

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：間葉系胃がんに対する精密医療開発

Development of precision medicine for mesenchymal gastric cancer

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：足立 淳

Jun Adachi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター 創薬標的プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダー

Laboratory of Proteomics for Drug Discovery, Center for Drug Design Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

II 研究開発の概要

胃がんの罹患数及び死亡数は肺がん、大腸がんに次いで3番目に多く、特に切除不能進行胃がんは生存期間中央値がおおよそ12ヶ月と予後が非常に悪いため新規治療法開発が望まれている。これまでに、患者体内でのがんのダイナミックなシグナル変化を捉える臨床検体オンデマンドプロテオーム・リン酸化プロテオーム解析手法を開発し、切除不能進行胃がんに対する1次化学療法増悪後には間葉系サブタイプの割合が大幅に増えることを見出してきた。

そこで本研究では以下の研究開発項目を設定した。

- (1) 高感度プロテオーム解析基盤を構築し、胃がんの1次治療前・治療中のリン酸化シグナル情報を取得し、ヒトの体内でのダイナミックな上皮間葉転換(EMT)の病態を解明する
- (2) 間葉系胃がん細胞は、化学療法・分子標的療法・免疫療法耐性であることが知られているため、間葉系サブタイプで活性化しているAXLを標的とした治療法開発を行う。具体的にはマウスゼノグラフトモデル及びPDXモデルを用いた前臨床試験を行い、AXLを標的とした治療法を検証する。
- (3) 間葉系胃がん細胞の依存性が高い遺伝子のアンチセンス核酸の最適化を行い、in vitro, in vivoで検証する。

各研究開発項目の成果

- (1) DIA(Data Independent Acquisition)法は既存のDDA(Data Dependent Acquisition)法と比較して欠損値が少なく、深層学習を組み入れたデータ解析技術と併用することで高深度解析を可能とする新たな解析法である。プロテオーム解析では10000タンパク質の同定を目標にしていたが、各サンプル平均11037個のタンパク質を同定す

ることに成功した。本研究の計画段階では、DIA 法をプロテオーム解析にのみ適用し、リン酸化プロテオーム解析は DDA 法を用いる予定であった。予備検討では胃がんゼノグラフトモデルを用いた検証実験でチロシンキナーゼを特異的に濃縮する手法等を用いて、DDA 法で 1990 チロシンリン酸化部位を同定することに成功した。しかし本研究期間中に、DIA 法の開発が予想を超えて進展し、リン酸化プロテオーム解析にも適用する目処がたったため、DIA リン酸化プロテオーム解析を採用した。オブジーボと化学療法の併用療法をうける切除不能進行胃がん患者 13 症例の、1 次治療前・治療中の検体収集をした。また DIA 法を用いたリン酸化及びタンパク質発現測定基盤の構築を行い、収集した検体の解析を行った。その結果、全体で 160715 個のリン酸化部位を同定し、1 サンプルあたり平均 38710 リン酸化部位を定量することに成功した。その結果、併用療法では従来の化学療法の場合と比較して、胃がんの薬剤反応が大きく異なることを明らかにした。またその結果から、新たな治療法を提案するに至った。

(2) 間葉系胃がんにおいて高発現している AXL に対する阻害剤とパクリタキセル併用治療の抗腫瘍効果を AXL 高活性間葉系胃がん培養細胞株 Hs 746T を用いたゼノグラフトモデルを用いて確認した。具体的には Gilteritinib と nab-Paclitaxel の併用治療群では、コントロール群、単剤治療群と比較して有意に腫瘍増殖抑制効果が見られた。上記試験で取得した腫瘍に対して薬理プロテオーム解析を行った結果、EGFR シグナルが併用時に相加的に抑制されていた。AXL、EGFR の発現量、AXL Y702、EGFR Y1197 のリン酸化は、併用治療群は他の群と比較して低下傾向が見られた。これらの結果を論文発表した(Shoji et. al. Cell Rep. 2024)。

胃がん PDX マウスモデルでの抗腫瘍効果を検証するために、トランスクリプトーム情報を元にした EMT スコアから間葉系胃がん PDX マウスモデルと上皮系胃がん PDX マウスモデルを 1 種類ずつ選択し、コントロール群、Gilteritinib もしくは nab-PTX 単剤治療群、Gilteritinib と nab-PTX の併用治療群で抗腫瘍効果を検証した。その結果、間葉系胃がん PDX マウスモデルの併用治療群でのみ抗腫瘍効果が見られることを確認した。またゼノグラフトモデルでは、併用治療時にフィブロネクチン(FN1)や MMP14 など EMT の促進、維持に関わる中心的な細胞外マトリックス因子の抑制が観察されなかったが、PDX モデルではこれらの因子が減少している傾向を示した。PDX モデルはゼノグラフトモデルと比較して腫瘍微小環境が保持されているため、ヒトへの外挿性が高いと考えられる。そのためフィブロネクチンや MMP14 は将来的に臨床試験における薬効予測、薬効実測対象マーカーの候補となりうる。

