

令和 5 年 5 月 3 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03544

研究課題名（和文）生検組織を用いたリン酸化シグナル解析によるがん多様性機序の解明と精密医療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of cancer diversity mechanism by analysis of phosphorylation signal using biopsy tissue and application to precision medicine

研究代表者

朝長 毅（Tomonaga, Takeshi）

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・客員研究員

研究者番号：80227644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、患者のがん生検組織や同一患者の時系列の手術切除組織を用いて、大規模なリン酸化プロテオーム解析とバイオインフォマティクス解析を行い、患者の層別化と個人個人に対して最適な治療法の提案をすることを目的とした。その結果、胃がんを3つのサブタイプに分類することおよびそれぞれのサブタイプに対して特異的な治療法を提案することに成功した。また、大腸がんの原発巣と肝転移組織のリン酸化プロテオーム解析から、予後不良群で活性化するキナーゼおよび治療薬としてのキナーゼ阻害剤を見出すことができ、シグナルプロテオミクス創薬の概念実証に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、大規模なリン酸化プロテオーム解析とバイオインフォマティクス解析を組み合わせることにより、がんシグナルパスウェイとパスウェイ上のキナーゼ活性を網羅的に推定することができ、がんの多様性をシグナルパスウェイの観点から理解できるようになったことである。その結果、患者の層別化を可能とし、また、個々のがん患者のシグナルパスウェイの活性化状態から治療法の提案を可能とすることができた。すなわち、シグナルプロテオミクス創薬が精密医療・個別化医療の実践に有用であることを示した点が本研究の社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed large-scale phosphoproteome and bioinformatics analysis using patient cancer biopsy tissue and surgically resected tissue for patient stratification and proposal of the optimal treatment for individual patient. As a result, we succeeded in classifying gastric cancer into three subtypes and proposing specific treatment methods for each subtype. In addition, from the phosphoproteome analysis of the primary tumor and the liver metastasis of colorectal cancer patients, we were able to discover the kinase that is activated in the poor prognosis group of colorectal cancer and the kinase inhibitor as a therapeutic agent. We could successfully demonstrate the concept of signal proteomics for drug discovery.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：リン酸化プロテオーム解析 がん多様性 精密医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のがんのオミックス解析から明らかなように、がんは多様性であり、個人個人によって性質が異なることはもちろんのこと、転移、再発、治療によって性質が変化する。従って、がんの薬物療法は、個人個人やその時々によって最適な治療法が変わってくるはずである。ところが、現在のがんの薬物療法は、がんの多様性に即した個別化医療にはほど遠い。また、分子標的薬は多くの場合1年以内に不応となり二次耐性が大きな問題となっているが、治療抵抗性の機序の解明はほとんど進んでいない。

患者層別化による治療法の選択は、肺がんなどの一部のがんでは進んでいるものの、がんの多様性はいくつかのサブタイプに分かれるほど単純ではなく、ほとんどのがん種でサブタイプによる層別化ががんの新しい治療法の選択に結びついていないのが現状である。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、本研究の目的は、個々のがん患者の多様性を捉えるための最適な方法は何か、どうすれば個人個人に対して最適な治療法を提案することができるかということである。具体的には、患者のがん生検組織、PDX 移植腫瘍および同一患者の時系列の手術切除組織を用いて、大規模なリン酸化プロテオーム解析とバイオインフォマティクス解析を行い、その定量データをもとに、がんシグナルパスウェイとパスウェイ上のキナーゼ活性を網羅的に推定することで、がんの多様性を理解し、患者の層別化と個人個人に対して最適な治療法の提案をすることを目的とする。個々のがん患者において、そのシグナルパスウェイ上の活性化キナーゼがわかれば、すでに開発済みの多種多様なキナーゼ阻害剤の選択が可能となる (Drug repositioning 等)。

3. 研究の方法

(1) 胃がん・大腸がん生検組織の収集、同一患者の大腸がん初発時、再発時、治療不応期と時系列で取られた生検組織または手術切除組織の収集 (研究分担者: 朴、長山)

胃がん・大腸がんの生検組織は国立がん研究センター中央病院消化器内科の朴が担当する。同一患者から時系列に採取する生検組織および手術切除組織はがん研有明病院大腸外科の長山が担当する。

