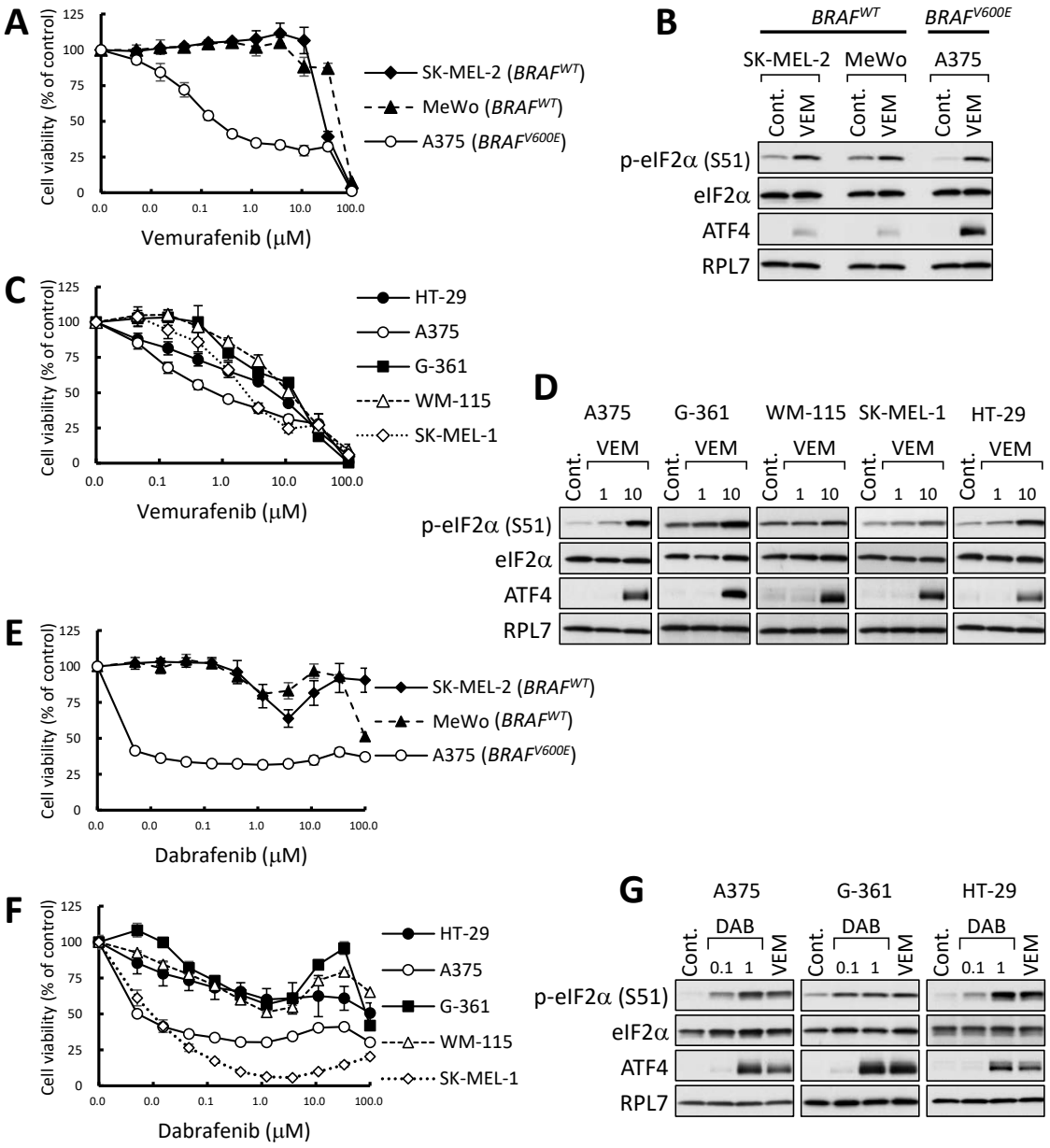


Figure 1. BRAF 阻害剤は BRAF^{V600E} 変異型細胞株において ISR を活性化する

(**A, E**) SK-MEL-2、MeWo 及び A375 細胞を図中に示す濃度の vemurafenib (**A**) または dabrafenib (**E**) で 48 時間処理し、細胞生存率を MTT アッセイ法により測定した (±SD, n=3)。(**B**) SK-MEL-2、MeWo 及び A375 細胞を vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**C, F**) BRAF^{V600E} 変異型細胞株を図中に示す濃度の vemurafenib (**C**) または dabrafenib (**F**) で 48 時間処理し、細胞生存率を ATP アッセイ法により測定した (±SD, n=3)。(**D, G**) BRAF^{V600E} 変異型細胞株を vemurafenib (1 または 10 μM) (**D**) または dabrafenib (DAB, 1 μM) (**G**) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第二節　BRAF 下流 MEK-ERK シグナルと Akt シグナルは、vemurafenib による ISR 活性化に関与しない

Vemurafenib による ISR 活性化に BRAF 下流の MEK-ERK シグナルが関与しているのか検討した。A375 細胞に MEK 阻害剤 trametinib を 4 時間処理したところ、vemurafenib 処理時と同様に MEK 及び ERK のリン酸化が抑制されたが、eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現誘導は認められなかった（Fig. 2A)。Trametinib と vemurafenib の併用においても、trametinib 処理は vemurafenib に誘導される ISR 活性化に影響を与えなかった（Fig. 2B)。他の $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株である G-361 及び *BRAF* 野生型細胞株である SK-MEL-2 においても、trametinib による MEK-ERK シグナル阻害による ISR 活性化は認められなかった（Fig. 2C)。

BRAF のもう一つの主要な下流シグナル分子である Akt のリン酸化についても検討したが、vemurafenib 処理による Akt のリン酸化の変動は、ERK のリン酸化のように一律ではなく、細胞株及び vemurafenib の濃度によって異なる反応を示した（Fig. 2D)。これらの結果より、vemurafenib による ISR 活性化に MEK-ERK 及び Akt シグナル経路は関与しないと考えた。

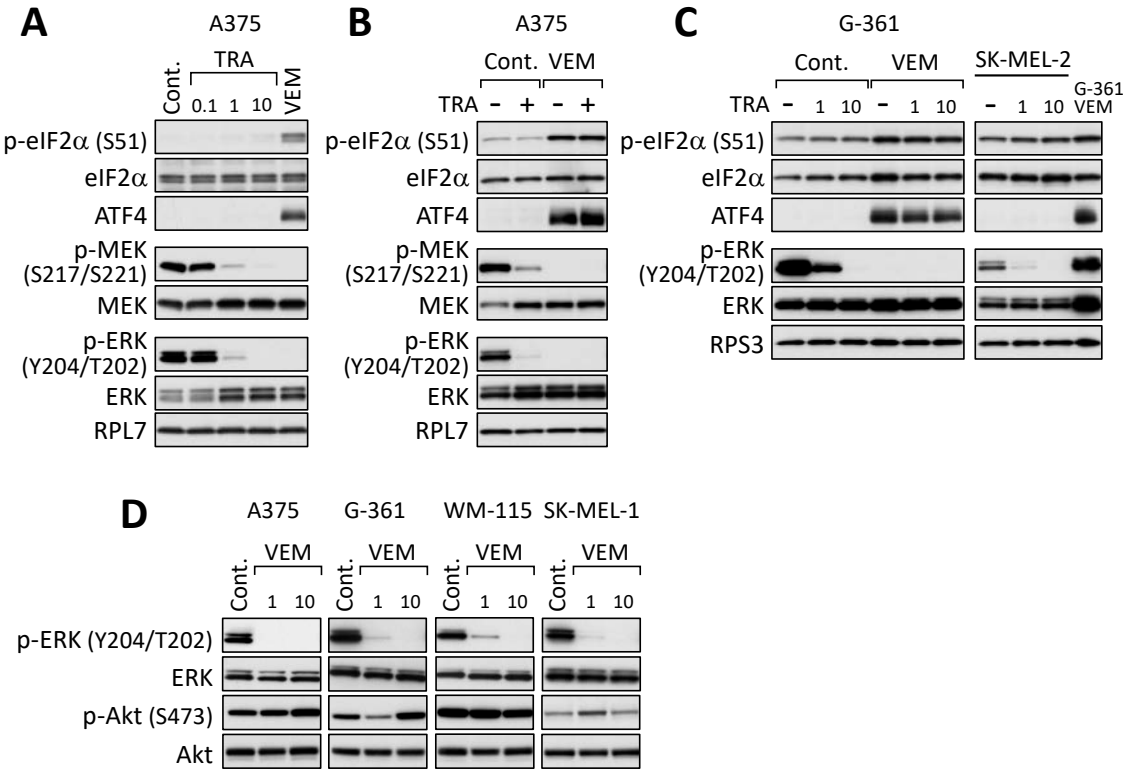


Figure 2. BRAF 下流 MEK-ERK シグナルと Akt シグナルは、vemurafenib による ISR 活性化に関与しない

(A) A375 細胞を trametinib (TRA, 0.1, 1 または 10 nM) または vemurafenib (VEM, 10 μM)で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(B) A375 細胞を trametinib (1 nM) 単独または、vemurafenib (10 μM) と併用して 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(C) G-361 及び SK-MEL-2 細胞を trametinib (1, 10 nM) または、vemurafenib (10 μM) と併用して 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。 (D) $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株を vemurafenib (1 または 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第三節　Vemurafenib は GCN2 を介して ISR 活性化を引き起こす

Vemurafenib による ISR 活性化に関与する eIF2αキナーゼを同定するため、これまでに知られている 4 種の eIF2αキナーゼそれぞれに対する siRNA を用いたノックダウン実験を行った。その結果、A375 及び HT-29 細胞において、アミノ酸飢餓センサー分子である GCN2 のノックダウンにより vemurafenib による eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現誘導が抑制されることを見出した（Fig. 3A 及び Supplementary Fig. S1A: alternative siRNA)。これに対して、他の eIF2αキナーゼである PERK、PKR 及び HRI のノックダウンは vemurafenib による ISR 活性化に影響を与えなかった（Fig. 4A 及び Supplementary Fig. S1B-S1D)。ただし、HRI のノックダウンは、異なる配列の 2 種の siRNA を用いても他の eIF2αキナーゼに比べて十分なノックダウン効率が得られなかった。

Vemurafenib 処理により GCN2 の活性化が誘導されるのか、GCN2 活性化の指標となる 899 番目のスレオニンのリン酸化を解析した[25-27]。その結果、用いた $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株全てにおいて、vemurafenib 10 μM の処理による GCN2 Thr899 のリン酸化誘導を認めた（Fig. 3B)。さらに、vemurafenib 処理による ISR 活性化の経時的変化を検討したところ、A375 及び G-361 細胞において vemurafenib 10 μM の処理より 1 時間後には GCN2 及び eIF2αのリン酸化が生じ、それに続いて 4 時間後から ATF4 の発現誘導が起こり、その後 ATF4 発現量は徐々にベースラインへ戻ることを認めた（Fig. 3C)。

次に、転写因子として働く ATF4 の核における発現誘導を蛍光免疫染色法により検討した。A375 細胞において、核における ATF4 発現は vemurafenib 10 μM を 6 時間処理することで増加し、この発現増加は GCN2 のノックダウンにより抑制され、PERK のノックダウンでは抑制されなかった（Fig. 3D)。これらの結果より、vemurafenib は $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株において GCN2 の活性化を介して ISR 活性化を誘導することを明らかとした。

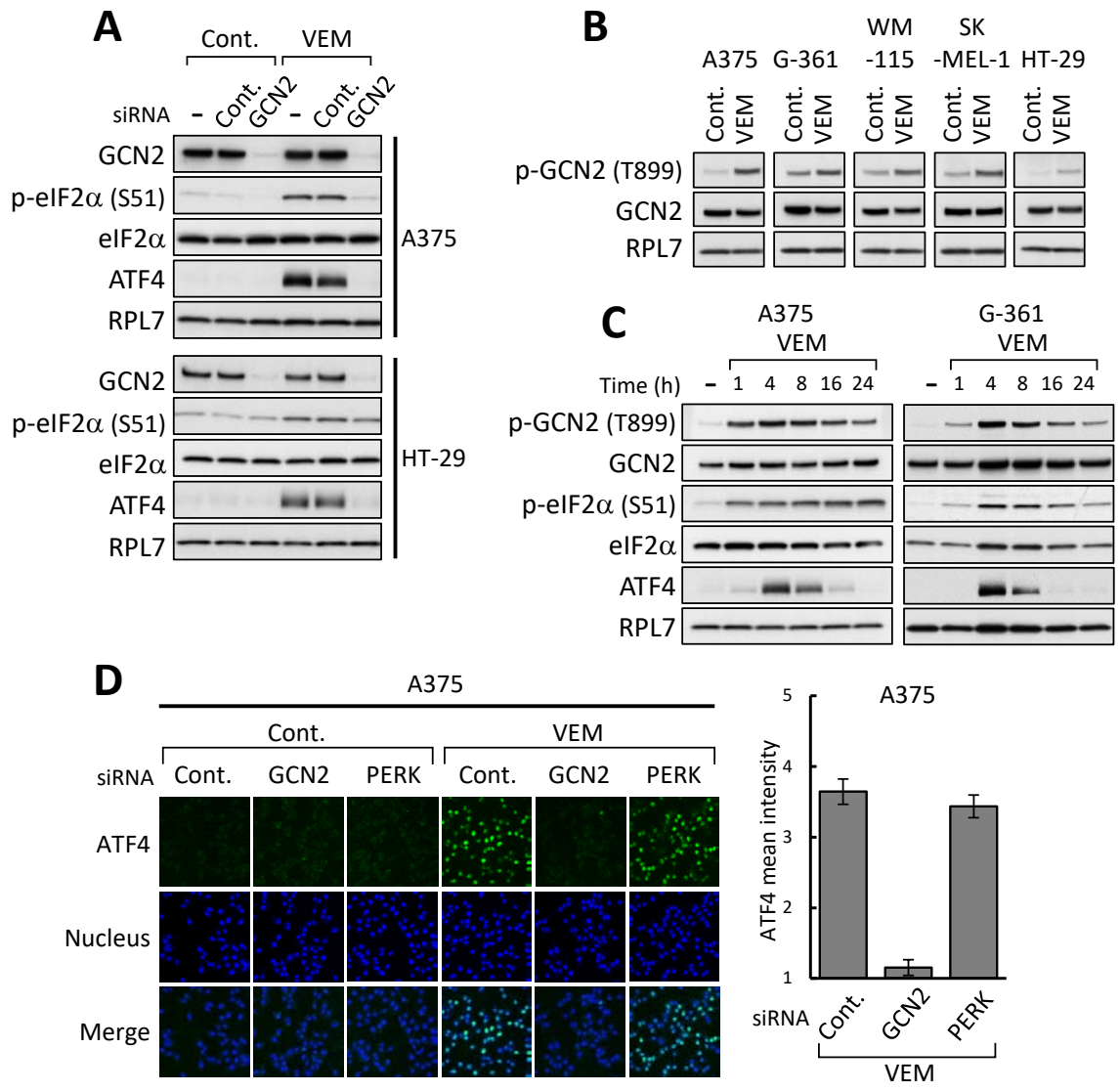


Figure 3. Vemurafenib は GCN2 を介して ISR 活性化を引き起こす

(**A**) A375 及び HT-29 細胞に GCN2 に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**B**) $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株を vemurafenib (10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**C**) A375 及び G-361 細胞を vemurafenib (10 μM) で図中に示す時間でそれぞれ処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**D**) A375 細胞に GCN2 または PERK に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (10 μM) で 6 時間処理した。細胞を固定後、ATF4 に対する抗体を用いて染色した。棒グラフは、コントロール siRNA を導入条件下、薬剤未処理における ATF4 シグナルの intensity を 1 とした時の各条件における核における ATF4 シグナルの intensity を示した (±SD, n=3)。

第四節　PERK 及び小胞体ストレスは vemurafenib による短時間における ISR 活性化に関与しない

先行研究において、vemurafenib による ISR 活性化には小胞体ストレスセンサー分子である PERK の活性化が関与することが提唱されていたため、我々も vemurafenib 処理と小胞体ストレス及び PERK の関与について検証を行った。しかし、A375、G-361 及び WM-115 細胞において、PERK をノックダウンしても vemurafenib による eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現誘導は抑制されなかった（Fig. 4A 及び Supplementary Fig. S1B: alternative siRNA)。さらに、PERK 選択的な阻害剤 GSK2656157 を用いた検討を行った結果、2DG 10 mM 処理条件下においては GSK2656157 0.1 μM の処理により PERK の活性化（高分子量へのバンドシフト）及び ISR 活性化の抑制を認めたが、vemurafenib 10 μM 処理条件下においては GSK2656157 を処理しても ISR の活性化は抑制されなかった（Fig. 4B)。また、小胞体ストレスに対する応答のマーカー分子である glucose-regulated protein 78 (GRP78) のプロモーター活性をレポーターアッセイ法 [28, 29]により測定したところ、小胞体ストレスを誘導する 2DG 及び tunicamycin 処理条件下では明らかな GRP78 のプロモーター活性の上昇を認めたのに対し、vemurafenib 処理条件下ではそのような上昇は認めなかった（Fig. 4C)。GRP78 及び GRP94 タンパク質発現についても vemurafenib 処理条件下において増加しないことを確認した（Fig. 4D)。

次に、マイクロアレイを用いて、A375 細胞における vemurafenib、2DG または tunicamycin 処理時の遺伝子発現変動を解析した（Fig. 4E 及び Supplementary Table 1)。クラスタリング解析の結果、vemurafenib と 2DG 及び tunicamycin 間で共通して変動したプローブは全体の一部分に限られていた。全ての条件で共通して発現上昇を認めた 114 プローブセットに対し、Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、このクラスターにはアミノ酸の生合成に関わる遺伝子が多く含まれていることが示唆された（Table 1 及び Supplementary Table S2)。一方、2DG 及び tunicamycin 処理による小胞体ストレ

ス負荷時に発現上昇した 207 プローブセットに対し GO 解析を行った結果、小胞体に関連する遺伝子が上位にエンリッチしていた（Table 2 及び Supplementary Table S3)。これらの結果より、vemurafenib を短時間で処理した $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株では、小胞体ストレス及び PERK の活性化は誘導されないことが示唆された。

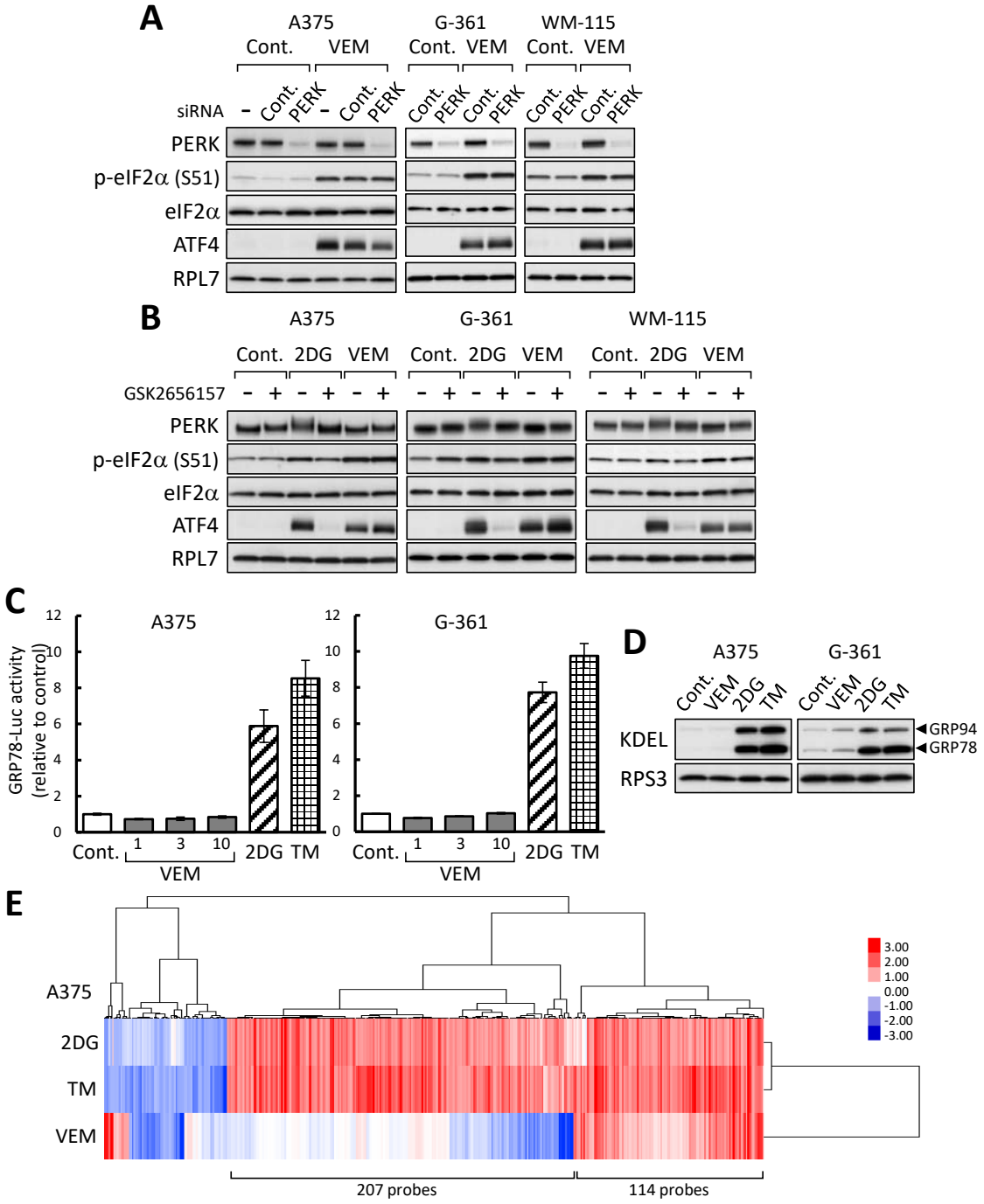

A
A375
G-361
WM-115
Cont.
VEM
siRNA
Cont.
PERK
PERK
p-eIF2α (S51)
eIF2α
ATF4
RPL7
B
A375
G-361
WM-115
Cont.
2DG
VEM
GSK2656157
C
A375
G-361
GRP78-Luc activity (relative to control)
Cont.
1
3
10
2DG
TM
VEM
D
KDEL
RPS3
GRP94
GRP78
E
A375
2DG
TM
VEM
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00
-2.00
-3.00
207 probes
114 probes

Figure 4. PERK 及び小胞体ストレスは vemurafenib による短時間における ISR 活性化に
関与しない
(**A**) $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株に PERK に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**B**) $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株に GSK2656157 (0.1 μM) を 1 時間前処理し、その後 2DG (10 mM) または vemurafenib (10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**C**) A375 及び G361 細胞に pGRP78pro 160-Luc を導入した後、vemurafenib (1, 3 または 10 μM)、2DG (10 mM) または tunicamycin (TM, 1 μg/ml) で 18 時間処理し、GRP78 プロモーター活性をレポーターアッセイ法により測定した (±SD, n=3)。(**D**) A375 及び G361 細胞を vemurafenib (10 μM)、2DG (10 mM) または tunicamycin (1 μg/ml) で 18 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。抗 KDEL 抗体は GRP78 及び GRP94 を検出する。(**E**) A375 細胞に vemurafenib (10 μM)、2DG (10 mM) または tunicamycin (1 μg/ml) を 6 時間処理し、精製した RNA を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。薬剤未処理の条件に対し 2 倍以上の発現上昇または 2 分の 1 以下の発現低下を認めた 395 プローブについて、クラスター解析を行った。

Table 1. A375 細胞における vemurafenib、2DG または tunicamycin 処理時に共通して発現上昇を認めた 114 プローブセットに対する GO 解析結果

*Rank**	*Category*	*Term*	*PValue*	*FDR†*
1	SP_PIR_KEYWORDS	amino-acid biosynthesis	3.05E-06	3.61E-03
2	GOTERM_BP_FAT	GO:0008652~cellular amino acid biosynthetic process	4.02E-06	6.22E-03
3	GOTERM_BP_FAT	GO:0009070~serine family amino acid biosynthetic process	1.62E-05	2.51E-02

*上位 3 terms を記載した（全ての解析結果は Supplementary Table S2 を参照)。

† FDR, false discovery rate.

Table 2. A375 細胞における 2DG または tunicamycin 処理時に共通して発現上昇を認めた 207 プローブセットに対する GO 解析結果

*Rank**	*Category*	*Term*	*PValue*	*FDR†*
1	SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	3.05E-11	3.82E-08
2	GOTERM_CC_FAT	GO:0005783~endoplasmic reticulum	4.88E-11	6.13E-08
3	GOTERM_CC_FAT	GO:0044432~endoplasmic reticulum part	2.20E-09	2.76E-06

*上位 3 terms を記載した（全ての解析結果は Supplementary Table S3 を参照)。

† FDR, false discovery rate.

