

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15386

研究課題名（和文）細胞表面タンパク質の網羅的解析を基盤とした卵巣がん新規診断・治療標的の同定

研究課題名（英文）Identification of novel therapeutic targets for ovarian cancer by surfaceome analysis

研究代表者

小林 信（Kobayashi, Makoto）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60761947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣漿液性癌の細胞表面に発現するタンパク質を約9000個同定した。その中から卵巣癌の細胞表面タンパク質シグニチャーを構成する31個の分子群を絞り込み、卵巣がんに突出して高発現するSpondin-1（SPON1）に着目した研究を展開した。まず特異抗体を作製し、卵巣がん外科切除標本を免疫染色したところ、SPON1の発現は様々な臨床病理学的因子と正に相関し、卵巣癌の独立した予後因子であることを明らかにした。さらに卵巣癌細胞株の培養上清や腹水における分泌も確認し、SPON1は卵巣がんの予後マーカーのみならず血清診断マーカーとしても有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞表面タンパク質は、がんの診断・治療標的候補として有望な分子群が濃縮されていると考えられる。しかしながら、実際に卵巣癌細胞の表面に発現するタンパク質を詳細に解析した報告は少ない。本研究で着目したSPON1は、自身が組織診断・予後マーカー、血清診断マーカー、治療標的としての可能性を持つ。従って本研究で確立した細胞表面タンパク質の網羅的同定法は、卵巣癌の新規バイオマーカーの獲得法として有用である。また我々が絞り込んだ他の分子群についても同様に卵巣癌の新規バイオマーカーや治療標的としての有用性が示唆され、卵巣癌の予後延長に寄与できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In-depth proteomics analysis revealed 9,000 proteins expressed on the surface of serous ovarian cancer cells. First, using bioinformatics analysis, we discovered Spondin-1 (SPON1) as a protein with a "cell surface signature" that was particularly expressed in ovarian cancer compared to other cancer types. Second, we generated a monoclonal antibody against SPON1 and investigated the correlation between SPON1 expression and clinicopathological factors using immunohistochemistry. Our findings suggested that high SPON1 expression was an independent prognostic factor for ovarian cancer recurrence-free survival. Furthermore, we found SPON1 secretion in both ovarian cancer cell culture media and ovarian cancer patient-derived ascites fluid. With these findings, SPON1 has been identified not only as a prognostic marker but also as a serum diagnostic marker for ovarian cancer.

研究分野：人体病理

キーワード：卵巣癌 予後マーカー 細胞表面タンパク質 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは最も致死率の高い婦人科がんであり、本邦においてその罹患率と粗死亡率は漸増傾向にある。自覚症状に乏しく早期診断法が確立されていないことから、約75%が進行がんとして診断される。標準治療として外科手術と化学療法が併用されるが、半数以上の症例が再発し、再発例の5年生存率は約20%に留まる。分子標的治療が実用化されて20年以上経過してなお、卵巣がんにおいては肺がんや乳がんにおけるEGFRやHER2のような腫瘍マーカーと治療戦略が一对一対応する理想的な分子標的が同定されておらず、他のがん腫と比較して治療戦略の開発が相対的に立ち遅れている。

がん研究において細胞表面タンパク質を標的とする利点は、1) 増殖や浸潤など悪性形質を規定する様々な細胞内シグナルの最上流に位置する分子が多く含まれること、2) 薬剤の細胞膜透過性を考慮する必要がなくドラッグデリバリー戦略が立てやすいこと、3) 剪断化等の翻訳後修飾を受けたタンパク質は血中への分泌の可能性があり、血清診断マーカーとしても活用できること、4) 抗体治療法の開発に結びつくことである。つまり細胞表面タンパク質を標的とした治療は、がんの治療戦略を考えるうえで鍵となる特性を有している。特に昨今進歩の著しい抗体薬物複合体は正常組織を傷つけずに腫瘍組織のみを特異的に傷害できることのみならず、がん遺伝子依存性増殖を脱した薬剤耐性がん細胞も傷害可能など、多数のアドバンテージがある。しかしながら現在までの細胞表面タンパク質研究は主として機械学習を基にした局在予測が殆どであり、実際のがん細胞表面に発現するタンパク質をプロファイルした研究は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、本邦における卵巣がんの中で最も多い漿液性癌を対象とした細胞表面タンパク質解析を通し、卵巣癌の診断・予後マーカーや治療標的として有用な分子群を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

