

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09380

研究課題名(和文) 分子標的治療におけるバイオマーカーとしてのインスリン様増殖因子活性化機構

研究課題名(英文) Mechanism of insulin-like growth factor activation as a biomarker in molecular targeted therapy

研究代表者

瀬戸山 健 (Setoyama, Takeshi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80760595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌転移単増大に伴う血中bioactive IGFの経時的上昇を確認し、bioactive IGFを遊離させるMMP-7発現量による治療効果の差異が示せれば、IGF中和療法における治療効果ならびに対象選択バイオマーカーが示せると考えられた。だが、免疫不全、野生型の両モデルともに、転移巣局所でヒトMMP-7は不活性型のpro-formしか確認できず、活性化が確認されなかった。ヒトとマウスの分子構造の差異は小さいが、マウス微小環境下ではヒトMMP-7は活性化できないとの結論に至った。IGFの活性化は厳密に制御され、またIGFを活性化させるMMP-7の活性化も厳密に制御されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では大腸癌は罹患者数、死亡者数ともに多く、遠隔転移、特に肝転移症例は、根治困難である。大腸癌肝転移において、IGF機構の活性化が重要なことは明らかで、MMP-7が主要なIGF機構活性化分子であることも報告されている。故に、MMP-7はIGF中和療法の対象選択のためのバイオマーカーとなり得るが、今回の我々の検討により、MMP-7の生体内での活性化もIGF活性化機構と同様に厳密に制御されていることが判明した。今後、大腸癌肝転移を促進するIGF活性化メカニズムの解明の一助となり、IGF中和療法の科学的な根拠ならびに、治療対象選択と治療効果判定のバイオマーカー探索研究に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic effect biomarker and target selection biomarker for IGF neutralization therapy could be indicated by confirming the increase in blood bioactive IGF with the increase of cancer metastatic lesions and the difference in therapeutic effect depending on the expression level of MMP-7 that releases bioactive IGF. However, in both immunodeficient and wild-type mouse models using human pro-form MMP-7 transfected mouse cancer cells, only the pro-form was detected in the serum, suggesting that human MMP-7 was not activated. Although the differences in the molecular structures of human and mouse MMP-7 are small, it was concluded that human MMP-7 cannot be activated in the mouse microenvironment. It was revealed that the activation mechanism of MMP-7, which activates the tightly regulated IGF system, could be also tightly regulated. Our study results show that the more physiological animal model is needed to validate the usefulness of MMP-7 in IGF neutralizing therapy in the future.

研究分野：消化管悪性腫瘍

キーワード：大腸がん肝転移 分子標的薬 増殖因子 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では大腸癌は罹患者数、死亡者数ともに多く、遠隔転移、特に肝転移症例は、根治困難である。インスリン様増殖因子 (Insulin-like Growth Factor; IGF) は、がんの増殖、浸潤、転移に関与していることが知られている。IGF リガンドである IGF-1 ならびに IGF-2 は主に肝臓で産生され、クッパー細胞や血管内皮から産生される IGFBP と結合して、大部分が非活性型として存在する。したがって、IGF が活性型 IGF (bioactive IGF) として作用を発揮するためには、タンパク質分解酵素による IGFBP の分解が必須である。これまでに、当研究室では、がん細胞から分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -7 が 6 種全ての IGFBP に対して分解酵素活性をもつこと発見した。また、IGF に対する中和抗体を開発し、大腸癌肝転移モデルマウスにおいて、肝転移抑制効果を有することを示し、bioactive IGF が治療標的となりうることを証明した。さらに、IGF 受容体過剰発現細胞を血液検体で刺激し、抗リン酸化 IGF 受容体抗体を用いたウエスタンブロット法にて IGF 受容体のリン酸化を検出することで血中 bioactive IGF を評価する機能的測定法 (Kinase Receptor Activation Assay: KIRA 法) を開発した。これにより、肝転移巣の増大に伴う bioactive IGF の経時的な測定が可能となり、IGF 中和療法において、血中 bioactive IGF が治療効果の予測を可能とするバイオマーカーとなり得ることが示唆された。さらに、pan-IGFBP 分解酵素である MMP-7 の発現が、より高い効果を発揮できる治療対象症例の選択に利用できるものと考えられた。

2. 研究の目的

当研究室では、bioactive IGF を特異的に中和する抗 IGF 抗体による分子標的治療を開発した。分子標的治療においては、効果の得られる患者群の選択と、薬剤が確実に標的分子に作用していることを証明することが不可欠である。本研究では、当研究室が開発した KIRA 法を用い、血中 bioactive IGF が中和抗体投与により低下し、抗腫瘍効果と相関することを証明する。その際、bioactive IGF 産生に必須である IGFBP 分解酵素 (MMP-7) 発現の有無による治療効果の差異を検討し、高い治療効果が期待できる患者群を選択可能であるかを併せて検討する。これにより動物実験レベルで、IGF 中和療法の POC (Proof of Concept) が確立し、早期臨床応用につながると考える。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌肝転移モデルにおける経時的な bioactive IGF の測定

まず、ヒト大腸癌細胞株である HT29 を用いた免疫不全マウスによる大腸癌肝転移モデルを作成し、バイオアッセイである KIRA 法を用いた経時的な血中 bioactive IGF の測定を試みた。

(2) 肝転移巣における MMP-7 活性化の確認

ウエスタンブロット法により、HT29 から分泌される MMP-7 の検出を試みた。さらに、MMP-7 の活性化を確認するため、薄切した新鮮凍結標本を MMP の基質でコーティングされたフィルム上に張り付けて、基質の溶け具合から、MMP の活性化を半定量的に評価する方法である in situ Zymography を行った。

