

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07690
研究課題名（和文）がん高精度医療診断技術としてのFFPE検体・逆相リン酸化タンパクアレイ基盤の確立

研究課題名（英文）Development of a diagnostic platform for precision oncology by applying reverse-phase phosphoprotein array to an analysis of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue

研究代表者
増田 万里（MASUDA, MARI）
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：70435717
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、逆相リン酸化タンパクアレイ法によって、一般的に病理診断で用いられるホルマリン固定・パラフィン包埋組織（FFPE）におけるリン酸化たんぱく質の検出法（FFPE-RPPA法）の最適化を進め、今後のがんゲノム高精度医療を補強しうる有用な技術基盤の確立を目指した。最初に、FFPE-RPPA法のアレイ作製法等の最適化による本基盤技術の構築を行い、次に、確立した基盤を用いて、EGF阻害剤感受性及び抵抗性の非小細胞がん細胞で、直接タンパク質の抽出した場合とFFPEブロック作製後にタンパク質を抽出した場合で比較を行った。その結果、阻害剤によるより大きな変動がFFPE-RPPA法で検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々のがん患者に適切な薬剤を見出すがんゲノム医療が一般化しつつあるが、薬剤抵抗性や臨床試験登録の地域格差も含め克服すべき問題は多く存在する。殆どの分子標的治療薬の標的となるキナーゼや下流シグナルのタンパク質の活性化（リン酸化）を、一般的に病理診断材料であるホルマリン固定・パラフィン包埋組織（FFPE）を用いて逆相リン酸化タンパクアレイ（RPPA）法で正確に把握できれば、多剤併用を含む適切な治療戦略の提示や薬剤に対する初回耐性及び治療後の獲得耐性の克服に貢献できることが期待され社会的意義は高い。また得られる知見は今後の薬剤開発への重要な知見となり学術的重要性も高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to optimize the detection of phosphoproteins in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue, which is commonly used for pathological diagnosis, using a reverse-phase phosphoprotein array method. The FFPE-RPPA method is expected to reinforce highly accurate precision cancer medicine in the future. We first improved our original RPPA technology by optimizing the protein concentration and the signal detection method suitable for the FFPE-RPPA method. With this refined FFPE-RPPA platform, we next compared the expression of phosphoproteins in the protein samples extracted from either the cells or the FFPE block of EGFR inhibitor-treated (EGFRi)-sensitive and resistant non-small cell cancer cells. As a result, greater inhibitor-induced signal variation was detected with the optimized FFPE-RPPA method.

研究分野：腫瘍生物学、プロテオミクス

キーワード：RPPA Wnt シグナル シグナル伝達 リン酸化タンパク質 バイオマーカー 治療標的 トランスレ
ショナル・リサーチ プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム医療が2019年に始まり、個々のがん患者に適切な薬剤を見出す医療が開始された。更に、2021年には固形がん組織から血中に漏出する遊離DNA (cfDNA) のがん遺伝子パネル検査が開始され、より低侵襲な検査も可能となってきた。しかしながら、がんゲノム医療で適切な治療が見つかって、その恩恵を受けられるがん患者は全体の10%以下であり、薬剤耐性や未承認薬の臨床試験へ登録できる地域格差など含め克服すべき問題は未だ多く存在する。とりわけ分子標的治療薬に対する初回耐性及び治療後の獲得耐性の克服は直近の重要課題であり、現在のゲノム医療では多くの場合対策が見つかっていない。分子標的治療薬の標的の殆どはシグナル経路上のタンパク質であり、薬剤抵抗性に関与するシグナル経路間クロストークやバイパス経路出現などはタンパク質レベルで生じる。よって、シグナル経路上のリン酸化タンパクのプロファイリングは、今後がんの病態とゲノム医療のギャップを埋めるカギとなることが期待される。逆相タンパクアレイ法 (Reverse-Phase Protein Array; RPPA, 下図) は多数検体における標的タンパク質の発現を high-throughput かつ定量的或は半定量的に検出できる優れたプロテオーム技術である (下図)。研究代表者は、2009年に日本国内で初めて独自のアレイ作製及びシグナル検出技術を開発し、ウエスタン法に要する 1/10,000 以下の微量な試料 (10ng/sample/array) でリン酸化タンパクを正確かつ high-throughput に解析できる RPPA 基盤 (細胞及び凍結組織) を確立している。組織検体を用いた RPPA 法は、基礎研究における治療標的の同定やコンパニオンマーカートの開発、獲得耐性の機序解明等が期待され、今後のがん医療を支える有用な技術基盤となる可能性が高い。更に 一般病理診断に使用されるホルマリン固定・パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 組織を用いた RPPA 解析が可能 になれば、広く診断に使用されている免疫組織染色法に比較し少量の検体 (例えば穿刺吸引細胞診や針生検など) で多くの種類のタンパクの発現状態が把握できるため、より正確な診断へと繋がる可能性が高い。

