

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03530

研究課題名(和文)大規模経時採取検体を用いた大腸がん肝転移巣の化学療法耐性化シグナルシフトの解明

研究課題名(英文)Elucidation of chemoresistance-resistant signal mechanism of colon cancer liver metastasis

研究代表者

足立 淳 (ADACHI, JUN)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：20437255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：切除可能大腸癌肝転移患者の経時採取検体のリン酸化プロテオーム解析を行い、術後補助化学療法に対する耐性を克服する新規治療標的を探索した。

術後補助化学療法中に再発を認めた症例群(During群)と術後補助化学療法後に再発した症例群(After群)を群間比較し、During群において特異的に活性化が予測されたキナーゼ群を明らかにした。この治療標的候補キナーゼが活性化している大腸がん培養細胞株は、*in vitro*及び*in vivo*で、キナーゼ阻害剤によって増殖が強く抑制された。上記の結果から、リン酸化プロテオミクス手法を用いて大腸癌肝転移に対する新たな治療標的を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除可能大腸癌肝転移の標準治療は、外科的切除が推奨されているが、術後再発率は高く、その治療法の開発は臨床における課題である。肝切除後、術後補助化学療法が施行されるが、施行後に再発肝転移が顕在化する症例は薬剤に耐性化していることが示唆される。キードラッグである5FUに対する耐性関連遺伝子の研究は多く行われているが、耐性機序に基づいた新規治療法は開発されていないためアンメットニーズが高い。本研究は予後不良な切除可能大腸癌肝転移に対する新たな治療法につながる成果であり、今後臨床応用に向けたさらなる開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed phosphoproteomic analysis of time-lapse samples of resectable colorectal cancer liver metastases for the discovery of therapeutic targets that overcome resistance to adjuvant chemotherapy.

The kinase activities of the case group in which recurrence was observed during treatment (During group) and the case group in which recurrence occurred after treatment (After group) were compared between the groups. As a result, we identified the kinases specifically activated in the During group. Colorectal cancer cultured cell lines with activated candidate therapeutic target kinase showed strong growth inhibition by the kinase inhibitor, both *in vitro* and *in vivo*. Based on the above results, a new therapeutic target for colorectal cancer liver metastases was identified using phosphoproteomics methods.

研究分野：がんプロテオミクス

キーワード：大腸癌肝転移 リン酸化プロテオミクス 化学療法耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移を有する大腸がん症例の予後は未だに悪い。再発予防のための術後補助化学療法として、また切除不能進行癌に対して術前化学療法として、FOLFOX 等の化学療法に KRAS 遺伝子の変異をマーカーとして分子標的薬、抗 VEGF 抗体 (Bevacizumab) または抗 EGFR 抗体 (Cetuximab または Panitumumab) を上乗せした標準療法が行われているが、大腸がん進行度 II 期手術症例の約 15%、III 期手術症例の約 45%、IV 期手術症例の約 65% で転移・再発が認められる。これらの転移・再発巣は、化学療法耐性になっていると考えられるが、がん組織におけるその実態は不明であり、また耐性メカニズムに基づく治療は行われていないのが現状である。例えば切除不能進行癌で 1 次治療が奏功しない場合、2 次治療の奏功率はわずか 10-15% 程度 (Bennouna et. al. *Lancet Oncol* 2013) であり、がん組織における化学療法耐性機序に基づいた新たな治療法の開発は実臨床においても重要な課題である。

臨床検体を用いた解析では、個人差、環境差などの複雑な要因が影響するため、その影響を受けにくい遺伝子変異のような on/off のはっきりした指標が頻用されている。しかし、遺伝子変異だけでは病態の進行を説明できないことは明らかであり、タンパク質発現やシグナル伝達についても複雑性を乗り越えて、臨床検体から有意な情報を取得する手法の開発がトランスレーショナル・メディシンの推進に重要であるが、ゴールドスタンダードは確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、大腸がんの術後補助化学療法前後で採取された同一患者肝転移巣 24 ペアの大規模高感度解析を行うことよって、遺伝的差異の影響を軽減し、また 24 ペアという規模のメリットを生かし、大規模プロテオミクスにより 1 万を超えるリン酸化部位情報を取得することで複雑性の壁を乗り越えて耐性化にシフトするシグナルネットワークの解明に挑戦する。さらに耐性化に伴って活性化しているキナーゼ等の治療標的候補を同定し、in vitro、in vivo 検証を行う。