第一に、卵巣がん細胞株3種(OVCAR3, SKOV3, AMOC2)の表面に発現するタンパク質の網羅的同定を試みた。各細胞株を生きた状態でビオチン化し、界面活性剤入りのバッファーで回収したのちアビジンビーズで濃縮した。一方、超音波破砕法で全細胞タンパク質を抽出したものをコントロールとし質量分析に供した。第二に、バイオインフォマティクス解析を用いて同定されたタンパクの中から卵巣癌の診断・予後マーカー・治療標的としての可能性を持つ分子群を絞り込んだ。第三に、絞り込んだ分子群の中から新規性の高いタンパク質Spondin-1 (SPON1)に着目し、特異抗体の作製及び卵巣癌外科手術標本を用いた免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

質量分析の結果、卵巣癌細胞株の全細胞画分から2,787個、細胞表面画分から378個、両者に共通して6,302個のタンパク質が同定できた。細胞表面画分には既知の細胞表面マーカーであるが複数含まれており、本法で細胞表面分子を濃縮できることが確認された(図1)。これらの分子の中からThe Cancer Genome Atlas (TCGA)とThe Genotype-Tissue Expression (GTEx)データベースを用いて卵巣がん細胞株に高発現するが正常組織に発現しない分子群を抽出し、全細胞画分と細胞表面画分の比を算出することで31個のタンパク質から成る新規治療標的分子パネルを抽出した。Ingenuity pathway analysisの結果、これら分子群は卵巣漿液性癌と関連があることが分かった(図2)。

TCGAとGTExデータベースを用いた解析から、卵巣がん新規治療標的分子パネルに含まれるSPON1は遺伝子発現が卵巣がんに突出して高発現する一方、正常組織には殆ど発現しないことが分かった。そこで本研究ではSPON1に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、卵巣癌外科切除法本を用いた免疫組織化学的検討を実施した。その結果、SPON1タンパク質は遺伝子同様に主要な正常組織に発現しない一方、卵巣癌組織には様々な強度で染色を認めた。染色強度と範囲を基にして卵巣癌組織におけるSPON1発現をスコア化し、予後や臨床病理学的因子との関連を検討した。その結果SPON1高発現は卵巣癌の全生存期間とは関連しなかったが、無再発生存期間を有意に短縮させることが明らかになった(図3)。さらにSPON1高発現はステージ、pT因子、腹膜播種、手術完遂度、再発等の様々な臨床病理学的因子と正に相関することを示し、単変量・多変量解析からSPON1高発現は独立した再発予測因子であることを明らかにした。

