

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09116

研究課題名（和文）PDXモデルの多層プロテオーム解析による大腸癌転移制御法の開発

研究課題名（英文）Integrative proteomic analysis of PDX models to develop targeted therapies for colorectal cancer metastasis

研究代表者

木下 敬史（Kinoshita, Takashi）

愛知県がんセンター（研究所）・分子診断TR分野・研究員

研究者番号：40467311

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：1. *in vivo* selectionによって作成した高腹膜転移性マウス大腸癌細胞株CT26において、アクチン結合タンパク質AVILが転移能を亢進させることを明らかにした。またAVILは1FNシグナルによって制御されること、下流の分子としてチロシンフォスファターゼがAVILに結合することを見出した。2. 大腸癌原発巣66例、肝転移巣28例（うち同一症例由来のペア5症例を含む）においてPDXモデルの作成に成功し、多層オミクス解析を行った。3. 直腸癌マウスモデルの血漿プロテオーム解析から、局所進行直腸癌における術前化学放射線療法の新規効果予測血液バイオマーカーとしてVEGFR3を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の転移再発に関わる分子機構の解明に向けて、90例を超える大腸癌PDXライブラリなど大規模な生体材料基盤を整備し、また付随する多層オミクスデータ基盤も構築できた。本研究課題によって、大腸癌の新規転移関連分子AVILの同定や、局所進行直腸癌における新規術前化学放射線療法効果予測血液バイオマーカーVEGFR3の同定など、難治である転移性大腸癌に対する革新的な分子標的薬・バイオマーカー開発の基盤となる多くの情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted multi-omics profiling of primary CRC and metastatic CRC to elucidate molecular mechanisms involved in the development of metastasis. 1. Molecular characterization of mouse colorectal cancer cell lines with different metastatic potential identified AVIL as a potential therapeutic target in patients with metastatic CRC. We demonstrated regulation of AVIL expression by interferon signaling. In addition, we identified potential interaction between AVIL and a tyrosine phosphatase. 2. PDX models were successfully generated from 66 primary CRC tumors and 28 liver metastases. We performed omics analysis, particularly focusing on proteomics, in these PDX tumors, resulting in identification of molecular signatures associated with metastatic CRC. 3. We identified circulating VEGFR3 as a novel biomarker for predicting response to neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer through proteomic analysis of plasmas from a mouse model of rectal cancer.

研究分野：がん分子生物学

キーワード：大腸癌 転移 *in vivo* selection PDXモデル プロテオミクス 細胞表面タンパク質 術前化学放射線療法 血液バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我が国における大腸癌の罹患率と死亡率は、いずれも年々増加している。我が国の大腸癌の罹患数は15万人を超え全癌種の中で最も多く、死亡数は肺癌に次いで第2位であり、大腸癌の克服は喫緊かつ最重要の課題である。

遠隔転移を伴わない Stage ~ の大腸癌に対する標準治療は外科的切除と領域リンパ節郭清であり、Stage であってもその5年生存率は約70%と比較的良好である。その一方で、遠隔転移を有する Stage 大腸癌の5年生存率は約20%と、いまだに予後は極めて悪い。Stage においても遠隔転移巣も含めて完全切除が可能であれば外科的切除の適応となり、例えば、肝転移に対して根治的切除を行った場合の5年生存率は約20~50%と報告されているが、肝転移根治切除後5年間で70~80%の症例に再発が見られることから、大腸癌の生存率向上のためには、微小転移巣の制御が極めて重要であると考えられる。しかし、欧州の臨床試験(EORTC40983)からは、肝転移切除後のFOLFOX療法は全生存期間を延長しない、という結果が示された。また、次世代シーケンシングなどの解析手法の進歩によって、ゲノム情報を中心に転移性大腸癌の分子生物学的な知見は集積しつつあるものの、有効な分子標的治療法の開発には至っておらず、革新的なアプローチによって、転移性大腸癌の克服に取り組む必要がある。