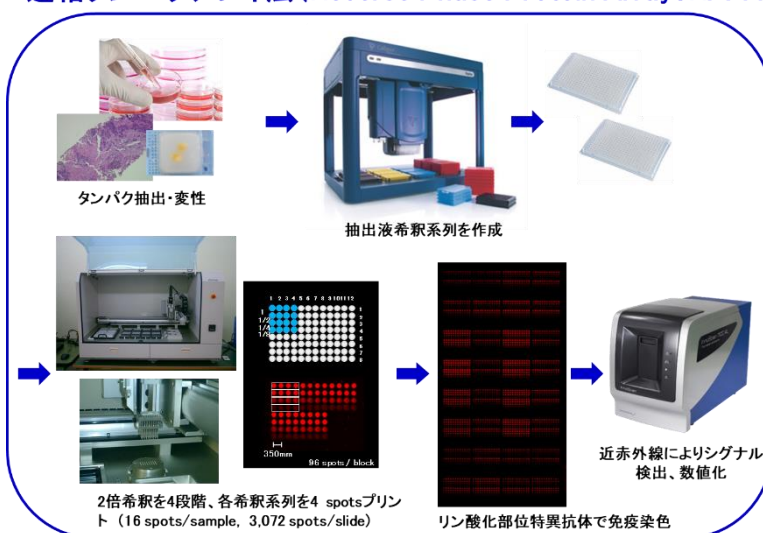
一方、米国では、乳がんの臨床試験 I-SPY1, I-SPY2, SideOut 等のアンブレラ試験への RPPA 技術基盤の組み込みが既に始まっており、病理、ゲノミクス、トランスクリプトミクスのデータと統合しプロテオーム解析ならでの強みを証明している。FFPE 組織検体を用いた RPPA 法の臨床応用は、今後のがんゲノム高精度医療を補強する有用な技術基盤となる可能性が高く、日本国内においても早急な開発が必須であると考え本研究開発の提案に至った。

2. 研究の目的

がんゲノム高精度医療の改善に向けて、多くの分子標的治療薬の標的となるタンパク及び下流のタンパクの活性化を逆相リン酸化タンパクアレイ (RPPA) 法により把握できれば、分子標的治療薬による適切な治療戦略の提示や治療後の獲得耐性の克服が可能となることが期待される。

本研究では、一般的に病理診断で用いられるホルマリン固定・パラフィン包埋組織 (FFPE) を用いた逆相リン酸化タンパクアレイ (FFPE-RPPA) 法の 技術開発を第一目的とした。更に、本研究により確立される基盤を用いて、研究代表者が先行研究で見出した中皮腫に対する EGFR 阻害剤のコンパニオンマーカー候補の検証を FFPE-RPPA 法を用いて行うことを当初第二の目的としていた。

逆相タンパクアレイ法 (Reverse Phase Protein Array: RPPA)



3. 研究の方法

(1) FFPE-RPPA の最適化

FFPE-RPPA 法の最適化で

は、1) FFPE検体からのタンパク質の抽出法、2) RPPA作製法、3) 適切なloading コントロールおよびリン酸化タンパク質コントロールの検討、及び4) リン酸化タンパク質のシグナル増幅法の検討を行った。更に、最適化したFFPE-RPPA法によって、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) チロシンリン酸化酵素阻害薬 (TKI) エルロチニブに対する感受性の異なる2つの非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株 (PC9及びH1975細胞株) を用いて、EGFR-TKI 処理による両細胞でのリン酸化タンパク質の発現プロファイルについて比較検討を行った。PC9はEGFRのexon19に決失変異を有しエルロチニブに対し高い感受性を示すが、H1975細胞はEGFR

にT790M変異を有するためエルロチニブに対して抵抗性を示すことが知られている。本最適化に使用した細胞は、同条件下で培養した細胞の半量を液体窒素により直ちに凍結後-80C保存し（凍結組織-PRRA用）、もう一方の半量でホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックを作製（FFPE-RPPA用）し、同時にタンパク抽出を行った。

