

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08899

研究課題名(和文) 多層プロテオーム解析による新規肺非腺癌治療法の開発

研究課題名(英文) In depth proteomics to develop novel therapies in non-adenocarcinoma lung cancer

研究代表者

川口 晃司 (Kawaguchi, Koji)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10402611

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)：国際共同研究として、肺腺癌と肺非腺癌の血漿miRNAプロファイルについてmiRNAマイクロアレイを用いて比較し、血漿miRNAシグネチャが早期肺腺癌の再発・予後予測バイオマーカーとして有用であることを明らかにした。本知見についてAACR Annual Meeting 2023において学会報告を行った(発表演者)。またInternational Journal of Molecular Sciences誌に投稿をし、受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌の新規治療薬が年々開発されている中で、小細胞癌、大細胞癌や扁平上皮癌など非腺癌の5年生存率は45-60%と、腺癌と比較して未だに予後不良である。本研究では、肺非腺癌の腫瘍組織から、患者腫瘍組織移植(Patient-derived xenograft; PDX)モデルを作成し、エクソーム解析とトランスクリプトーム解析に加えて、サーフェスオーム解析とリン酸化プロテオーム解析を行った。またPDX作成とともに、肺非腺癌由来PDX腫瘍と比較対照となる肺腺癌由来PDX腫瘍のオミクス解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：In an international collaborative study, plasma miRNA profiles of lung adenocarcinoma and lung non-adenocarcinoma were compared using miRNA microarrays, and plasma miRNA signatures were found to be useful as predictive biomarkers for recurrence and prognosis in early stage lung adenocarcinoma. This finding was reported at the AACR Annual Meeting 2023 (presenting author). The manuscript was accepted for publication in the International Journal of Molecular Sciences.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：肺癌

キーワード：肺非腺癌 多層オミクス解析 サーフェスオーム解析 患者腫瘍組織移植(PDX)モデル miRNA 再発予測 バイオマーカー

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。

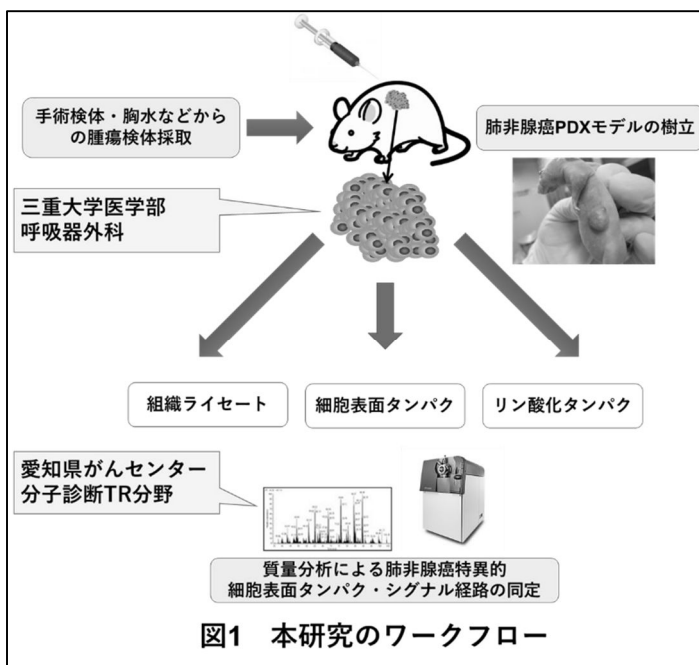
### 1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌、特に肺腺癌においては多くのドライバー変異が同定され、それらを標的とした分子標的薬の開発が加速している。また呼吸器外科手術では高分化腺癌の割合が多くなってきており、肺癌登録合同委員会第7次事業からの報告によると腺癌手術症例の5年生存率は80%を超えている。その一方で、肺非腺癌である、小細胞癌をはじめ、大細胞癌、さらに扁平上皮癌の5年生存率は45-60%と腺癌と比較して明らかに予後不良であり、さらに分子標的薬などの開発がほとんど進んでいない。したがって肺非腺癌の克服は、喫緊かつ重要な課題である。

