

令和 6 年 6 月 30 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：21K09337

研究課題名（和文）骨軟部肉腫の多層プロテオーム解析による病態解明と革新的治療法の開発

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

研究代表者

濱田 俊介（Hamada, Shunsuke）

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：90747289

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）：希少がんである骨軟部肉腫においては、有効な化学療法は極めて限られており、革新的なアプローチによる新規治療法の開発が急務である。本研究では、骨軟部肉腫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、骨軟部肉腫細胞株を用いてCRISPR-Cas9システムによるゲノムワイド機能スクリーニングを行う。これにより、骨軟部肉腫の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、骨軟部肉腫の克服を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、骨軟部肉腫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ことを期待される。また、肉腫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）：Effective chemotherapies for the rare bone and soft tissue sarcoma are extremely limited and there is an urgent need to develop innovative therapies. In this study, we will develop patient-derived xenograft (PDX) models of bone and soft tissue sarcoma 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 signalling pathways. In addition, a genome-wide functional screen will be performed using bone and soft tissue sarcoma cell lines with the CRISPR-Cas9 system. This will help elucidate the molecular mechanisms of bone and soft tissue sarcomas and identify a set of cell surface molecules as innovative therapeutic targets to overcome bone and soft tissue sarcomas.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部肉腫 PDXモデル 患者由来細胞 多層オミクス解析 プロテオミクス 細胞表面タンパク質 CRISPR-Cas9 合成致死

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

本邦における骨軟部肉腫の発生頻度は、年間 10 万人あたり 3 人超と非常に低く、希少がんと考えられている。さらに、その組織型は 50 を超え多彩であることから、しばしばその診断や治療に難渋し、適切な治療を行うことが困難な場合も多い。骨軟部肉腫の大部分を占める、脂肪肉腫、未分化多形肉腫、平滑筋肉腫、滑膜肉腫などの非円形細胞肉腫においては、化学療法あるいは放射線療法に対する感受性は低く、一次治療に用いられる化学療法剤としては、ドキソルビシンおよびイホスファミドが標準治療とされ、長年にわたり目覚ましい進歩はみられていない。近年、トラベクテジン、エリプリン、さらに分子標的治療薬である Pazopanib などが開発されているものの、その効果は限定的であり、また、遠隔転移を伴う肉腫の 2 年生存率は約 20% と、極めて予後不良であることから、分子生物学的な知見に基づく新たな骨軟部肉腫治療法の開発は、喫緊かつ最重要の課題である。次世代シーケンシングなどの進歩によって、骨軟部肉腫のゲノム情報は集積しつつある。その一方で、骨軟部肉腫に共通する遺伝子異常として頻度の多い、転写因子を構成成分とする融合遺伝子は、直接の治療標的にはなりづらいため、ゲノム解析から肉腫の個別化医療の開発にはつながっておらず、革新的なアプローチによって、肉腫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、外科手術で採取された腫瘍組織から肉腫 PDX モデルを作成すること、細胞表面タンパク質(サーフェソーム)解析から下流の活性化シグナル経路同定のためのリン酸化タンパク質解析まで含む、高深度な多層プロテオーム解析によって骨軟部肉腫特異的な細胞表面タンパク質や活性化シグナル経路を同定すること、そしてそれらをターゲットとする革新的な治療法の開発から骨軟部肉腫の克服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と名古屋大学整形外科において、外科手術で得られた腫瘍組織を、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)。

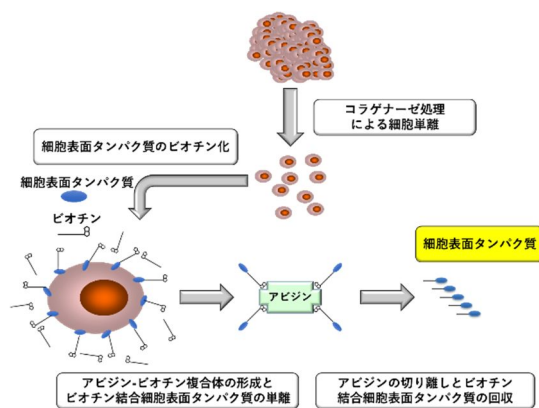


図 1 細胞表面タンパク質の単離

PDX 腫瘍のサーフェソームは、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、得られたサーフェソームデータを、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肉腫特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

