

令和 6 年 6 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08765

研究課題名(和文) 胃癌PDXモデルの多層プロテオーム解析による革新的分子治療標的の同定

研究課題名(英文) Integrative proteomic analysis of PDX models to develop targeted therapies in gastric cancer

研究代表者

伊藤 友一 (Yuichi, Ito)

愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR分野・研究員

研究者番号：80397463

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)：早期胃癌の多くは根治が期待できるのに対し、予後不良な進行胃癌に対する有効な化学療法は限られており、革新的なアプローチによる新規治療法の開発が急務である。本研究では、胃癌の患者腫瘍組織移植(PDX)モデルを作成し、サーフェスオーム解析とリン酸化タンパク質解析による活性化シグナル経路同定を中心とした網羅的多層プロテオーム解析を行う。またHLAリガンドーム解析を行い個別化がんワクチン療法への応用が可能な高免疫原性HLAクラスI結合ペプチドを同定する。これにより、胃癌の分子背景の解明と革新的細胞表面分子治療標的群の同定から、進行胃癌の克服を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、胃癌PDXにおける細胞表面タンパク質の発現プロファイルから機能的サーフェスオームデータ基盤を構築し、その分子生物学的理解を深めることで、既存研究では俯瞰しえなかった革新的細胞表面タンパク質治療標的群を大規模に開拓できる。腫瘍特異性が高い細胞表面分子が同定されれば、抗体薬物複合体や癌抗原ワクチン、CAR-T療法など、免疫療法の革新につながることを期待される。また、胃癌特異的に発現する分子は、治療標的としてだけでなく、診断、再発・治療効果予測に有用な組織・血液バイオマーカーとしての展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：While most early-stage gastric cancers can be cured by surgery, effective chemotherapy for advanced gastric cancer is limited and there is an urgent need to develop innovative therapies. In this study, we will develop patient-derived xenograft (PDX) models of gastric cancer and a comprehensive multi-omics analysis of PDX tumors will be performed, including cell surfaceome and phosphoproteome analysis that focus on the identification of activated signalling pathways. In addition, HLA ligandome analysis will be performed to identify highly immunogenic HLA class I peptides that can be used for personalized cancer vaccine therapy. The aim is to overcome advanced gastric cancer by elucidating the molecular background of gastric cancer and identifying a set of cell surface molecules as innovative therapeutic targets.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 PDXモデル 患者由来細胞 プロテオミクス 細胞表面タンパク質 HLAクラスI結合ペプチド 腫瘍浸潤リンパ球 個別化がんワクチン

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

我が国において、胃癌の年齢調整罹患率、死亡率はともに減少傾向にあるものの、2020年の罹患患者数予測は大腸癌に次ぐ2位(約135,000人)、死亡数予測は肺癌、大腸癌に次いで3位(約44,000人)と依然として多い。Stage 胃癌の5年生存率は95%を超え、根治がほぼ期待できる一方で、遠隔転移を有するStage 胃癌の5年生存率は約7%と極めて予後が悪く、胃癌の生存率向上のためには、術後の再発予防や切除不能進行胃癌の治療を目的とした化学療法の重要性が非常に高いと考えられる。現在、胃癌の化学療法としては、シスプラチンあるいはオキサリプラチンに、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤またはカペシタピンを組み合わせたレジメンが一次化学療法として用いられる。胃癌の約20%を占めるHER2過剰発現胃癌症例に対しては、分子標的治療としてさらにトラスツマブを加えたレジメンが用いられる。二次治療ではパクリタキセルとVEGFR2を分子標的とするラムシルマブ、三次治療ではイリノテカンや免疫チェックポイント阻害剤であるニボルマブが用いられるが、Stage 胃癌の生存期間中央値は1年前後であり、分子生物学的な知見に基づく新たな胃癌治療法の開発は、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解析手法の進歩によって、胃癌のゲノム情報は集積しつつある。免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待できる高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-high)を約20%に認める一方で、TP53(30-50%)、ARID1A(約15%)、CDH1(約10%)、RHOA(約10%)など、胃癌に頻度の多い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おらず、革新的なアプローチによって、胃癌の克服に取り組む必要がある。