第五節　Vemurafenib による ISR に制御される遺伝子の解析

A375 細胞における vemurafenib 処理条件下における遺伝子発現変動のうち、GCN2-ATF4 経路によって制御される遺伝子をマイクロアレイ解析により探索した。GCN2 または ATF4 をノックダウンした A375 細胞を、vemurafenib 10 μM で 6 時間処理し、精製した RNA をマイクロアレイ解析に用いた。クラスタリング解析の結果、vemurafenib 処理によって変動する大部分の遺伝子は、GCN2 または ATF4 のノックダウンによる影響を受けなかった（Fig. 5A 及び Supplementary Table S4)。それらの中には、キナーゼシグナルやアポトーシス制御に関与する JUN, MCL1 及び CDC41EP3 等の遺伝子が含まれていた。Vemurafenib 処理によって発現上昇し、GCN2 または ATF4 のノックダウンによって発現が抑制された 22 プローブには、セリンの生合成及び代謝に関与する遺伝子、phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1)、phosphoserine phosphatase (PSPH)、cystathionine-β-synthase（CBS）及び cystathionine-γ-lyase（CTH）が含まれていた (Fig. 5A 右、影付きの遺伝子)[30, 31]。これらの遺伝子は ATF4 による転写制御を受けることが報告され [32, 33]、さらにこれらの遺伝子がコードするセリン生合成及び代謝を触媒する酵素は、近年がん細胞の増殖における重要性が示唆されている [34, 35]。実際に、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株において vemurafenib を 8 から 24 時間処理することで PSAT1、PSPH、CBS 及び CTH のタンパク質発現量が増加することを認めた（Fig. 5B)。以上の結果より、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株において vemurafenib 処理によって活性化した GCN2-ATF4 経路の下流では、アミノ酸の生合成、特にセリンの生合成及び代謝が増強されることが示唆された。

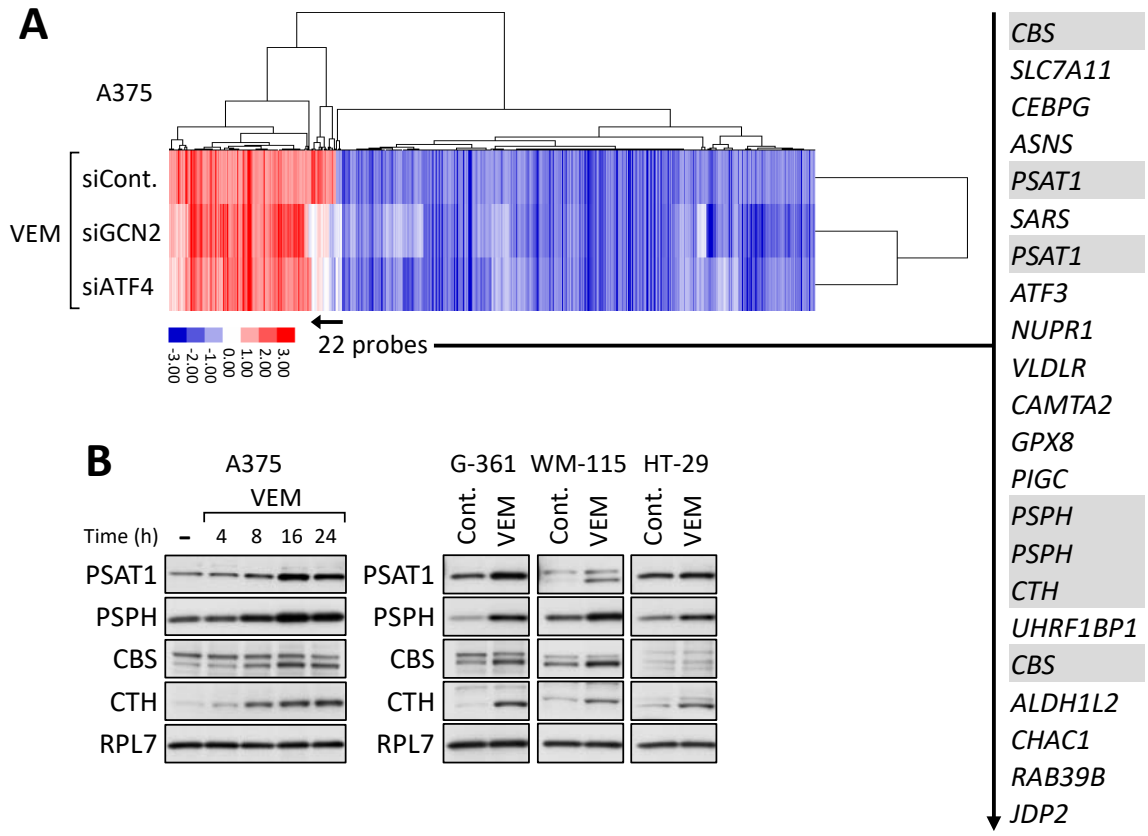


Figure 5. Vemurafenib による ISR に制御される遺伝子の解析

(**A**) A375 細胞に GCN2 または ATF4 に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 6 時間処理し、精製した RNA を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。コントロール siRNA 導入後、薬剤未処理条件に対し vemurafenib 処理条件において 2 倍以上の発現上昇または 2 分の 1 以下の発現低下を認めた 563 プローブについて、クラスター解析を行った。右に示した 22 プローブの遺伝子名のうち、セリンの生合成及び代謝経路に関与する遺伝子名を影付きで示した。(**B**) $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株を vemurafenib (10 μM) で図中に示す時間でそれぞれ処理したライゼート (左: A375) または 24 時間処理したライゼート (右: G-361 及び WM-115) を調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第六節　ATF4 ノックダウンは vemurafenib による細胞増殖阻害を増強する

Vemurafenib による ISR 活性化が細胞増殖に与える影響について、ATF4 をノックダウンすることで検討した。ATF4 に対する siRNA を導入した A375 細胞では、vemurafenib 処理による ATF4 発現誘導が効果的に抑制された（Fig. 6A 及び Supplementary Fig. S2A: alternative siRNA)。ATF4 をノックダウンした A375 細胞を vemurafenib 10 μM で 24 時間処理し、その後、細胞を播き直して vemurafenib 不含有培地で 7 日間培養した。形成したコロニーを観察したところ、ATF4 のノックダウンのみでは細胞増殖能に大きな影響を与えず、vemurafenib 処理のみでは薬剤未処理の細胞に比べて細胞増殖がおよそ 60%に抑制された（Fig. 6B 及び Supplementary Fig. S2B: alternative siRNA)。ATF4 のノックダウンと vemurafenib を共処理した細胞では、薬剤未処理の細胞に比べて細胞増殖がおよそ 30%にまで抑制された（Fig. 6B 及び Supplementary Fig. S2B)。この結果より、vemurafenib による GCN2 を介した ISR の活性化は vemurafenib の作用に対し細胞防御に働くことが示唆された。一方で、GCN2 に対するノックダウンでは vemurafenib に対する感受性の増強は認められなかった (Fig. 6C)。この正確な原因は明らかではないが、GCN2 ノックダウンでは ATF4 下流の転写プログラムが完全に抑制されず、vemurafenib に対する感受性化作用が減弱したと考えられる。実際に GCN2 のノックダウンでは ATF4 のノックダウンに比べ、vemurafenib に誘導される ATF4 発現の抑制効果が弱いことを認めた（Fig. 6D)。従って、vemurafenib に対する感受性の増強には強い ATF4 の抑制が必要と考えられる。ATF4 ノックダウンによる vemurafenib の細胞増殖阻害作用の増強は、他の $BRAF^{V600E}$ 変異型メラノーマ細胞株 G-361 においても同様に観察された（Supplementary Fig. S2C 及び S2D)。

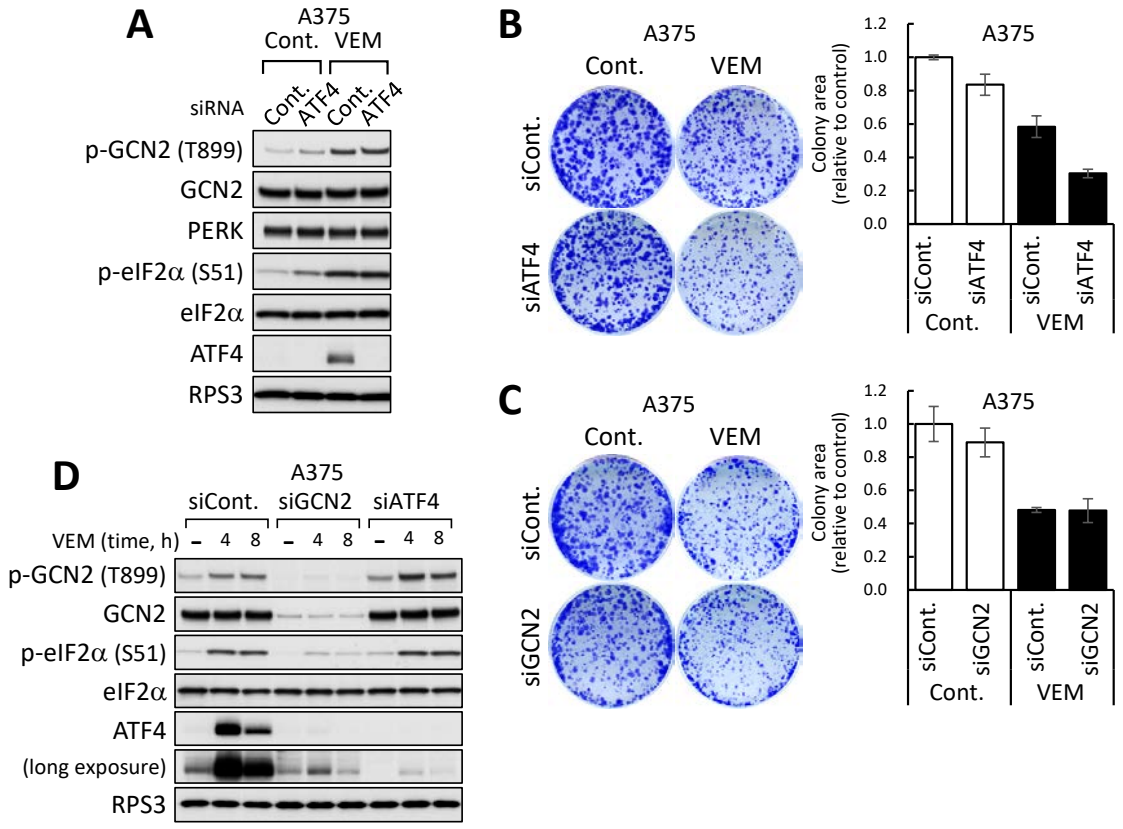


Figure 6. ATF4 ノックダウンは vemurafenib による細胞増殖阻害を増強する
(**A**) A375 細胞に ATF4 に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**B, C**) A375 細胞に ATF4 (**B**) または GCN2 (**C**) に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (10 μM) で 24 時間処理し、細胞を 6 ウェルプレートに播き直し、薬剤不含有の培地で 7 日間培養した。形成したコロニーをクリスタルバイオレットで染色し、ウェルごとのコロニー面積を棒グラフに示した (±SD, n=3)。(**D**) A375 細胞に GCN2 または ATF4 に対する siRNA を導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 または 8 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第二章　Vemurafenib による ISR に対する選択的阻害剤の探索

GCN2 を介した ISR の活性化は vemurafenib の細胞増殖阻害作用に対して細胞保護的に働いたことから、ISR が vemurafenib の治療効果を向上させる新たな治療標的として有用であると考えた。そこで、vemurafenib による ISR 活性化を選択的に抑制する低分子化合物を探索することとした。

第一節　mTOR 阻害剤及び PI3K 阻害剤はストレスの種類非選択的に ATF4 発現誘導を抑制する

Vemurafenib による ISR を阻害する低分子化合物の探索リソースとして 355 種のキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いて、ATF4 蛍光免疫染色法によるスクリーニングを行った。A375 細胞に vemurafenib 10 μM と各キナーゼ阻害剤 2 μM を 6 時間共処理した後、細胞を固定し核内における ATF4 発現を蛍光免疫染色により検出した。コントロールに対し vemurafenib 処理によって上昇した ATF4 の intensity を 100%とし、各キナーゼ阻害剤を共処理した時の ATF4 intensity をグラフに示した（Fig. 7A)。355 種のキナーゼ阻害剤の中には、ATF4 発現を vemurafenib よりもさらに誘導するもの、逆に抑制するものが含まれていた。特に ATF4 発現を強く抑制したキナーゼ阻害剤には、mammalian target of rapamycin（mTOR）阻害剤や phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) 阻害剤が多く含まれていた（Fig. 7A)。次に、それらの mTOR 及び PI3K 阻害剤の中から、AZD8055、PP242、BEZ235、PI-103 及び ZSTK474 の ATF4 発現抑制作用のストレス選択性を検討した。A375 細胞にそれぞれの阻害剤または PERK 阻害剤 GSK2656157 と vemurafenib、2DG、tunicamycin または L-histidinol（アミノ酸飢餓をミミックするヒスチジン誘導体）を処理した時の ATF4 発現を蛍光免疫染色法により検出した結果、GSK2656157 は PERK 誘導性の ATF4 発現（2DG 及び tunicamycin）に選

択的な阻害作用を示したのに対し、mTOR 及び PI3K 阻害剤は全てのストレッサー処理条件下においてATF4発現誘導を抑制した（Fig. 7B及び7C)。ただし、特にvemurafenib、2DG、L-histidinol 処理による ATF4 発現誘導が強く抑えられ、それに比較して tunicamycin 処理による ATF4 発現誘導はやや弱く抑制される傾向を認めた。これらの mTOR 及び PI3K 阻害剤は、mTOR シグナルを強力に阻害することでタンパク質翻訳を抑制し、ATF4 の発現誘導を阻害したものと考えられる。以上より、mTOR 及び PI3K 阻害剤は vemurafenib による ATF4 発現誘導を強く抑制したものの、vemurafenib に選択的な作用ではなかったため治療薬の候補には適していないと考えた。

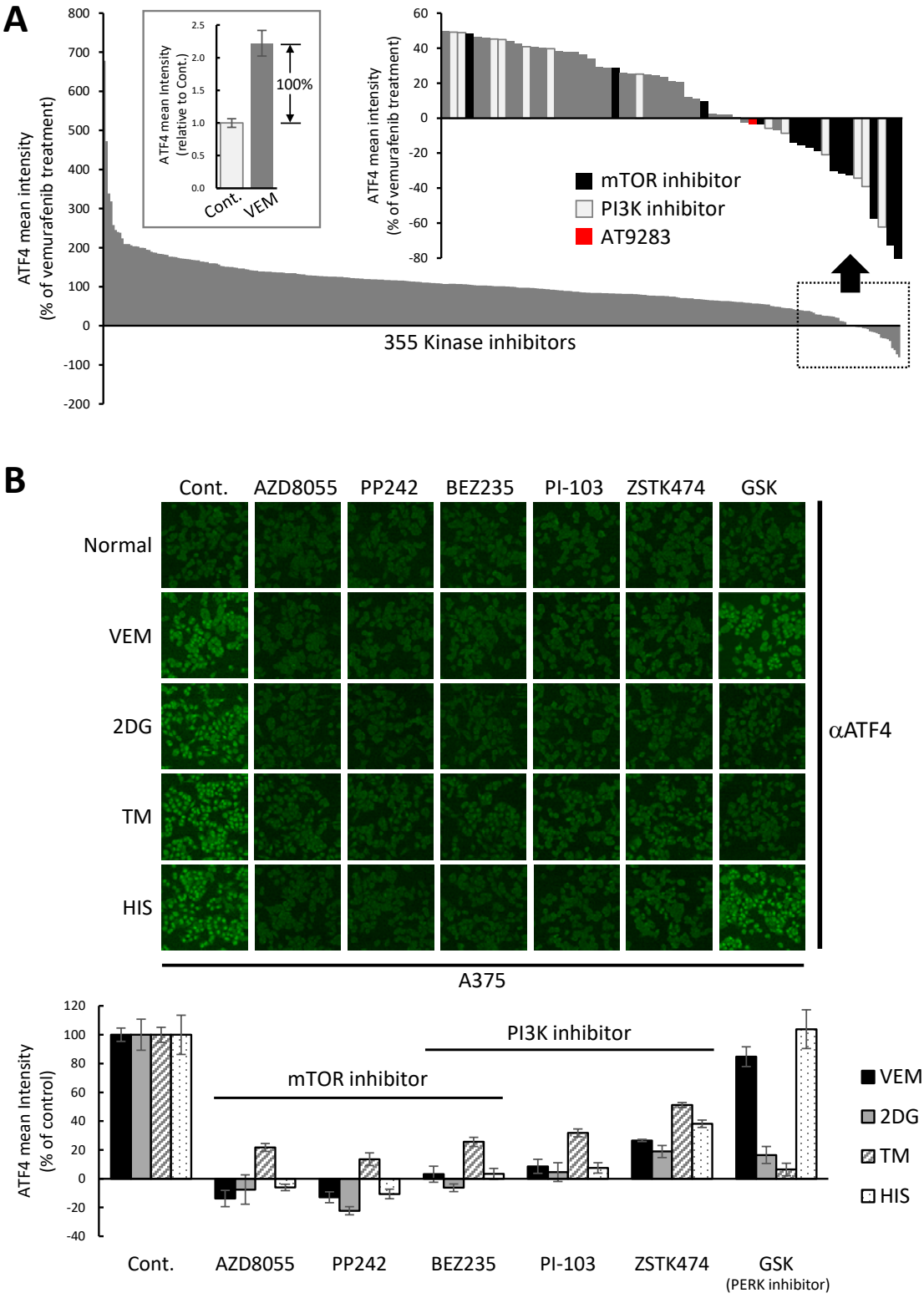

A
ATF4 mean intensity (% of vemurafenib treatment)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
-200
355 Kinase inhibitors
ATF4 mean Intensity (relative to Cont.)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
100%
Cont.
VEM
ATF4 mean intensity (% of vemurafenib treatment)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
mTOR inhibitor
PI3K inhibitor
AT9283
B
Cont.
AZD8055
PP242
BEZ235
PI-103
ZSTK474
GSK
Normal
VEM
2DG
TM
HIS
αATF4
A375
ATF4 mean Intensity (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
mTOR inhibitor
PI3K inhibitor
VEM
2DG
TM
HIS
Cont.
AZD8055
PP242
BEZ235
PI-103
ZSTK474
GSK
(PERK inhibitor)

Figure 7. mTOR 阻害剤及び PI3K 阻害剤はストレスの種類非選択的に ATF4 発現誘導を抑制する

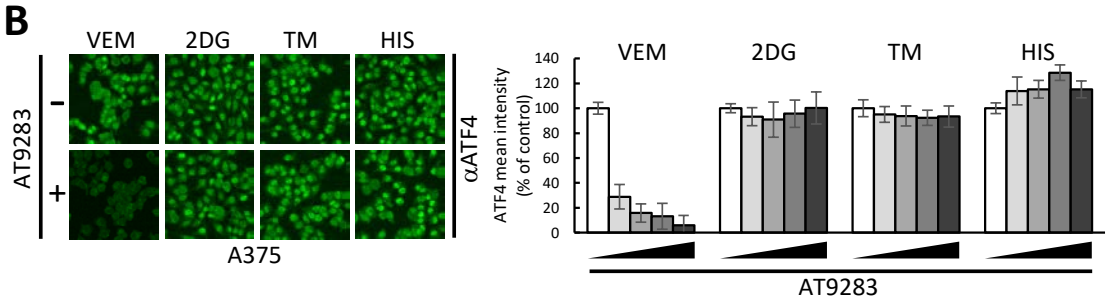
(A) A375 細胞に各キナーゼ阻害剤（2 μM）と vemurafenib（VEM, 10 μM）を 6 時間共処理し、細胞を固定後、ATF4 に対する抗体を用いて染色した。グラフは横軸に 355 種のキナーゼ阻害剤を示し、縦軸に vemurafenib 処理によって上昇した ATF4 シグナルの intensity を 100%とした時の各キナーゼ阻害剤処理条件下における ATF4 シグナルの intensity を示した。黒色で示した棒グラフは mTOR 阻害剤、グレー色で示した棒グラフは PI3K 阻害剤、赤色で示した棒グラフは AT9283（第二節参照）を示した。**(B)** A375 細胞に AZD8055、PP242、BEZ235、PI-103、ZSK474（全て 2 μM）または GSK2656157（0.1 μM）と vemurafenib（10 μM）を 6 時間共処理し、細胞を固定後、ATF4 に対する抗体を用いて染色した。棒グラフは、各ストレッサーのみを処理した時の ATF4 シグナルの intensity を 100%とした時の各キナーゼ阻害剤処理条件下における ATF4 シグナルの intensity を示した（±SD, n=3)。

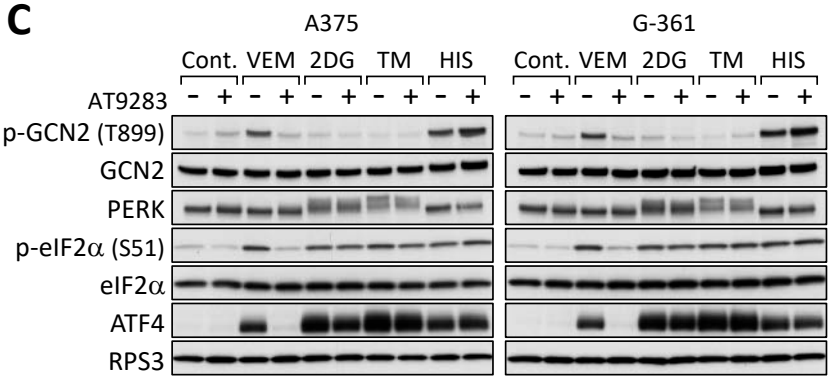
第二節　AT9283 は vemurafenib による ATF4 発現誘導を選択的に抑制する

スクリーニングを行ったキナーゼ阻害剤の中で mTOR 阻害剤や PI3K 阻害剤と同様に vemurafenib による ATF4 発現誘導を強く抑制する阻害剤として、janus kinase (JAK) 2/3 阻害剤として知られる AT9283 が含まれていた（Fig. 7A 及び Fig. 8A)。AT9283 は、2DG、tunicamycin 及び L-histidinol 処理によって誘導される ATF4 発現は抑制せず、vemurafenib 処理によって誘導される ATF4 発現を強く抑制した（Fig. 8B)。AT9283 の各ストレス条件における eIF2α キナーゼ及び eIF2αのリン酸化に与える影響を検討した結果、AT9283 は vemurafenib 処理によって誘導される GCN2 のリン酸化を選択的に抑制し、L-histidinol 処理による GCN2 の活性化及び 2DG と tunicamycin 処理による PERK の活性化は抑制しなかった（Fig. 8C)。AT9283 による vemurafenib 誘導性の ATF4 発現抑制作用は 10 nM から 1 μM にかけて濃度依存的に生じ、さらに dabrafenib による GCN2 を介した ISR も同様に抑制することを認めた（Fig. 8D)。以上より、AT9283 は BRAF 阻害剤 vemurafenib 及び dabrafenib によって誘導される ISR を選択的に抑制する ISR 阻害剤であると考えられる。

A AT9283

Chemical Formula: $C_{19}H_{23}N_7O_2$
Molecular Weight: 381.44





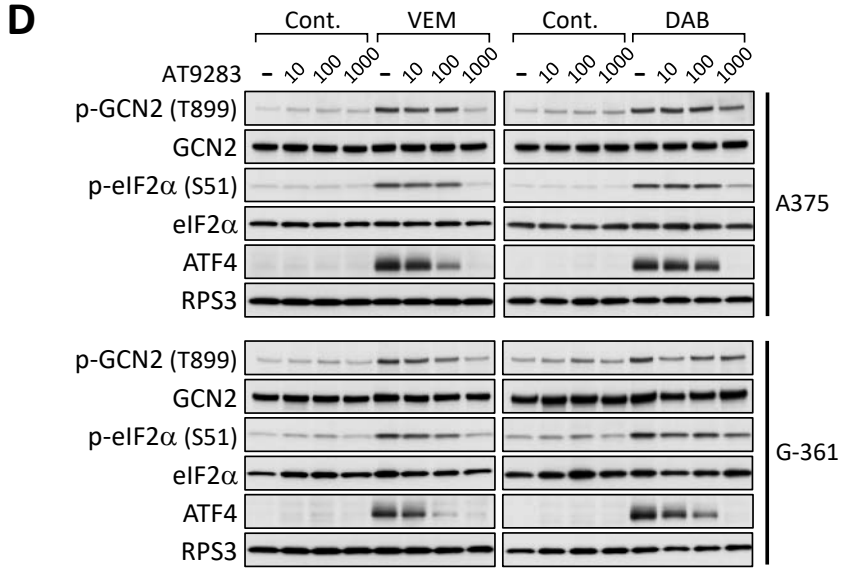


Figure 8. AT9283 は vemurafenib による ATF4 発現誘導を選択的に抑制する
(**A**) AT9283 の構造、化学構造式及び分子量を示した。(**B**) A375 細胞に AT9283 (0, 0.1, 0.2, 0.5 または 1 μM) と vemurafenib (VEM, 10 μM)、2DG (10 mM)、tunicamycin (TM, 1 μg/ml) または L-histidinol (HIS, 2 mM) を 6 時間共処理し、細胞を固定後、ATF4 に対する抗体を用いて染色した。棒グラフは、各ストレッサーのみを処理した時の ATF4 シグナルの intensity を 100%とした時の各濃度の AT9283 処理条件下における ATF4 シグナルの intensity を示した (±SD, n=3)。(**C**) A375 及び G-361 細胞株に AT9283 (1 μM) と vemurafenib (10 μM)、2DG (10 mM)、tunicamycin (1 μg/ml) または L-histidinol (2 mM) を 4 時間共処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**D**) A375 及び G-361 細胞株に AT9283 (0, 0.01, 0.1 または 1 μM) と vemurafenib (10 μM)、または dabrafenib (DAB, 1 μM) を 4 時間共処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第三節　AT9283 は vemurafenib によって誘導されるアミノ酸代謝の恒常性を維持するための応答を抑制する

Vemurafenib、AT9283 及びそれらの共処理によって変動する遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を用いて検討した。A375 細胞に vemurafenib 10 μM と AT9283 1 μM をそれぞれ単独または併用して 6 時間処理し、精製した RNA をマイクロアレイ解析に用いた。クラスタリング解析の結果、vemurafenib 処理によって発現が上昇した遺伝子のうち、AT9283 の共処理によって 112 プローブの発現が強く抑制され、130 プローブの発現が中程度に抑制された（Fig. 9A 及び Supplementary Table S5)。これらのプローブセットに対し、GO 解析を行った結果、112 プローブセットのクラスターにはアミノ酸のトランスポーター活性に関わる遺伝子が多く含まれていることが示唆され、130 プローブセットのクラスターにはアミノ酸の生合成に関わる遺伝子が多く含まれていることが示唆された。(Supplementary Table S6 及び S7)。さらに、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の結果、アミノ酸の枯渇状態に発現上昇する遺伝子が vemurafenib 単独処理に対して AT9283 を併用することで、抑制されることが示唆された（Fig. 9B)。AT9283 は vemurafenib が誘導するアミノ酸代謝の恒常性を維持するための応答を抑制すると考えられる。

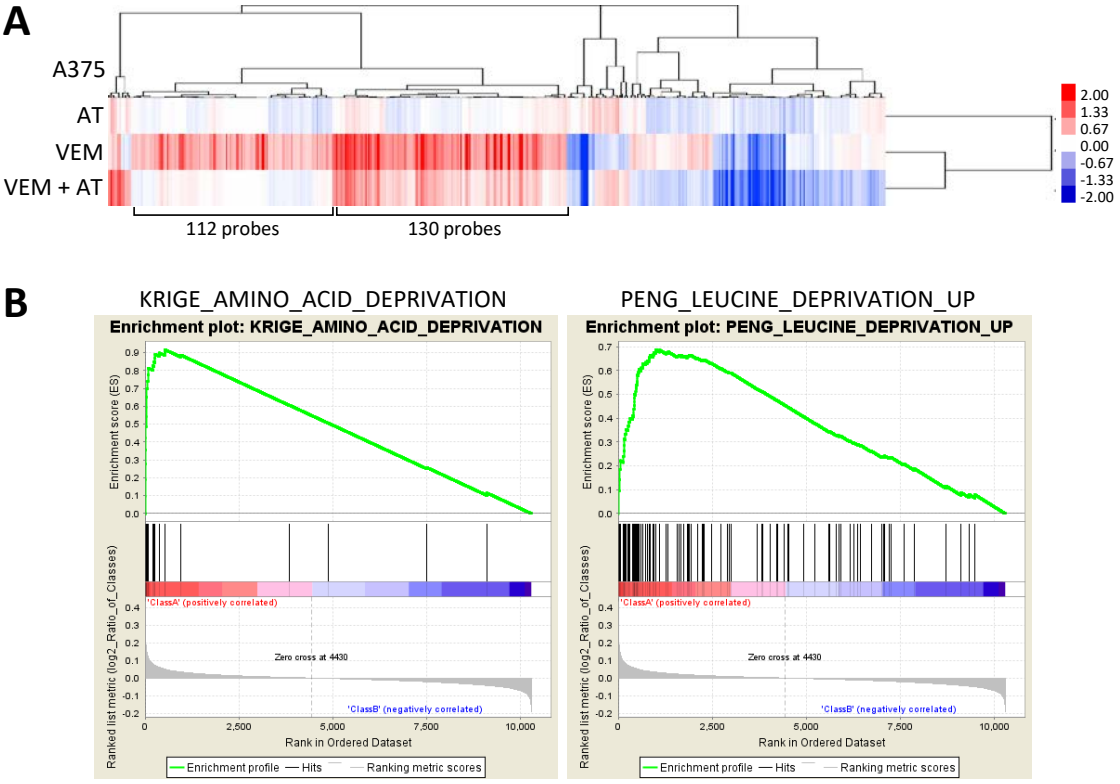


Figure 9. AT9293 は vemurafenib によって誘導されるアミノ酸代謝の恒常性を維持するための応答を抑制する

(A) A375 細胞に vemurafenib (VEM, 10 μM) と AT9283 (AT, 1 μM) をそれぞれ単独または併用して 6 時間処理し、精製した RNA を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。Vemurafenib 単独処理条件に対し、AT9283 の併用によって 1.5 倍以上の発現上昇または 0.75 倍以下の発現低下を認めた 432 プローブについてクラスター解析を行った。**(B)** 全 54675 プローブのうち、vemurafenib 単独処理条件または vemurafenib と AT9283 の共処理条件のどちらかにおいてシグナル強度 50 未満のものを除去した 17737 プローブを用いて GSEA 解析を行った。