(3) 遺伝子ノックアウトスクリーニングによって見出した新規間葉系胃がん治療標的遺伝子に対するアンチセンス核酸について、間葉系胃がん培養細胞株を用いて基本骨格、核酸長の最適化を行った。その結果最適化されたアンチセンス核酸を、新規間葉系胃がん治療標的遺伝子に対するアンチセンス核酸として、国際特許出願を行った。

The incidence and mortality of gastric cancer rank third, following lung cancer and colorectal cancer. In particular, unresectable advanced gastric cancer has a very poor prognosis, with a median overall survival of approximately 12 months, highlighting the urgent need for the development of novel therapeutic strategies. We have previously developed an on-demand clinical specimen-based proteome and phosphoproteome analysis platform capable of capturing dynamic signaling changes in tumors within patients. Using this approach, we found that the proportion of the mesenchymal subtype markedly increases after progression following first-line chemotherapy in unresectable advanced gastric cancer.

Based on these findings, the present study established the following research and development objectives:

- (1) To construct a highly sensitive proteomic analysis platform, acquire phospho-signaling information before and during first-line treatment of gastric cancer, and elucidate the dynamics of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in vivo.
- (2) Mesenchymal gastric cancer cells are known to be resistant to chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy. Therefore, we aim to develop therapeutic strategies targeting AXL, which is activated in the mesenchymal subtype. Specifically, preclinical studies using mouse xenograft and patient-derived xenograft (PDX) models will be conducted to evaluate AXL-targeted therapies.
- (3) To optimize antisense oligonucleotides targeting genes highly essential for mesenchymal gastric cancer cells, followed by validation in vitro and in vivo.

Results for Each Research and Development Objective

(1) Data Independent Acquisition (DIA) is a novel analytical method that yields fewer missing values than the conventional Data Dependent Acquisition (DDA) method and enables deep proteomic analysis when combined with deep learning-based data processing. While the initial target was the identification of 10,000 proteins, we successfully identified an average of 11,037 proteins per sample. At the planning stage of this study, DIA was intended only for proteome analysis, while phosphoproteome analysis was to be conducted using DDA. In preliminary studies using a gastric cancer xenograft model, we successfully identified 1,990 tyrosine phosphorylation sites using DDA with tyrosine kinase enrichment methods. However, during the course of this study, DIA technology advanced beyond expectations and became applicable to phosphoproteome analysis; therefore, DIA-based phosphoproteomics was adopted.

Tumor samples were collected from 13 patients with unresectable advanced gastric cancer undergoing combination therapy with nivolumab (Opdivo) and chemotherapy, both before and during first-line treatment. We established a DIA-based platform for phosphoproteome and proteome profiling and analyzed the collected samples. As a result, a total of 160,715 phosphorylation sites were identified, with an average of 38,710 sites quantified per sample. These analyses revealed that tumor responses to the combination therapy differed markedly from those observed with conventional chemotherapy alone. Based on these findings, we proposed a novel therapeutic strategy.

(2) The antitumor efficacy of combination therapy with an AXL inhibitor and paclitaxel was evaluated using a xenograft model derived from the AXL-high mesenchymal gastric cancer cell line Hs746T. Specifically, the combination treatment with gilteritinib and nab-paclitaxel showed a significantly greater tumor growth inhibitory effect compared to both control and monotherapy groups. Pharmacoproteomic analysis of tumor tissues obtained from this study demonstrated additive suppression of EGFR signaling in the combination treatment group. Expression levels of AXL and EGFR, as well as

phosphorylation levels at AXL Y702 and EGFR Y1197, tended to decrease in the combination group compared to other groups (Shoji et al., Cell Reports, 2024).

To further validate antitumor efficacy in gastric cancer PDX mouse models, one mesenchymal-type and one epithelial-type model were selected based on EMT scores derived from transcriptomic data. Antitumor effects were evaluated in control, monotherapy (gilteritinib or nab-paclitaxel), and combination therapy groups. As a result, antitumor effects were observed only in the mesenchymal-type PDX model treated with the combination therapy. In the xenograft model, no suppression of key extracellular matrix factors involved in EMT promotion and maintenance, such as fibronectin (FN1) and MMP14, was observed during combination treatment; however, in the PDX model, these factors showed a decreasing trend. Since PDX models better preserve the tumor microenvironment compared to xenograft models, they are considered to have higher translational relevance to humans. Therefore, fibronectin and MMP14 may serve as candidate biomarkers for predicting and monitoring therapeutic efficacy in future clinical trials.

(3) Antisense oligonucleotides targeting a novel therapeutic gene identified through gene knockout screening in mesenchymal gastric cancer were optimized in terms of backbone chemistry and nucleotide length using mesenchymal gastric cancer cell lines. As a result, the optimized antisense oligonucleotides were filed as an international patent application as a novel therapeutic approach targeting mesenchymal gastric cancer.