

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：21K16438

研究課題名(和文) 多層プロテオーム解析に基づく肝臓癌の新規治療標的探索と治療効果予測法の開発

研究課題名(英文) The search for drug targets and predictive biomarkers in hepatocellular carcinoma through integrative proteomics of PDX models

研究代表者

奥野 正隆 (Okuno, Masataka)

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：80896689

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)：肝臓癌はもっとも予後が不良な固形癌のひとつである。切除不能進行肝臓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、肝臓癌患者腫瘍組織移植(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、肝臓癌細胞株を用いて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、肝臓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、肝臓癌の克服を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、肝臓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、肝臓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)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the cancers with the worst prognosis. Effective chemotherapy for advanced HCC is limited and there is an urgent need to develop innovative therapies. In this study, we will develop patient-derived xenograft (PDX) models of HCC 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 signaling pathways. In addition, a genome-wide functional screen will be performed using HCC cell lines with the CRISPR-Cas9 system. This will help to elucidate the molecular mechanisms of HCC and identify a set of cell surface molecules as innovative therapeutic targets to overcome HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝臓癌 PDXモデル プロテオミクス 細胞表面タンパク質 多層オミクス解析 CRISPR-Cas9 合成致死 分子標的治療

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

肝臓癌は、日本で5番目に多い癌死亡原因であり、その5年生存率は40%程度と、予後不良な癌の一つである(国立がん研究センターがん対策情報センター「がん登録・統計」)。肝臓癌は、高頻度に再発を繰り返し、最終的に外科切除や、ラジオ波焼灼療法、肝動脈化学塞栓療法の適応から外れる症例が多い。このような切除不能進行肝臓癌に対しては、分子標的治療として、一次治療ではソラフェニブとレンバチニブ、二次治療ではレゴラフェニブ、ラムシルマブが用いられており、その奏効率は、それぞれ約10%、30%、10%、10%である。これらの分子標的治療薬は、主に腫瘍血管新生を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤であるが、いずれの分子標的治療薬においても、有効な症例は限られており、分子生物学的な知見に基づく新たな肝臓癌治療法の開発に加えて、分子標的治療薬の効果予測バイオマーカーの同定は、喫緊の課題である。

次世代シーケンシングなどの進歩によって、肝臓癌のゲノム情報は集積しつつあるが、TERTプロモーター領域(60%)、TP53(30%)、CTNNB1(30%)など、肝臓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いない。また、FGFR4のリガンドであるFGF19の遺伝子増幅を伴う肝臓癌は、FGFRを含むマルチキナーゼ阻害剤であるレンバチニブへの感受性が高いことが報告されているものの、FGF19遺伝子増幅は5-10%と低頻度であり、革新的なアプローチによって、肝臓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肝臓癌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肝臓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)。

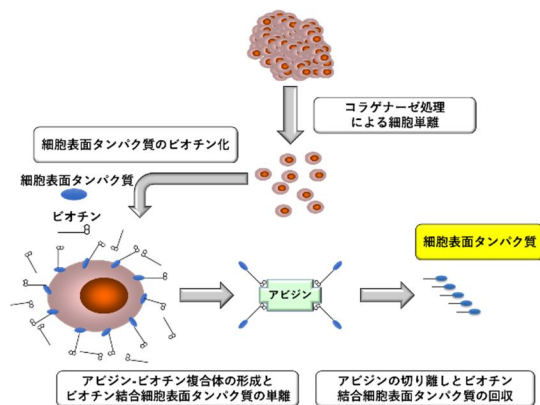


図1 細胞表面タンパク質の単離

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肝臓癌特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

また、並行して、高脂肪食付加MC4R欠損マウスに発症する肝臓癌の組織トランスクリプトーム・プロテオーム解析を行い、肝臓癌PDXの多層オミクスデータと統合的に解析するとともに、MC4R欠損マウス由来肝臓癌から樹立した細胞株において、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day 0とし、全体を3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レンバチニブ存在下に培養する。2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、レンバチニブ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

肝臓癌 64 症例から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、7 症例 (11.1%) で生着した (表 1)。生着率は既報 (10~20%) と同等であった。

ID	性別	年齢	背景肝疾患	pStage	再発の有無
005	男	83	慢性C型肝炎	I	無し
018	男	81	脂肪肝	IIIA	有り
028			情報取得中		
041	男	77	慢性肝炎	IIA	無し
056	男	81	NASH	IIIA	有り
057	男	85	不明	II	有り
059	男	75	慢性肝炎	IA	無し