2. 研究の目的

我々は、大腸癌を含む代表的な癌細胞株を用いてプロテオーム解析を中心とした網羅的かつ多層的なオミクス解析を行い、様々な癌の形質に関連する分子シグネチャの同定とその機能的な重要性を明らかにしてきた。そこで、本研究では、大腸癌原発巣と転移巣の多層オミクスプロファイル解析から、新たな分子標的治療法の開発を目指した。本研究におけるプロテオーム解析については、特に細胞表面タンパク質のプロテオーム(サーフェスオーム)解析に重点を置いて研究を進めた。細胞表面タンパク質は、癌において機能的に重要な役割を果たしているだけでなく、その局在から、直接的な治療標的としても非常に有望である。細胞表面タンパク質は細胞内タンパク質に比べて極めて微量であることから、解析に十分な量の検体を得るために、大腸癌転移モデルとして高転移性マウス大腸癌細胞株と大腸癌転移巣由来 PDX モデルを作成し、ゲノム、トランスクリプトーム、サーフェスオームを含むプロテオーム解析を行った。得られた多層オミクスデータの統合的な解析によって、大腸癌転移に関わる分子機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 高転移性マウス大腸癌細胞株の作成

マウス大腸癌細胞株 CT26 を同系のマウスに同所性(盲腸)に移植し、形成された原発巣と転移巣を採取して繰り返し同系同所性に移植する *in vivo* selection 法を用いて、高肝転移性亜株(CT26-L6)、高リンパ節転移性亜株(CT26-LN6)、高腹膜転移性亜株(CT26-P6)、低転移性亜株(CT26-N5)を作成した。

(2) 大腸癌転移巣由来 PDX モデルの作成

高度な免疫不全を呈する Rag-2/Jak3 二重欠損マウスを用いて、大腸癌原発巣と転移巣の腫瘍組織をそれぞれ皮下移植し PDX モデルを作成した。これにより、小さな検体から、多層オミクス解析に十分な量の検体を PDX 腫瘍として得た。

(3) 多層オミクス解析

全エクソーム解析、RNA シーケンス解析、組織ライセートプロテオーム解析、セクレトーム解析、リン酸化プロテオーム解析に加えて、ビオチンを用いて標識・単離した細胞表面タンパク質

のプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス大腸癌細胞株の解析

in vivo selection によって作成したマウス大腸癌細胞株 CT26 の高肝転移性亜株 (CT26-L6)、高リンパ節転移性亜株 (CT26-LN6)、高腹膜転移性亜株 (CT26-P6) は低転移性亜株 (CT26-N5) に比べて高い遊走・浸潤能を獲得していた。各亜株の RNA シーケンス解析とプロテオーム解析から、アクチン結合タンパク質である Avil が高腹膜転移亜株で過剰発現していることを見出した。Avil のノックダウンを行った CT26-P6 細胞では、in vitro における細胞遊走能・浸潤能が低下し、in vivo においても有意に腹膜播種の個数が低下した (図 1)。また、CT26-N5 に Avil を過剰発現させたところ、細胞遊走能・浸潤能の上昇がみられた。ヒト大腸癌患者由来細胞 (Patient-derived cells; PDC) でも AVIL のノックダウンにより遊走能と浸潤能が著明に抑制された。GSEA 解析により、CT26-P6 細胞において IFN 応答遺伝子群の活性化が示唆された。PDC において、IFN- γ は AVIL 発現を誘導し、JAK 阻害剤は AVIL 発現を減少させたことから、AVIL は IFN- γ シグナルによって制御されると考えられた。さらに、IP-MS を用いて、Avil 結合タンパク質としてチロシンフォスファターゼ A を同定した。PDC において A のノックダウンを行ったところ、AVIL のノックダウン同様に細胞遊走能・浸潤能が低下することを見出した。

