

令和 6 年 7 月 2 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03669

研究課題名（和文）PDXモデルの高深度サーフェソーム解析に基づく革新的膵癌個別化治療法の開発

研究課題名（英文）In-depth surfaceome analysis of PDX models to develop innovative personalized therapies in pancreatic cancer

研究代表者

田口 歩（Taguchi, Ayumu）

愛知県がんセンター（研究所）・分子診断TR分野・分野長

研究者番号：50817567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、71例の膵癌患者腫瘍組織移植（PDX）モデル、27例のPDX由来膵癌細胞株を作成し、サーフェソーム解析を含む多層オミクス解析を行った。また、未知の細胞表面タンパク質同定とその発現解析が可能なプロテオゲノミクスパイプラインとターゲットプロテオミクスを構築した。これにより、膵癌特異的に発現する新規治療標的細胞表面タンパク質分子を同定し、それをターゲットとする二次性薬物抗体複合体（ADC）が細胞増殖を強く抑制することを見出した。さらに、PDX、PDX由来膵癌細胞株の多層オミクスデータを格納し、そのバイオインフォマティクス解析が可能なデータベースを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、従来同定できなかった変異タンパク質やnon-coding RNA由来翻訳産物、偽遺伝子由来タンパク質など、正常組織に存在しない新規癌特異的細胞表面タンパク質の同定が可能となった。また、膵癌に加えて大腸、肺、食道、胃癌などでも同様の取り組みを行っており、癌腫を横断したサーフェソームデータ基盤の整備と細胞表面タンパク質の分子生物学的理解から、既存研究では俯瞰しえなかった革新的細胞表面分子治療標的群を大規模に開拓し、抗体薬物複合体や癌抗原ワクチン、CAR-T細胞療法など、癌免疫療法の革新につながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, 71 pancreatic cancer patient-derived xenograft (PDX) models and 27 PDX-derived pancreatic cancer cell lines were established and subjected to multi-omics analysis, particularly focusing on cellular surfaceome. In addition, a pipeline for proteogenomics and targeted proteomics were developed to identify and validate novel cell surface proteins. We identified a cell surface protein that was specifically expressed in pancreatic cancer and found that secondary drug-antibody conjugates (ADCs) targeting the molecule strongly suppressed cell proliferation. In addition, we constructed a database that allows the bioinformatic analysis using multi-omics data of PDXs and PDX-derived cell lines.

研究分野：分子診断学

キーワード：膵癌 PDXモデル 患者由来細胞株 多層オミクス解析 プロテオミクス 細胞表面タンパク質 抗体薬物複合体 CRISPR-Cas9

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

膵癌は、診断時すでに 70-80% が切除不能であり、その 5 年生存率はわずか 5-10% と、極めて予後が悪い癌である。膵癌の死亡数は年間 3 万人以上と、この 30 年で 8 倍以上に増加しており、日本の部位別癌死亡数の第 4 位を占めている(国立がん研究センターがん対策情報センター「がん登録・統計」)。また、進行期膵癌に対しては、FOLFIRINOX (フルオロウラシル+ロイコボリン+イリノテカン+オキサリプラチン)、ジェムシタピン+ナブパクリタキセルなど有効な抗癌剤治療法が開発されているものの、いずれも平均生存期間は 1 年未満であり、分子生物学的な知見に基づく新たな膵癌治療法の開発は、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、膵癌のゲノム情報は集積しつつある。膵癌の主要な遺伝子変異(とその頻度)は、KRAS (90% 以上)、TP53 (60-70%)、CDKN2A (50% 以上)、SMAD4 (約 50%) の 4 遺伝子にほぼ集約されるが、これらの遺伝子異常を直接標的にする有効な治療法の開発には至っていない。特に、KRAS 遺伝子変異は膵癌だけでなく、非小細胞肺癌、大腸癌などにおいても頻繁に観察され、発癌に直接寄与する極めて重要なドライバー変異であるにもかかわらず、KRAS はキナーゼ活性をもたない小分子であるため、選択的な阻害剤の開発は難航している。最近、KRAS の G12C 突然変異をターゲットとする、AMG510 の肺癌での有効性が示唆されたが、膵癌における G12C 変異の頻度は約 1% と少ない。さらに、変異 KRAS によって活性化される下流のエフェクターは、KRAS の変異アリルや併存する TP53 遺伝子変異などによっても異なりうるため、主要な KRAS の下流シグナル経路である、MAPK 経路あるいは PI3K 経路に対する阻害剤も大きな成果を上げていない。また、PARP 阻害剤が有効である BRCA 遺伝子変異、免疫チェックポイント阻害剤が有効な DNA ミスマッチ修復機能欠損など、治療標的となりうる遺伝子異常は、膵癌においてはそれぞれ 1-2% と低頻度であり、それらを合計しても 10% 程度である。このように、有効な治療法の乏しい膵癌において、プロテオーム解析を用いた革新的なアプローチによって、ゲノム解析だけでは得られない、新規の情報に基づく新たな治療法を開発し、膵癌の克服を目指すのが本研究の目標である。