第四節　AT9283 は vemurafenib と併用することで相乗的に細胞死を誘導する

AT9283 が vemurafenib の薬理作用に与える影響を検討した。A375 細胞において、vemurafenib または dabrafenib に AT9283 を併用して 16 時間処理した結果、それぞれの単独処理に比べ、相乗的なカスパーゼ 3/7 活性の上昇を認めた（Fig. 10A)。さらに、A375 及び G-361 細胞において、vemurafenib または dabrafenib に AT9283 を併用した結果、アポトーシスの指標となる poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の切断の増加を認めた（Fig. 10B)。これらの結果より、vemurafenib 及び dabrafenib に AT9283 を併用することで、相乗的にアポトーシスが誘導されることが示された。次に、アポトーシス誘導の結果として、これらの薬剤の併用による細胞増殖への影響を検討した。A375 及び G-361 細胞において vemurafenib と AT9283 を 16 時間共処理し、その後細胞を播き直して 96 時間培養した。Vemurafenib 単独の処理ではコントロール条件に対しておよそ 80%まで細胞が再増殖したのに対し、AT9283 の併用によってその増殖が強く抑制された (Fig. 10C)。また、同様に vemurafenib と AT9283 を 16 時間共処理し、その後細胞を播き直して 7 日間（A375）または 14 日間（G-361）培養することで形成したコロニーを観察した場合にも、これらの薬剤の併用による相乗的な細胞増殖阻害効果を認めた（Fig. 10D)。以上より、AT9283 は vemurafenib 及び dabrafenib による ISR を選択的に抑制し、細胞死を誘導する新しい薬剤として有用と考えられる。

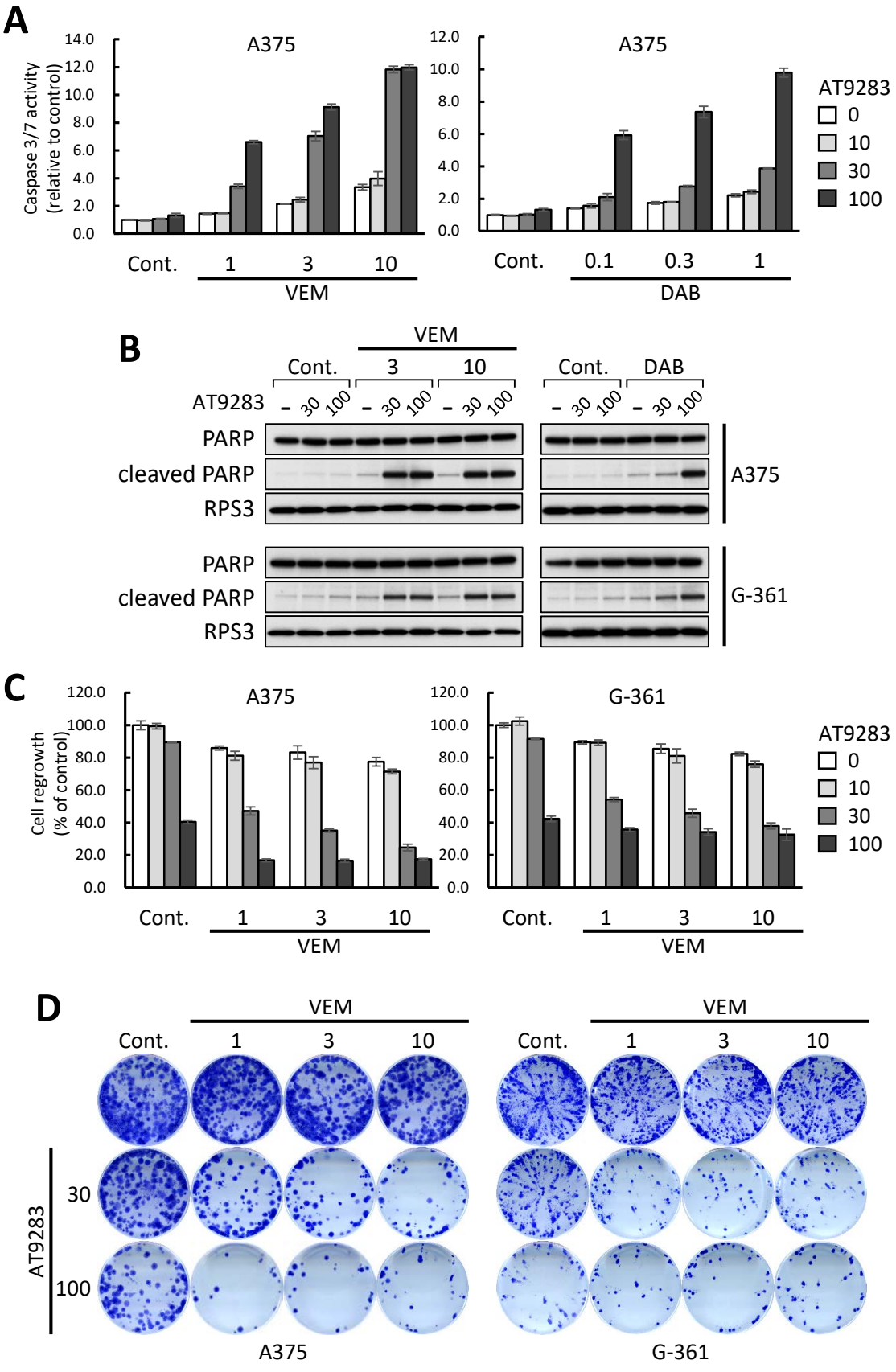

A
A375
Caspase 3/7 activity (relative to control)
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Cont.
1
3
10
VEM
A375
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Cont.
0.1
0.3
1
DAB
AT9283
0
10
30
100
B
VEM
Cont.
3
10
Cont.
DAB
AT9283
-
30
100
PARP
cleaved PARP
RPS3
A375
G-361
C
A375
G-361
Cell regrowth (% of control)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
Cont.
1
3
10
VEM
AT9283
0
10
30
100
D
VEM
Cont.
1
3
10
AT9283
30
100
A375
G-361

Figure 10. AT9283 は vemurafenib と併用することで相乗的に細胞死を誘導する
(**A**) A375 細胞に vemurafenib (VEM, 1, 3 または 10 μM) または dabrafenib (DAB, 0.1, 0.3 または 1 μM) と AT9283 (0, 10, 30 または 100 nM) を 16 時間共処理し、カスパーゼ 3/7 活性を測定した (±SD, n=3)。(**B**) A375 及び G-361 細胞に vemurafenib (3 または 10 μM) または dabrafenib (1 μM) と AT9283 (30 または 100 nM) を 16 時間共処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**C**) A375 及び G-361 細胞に vemurafenib (1, 3 または 10 μM) と AT9283 (0, 10, 30 または 100 nM) を 16 時間共処理した後、細胞を播き直した。薬剤不含有の培地で 96 時間培養した後、細胞生存率を ATP アッセイ法により測定した (±SD, n=3)。(**D**) A375 及び G-361 細胞に vemurafenib (1, 3 または 10 μM) と AT9283 (30 または 100 nM) を 16 時間共処理した後、細胞を 6 ウェルプレートに播き直し、薬剤不含有の培地で 7 日間 (A375) または 14 時間 (G-361) 培養した。形成したコロニーをクリスタルバイオレットで染色した。

第三章　活性変異型 BRAF^{V600E} による ISR 制御機構の解析

第三章では、活性変異型 BRAF そのものの機能に焦点を当て、活性変異型 BRAF がストレス応答シグナルの中でどのような役割を果たしているのか明らかにすることを目指した。そこで、はじめに BRAF のノックダウンが ISR シグナルに与える影響について検討した。

第一節　BRAF^{V600E} 変異型細胞における BRAF ノックダウンはストレスに誘導される ATF4 発現を抑制する

はじめに、BRAF^{V600E} 変異型メラノーマ細胞株である A375 及び G-361 と、BRAF 野生型メラノーマ細胞株 SK-MEL-2 及び MeWo を用いて、BRAF のノックダウンによる ISR への影響を検討した。各細胞株に BRAF に対する siRNA を導入した後、ストレッサーとして L-histidinol、dabrafenib、vemurafenib、tunicamycin または thapsigargin (Ca^{2+}-ATPase 阻害剤）で 4 時間処理し ISR シグナルに対する影響を解析した。その結果、A375 及び G-361 細胞では、BRAF のノックダウンによって GCN2 の活性化を誘導する L-histidinol、dabrafenib 及び vemurafenib 処理による ATF4 発現誘導が抑制された（Fig. 11A 及び Supplementary Fig. S3: alternative siRNA)。同細胞株において、PERK の活性化を誘導する tunicamycin 及び thapsigargin 処理条件下では、BRAF ノックダウンによって ATF4 発現誘導が部分的に抑制された（Fig. 11A 及び Supplementary Fig. S3: alternative siRNA)。これらの条件下において、GCN2 または PERK のリン酸化は BRAF ノックダウンによってやや変動したが、下流の eIF2α のリン酸化は維持されていた。一方、BRAF 野生型細胞株である SK-MEL-2 及び MeWo 細胞では、いずれのストレッサー処理条件下においても BRAF のノックダウンによる ATF4 発現誘導への影響を認めなかった（Fig. 11B)。以上より、BRAF^{V600E} 変異型メラノーマ細

胞株では活性変異型 BRAF によって ISR における ATF4 発現誘導が正に制御されている
ことが示唆された。

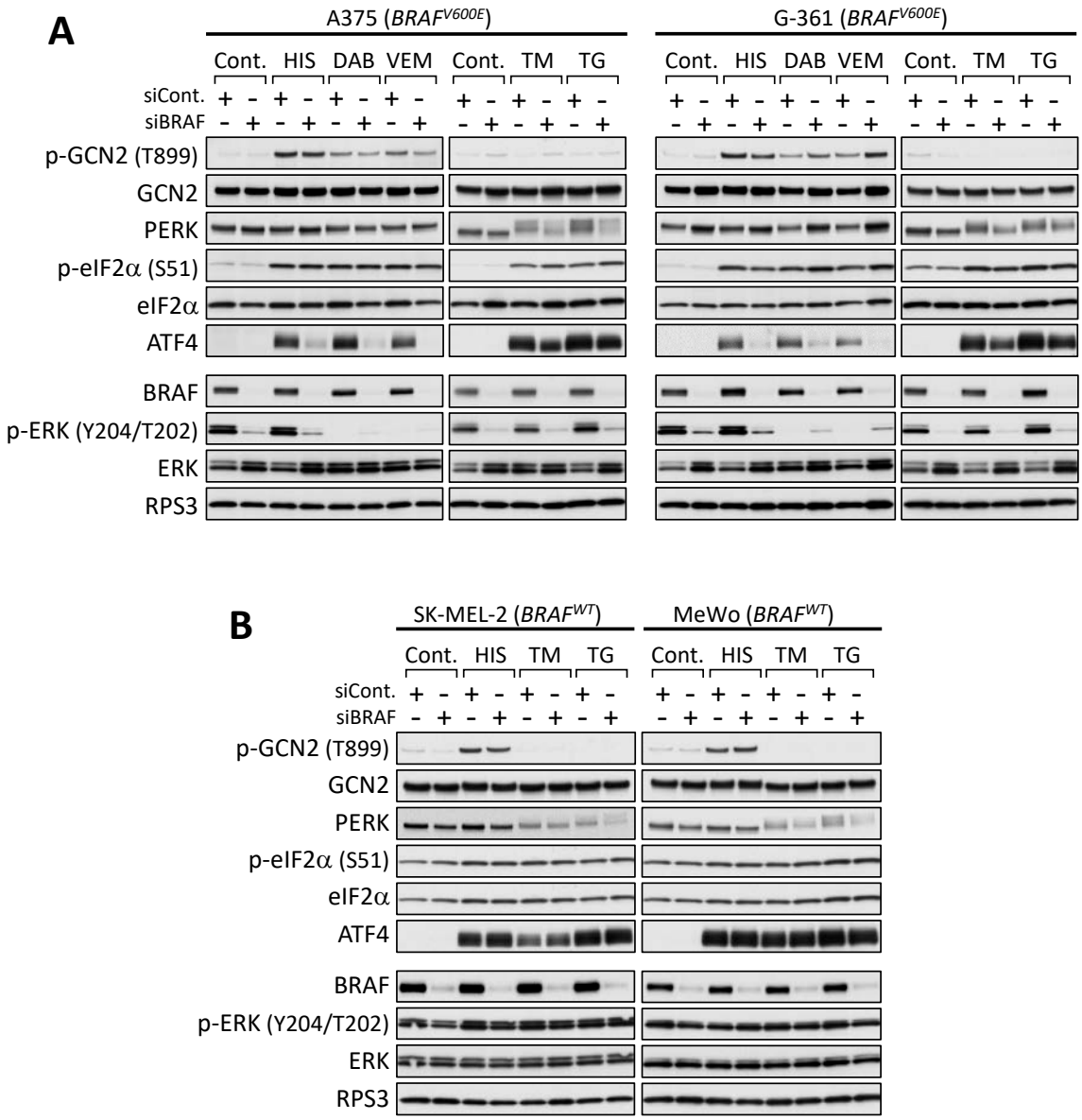


Figure 11. BRAF^{V600E} 変異型細胞における BRAF ノックダウンはストレスに誘導される ATF4 発現を抑制する

(**A**, **B**) A375、G-361、SK-MEL-2 及び MeWo 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM, SK-MEL-2 のみ 20 mM)、dabrafenib (DAB, 1 μM)、vemurafenib (VEM, 10 μM)、tunicamycin (TM, 1 μg/ml, SK-MEL-2 のみ 10 μg/ml) または thapsigargin (TG, 300 nM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第二節　BRAF ノックダウンが ATF4 mRNA 及び uORF に与える影響の検討

BRAF のノックダウンが ATF4 mRNA 発現レベルに影響を与えるのか real-time RT-PCR 法により検討した。A375 細胞において、L-histidinol、dabrafenib、vemurafenib、tunicamycin または thapsigargin 処理によって上昇した ATF4 mRNA レベルは BRAF ノックダウンによって低下した。(Fig. 12A 及び Supplementary Fig. S4A: alternative siRNA)。しかし、Fig. 11A で認めた BRAF ノックダウンによる ATF4 タンパク質の発現抑制のストレス毎のパターンとは相違があった。一方、SK-MEL-2 細胞では BARF ノックダウンによる ATF4 mRNA レベルへの影響は認められなかった（Fig. 12A 及び Supplementary Fig. S4A: alternative siRNA)。

ATF4 mRNA のタンパク質コード領域 5’ 側には二つの small upstream open reading frames（uORFs）が存在し、非ストレス条件下では uORF 上の翻訳が生じるため ATF4 タンパク質は産生されず、ストレス条件下選択的に下流の ATF4 ORF における翻訳が促進される[7,8]。そこで、BRAF ノックダウンが ATF4 uORF に与える影響について、ルシフェラーゼ遺伝子上流に ATF4 の二つの uORF 配列（uORF1 及び uORF2）を組み込んだプラスミドを用いたレポーターアッセイ法[36]により検討した。はじめに、A375 細胞において、L-histidinol、dabrafenib、vemurafenib、tunicamycin または thapsigargin 処理によって ATF4 uORF ルシフェラーゼシグナルは上昇し、それぞれ GCN2 または PERK の阻害剤（GZD824: GCN2 阻害剤、GSK2656157: PERK 阻害剤）の処理によって抑制されることを確認した（Fig. 12B 上段)。次に、BRAF ノックダウンによる ATF4 uORF に対する影響を検討したが、どのストレッサー処理条件においても BRAF ノックダウンによる ATF4 uORF ルシフェラーゼシグナルの変化は認められなかった(Fig. 12B 下段 及び Supplementary Fig. S4B: alternative siRNA)。これらの結果より、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞における BRAF ノックダウンによる ATF4 発現抑制の主となる機序は、ATF4 mRNA レベル及び uORF とは異なると考えた。

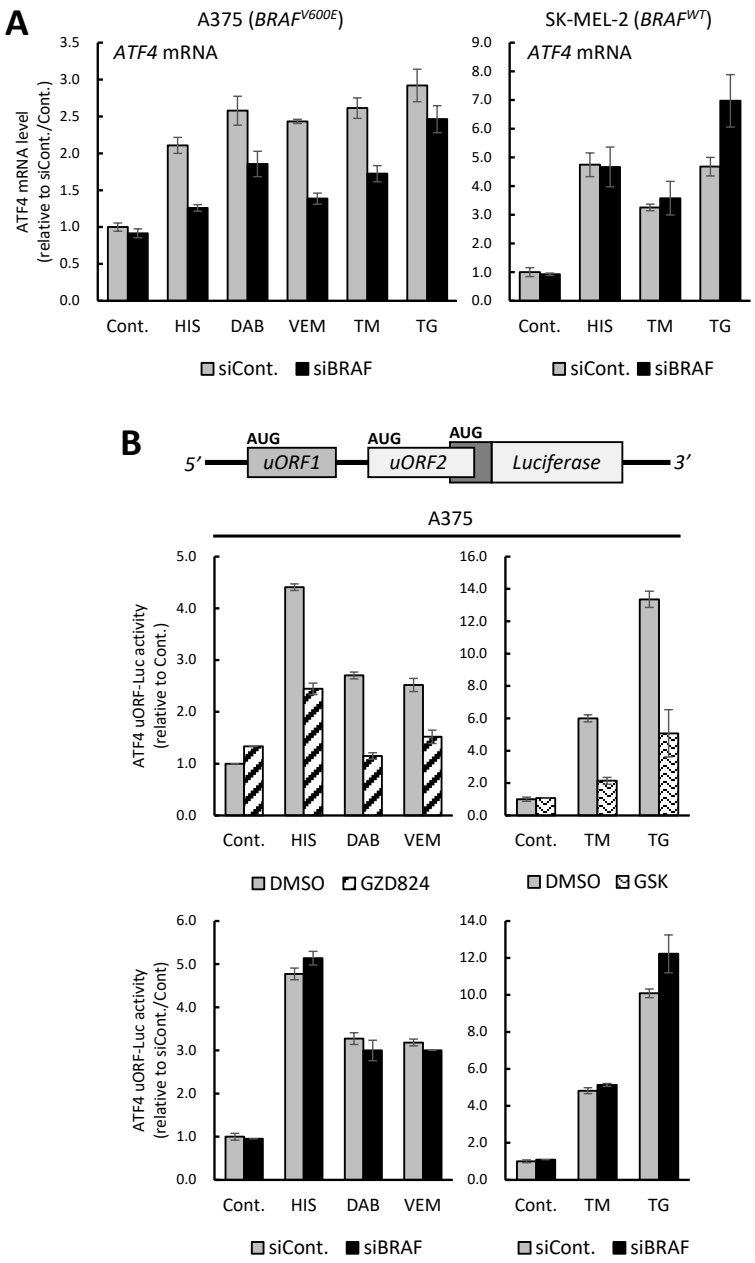


Figure 12. BRAF ノックダウンが ATF4 mRNA 及び uORF に与える影響の検討
(**A**) A375 及び SK-MEL-2 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM, SK-MEL-2 のみ 20 mM)、dabrafenib (DAB, 1 μM)、vemurafenib (VEM, 10 μM)、tunicamycin (TM, 1 μg/ml, SK-MEL-2 のみ 10 μg/ml) または thapsigargin (TG, 300 nM) で 4 時間処理し、精製した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR 法により ATF4 mRNA レベルを測定した。(**B**) 上段: A375 細胞に ATF4 uORF 配列を組み込んだレポータープラスミド pRL-TK pGL3 Luc hATF4 UTR を導入した後、(A) と同様のストレッサーと GCN2 阻害剤 GZD824 (200 nM) または PERK 阻害剤 GSK2656157 (GSK, 300 nM) を 18 時間共処理し、レポーターアッセイを行った (±SD, n=3)。下段: A375 細胞に pRL-TK pGL3 Luc hATF4 UTR と BRAF に対する siRNA を導入した後、(A) と同様のストレッサーを 18 時間処理し、レポーターアッセイを行った (±SD, n=3)。

第三節　$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における BRAF ノックダウンは mTOR シグナル及び翻訳開始因子のリン酸化レベルを抑制する

ATF4 の mRNA レベルはストレス条件下において 2 から 5 倍程度上昇するが（Fig. 12A)、タンパク質発現量は数十倍の強度で増加する（Fig. 11)。このことから ATF4 発現量の変動にはタンパク質の翻訳制御の影響力が大きいと考え、BRAF ノックダウンによって ATF4 の翻訳制御に変化が生じているのか検討した。

まず、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞において BRAF のノックダウンが細胞内の全体的なタンパク質翻訳に影響するのか、ピューロマイシンの取り込みを指標として検討した。その結果、A375 及び G-361 細胞において BRAF ノックダウンによるピューロマイシン取り込みの変化は認めなかった（Fig. 13A 及び Supplementary Fig. S5A)。さらに、L-histidinol または thapsigargin を 4 時間処理した場合においても、ピューロマイシン取り込みに顕著な変化は認められず、各条件における ATF4 発現量の増減とは相関しなかった（Fig. 13A 及び Supplementary Fig. S5A: alternative siRNA)。従って、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞における BRAF ノックダウンによる ATF4 発現誘導の抑制は、細胞内の全体的な新規タンパク質合成の抑制によるものではないと考えた。

次に、アミノ酸代謝調節とタンパク質翻訳制御に関与する mTOR シグナル経路に対する BRAF ノックダウンの影響を検討した。$BRAF^{V600E}$ を発現する A375 及び G-361 細胞では、BRAF ノックダウンにより L-histidinol 処理条件下 70kDa ribosomal protein S6 kinase 1 (p70 S6K) 及び ribosomal protein S6 (S6) のリン酸化レベルが低下した（Fig. 13B 及び Supplementary Fig. S5B: alternative siRNA)。また、A375 細胞において BRAF ノックダウン条件下、dabrafenib または vemurafenib を処理した場合には、dabrafenib 及び vemurafenib 処理によって p70 S6K 及び S6 のリン酸化レベルが低下したが、BRAF のノックダウンによってさらに低下した（Supplementary Fig. S5C)。一方で、野生型 BRAF を発現する SK-MEL-2 及び MeWo 細胞では、L-histidinol 処理によって p70 S6K

及び S6 のリン酸化レベルの低下を認めたが、BRAF ノックダウンによる mTOR シグナルへの影響は認めなかった（Fig. 13B)。

さらに、mTOR シグナルの下流で働く翻訳開始因子に対する BRAF ノックダウンの影響について検討した。タンパク質の翻訳開始因子 eukaryotic translation initiation factor (eIF) の複合体形成は、vemurafenib に対する感受性を規定する因子の一つであることが報告されている [37]。この報告では vemurafenib による BRAF 阻害が eIF4E と eIF4G の結合を低下させることで翻訳活性を抑制することが示されていた。そこで、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における BRAF ノックダウンが eIF4E と eIF4G の結合に影響を与えるのか検討した。BRAF をノックダウンした A375 細胞に L-histidinol または thapsigargin を処理した後、eIF4E が認識するキャップ構造を結合したビーズを用いて eIF4E コンプレックスを精製し、eIF4G の結合量を解析した。しかし、BRAF ノックダウンによる eIF4G 及び eIF4E のもう一つの結合パートナーである 4EBP1 との結合量の変化は認めなかった（Supplementary Fig. S5D)。

そこで、BRAF ノックダウンが翻訳開始因子の活性化に重要なリン酸化レベルに与える影響について検討を行った [38]。その結果、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株である A375 及び G-361 細胞では、BRAF ノックダウンによって eIF4B のリン酸化が強く抑制された（Fig. 13B 及び Supplementary Fig. S5B: alternative siRNA)。また、ストレッサーとして dabrafenib または vemurafenib を用いた場合には、eIF4B のリン酸化は BRAF 阻害剤の処理によってやや抑制されたが、BRAF ノックダウン条件下の方が強く抑制された (Supplementary Fig. S5C)。一方、BRAF 野生型細胞株である SK-MEL-2 及び MeWo 細胞では、BRAF ノックダウンによる eIF4B のリン酸化の抑制は認めなかった（Fig. 13B)。

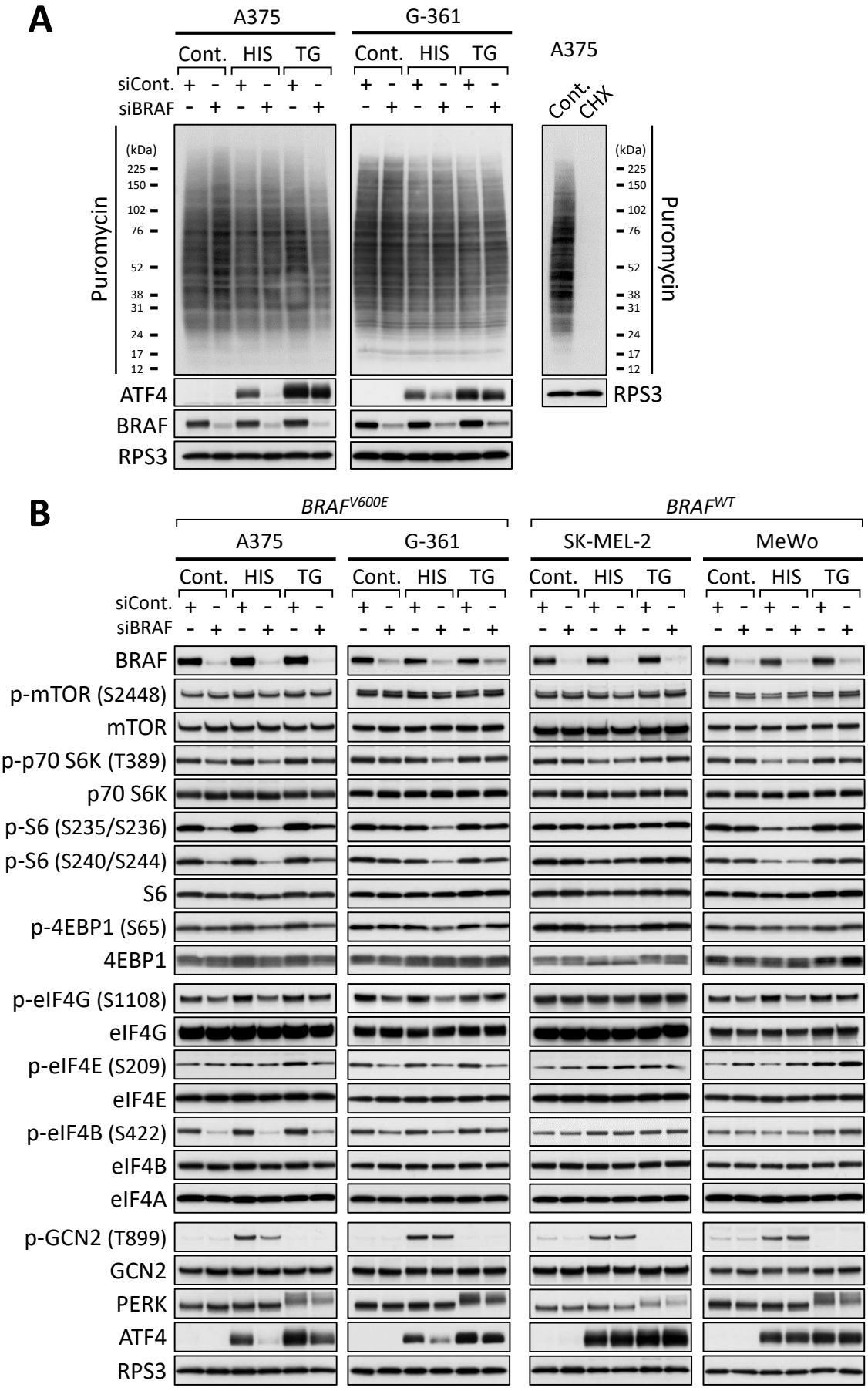

A
A375
G-361
Cont.
HIS
TG
siCont.
siBRAF
A375
Cont.
CHX
(kDa)
225
150
102
76
52
38
31
24
17
12
Puromycin
ATF4
BRAF
RPS3
B
BRAFV600E
BRAFWT
A375
G-361
SK-MEL-2
MeWo
BRAF
p-mTOR (S2448)
mTOR
p-p70 S6K (T389)
p70 S6K
p-S6 (S235/S236)
p-S6 (S240/S244)
S6
p-4EBP1 (S65)
4EBP1
p-eIF4G (S1108)
eIF4G
p-eIF4E (S209)
eIF4E
p-eIF4B (S422)
eIF4B
eIF4A
p-GCN2 (T899)
GCN2
PERK
ATF4
RPS3

