

# 患者癌組織移植マウスモデルの多層プロテオミクス解析による、転移性大腸癌を克服する新規分子標的の探索

愛知県がんセンター研究所  
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 主任研究員  
阿部雄一

愛知県がんセンター研究所  
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 分野長  
田口歩

## 1. 研究の目的・背景

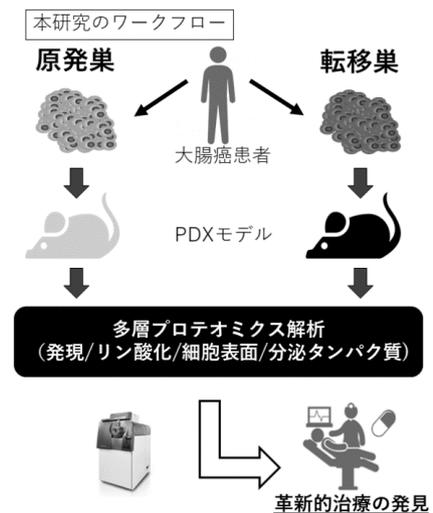
大腸癌では、遠隔転移を伴う StageIVであっても、遠隔転移巣も含めて完全切除が可能であれば外科的切除の適応となる。例えば、肝転移に対して根治的切除を行った場合の5年生存率は、15～59%と報告されている。しかし、肝転移切除後の再発は、残肝再発が約49%、次いで肺転移が20～30%と多く、大腸癌の生存率向上のためには、転移・再発の制御が極めて重要であると考えられる。ゲノム情報を中心に転移性大腸癌の分子生物学的知見は集積しつつある。しかし有効な治療法の開発には至っておらず、独創的アプローチで解析された分子プロファイルに基づき大腸癌の克服に取り組む必要がある。

本研究における分子プロファイリングとして、同一症例の原発巣、転移巣から患者腫瘍組織移植マウスモデル (patient-derived xenograft ; PDX) を樹立し、細胞表面タンパク質 (サーフェソーム)、リン酸化プロテオームを中心とした多層プロテオミクス解析を行う。細胞表面タンパク質はその局在と機能的な重要性から、抗体など免疫治療の直接的な標的として非常に有望であり、実際に、FDA に承認された癌治療薬の約60%が、細胞表面タンパク質を標的としている。またリン酸化修飾酵素であるキナーゼも、多くの癌腫で低分子化合物の分子標的となっており、本研究のリン酸化プロテオミクスから有効な治療標的の発見が期待される。

しかし多層プロテオミクス解析は多量の検体を必要とするため、手術検体から十分量の

サンプルを確保できる機会は少ない。臨床検体由来の癌組織を免疫不全マウスに移植する PDX モデルは、ヒト癌組織を非常によく再現する優れたモデルであることから、本研究では大腸癌の原発巣、転移巣 PDX モデルを樹立し、PDX 腫瘍を用いて多層プロテオミクス解析を行う。本研究で得られる多層プロテオミクスデータは、ゲノム解析では捉えることのできなかつた、転移性大腸癌の分子機構解明につながる重要なリソースである。

本研究では、同一症例の大腸癌原発巣と転移巣からそれぞれ PDX モデルを樹立し、そしてサーフェソーム・リン酸化プロテオームを中心とする多層プロテオミクス解析を実施する。これにより、大腸癌転移の分子機構を解明するとともに、転移巣に特徴的な細胞表面タンパク分子やシグナル経路を同定し、大腸癌転移再発を制御するための新規分子標的治療法を開発することで、大腸癌の克服を目指す(図)。