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、超音波内視鏡下穿刺吸引法 (EUS-FNA) または外科手術で採取された膵癌組織から PDX モデルを作成する。PDX において、ゲノム・トランスクリプトーム解析に加えて、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膵癌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し、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膵癌の克服を目指す。

3. 研究の方法

愛知県がんセンター病院において、EUS-FNA または外科手術で得られた膵癌組織を、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は、PDX をコラゲナーゼで処理して細胞を単離し、細胞膜を通過しないビオチンで細胞表面を標識したのち、アビジンビーズで回収して単離し、これをマスマスペクトロメトリーで解析する。(図 1)

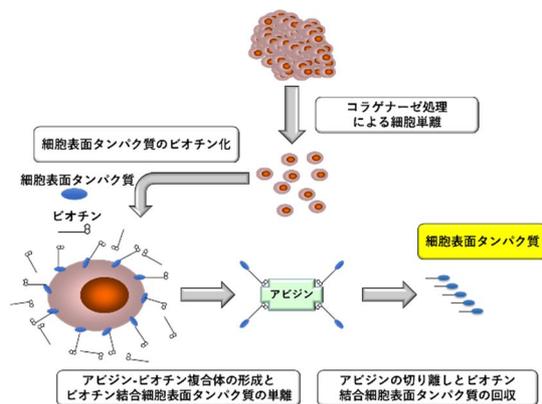


図 1 細胞表面タンパク質の単離

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膵癌特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

また、並行して、未知の細胞表面タンパク質を同定するために、PEAKS ソフトウェアを用いた de novo アミノ酸配列決定法の導入と、各膵癌症例のゲノム・トランスクリプトームデータから構築した患者固有予測アミノ酸配列データを用いたプロテオゲノム解析系の開発を行う。

4. 研究成果

膵癌 153 症例から、EUS-FNA または外科手術で採取した膵癌組織検体を Rag-2/Jak3 二重欠損マウスに移植し、71 症例 (46.4%) で着生した。膵癌 PDX43 例におけるサーフェスオーム解析によって、膵がん PDX1 症例当たり平均 5,373 個、43 例全体で 8,530 個の細胞表面タンパク質が同定された (図 1 左)。サーフェスオームプロファイルと臨床因子との関連を検討したところ、キナーゼに関連する細胞表面タンパク質 K は、遠隔転移を伴う膵癌症例で特徴的に過剰発現していたことから、膵癌の進展転移に関わる新規治療標的候補分子であると考えられた。一方、細胞表面タンパク質 K の mRNA 発現は遠隔転移の有無で差がなく、トランスクリプトーム解析では治療標的として見出しえなかったことからサーフェスオーム解析の重要性が示唆された (図 1 右)。