Figure 13. $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における BRAF ノックダウンは mTOR シグナル及び翻訳開始因子のリン酸化レベルを抑制する

(A) A375 及び G-361 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM)、または thapsigargin (TG, 300 nM) で 3.5 時間処理し、そのまま培地中に puromycin (最終濃度 1 μg/ml) を添加し、30 分インキュベートした。その後、ライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。ポジティブコントロールとして A375 細胞に cycloheximide (CHX, 50 mg/ml) と puromycin を 30 分間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。**(B)** A375、G-361、SK-MEL-2 及び MeWo 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (A375, G-361 及び MeWo: 2 mM, SK-MEL-2: 20 mM) または thapsigargin (300 nM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第四節　$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における vemurafenib の 24 時間処理は mTOR シグナル及び ATF4 発現を抑制する

Vemurafenib による BRAF のキナーゼ阻害が BRAF のノックダウンと同様の現象を引き起こすのか検討した。A375 細胞に vemurafenib を 24 時間処理した後、L-histidinol または thapsigargin を 4 時間処理した。その結果、vemurafenib を 24 時間処理することで p70 S6K 及び S6 のリン酸化レベルが低下し、L-histidinol 処理による ATF4 発現誘導が強く抑制され、thapsigargin 処理による ATF4 発現誘導は部分的に抑制された。このことから、BRAF のキナーゼ活性が mTOR シグナルの制御に重要であり、また ATF4 発現誘導にも重要であることが示唆された。

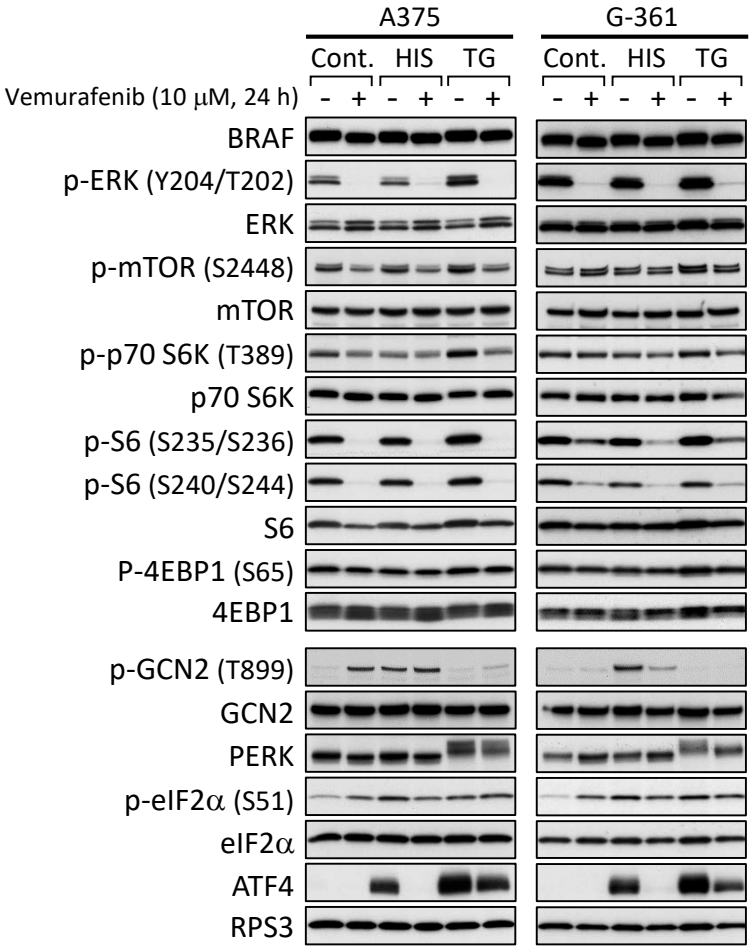


Figure 14. BRAF^{V600E} 変異型細胞株における vemurafenib の 24 時間処理は mTOR シグナル及び ATF4 発現を抑制する

A375 及び G-361 細胞に vemurafenib (10 μM) を 24 時間処理した後、L-histidinol (HIS, 2 mM) または thapsigargin (TG, 300 nM) を 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第五節　mTOR シグナルの阻害は GCN2 を介した ATF4 発現誘導を抑制する

mTOR シグナルが ATF4 発現誘導に関与しているか mTOR 阻害剤である PP242 を用いて検討した。A375 及び SK-MEL-2 の両細胞において、PP242 処理により mTOR、p70 S6K、S6 及び eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1) のリン酸化の低下を認めた (Fig. 15A)。これらの細胞に L-histidinol 処理条件下、PP242 を共処理した結果、L-histidinol によって誘導された GCN2 及び eIF2αのリン酸化が抑制され、ATF4 発現誘導も強く阻害された。それに比較して thapsigargin 処理条件下、PP242 を共処理した場合、thapsigargin によって誘導された PERK 及び eIF2αのリン酸化レベルに顕著な抑制は認められなかったが、ATF4 発現誘導は部分的に抑制された (Fig. 15A)。PP242 は mTOR 複合体 1 (mTORC1)と mTOR 複合体 2 (mTORC2) の両方を阻害するが、rapamycin 及びそのアナログは mTORC1 のみを阻害する [39]。A375 細胞に、rapamycin または everolimus を L-histidinol または thapsigargin と併用して処理した結果、PP242 と同様に L-histidinol 処理と併用した場合にのみ、GCN2 と eIF2αのリン酸化抑制、及び ATF4 発現誘導の阻害を認めた (Fig. 15B)。

これらの結果より、PERK を介した ATF4 発現誘導に比べ、GCN2 を介した ATF4 発現誘導において mTORC1 シグナルの活性がより重要であることが示唆された。mTORC1 シグナル阻害による ATF4 発現抑制は、$BRAF^{V600E}$ 変異型細胞において認められた BRAF ノックダウンによる ATF4 発現抑制のストレスの違いによる抑制強度のパターンと一致していたことから (Fig. 11A)、BRAF ノックダウンによる ATF4 発現抑制は mTORC1 シグナルの抑制を介して生じた可能性が高いと考えられる。ただし、mTOR 阻害剤処理条件下ではタンパク質翻訳に強い影響力をもつ 4EBP1 のリン酸化が抑制 (4EBP1 の活性化) されている一方、BRAF のノックダウンでは 4EBP1 のリン酸化は抑制されていないといった相違点もあることから、mTORC1 シグナルの抑制以外にも翻訳開始因子等が関与して ATF4 の発現抑制が生じていると考えられる。

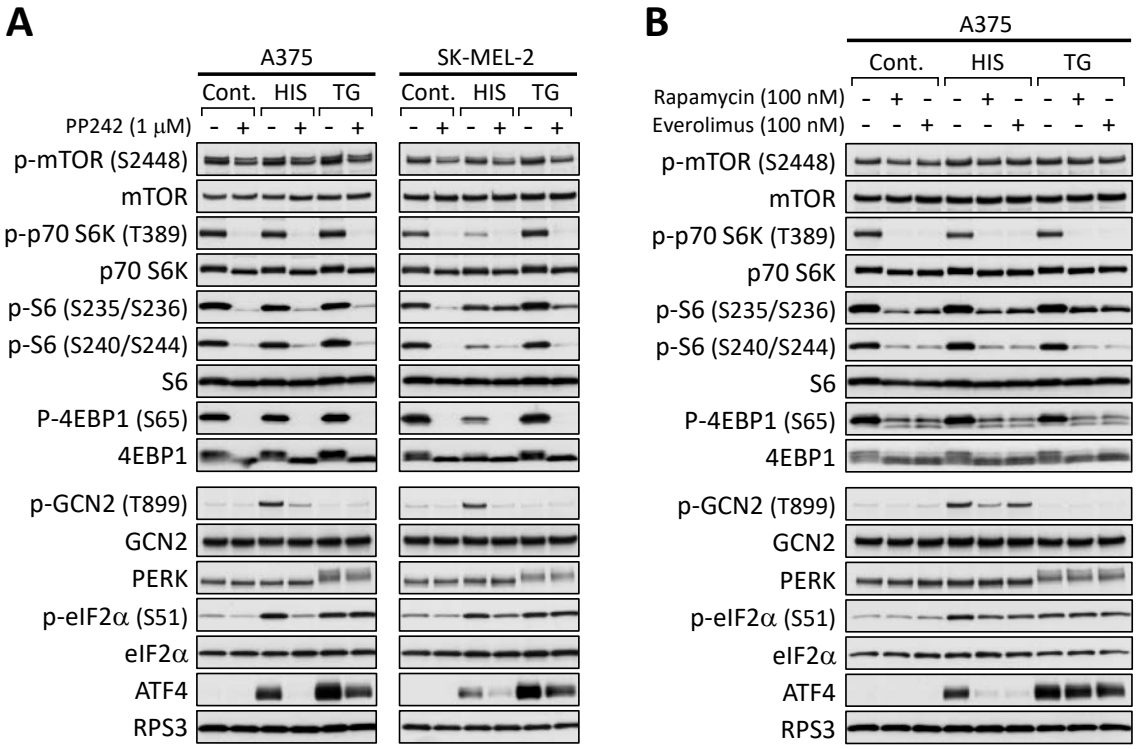


Figure 15. mTOR シグナルの阻害は GCN2 を介した ATF4 発現誘導を抑制する
(**A**) A375 及び SK-MEL-2 細胞に PP242 (1 μM) と L-histidinol (HIS, A375: 2 mM, SK-MEL-2: 20 mM) または thapsigargin (TG, 300 nM) を 4 時間共処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**B**) A375 細胞に rapamycin (100 nM) または everolimus (100 nM) と L-histidinol (2 mM) または thapsigargin (300 nM) を 4 時間共処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

第六節　BRAF は mTORC1 及び GCN2 と結合し、mTOR はストレス依存的に BRAF との結合が増加する

BRAF と mTOR の直接的な相互作用について検討した。HEK293T 細胞に、FLAG タグ付き野生型 BRAF（$BRAF^{WT}$）または変異型 $BRAF^{V600E}$ を一過性に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物に含まれるタンパク質について解析したところ、mTOR、p70 S6K 及び 4EBP1 が BRAF と共沈されることを見出した（Fig. 16A)。さらに、GCN2 及び GCN2 との相互作用が既に報告されている general control of amino acid synthesis 1-like protein 1 (GCN1L1)[40] の共沈も認めた（Fig. 16A)。これらの分子との結合において、野生型 BRAF と変異型 $BRAF^{V600E}$ の間で顕著な差は認めなかった。mTOR が形成するコンプレックスには regulatory associated protein of mTOR complex 1（Raptor）を含む mTORC1 と raptor independent companion of mTOR complex 2（Rictor）を含む mTORC2 が知られている [39]。BRAF が mTORC1 または mTORC2 のどちらと結合するのか、Raptor と Rictor との結合量を比較することで検討した。インプットの Raptor 及び Rictor のバンド強度に対して、BRAF の免疫沈降サンプルでは Raptor のバンド強度の方が Rictor よりも明らかに強く、このことから BRAF と主に結合するのは mTORC1 であることが示唆された（Fig. 16B)。

さらに、BRAF と mTOR 及び GCN2 の相互作用におけるストレス応答性について A375 細胞を用いて検討した。A375 細胞に変異型 $BRAF^{V600E}$ を一過性に過剰発現させ、L-histidinol または thapsigargin 処理を行った後、抗 mTOR 抗体または抗 GCN2 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、mTOR と BRAF の結合は L-histidinol 処理条件下において増加し、thapsigargin 処理条件下においてはそれらの結合量はコントール条件と変わらなかった（Fig. 16C)。一方、GCN2 と BRAF の結合は、コントール及び各ストレス条件いずれにおいても同程度に認められた（Fig. 16C)。以上より、BRAF はアミ

ノ酸飢餓様のストレス依存的に mTORC1 とのコンプレックス形成を増加させることが示唆された。

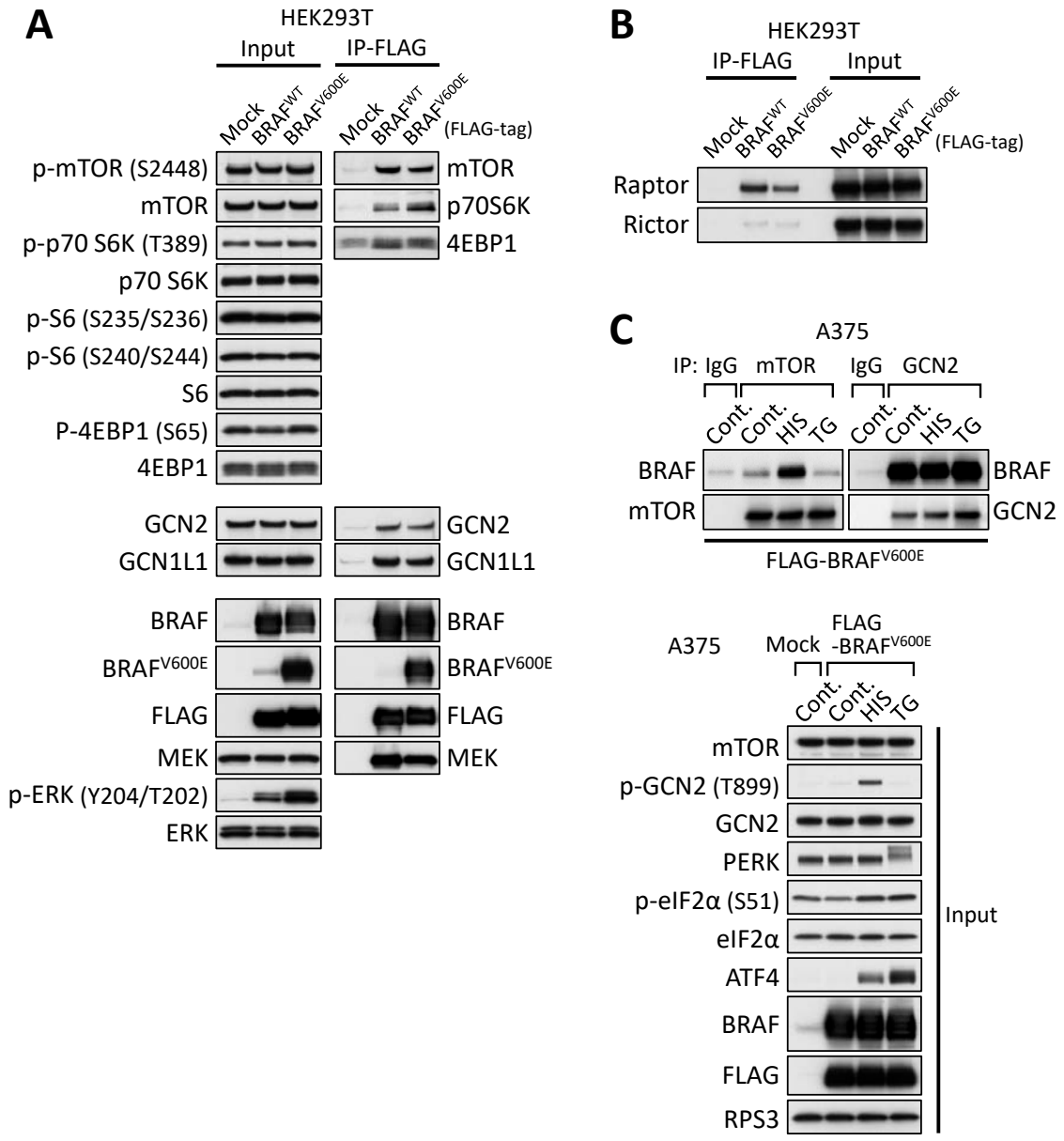


Figure 16. BRAF は mTORC1 及び GCN2 と結合し、mTOR はストレス依存的に BRAF との結合が増加する

(**A**, **B**) HEK293T 細胞に FLAG タグ付き野生型 BRAF (BRAF^{WT}) または変異型 BRAF (BRAF^{V600E}) を過剰発現させたライゼートを調製した。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法により解析した。(**C**) A375 細胞に FLAG タグ付き変異型 BRAF (BRAF^{V600E}) を過剰発現させた後、L-histidinol (2 mM) または thapsigargin (300 nM) を 4 時間処理したライゼートを調製した。抗 mTOR 抗体または抗 GCN2 抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法により解析した。

結語

本研究は、BRAF 阻害剤 vemurafenib による Integrated stress response (ISR) 活性化機序の解析及び活性変異型 BRAF による ATF4 発現制御メカニズムの解析を行い、活性型がん遺伝子 BRAF による ISR 制御の新たな分子基盤を明らかにした。

はじめに我々は、BRAF 変異型細胞株は vemurafenib に応答して、GCN2 の活性化を介した eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現誘導を誘導することを明らかにした。この時、vemurafenib による ISR の活性化は BRAF の主要な下流シグナルである MEK-ERK 経路の阻害とは関係なく誘導されることを見出した。実際のがん患者の治療において vemurafenib を単回投与した時にはその血中濃度はおよそ 10 μM に達することから [19]、今回我々が見出した vemurafenib による ISR の活性化は臨床においても非常に重要な知見となり得る。それに加えて、我々は GCN2 を介した ATF4 の発現誘導が vemurafenib の作用に対して細胞防御に働くことを見出した。

GCN2 はアミノ酸の枯渇に応答して活性化することから、vemurafenib 処理による GCN2 の活性化誘導は vemurafenib が細胞にアミノ酸代謝の変化を引き起こすことを示唆している。実際に、これまでに BRAF 変異型メラノーマ細胞株において vemurafenib の長期間処理によって酸化的リン酸化が亢進し、エネルギー源としてグルタミンに依存するようになる代謝リプログラミングが惹起されることが報告され、これが vemurafenib に対する薬剤耐性に寄与すると提唱されている [41-43]。これらの報告に一致して、我々の結果においても GCN2-ATF4 経路の活性化は vemurafenib に対する抵抗性に寄与することが示唆された。GCN2 を介した ATF4 発現誘導は、その下流でアミノ酸の生合成及び代謝、オートファジーの誘導に関与する遺伝子の発現を上昇させることが知られている [2, 9-11]。我々の検討においても、vemurafenib による GCN2-ATF4 経路の下流では、セリンの生合成及び代謝経路が亢進することが認められた。また、vemurafenib 及び PLX4720 (前臨床における vemurafenib 誘導体) が BRAF 変異型メラノーマ及び大腸がん細胞においてオートファジーを誘導し、vemurafenib に対する耐性を獲得することも報告されている [24, 44]。今後、vemurafenib による代謝リプログラミングにおける

GCN2 を介した ISR の役割を検証することは興味深く、vemurafenib の治療効果を向上させる上で重要な情報を与えるものと考えられる。

ISR を活性化させる eIF2αキナーゼとして小胞体ストレスに応答する PERK も GCN2 と同じように代謝ストレスに対する適応応答において重要な分子である [4, 45, 46]。先行研究において、vemurafenib または PLX4720 は BRAF 変異型メラノーマ細胞株において小胞体ストレス誘導することで PERK を活性化し、それによって ISR を誘導することが提唱されていた [23, 24]。我々の行った PERK に対する siRNA 及び低分子阻害剤を用いた検討では、vemurafenib の比較的短時間の処理条件においては小胞体ストレスの誘導及び PERK の活性化は観察されなかった。我々の結果と矛盾なく、先行研究においても PLX4720 による eIF2αのリン酸化及び ATF4 発現は 4 から 6 時間以内に誘導されることが示され、一方で PERK の活性化は 24 から 48 時間に誘導されることが示されている [24]。このことから、vemurafenib によって短時間に活性化される ISR は GCN2 を介しており、先行研究で示されている低濃度の vemurafenib の持続的な処理は PERK を介した ISR を活性化させると推測される。実際に、我々は vemurafenib 及び PLX4720 を 1 μM で A375 細胞に処理し続けると、48 時間後に PERK 活性化による ISR の誘導が生じることを確認した（Supplementary Fig. S6A)。しかしこれらの薬剤は 10 μM では療法とも 4 時間以内に GCN2 を介した ISR の活性化を誘導し、10 μM で 48 時間の処理を行っても PERK の活性化による ISR の誘導は観察されなかった（Supplementary Fig. S6B 及び S6C)。従って、vemurafenib による ISR の活性化機序は処理濃度及び時間に依存して変わり得ると考えられる。

さらに、先行研究では vemurafenib による ISR が細胞生存に寄与するという報告と細胞死の誘導に働くという報告があり、ISR の細胞運命における役割については曖昧であった [23, 24]。このように相反する現象が示されているのは、ストレス適応応答の二相性シグナルが関与していると考えられる。ATF4 は通常はストレス適応に必要な遺伝子の転写活性を上昇させ、細胞の生存に寄与するが、持続的なストレス条件下ではストレス適応を

達成できずアポトーシスの誘導へ移行することが知られている[47]。このことから BRAF 阻害剤が誘導する細胞防御に働く GCN2 を介した ISR と後期に誘導される ISR それぞれの細胞運命における役割及び切り替えの分子メカニズムについてさらなる検討が必要である。

興味深いことに、我々は活性変異型 $BRAF^{V600E}$ が mTORC1 シグナルを制御することで、GCN2 を介した ATF4 発現誘導を正に制御することを見出した。我々の結果から、vemurafenib による BRAF の阻害は、処理後 4 時間の時点では MEK-ERK シグナル経路に対しては有効だが、ATF4 の発現を制御する機能に対してはその阻害効果が及ばず、かえって ISR の活性化を誘発すると考えられる。実際に vemurafenib の 24 時間の処理や BRAF のノックダウンでは両機能が抑制されたように、活性変異型 $BRAF^{V600E}$ は MEK-ERK シグナル経路に加え、mTOR シグナルを介したストレス適応応答の制御も行う、二面性の機能を有することが明らかとなった。

mTORC1 シグナル経路がアミノ酸代謝を調節することは多くの研究報告から示されており、一般にアミノ酸の枯渇状態は mTORC1 活性を低下させ、オートファジーを誘導することでアミノ酸供給が促進されることが知られている[48]。確かに BRAF 野生型細胞株では L-histidinol 処理条件下 mTOR の下流シグナル分子である p70 S6K 及び S6 のリン酸化レベルが低下した。しかし、BRAF 変異型細胞株では L-histidinol 処理による mTOR シグナルの低下は認めず、BRAF のノックダウンによって mTOR シグナルの抑制を認めた (Fig. 13B)。このように活性変異型 $BRAF^{V600E}$ は、本来であればアミノ酸飢餓ストレスによって抑制される mTORC1 の活性を増強していることが示唆された。さらに我々の結果は、BRAF がストレス依存的に mTORC1 と直接的に相互作用することを示した。これまで mTOR は PI3K-Akt 経路からシグナルが伝達されると考えられているが、活性変異型 BRAF と mTOR のコンプレックス形成により、活性変異型 BRAF が mTOR を介して直接的にアミノ酸代謝に影響を及ぼすことが示唆された。実際に、これ

をサポートする先行研究の報告として、活性変異型 BRAF を発現する細胞ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が亢進し、細胞内の代謝システムが変化していることが示されている [41]。我々が見出したように、GCN2 による ATF4 発現誘導が活性変異型 BRAF に依存していることからも、BRAF 変異型細胞ではアミノ酸代謝やストレス適応応答のコンテクストが大きく変化し、それらが活性変異型 BRAF のコントロール下に置かれている可能性がある。今後、がんの発生や進展において活性変異型 BRAF によるストレス適応応答制御、特に ATF4 の発現制御がどのように寄与しているのか研究を行うことは非常に興味深いと考えられる。

このような変異型 BRAF の二面性の機能は、BRAF を標的としたがん治療の効果に影響を与えることが予想される。実際に、我々は ISR の活性化が vemurafenib の作用に対して細胞防御に働くことを示した。その解決策の一つとして、AT9283 と vemurafenib の併用療法は BRAF の増殖シグナルとストレス適応応答の両機能を抑制することによって合成致死を導く治療法として期待できる。

AT9283 は骨髄腫の治療薬として開発されている Aurora キナーゼ及び JAK の阻害剤であり [49, 50]、これまでに第二相臨床試験まで実施されている [51-55]。ISR 阻害剤のスクリーニングを行ったキナーゼ阻害剤ライブラリー中には AT9283 以外に複数の Aurora キナーゼ阻害剤及び JAK 阻害剤が含まれているが、それらの阻害剤による ISR の抑制は認められなかった。従って、AT9283 による ISR 阻害作用は Aurora キナーゼや JAK 以外の未だ同定されていない標的分子の阻害を介していると推測され、GCN2 に直接的に結合して活性化を阻害する機序と GCN2 の活性化を制御する上流分子を阻害する機序のどちらかが考えられる。現時点では AT9283 の詳細な作用メカニズムは明らかではないが、遺伝子発現解析において観察された、vemurafenib と AT9283 の共処理によって強く発現が抑制された 112 プローブセットの各遺伝子を詳細に解析することで AT9283 の分子機序につながる情報が得られる可能性がある。

また、vemurafenib と AT9283 の併用による細胞死誘導作用は、vemurafenib の変異型 BRAF に対する高い選択性と、AT9283 の vemurafenib 誘導性 ISR に対する選択性によって BRAF 変異型のがん細胞に特異的に発揮されることが期待できる。これまでに同様に vemurafenib によるアミノ酸代謝のリプログラミングを阻害する治療戦略として、vemurafenib とオートファジー阻害剤 hydroxychloroquine の併用による治療効果の増強が BRAF 変異型メラノーマ及び大腸がん細胞を用いた *in vitro* 及び *in vivo* で報告されている[24, 44]。AT9283 はそれらの成果以上により選択的に vemurafenib の治療効果を改善できる可能性があり、今後 *in vivo* における併用療法の有効性の確認を行うことが重要である。

以上、本研究では活性変異型 $BRAF^{V600E}$ によるストレス適応応答の新たな制御機構を明らかにし、それに基づいた治療戦略の有用性について見出した。本研究の成果は、BRAF を標的としたがん治療法の改善に貢献できるだけでなく、活性変異型 BRAF によるがんの発生や進展の分子機構の新たな理解にもつながるものである。今後、さらに詳細ながんのストレス適応応答機構が明らかになり、それに基づいた優れたがん治療薬が創生されることを期待したい。