## 2. 研究の対象ならびに方法

### ① 大腸癌原発巣・転移巣からの PDX モデル作成と、病理学的評価・ゲノム変異解析

愛知県がんセンター病院において、同一症例から採取された原発巣と転移巣の腫瘍組織を高度免疫不全マウスである Rag-2/Jak3 マウスへ皮下移植し、PDX モデルを作成する。我々は、2019年10月より大腸癌 PDX モデル作成を行っており、すでに原発巣由来 PDX モデルを13系統、肝転移巣由来 PDX モデルを2系統樹立した。本研究では、同一症例から得られた原発巣・肝転移巣10ペアの PDX モデルを多層プロテオミクス解析に供する。腫瘍移植後2-3ヶ月で解析に十分な大きさである1立方cmの PDX 腫瘍が複数個得られる。PDX 腫瘍の病理学的評価に加えて、大腸癌で高頻度に変異がみられる KRAS, APC, BRAF, TP53 などの遺伝子変異もターゲットシーケンスまたはデジタル PCR 法により解析する。また、マイクロサテライト不安定性 (MSI) についても PCR 法を用いて評価する。PDX モデル作成は、愛知県研究費によって行われる。

### ② PDX 腫瘍の多層プロテオミクス解析

リン酸化タンパク質については、申請者らの開発した超高感度チロシンリン酸化プロテオミクス法 (Ref1)、微量検体用リン酸化プロテオミクス法 (Ref2) をそれぞれ用いて、サンプル調整を行う。リン酸化修飾定量データから申請者が先行研究 (Ref3) にて構築した方法を用いて原発巣・転移巣特異的な活性化キナーゼを推定する。

細胞表面タンパク質は、共同研究者の田口らが用いた手法により (Ref4)、ビオチンを

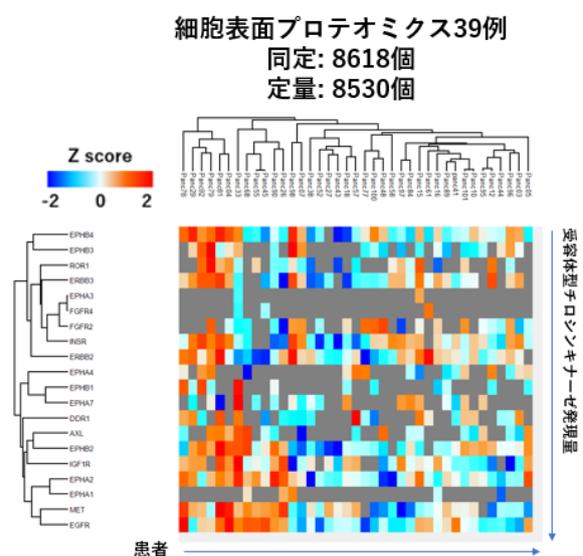
用いて標識・単離し、PDX 腫瘍全体の発現プロテオームと比較することで、各タンパク質の細胞表面への局在を評価する。また、転移巣では、原発巣とは異なる微小環境に腫瘍細胞が適応し、微小環境をリモデリングしていると考えられるため、PDX 腫瘍からの分泌タンパク質も解析する。得られた多層プロテオームデータについては、転移巣由来・原発巣由来 PDX 腫瘍の間で比較する。さらに原発巣手術時に得られた正常大腸粘膜組織のトランスクリプトームデータと比較することで、転移性大腸癌の分子機構を解明し、治療標的となりうる転移性大腸癌特異的な細胞表面タンパク質の同定を行う。