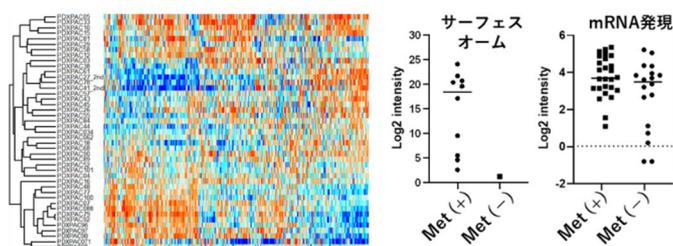


図 1 膵癌 PDX のサーフェスオーム解析

PDX のトランスクリプトームデータについても解析を行った。膵癌細胞株における CRISPR-Cas9 を用いたゲノムワイド機能スクリーニングと統合して、膵癌 PDX 腫瘍で高発現している機能的 lncRNA X を同定した。lncRNA X のノックダウンは、膵癌細胞株においてアポトーシスを促進し、in vivo で腫瘍増殖を抑制したことから、lncRNA X は膵癌の発育進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。現在、lncRNA X の結合分子 F を RNA プルダウンアッセイで同定し、詳細な機能解析を進めている (図 2)。

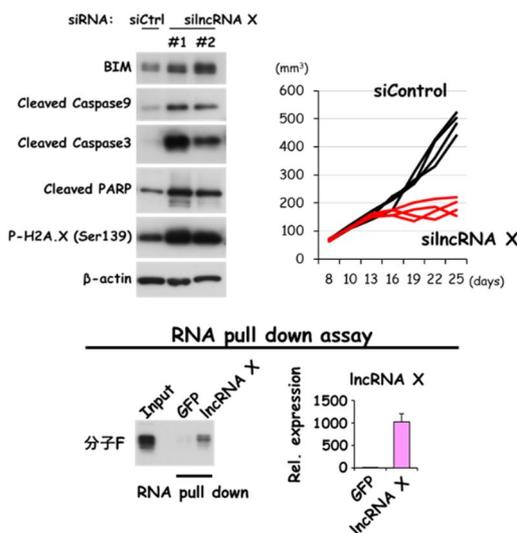


図 2 膵癌細胞における lncRNA X の機能解析

また、PDX 由来膵癌細胞株について、PDX と同様に多層オミクス解析を行った。PDX のサーフェスオームデータと PDX 由来膵癌細胞株における E-cadherin、N-cadherin の発現は非常によく相関した (図 3A)。そこで、20 株の PDX 由来膵癌細胞株と正常膵管上皮細胞株 H6c7 において、サーフェスオーム解析を行ったところ、分子 A が PDX 由来膵癌細胞株で高発現していることを見出した。抗分子 A モノクローナル抗体が内在化することを確認できたこと (図 3B) から、抗分子 A マウスモノクローナル抗体を一次抗体として、二次抗体にペイロードを付加した二次抗体薬物複合体 (Secondary ADC) の効果を検討した。PNU159682 を付加した Secondary ADC においては、PDX 由来膵癌細胞株で細胞死が強く誘導され、分子 A は有望な新規治療標的細胞表面

タンパク質分子であると考えられた (図 3C)。

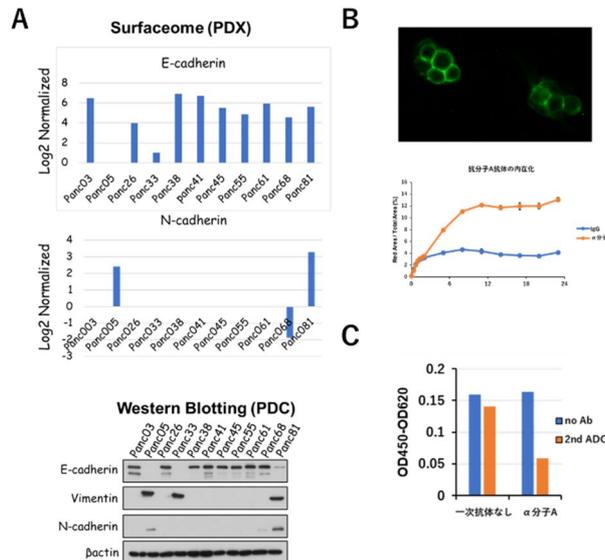


図 3 PDX 由来膵癌細胞株における二次性抗体薬物複合体

さらに、未知の細胞表面タンパク質を同定するべく、PEAKS ソフトウェアを導入し、データベース非依存性の MS/MS スペクトルに基づく de novo シーケンシングを用いたペプチドのアミノ酸配列決定を行った。また、各膵癌症例のゲノム・トランスクリプトームデータから構築した患者固有予測アミノ酸配列データベースに、遺伝子変異公開データベースや lncRNA 由来マイクロペプチドデータベースを統合したプロテオゲノム解析系を構築した。このようなプロテオゲノミクスのアプローチでサーフェスオームデータを解析したところ、lncRNA 由来の新規マイクロペプチドを同定したことから、Parallel Reaction Monitoring (PRM) を用いたターゲットプロテオミクスを立ち上げて定量的測定を行っている。