実験項

細胞培養及び試薬

A375 (CRL-1619), SK-MEL-2 (HTB-68), MeWo (HTB-65), G-361 (CRL-1424), WM-115 (CRL-1675) 及び SK-MEL-1 (HTB-67) 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。これらのメラノーマ細胞株及び HT-29 細胞は RPMI1640 (和光純薬工業, 大阪) に 10% ウシ胎児血清 (ニチレイバイオサイエンス, 東京) と 100 μg/ml カナマイシン (明治製菓ファルマ, 東京) を添加した培地で、5% CO_2、37℃条件下で培養した。Vemurafenib、dabrafenib、trametinib、GSK2656157、GZD824、PP242、rapamycin、everolimus 及び AT9283 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して用いた。2-deoxy-D-glucose (2DG; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 及び L-histidinol (Sigma-Aldrich) は滅菌蒸留水に溶解し、tunicamycin (ナカライテスク, 京都) 及び thapsigargin (和光純薬工業) は DMSO に溶解して用いた。

細胞生存率の測定

A375 (3×10^3 cells/well)、SK-MEL-2 (1×10^4 cells/well)、MeWo (8×10^3 cells/well)、G-361 (6×10^3 cells/well)、WM-115 (8×10^3 cells/well) 及び SK-MEL-1 (1×10^4 cells/well) 細胞をそれぞれ 96 ウェルプレートに播種し、一晩培養した。翌日、各細胞に図中に示した濃度の vemurafenib または dabrafenib を処理し、48 時間培養した。細胞生存率は CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて細胞内 ATP 量から算出した。MTT アッセイ法では、薬剤処理後の細胞に MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich) を添加し、3 時間培養した。生成したホルマザンを DMSO で溶解し、吸光度 ($OD_{525\,nm/650\,nm}$) を測定して細胞生存率を算出した。細胞生存率は薬剤未処理のコントロール条件に対する割合 (%) で示した。

ウェスタンブロット解析

細胞のライゼートは SDS lysis buffer (2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) を用いて調製した。ライゼート中のタンパク質濃度は、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて定量した。タンパク質は SDS-PAGE によって分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを 4% スキムミルク TBS-T (0.1% Tween-20, 150 mM NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6) でブロッキングを行い、4% スキムミルク TBS-T で希釈した各一次抗体液に浸して 4℃で一晩反応させた。一次抗体を反応させたメンブレンを TBS-T で洗浄後、4%スキムミルク TBS-T で希釈した二次抗体 ECL Anti-Rabbit IgG , HRP linked whole antibody, NA934V または ECL Anti-mouse IgG, HRP linked whole antibody, NA931V (GE healthcare, Pollards Wood, UK) と室温で 1 時間反応させた。再度 TBS-T で洗浄後、Western Lightning plus ECL (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて各タンパク質のバンドを検出した。

本研究で用いた一次抗体をメーカー毎に以下に示した。

- Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

Phospho-eIF2α (Ser51) (D9G8) XP Rabbit mAb #3398

ATF-4 (D4B8) Rabbit mAb #11815

MEK1/2 (D1A5) Rabbit mAb #8727

Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) Rabbit mAb #9154

p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb #4695

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb #4370

Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb #4685

Phospho-Akt (Ser473) Antibody #9271

GCN2 Antibody #3302

PKR (D7F7) Rabbit mAb #12297

mTOR Antibody #2972

Phospho-mTOR (Ser2448) Antibody #2971

p70 S6 Kinase Antibody #9202

Phospho-p70 S5 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb #9234

S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb #2217

Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Antibody #2211

Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) Antibody

4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb #9644

Phospho-4E-BP1 (Ser65) (174A9) Rabbit mAb #9456

Raptor (24C12) Rabbit mAb #2280

Rictor (53A2) Rabbit mAb #2114

eIF4G (C45A4) Rabbit mAb #2469

Phospho-eIF4G (Ser1108) Antibody #2441

eIF4E (C46H6) Rabbit mAb

Phospho-eIF4E (ser209) Antibody #9741

eIF4B Antibody #3592

Phospho-eIF4B (Ser422) Antibody #3591

eIF4A (C32B4) Rabbit mAb #2013

PARP (46D11) Rabbit mAb #9532

Cleaved PARP (Asp214) (D64E10) XP Rabbit mAb #5625

Ribosomal Protein L7a (R225) Antibody #2403

Ribosomal Protein S3 (D50G7) XP Rabbit mAb #9538

- Abcam (Cambridge, UK)

Anti-EIF2S1 antibody [EIF2a] ab5369

Anti-GCN2 (phospho T899) antibody [EPR2320Y] ab75836

Anti-PERK antibody ab65142

Anti-EIF2AK1 antibody [EP6587] ab151745

Anti-Phosphoserine Aminotransferase antibody ab154055

Anti-Phosphoserine phosphatase antibody ab96414

- Enzo life Sciences (Farmingdale, NY, USA)

KDEL, mAb (10C3)

- Sigma-Aldrich

Monoclonal Anti-CBS, antibody produced in mouse, clone 3E1, WH0000875M1

Monoclonal Anti-CTH, antibody produced in mouse, clone S51, SAB1403711

Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody F-3165

- Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

Raf-B (F-3) sc-55522

- New East Biosciences

B-Raf (V600E) 26039

- Kerafast (Boston, MA, USA)

Anti-Puromycin (3RH11) mAb EQ0001

siRNA による発現ノックダウン

細胞に各分子に特異的な siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてトランスフェクションした。ON-TARGET*plus* SMARTpool siRNA (GE Healthcare) は最終濃度 20 nM、Silencer Select siRNA (Thermo Fisher Scientific) は最終濃度 5 nM で用いた。siRNA のトランスフェクションから 48 時間後、薬剤処理等の実験を行った。

本研究で用いた siRNA を以下に示した。

- ON-TARGET*plus* SMARTpool siRNA

GCN2 (EIFAK4): L-005314-00

PERK (EIFAK3): L-004883-00

PKR (EIFAK2): L-003527-00

HRI (EIFAK1): L-005007-00

ATF4: L-005125-00

BRAF: L-003460-00

- Silencer Select siRNA

GCN2 (EIFAK4): s54068

PERK (EIFAK3): s18102

PKR (EIFAK2): s11185

HRI (EIFAK1): s25823

ATF4: s1702, s1703

BRAF: s2080

ATF4 蛍光免疫染色

細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定し、PBS で洗浄後、0.3% Triton X-100 in 4% BSA-PBS で 1 時間ブロッキングを行った。その後、1% BSA-PBS で 400 倍に希釈した抗 ATF4 抗体 (#11815, CST) と一晩反応させた。PBS で洗浄後、1% BSA-PBS で 500 倍に希釈した二次抗体 Goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, AlexaFluor-488 conjugate (A11034, Thermo Fisher Scientific) と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞の核を染色した。ATF4 の蛍光シグナルは IN Cell Analyzer 6000 (GE healthcare) により検出し、IN Cell Developer Toolbox software (GE Healthcare) を持いて核における ATF4 intensity を算出した。

GRP78 レポーターアッセイ

A375 (2×10^5 cells/well) 及び G-361 細胞 (3×10^5 cells/well) をそれぞれ 6 ウェルプレートに播種し、一晩培養した。Firefly ルシフェラーゼを含む pGRP78pro160-Luc プラスミドと内部標準 renilla ルシフェラーゼを含む pRL-CMV を 500：1 で混合して Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 6 時間後、細胞を 96 ウェルプレートに播き直し、一晩培養した後、vemurafenib、2DG または tunicamycin を 18 時間処理した。Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて、renilla ルシフェラーゼシグナル強度に対する firefly ルシフェラーゼシグナル強度を測定した。

マイクロアレイ発現解析

細胞のトータル RNA は RNeasy RNA purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出した。RNA のクオリティは 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 及び RNA 6000 Nano LabChip kit を用いて確認し、マイクロアレイは Affymetrix GeneChip Human genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). を用いて行った。マイクロアレイ発現データは RMAExpress 1.0.5 を用いて Robust Multichip Average (RNA) 法により正規化し、検出されたシグナル値が 50 未満のプローブは全て固定値 50 として解析に用いた。コントロール条件に対してシグナル値が 2 倍以上で検出されたプローブを発現上昇、1/2 以下で検出されたプローブを発現減少と定義した。クラスタリング解析は Cluster 3.0 software を用いて行い、Java TreeView を用いて可視化した。Gene Ontology 解析は DAVID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。

コロニー形成アッセイ

各条件の処理を行った細胞を 6 ウェルプレートに播き直し（A375: 1×10^3 cells/well, G-361: 2×10^3 cells/well)、薬剤不含有培地で 7 日間（A375）または 14 日間（G-361）培養した。コロニーはメタノールで固定後、0.4% クリスタルバイオレットを用いて染色した。コロニーの面積は ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/) を用いて定量した。

Real-time RT-PCR

細胞のトータル RNA は RNeasy RNA purification kit (Qiagen) を用いて抽出した。各サンプルにおける ATF4 及び GAPDH の mRNA 発現レベルは、SuperScriptⅢ Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) 及び Chromo4 real-time PCR thermocycler (Bio-Rad) を用いて測定した。PCR に用いたプライマーを以下に示した。

ATF4_forward: 5'- cctgtcctccactccagatc-3'

ATF4_reverse: 5'- cactgagggatcatggcaac-3'

GAPDH_forward: 5'-aaggtgaaggtcggagtcaa-3'

GAPDH_reverse: 5'-aatgaaggggtcattgatgg-3'

ATF4 uORF レポーターアッセイ

A375 細胞を 10 cm 培養ディッシュに視野 80%の細胞密度で用意した。Firefly ルシフェラーゼを含む pATF4uORF-Luc プラスミドと内部標準 renilla ルシフェラーゼを含む pRL-TK を 4：1 で混合し、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 6 時間後、細胞を 12 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well で播き直し、一晩培養した。この時、BRAF ノックダウンの影響を検討する際には siRNA をトランスフェクションした。翌日、細胞に L-histidinol、vemurafenib、dabrafenib、tunicamycin、thapsigargin、GZD824 または GSK2656157

をそれぞれ図中に示した条件で 18 時間処理した。Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて、renilla ルシフェラーゼシグナル強度に対する firefly ルシフェラーゼシグナル強度を測定した。

Puromycin 取り込みを指標とした新規タンパク質合成の測定

細胞内における新規タンパク質の合成は、puromycin の翻訳中ペプチドへの取り込み量を指標として測定した。細胞のライゼートを調製する 30 分前に培地中に最終濃度 1 μg/ml の puromycin を添加し、インキュベートした。抗 puromycin 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、puromycin の取り込み量を検出した。

BRAF の過剰発現

pFLAG-BRAF プラスミド (#40775) は Addgene (Cambridge, MA, USA) より購入し、これを鋳型として QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いて pFLAG-BRAF^{V600E} プラスミドを作製した。プラスミドは Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞にトランスフェクションした。

抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降

pFLAG-BRAF (野生型) プラスミドまたは pFLAG-BRAF^{V600E} プラスミドを導入した HEK293T 細胞を冷却した PBS で洗浄後、Protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) と Phosphatase inhibitor cocktail (P5726 及び P0044, Sigma-Aldrich) を加えた IP lysis buffer (1% TritonX-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いて懸濁し、10,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離した。上清に Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を添加し、回転させながら 4℃で 2 時間反応させた。ビーズを IP lysis buffer を用いて 1 ml/チューブで 3 回洗浄し、さらに Wash buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いて 1 ml/チューブで 1 回洗浄した。Wash buffer

に溶解した 3×FLAG Peptide (Sigma-Aldrich) と 4℃で 1 時間反応させることで結合タンパク質を溶出し、100℃加温下 5×SDS lysis buffer を用いて SDS 化サンプルを調製した。

タンパク質の免疫沈降

細胞を冷却した PBS で洗浄後、Protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) と Phosphatase inhibitor cocktail (P5726 及び P0044, Sigma-Aldrich) を加えた IP lysis buffer を用いて懸濁し、10,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離した。上清に Normal Rabbit IgG Control (AB-105-C, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、IgG 抗 mTOR 抗体 (#2972, CST) または抗 GCN2 抗体 (#3302, CST) をライゼート液量の 1/100 量で添加し、回転させながら 4℃で一晩反応させた。翌日、Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を 50 μl/チューブ添加し、回転させながら 4℃で 1 時間反応させた。その後、IP lysis buffer を用いて 1 ml/チューブで 4 回洗浄し、100℃加温下 SDS lysis buffer を用いてタンパク質を溶出した。

7mGTP アフィニティ精製

細胞を冷却した PBS で洗浄後、Protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) と Phosphatase inhibitor cocktail (P5726 及び P0044, Sigma-Aldrich) を加えた IP lysis buffer を用いて懸濁し、10,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離した。上清に 7-methyl-GTP sepharose beads (GE healthcare) を添加し、回転させながら 4℃で 2 時間反応させた。ビーズを IP lysis buffer を用いて 1 ml/チューブで 3 回洗浄後、100℃加温下 2×SDS lysis buffer を用いて結合タンパク質を溶出した。

ATF4 蛍光免疫染色法を用いたキナーゼ阻害剤スクリーニング

355 種のキナーゼ阻害剤を含む Kinase Inhibitor Library (z88022, Selleck Chemicals)

をスクリーニングに用いた。A375 細胞を 96 ウェル平底黒色ウェル/透明ボトムプレート (353219, Corning, Big Flats, NY, USA) に 8×10^3 cells/well で播種し、一晩培養した。細胞に各キナーゼ阻害剤を最終濃度 2 または 20 μM で vemurafenib 10 μM と 6 時間共処理した。その後、ATF4 蛍光免疫染色を行い、各キナーゼ阻害剤の ATF4 発現抑制作用を評価した。

カスパーゼ 3/7 活性の測定

A375 細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^3 cells/well で播種し、一晩培養した。翌日、vemurafenib、dabrafenib 及び AT9283 をそれぞれ図中に示した条件で 16 時間処理した。カスパーゼ 3/7 活性は Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) を用いて測定した。カスパーゼ 3/7 活性化は薬剤未処理のコントロール条件に対する割合で示した。

細胞再増殖率の測定

A375 (5×10^3 cells/well) 及び G-361 (8×10^3 cells/well) 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、一晩培養した。翌日、vemurafenib 及び AT9283 をそれぞれ図中に示した条件で 16 時間処理した。各条件の 1 ウェルあたりの細胞を 18 倍に希釈し、新しい 96 ウェルプレートに播種し、96 時間培養した。細胞数は CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega) を用いて細胞内 ATP 量から算出した。細胞の再増殖率は薬剤未処理のコントロール条件に対する割合 (%) で示した。

参考文献

1) Cairns RA, Harris IS, Mak TW: Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer,* **11**, 85-95 (2011).

2) Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D: An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell,* **11**, 619-633 (2003).

3) Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D, Koumenis C: The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J,* **29**, 2082-2096 (2010).

4) Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D: Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular Cell,* **5**, 897-904 (2000).

5) Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS: Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell,* **140**, 338-348 (2010).

6) Chen JJ: Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood,* **109**, 2693-2699 (2007).

7) Vattem KM, Wek RC: Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **101**, 11269-11274 (2004).

8) Lu PD, Harding HP, Ron D: Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol,* **167**, 27-33 (2004).

9) Kilberg MS, Shan J, Su N: ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM,* **20**, 436-443 (2009).

10) Rzymski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, Pires I, Hammond E, Ragoussis I, Harris AL: Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene,* **29**, 4424-4435 (2010).

11) B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A: The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research,* **41**, 7683-7699 (2013).

12) Pagliarini R, Shao W, Sellers WR: Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. *EMBO reports,* **16**, 280-296 (2015).

13) Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S,

Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature,* **417**, 949-954 (2002).

14) Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A: Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology,* **26**, 5705-5712 (2008).

15) Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA: High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research,* **63**, 1454-1457 (2003).

16) Mercer KE, Pritchard CA: Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et biophysica acta,* **1653**, 25-40 (2003).

17) Montagut C, Settleman J: Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer letters,* **283**, 125-134 (2009).

18) Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G: Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **105**, 3041-3046 (2008).

19) Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine,* **363**, 809-819 (2010).

20) Lito P, Rosen N, Solit DB: Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature medicine,* **19**, 1401-1409 (2013).

21) Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank C, Wesseling J, Willems SM, Zecchin D, Hobor S, Bajpe PK, Lieftink C, Mateus C, Vagner S, Grernrum W, Hofland I, Schlicker A, Wessels LF, Beijersbergen RL, Bardelli A, Di Nicolantonio F, Eggermont AM, Bernards R: Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature,* **508**, 118-122 (2014).

22) Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liszkay G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Sovak MA, Chang I, Choong N, Hack SP, McArthur GA, Ribas A: Combined vemurafenib

and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine,* **371**, 1867-1876 (2014).

23) Beck D, Niessner H, Smalley KS, Flaherty K, Paraiso KH, Busch C, Sinnberg T, Vasseur S, Iovanna JL, Driessen S, Stork B, Wesselborg S, Schaller M, Biedermann T, Bauer J, Lasithiotakis K, Weide B, Eberle J, Schittek B, Schadendorf D, Garbe C, Kulms D, Meier F: Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Science signaling,* **6**, ra7 (2013).

24) Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, Hart LS, Levi S, Hu J, Zhang G, Lazova R, Klump V, Pawelek JM, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Davies MA, Herlyn M, Winkler J, Koumenis C, Amaravadi RK: Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *The Journal of clinical investigation,* **124**, 1406-1417 (2014).

25) Romano PR, Garcia-Barrio MT, Zhang X, Wang Q, Taylor DR, Zhang F, Herring C, Mathews MB, Qin J, Hinnebusch AG: Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Molecular and cellular biology,* **18**, 2282-2297 (1998).

26) Padyana AK, Qiu H, Roll-Mecak A, Hinnebusch AG, Burley SK: Structural basis for autoinhibition and mutational activation of eukaryotic initiation factor 2alpha protein kinase GCN2. *J Biol Chem,* **280**, 29289-29299 (2005).

27) Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C: Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *European journal of biochemistry / FEBS,* **265**, 754-762 (1999).

28) Saito S, Furuno A, Sakurai J, Sakamoto A, Park HR, Shin-Ya K, Tsuruo T, Tomida A: Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer research,* **69**, 4225-4234 (2009).

29) Saito S, Furuno A, Sakurai J, Park HR, Shin-ya K, Tomida A: Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *PloS one,* **7**, e45845 (2012).

30) Locasale JW: Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer,* **13**, 572-583 (2013).

31) Amelio I, Cutruzzola F, Antonov A, Agostini M, Melino G: Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci,* **39**, 191-198 (2014).

32) Adams CM: Role of the transcription factor ATF4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. *J Biol Chem,* **282**, 16744-16753 (2007).

33) Seo J, Fortuno ES, 3rd, Suh JM, Stenesen D, Tang W, Parks EJ, Adams CM, Townes T, Graff JM: Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure.

Diabetes, **58**, 2565-2573 (2009).

34) Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM: Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature,* **476**, 346-350 (2011).

35) Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhim R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG: Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet,* **43**, 869-874 (2011).

36) Tsukumo Y, Tsukahara S, Furuno A, Iemura S, Natsume T, Tomida A: TBL2 Associates With ATF4 mRNA Via Its WD40 Domain and Regulates Its Translation During ER Stress. *Journal of cellular biochemistry,* **117**, 500-509 (2016).

37) Boussemart L, Malka-Mahieu H, Girault I, Allard D, Hemmingsson O, Tomasic G, Thomas M, Basmadjian C, Ribeiro N, Thuaud F, Mateus C, Routier E, Kamsu-Kom N, Agoussi S, Eggermont AM, Desaubry L, Robert C, Vagner S: eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*, (2014).

38) Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ: Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer,* **10**, 254-266 (2010).

39) Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E: Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer,* **10**, 267-277 (2010).

40) Sattlegger E, Hinnebusch AG: Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation in amino acid-starved cells. *Embo j,* **19**, 6622-6633 (2000).

41) Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, Wargo JA, Song JS, Fisher DE, Arany Z, Widlund HR: Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer cell,* **23**, 302-315 (2013).

42) Hernandez-Davies JE, Tran TQ, Reid MA, Rosales KR, Lowman XH, Pan M, Moriceau G, Yang Y, Wu J, Lo RS, Kong M: Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. *Journal of translational medicine,* **13**, 210 (2015).

43) Baenke F, Chaneton B, Smith M, Van Den Broek N, Hogan K, Tang H, Viros A, Martin M, Galbraith L, Girotti MR, Dhomen N, Gottlieb E, Marais R: Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Molecular*

oncology, **10**, 73-84 (2016).

44) Sueda T, Sakai D, Kawamoto K, Konno M, Nishida N, Koseki J, Colvin H, Takahashi H, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H: BRAF V600E inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells. *Scientific reports,* **6**, 18949 (2016).

45) Hetz C, Chevet E, Harding HP: Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov,* **12**, 703-719 (2013).

46) Ma Y, Hendershot LM: The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer,* **4**, 966-977 (2004).

47) Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ: Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer cell,* **25**, 563-573 (2014).

48) Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology,* **13**, 132-141 (2011).

49) Howard S, Berdini V, Boulstridge JA, Carr MG, Cross DM, Curry J, Devine LA, Early TR, Fazal L, Gill AL, Heathcote M, Maman S, Matthews JE, McMenamin RL, Navarro EF, O'Brien MA, O'Reilly M, Rees DC, Reule M, Tisi D, Williams G, Vinkovic M, Wyatt PG: Fragment-based discovery of the pyrazol-4-yl urea (AT9283), a multitargeted kinase inhibitor with potent aurora kinase activity. *Journal of medicinal chemistry,* **52**, 379-388 (2009).

50) Dawson MA, Curry JE, Barber K, Beer PA, Graham B, Lyons JF, Richardson CJ, Scott MA, Smyth T, Squires MS, Thompson NT, Green AR, Wallis NG: AT9283, a potent inhibitor of the Aurora kinases and Jak2, has therapeutic potential in myeloproliferative disorders. *British journal of haematology,* **150**, 46-57 (2010).

51) Arkenau HT, Plummer R, Molife LR, Olmos D, Yap TA, Squires M, Lewis S, Lock V, Yule M, Lyons J, Calvert H, Judson I: A phase I dose escalation study of AT9283, a small molecule inhibitor of aurora kinases, in patients with advanced solid malignancies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology,* **23**, 1307-1313 (2012).

52) Dent SF, Gelmon KA, Chi KN, Jonker DJ, Wainman N, Capier CA, Chen EX, Lyons JF, Seymour L: NCIC CTG IND.181: phase I study of AT9283 given as a weekly 24 hour infusion in advanced malignancies. *Investigational new drugs,* **31**, 1522-1529 (2013).

53) Moreno L, Marshall LV, Pearson AD, Morland B, Elliott M, Campbell-Hewson Q, Makin G, Halford SE, Acton G, Ross P, Kazmi-Stokes S, Lock V, Rodriguez A, Lyons JF, Boddy AV, Griffin MJ, Yule M, Hargrave D: A phase I trial of AT9283 (a selective inhibitor of aurora kinases) in children and adolescents with solid tumors: a Cancer Research UK study. *Clinical cancer research : an official journal of the American*

Association for Cancer Research, **21**, 267-273 (2015).

54) Hay AE, Murugesan A, DiPasquale AM, Kouroukis T, Sandhu I, Kukreti V, Bahlis NJ, Lategan J, Reece DE, Lyons JF, Sederias J, Xu H, Powers J, Seymour LK, Reiman T: A phase II study of AT9283, an aurora kinase inhibitor, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: NCIC clinical trials group IND.191. *Leukemia & lymphoma,* **57**, 1463-1466 (2016).

55) Vormoor B, Veal GJ, Griffin MJ, Boddy AV, Irving J, Minto L, Case M, Banerji U, Swales KE, Tall JR, Moore AS, Toguchi M, Acton G, Dyer K, Schwab C, Harrison CJ, Grainger JD, Lancaster D, Kearns P, Hargrave D, Vormoor J: A phase I/II trial of AT9283, a selective inhibitor of aurora kinase in children with relapsed or refractory acute leukemia: challenges to run early phase clinical trials for children with leukemia. *Pediatric blood & cancer*, (2016).