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、外科手術で採取された腫瘍組織から胃癌PDXモデルを作成すること、細胞表面タンパク質(サーフェスオーム)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胃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すること、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胃癌の克服を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

愛知県がんセンター病院において、外科手術で得られた腫瘍組織を、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解析はビオチンを用いて標識、単離する(図1)。

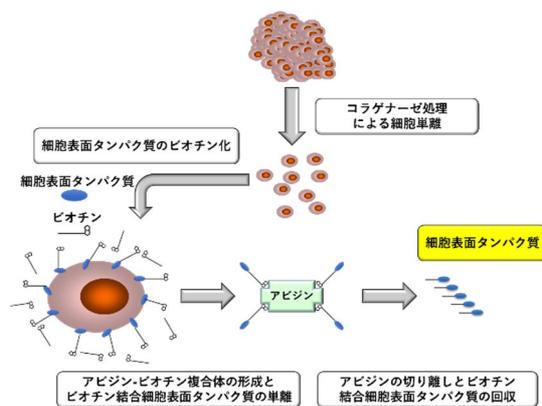


図1 細胞表面タンパク質の単離

PDX腫瘍のサーフェスオームは、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胃癌特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

また、PDX腫瘍の一部を用いて、抗HLAクラスI抗体による免疫沈降を行い、質量分析によって8-11アミノ酸長のHLAクラスI結合ペプチドを同定する(HLA-Iリガンドーム)。本研究では、遺伝子変異配列を含むネオアンチゲンやlncRNAがコードするマイクロペプチドなど、未知のアミノ酸配列を持つペプチドを同定するために、プロテオゲノミクスによって各症例のゲノム・トランスクリプトーム情報から構築した症例固有の予測アミノ酸配列データベースに基づく解析と、データベース非依存性のMS/MSスペクトルに基づくde novoシーケンシングの2つ

の方法を用いてアミノ酸配列を決定する。各症例の HLA タイプに基づき、NetMHCpan を用いた HLA アリルへの各ペプチドの結合親和性を解析し、免疫原性の高い HLA クラス I 結合ペプチドを同定する。

4. 研究成果

胃癌 58 症例を Rag-2/Jak3 二重欠損マウスに移植し、18 症例 (31.0%) で生着した。生着率は既報 (15~40%) に比較して同等であった。生着した PDX の内訳は、分化型 3 例、未分化型 15 例、早期癌 8 例、進行癌 10 例であった (表 1)。

| ID | 性別 | 年齢 | 組織型 | pStage |
|-----|----|----|--------|--------|
| 055 | M | 71 | 中分化型腺癌 | IIB |
| 058 | M | 79 | 低分化型腺癌 | IIIA |
| 060 | M | 70 | 低分化型腺癌 | IA |
| 077 | M | 73 | 低分化型腺癌 | IV |
| 078 | M | 78 | 中分化型腺癌 | IIB |
| 083 | F | 81 | 低分化型腺癌 | IIIA |
| 088 | F | 64 | 低分化型腺癌 | IIIA |
| 104 | F | 78 | 低分化型腺癌 | IV |
| 111 | M | 73 | 高分化型腺癌 | IIIB |
| 114 | M | 81 | 高分化型腺癌 | IB |
| 118 | M | 83 | - | IV |
| 122 | F | 69 | 中分化型腺癌 | IIIA |
| 127 | M | 74 | 印環細胞癌 | IIIA |
| 137 | M | 75 | 乳頭状腺癌 | IA |
| 141 | M | 77 | 低分化型腺癌 | IIIC |
| 142 | M | 47 | 中分化型腺癌 | IIB |
| 161 | F | 40 | 中分化型腺癌 | IIA |
| 172 | M | 77 | 低分化型腺癌 | IIA |