(2) 大腸癌 PDX モデルの解析

現在までに、大腸癌原発巣 66 例、肝転移巣 28 例において PDX モデルの作成に成功し

た。このうち 6 症例は、原発巣と肝転移巣のペアとして作成できた。さらに、32 症例において患者腫瘍由来細胞株 (Patient-derived cells; PDC) を樹立した。Rag-2/Jak3 二重欠損マウスを用いた PDX の作成効率は、原発巣で 46%、肝転移巣で 93% と、肝転移巣で非常に高い作成効率を達成した。原発巣、肝転移巣各 16 症例 (ペア 5 症例を含む) から得られた PDX 腫瘍について、エクソーム解析、RNA シーケンス解析、サーフェソーム解析、リン酸化プロテオーム解析が完了した。プロテオームデータの解析から、分子 B が肝転移巣由来 PDX 腫瘍で高発現していることを見出し、現在機能解析を進めている。

(3) 局所進行直腸癌における術前化学放射線療法の効果予測血液バイオマーカーの検証

本研究課題では、MD アンダーソンがんセンターとの国際共同研究として、血液検体を用いた直腸癌の化学放射線療法の効果予測も試みた。局所進行直腸癌においては、術前化学放射線療法 (nCRT) によって再発率が減少し、さらに約 20% の症例で病理学的完全寛解 (pCR) が得られる。したがって、nCRT の効果を予測できる血中バイオマーカーは直腸癌の治療個別化に有用である。tet0_LSL-Kras^{G12D}; Apc^{LoxP/LoxP}; p53^{LoxP/LoxP} マウスに villin-creER マウスを交配させ、タモキシフェン注腸により直腸癌マウスモデルを作成し、5 日間の 5-FU 腹腔内投与と放射線照射を行った。pCR となったマウスと non-pCR のマウスからそれぞれ治療前に採取された血漿を用いた定量的プロテオーム解析から、