3. 研究の方法

肝転移を有する Stage 4 切除可能大腸癌患者のうち、初回肝切除 (T1) および、術後再発した再発肝転移 (T2) が切除可能であった 24 症例から、肝転移巣および対照部位として、肝実質組織を採取した。24 症例のうち、6 症例は術後補助化学療法を受けていない NT 群あり、残り 18 症例は術後補助化学療法を受けている AdjCTx 群であった。

LC-MS/MS を用いて各検体のプロテオーム、リン酸化プロテオーム解析を実施し、タンパク質およびリン酸化部位をそれぞれ 5812 タンパク質及び 23689 リン酸化部位同定した。患者毎に化学療法前後でのタンパク質およびリン酸化部位の経時変化データを抽出し、キナーゼ活性を予測する手法 (PTM-SEA 法: PTM Signature Enrichment Analysis) を用いて、化学療法前後でのキナーゼ活性変化を推測した。術後補助化学療法中に再発を認めた症例群 (During 群) と術後補助化学療法後に再発した症例群 (After 群) を群間比較すると、During 群で予後が有意に不良であった (図 1A)。臨床検体から得られた 2 万個超のリン酸化定量データから化学療法前後でのキナーゼ活性変動プロファイルを取得し、群間比較を行うと during 群においてキナーゼ X が最も有意に活性化していた (図 1B)。またこのキナーゼのタンパク質発現量には有意差は見られなかった。

さらに治療標的薬剤候補を探索するために、大腸がん培養細胞 35 株のリン酸化プロテオミク

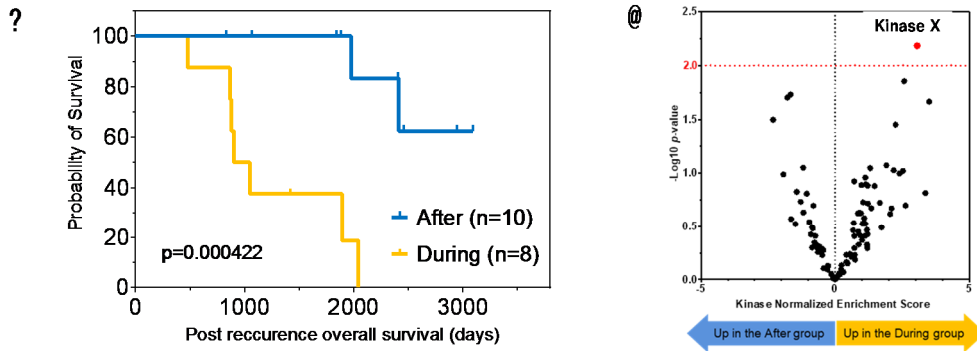
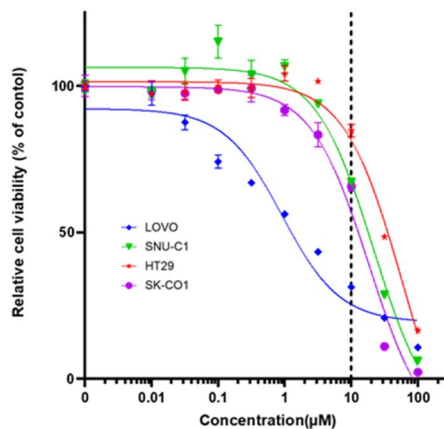


図1 術後補助化学療法中再発群 (During 群)、術後補助化学療法後再発群(After群)の (A)累積生存率、(B) キナーゼ活性のvolcano plot (During 群/After群)