表 1 胃癌 PDX 作成症例

また、HER2 陰性例を 3 例含んでいた。PDX が作成できた 18 症例のうち、6 例で PDX 由来細胞株を樹立でき、11 例で腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の単離培養が可能であった。

多層オミクス解析については、エクソーム解析、トランスクリプトーム解析が完了し、プロテオーム解析を進めている。中でも、液体クロマトグラフィーと気相分離システムを組み合わせることで、網羅的かつ高感度な HLA-I リガンドームデータ取得が可能な質量分析システムを構築した。これにより、既存法で 3,000 個程度であった HLA-I リガンドの同定数を、世界トップレベルと比肩しうる、検体当たり 15,000~20,000 個にまで増加させることに成功した。同定されたペプチドのうち、40~70% が HLA クラス I 分子への結合親和性スコア上位 1% 未満であったことから、極めて高い効率で HLA クラス I 結合ペプチドが HLA-I リガンドームデータに濃縮できていることが確認された。次に、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法を導入した。これにより、既知のデータベースには存在しない、未知のペプチドを検体あたり約 4,000~10,000 個同定できた。驚くべきことに、これら未知のペプチドのうち、20~30% が HLA クラス I 複合体への結合親和性スコア上位 1% 未満を示しており、de novo ペプチドシーケンスデータから、未知のがん特異的抗原が大規模に同定可能であることが示唆された (図 2)。

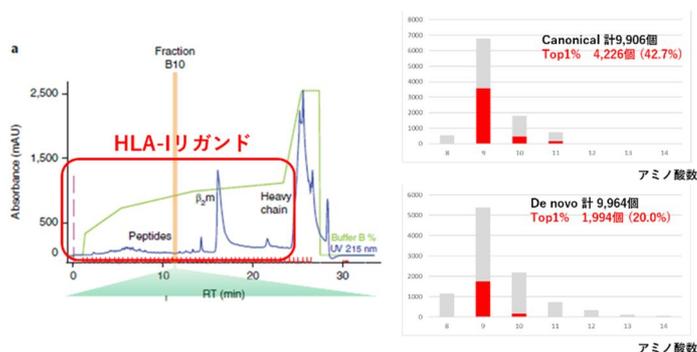


図 2 HLA-I リガンドーム解析

さらに、各がん症例のゲノム・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。2023 年 2 月に導入が完了し、現在解析を進めているが、各検体において 2~6 個の lncRNA 由来マイクロペプチドが、HLA クラス I 分子と極めて高い結合親和性を示しており、新規がん抗原候補として期待される。現在、腫瘍浸潤 CD8 + T 細胞のシングルセル解析(遺伝子発現解析(scRNA-seq)、TCR 解析(TCR-seq))を進めている。scRNA データから同定された腫瘍浸潤 CD8+T 細胞内の Tex (exhausted T cells)クラスターにおいて頻度の高い TCR 種を選択し、TCR 遺伝子導入 Jurkat 細胞を用いてがん抗原ペプチド候補との反応性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 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, Yuichi Abe, Taisuke Kajino, Hisanori Isomura |
| 2. 発表標題 In-depth proteomic analysis of cancer models |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 治樹, 阿部雄一, 梶野泰祐, 夏目誠治, 木下敬史, 大内 晶, 水野和幸, 三宅 亨, 飯田洋也, 細田和貴, 小森康司, 清水泰博, 谷 眞至, 田口 歩 |
| 2. 発表標題 Physician scientistを志して ~新しい外科の地平線を切り拓くために~ |
| 3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2022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 |

〔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 | 田口 歩 (Ayumu Taguchi) (50817567) | 愛知県がんセンター(研究所)・分子診断TR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 |
|---------|---------|
|---------|---------|