(2) PDX (Patient Derived Xenograft) の作製 (研究分担者: 佐藤、協力者: 軍司)

胃がん・大腸がん生検組織や手術切除組織が、量的質的にリン酸化プロテオーム解析に適さない場合は、採取した組織を免疫不全マウスに移植して PDX を作製する。

(3) 生検組織、手術切除組織、PDX の大規模リン酸化プロテオーム解析によるシグナルパスウェイおよびキナーゼ活性定量 (研究代表者: 朝長、分担者: 足立、協力者: 鳴海)

胃がん・大腸がん生検組織や PDX から採取したがん組織のリン酸化プロテオーム解析で得られたキナーゼ自身の活性化リン酸化部位の定量値およびキナーゼ-基質データベース (キナーゼによる基質のリン酸化サイトのデータベース) を用い、基質となるリン酸化部位の定量値を用い、活性化キナーゼを推定する。

(4) リン酸化マーカーク群を集積したリン酸化診断パネルの作製と精密医療への応用 (朝長)

上記の結果で得られた患者層別化に有用なマーカーク群を集積したリン酸化診断パネルを作製し、患者層別化および個人に最適な治療法、特にキナーゼ阻害剤を臨床医に提案する。

4. 研究成果

(1) 胃がん・大腸がん生検組織の収集、同一患者の大腸がん初発時、再発時、治療不応期と時系列で取られた生検組織または手術切除組織の収集 (研究分担者: 朴、長山)

研究分担者の朴により、胃がん 85 症例、大腸がん 109 症例のがん部と非がん部の生検組織の収集に成功した。また、研究分担者の長山により、大腸がん初発時と化学療法後再発時の手術切除組織 24 検体の収集に成功した。

(2) PDX (Patient Derived Xenograft) の作製 (研究分担者: 佐藤、協力者: 軍司)

胃がん・大腸がん患者から収集した生検組織、手術切除組織を用いた PDX の作製が可能であることを確認した。

(3) 生検組織、手術切除組織、PDX の大規模リン酸化プロテオーム解析によるシグナルパスウェイおよびキナーゼ活性定量 (研究代表者: 朝長、分担者: 足立、協力者: 鳴海)

研究分担者の朴により収集された胃がん・大腸がん生検検体を用いて、大規模リン酸化プロテ

オーム解析を行った。その結果、胃癌症例をサブタイプ 1：CDK 活性型、2：上皮間葉転換 (EMT)型、3：その他 (割合 35%、15%、50%)に分類することに成功した。また、1次化学療法増悪後に EMT 型サブタイプの割合が 60%を超えることも見出した。

研究分担者の長山により収集された大腸がん初発時と化学療法後再発時の手術切除組織を用いた大規模リン酸化プロテオーム解析の結果、進行大腸がんの化学療法中に再発を認めた予後不良群では、ある特定のキナーゼ B が活性化されていること、そのキナーゼの上流の因子の阻害剤が進行大腸がん予後不良群に有用である可能性が示唆された。

(4)リン酸化マーカー群を集積したリン酸化診断パネルの作製と精密医療への応用(朝長、足立、朴、長山、研究協力者軍司)

胃癌の3つのサブタイプのうち、EMT型に対する特異的な治療標的として、そのサブタイプで活性化しているキナーゼ A の阻害剤とパクリタキセルの併用治療法の抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で確認した。本治療法は、1次化学療法増悪後に増加する EMT 型サブタイプにも有効であることが示唆された。