### 3. 研究結果

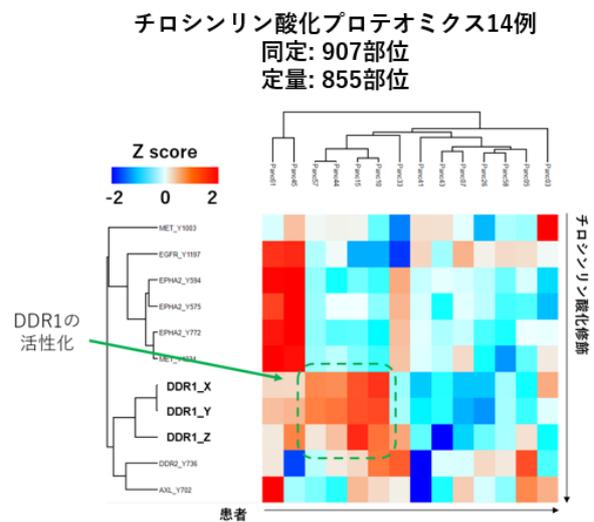
現在までに、NOD/Scid マウスおよび Rag-2/Jak3 マウスを用いて、31 例の原発巣 PDX、7 例の転移巣 PDX の樹立に成功している。またこのうち 3 例は同一個人から作成された貴重なペア症例 PDX であり、同じ遺伝的背景から原発巣・転移巣間での分子プロファイリングを測定できるサンプルを確保する事に成功した。

PDX からの分子プロファイリング測定状況としては、RNA シーケンシング 7 例が完了している。全細胞プロテオミクス、細胞表面プロテオミクス、オルガネラプロテオミクス、リン酸化プロテオミクスについては、コロナウイルス感染拡大によって 2020 年度の受託分析がしばしば停止したため進捗が遅れているものの、現在ペア症例 PDX の質量分析計による測定を始めた所である。以下、先行プロジェクトとして解析の進んでいる膵臓癌 PDX データを、本研究と同じ多層プロテオミクス解析の導入事例として、2020 年度の研究成果を示す。

膵癌 PDX39 例にて、細胞表面プロテオミクスが既に完了しており、平均 5371 個、のべ 8618 個のタンパク質同定に成功した。既に多くの癌腫で治療標的として応用が進んでいる受容体型チロシンキナーゼについて、発現量に基づくクラスタリング解析を右図にまとめた。一部の患者群にて受容体型チロシンキナーゼ全般の発現亢進が認められており、このような患者群に対してはチロシンキナーゼ阻害剤による治療効果が期待され、PDX に対する投与実験による検討が必要と考えられた。



また、膵癌 PDX14 例からのチロシンリン酸化プロテオミクス解析を実施し、同様に受容体型チロシンキナーゼ上のリン酸化修飾定量情報に基づいてクラスタリングした結果を右図にまとめた。リン酸化修飾からも、一部の膵癌患者における活性化チロシンキナーゼの存在が認められた。特に特徴的な例として DDR1 の活性制御チロシンリン酸化群の亢進が観察されたため、PDX 癌組織から樹立した膵癌細胞株を用いた DDR1 阻害剤の感受性の検証が期待される。



#### 4. 考察

膵癌 PDX を用いたここまでの結果から、チロシンキナーゼのような既知の “Drugable gene” でも、これまで測定されていないオミクス（細胞表面プロテオミクスなど）のデータによって患者層別化が可能な事が明らかとなった。既存の大規模ゲノミクス研究 (Ref5) では、今回明らかとなったチロシンキナーゼ全般の発現亢進は見つかっておらず、我々のアプローチによって独自の分子プロファイルを得られることが確認できた。今後、同一個人から作成された貴重なペア症例 PDX を用いて、転移巣特徴的な分子プロファイルの取得と、未知の分子標的メカニズムの解明が期待される。今後の展開として、まず多層プロテオミクス、RNAseq、Whole Exon Seq を早急に取得し、転移巣特徴的な分子標的候補について、大腸癌 PDX での阻害実験、PDX 組織から樹立した細胞株による In vivo, In vitro レベルの検証へ速やかに移行したい。

#### 5. 文献

- Ref1: Theranostics. 2020; 10(5): 2115-2129.  
 Ref2: J Proteome Res. 2017 Feb 3;16(2):1077-1086.  
 Ref3: Sci Rep. 2017 Sep 5;7(1):10463.  
 Ref4: Cancer Cell. 2011 Sep 13;20(3):289-99.  
 Ref5: Nature. 2015 518, pages495-501

#### 6. 論文発表

特になし