

令和 6 年 6 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15543

研究課題名（和文）術前化学療法後食道癌の多層プロテオーム解析に基づく転移再発制御法の開発

研究課題名（英文）Integrative proteomic analysis of PDX models to develop targeted therapies for recurrent esophageal cancer

研究代表者

檜垣 栄治 (Higaki, Eiji)

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：60896009

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：手術可能なStage II、III食道癌の半数近くが転移・再発をきたす。転移再発食道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、食道癌患者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、本研究で樹立した食道癌細胞株を用いてCRISPR-Cas9システムによるゲノムワイド機能スクリーニングを行う。これにより、食道癌の分子機構解明と革新的細胞表面分子治療標的群の同定から、食道癌の克服を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、食道癌PDXにおける細胞表面タンパク質の発現プロファイルや機能スクリーニング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、食道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）：Nearly half of operable stage II and III esophageal cancer patients develop recurrence. Effective chemotherapy for metastatic esophageal 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 esophageal 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, a genome-wide functional screening using the CRISPR-Cas9 system will be performed using the esophageal cancer cell lines established in this study. This will help to elucidate the molecular mechanisms of esophageal cancer and identify a set of cell surface molecules as innovative therapeutic targets to overcome esophageal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 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 術前化学療法 CRISPR-Cas9 合成致死

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

手術可能な Stage、の食道扁平上皮癌(以下食道癌)においては、JCOG1109 試験で術前 CF(5-FU+シスプラチン)療法に対する優越性が示されたことに基づいて、術前 DCF(5-FU+シスプラチン+ドセタキセル)療法を行った後の根治切除が第一選択となった。その一方で、手術可能な Stage、食道癌においても半数近くで再発をきたし、その 5 年生存率はそれぞれ約 60%、40%といまだに難治である。また、最近の第 3 相臨床試験(KEYNOTE-181、ATTRACTION-3、ESCORT、KEYNOTE-590 など)において、免疫チェックポイント阻害剤の食道癌における有用性が報告された。これにより、転移再発食道癌に対しては、シスプラチン、5-FU、パクリタキセルなどの細胞傷害性抗癌薬と免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせた化学療法が用いられるが、再発診断時からの生存期間中央値は 1 年にも満たない。このように、食道癌の生存率向上のためには、より有効な術前化学療法や、再発・転移巣を十分制御し得る化学療法の開発が極めて重要であると考えられるが、食道癌に有効な化学療法薬は限られており、分子生物学的な知見に基づく新たな食道癌治療法の開発は、食道癌の克服に向けて喫緊かつ最重要の課題である。このため、次世代シーケンサーを用いた食道癌の大規模なゲノム情報が近年集積されてきた。しかし、TP53 変異(80%)、CDKN2A 変異(70%)、NEF2L2 変異(30%)、CCND1 遺伝子増幅(50%)、TP63/SOX2 遺伝子増幅(50%)など、食道癌に共通して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、食道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、膀胱癌、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食道癌 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食道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食道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)。

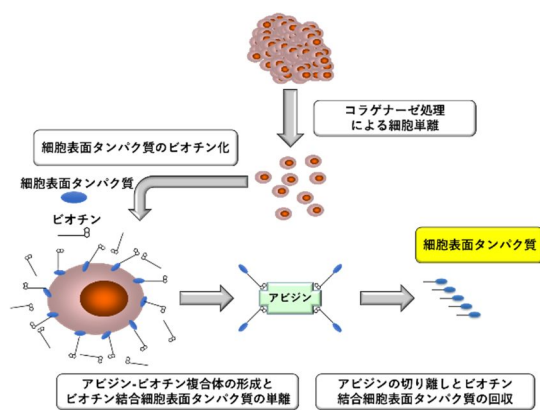


図 1 細胞表面タンパク質の単離

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、得られたサーフェソームデータを、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食道癌特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

また、本研究で DCF 療法耐性食道癌から樹立する食道癌細胞株や入手可能な細胞株を用いて、2 ベクターシステムのゲノムワイド CRISPR knockout pooled library (GeCKO v2)を用いて機能スクリーニングを行う。低 MOI(Multiplicity of infection)でコンストラクトを導入後、3~7 日間 puromycin 存在下で培養し非形質導入細胞を排除する。この時点をも day 0 とし、全体を 7 つのバッチに分け、一つのバッチからは gRNA を抽出する。残りをそれぞれコントロールまたは DCF 存在下または強い耐性を示した薬剤の存在下に培養する。4 週間後に gRNA を回収し、次世代シーケンサーを用いて gRNA 量を測定する。gRNA 量を day 0、コントロール、DCF 存在下、薬剤存