35 種類の大腸がん細胞株のリン酸化プロテオームデータ・薬剤感受性情報、キナーゼ活性情報から有効な薬剤を論理的に選択する手法を開発し、進行大腸がんの化学療法中に再発を認めた予後不良群に応用した。その結果、キナーゼ阻害剤 C が選択され、その抗腫瘍効果を *in vitro* 及び *in vivo* で検証し、シグナルプロテオミクス創薬の概念実証に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nojima, Y., Aoki, M., Re, S., Hirano, H., Abe, Y., Narumi, R., Muraoka, S., Shoji, H., Honda, K., Tomonaga, T., Mizuguchi, K., Boku, N., and Adachi, J.	4. 巻 21
2. 論文標題 Integration of pharmacoproteomic and computational approaches reveals the cellular signal transduction pathways affected by apatinib in gastric cancer cell lines.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Comput Struct Biotechnol J	6. 最初と最後の頁 2172-2187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.csbj.2023.03.006	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 -
1. 著者名 Adachi, J., Kakudo, A., Takada, Y., Isoyama, J., Ikemoto, N., Abe, Y., Narumi, R., Muraoka, S., Gunji, D., Hara, Y., Katayama, R., and Tomonaga, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Systematic identification of ALK substrates by integrated phosphoproteome and interactome analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e2021012025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101202	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 -
1. 著者名 Hirano H, Abe Y, Nojima Y, Aoki M, Shoji H, Isoyama J, Honda K, Boku N, Mizuguchi K, Tomonaga T, Adachi J	4. 巻 12
2. 論文標題 Temporal dynamics from phosphoproteomics using endoscopic biopsy specimens provides new therapeutic targets in stage IV gastric cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08430-7	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 -
1. 著者名 Abe Yuichi, Hirano Hidekazu, Shoji Hirokazu, Tada Asa, Isoyama Junko, Kakudo Akemi, Gunji Daigo, Honda Kazufumi, Boku Narikazu, Adachi Jun, Tomonaga Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Comprehensive characterization of the phosphoproteome of gastric cancer from endoscopic biopsy specimens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 2115 ~ 2129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/thno.37623	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 朝長毅
2. 発表標題 医薬基盤研究所でのバイオマーカー研究の近況と実用化を目指した取り組み
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立淳、覚道明美、高田洋子、池本成美、磯山純子、阿部雄一、鳴海良平、村岡賢、軍司大悟、原康弘、片山量平、朝長毅
2. 発表標題 リン酸化プロテオーム解析とインタラクトーム解析を組み合わせたALKキナーゼの基質同定
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 軍司大悟、阿部雄一、長山聡、坂井義治、小濱和貴、朝長毅、足立淳
2. 発表標題 リン酸化プロテオミクスと公共薬剤感受性データの統合解析による薬剤耐性大腸がん肝転移巣の新規創薬探索
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 軍司大悟、阿部雄一、長山聡、坂井義治、小濱和貴、朝長毅、足立淳
2. 発表標題 リン酸化プロテオミクスと公共薬剤感受性データの統合解析による薬剤耐性大腸がん肝転移巣の新規創薬探索
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 軍司大悟、阿部雄一、長山聡、坂井義治、小瀨和貴、朝長毅、足立淳
2. 発表標題 リン酸化プロテオームデータと薬剤感受性データの統合解析による薬剤耐性大腸がん肝転移巣の新規治療標的探索
3. 学会等名 第42回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立淳、朝長毅
2. 発表標題 Identification of ALK substrate candidates by the combination of phosphoproteome and interactome analysis.
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 Adachi J, Tomonaga T
2. 発表標題 Combination of phosphoproteomic data, drug sensitivity data, gene dependency data reveals potential therapeutic targets.
3. 学会等名 第79回日本がん学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoji H, Abe Y, Hirano H, Adachi J, Aoki M, Honda K, Boku N, Tomonaga T.
2. 発表標題 Comprehensive characterization of the phosphoproteome of gastric cancer from endoscopic biopsy specimens.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoji H, Abe Y, Hirano H, Adachi J, Aoki M, Honda K, Boku N, Tomonaga T
2. 発表標題 Comprehensive characterization of the phosphoproteome of gastric cancer from endoscopic biopsy specimens.
3. 学会等名 2020 ASMS Reboot (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 難治性癌に対する治療薬の探索方法	発明者 足立淳、朝長毅、軍 司大悟	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-74693	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	足立 淳 (Adachi Jun) (20437255)	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 (84420)	
研究分担者	朴 成和 (Boku Narikazu) (50505948)	東京大学・医学研究所・教授 (12601)	
研究分担者	長山 聡 (Nagayama Satoshi) (70362499)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	佐藤 友美 (Sato Yumi) (10333353)	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 プロテオームリサーチプロジェクト・特任研究員 (84420)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	軍司 大悟 (Gunji Daigo)		
研究協力者	鳴海 良平 (Narumi Ryohei)		

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