(2)凍結試料-RPPA と FFPE-RPPA の比較

これまで研究代表者らは、リン酸化たんぱく質の定量値は、それぞれのアレイスポットのシグナル値を loading control (γ Tubulin や Actin 等) のシグナル値で補正し算出してきた。本研究期間中に、米国 MD Anderson Cancer Center で開発された RPPA の定量化プログラム SuperCurve を我々の基盤に合わせ調整し導入した。SuperCurve は 1 アレイごとの全データからシグモイド近似曲線を描き、各データを曲線にあてはめ、相対定量値を求める定量化プログラムである。上記の研究で得られた結果をこれまでの定量化の方法と SuperCurve による方法 2 つで解析を行い、両方法で得られた結果を比較した。

4. 研究成果

本研究課題では、一般的に病理診断で用いられるホルマリン固定・パラフィン包埋組織（FFPE）を用いた逆相リン酸化タンパクアレイ（FFPE-RPPA）法の技術開発及び改善を進め、今後のがんゲノム高精度医療を補強できる有用な技術基盤の確立を目指した。研究初年度(2020)と次年度(2021)は、FFPE-RPPA 法の最適化と本基盤技術の構築を行った。最終年度(2022)は、本基盤を用いて、EGF 阻害剤感受性 (PC9) 及び抵抗性 (H1975) の非小細胞がん細胞で、エルロチニブ処理後のシグナル変動を凍結細胞より抽出したタンパク質と FFPE ブロック作製後タンパク質で比較を行った。その結果両者に同様の傾向が認められたが、感受性細胞では薬剤による EGFR 及び下流 MAPK シグナルの活性阻害は、FFPE-RPPA 法で得られたタンパク質で、より明確なシグナル変動が検出された（図 1）。この結果はホルマリンによりリン酸基が迅速に固定化されたためと推測され、組織抽出からホルマリン固定開始までの時間重要性が示唆された。一方、FFPE ブロック作製後の保存法や適正な保存期間についても SOP が作成できた。定量解析法については Supercurve による解析法と従来法によって得られる結果に大きな差は認められなかった。よって、Supercurve の導入により解析時間の短縮が可能となった。