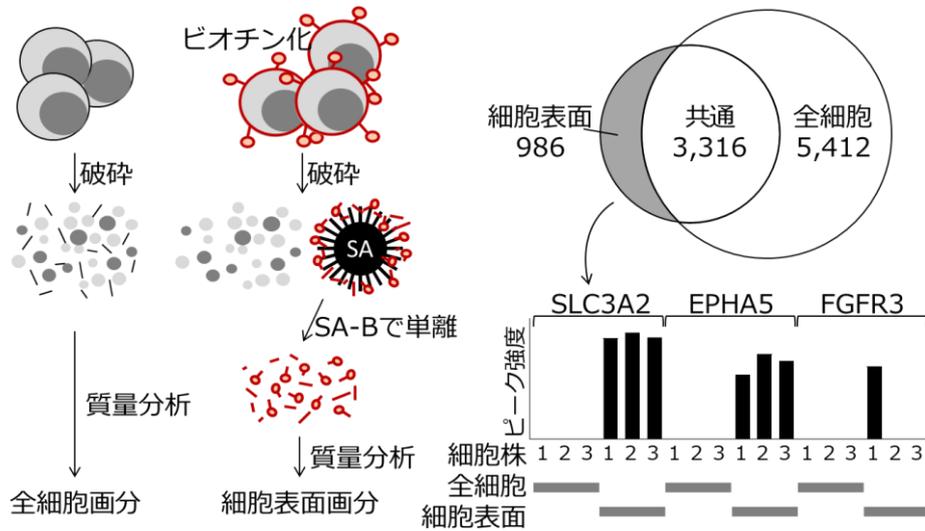


図1. 卵巣がん細胞株3種から全細胞画分と細胞表面画分を抽出し、それぞれ質量分析した(左)。378分子が細胞表面画分に偏在して分布しており(右上)、その中には既知の細胞表面マーカーが含まれていた(右下)。