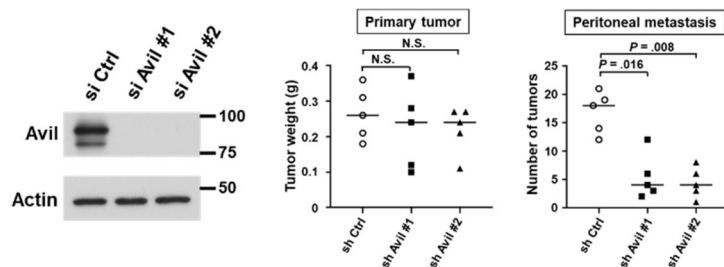


図1 高腹膜転移株においてAvilのノックダウンは腹膜転移を抑制する

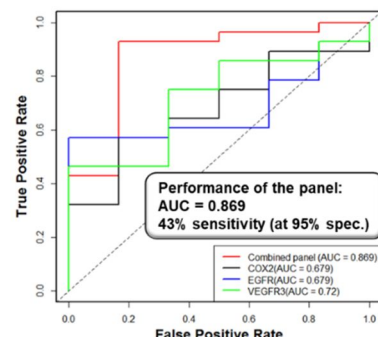


図2 局所進行直腸癌における術前化学放射線療法の効果予測

VEGFR3、IGFBP4、CTSB が non-pCR マウスの血漿で pCR マウスに比べて著明に上昇していることを見出した。これら 3 つのバイオマーカー候補に加えて、直腸癌組織中で化学放射線療法感受性に関連することが報告されている、CEA、EGFR、Ki67、E-cadherin、COX2 についても血中バイオマーカーとしての有用性を検討した。34 例の局所進行直腸癌症例 (pCR : 6 例、non-pCR : 28 例) の血漿において、VEGFR3、EGFR、COX2 は non-pCR 症例で pCR 症例に比べて有意に上昇していた。また VEGFR3 と EGFR は、手術後の血漿では手術前に比べて有意に低下しており、腫瘍由来であることが示唆された。VEGFR3、EGFR、COX2 を組み合わせたパネルの AUC は 0.87 で感度 43% (特異度 95%) であり (図 2)、マウスモデルの解析から同定された新規血中バイオマーカー VEGFR3 を含むバイオマーカーパネルは、nCRT の効果予測に有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dayde D, Gunther J, Hirayama Y, Weksberg DC, Boutin A, Parhy G, Aguilar-Bonavides C, Wang H, Katayama H, Abe Y, Do KA, Hara K, Kinoshita T, Komori K, Shimizu Y, Tajika M, Niwa Y, Wang YA, DePinho R, Hanash S, Krishnan S, Taguchi A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of Blood-Based Biomarkers for the Prediction of the Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13143642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruki Mori, Hisanori Isomura, Shuang Zhou, Taisuke Kajino, Yuichi Abe, Takashi Kinoshita, Seiji Natsume, Yusuke Sato, Akira Ouchi, Toru Miyake, Waki Hosoda, Koji Komori, Yasuhiro Shimizu, Masaji Tani, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Molecular characterization of mouse colorectal cancer cell lines with high potential of peritoneal metastasis
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯村 久徳、森 治樹、周 爽、梶野 泰祐、阿部雄一、夏目誠治、木下敬史、大内 晶、三宅 亨、飯田洋也、細田和貴、小森康司、清水泰博、谷 眞至、田口 歩
2. 発表標題 同系大腸癌腹膜播種モデルの多層オミクス解析に基づく転移分子機構解明
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Hisanori Isomura
2. 発表標題 In-depth proteomic analysis of cancer models
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisanori Isomura, Haruki Mori, Taisuke Kajino, Yuichi Abe, Toru Miyake, Masaji Tani, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Multi-omics analysis of mouse colorectal cancer cell lines with high potential of peritoneal dissemination
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisanori Isomura, Haruki Mori, Shuang Zhou, Taisuke Kajino, Yuichi Abe, Seiji Natsume, Takashi Kinoshita, Akira Ouchi, Toru Miyake, Hiroya Iida, Waki Hosoda, Koji Komori, Yasuhiro Shimizu, Masaji Tani, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Multi-omics analysis of syngeneic colorectal cancer mouse model of peritoneal dissemination
3. 学会等名 第12回 名古屋大学医・生理研合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 治樹, 阿部雄一, 梶野泰祐, 夏目誠治, 木下敬史, 大内 晶, 水野和幸, 三宅 亨, 飯田洋也, 細田和貴, 小森康司, 清水泰博, 谷 眞至, 田口 歩
2. 発表標題 Physician scientistを志して ~新しい外科の地平線を切り拓くために~
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 治樹, 阿部雄一, 夏目誠治, 木下敬史, 大内 晶, 三宅 亨, 飯田洋也, 細田和貴, 小森康司, 清水泰博, 谷 眞至, 田口 歩
2. 発表標題 In vitro転移モデルのマルチオミクス解析による大腸癌転移機構の解明と制御法の開発
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruki Mori, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Toru Miyake, Masaji Tani, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Establishment and multi-omic characterization of mouse colorectal cancer cell lines with different metastatic potentials
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 治樹、阿部雄一、夏目誠治、大内 晶、木下敬史、三宅 亨、飯田洋也、細田和貴、小森康司、清水泰博、谷 眞至、田口 歩
2. 発表標題 In vitro大腸癌転移モデルの多層オミクス解析に基づく転移分子機構解明とその制御法の開発
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 クリニカルプロテオミクスが拓くがん研究の近未来
3. 学会等名 第53回藤田医科大学医学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 治樹、磯村 久徳、周 爽、梶野 泰祐、阿部 雄一、夏目 誠治、木下 敬史、大内 晶、三宅 亨、細田 和貴、小森 康司、清水 泰博、谷 眞至、田口 歩
2. 発表標題 In vitro腹膜播種転移モデルを用いたマルチオミクス解析による大腸癌転移機構の解明と制御法の開発
3. 学会等名 第35回 日本バイオセラピー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruki Mori, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Kazuyuki Mizuno, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Establishment and multi-omic characterization of mouse colorectal cancer cell lines with different metastatic potentials
3. 学会等名 第11回 名古屋大学医・生理研合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口 歩
2. 発表標題 クリニカルプロテオミクスとそのがん免疫治療への応用
3. 学会等名 第1回Oncology Crosstalk Symposium
4. 発表年 2020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	細田 和貴 (Waki Hosoda) (00728412)	愛知県がんセンター(研究所)・がん情報・対策研究分野・研究員 (83901)	
研究分担者	田口 歩 (Ayumu Taguchgi) (50817567)	愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR分野・分野長 (83901)	

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
---------	---------