肺小細胞癌の標準治療は、I期のみ外科切除でそれ以外は化学療法と放射線療法であるが、化学療法においては、過去20年以上にわたり目覚ましい進歩はみられていない。局所進行肺非腺癌非小細胞肺癌に対しては、外科切除後、プラチナ製剤の補助化学療法を行っているが、未だ多くの患者で再発を来し、二次治療以降の有効な治療法に乏しい。また、大細胞癌のなかに分類されていた神経内分泌癌(LCNEC)は臨床的にも腫瘍学的にも小細胞癌に近いと認識され、現在のWHO分類では小細胞癌と同じ神経内分泌腫瘍に分類された。臨床では、小細胞癌と同じ化学療法のレジメンが選択されているが、LCNECにおいても有効な治療は確立されていない。近年次世代シーケンシングなど分子生物学的解析手法の進歩によって、小細胞癌を含めた肺非腺癌の分子生物学的な知見は集積しつつある(George et al. Nature 2015)ものの、決定的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肺非腺癌の克服に取り組む必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、治療成績の向上していない肺非腺癌を対象として、手術検体から患者腫瘍組織移植(PDX)モデルを確立すること、網羅的な多層プロテオーム解析によって肺の肺非腺癌特異的な細胞表面タンパクやシグナル経路を同定すること、さらに得られた分子プロフィールとキードラッグへの感受性から新規治療標的分子や薬剤感受性予測バイオマーカーの探索同定を行うこと、そして最終的にはそれらをターゲットとする革新的な癌治療法の開発から肺非腺癌の治療成績の向上を目指すことである。

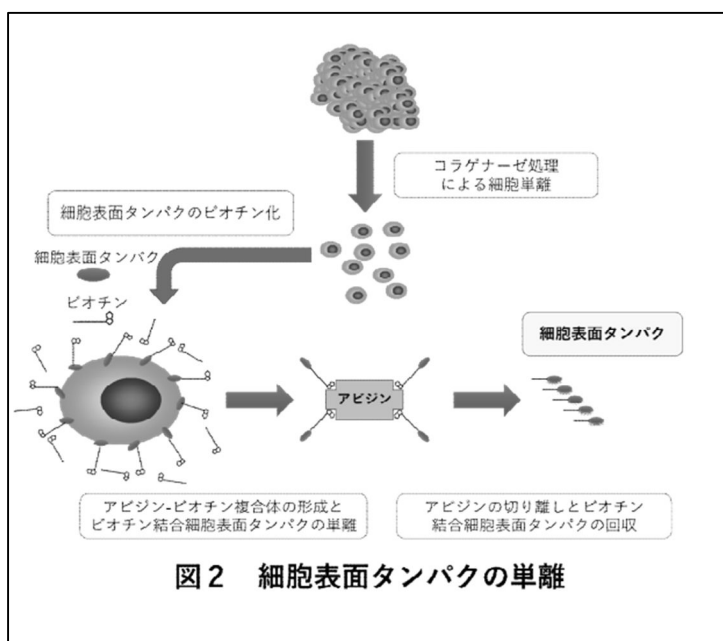


### 3. 研究の方法

#### (1) 肺非腺癌 PDX マウスモデルの作成

三重大学呼吸器外科で、手術により摘出された治療前の肺非腺癌患者の腫瘍組織または胸水を用いて、20例を目標に、PDXモデルを作成する。三重大学呼吸器外科では、年間に約30例の非腺癌症例の手術を行っており、十分な数の臨床検体が確保できる。肺小細胞癌などは比較的生着率が高いため、ヌードマウスを使用して皮下移植によってPDXモデルを樹立するが、生着率が低い場合は、研究分担者である愛知県がんセンター分子診断TR分野に

において、高度免疫不全モデルである Rag-2/Jak3 二重欠損マウスを使用し PDX モデルを作成する。これにより、小さな検体から、多層プロテオーム解析に十分な量の検体を、PDX 腫瘍として得ることができる。