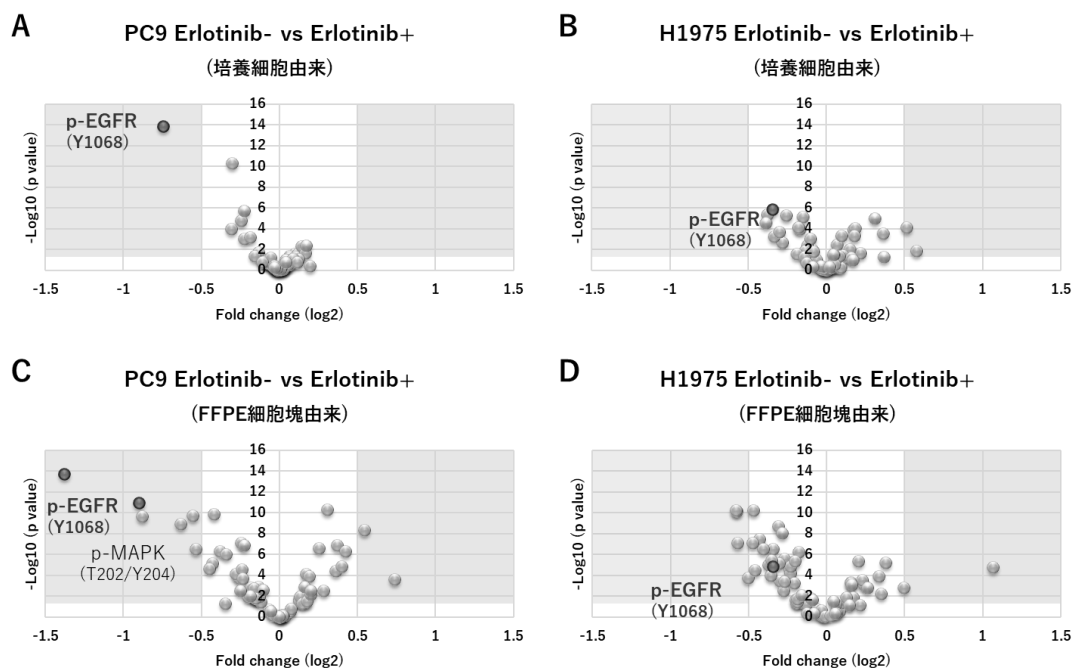


図 1. 培養細胞（凍結試料）抽出タンパク質と FFPE 細胞塊由来タンパク質のシグナルプロファイルの比較

(A)PC9 細胞由来タンパク質 (B)H1975 細胞由来タンパク質

(C)PC9 FFPE 細胞塊由来タンパク質 (D)H1975 FFPE 細胞塊由来タンパク質

p 値 ≤ 0.05 かつ log FC ≤ -0.5 (左上) は有意な減少、p 値 ≤ 0.05 かつ log FC ≥ 0.5 (右上) は有意な増加

なお、本研究は、以下の 2 つの理由により当初の研究計画を変更した。本来、FFPE-RPPA 法が確立した 2021 後半から 2022 年度初めに、上記細胞実験はゼノグラフト (CDX) より抽出した腫瘍組織で行う予定であったが、コロナ渦により実験動物の納期が遅延し、細胞を用いた検証に切り替えた。加えて、予定していた学会がキャンセルとなり、参加費用・旅費の必要性が無くなったため、その費用で、逆相タンパクアレイのデータを効率的に解析できるソフトウェアを開発し

た。SuperCurve による解析は当初 R や Perl を用いて手動で行っていたが、解析手法の習得にはある程度の時間を要するため、ソフトウェアの開発を行った。加えて、当初協力の承諾を得ていた病理医の移動によって、中皮腫における FGFR 阻害剤の効果予測マーカーの検証については、改め現在研究計画を作成中で、今後の研究課題として進めていくこととなった。

