

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08743
研究課題名（和文）プロテオゲノミクス解析と患者由来モデルを用いた腹膜偽粘液腫の新しい治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for pseudomyxoma peritoneum using proteogenomic analysis and patient-derived models

研究代表者
野口 玲（Noguchi, Rei）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30779682
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）：腹膜偽粘液腫(PMP)は粘液を産生する腫瘍細胞が腹腔に播種することで症状を呈する希少がんである。原発巣の切除、粘液の除去、腹腔内の灌流化学療法を組み合わせた複合治療が主流で、生命予後は改善された。しかし、術後再発や高率の合併症を発生し、新たな治療法開発が求められている。研究の目的は、PMPの治療法の開発に向けて、抗がん剤および治療標的を見つけることである。本研究では、申請者が樹立したPMPの患者由来細胞株を用いて、薬剤スクリーニングを行い、有効な抗がん剤を同定した。またPMPの大規模検体を用いてのプロテオゲノミクス解析のために、ホルマリン固定標本からのタンパク質抽出法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、腹膜偽粘液腫の患者由来細胞株を用いて、薬剤スクリーニングを行い、未だかつてない規模での薬剤の奏効性を調べることができた。また今までに取得した全ゲノムデータやRNA-Seqのデータから推測された治療標的から推測した薬剤と薬剤スクリーニングで実際奏効する薬剤の両方を検討することができた。これにより、患者由来モデルを用いての機能的アプローチと分子背景からの治療標的の同定の理論的アプローチの両方が重要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Pseudomyxoma peritoneum (PMP) is a rare cancer that manifests as symptoms caused by the dissemination of mucus-producing tumor cells into the peritoneal cavity. The mainstream treatment is a combination of excision of the primary tumor, removal of mucus, and intraperitoneal perfusion chemotherapy, which has improved the prognosis. However, postoperative recurrence and complications occur at a high rate, and the development of new treatment methods is required. The goal of the research is to find anticancer drugs and therapeutic targets for the development of treatments for PMP. In this study, we conducted drug screening using a PMP patient-derived cell line established by the applicant and identified effective anticancer drugs. We also established a protein extraction method from formalin-fixed specimens for proteogenomic analysis using large-scale specimens of PMP.

研究分野：Rare cancer

キーワード：pseudomyxoma peritonei patient-derived model proteogenomics

1. 研究開始当初の背景

腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP) は、大量に粘液を産生する腫瘍細胞が腹腔内に播種し様々な症状を呈する。原発巣の切除と粘液の除去およびマイトマイシン C の腹腔内灌流化学療法が標準的な治療である。しかし、腫瘍の完全切除は困難で、約 40% が術後再発を繰り返す。治療による合併症が 30% の症例で発生する。PMP は年間 100 万人あたり 1-2 人の割合で発症するきわめて希少な悪性腫瘍であり、PMP を研究する研究者はきわめて限られており、細胞株や実験動物などの患者由来がんモデルがないことから前臨床試験の施行が難しく、治療法の開発が遅れている。そこで、本研究課題の核心をなす問いとして、(1) PMP の治療標的となる遺伝子やタンパク質は存在するのか、(2) 「PMP に適応拡大可能な抗がん剤は存在するのか？」の 2 点について挑戦することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、希少で難治な腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP) の治療法の開発に向けて、病態の分子生物学的背景の理解に基づき、有効な抗がん剤および治療標的を見つけることである。本研究では、[1] PMP の腫瘍組織を用いてプロテオミクス解析を行い、治療標的を同定する。[2] 患者由来 PMP 細胞株を用いて抗がん剤スクリーニングを行い、有効な抗がん剤を同定する。[3] PMP が産生する粘液 (ムチン) の特性を分子マトリックス電気泳動及び糖鎖修飾解析で明らかにし、粘液を減量・除去する方法に資する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) PMP の治療標的となる遺伝子やタンパク質は存在するのか？

取得済みの全ゲノム配列のデータと合わせて、治療標的になりうる遺伝子変異および分子パスウェイの異常を同定する。同定した遺伝子変異および分子パスウェイの異常が治療標的になりうるかどうかを、細胞株と PDX を用いて検証する。

(2) PMP に適応拡大可能な抗がん剤の同定と薬効の分子背景の理解

PMP に適応拡大可能な抗がん剤の同定のために、我々が樹立した患者由来 PMP 細胞株と既存抗がん剤のライブラリー 300 剤を用いた抗がん剤スクリーニングを行い、抗腫瘍効果を示す抗がん剤を同定する。並行して patient-derived xenograft (PDX) の樹立を試み、抗腫瘍効果を検証する。