## (2) PDX 腫瘍の多層プロテオーム解析

肺非腺癌 PDX 腫瘍は 2-3 ヶ月で解析に十分な大きさである 1 立方 cm の腫瘍が複数個得られる。PDX 腫瘍を用いて、細胞株の樹立、病理学的評価、遺伝子変異 (TP53、RB1、CREBBP、KRAS、KEAP1、EGFR、BRAF など) の解析を行う。細胞表面タンパクはビオチンを用いて標識・単離する (Taguchi et al. Cancer Cell 2011)。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、各タンパクの細胞表面への局在を検討する。また正常肺組織の遺伝子発現データと比較する。これらの解析により、各タンパクの細胞表面への局在を検討するとともに、肺非腺癌特異的な細胞表面タンパクの同定を試みる。PDX モデルが作成できなかった場合、凍結組織標本を用いて、RNA シーケンス解析を行い、膜貫通ドメインの予測アルゴリズムである TMHMM を用いて、細胞膜に存在することが予測される遺伝子の発現プロファイルからサーフェソーム解析を行う。リン酸化タンパクについては、愛知県がんセンター分子診断 TR 分野で開発した超高感度リン酸化プロテオーム解析法 (Abe et al. Theranostics 2020) を用いて網羅的リン酸化修飾データを取得し、肺非腺癌特異的に活性化されたキナーゼを推定する (Abe et al. Sci Rep 2017)。

## (3) 標的分子の解析

多層プロテオーム解析から得られた有望な治療標的分子については、分子診断 TR 分野が保有する肺非腺癌細胞株や、本研究で PDX 腫瘍から樹立した細胞株を用いて、その機能的な重要性や制御機構について検討する。培養細胞株で有望な結果が得られた標的分子は、PDX モデルを用いてさらに検証実験を行う。また、各 PDX モデルにおいては、肺非腺癌治療のキードラッグであるエトポシド、ドセタキセル、ゲムシタピン、ピノレルピン、S-1 などに対する感受性を検討する。これにより、各キードラッグと相乗・相加的な効果を示す新規治療標的分子の同定や、薬剤感受性予測バイオマーカーの同定を行う。

## 4. 研究成果

まず高度免疫不全モデルである Rag-2/Jak3 二重欠損マウスを用いた PDX モデルの作成を中心に研究を進めた。肺癌 133 例から 34 例の PDX モデル作成に成功し、その内訳は、肺非腺癌 11 例 (小細胞癌 3 例、扁平上皮癌 8 例)、腺癌 23 例である。また、小細胞癌 1 例、扁平上皮癌 7 例、腺癌 5 例においては PDX から Patient-derived cells (PDC) も樹立した。現在、肺非腺癌を中心に、PDX 腫瘍のゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム解析を進めている。

また PDX 作成とともに、肺非腺癌由来 PDX 腫瘍と比較対照となる肺腺癌由来 PDX 腫瘍のオミクス解析を進め、並行して国際共同研究として、肺腺癌と肺非腺癌の血漿 miRNA プロファイルについて miRNA マイクロアレイを用いて比較し、血漿 miRNA シグネチャが早期肺腺癌の再発・予後予測バイオマーカーとして有用であることを明らかにした。本知見について AACR Annual Meeting 2023 において「A circulating microRNA panel predicts recurrence and survival in early-stage lung adenocarcinoma」のタイトルで学会報告を行った (発

表演者)。また International Journal of Molecular Sciences 誌に論文「Circulating microRNA Panel for Prediction of Recurrence and Survival in Early-Stage Lung Adenocarcinoma。」投稿をし、受理された (Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(4), 2331; <https://doi.org/10.3390/ijms25042331>)。