謝辞

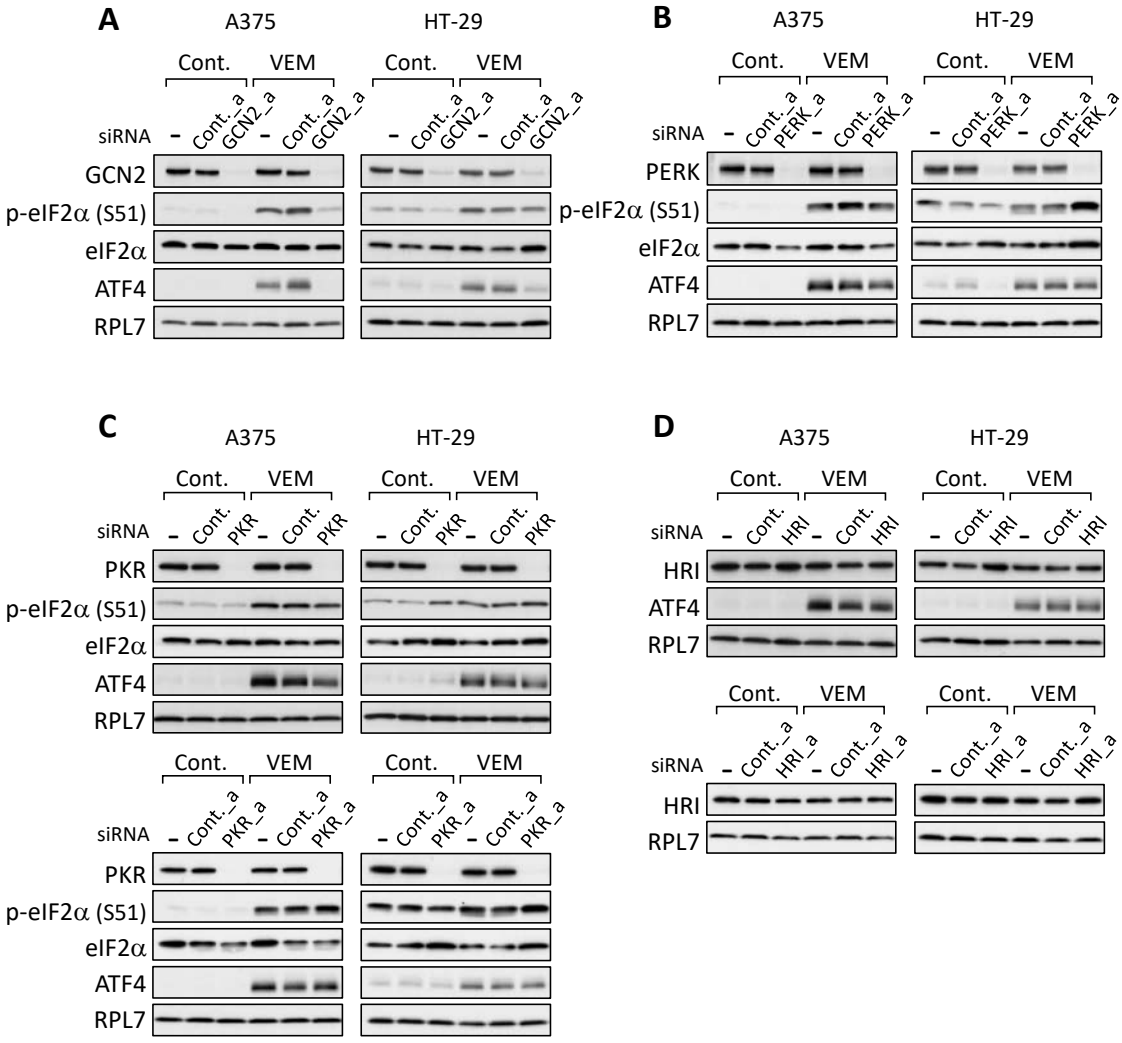
本研究に際し、終始熱心なご指導を賜りました公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・ゲノム研究部 冨田章弘部長に心より感謝致します。日々の研究生活において様々な面でご支援くださいましたゲノム研究部の國政和宏博士、岡本有加博士、研究助手の櫻井純子さん、塚原里美さん、谷優理さん、池田千佳さん、小井土大さんに感謝申し上げます。また、がん化学療法センターの他の研究部及び洗浄室の皆様にも支えていただき、充実した研究環境で 3 年間過ごさせていただきました。

外部機関における研究の遂行に際し、大学の事務手続き等をサポートしてくださいました本学生薬学教室 小山清隆教授、分析化学教室 鈴木俊宏准教授に深く感謝申し上げます。本論文の作成にあたりご助言を賜りました本学衛生化学教室 石井一行教授、生化学教室 紺谷圏二教授に感謝致します。

最後に、毎日毎日誰よりもそばで支えてくれた家族に心より感謝致します。

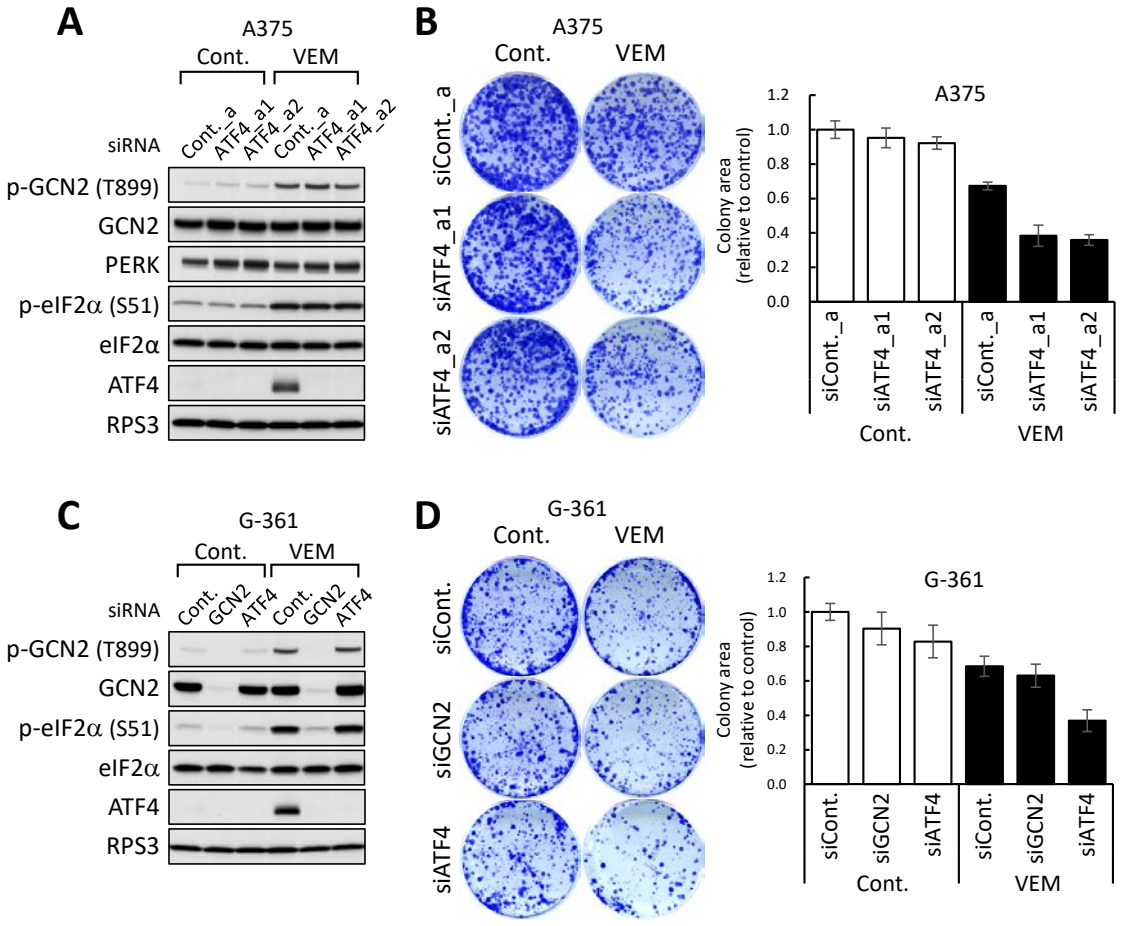
平成 29 年 3 月　永澤　生久子

Supplementary Data



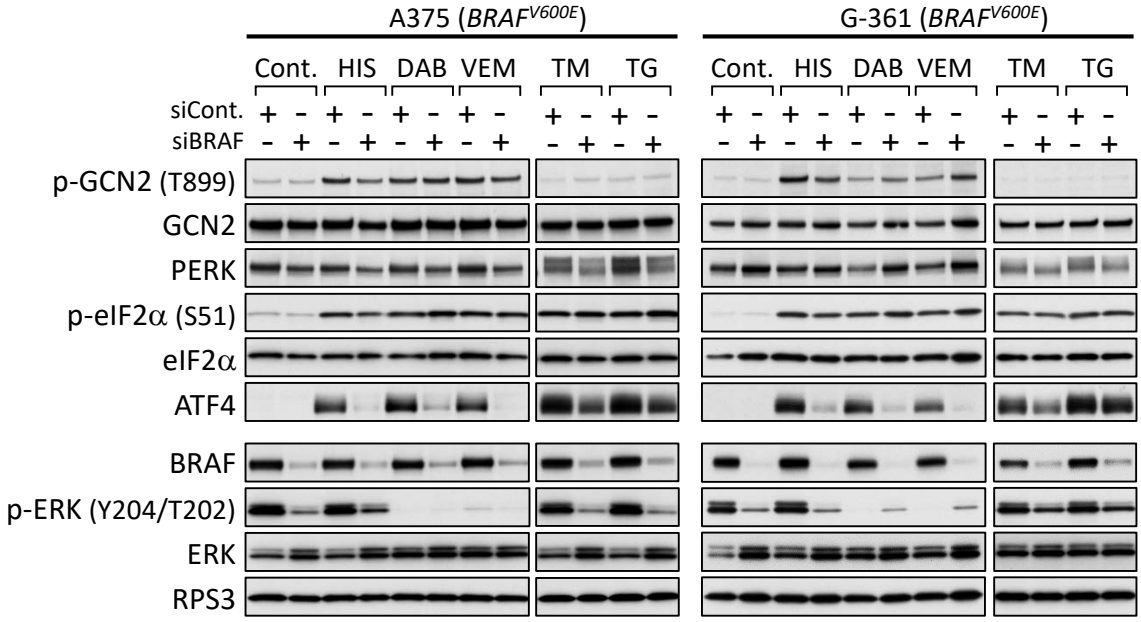
Supplementary Figure S1. Vemurafenib による ISR 活性化は、GCN2 ノックダウンによって抑制され、他の eIF2αキナーゼのノックダウンでは抑制されない

A375 及び HT-29 細胞に GCN2 (**A**)、PERK (**B**)、PKR (**C**) または HRI (**D**) に対する siRNA を導入後、vemurafenib (10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。異なる配列の siRNA (Silencer Select, Thermo Fisher Scientific 社) を用いている場合は siRNA の名前の後に_a と記載した。



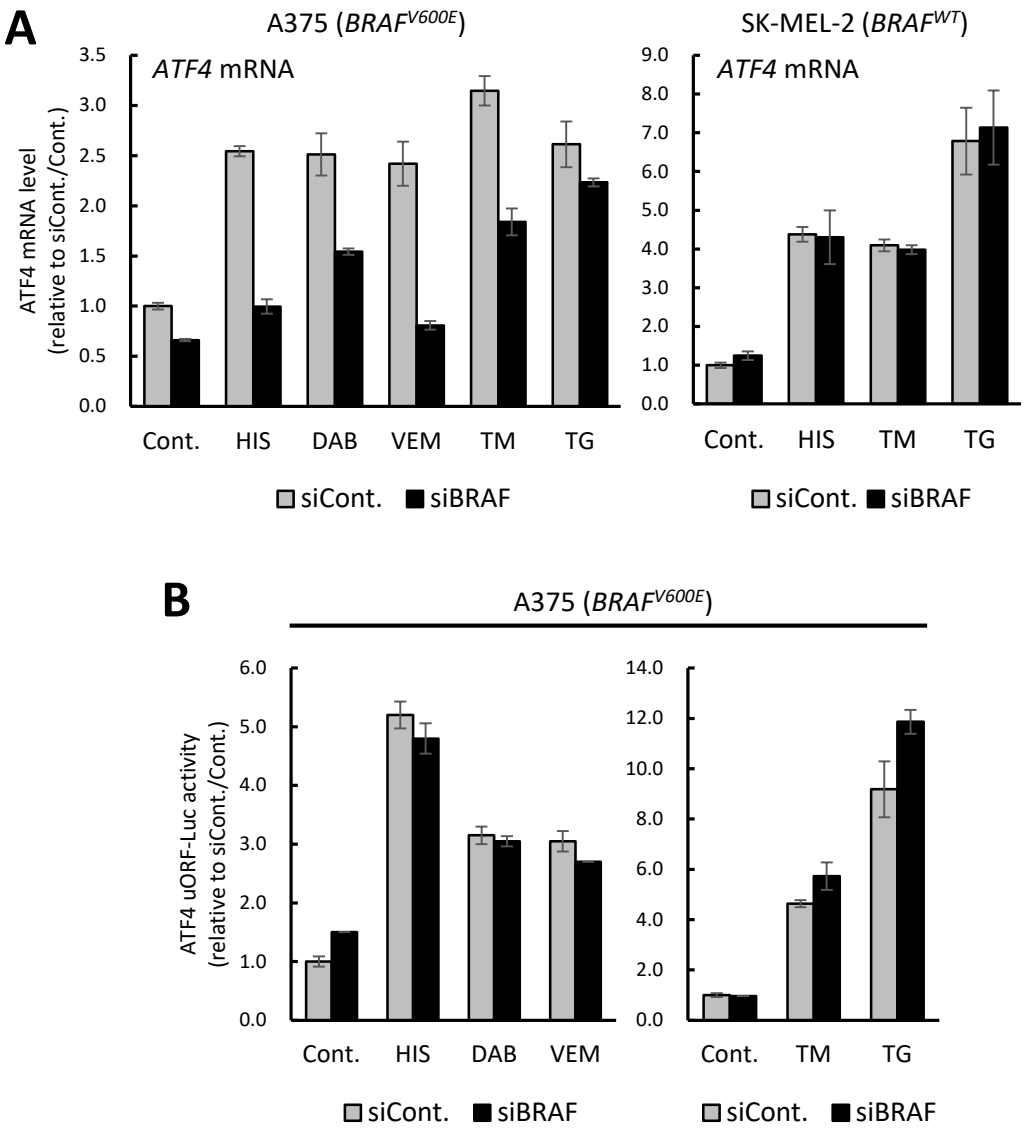
Supplementary Figure S2. ATF4 ノックダウンは vemurafenib による細胞増殖阻害を増強する

(A) A375 細胞に ATF4 に対する 2 種の siRNA をそれぞれ導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(B) A375 細胞に ATF4 に対する 2 種の siRNA をそれぞれ導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 24 時間処理し、細胞を 6 ウェルプレートに播き直して 7 日間培養した。形成したコロニーをクリスタルバイオレットで染色し、ウェルごとのコロニー面積を棒グラフに示した (±SD, n=3)。本 Figure における実験は、Figure 6 とは異なる配列の siRNA (Silencer Select) を用いて行い、siRNA の名前の後に_a と記載した。(C) G-361 細胞に GCN2 または ATF4 に対する siRNA をそれぞれ導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(D) G-361 細胞に GCN2 または ATF4 に対する siRNA をそれぞれ導入した後、vemurafenib (VEM, 10 μM) で 24 時間処理し、細胞を 6 ウェルプレートに播き直し 14 日間培養した。形成したコロニーをクリスタルバイオレットで染色し、ウェルごとのコロニー面積を棒グラフに示した (±SD, n=3)。



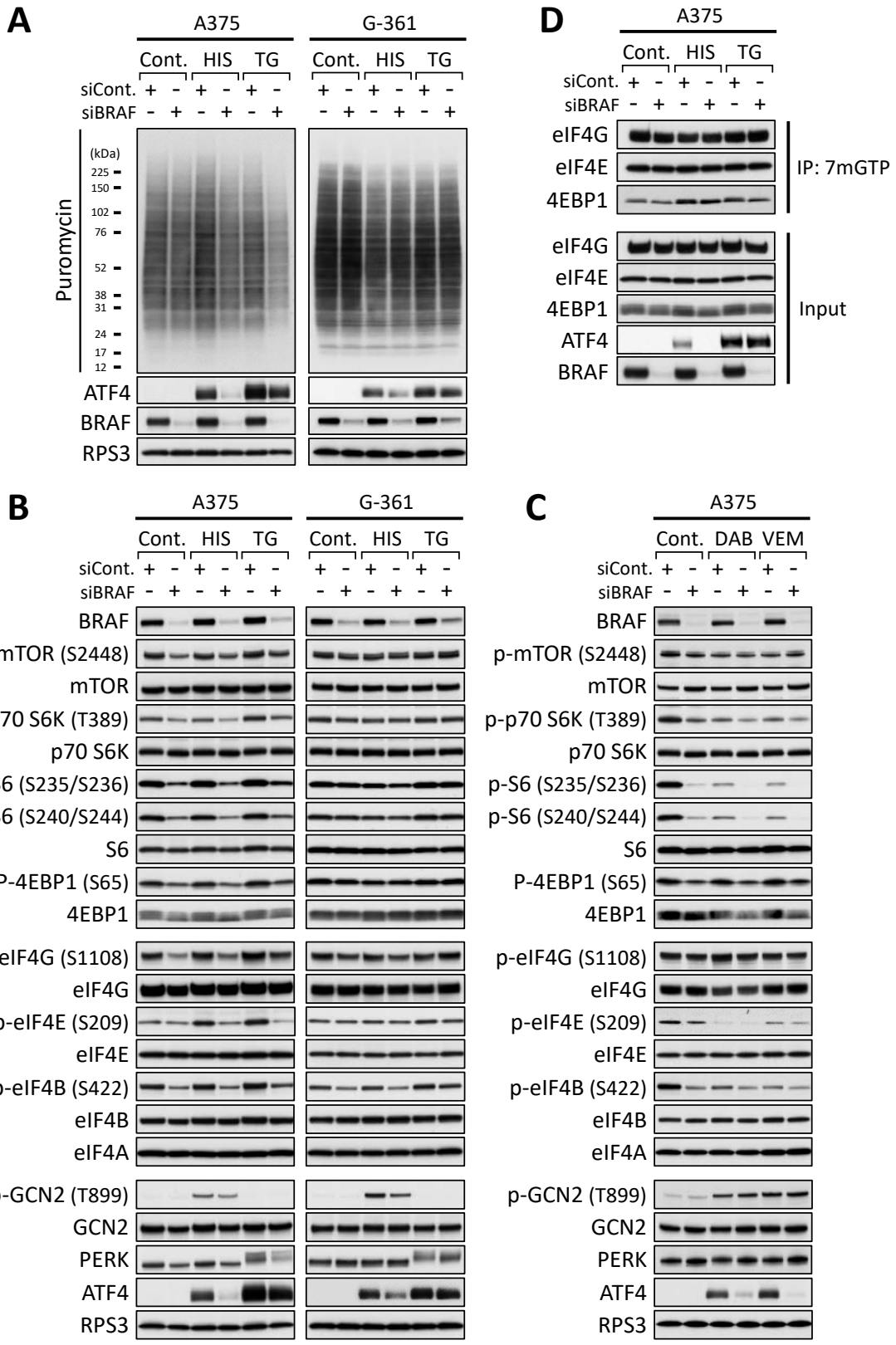
Supplementary Figure S3. $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞における BRAF ノックダウンはストレスに誘導される ATF4 発現を抑制する

A375 及び G-361 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM)、dabrafenib (DAB, 1 μM)、vemurafenib (VEM, 10 μM)、tunicamycin (TM, 1 μg/ml) または thapsigargin (TG, 300 nM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。本 Figure における実験は、Figure 11 とは異なる配列の siRNA (Silencer Select) を用いて行った。



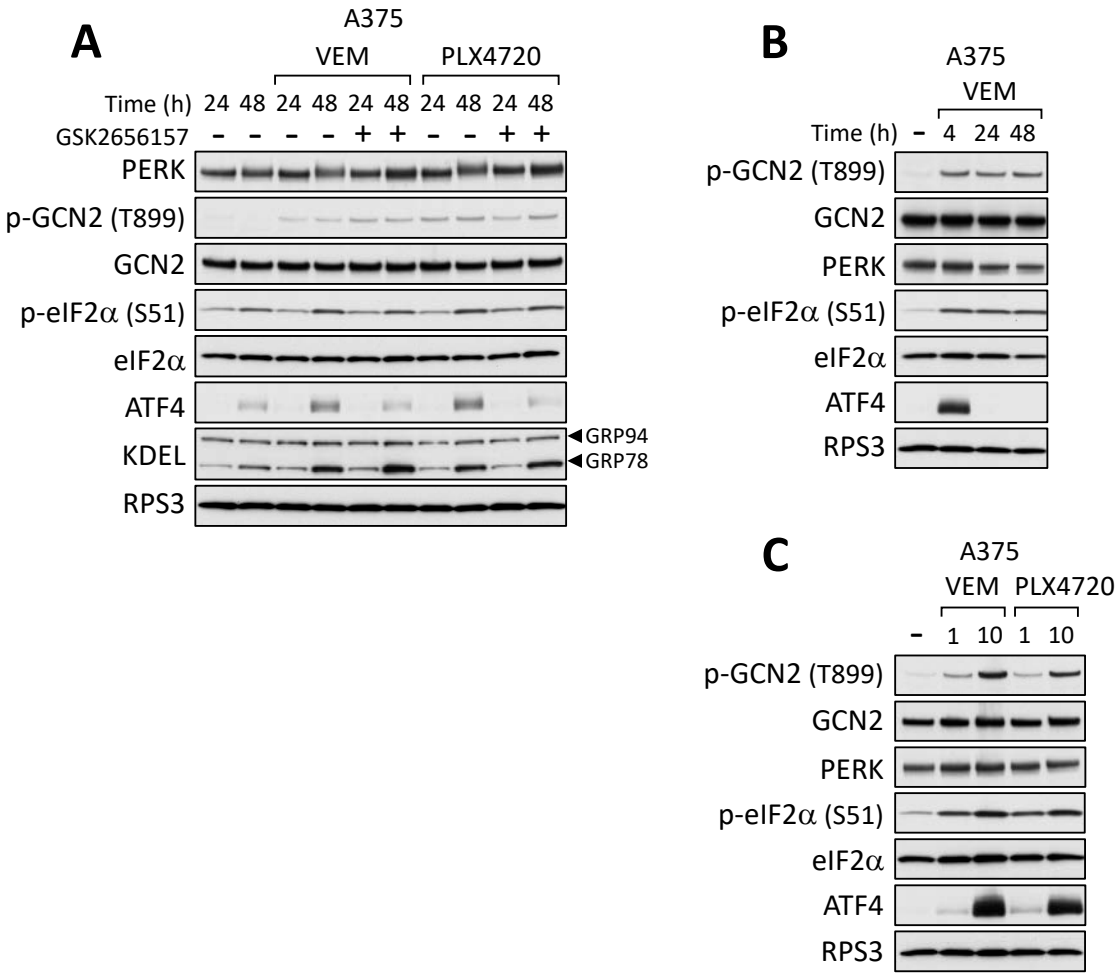
Supplementary Figure S4. BRAF ノックダウンが ATF4 mRNA 及び uORF に与える影響の検討

(**A**) A375 及び SK-MEL-2 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM, SK-MEL-2 のみ 20 mM)、dabrafenib (DAB, 1 μM)、vemurafenib (VEM, 10 μM)、tunicamycin (TM, 1 μg/ml, SK-MEL-2 のみ 10 μg/ml) または thapsigargin (TG, 300 nM) で 4 時間処理し、精製した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR 法により ATF4 mRNA レベルを測定した。(**B**) 上段: A375 細胞に ATF4 の 2 つの uORF 配列を組み込んだレポータープラスミド pRL-TK pGL3 Luc hATF4 UTR と BRAF に対する siRNA を導入した後、(A) と同様のストレッサーを 18 時間処理し、レポーターアッセイを行った (±SD, n=3)。本 Figure における実験は、Figure 12 とは異なる配列の siRNA (Silencer Select) を用いて行った。


A
A375
G-361
Cont.
HIS
TG
siCont.
siBRAF
Puromycin
(kDa)
225
150
102
76
52
38
31
24
17
12
ATF4
BRAF
RPS3
D
A375
Cont.
HIS
TG
siCont.
siBRAF
eIF4G
eIF4E
4EBP1
IP: 7mGTP
eIF4G
eIF4E
4EBP1
ATF4
BRAF
Input
B
A375
G-361
Cont.
HIS
TG
siCont.
siBRAF
BRAF
p-mTOR (S2448)
mTOR
p-p70 S6K (T389)
p70 S6K
p-S6 (S235/S236)
p-S6 (S240/S244)
S6
P-4EBP1 (S65)
4EBP1
p-eIF4G (S1108)
eIF4G
p-eIF4E (S209)
eIF4E
p-eIF4B (S422)
eIF4B
eIF4A
p-GCN2 (T899)
GCN2
PERK
ATF4
RPS3
C
A375
Cont.
DAB
VEM
siCont.
siBRAF
BRAF
p-mTOR (S2448)
mTOR
p-p70 S6K (T389)
p70 S6K
p-S6 (S235/S236)
p-S6 (S240/S244)
S6
P-4EBP1 (S65)
4EBP1
p-eIF4G (S1108)
eIF4G
p-eIF4E (S209)
eIF4E
p-eIF4B (S422)
eIF4B
eIF4A
p-GCN2 (T899)
GCN2
PERK
ATF4
RPS3

Supplementary Figure S5. $BRAF^{V600E}$ 変異型細胞株における BRAF ノックダウンは mTOR シグナル及び翻訳開始因子のリン酸化レベルを抑制する

(**A**) A375 及び G-361 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM)、または thapsigargin (TG, 300 nM) で 3.5 時間処理し、そのまま培地中に puromycin (最終濃度 1 μg/ml) を添加し、30 分インキュベートした。その後、ライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**B**) A375 及び G-361 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol または thapsigargin で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**C**) A375 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、dabrafenib (1 μM) または vemurafenib (10 μM) で 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**D**) A375 細胞に BRAF に対する siRNA を導入した後、L-histidinol (HIS, 2 mM) または thapsigargin (TG, 300 nM) で 4 時間処理したライゼートを調製した。7-methyl-GTP セファロースビーズを用いて eIF4E コンプレックスを精製し、ウェスタンブロット法により解析した。Figure S5A-S5C における実験は、Figure 13 とは異なる配列の siRNA (Silencer Select) を用いて行った。



Supplementary Figure S6. GCN2 及び PERK の活性化は vemurafenib の処理濃度及び時間に依存する

(**A**) A375 細胞に GSK2656157 (0.1 μM) を 1 時間前処理し、その後 vemurafenib (VEM, 1 μM) または PLX4720 (1 μM) で 24 または 48 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**B**) A375 細胞に vemurafenib (10 μM) を 4、24 または 48 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。(**C**) A375 細胞に vemurafenib (1 または 10 μM) または PLX4720 (1 または 10 μM)を 4 時間処理したライゼートを調製し、ウェスタンブロット法により解析した。

Supplementary Table S1. Figure 4E のシグネチャーに用いた 395 プローブセット

Probe Set ID	*Gene Symbol*
1553972_a_at	CBS
1554148_a_at	SLC33A1
1554462_a_at	DNAJB9
1554777_at	ZFP42
1555355_a_at	ETS1
1555673_at	KRTAP2-3 /// KRTAP2-4
1555788_a_at	TRIB3
1555963_x_at	B3GNT7
1555968_a_at	---
1558027_s_at	LOC101060511 /// PRKAB2
1558080_s_at	DNAJC3
1562367_at	C15orf54
1563808_at	MCF2L
1564494_s_at	P4HB
1569086_at	LOC100287177
200598_s_at	HSP90B1 /// MIR3652
200599_s_at	HSP90B1 /// MIR3652
200629_at	WARS
200656_s_at	P4HB
200670_at	XBP1
200779_at	ATF4
200799_at	HSPA1A /// HSPA1B
200800_s_at	HSPA1A /// HSPA1B
200825_s_at	HYOU1
200920_s_at	BTG1
200921_s_at	BTG1
200935_at	CALR
200969_at	SERP1
201008_s_at	LOC101060503 /// TXNIP
201009_s_at	LOC101060503 /// TXNIP
201010_s_at	LOC101060503 /// TXNIP
201041_s_at	DUSP1
201133_s_at	PJA2
201170_s_at	BHLHE40
201289_at	CYR61
201340_s_at	ENC1
201565_s_at	ID2
201694_s_at	EGR1
201896_s_at	PSRC1
201983_s_at	EGFR
202014_at	PPP1R15A
202061_s_at	SEL1L
202062_s_at	SEL1L
202064_s_at	SEL1L
202146_at	IFRD1
202147_s_at	IFRD1
202375_at	SEC24D
202431_s_at	MYC
202454_s_at	ERBB3
202557_at	HSPA13
202558_s_at	HSPA13
202581_at	HSPA1A /// HSPA1B
202655_at	MANF
202656_s_at	SERTAD2
202672_s_at	ATF3
202719_s_at	TES
202720_at	TES
202721_s_at	GFPT1
202722_s_at	GFPT1
202769_at	CCNG2
202770_s_at	CCNG2
202841_x_at	OGFR
202842_s_at	DNAJB9
202846_s_at	LOC100505991 /// PIGC
202858_at	U2AF1
202886_s_at	PPP2R1B
202949_s_at	FHL2
202986_at	ARNT2
203164_at	SLC33A1
203165_s_at	SLC33A1