一方、当初の計画の第一目標であった FFPE-RPPA 法の確立については、FFPE からのタンパク質抽出法、アレイの作製法、適切なコントロールの選択、シグナル検出法の最適化は予定通りに進行し、標準作業手順書 (SOP) の作成も終了した。本研究期間中に、国立がん研究センター・基盤的臨床開発研究コアセンターにおいて共同研究による RPPA 受託解析も増え、様々な RPPA 解析結果が集積している。データの集積によって正確性や再現性の検証もすすんでおり、米国で実施されているような臨床試験に組み込める基盤として FFPE-RPPA 法の有用性を示せるように更なる改善を進めていきたい。一方、タンパク抽出法については、標的とするタンパク質や実験の目的 (例えば、核タンパクを中心に解析などの場合を想定) によって組織溶解バッファーの変更が必要であるという予備結果が得られたため、それぞれについて最適化及び SOP の作成が現在進行中である。クロマチン構造の変化は転写を制御していることが知られているが、現在、ヒストンや修飾ヒストンを含むクロマチンタンパク質を網羅的にプロファイルする方法は意外にも普及していない。前述の MD Anderson Cancer Center の Kornblau らの研究チームは RPPA により急性骨髄性白血病の予後予測マーカー候補を見出しており、現在、我々もクロマチンタンパク質を網羅的に解析できる RPPA 基盤の確立も進めている。本技術が確立できれば、今後、エピドラルクのスクリーニングやバイオマーカーの探索・検証に応用可能な技術基盤になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki H, Mitsunaga S, Ikeda M, Aoyama T, Yoshizawa K, Yoshimatsu H, Kawai N, Masuda M, Miura T, Ochiai A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical and Tumor Characteristics of Patients with High Serum Levels of Growth Differentiation Factor 15 in Advanced Pancreatic Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13194842	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 Fujisawa R, Iwaya T, Endo F, Idogawa M, Sasaki N, Hiraki H, Tange S, Hirano T, Koizumi Y, Abe M, Takahashi T, Yaegashi M, Akiyama Y, Masuda M, Sasaki A, Takahashi F, Sasaki Y, Tokino T, Nishizuka S.	4. 巻 42
2. 論文標題 Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1239, 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab088	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 Hirozane Toru, Masuda Mari, Sugano Teppei, Sekita Tetsuya, Goto Naoko, Aoyama Toru, Sakagami Takato, Uno Yuko, Moriyama Hideki, Sawa Masaaki, Asano Naofumi, Nakamura Masaya, Matsumoto Morio, Nakayama Robert, Kondo Tadashi, Kawai Akira, Kobayashi Eisuke, Yamada Tesshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Direct conversion of osteosarcoma to adipocytes by targeting TNIK	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e137245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.137245	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 Sugano Teppei, Masuda Mari, Takeshita Fumitaka, Motoi Noriko, Hirozane Toru, Goto Naoko, Kashimoto Shigeki, Uno Yuko, Moriyama Hideki, Sawa Masaaki, Nagakawa Yuichi, Tsuchida Akihiko, Seike Masahiro, Gemma Akihiko, Yamada Tesshi	4. 巻 124
2. 論文標題 Pharmacological blockage of transforming growth factor- signalling by a Traf2- and Nck-interacting kinase inhibitor, NCB-0846	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 228 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01162-3	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 Uchihara T, Miyake K, Yonemura A, Komohara Y, Itoyama Ri, Koiwa M, Yasuda T, Arima K, Harada K, Eto K, Hayashi H, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Yi, Yoshida N, Yashiro M, Masuda Mari, Ajani Jaffer A., Tan Patrick, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing α 1 Integrin, Enhancing Drug Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3222 ~ 3235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3803	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 Sekita Tetsuya, Yamada Tesshi, Kobayashi Eisuke, Yoshida Akihiko, Hirozane Toru, Kawai Akira, Uno Yuko, Moriyama Hideki, Sawa Masaaki, Nagakawa Yuichi, Tsuchida Akihiko, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Nakayama Robert, Masuda Mari	4. 巻 12
2. 論文標題 Feasibility of Targeting Traf2-and-Nck-Interacting Kinase in Synovial Sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1258 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051258	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 Miyana Akihiko, Masuda Mari, Motoi Noriko, Tsuta Koji, Nakamura Yuka, Nishijima Nobuhiko, Watanabe Shun-ichi, Asamura Hisao, Tsuchida Akihiko, Seike Masahiro, Gemma Akihiko, Yamada Tesshi	4. 巻 145
2. 論文標題 Whole-exome and RNA sequencing of pulmonary carcinoid reveals chromosomal rearrangements associated with recurrence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 85 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2020.03.027	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 Sugano Teppei, Yoshida Masayuki, Masuda Mari, Ono Makiko, Tamura Kenji, Kinoshita Takayuki, Tsuda Hitoshi, Honda Kazufumi, Gemma Akihiko, Yamada Tesshi	4. 巻 122
2. 論文標題 Prognostic impact of ACTN4 gene copy number alteration in hormone receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1811 ~ 1817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0821-y	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 Akiyama T, Yasuda T, Uchihara T, Yasuda-Yoshihara N, Tan B, Yonemura A, Semba T, Yamasaki J, Komohara Y, Ohnishi K, Wei F, Fu L, Zhang J, Kitamura F, Yamashita K, Eto K, Iwagami S, Tsukamoto H, Umemoto T, Masuda M, Nagano O, Satou Y, Saya H, Tan P, Baba H, and Ishimoto T.	4. 巻 83(5)
2. 論文標題 Stromal Reprogramming through Dual PDGFR / Blockade Boosts the Efficacy of Anti-PD-1 Immunotherapy in Fibrotic Tumors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 753-770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-22-1890	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 増田万里	4. 巻 66(1)
2. 論文標題 逆相タンパクアレイ基盤のがん高精度医療への応用の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 31-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.66.31	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7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中川莉杏、増田万里
2. 発表標題 がん医療へ応用可能な逆相タンパクアレイ (Reverse-phase protein array; RPPA) 技術基盤の最適化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川莉杏、増田万里
2. 発表標題 逆相タンパクアレイ (Reverse-Phase Protein Array; RPPA) 技術基盤の最適化
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 増田万里
2. 発表標題 逆相タンパクアレイ基盤のがん高精度医療への応用
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Masuda
2. 発表標題 Utility of Reverse-Phase Protein Array for Refining Precision Oncology
3. 学会等名 Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB) International Conference 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toru Aoyama, Noriko Motoi, Naoko Goto, Riko Nakagaw, Masahiro Seike, Mari Masuda
2. 発表標題 Identification of therapeutic target and potential companion marker for molecular-targeted therapy of malignant pleural mesothelioma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田万里
2. 発表標題 逆相タンパクアレイ基盤のがん高精度医療への応用
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田万里、中川莉杏、近藤格
2. 発表標題 がん高精度医療の更なる改善に向けた逆相タンパクアレイ技術基盤の有用性
3. 学会等名 第72回日本プロテオーム学会2022年大会・JHUP O第20回大会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>患者個人に合わせた超高感度血液検査で食道がん再発を早期に検出する方法を開発（プレスリリース；PR） https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2020/1012/index.html 骨肉腫を脂肪細胞へ変化させることに成功、TNIK阻害薬活用による新規治療法開発への期待（PR） https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2021/0205/index.html</p>

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