スデータ、阻害剤スクリーニングデータを取得、収集し、これらの大規模情報から KinaseX のキナーゼ活性が高い細胞において増殖抑制効果の高い薬剤を見出した。KinaseX 活性が高い細胞株 LOVO は活性が低い細胞株 SKCO1、HT29、SNUC1 と比較して感受性であることを検証した(図2)。キナーゼ阻害剤 Y は FDA 未承認薬であったため、同じキナーゼを標的とする FDA 承認済キナーゼ阻害剤 Z が KinaseX 活性化細胞株に対して増殖抑制効果を有していることを見出した。さらにマウスゼノグラフトモデルを用いて、キナーゼ阻害剤 Z による抗腫瘍効果を増殖速度の異なる2種類の細胞株を用いて確認した(図3)。



bar0 ε Z ち No.端(12)ずW 俵カペ⁶ さ 痲病^ル 厘m²ナ ⊕ m³

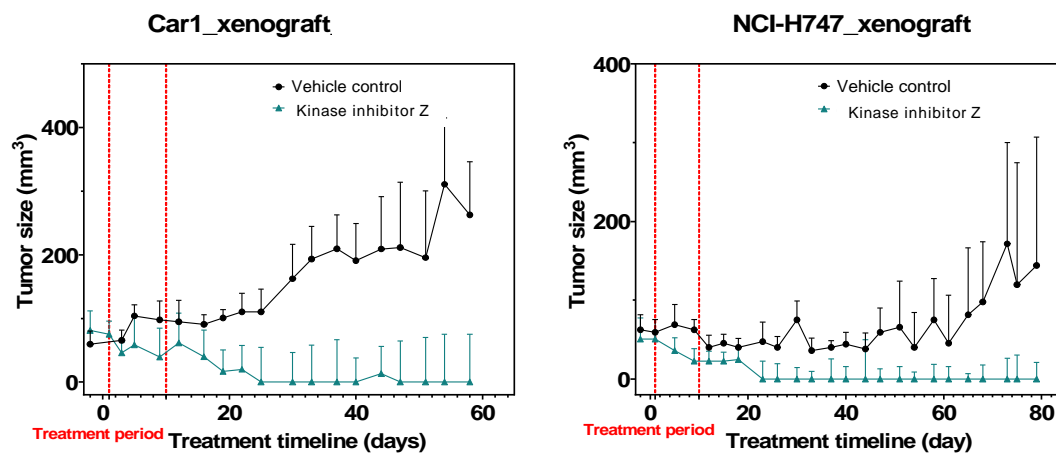


図3 マウスゼノグラフトモデルでのキナーゼ阻害剤Zの抗腫瘍効果

4 . 研究成果

上記の結果から、大腸がんの術後補助化学療法前後で採取された同一患者肝転移巣の経時比較解析を行うことで、個人差を乗り越えて、化学療法耐性検体で活性化するキナーゼ、シグナルを同定し、大腸癌肝転移に対する新たな治療標的候補を見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 足立淳
2. 発表標題 リン酸化シグナル解析を用いたがん個別化医療への展開
3. 学会等名 第16回日本臨床プロテオゲノミクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 軍司 大悟、阿部雄一、朝長毅、長山聡、足立淳
2. 発表標題 Quantitative proteomic analysis of colorectal cancer liver metastases resistant to postoperative adjuvant chemotherapy.
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立淳
2. 発表標題 リン酸化シグナル解析を基盤としたがん最適医療への挑戦
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daigo Gunji
2. 発表標題 Integrated pharmaco-phosphoproteomics of colorectal cancer liver metastases resistant to adjuvant chemotherapy suggests Kinase inhibitors as potential therapeutic candidates
3. 学会等名 Copenhagen Bioscience Conferences（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長山 聡 (Nagayama Satoshi) (70362499)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長 (72602)	
研究分担者	朝長 毅 (Tomonaga Takeshi) (80227644)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・上級研究員 (84420)	
研究分担者	野村 大成 (Nomura Taisei) (90089871)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・研究リーダー (84420)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------