Probe Set ID	*Gene Symbol*
203252_at	CDK2AP2
203279_at	EDEM1
203313_s_at	TGIF1
203343_at	UGDH
203438_at	STC2
203439_s_at	STC2
203455_s_at	SAT1
203574_at	NFIL3
203624_at	AKAP17A
203665_at	HMOX1
203675_at	NUCB2
203725_at	GADD45A
203821_at	HBEGF
203827_at	WIPI1
203971_at	SLC31A1
203989_x_at	F2R
204014_at	DUSP4
204140_at	TPST1
204159_at	CDKN2C
204194_at	BACH1
204203_at	CEBPG
204285_s_at	PMAIP1
204286_s_at	PMAIP1
204334_at	KLF7
204351_at	S100P
204379_s_at	FGFR3
204421_s_at	FGF2
204595_s_at	STC1
204597_x_at	STC1
204642_at	S1PR1
204897_at	PTGER4
204926_at	INHBA
205047_s_at	ASNS
205048_s_at	PSPH
205168_at	DDR2
205193_at	MAFF
205194_at	PSPH
205239_at	AREG /// AREGB
205266_at	LIF
205289_at	BMP2
205290_s_at	BMP2
205463_s_at	PDGFA
205481_at	ADORA1
205807_s_at	TUFT1
205899_at	CCNA1
206029_at	ANKRD1
206034_at	SERPINB8
206085_s_at	CTH
206101_at	ECM2
206157_at	PTX3
206163_at	MAB21L1
206170_at	ADRB2
206175_x_at	ZNF222
206332_s_at	IFI16
206552_s_at	TAC1
206569_at	IL24
206662_at	GLRX
206765_at	KCNJ2
207219_at	ZFP69B
207629_s_at	ARHGEF2
208003_s_at	NFAT5
208025_s_at	HMGA2
208296_x_at	TNFAIP8
208394_x_at	ESM1
208499_s_at	DNAJC3
208612_at	PDIA3
208658_at	PDIA4
208763_s_at	TSC22D3
208786_s_at	MAP1LC3B
208813_at	GOT1

Probe Set ID	*Gene Symbol*
208937_s_at	ID1
208965_s_at	IFI16
208966_x_at	IFI16
209099_x_at	JAG1
209101_at	CTGF
209205_s_at	LMO4
209212_s_at	KLF5
209230_s_at	NUPR1
209276_s_at	GLRX
209294_x_at	TNFRSF10B
209383_at	DDIT3
209404_s_at	TMED7 /// TMED7-TICAM2
209409_at	GRB10
209431_s_at	PATZ1
209435_s_at	ARHGEF2
209457_at	DUSP5
209610_s_at	SLC1A4
209682_at	CBLB
209765_at	ADAM19
209822_s_at	VLDLR
209850_s_at	CDC42EP2
209921_at	SLC7A11
210002_at	GATA6
210105_s_at	FYN
210405_x_at	TNFRSF10B
210512_s_at	VEGFA
210592_s_at	SAT1
210596_at	MAGT1
210705_s_at	TRIM5
210762_s_at	DLC1
210764_s_at	CYR61
210970_s_at	IBTK
210999_s_at	GRB10
211048_s_at	PDIA4
211936_at	HSPA5
212110_at	SLC39A14
212233_at	MAP1B
212472_at	MICAL2
212501_at	CEBPB
212622_at	TMEM41B
212623_at	TMEM41B
212660_at	PHF15
212724_at	RND3
212810_s_at	SLC1A4
212811_x_at	SLC1A4
212935_at	MCF2L
212948_at	CAMTA2
212985_at	APBB2
213182_x_at	CDKN1C
213206_at	GOSR2
213348_at	CDKN1C
213425_at	WNT5A
213506_at	F2RL1
213836_s_at	WIPI1
213844_at	HOXA5
213988_s_at	SAT1
214014_at	CDC42EP2
214581_x_at	TNFRSF21
214658_at	TMED7 /// TMED7-TICAM2
214724_at	DIXDC1
215243_s_at	GJB3
215767_at	ZNF804A
216268_s_at	JAG1
216449_x_at	HSP90B1
216450_x_at	HSP90B1
216894_x_at	CDKN1C
217127_at	CTH
217168_s_at	HERPUD1
217678_at	SLC7A11
217823_s_at	UBE2J1

Probe Set ID	Gene Symbol
217824_at	UBE2J1
217825_s_at	UBE2J1
217826_s_at	UBE2J1
217853_at	TNS3
217858_s_at	ARMCX3
217966_s_at	FAM129A
217967_s_at	FAM129A
217996_at	PHLDA1
217997_at	PHLDA1
217999_s_at	PHLDA1
218000_s_at	PHLDA1
218050_at	UFM1
218145_at	TRIB3
218251_at	MID1IP1
218296_x_at	MSTO1 /// MSTO2P
218358_at	CRELD2
218421_at	CERK
218615_s_at	TMEM39A
218651_s_at	LARP6
218681_s_at	SDF2L1
218696_at	EIF2AK3
218856_at	TNFRSF21
218974_at	SOBP
219010_at	C1orf106
219256_s_at	SH3TC1
219270_at	CHAC1
219371_s_at	KLF2
219390_at	FKBP14
219534_x_at	CDKN1C
219600_s_at	TMEM50B
219910_at	FICD
219990_at	E2F8
220012_at	ERO1LB
220038_at	C8orf44-SGK3 /// SGK3
220266_s_at	KLF4
220892_s_at	PSAT1
221050_s_at	GTPBP2
221489_s_at	SPRY4
221553_at	MAGT1
221559_s_at	MIS12
221577_x_at	GDF15
221778_at	JHDM1D
221841_s_at	KLF4
221865_at	C9orf91
222235_s_at	CSGALNACT2
222412_s_at	SSR3
222444_at	ARMCX3
222450_at	PMEPA1
222690_s_at	TMEM39A
222710_at	AMIGO3 /// GMPPB
222907_x_at	TMEM50B
223054_at	DNAJB11
223059_s_at	FAM107B
223062_s_at	PSAT1
223070_at	SELK
223195_s_at	SESN2
223196_s_at	SESN2
223209_s_at	VIMP
223314_at	TSPAN14
223412_at	KBTBD7
223450_s_at	COG3
223541_at	HAS3
224233_s_at	MSTO1
224325_at	FZD8
224367_at	BEX2
224516_s_at	CXXC5
224657_at	ERRFI1
224822_at	DLC1
224833_at	ETS1
224839_s_at	GPT2
224899_s_at	MAGT1
225033_at	ST3GAL1
225090_at	SYVN1
225133_at	KLF3
225163_at	FRMD4A
225182_at	TMEM50B
225278_at	LOC101060511 /// PRKAB2
225284_at	DNAJC3
225316_at	MFSD2A
225436_at	ABHD17C
225442_at	DDR2
225527_at	CEBPG
225621_at	ALG2
225634_at	ZC3HAV1
225666_at	TMTC4
225807_at	AJUBA
226034_at	DUSP4
226084_at	MAP1B
226101_at	PRKCE
226135_at	UHRF1BP1
226150_at	PPAPDC1B
226181_at	TUBE1
226206_at	MAFK
226275_at	MXD1
226321_at	LYSMD3
226390_at	STARD4
226425_at	CLIP4
226722_at	FAM20C
226725_at	SLFN5
226743_at	SLFN11
226750_at	LARP1B
226886_at	GFPT1
226925_at	ACPL2
227027_at	GFPT1
227033_at	PDIA3
227038_at	SGMS2
227052_at	---
227080_at	ZNF697
227220_at	NFXL1
227236_at	TSPAN2
227404_s_at	EGR1
227405_s_at	FZD8
227443_at	LURAP1L
227484_at	SRGAP1
227561_at	DDR2
227627_at	C8orf44-SGK3 /// SGK3
227755_at	OTTHUMG00000178878 /// RP11-214C8.5
227997_at	IL17RD
228033_at	E2F7
228038_at	SOX2
228121_at	TGFB2
228146_at	C17orf51
228482_at	CDRT4 /// TVP23C-CDRT4
228497_at	SLC22A15
228499_at	PFKFB4
228574_at	TMTC2
228635_at	PCDH10
228745_at	SGTB
228846_at	MXD1
229285_at	RNASEL
229332_at	HPDL
229453_at	PDIA3
229717_at	AMIGO3 /// GMPPB
229817_at	ZNF608
229838_at	NUCB2
230031_at	HSPA5
230075_at	RAB39B
230261_at	ST8SIA4
230265_at	---
230493_at	SHISA2
230659_at	---
230722_at	BNC2
230728_at	FKBP14
230746_s_at	---
230836_at	ST8SIA4
230972_at	ANKRD9
231202_at	ALDH1L2
231798_at	NOG
231828_at	PSMD5-AS1
231894_at	SARS
231944_at	ERO1LB
232068_s_at	TLR4
233557_s_at	MON1B
233764_s_at	LARP1B
233888_s_at	SRGAP1
233955_x_at	CXXC5
235122_at	HIVEP3
235142_at	ZBTB8A
235191_at	LINC00662
235230_at	PLCXD2
235311_at	FKBP14
235341_at	DNAJC3
235589_s_at	---
235775_at	TMTC2
235939_at	OTTHUMG00000175830 /// RP1-228H13.5
236606_at	OTTHUMG00000183927 /// RP11-248J18.2
237411_at	ADAMTS6
237435_at	---
238009_at	SOX5
238430_x_at	SLFN5
238478_at	BNC2
238575_at	OSBPL6
238729_x_at	SAV1
239451_at	---
239825_at	---
240421_x_at	SAV1
242727_at	ARL5B
242943_at	ST8SIA4
243160_at	---
244070_at	SYNE1
244841_at	SEC24A
35147_at	MCF2L
36711_at	MAFF
37028_at	PPP1R15A
38037_at	HBEGF

Supplementary Table S2. A375 細胞における vemurafenib、2DG または tunicamycin 処理時に共通して発現上昇を認めた 114 プローブセットに対する GO 解析結果

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 3.1748107799632934				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	amino-acid biosynthesis	5	5.81	3.1E-06	3.6E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0008652~cellular amino acid biosynthetic process	6	6.98	4.0E-06	6.2E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0009070~serine family amino acid biosynthetic process	4	4.65	1.6E-05	2.5E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0009309~amine biosynthetic process	6	6.98	3.9E-05	6.1E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0046394~carboxylic acid biosynthetic process	7	8.14	8.9E-05	1.4E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0016053~organic acid biosynthetic process	7	8.14	8.9E-05	1.4E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0030170~pyridoxal phosphate binding	5	5.81	1.1E-04	1.3E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0070279~vitamin B6 binding	5	5.81	1.1E-04	1.3E-01
SP_PIR_KEYWORDS	pyridoxal phosphate	5	5.81	1.4E-04	1.7E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0009069~serine family amino acid metabolic process	4	4.65	2.4E-04	3.8E-01
KEGG_PATHWAY	hsa00260:Glycine, serine and threonine metabolism	4	4.65	2.5E-04	2.4E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0019842~vitamin binding	6	6.98	3.3E-04	4.0E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006563~L-serine metabolic process	3	3.49	6.1E-04	9.3E-01
INTERPRO	IPR015421:Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 1	4	4.65	7.9E-04	9.8E-01
INTERPRO	IPR015422:Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 2	3	3.49	1.2E-03	1.5E+00
SP_PIR_KEYWORDS	Aminotransferase	3	3.49	3.6E-03	4.1E+00
GOTERM_MF_FAT	GO:0008483~transaminase activity	3	3.49	4.2E-03	5.0E+00
GOTERM_MF_FAT	GO:0048037~cofactor binding	6	6.98	5.8E-03	6.9E+00
GOTERM_MF_FAT	GO:0016769~transferase activity, transferring nitrogenous groups	3	3.49	8.4E-03	9.9E+00
KEGG_PATHWAY	hsa00270:Cysteine and methionine metabolism	3	3.49	8.4E-03	7.7E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	6	6.98	1.9E-02	2.5E+01
SP_PIR_KEYWORDS	transferase	6	6.98	7.2E-01	1.0E+02
SP_PIR_KEYWORDS	disease mutation	5	5.81	9.2E-01	1.0E+02

Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 3.0802395199484254				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
INTERPRO	IPR011700:Basic leucine zipper	6	6.98	4.4E-09	5.4E-06
GOTERM_MF_FAT	GO:0003700~transcription factor activity	13	15.12	1.5E-03	1.8E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0006366~transcription from RNA polymerase II promoter	5	5.81	2.5E-02	3.2E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006351~transcription, DNA-dependent	5	5.81	4.9E-02	5.4E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0032774~RNA biosynthetic process	5	5.81	5.1E-02	5.6E+01

Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 3.037309190281408				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
INTERPRO	IPR011700:Basic leucine zipper	6	6.98	4.4E-09	5.4E-06
GOTERM_MF_FAT	GO:0008134~transcription factor binding	11	12.79	1.1E-04	1.3E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0003712~transcription cofactor activity	7	8.14	6.4E-03	7.6E+00
GOTERM_MF_FAT	GO:0003714~transcription corepressor activity	4	4.65	2.9E-02	3.1E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0016564~transcription repressor activity	5	5.81	5.8E-02	5.2E+01
SP_PIR_KEYWORDS	repressor	5	5.81	1.1E-01	7.6E+01

Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 2.5496812863907072				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
SMART	SM00338:BRLZ	8	9.30	1.7E-09	1.5E-06
INTERPRO	IPR004827:Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor	8	9.30	3.3E-09	4.1E-06
INTERPRO	IPR011700:Basic leucine zipper	6	6.98	4.4E-09	5.4E-06
UP_SEQ_FEATURE	domain:Leucine-zipper	9	10.47	2.3E-08	3.1E-05
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region:Basic motif	7	8.14	6.7E-05	8.9E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0008134~transcription factor binding	11	12.79	1.1E-04	1.3E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0046983~protein dimerization activity	11	12.79	1.7E-04	2.1E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0030528~transcription regulator activity	17	19.77	1.1E-03	1.3E+00
GOTERM_MF_FAT	GO:0003700~transcription factor activity	13	15.12	1.5E-03	1.8E+00
SP_PIR_KEYWORDS	activator	9	10.47	1.7E-03	2.0E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	10	11.63	3.5E-03	5.2E+00
SP_PIR_KEYWORDS	transcription regulation	18	20.93	4.7E-03	5.4E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	10	11.63	4.7E-03	7.1E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	10	11.63	5.2E-03	7.7E+00
SP_PIR_KEYWORDS	Transcription	18	20.93	5.8E-03	6.7E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	11	12.79	6.6E-03	9.8E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0045449~regulation of transcription	22	25.58	6.8E-03	1.0E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006350~transcription	18	20.93	1.6E-02	2.2E+01

GOTERM_MF_FAT	GO:0043565~sequence-specific DNA binding	8	9.30	2.1E-02	2.3E+01
SP_PIR_KEYWORDS	dna-binding	15	17.44	2.6E-02	2.7E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	8	9.30	2.7E-02	3.5E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	8	9.30	3.2E-02	3.9E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	15	17.44	3.5E-02	4.3E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	15	17.44	4.2E-02	4.8E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0045941~positive regulation of transcription	7	8.14	5.0E-02	5.5E+01
SP_PIR_KEYWORDS	nucleus	26	30.23	5.2E-02	4.7E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0010628~positive regulation of gene expression	7	8.14	5.6E-02	5.9E+01
SP_PIR_KEYWORDS	DNA binding	5	5.81	5.7E-02	5.0E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0003677~DNA binding	17	19.77	6.1E-02	5.4E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0003702~RNA polymerase II transcription factor activity	4	4.65	1.0E-01	7.4E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7	8.14	1.3E-01	8.8E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	5	5.81	1.9E-01	9.6E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	5	5.81	1.9E-01	9.6E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4	4.65	2.6E-01	9.9E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0016563~transcription activator activity	4	4.65	2.9E-01	9.9E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006955~immune response	5	5.81	4.1E-01	1.0E+02

Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 2.4281875387113985				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0034976~response to endoplasmic reticulum stress	5	5.81	1.9E-05	2.9E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0030968~endoplasmic reticulum unfolded protein response	3	3.49	4.4E-03	6.6E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0034620~cellular response to unfolded protein	3	3.49	4.4E-03	6.6E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0006984~ER-nuclear signaling pathway	3	3.49	1.2E-02	1.7E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0051789~response to protein stimulus	4	4.65	1.4E-02	2.0E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006986~response to unfolded protein	3	3.49	4.4E-02	5.1E+01

Supplementary Table S3. A375 細胞における 2DG または tunicamycin 処理時に共通して発現上昇を認めた 207 プローブセットに対する GO 解析結果

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 9.8279940194613				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	26	18.84	3.1E-11	3.8E-08
GOTERM_CC_FAT	GO:0005783~endoplasmic reticulum	31	22.46	4.9E-11	6.1E-08
GOTERM_CC_FAT	GO:0044432~endoplasmic reticulum part	18	13.04	2.2E-09	2.8E-06

Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 5.153622478248857				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0043067~regulation of programmed cell death	25	18.12	5.4E-08	8.9E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0010941~regulation of cell death	25	18.12	5.8E-08	9.6E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0042981~regulation of apoptosis	24	17.39	1.9E-07	3.2E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0043065~positive regulation of apoptosis	15	10.87	1.5E-05	2.5E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	15	10.87	1.6E-05	2.7E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0010942~positive regulation of cell death	15	10.87	1.7E-05	2.8E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0006917~induction of apoptosis	10	7.25	1.5E-03	2.5E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0012502~induction of programmed cell death	10	7.25	1.6E-03	2.6E+00

Annotation Cluster 3	Enrichment Score: 4.421621764568182				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
UP_SEQ_FEATURE	short sequence motif:Prevents secretion from ER	9	6.52	8.7E-09	1.3E-05
GOTERM_CC_FAT	GO:0005788~endoplasmic reticulum lumen	10	7.25	1.5E-08	1.8E-05
INTERPRO	IPR000886:Endoplasmic reticulum, targeting sequence	7	5.07	1.3E-06	1.7E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0048770~pigment granule	5	3.62	5.8E-03	7.0E+00
GOTERM_CC_FAT	GO:0042470~melanosome	5	3.62	5.8E-03	7.0E+00
GOTERM_MF_FAT	GO:0005509~calcium ion binding	9	6.52	5.5E-01	1.0E+02

Annotation Cluster 4	Enrichment Score: 4.304943010210572				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	23	16.67	6.5E-08	1.1E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	22	15.94	2.3E-07	3.8E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	21	15.22	3.8E-07	6.3E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	21	15.22	4.9E-07	8.0E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	19	13.77	4.4E-06	7.4E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	22	15.94	8.3E-06	1.4E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	15	10.87	4.7E-05	7.8E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	15	10.87	5.1E-05	8.5E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	13	9.42	6.8E-05	1.1E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0045941~positive regulation of transcription	16	11.59	7.6E-05	1.3E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0010628~positive regulation of gene expression	16	11.59	1.1E-04	1.8E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	18	13.04	1.2E-04	2.0E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	27	19.57	3.0E-03	4.9E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	27	19.57	4.1E-03	6.5E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0045449~regulation of transcription	32	23.19	2.4E-02	3.3E+01
GOTERM_MF_FAT	GO:0016563~transcription activator activity	6	4.35	2.9E-01	9.9E+01

Annotation Cluster 5	Enrichment Score: 3.5292991624377303				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_MF_FAT	GO:0008083~growth factor activity	14	10.14	1.3E-09	1.8E-06
SP_PIR_KEYWORDS	growth factor	11	7.97	3.1E-08	3.9E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	15	10.87	1.1E-06	1.8E-03
SP_PIR_KEYWORDS	signal	42	30.43	9.1E-05	1.1E-01
UP_SEQ_FEATURE	signal peptide	42	30.43	1.1E-04	1.5E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005615~extracellular space	17	12.32	1.1E-04	1.4E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0044421~extracellular region part	19	13.77	6.1E-04	7.6E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0005125~cytokine activity	8	5.80	1.6E-03	2.1E+00
SP_PIR_KEYWORDS	Secreted	23	16.67	3.7E-03	4.5E+00
GOTERM_CC_FAT	GO:0005576~extracellular region	28	20.29	4.2E-03	5.1E+00
SP_PIR_KEYWORDS	disulfide bond	33	23.91	6.8E-03	8.2E+00
SP_PIR_KEYWORDS	glycoprotein	42	30.43	2.2E-02	2.5E+01
UP_SEQ_FEATURE	disulfide bond	30	21.74	2.4E-02	3.0E+01
UP_SEQ_FEATURE	glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)	39	28.26	4.8E-02	5.1E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0007166~cell surface receptor linked signal transduction	22	15.94	9.5E-02	8.1E+01

Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 3.244644324816071				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_CC_FAT	GO:0031988~membrane-bounded vesicle	15	10.87	1.8E-04	2.2E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0031982~vesicle	16	11.59	2.9E-04	3.7E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0016023~cytoplasmic membrane-bounded vesicle	14	10.14	4.6E-04	5.8E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0031410~cytoplasmic vesicle	15	10.87	6.2E-04	7.7E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0044433~cytoplasmic vesicle part	7	5.07	4.0E-03	4.9E+00

Annotation Cluster 7	Enrichment Score: 3.220602837686791				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_CC_FAT	GO:0044432~endoplasmic reticulum part	18	13.04	2.2E-09	2.8E-06
GOTERM_CC_FAT	GO:0042175~nuclear envelope-endoplasmic reticulum network	11	7.97	9.6E-05	1.2E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0005789~endoplasmic reticulum membrane	10	7.25	3.2E-04	4.0E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0031301~integral to organelle membrane	7	5.07	4.7E-04	5.9E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0012505~endomembrane system	17	12.32	5.0E-04	6.2E-01
GOTERM_CC_FAT	GO:0031300~intrinsic to organelle membrane	7	5.07	1.2E-03	1.4E+00
GOTERM_CC_FAT	GO:0030176~integral to endoplasmic reticulum membrane	4	2.90	6.4E-03	7.7E+00
GOTERM_CC_FAT	GO:0031090~organelle membrane	18	13.04	6.4E-03	7.7E+00
GOTERM_CC_FAT	GO:0031227~intrinsic to endoplasmic reticulum membrane	4	2.90	1.5E-02	1.7E+01
SP_PIR_KEYWORDS	Signal-anchor	4	2.90	5.7E-01	1.0E+02

Supplementary Table S4. Figure 5A のシグネチャーに用いた 563 プローブセット

Probe Set ID	*Gene Symbol*
1552648_a_at	TNFRSF10A
1552798_a_at	TLR4
1553055_a_at	SLFN5
1553972_a_at	CBS
1553994_at	NT5E
1553995_a_at	NT5E
1554980_a_at	ATF3
1555673_at	KRTAP2-3 /// KRTAP2-4
1555832_s_at	KLF6
1555968_a_at	---
1556773_at	---
1557458_s_at	SHB
1558027_s_at	LOC101060511 /// PRKAB2
1558404_at	LINC00622
1560477_a_at	SAMD11
1561691_at	LINC00326
1562367_at	C15orf54
200768_s_at	MAT2A
200796_s_at	MCL1
200797_s_at	MCL1
200798_x_at	MCL1
200919_at	PHC2
201008_s_at	LOC101060503 /// TXNIP
201009_s_at	LOC101060503 /// TXNIP
201010_s_at	LOC101060503 /// TXNIP
201041_s_at	DUSP1
201107_s_at	THBS1
201108_s_at	THBS1
201109_s_at	THBS1
201148_s_at	TIMP3
201149_s_at	TIMP3
201150_s_at	TIMP3
201170_s_at	BHLHE40
201289_at	CYR61
201324_at	EMP1
201325_s_at	EMP1
201340_s_at	ENC1
201341_at	ENC1
201367_s_at	ZFP36L2
201368_at	ZFP36L2
201369_s_at	ZFP36L2
201416_at	SOX4
201417_at	SOX4
201464_x_at	JUN
201465_s_at	JUN
201466_s_at	JUN
201565_s_at	ID2
201566_x_at	ID2
201631_s_at	IER3
201695_s_at	PNP
201739_at	SGK1
201829_at	NET1
201830_s_at	NET1
201860_s_at	PLAT
201920_at	SLC20A1
201983_s_at	EGFR
202006_at	PTPN12
202067_s_at	LDLR
202068_s_at	LDLR
202081_at	IER2
202132_at	WWTR1
202134_s_at	WWTR1
202146_at	IFRD1
202147_s_at	IFRD1
202241_at	TRIB1
202283_at	SERPINF1
202391_at	BASP1
202431_s_at	MYC
202437_s_at	CYP1B1
202464_s_at	PFKFB3
202478_at	TRIB2
202479_s_at	TRIB2
202497_x_at	SLC2A3
202498_s_at	SLC2A3
202499_s_at	SLC2A3
202565_s_at	SVIL
202644_s_at	TNFAIP3
202663_at	WIPF1
202664_at	WIPF1
202672_s_at	ATF3
202693_s_at	STK17A
202695_s_at	STK17A
202769_at	CCNG2
202770_s_at	CCNG2
202846_s_at	LOC100505991 /// PIGC
202858_at	U2AF1
202912_at	ADM
202949_s_at	FHL2
202969_at	DYRK2
202975_s_at	RHOBTB3
202976_s_at	RHOBTB3
202986_at	ARNT2
203044_at	CHSY1
203072_at	MYO1E
203108_at	GPRC5A
203143_s_at	KIAA0040
203153_at	IFIT1
203180_at	ALDH1A3
203217_s_at	ST3GAL5
203320_at	SH2B3
203348_s_at	ETV5
203349_s_at	ETV5
203394_s_at	HES1
203395_s_at	HES1
203474_at	IQGAP2
203499_at	EPHA2
203603_s_at	ZEB2
203607_at	INPP5F
203699_s_at	DIO2
203700_s_at	DIO2
203759_at	ST3GAL4
203821_at	HBEGF
203879_at	PIK3CD
203921_at	CHST2
203989_x_at	F2R
204011_at	SPRY2
204014_at	DUSP4
204015_s_at	DUSP4
204032_at	BCAR3
204140_at	TPST1
204197_s_at	RUNX3
204198_s_at	RUNX3
204203_at	CEBPG
204254_s_at	VDR
204255_s_at	VDR
204337_at	RGS4
204351_at	S100P
204363_at	F3
204396_s_at	GRK5
204401_at	KCNN4
204420_at	FOSL1
204435_at	NUPL1
204451_at	FZD1
204470_at	CXCL1
204595_s_at	STC1
204596_s_at	STC1
204597_x_at	STC1
204657_s_at	SHB
204689_at	HHEX
204695_at	CDC25A
204696_s_at	CDC25A
204913_s_at	SOX11
204914_s_at	SOX11
204915_s_at	SOX11
204933_s_at	TNFRSF11B
204948_s_at	FST
204967_at	SHROOM2
205015_s_at	TGFA
205016_at	TGFA
205042_at	GNE
205047_s_at	ASNS
205048_s_at	PSPH
205097_at	SLC26A2
205101_at	CIITA
205117_at	FGF1
205130_at	MOK
205168_at	DDR2
205193_at	MAFF
205194_at	PSPH
205239_at	AREG /// AREGB
205266_at	LIF
205286_at	TFAP2C
205287_s_at	TFAP2C
205289_at	BMP2
205290_s_at	BMP2
205398_s_at	SMAD3
205453_at	HOXB2
205466_s_at	HS3ST1
205596_s_at	SMURF2
205749_at	CYP1A1
205805_s_at	ROR1
205872_x_at	LOC101060353 /// PDE4DIP
205932_s_at	MSX1
206029_at	ANKRD1
206067_s_at	WT1
206085_s_at	CTH
206101_at	ECM2
206115_at	EGR3
206157_at	PTX3
206170_at	ADRB2
206271_at	TLR3
206300_s_at	PTHLH
206307_s_at	FOXD1
206385_s_at	ANK3
206429_at	F2RL1
206448_at	ZNF365
206460_at	AJAP1
206501_x_at	ETV1
206569_at	IL24
206652_at	ZMYM5
206765_at	KCNJ2
206924_at	IL11
206925_at	ST8SIA4
206926_s_at	IL11
207084_at	POU3F2
207345_at	FST
207390_s_at	SMTN
207558_s_at	PITX2
207604_s_at	SLC4A7
207606_s_at	ARHGAP12
207754_at	LOC100996477 /// RASSF8
207761_s_at	METTL7A
207950_s_at	ANK3
208309_s_at	MALT1
208394_x_at	ESM1
208476_s_at	FRMD4A
208510_s_at	PPARG
208650_s_at	CD24
208651_x_at	CD24
208711_s_at	CCND1