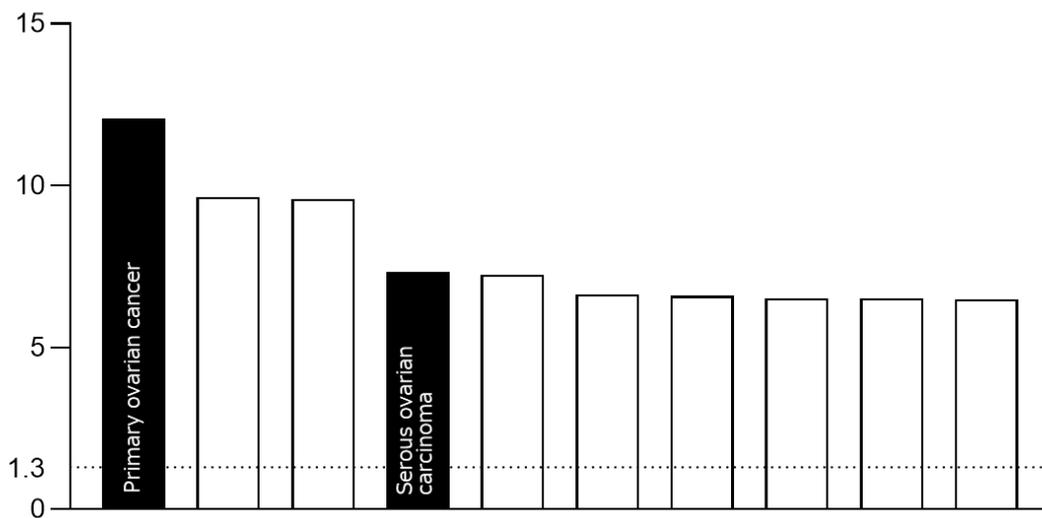


図2. 本研究で見出した31個のタンパク質からなる「卵巣癌新規治療標的分子パネル」は卵巣漿液性癌のシグネチャーと有意な正の関連を示した。

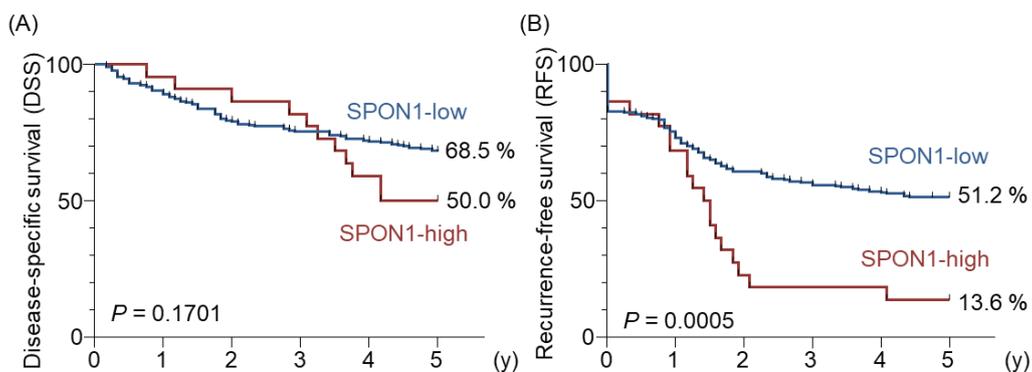


図3. SPON1の発現は全生存期間と関連しない(A)一方、無再発生存期間を有意に短縮させた(B)。

本研究では、1) 細胞に発現する表面タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクス実験法の構築、2) 標的特異的に反応するモノクローナル抗体の開発、3) バイオインフォマティクス解析による新規治療標的分子の抽出法などの様々な方法論を構築した。さらに SPON1 解析を通して、これらの方法で卵巣癌新規治療標的が複数抽出可能であることを示した。すなわち、我々が同定した SPON1 以外の分子においても SPON1 同様に卵巣癌の診断や治療に有用な新規バイオマーカーである可能性が示唆される。さらに本研究で構築した上記方法は、卵巣癌に限らず乳がんや子宮体がん等のいかなるがん種においても適応可能であり、今までに同定されていない様々な新規バイオマーカーを探索できる可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ajani JA, Xu Y, Huo L, Wang R, Li Y, Wang Y, Pizzi MP, Scott A, Harada K, Ma L, Yao X, Jin J, Zhao W, Dong X, Badgwell BD, Shanbhag N, Tatlonghari G, Estrella JS, Roy-Chowdhuri S, Kobayashi M, Vykoukal JV, Hanash SM, Calin GA, Peng G, Lee JS, Johnson RL, Wang Z, Wang L, Song S	4. 巻 70
2. 論文標題 YAP1 mediates gastric adenocarcinoma peritoneal metastases that are attenuated by YAP1 inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 55-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2019-319748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fahrman JF, Irajizad E, Kobayashi M, Vykoukal JV, Dennison JB, Murage E, Wu R, Long JP, Do K-A, Celestino J, Lu KH, Lu Z, Bast RC, Hanash SM	4. 巻 13
2. 論文標題 A MYC-driven plasma polyamine signature for early detection 2 of ovarian cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13040913	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
1. 著者名 Kojima M, Kogimoto K, Kobayashi M, Tomikawa-Ichikawa N, Koshiwagi K, Watanabe T, Soeda S, Fujimori K, Chiba H	4. 巻 19
2. 論文標題 Aberrant claudin-6 adhesion signal promotes endometrial cancer progression via estrogen receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1208-1220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Rahman A, Kobayashi M, Sugimoto K, Endo Y, Kojima M, Furukawa S, Watanabe T, Soeda S, Hashimoto Y, Fujimori K, Chiba H	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced Claudin-12 Expression Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073774	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

1. 著者名 Katayama H, Kobayashi M, Irajizad E, Patel N, Mao X, Rusling L, Vykoukal J, Cai Y, Hsiao F, Yu CY, Long J, Liu J, Esteva F, Fahrman J, Hanash S	4. 巻 9
2. 論文標題 Protein citrullination as a source of cancer neoantigens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-002549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 小林 信、杉本 幸太郎、千葉 英樹	4. 巻 66
2. 論文標題 がん自己抗体研究の軌跡	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo Y, Sugimoto K, Kobayashi M, Kobayashi Y, Kojima M, Furukawa S, Soeda S, Watanabe T, Higashi A, Higashi T, Hashimoto Y, Fujimori K, Chiba H	4. 巻 61
2. 論文標題 Claudin-9 is a novel prognostic biomarker for endometrial cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2022.5425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irajizad E, Fahrman JF, Long JP, Vykoukal J, Kobayashi M, Capello M, Yu C-Y, Cai Y, Hsiao FC, Patel N, Park S, Peng Q, Dennison JB, Kato T, Tai MC, Taguchi A, Kadara H, Wistuba II, Katayama H, Do K-A, Hanash SM, Ostrin EJ	4. 巻 23
2. 論文標題 A Comprehensive Search of Non-Canonical Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Impact on the Immune Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8933 ~ 8933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23168933	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