4. 研究成果

(1) について、我々は腹膜偽粘液腫 (PMP) の病態メカニズム解明が治療開発につながると考え、PMP のターゲットシークエンスを 18 症例の PMP で行い、KRAS・GNAS・TP53 の遺伝子変異を同定したが、治療標的になりうる遺伝子変異は同定できなかった。続いて、腫瘍組織と正常組織のペアである PMP10 症例を対象として、凍結組織を用いた全ゲノムシークエンスを行い、治療標的である PI3K-AKT pathway の異常、EGFR・MET コピー数増幅を同定した。また同サンプルの RNA-Seq データを Connectivity Map (CMap, <https://www.broadinstitute.org/connectivity-map-cmap>) で解析したところ、MAP kinase inhibitor と MEK inhibitor が有意な薬剤として同定された。サンプル数を多く、解析するには PMP の希少性から凍結組織を収集する難しさを実感した。そのため、サンプルの対象を凍結組織ではなく、ホルマリン固定標本を用いて研究を行うということへシフトした。そのため、30 年前に保存したホルマリン固定標本からタンパク質を抽出し、質量分析を行い、腫瘍特異的な発現変動タンパク質を同定するというワークフローを考えた。ホルマリン固定標本は凍結組織と異なり、脱クロスリンクを行う作業が必要となり、高圧や高温や溶解バッファーなどの工夫を行い、古いホルマリン固定標本でもタンパク質を抽出することが可能になった。本技術を用いて、多くの施設での貯蔵してあるホルマリン固定標本を用いて、多検体でのプロテオーム解析を行う基盤を構築することができた。

(2) について、申請者が世界に先駆けて樹立した患者由来腹膜偽粘液腫細胞株 (NCC-PMP1-C1, NCC-PMP2-C1) を用いて、214 剤の抗がん剤スクリーニングを行った。結果として、NCC-PMP1-C1 において daunorubicin, homoharringtonine, mitomycin C, ponatinib (PMID: 35207746) NCC-PMP2-C1 においてプロテアソーム阻害薬の bortezomib, HER2 阻害薬の mubritinib, HDAC 阻害薬の romidepsin (PMID: 37763192) が同定された。2 細胞株に共通した薬剤は同定されなかった。また RNA-Seq において予測された MEK inhibitor や MAP inhibitor についても、抗がん剤スクリーニングでは奏効薬剤として同定されなかった。そのため、細胞株に直接薬剤をかけてみる機能的アプローチと分子背景から治療標的を同定し、薬剤を推定する理論的アプローチでは乖離

があった。今後はゲノム・トランスクリプトームに加えて、キナーゼ活性やプロテオームを組み合わせて、治療標的でかつ奏効する薬剤をどのようにして見つけるかが課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Noguchi Rei, Yoshimatsu Yuki, Sin Yooksil, Ono Takuya, Tsuchiya Ryuto, Yoshida Hiroshi, Kiyono Tohru, Yonemura Yutaka, Kondo Tadashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment and Characterization of NCC-PMP1-C1: A Novel Patient-Derived Cell Line of Metastatic Pseudomyxoma Peritonei	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 258 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm12020258	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 Noguchi Rei, Yoshimatsu Yuki, Sin Yooksil, Ono Takuya, Tsuchiya Ryuto, Yoshida Hiroshi, Kiyono Tohru, Yonemura Yutaka, Kondo Tadashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Correction: Noguchi et al. Establishment and Characterization of NCC-PMP1-C1: A Novel Patient-Derived Cell Line of Metastatic Pseudomyxoma Peritonei. J. Pers. Med. 2022, 12, 258	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13091383	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 Noguchi Rei, Yoshimatsu Yuki, Sin Yooksil, Ono Takuya, Tsuchiya Ryuto, Yoshida Hiroshi, Kiyono Tohru, Yonemura Yutaka, Kondo Tadashi	4. 巻 37
2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-PMP2-C1: a novel patient-derived cell line of pseudomyxoma peritonei with signet ring cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 511 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-023-01015-0	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口玲、吉松有紀、申育實、大崎珠理亜、秋山太郎、安達雄輝、小野拓、 町田香織、柳原五吉、吉田裕、清野透、米村豊、近藤格
2. 発表標題 超希少がん、腹膜偽粘液腫の治療開発：患者由来細胞株の樹立と抗がん剤の同定
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口玲
2. 発表標題 腹膜偽粘液腫の基礎研究
3. 学会等名 第9階腹膜偽粘液腫患者の支援の会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口玲
2. 発表標題 私と基礎研究 隣の芝生へ飛び込め！
3. 学会等名 武蔵野大学 薬学部（招待講演）
4. 発表年 2021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	小迫 英尊 (Kosako Hidetaka) (10291171)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授 (16101)	
研究分担者	近藤 格 (Kondo Tadashi) (30284061)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長 (82606)	
研究分担者	亀山 昭彦 (Kameyama Akihiko) (80415661)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員 (82626)	

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