当研究室では、膵癌だけでなく、大腸癌、肺癌、胃癌、食道癌などにおいて、幅広く PDX モデルの作成と多層オミクス解析を行っている。これら創出した大規模データセットを統合・蓄積して、クラスター分析などのバイオインフォマティクス解析を行うことができる難治がん多層オミクスデータベース (i-MIRAI) の構築を進めている。

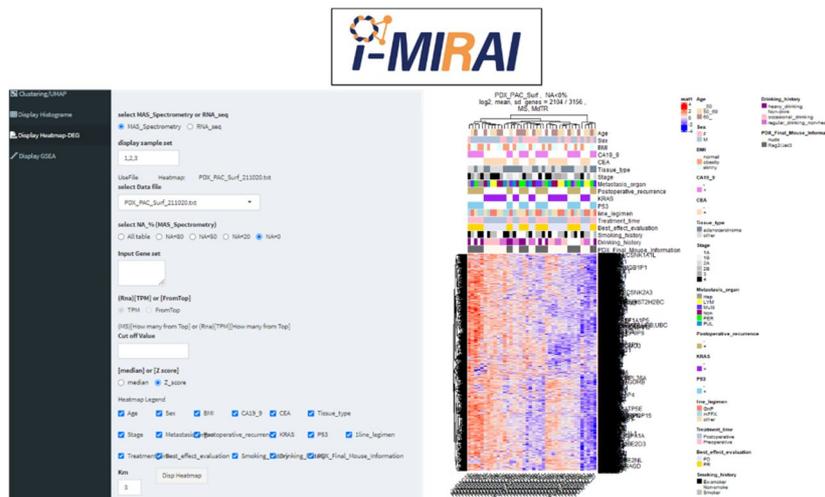


図 4 難治がん多層オミクスデータベース (i-MIRAI) の構築

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuichi Abe, Hisanori Isomura, Zhou Shuang, Taisuke Kajino, Rui Yamaguchi, Waki Hosoda, Kazuo Hara, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 A proteogenomic approach for identification of novel IgG-bound antigens in pancreatic cancer
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 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth proteomics to decipher the complexity of the blood cancer proteome
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 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth Plasma Proteomics for Cancer Biomarker Discovery
3. 学会等名 HUPO 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部雄一, 磯村久徳, 田口 歩
2. 発表標題 免疫グロブリン結合抗原の高深度プロテオーム解析による新規がんバイオマーカー探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶野 泰祐, 水野 和幸, 阿部 雄一, 夏目 誠治, 奥野 正隆, 倉石 康弘, 奥野 のぞみ, 桑原 崇通, 羽場 真, 水野 信匡, 細田 和貴, 清水 泰博, 原 和生, 藤城 光弘, 川嶋 啓揮, 田口 歩
2. 発表標題 lncRNA XXYL1-AS2は膵がんにおいてアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 コホート・生体試料支援プラットフォーム (CoBiA) 若手支援研究成果発表会
4. 発表年 2023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 Ayumu Taguchi
2. 発表標題 In-depth proteomic analysis of cancer models
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶野 泰祐, 阿部 雄一, 細田 和貴, 清水 泰博, 原 和生, 田口 歩
2. 発表標題 Long non-coding RNA XYLT1-AS2 inhibits apoptosis in pancreatic cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
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
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	松下 博和 (Matsushita Hirokazu) (80597782)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫制御TR分野・分野長 (83901)	
研究分担者	原 和生 (Hara Kazuo) (80740258)	愛知県がんセンター(研究所)・がん予防研究分野・研究員 (83901)	
研究分担者	山口 類 (Yamaguchi Rui) (90380675)	愛知県がんセンター(研究所)・システム解析学分野・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
---------	---------