

令和 6 年 7 月 1 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07166

研究課題名（和文）インビトロ、インビボモデルの空間プロテオーム解析による大腸癌肝転移の分子機構解明

研究課題名（英文）Spatial proteomic analysis of in vivo and in vitro models of colorectal cancer liver metastasis

研究代表者

夏目 誠治（Natsume, Seiji）

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：10813280

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）：大腸癌の生存率向上のためには、転移巣の制御が極めて重要である。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。本研究では、大腸癌肝転移巣の患者腫瘍組織移植（PDX）モデルを作成し、サーフェスオーム解析とリン酸化タンパク解析による活性化シグナル経路同定を中心とした網羅的多層プロテオーム解析を行う。また、異なる転移能を持つマウス大腸癌細胞株においても同様に網羅的多層プロテオーム解析を行う。これにより、大腸癌の転移分子機構の解明と革新的細胞表面分子治療標的群の同定から、大腸癌の克服を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、大腸癌肝転移巣由来PDXにおける細胞表面タンパク質の発現プロファイルや機能スクリーニングから機能的サーフェスオームデータ基盤を構築し、その分子生物学的理解を深めることで、既存研究では俯瞰しえなかった革新的細胞表面タンパク質治療標的群を大規模に開拓できる。腫瘍特異性が高い細胞表面分子が同定されれば、抗体薬物複合体や癌抗原ワクチン、CAR-T療法など、免疫療法の革新につながる事が期待される。また、大腸癌肝転移巣特異的に発現する分子は、治療標的としてだけでなく、診断、再発・治療効果予測に有用な組織・血液バイオマーカーとしての展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Despite extensive research in understanding molecular biology of colorectal cancer (CRC), its metastatic form continues to pose a substantial challenge, primarily owing to limited therapeutic options. In this study, we will develop patient-derived xenograft (PDX) models of primary CRC tumors and liver metastasis and a comprehensive multi-omics analysis of PDX tumors will be performed, including cell surfaceome and phosphoproteome analysis that focus on the identification of activated signaling pathways. We will also perform multi-omics analysis in mouse CRC cell lines with different metastatic potential. The goal is to overcome CRC by elucidating the molecular mechanisms of metastasis and identifying cell surface molecules as innovative therapeutic targets.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 肝転移 in vivo selection PDXモデル プロテオミクス 多層オミクス解析 細胞表面タンパク質 リン酸化タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における大腸癌の罹患者数と死亡者数は、いずれも年々増加している。2022 年のがん統計予測(国立がん研究センターがん対策情報センター)によると、我が国の大腸癌の罹患者数は約 16 万人と全癌種の中で最も多く、死亡者数は肺癌に次いで第 2 位(約 54,000 人)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、リンパ節転移を有する Stage であっても、5 年生存率は約 70%と比較的予後良好である。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%と非常に予後が悪い。Stage においても遠隔転移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(EORTC40983)と本邦(JCOG0603)の臨床試験からは、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

愛知県がんセンター分子診断 TR 分野では、膵癌、大腸癌、肺癌などを含む、100 以上の代表的な癌細胞株を用いて、細胞表面タンパク質や核タンパク質、分泌タンパク質など、空間的なプロファイリングに重点を置いた網羅的多層プロテオーム解析を行ってきた。そこで、本研究では、in vivo モデルとして大腸癌肝転移巣由来 PDX モデルを確立すること、in vitro モデル(マウス大腸癌細胞高転移性亜株と低転移性亜株)と in vivo モデルを用いてサーフェスオーム解析を中心とする網羅的な空間プロテオーム解析を行い、大腸癌転移に関わる分子機構を解明し、大腸癌肝転移に特異的な分子シグネチャや細胞表面タンパク質を同定すること、そして最終的にはそれらをターゲットとする革新的な治療法の開発から予後不良である大腸癌転移の治療成績の向上を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

愛知県がんセンター病院において、外科手術で得られた大腸癌原発巣、肝転移巣の腫瘍組織を、高度な免疫不全を呈する Rag-2/Jak3 二重欠損マウスに移植して PDX モデルを作成する。作成された PDX を用いて、細胞株の樹立、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム解析を行う。細胞表面タンパク質解析はビオチンを用いて標識、単離する(図 1)。

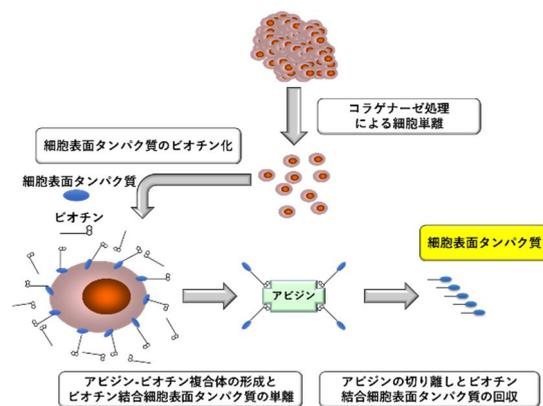


図 1 細胞表面タンパク質の単離

PDX 腫瘍のサーフェスオームは、PDX 腫瘍の組織ライセートのプロテオームと比較することにより、各タンパク質の細胞表面への局在を検討する。また、得られたサーフェスオームデータを、公開データベースから得られる正常組織のトランスクリプトームデータと比較することで、治療標的となりうる食道癌特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