Probe Set ID	Gene Symbol
208712_at	CCND1
208763_s_at	TSC22D3
208891_at	DUSP6
208892_s_at	DUSP6
208893_s_at	DUSP6
208944_at	TGFBR2
208960_s_at	KLF6
209034_at	PNRC1
209037_s_at	EHD1
209039_x_at	EHD1
209099_x_at	JAG1
209101_at	CTGF
209230_s_at	NUPR1
209286_at	CDC42EP3
209287_s_at	CDC42EP3
209288_s_at	CDC42EP3
209324_s_at	RGS16
209325_s_at	RGS16
209357_at	CITED2
209383_at	DDIT3
209386_at	TM4SF1
209387_s_at	TM4SF1
209442_x_at	ANK3
209457_at	DUSP5
209493_at	PDZD2
209604_s_at	GATA3
209655_s_at	TMEM47
209656_s_at	TMEM47
209682_at	CBLB
209771_x_at	CD24
209772_s_at	CD24
209782_s_at	DBP
209803_s_at	PHLDA2
209822_s_at	VLDLR
209850_s_at	CDC42EP2
209884_s_at	SLC4A7
209946_at	VEGFC
210017_at	MALT1
210018_x_at	MALT1
210095_s_at	IGFBP3
210198_s_at	PLP1
210355_at	PTHLH
210511_s_at	INHBA
210612_s_at	SYNJ2
210692_s_at	SLC43A3
210762_s_at	DLC1
210764_s_at	CYR61
210845_s_at	PLAUR
211258_s_at	TGFA
211506_s_at	IL8
211559_s_at	CCNG2
211756_at	PTHLH
211924_s_at	PLAUR
212096_s_at	MTUS1
212148_at	PBX1
212298_at	NRP1
212419_at	ZCCHC24
212423_at	ZCCHC24
212434_at	GRPEL1
212444_at	GPRC5A
212445_s_at	NEDD4L
212448_at	NEDD4L
212458_at	SPRED2
212665_at	TIPARP
212715_s_at	MICAL3
212724_at	RND3
212764_at	LOC100996668 /// ZEB1
212816_s_at	CBS
212828_at	SYNJ2
212838_at	DNMBP

Probe Set ID	Gene Symbol
212845_at	SAMD4A
212906_at	GRAMD1B
212942_s_at	KIAA1199
212948_at	CAMTA2
212981_s_at	FAM115A /// LOC100294033
213056_at	FRMD4B
213113_s_at	SLC43A3
213142_x_at	GSAP
213281_at	JUN
213310_at	CTA-204B4.6 /// OTTHUMG00000172354
213338_at	TMEM158
213413_at	STON1
213462_at	NPAS2
213506_at	F2RL1
213664_at	SLC1A1
213721_at	SOX2
213722_at	SOX2
213848_at	DUSP7
213849_s_at	PPP2R2B
214014_at	CDC42EP2
214023_x_at	TUBB2B
214056_at	MCL1
214057_at	MCL1
214451_at	TFAP2B
214581_x_at	TNFRSF21
215034_s_at	TM4SF1
215037_s_at	BCL2L1
215704_at	FLG
215933_s_at	HHEX
216048_s_at	RHOBTB3
216236_s_at	SLC2A14 /// SLC2A3
216268_s_at	JAG1
216379_x_at	CD24
216915_s_at	PTPN12
217053_x_at	ETV1
217061_s_at	ETV1
217127_at	CTH
217173_s_at	LDLR
217678_at	SLC7A11
217875_s_at	PMEPA1
217911_s_at	BAG3
217966_s_at	FAM129A
217967_s_at	FAM129A
217996_at	PHLDA1
217997_at	PHLDA1
217998_at	PHLDA1
217999_s_at	PHLDA1
218000_s_at	PHLDA1
218113_at	TMEM2
218211_s_at	MLPH
218273_s_at	PDP1
218276_s_at	SAV1
218284_at	SMAD3
218303_x_at	KRCC1
218326_s_at	LGR4
218530_at	FHOD1
218647_s_at	YRDC
218651_s_at	LARP6
218691_s_at	PDLIM4
218692_at	SYBU
218807_at	VAV3
218856_at	TNFRSF21
219010_at	C1orf106
219049_at	CSGALNACT1
219250_s_at	FLRT3
219270_at	CHAC1
219361_s_at	AEN
219371_s_at	KLF2
219522_at	FJX1
219563_at	LINC00341

Probe Set ID	Gene Symbol
219634_at	CHST11
219682_s_at	TBX3
219911_s_at	SLCO4A1
220012_at	ERO1LB
220014_at	PRR16
220144_s_at	ANKEF1
220272_at	BNC2
220892_s_at	PSAT1
220945_x_at	MANSC1
221060_s_at	TLR4
221215_s_at	RIPK4
221276_s_at	SYNC
221489_s_at	SPRY4
221752_at	SSH1
221773_at	ELK3
221864_at	ORAI3
221911_at	ETV1
222088_s_at	SLC2A14 /// SLC2A3
222108_at	AMIGO2
222150_s_at	GSAP
222221_x_at	EHD1
222449_at	PMEPA1
222450_at	PMEPA1
222572_at	PDP1
222582_at	PRKAG2
222847_s_at	EGLN3
222853_at	FLRT3
223062_s_at	PSAT1
223159_s_at	NEK6
223195_s_at	SESN2
223196_s_at	SESN2
223204_at	FAM198B
223264_at	MESDC1
223314_at	TSPAN14
223541_at	HAS3
223599_at	TRIM6
223704_s_at	DMRT2
224325_at	FZD8
224341_x_at	TLR4
224606_at	KLF6
224657_at	ERRFI1
224797_at	ARRDC3
224822_at	DLC1
224959_at	SLC26A2
224963_at	SLC26A2
224990_at	SMIM14
225048_at	PHF10
225163_at	FRMD4A
225167_at	FRMD4A
225168_at	FRMD4A
225186_at	RAPH1
225188_at	RAPH1
225189_s_at	RAPH1
225202_at	RHOBTB3
225220_at	SNHG8 /// SNORA24
225278_at	LOC101060511 /// PRKAB2
225283_at	ARRDC4
225316_at	MFSD2A
225436_at	ABHD17C
225442_at	DDR2
225450_at	AMOTL1
225457_s_at	LINC00263 /// PP7080
225459_at	AMOTL1
225544_at	TBX3
225548_at	LOC100996628 /// SHROOM3
225569_at	CTA-204B4.6 /// OTTHUMG00000172354
225582_at	ITPRIP
225619_at	SLAIN1
225626_at	PAG1
225685_at	CDC42EP3

Probe Set ID	Gene Symbol
225842_at	PHLDA1
225864_at	FAM84B
225912_at	TP53INP1
225946_at	LOC100996477 /// RASSF8
225975_at	PCDH18
226034_at	DUSP4
226077_at	RNF145
226101_at	PRKCE
226113_at	ZNF436
226114_at	ZNF436
226135_at	UHRF1BP1
226179_at	SLC25A37
226206_at	MAFK
226267_at	JDP2
226372_at	CHST11
226448_at	FAM89A /// MIR1182
226490_at	NHSL1
226497_s_at	FLT1
226498_at	FLT1
226612_at	UBE2QL1
226675_s_at	MALAT1
226722_at	FAM20C
226725_at	SLFN5
226795_at	LRCH1
226817_at	DSC2
226837_at	SPRED1
226847_at	FST
226925_at	ACPL2
226974_at	NEDD4L
226991_at	NFATC2
227020_at	YPEL2
227037_at	PLD6
227052_at	---
227080_at	ZNF697
227140_at	INHBA
227351_at	C16orf52 /// LOC101060634
227399_at	VGLL3
227405_s_at	FZD8
227410_at	FAM43A
227443_at	LURAP1L
227486_at	NT5E
227489_at	SMURF2
227561_at	DDR2
227606_s_at	STAMBPL1
227607_at	STAMBPL1
227697_at	SOCS3
227940_at	LOC339803
227997_at	IL17RD
228038_at	SOX2
228141_at	GPX8
228304_at	RBM43
228353_x_at	UBASH3B
228359_at	UBASH3B
228400_at	LOC100996628 /// SHROOM3
228402_at	ZBED3
228442_at	NFATC2
228461_at	SH3RF3
228523_at	NANOS1
225842_at	PCDH10
228737_at	TOX2
228870_at	FAM84B
229011_at	---
229151_at	SLC14A1
229158_at	WNK4
229431_at	RFXAP
229576_s_at	TBX3
229674_at	SERTAD4
229817_at	ZNF608
230075_at	RAB39B
230082_at	---

Probe Set ID	Gene Symbol
230083_at	USP53
230102_at	ETV5
230112_at	42067
230261_at	ST8SIA4
230296_at	C16orf52 /// LOC101060634
230383_x_at	SLFN5
230493_at	SHISA2
230494_at	SLC20A1
230660_at	SERTAD4
230720_at	RNF182
230721_at	C16orf52 /// LOC101060634
230746_s_at	---
230795_at	---
230820_at	---
230836_at	ST8SIA4
231034_s_at	---
231040_at	---
231183_s_at	---
231202_at	ALDH1L2
231513_at	---
231775_at	TNFRSF10A
231779_at	IRAK2
231817_at	USP53
231828_at	PSMD5-AS1
231894_at	SARS
231899_at	ZC3H12C
231944_at	ERO1LB
231984_at	MTAP
232060_at	ROR1
232068_s_at	TLR4
232113_at	---
232181_at	PPARGC1B
232861_at	PDP2
234192_s_at	GKAP1
234994_at	TMEM200A
235074_at	SPRED1
235086_at	THBS1
235109_at	ZBED3
235122_at	HIVEP3
235191_at	LINC00662
235238_at	SHC4
235277_at	AMOTL1
235337_at	SERTAD4
235521_at	HOXA3
235563_at	GPRC5A
235698_at	ZFP90
236219_at	SLC35G1
236489_at	GPR110
236599_at	---
237465_at	USP53
238430_x_at	SLFN5
238462_at	UBASH3B
238587_at	UBASH3B
238623_at	---
238689_at	GPR110
238729_x_at	SAV1
238949_at	RNF145
239058_at	FOXC2
239835_at	KBTBD8
241371_at	TNFRSF10A
241612_at	FOXD3
242005_at	LOC100506377
242455_at	POU3F2
242794_at	MAML3
242931_at	LONRF3
242943_at	ST8SIA4
243462_s_at	---
244439_at	SPRED1
244764_at	HIVEP3
266_s_at	CD24

Probe Set ID	Gene Symbol
36711_at	MAFF
38037_at	HBEGF
39549_at	NPAS2

Supplementary Table S5. Figure 9A のシグネチャーに用いた 432 プローブセット

Probe Set ID	*Gene Symbol*
1552274_at	PXK
1552275_s_at	PXK
1552309_a_at	NEXN
1552329_at	RBBP6
1553055_a_at	SLFN5
1553167_a_at	SEPSECS
1553708_at	LINC00525
1553764_a_at	AJUBA
1553768_a_at	DCBLD1
1553972_a_at	CBS
1554007_at	---
1554014_at	CHD2 /// LOC100507217
1554015_a_at	CHD2 /// LOC100507217
1554020_at	BICD1
1554195_a_at	C5orf46
1554239_s_at	ZADH2
1554520_at	LOC100996810 /// LOC283861
1554867_a_at	PRR16
1554980_a_at	ATF3
1555772_a_at	CDC25A
1555788_a_at	TRIB3
1555832_s_at	KLF6
1556348_at	HEATR1
1557078_at	SLFN5
1557094_at	ANXA8 /// LOC100996760 /// LOC101060462
1558256_at	LINC00662
1559220_at	OTTHUMG00000158107 /// RP5-1157M23.2
1559258_a_at	CXorf61
1559861_at	OTTHUMG00000020270 /// RP11-342C23.4
1560477_a_at	SAMD11
1569642_at	F2R
200628_s_at	WARS
200629_at	WARS
200670_at	XBP1
200799_at	HSPA1A /// HSPA1B
200800_s_at	HSPA1A /// HSPA1B
200802_at	SARS
200920_s_at	BTG1
200921_s_at	BTG1
201050_at	PLD3
201085_s_at	SON
201266_at	TXNRD1
201289_at	CYR61
201383_s_at	NBR1
201397_at	PHGDH
201464_x_at	JUN
201465_s_at	JUN
201559_s_at	CLIC4
201565_s_at	ID2
201746_at	TP53
201761_at	MTHFD2
201996_s_at	SPEN
202014_at	PPP1R15A
202034_x_at	RB1CC1
202068_s_at	LDLR
202081_at	IER2
202146_at	IFRD1
202147_s_at	IFRD1
202148_s_at	PYCR1
202237_at	NNMT
202238_s_at	NNMT
202241_at	TRIB1
202342_s_at	TRIM2
202376_at	SERPINA3
202386_s_at	KIAA0430
202558_s_at	HSPA13
202581_at	HSPA1A /// HSPA1B
202623_at	EAPP
202672_s_at	ATF3
202710_at	BET1
202719_s_at	TES
202720_at	TES
202730_s_at	MIR4680 /// PDCD4
202731_at	MIR4680 /// PDCD4
202769_at	CCNG2
202770_s_at	CCNG2
202848_s_at	GRK6
202888_s_at	ANPEP
203002_at	AMOTL2
203286_at	RNF44
203288_at	KIAA0355
203313_s_at	TGIF1
203438_at	STC2
203439_s_at	STC2
203445_s_at	CTDSP2
203474_at	IQGAP2
203542_s_at	KLF9
203543_s_at	KLF9
203574_at	NFIL3
203627_at	IGF1R
203640_at	MBNL2
203665_at	HMOX1
203699_s_at	DIO2
203752_s_at	JUND
203896_s_at	PLCB4
203989_x_at	F2R
204004_at	PAWR
204203_at	CEBPG
204285_s_at	PMAIP1
204286_s_at	PMAIP1
204334_at	KLF7
204351_at	S100P
204394_at	SLC43A1
204396_s_at	GRK5
204411_at	KIF21B
204547_at	RAB40B
204569_at	ICK
204602_at	DKK1
204664_at	ALPP
204881_s_at	UGCG
204948_s_at	FST
205017_s_at	MBNL2
205018_s_at	MBNL2
205022_s_at	FOXN3
205047_s_at	ASNS
205048_s_at	PSPH
205167_s_at	CDC25C
205168_at	DDR2
205194_at	PSPH
205234_at	SLC16A4
205415_s_at	ATXN3
205486_at	TESK2
205523_at	HAPLN1
205524_s_at	HAPLN1
205655_at	MDM4
205807_s_at	TUFT1
206085_s_at	CTH
206101_at	ECM2
206343_s_at	NRG1
206376_at	SLC6A15
206460_at	AJAP1
206898_at	CDH19
206961_s_at	MED20
207219_at	ZFP69B
207233_s_at	MITF
207528_s_at	SLC7A11
207574_s_at	GADD45B
207629_s_at	ARHGEF2
207782_s_at	PSEN1
207980_s_at	CITED2
208067_x_at	UTY
208370_s_at	RCAN1
208610_s_at	SRRM2
208671_at	SERINC1
208693_s_at	GARS
208712_at	CCND1
208735_s_at	CTDSP2
208763_s_at	TSC22D3
208868_s_at	GABARAPL1
208869_s_at	GABARAPL1
208916_at	SLC1A5
208937_s_at	ID1
208960_s_at	KLF6
208961_s_at	KLF6
208997_s_at	UCP2
208998_at	UCP2
209034_at	PNRC1
209101_at	CTGF
209102_s_at	HBP1
209184_s_at	IRS2
209185_s_at	IRS2
209205_s_at	LMO4
209216_at	WDR45
209217_s_at	WDR45
209230_s_at	NUPR1
209304_x_at	GADD45B
209305_s_at	GADD45B
209357_at	CITED2
209383_at	DDIT3
209435_s_at	ARHGEF2
209479_at	CCDC28A
209610_s_at	SLC1A4
209611_s_at	SLC1A4
209682_at	CBLB
209822_s_at	VLDLR
209864_at	FRAT2
209921_at	SLC7A11
209946_at	VEGFC
210095_s_at	IGFBP3
210105_s_at	FYN
210405_x_at	TNFRSF10B
210511_s_at	INHBA
210512_s_at	VEGFA
210513_s_at	VEGFA
210587_at	INHBE
210757_x_at	DAB2
210764_s_at	CYR61
211458_s_at	GABARAPL1 /// GABARAPL3
211527_x_at	VEGFA
211538_s_at	HSPA2
211559_s_at	CCNG2
211947_s_at	PRRC2C
211962_s_at	ZFP36L1
212099_at	RHOB
212143_s_at	IGFBP3
212148_at	PBX1
212444_at	GPRC5A
212501_at	CEBPB
212508_at	MOAP1
212593_s_at	MIR4680 /// PDCD4
212594_at	MIR4680 /// PDCD4
212614_at	ARID5B
212722_s_at	JMJD6
212723_at	JMJD6
212761_at	TCF7L2
212793_at	DAAM2
212810_s_at	SLC1A4
212811_x_at	SLC1A4
212816_s_at	CBS
212870_at	SOS2

Probe Set ID	Gene Symbol
212914_at	CBX7
212948_at	CAMTA2
212956_at	TBC1D9
213002_at	MARCKS
213225_at	PPM1B
213436_at	CNR1
214390_s_at	BCAT1
214437_s_at	SHMT2
214447_at	ETS1
214452_at	BCAT1
214992_s_at	DNASE2
215058_at	DENND5B
215253_s_at	RCAN1
215501_s_at	DUSP10
215623_x_at	SMC4
215789_s_at	AJAP1
215945_s_at	TRIM2
216037_x_at	TCF7L2
216417_x_at	HOXB9
216997_x_at	TLE4
217127_at	CTH
217168_s_at	HERPUD1
217678_at	SLC7A11
217783_s_at	YPEL5
217906_at	KLHDC2
217966_s_at	FAM129A
217967_s_at	FAM129A
218004_at	BSDC1
218041_x_at	SLC38A2
218145_at	TRIB3
218168_s_at	ADCK3
218177_at	CHMP1B
218178_s_at	CHMP1B
218234_at	ING4
218251_at	MID1IP1
218274_s_at	ANKZF1
218437_s_at	LZTFL1
218603_at	HECA
218651_s_at	LARP6
218692_at	SYBU
218769_s_at	ANKRA2
219014_at	PLAC8
219062_s_at	ZCCHC2
219270_at	CHAC1
219312_s_at	ZBTB10
219344_at	SLC29A3
219371_s_at	KLF2
219470_x_at	CCNJ
219691_at	SAMD9
219716_at	APOL6
219944_at	CLIP4
220301_at	CCDC102B
220436_at	LOC441402
220892_s_at	PSAT1
220924_s_at	SLC38A2
221050_s_at	GTPBP2
221250_s_at	MXD3
221478_at	BNIP3L
221479_s_at	BNIP3L
221563_at	DUSP10
221565_s_at	CALHM2
221577_x_at	GDF15
221686_s_at	RECQL5
221735_at	WDR48
221765_at	UGCG
221805_at	NEFL
221841_s_at	KLF4
221865_at	C9orf91
221884_at	MECOM
222108_at	AMIGO2

Probe Set ID	Gene Symbol
222157_s_at	WDR48
222200_s_at	BSDC1
222408_s_at	YPEL5
222632_s_at	LZTFL1
222790_s_at	RSBN1
222816_s_at	ZCCHC2
222982_x_at	SLC38A2
223062_s_at	PSAT1
223195_s_at	SESN2
223196_s_at	SESN2
223199_at	MKNK2
223218_s_at	NFKBIZ
223309_x_at	PNPLA8
223310_x_at	PNPLA8
223475_at	CRISPLD1
223674_s_at	CDC42SE1
223803_s_at	ZCCHC10
223974_at	DLGAP1-AS2
223982_s_at	PNPLA8
224185_at	OTTHUMG00000178019 /// RP11-199F11.2
224367_at	BEX2
224559_at	MALAT1
224565_at	MIR612 /// NEAT1
224566_at	MIR612 /// NEAT1
224569_s_at	IRF2BP2
224570_s_at	IRF2BP2
224571_at	IRF2BP2
224572_s_at	IRF2BP2
224606_at	KLF6
224657_at	ERRFI1
224783_at	UBALD2
224785_at	UBALD2
224826_at	GPCPD1
224839_s_at	GPT2
224917_at	MIR21 /// VMP1
224990_at	SMIM14
225056_at	SIPA1L2
225207_at	PDK4
225239_at	MIR612 /// NEAT1
225327_at	FAM214A
225344_at	NCOA7
225442_at	DDR2
225496_s_at	SYTL2
225527_at	CEBPG
225796_at	PXK
225804_at	CYB5D2
225807_at	AJUBA
225842_at	PHLDA1
225864_at	FAM84B
225882_at	SLC35B4
225974_at	TMEM64
226001_at	KLHL5
226012_at	ANKRD11
226022_at	SASH1
226066_at	MITF
226103_at	NEXN
226135_at	UHRF1BP1
226140_s_at	OTUD1
226157_at	TFDP2
226181_at	TUBE1
226189_at	ITGB8
226218_at	IL7R
226231_at	PAWR
226267_at	JDP2
226316_at	RBM26
226352_at	JMY
226360_at	ZNRF3
226423_at	PAQR8
226425_at	CLIP4
226456_at	RMI2

Probe Set ID	Gene Symbol
226461_at	HOXB9
226559_at	IER5L
226649_at	PANK1
226725_at	SLFN5
226842_at	FBXL20
226847_at	FST
227052_at	---
227140_at	INHBA
227234_at	LOC100132815
227443_at	LURAP1L
227452_at	LINC00511 /// LINC00673
227488_at	MIR503 /// MIR503HG
227561_at	DDR2
227563_at	FAM27E3
227626_at	PAQR8
227628_at	GPX8
227719_at	SMAD9
227978_s_at	ZADH2
227990_at	SLU7
228121_at	TGFB2
228188_at	FOSL2
228402_at	ZBED3
228582_x_at	MALAT1
228716_at	THRB
228842_at	---
228993_s_at	BBIP1
229009_at	SIX5
229163_at	CAMK2N1
229338_at	LOC100289361
229388_at	OTTHUMG00000018458 /// RP11-152N13.5
229566_at	LOC645638
229759_s_at	VEPH1
230075_at	RAB39B
230147_at	F2RL2
230204_at	HAPLN1
230492_s_at	GPCPD1
230795_at	---
230812_at	LINC00511 /// LINC00673
231013_at	---
231202_at	ALDH1L2
231730_at	SEPSECS
231775_at	TNFRSF10A
231828_at	PSMD5-AS1
231894_at	SARS
232112_at	RALGPS2
232176_at	SLITRK6
232297_at	KLHL5
232481_s_at	SLITRK6
232914_s_at	SYTL2
233933_s_at	OTUD5
234976_x_at	MTHFD2
234989_at	MIR612 /// NEAT1
235014_at	ILF3-AS1
235024_at	PHF17
235046_at	INPP4B
235132_at	LOC254128
235191_at	LINC00662
235282_at	LOC100506295
235595_at	ARHGEF2
235846_at	FSBP /// RAD54B
235939_at	OTTHUMG00000175830 /// RP1-228H13.5
236533_at	ASAP1
236565_s_at	LARP6
236656_s_at	LOC100288911
236657_at	LOC100288911
238430_x_at	SLFN5
238518_x_at	GLYCTK
238653_at	---
238695_s_at	RAB39B
238766_at	LOC100996592

Probe Set ID	*Gene Symbol*
238909_at	S100A10
239825_at	---
241682_at	KLHL23
241808_at	ZC2HC1A
242458_at	RALGPS2
243_g_at	MAP4
37028_at	PPP1R15A
41644_at	SASH1
48825_at	ING4
64883_at	MOSPD2
AFFX-DapX-3_at	---
AFFX-r2-Bs-dap-5_	---

Supplementary Table S6. A375 細胞において vemurafenib 処理によって発現上昇し、AT9283 の共処理によって発現低下を認めた 112 プローブセットに対する GO 解析結果

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 2.7505244585078428				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
GOTERM_MF_FAT	GO:0015175~neutral amino acid transmembrane transporter activity	4	4.65	1.0E-04	1.2E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0015171~amino acid transmembrane transporter activity	5	5.81	1.3E-04	1.6E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0005275~amine transmembrane transporter activity	5	5.81	3.1E-04	3.8E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006865~amino acid transport	5	5.81	4.5E-04	6.5E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0015179~L-amino acid transmembrane transporter activity	4	4.65	6.1E-04	7.5E-01
GOTERM_BP_FAT	GO:0015837~amine transport	5	5.81	1.2E-03	1.8E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0046942~carboxylic acid transport	5	5.81	2.8E-03	3.9E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0015849~organic acid transport	5	5.81	2.8E-03	4.0E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0015804~neutral amino acid transport	3	3.49	3.1E-03	4.4E+00
GOTERM_BP_FAT	GO:0015807~L-amino acid transport	3	3.49	3.7E-03	5.3E+00
SP_PIR_KEYWORDS	amino-acid transport	3	3.49	8.7E-03	1.0E+01
UP_SEQ_FEATURE	topological domain:Extracellular	8	9.30	9.2E-01	1.0E+02

Supplementary Table S7. A375 細胞において vemurafenib 処理によって発現上昇し、AT9283 の共処理によって中程度の発現低下を認めた 130 プローブセットに対する GO 解析結果

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 5.735871894552304				
Category	Term	Count	%	PValue	FDR
SP_PIR_KEYWORDS	amino-acid biosynthesis	8	21.05	1.8E-14	2.1E-11
GOTERM_BP_FAT	GO:0008652~cellular amino acid biosynthetic process	8	21.05	2.8E-11	3.9E-08
GOTERM_BP_FAT	GO:0009309~amine biosynthetic process	8	21.05	8.0E-10	1.1E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0006563~L-serine metabolic process	5	13.16	2.0E-09	2.8E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0009069~serine family amino acid metabolic process	6	15.79	4.0E-09	5.6E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0009070~serine family amino acid biosynthetic process	5	13.16	9.6E-09	1.3E-05
KEGG_PATHWAY	hsa00260:Glycine, serine and threonine metabolism	6	15.79	2.5E-08	2.0E-05
GOTERM_BP_FAT	GO:0046394~carboxylic acid biosynthetic process	8	21.05	7.5E-08	1.0E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0016053~organic acid biosynthetic process	8	21.05	7.5E-08	1.0E-04
SP_PIR_KEYWORDS	pyridoxal phosphate	5	13.16	6.0E-06	6.8E-03
SP_PIR_KEYWORDS	Serine biosynthesis	3	7.89	1.1E-05	1.2E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	8	21.05	1.1E-05	1.5E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0006564~L-serine biosynthetic process	3	7.89	1.7E-05	2.4E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0048037~cofactor binding	6	15.79	2.0E-04	2.3E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0030170~pyridoxal phosphate binding	4	10.53	2.3E-04	2.7E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0070279~vitamin B6 binding	4	10.53	2.3E-04	2.7E-01
GOTERM_MF_FAT	GO:0019842~vitamin binding	4	10.53	3.0E-03	3.4E+00
INTERPRO	IPR015421:Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 1	3	7.89	3.3E-03	3.7E+00
SP_PIR_KEYWORDS	acetylation	11	28.95	2.4E-02	2.4E+01
GOTERM_BP_FAT	GO:0006790~sulfur metabolic process	3	7.89	3.2E-02	3.6E+01
SP_PIR_KEYWORDS	disease mutation	7	18.42	8.1E-02	6.2E+01