また、本研究で樹立する肉腫細胞株や入手可能な細胞株を用いて、2 ベクターシステムのゲノムワイド CRISPR knockout pooled library (GeCKO v2) を用いて機能スクリーニングを行う。低 MOI (Multiplicity of infection) でコンストラクトを導入後、3~7 日間 puromycin 存在下で培養し非形質導入細胞を排除する。この時点をも day 0 とし、全体を 4 つのバッチに分け、一つのバッチからは gRNA を抽出する。残りをそれぞれコントロールまたは薬剤存在下に培養する。4 週間後に gRNA を回収し、次世代シーケンサーを用いて gRNA 量を測定する。gRNA 量を day 0、コントロール、薬剤存在下の各条件で比較することで、ノックアウトによって細胞増殖が抑制された遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

骨軟部肉腫 60 症例を Rag-2/Jak3 二重欠損マウスに移植し、20 症例 (33.3%) で生着した。生着率は既報 (30%程度) に比較して同等であった。生着した PDX の内訳は、滑膜肉腫 2 例、平滑筋肉腫 1 例、未分化多型肉腫 9 例、繊維肉腫 1 例、粘液繊維肉腫 4 例、横紋筋肉腫 1 例、悪性末梢神経鞘腫 2 例であった (表 1)。

ID	性別	年齢	組織型	部位	転移再発
4	F	42	滑膜肉腫	大腿	肺
6	M	54	平滑筋肉腫	腸間膜	肝、脊椎
8	F	53	未分化多型肉腫	大腿	
10	F	78	未分化多型肉腫	大腿	
11	F	77	繊維肉腫	大腿	肺, リンパ節
18	F	78	横紋筋肉腫	右大腿	
23	M	62	未分化多型肉腫	右臀部	肺
28	F	71	未分化多型肉腫	右下腿	
32	M	73	粘液繊維肉腫	左臀部	
38	M	80	滑膜肉腫	左下腿	肺
42	M	60	悪性末梢神経鞘腫	右前胸壁	
44	M	96	粘液繊維肉腫	前腕	有
46	M	63	未分化多型肉腫	右上腕	有
49	M	52	未分化多型肉腫	大腿	
55	M	51	未分化多型肉腫	左上腕	
57	F	69	未分化多型肉腫	側胸部	
58	M	84	未分化多型肉腫	大腿	
59	M	74	粘液繊維肉腫	大腿	
60	M	29	悪性末梢神経鞘腫	前胸部	有
68	F	48	粘液繊維肉腫	臀部	

表 1 骨軟部肉腫 PDX 作成症例

このうち 4 症例 (未分化多型肉腫 2 例、繊維肉腫 1 例、横紋筋肉腫 1 例) においては、さらに PDX 由来細胞株を樹立できた。

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。先行してゲノム解析を行った滑膜肉腫症例 (症例 ID #4) では、臨床検査では検出できなかった滑膜肉腫に特徴的な融合遺伝子である SS18-SSX1 を含む一群の遺伝子異常が同定できた (図 2)。

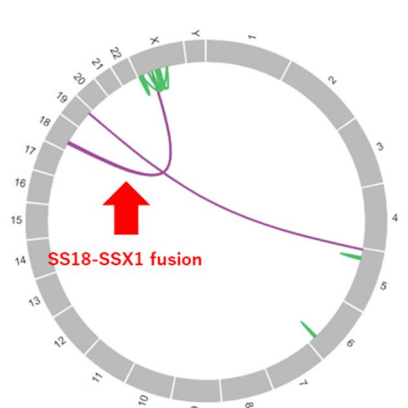


図 2 滑膜肉腫 PDX における SS18-SSX1 融合遺伝子の同定

また、分子標的治療薬と合成致死を示す遺伝子を網羅的にスクリーニングするために、悪性末梢神経鞘腫細胞株を用いて、Cas9 発現株の樹立を行っている。

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 3件 / うち国際学会 0件）

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 International Session 10「がん精密医療の実現に向けたモデル動物研究の最前線」（招待講演）
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 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 田口 歩
2. 発表標題 Systems-approach based molecular profiling of mouse models for translational cancer research
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会 International Session 6「種々のがんモデル動物を用いた新しい診断法・治療法開発への挑戦」（招待講演）
4. 発表年 2023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	今釜 史郎 (Imagama Shiro) (40467288)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
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)	

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