1. 著者名 Park S, Sater Ali HA, Fahrman JF, Irajizad E, Cai Y, Katayama H, Vykoukal J, Kobayashi M, Dennison JB, Garcia-Manero G, Mullighan CG, Gu Z, Konopleva M, Hanash S	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel UHRF1-MYC Axis in Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4262 ~ 4262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14174262	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

1. 著者名 Miyakawa R, Kobayashi M, Sugimoto K, Endo Y, Kojima M, Kobayashi Y, Furukawa S, Honda T, Watanabe T, Asano S, Soeda S, Hashimoto Y, Fujimori K, Chiba H	4. 巻 16
2. 論文標題 SPON1 is an independent prognostic biomarker for ovarian cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Ovarian Research	6. 最初と最後の頁 95-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13058-023-01646-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami-Nishimagi Y, Sugimoto K, Kobayashi M, Tachibana K, Kojima M, Okano M, Hashimoto Y, Saji S, Ohtake T, Chiba H	4. 巻 25
2. 論文標題 Claudin-4-adhesion signaling drives breast cancer metabolism and progression via liver X receptor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research	6. 最初と最後の頁 41-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13058-023-01646-z	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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林 信, 杉本 幸太郎, 千葉 英樹
2. 発表標題 細胞表面タンパク質解析を基盤とした卵巣癌の新規診断・治療標的の網羅的同定
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川 諒也, 小林 信, 杉本 幸太郎, 千葉 英樹
2. 発表標題 Spondin-1の新規卵巣癌診断マーカーとしての有用性
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abidur Rahman, 杉本 幸太郎, 小林 信, 遠藤 雄大, 小島 学, 千葉 英樹
2. 発表標題 Claudin-12, a new biomarker for cervical cancer
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 信
2. 発表標題 Surfaceome解析と自己抗体解析を駆使した卵巣がん新規診断マーカーの獲得
3. 学会等名 第18回北里疾患プロテオーム研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abidur Rahman, 小林 信, 杉本 幸太郎, 遠藤 雄大, 小島 学, 古川 茂, 渡辺 尚文, 添田 周, 藤森 敬也, 千葉 英樹
2. 発表標題 Reduced Claudin-12 Expression Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer
3. 学会等名 令和3年度福島県立医科大学サマーポスター
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西間木 淳, 杉本 幸太郎, 小林 信, 小船戸 康英, 月田 茂之, 渡邊 淳一郎, 佐藤 直哉, 石亀 輝英, 岡田 良, 木村 隆, 見城 明, 千葉英樹, 丸橋 繁
2. 発表標題 がん創薬を目指した核内受容体新規リン酸化部位に対する単クローン性抗体の樹立
3. 学会等名 令和3年度福島県立医科大学サマーポスター
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 信, 片山 博之, 杉本 幸太郎, 千葉 英樹
2. 発表標題 Auto-immunomicsを基盤としたがん患者血清中自己抗体の網羅的探索
3. 学会等名 第72 回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 雄大, 杉本 幸太郎, Abidur Rahman, 小林 信, 千葉 英樹
2. 発表標題 Claudin-9は子宮体がんの新規予後マーカーである
3. 学会等名 第72 回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川 諒也, 小林 信, 杉本 幸太郎, 千葉 英樹
2. 発表標題 卵巣がんにおけるSpondin-1タンパク質の発現解析