表 1 肝臓癌 PDX 作成症例

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。

また、NASH 由来肝臓癌モデルである、高脂肪食付加 MC4R 欠損マウスに発症する肝臓癌の組織トランスクリプトーム・プロテオーム解析から、代謝負荷下におかれた肝癌細胞に特徴的なシグナル依存性を抽出した。特に、パルミチン酸はその脂肪毒性によって細胞死を誘導し、NAFLD から NASH への進展を促進することが知られているが、パルミチン酸存在下の肝癌細胞株において分子 X をノックダウンすることによって著明な細胞死が誘導されたことから、分子 X はパルミチン酸の脂肪毒性を肝癌細胞が回避して生存するのに重要な役割を果たしていることが示唆された。

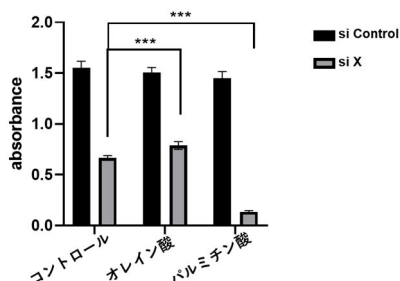


図 2 パルミチン酸負荷肝癌細胞株において分子 X は生存に重要である

さらに、MC4R 欠損マウス由来肝臓癌から樹立した細胞株を用いて CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノムワイド機能スクリーニングを行った。これにより、レンバチニブに合成致死を示す分子 A を同定し、その下流ターゲットとして同定した核酸代謝に関与する分子に対する阻害剤 B とレンバチニブが合成致死を示すことを見出し、ドラッグリポジショニングによる創薬につながることを期待された (図 3)。

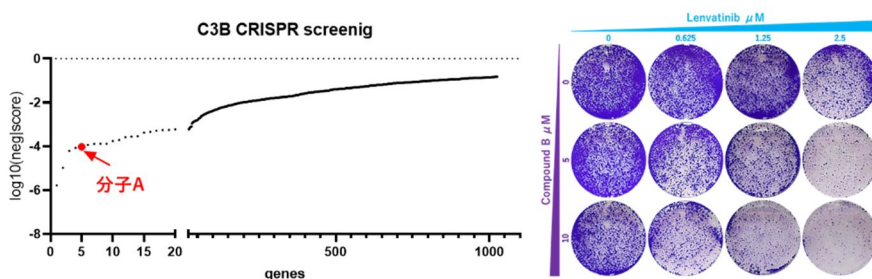


図 3 マウス肝臓癌細胞株におけるレンバチニブと合成致死を示す分子の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shuang Zhou他
2. 発表標題 Characterization of mouse hepatocellular carcinoma cell lines to understand resistance to tyrosine kinase inhibitors
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi他
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 Yuichi Abe他
2. 発表標題 Temporal Omics Profiling Using a Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocellular Carcinoma
3. 学会等名 HUP0 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumu Taguchi他
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

1. 発表者名 阿部雄一他
2. 発表標題 NASH肝がんマウスモデルの経時的マルチオミクス解析による肝がん早期診断バイオマーカーと治療標的分子の探索
3. 学会等名 第11回名古屋大学医・生理研合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部雄一他
2. 発表標題 Temporal omics profiling using a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部雄一他
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎由来肝癌マウスモデルのマルチプロテオーム解析による新規診断バイオマーカー・治療標的分子の探索
3. 学会等名 コホート・生体試料支援プラットフォーム（CoBiA）若手支援研究成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部雄一他
2. 発表標題 免疫グロブリン結合タンパク質の高深度プロテオーム解析と、新規がんバイオマーカー探索研究への応用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuang Zhou他
2. 発表標題 Integrated multi-omics analysis of a mouse model of NASH-derived HCC
3. 学会等名 第12回名古屋大学医・生理研合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部雄一他
2. 発表標題 免疫グロブリン結合タンパク質の高深度プロテオーム解析と、新規がんバイオマーカー探索研究への応用
3. 学会等名 第42回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuang Zhou他
2. 発表標題 Integrated multi-omics analysis of a mouse model of NASH-derived HCC
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部雄一他
2. 発表標題 免疫グロブリン結合抗原の高深度プロテオーム解析による新規がんバイオマーカー探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuichi Abe他
2. 発表標題 Integrated multi-omics analysis of a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference (国際学会)
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
研究協力者	田口 歩  (Taguchi Ayumu)		
研究協力者	阿部 雄一  (Abe Yuichi)		
研究協力者	周 爽  (Zhou Shuang)		

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	菅波 孝祥  (Suganami Takayoshi)		

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