また、我々は、大腸癌転移モデルとして、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)を作成している。これらの細胞株においてもゲノム、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い、得られた多層オミクスデータを統合的に解析する。

4. 研究成果

大腸癌 178 症例から外科手術で採取した組織検体を Rag-2/Jak3 二重欠損マウスに移植した。生着率は、原発巣 148 例中 73 例 (49.3%)、肝転移巣 30 例中 29 例 (96.7%) であり、特に肝転移巣では高い生着率が得られた。このうち 7 症例において、原発巣と肝転移巣のペア PDX が作成でき、また 11 例で PDX 由来細胞株が樹立できた。

多層オミクス解析については、エクソーム解析、トランスクリプトーム解析が完了し、プロテオーム解析を進めている。その中で、リン酸化タンパク質解析を原発巣と肝転移巣のペア PDX4 症例で先行して行った。肝転移巣 PDX でより高くチロシンリン酸化を受けている分子 A を同定し、大腸癌細胞株 SW480 において、分子 A のノックダウンで細胞遊走能が亢進したことから (図 1)、分子 A はチロシンリン酸化によって機能が抑制されていることが示唆された。

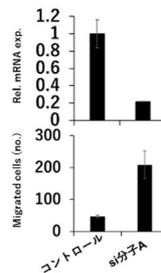


図 1 大腸癌転移抑制分子 A の同定

また、*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 が高腹膜転移性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 2A)。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 /JAK/STAT シグナルによって制御されると考えられた (図 2B)。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 B を同定した。PDC において 分子 B 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 (図 2C)。また、分子 B は RAC1 のチロシンリン酸化を介して細胞極性を制御していることが示唆された。

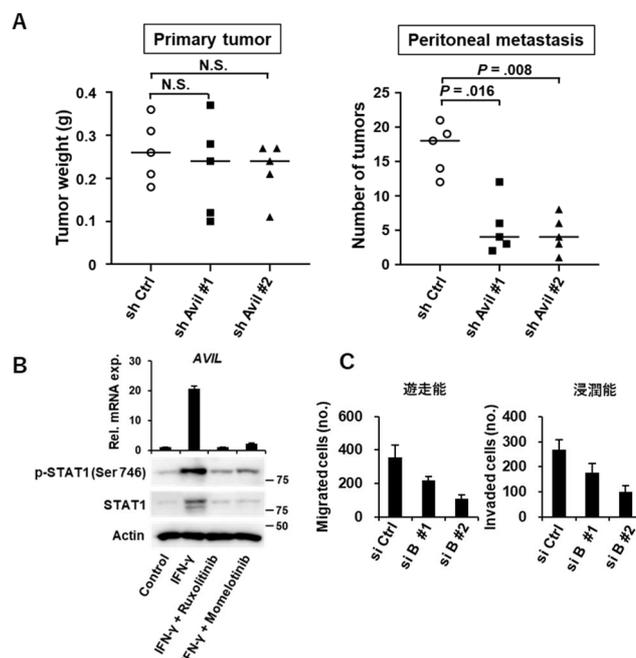


図 2 AVIL を介した大腸癌転移分子機構の解明

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	Hisanori Isomura, Haruki Mori, Taisuke Kajino, Yuichi Abe, Toru Miyake, Waki Hosoda, Koji Komori, 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82回日本癌学会学術集会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Ayumu Taguchi, Shuang Zhou, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Hisanori Isomura
2. 発表標題	Systems-approach based molecular profiling of mouse models for translational cancer research
3. 学会等名	第82回日本癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年	2023年

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 磯村 久徳、阿部雄一、山田啓策、大西祥代、田中努、山村健史、中村正直、島田昌明、田近正洋、藤城光弘、川嶋啓揮、田口 歩
2. 発表標題 血漿タンパク質と自己抗体の定量的プロファイリングによる大腸がん早期診断バイオマーカーの探索同定
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 田口 歩
2. 発表標題 血液バイオマーカーが拓く大腸がん検診の近未来
3. 学会等名 JDDW 2022 (招待講演)
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 Yuichi Abe, Hisanori Isomura, Koji Komori, Mitsuhiro Fujishiro, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 Quantitative profiling of circulating proteins and autoantibodies for early detection of colorectal cancer
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 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 森 治樹、阿部雄一、梶野泰祐、夏目誠治、木下敬史、大内 晶、三宅 亨、飯田洋也、水野和幸、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 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（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 治樹、阿部雄一、夏目誠治、木下敬史、大内 晶、細田和貴、小森康司、清水泰博、田口 歩
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 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 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、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 JDDW2021
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	細田 和貴 (Hosoda Waki) (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 (Taguchi Ayumu) (50817567)	愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR分野・分野長 (83901)	
研究分担者	谷 眞至 (Tani Masaji) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

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