## 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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tai Mei-Chee, Bantis Leonidas E., Parhy Gargy, Kato Taketo, Tanaka Ichidai, Chow Chi-Wan, Fujimoto Junya, Behrens Carmen, Hase Tetsunari, Kawaguchi Koji, Fahrman Johannes F., Ostrin Edwin J., Yokoi Kohei, Chen-Yoshikawa Toyofumi F., Hasegawa Yoshinori, Hanash Samir M., Wistuba Ignacio I., Taguchi Ayumu	4. 巻 25
2. 論文標題 Circulating microRNA Panel for Prediction of Recurrence and Survival in Early-Stage Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2331 ~ 2331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25042331	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 Kawaguchi Teruhisa, Ito Atsushi, Kaneda Shinji, Kawaguchi Koji, Shimamoto Akira, Takao Motoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 A case of traumatic respiratory failure successfully weaned from ventilator after diaphragmatic plication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of the Japanese Association for Chest Surgery	6. 最初と最後の頁 137 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2995/jacsurg.37.137	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 Kawaguchi Koji, Ito Atsushi, Kaneda Shinji, Kawaguchi Teruhisa, Shimamoto Akira, Takao Motoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Two different methods of bronchial dissection and coverage in robotic bilobectomy for advanced lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asian Journal of Endoscopic Surgery	6. 最初と最後の頁 147 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.13101	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 Ozeki Naoki, Iwano Shingo, Nakamura Shota, Kawaguchi Koji, Mizuno Yota, Inoue Takayuki, Nagaya Motoki, Chen Yoshikawa Toyofumi Fengshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Chest three dimensional computed tomography imaging data analysis for the variation of exercise capacity after lung lobectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Physiology and Functional Imaging	6. 最初と最後の頁 362 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cpf.12777	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mei-Chee Tai, Leonidas E. Bantis, Gargy Parhy, Taketo Kato, Ichidai Tanaka, Chi-Wan Chow, Junya Fujimoto, Carmen Behrens, Tetsunari Hase, Koji Kawaguchi, Johannes F. Fahrman, Edwin J. Ostrin, Kohei Yokoi, Toyofumi F. Chen-Yoshikawa, Yoshinori Hasegawa, Samir M. Hanash, Ignacio I. Wistuba, Ayumu Taguchi
2. 発表標題 A circulating microRNA panel predicts recurrence and survival in early-stage lung adenocarcinoma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hirotsugu Kenmotsu, Caicun Zhou, Nasser Altorki, Enriqueta Felip, Eric Vallieres, Shunichi Sugawara, Hiroshi Sakai, Haruhiro Saito, Min Tao, Koji Kawaguchi, Yunpeng Liu, Chong-Jen Yu, Qiong Wu, Huang Lin, Fan Wu, Elizabeth Bennett, Virginia McNally, Barbara J. Gitlitz, Heather Wakelee
2. 発表標題 IMpower010: Results From Asian Patients in a Phase 3 Study of Adjuvant Atezolizumab in Resected Stage IB-IIIA NSCLC
3. 学会等名 JSMO 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口晃司、伊藤温志、金田真吏、川口瑛久、島本亮、高尾仁二
2. 発表標題 Robotic bilobectomyにおける気管支切離と被覆についての検討
3. 学会等名 第14回 ロボット外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 晃司、島本 亮、伊藤 温志、金田 真吏、山口 大輔、高尾 仁二
2. 発表標題 ロボット手術の遠隔医療を見据えた我々の取り組み～リモート症例見学とロボット手術教育・支援システム (IoRE ; Internet of Robot-surgery Education)について
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 川口晃司、島本亮、金田真史、伊藤温志、高尾仁二
2. 発表標題 RATSにて肺動脈中枢を確保するコッソーロボット手術の適応拡大に向けて
3. 学会等名 第75回 日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 晃司、 金田 真史、 篠田真理、島本 亮、 高尾 仁二
2. 発表標題 ロボット手術が低侵襲以外にもたらしたものーリモート手術指導の取り組みによる均てん化を目指して
3. 学会等名 第63回 日本肺癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 晃司、 金田 真史、 篠田真理、島本 亮、 高尾 仁二
2. 発表標題 肺切除における4アームゼロアシストのロボット手術（RATS）の有用性に関する検討
3. 学会等名 第35回 内視鏡外科学会総会
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	金田 真史  (Kaneda Shinji)  (30793418)	三重大学・医学部附属病院・助教    (14101)	

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
研究分担者	田口 歩  (Taguchi Ayumu)  (50817567)	愛知県がんセンター（研究所）・分子診断TR分野・分野長    (83901)	
研究分担者	伊藤 温志  (Ito Atsushi)  (80783133)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト    (14101)	

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