3. 学会等名 第72 回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 信, Hiroyuki Katayama, Johannes F. Fahrmann, Ehsan Iradizad, Xiangying Mao, Jody V. Vykoukal, Chuan-Yih Yu, Yining Cai, 杉本 幸太郎, 千葉 英樹, Joseph Celestino, Jinsong Liu, Karen H. Lu, Samir M. Hanash
2. 発表標題 Surfaceome profiling of ovarian cancer ascites tumor cells for personalized immunotherapy
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 信, Hiroyuki Katayama, Johannes F. Fahrmann, Ehsan Iradizad, Xiangying Mao, Jody V. Vykoukal, Chuan-Yih Yu, Yining Cai, Joseph Celestino, Jinsong Liu, Karen H. Lu, Samir M. Hanash
2. 発表標題 Surfaceome profiling of ovarian cancer ascites tumor cells for personalized immunotherapy
3. 学会等名 10th Asia Oceania Human Proteome Organization Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 雄大, 小林 信, 杉本 幸太郎, 添田 周, 渡辺 尚文, 藤森 敬也, 千葉 英樹
2. 発表標題 Claudin-9は子宮体がんの新規予後マーカーである
3. 学会等名 令和3年度福島県立医科大学ウインターポスター
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瓜生 開, 杉本 幸太郎, 遠藤 雄大, 小林 信, 千葉 英樹
2. 発表標題 卵巣癌新規診断マーカーとしてのClaudin-12
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川諒也、小林信、杉本幸太郎、千葉英樹
2. 発表標題 Spondin-1は新規卵巣癌予後マーカーとして有用である
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小名木 彰史, 杉本 幸太郎, 小林 信, 小島 祥敬, 千葉 英樹
2. 発表標題 腎細胞癌におけるClaudin-10の臨床病理学的・分子病理学的解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 卵巣癌に起因する細胞表面タンパク質シグネチャーの同定
2. 発表標題 小林 信, 杉本 幸太郎, 遠藤 雄大, 宮川 諒也, 瓜生 開, 田口 歩, 千葉 英樹
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 免疫グロブリンサブタイプに着目した卵巣癌患者腹水中自己抗体の網羅的同定
2. 発表標題 瓜生 開, 小林 信, 杉本 幸太郎, 遠藤 雄大, 千葉 英樹
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋季特別総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細胞間接着分子クロードイン-16の新規卵巣癌診断マーカーとしての可能性
2. 発表標題 茂村 碧, 小林 信, 杉本 幸太郎, 瓜生 開, 遠藤 雄大, 千葉 英樹
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋季特別総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 信, 杉本 幸太郎, 宮川 諒也, 瓜生 開, 遠藤 雄大, 小林 靖幸, 田口 歩, 千葉 英樹
2. 発表標題 卵巣癌の新規バイオマーカーとしてのSpondin-1
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋季特別総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂村 碧, 小林 信, 杉本 幸太郎, 瓜生 開, 遠藤 雄大, 千葉 英樹
2. 発表標題 卵巣がんにおける細胞間接着分子Claudin-12, -16発現の臨床病理学的意義
3. 学会等名 令和4年度福島県立医科大学サマーポスター
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小名木 彰史, 杉本 幸太郎, 小林 信, 小島 祥敬, 千葉 英樹
2. 発表標題 腎細胞癌におけるClaudin-10の臨床病理学的解析
3. 学会等名 令和4年度福島県立医科大学ウインターポスター
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瓜生 開, 小林 信, 杉本 幸太郎, 遠藤 雄大, 千葉 英樹
2. 発表標題 卵巣癌患者腹水中に含まれる新規自己抗体群の同定
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 信, 杉本 幸太郎, 宮川 諒也, 瓜生 開, 遠藤 雄大, 小林 靖幸, 田口 歩, 千葉 英樹
2. 発表標題 Surfaceome解析を基盤とした卵巣癌細胞表面タンパク質シグネチャーの同定
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022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

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