在下の各条件で比較することで、ノックアウトによって細胞増殖が抑制された遺伝子群を同定する。

#### 4. 研究成果

食道癌計 51 症例から 術前化学療法前、術前化学療法の効果判定時、手術時に、内視鏡または外科手術で採取した組織検体を Rag-2/Jak3 二重欠損マウスに移植した。生着率は、42 例中 23 例 (54.8%)、23 例中 10 例 (43.5%)、5 例中 2 例 (40.0%) であった。生着率は既報 (15~40%) に比較して特に 術前化学療法前では良好な結果であると考えられた。また、本研究では特に術前化学療法の効果予測や耐性機序の解明がゴールであることから、以下の解析は 術前化学療法前 で PDX が生着した症例に焦点を置いて解析を行った。 術前化学療法前 で PDX が生着した症例と生着しなかった症例では特に臨床因子との関連は見られなかった (表 1)。

Variables		Success	Failure
Case		23	19
M/F		17/6	15/4
Age		68 (54-77)	66 (46-80)
Histology	SCC	20	18
	AdenoCa	2	0
	CS	1	1
cStage	1	1	1
	2	1	1
	3	13	7
	4	8	2
Tx	NAC	16	14
	CRT	1	4
	CT	1	0
	Palliative RT	2	0
	Surgery alone	1	1
	BSC	2	0
	Response to NAC		
PR	12	11	
SD	1	0	
PD	3	3	

表 1 食道癌 PDX 作成症例

で PDX が作成できた 23 症例の内訳は、扁平上皮癌 (SCC) 20 例、腺癌 2 例、癌肉腫 (CS) 1 例であり、 または 術前化学療法前 とのペアとして PDX を作成できた症例も 3 例あった。また、3 例で PDX 由来細胞株を樹立できた。

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。その中で、トランスクリプトーム解析を先行して行った。DCF 療法で PR であった 2 症例と PD であった 2 症例を比較したところ、PR 症例で高発現している遺伝子群 (図 2 中の Volcano plot で青色) は細胞周期に関連する遺伝子が多く含まれており、殺細胞性抗癌薬の作用機序からも妥当な結果であると考えられた。一方、PD 症例で高発現している遺伝子群 (図 2 中の Volcano plot で赤色) は、特にインターフェロンシグナルパスウェイと有意な関連を示した。

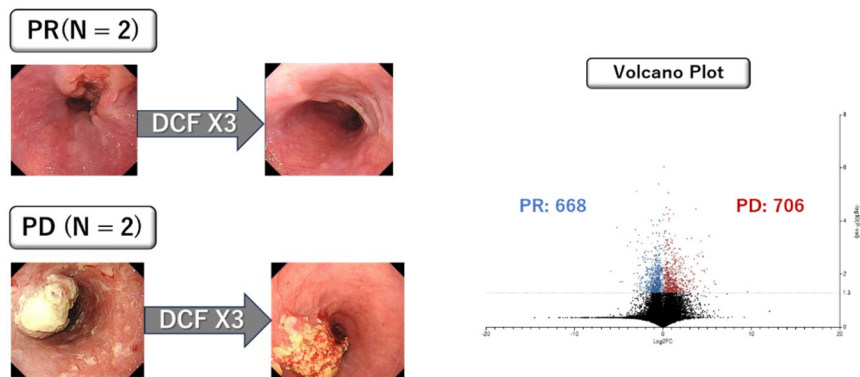


図 2 食道癌 PDX 腫瘍のトランスクリプトーム解析

現在、DCF 療法と合成致死を示す遺伝子を CRISPR-Cas9 システムを用いて網羅的にスクリーニングするために、PDX から樹立した食道癌細胞株において Cas9 安定発現株の作成を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 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 田中努、田近正洋、田口歩
2. 発表標題 食道癌PDXモデルのマルチオミクス解析に基づく化学療法効果予測
3. 学会等名 第107回日本消化器内視鏡学会総会 ワークショップ03「内視鏡が切り開く消化器疾患個別化医療への期待と課題」
4. 発表年 2024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
研究協力者	田口 歩  (Taguchi Ayumu)		

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
研究協力者	田中 努  (Tanaka Tsutomu)		
研究協力者	田近 正洋  (Tajika Masahiro)		

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