(3) 肝転移成立過程で MMP-7 が IGF 機構を活性化していることの確認

MMP-7 の発現のないマウス大腸癌細胞株を親株として、遺伝子導入によりヒト proMMP-7 高発現細胞株を作成した。そして、このヒト proMMP-7 高発現マウス大腸癌細胞株を野生型マウスに移植し、肝転移モデルを作成、血中 MMP-7 をウエスタンブロット法にて検出を試みた。同癌細胞に、ルシフェラーゼも遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにて肝転移の量的評価と同時に、IGF 中和抗体による治療実験も行った。

4. 研究成果

(1) 生体における bioactive IGF が微量で増減は検出困難であることが判明した。

HT29 モデル免疫不全マウスにおいて、肝転移成立過程に応じて経時的に血中 bioactive IGF を KIRA 法を用いて測定した。肝転移増大に伴って、血中の bioactive IGF が上昇する傾向がみられたが、再現性に乏しく、明らかな有意差は検出できなかった。元来、生体内における血中 bioactive IGF はシステムとして厳密に制御され、微量に維持されており、なおかつ、KIRA 法がバイオアッセイであることから、測定の精度が IGF 受容体過剰発現細胞のコンディションにも依存する。そのため、転移巣局所における bioactive IGF 量の精密な増減の測定は困難と考えられた。元来微量で差異検出が極めて困難である bioactive IGF の血中濃度を増加させるために MMP-7 高発現株を作成し、非発現株との比較も含め、肝転移巣の増大に伴い測定を行い、血中 bioactive IGF が経時的に上昇することを確認することが必要と考えられた。

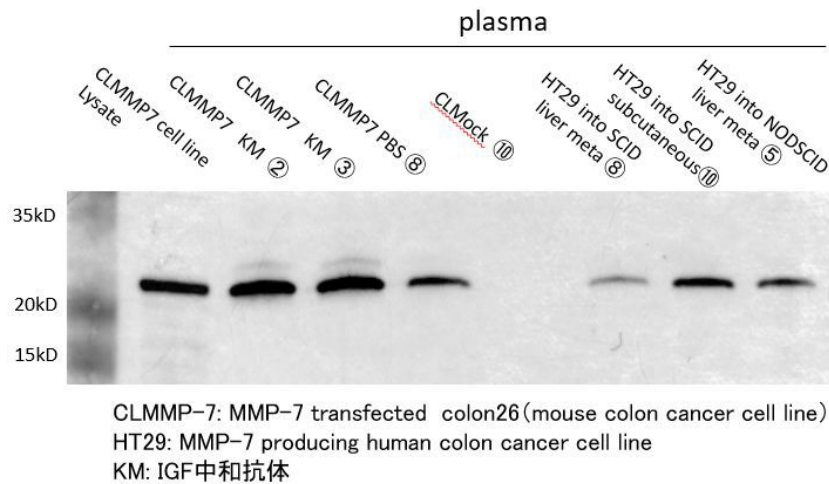
(2) 免疫不全マウスモデルでは MMP-7 は活性化されないことが示唆された。

次に、同じ HT29 モデル免疫不全マウスにおいて、血中 MMP-7 の検出をウエスタンブロット法を用いて行った。もともと MMP-7 も、不活性型の pro-form (proMMP-7, 28kDa)

として分泌され、他のプロテアーゼにより限定分解を受けて活性化される (active MMP-7, 20kDa)。今回、ウエスタンブロット法では、予想外なことに、不活性型の proMMP-7 のみしか検出できなかった (図 1)。さらに、in situ Zymography においても、ヒト肝転移巣に比して、免疫不全マウスの肝転移巣では、MMP-7 の活性化がほとんどみられなかった。この結果から、免疫不全マウスには T/B 細胞がないことから、癌間質相互作用が起こりにくく、転移巣局所で MMP-7 が活性化されないことが示唆された。

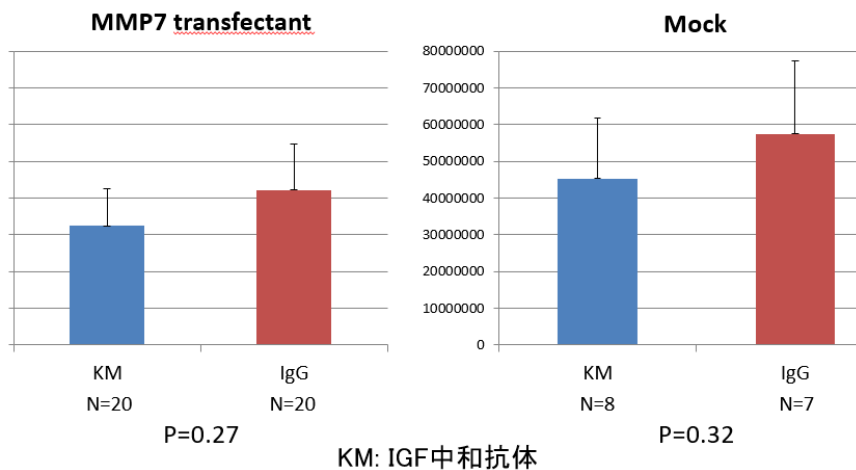
- (3) マウス生体内の微小環境下ではヒト MMP-7 は活性化できないことが強く示唆された。ヒト proMMP-7 高発現マウス大腸癌細胞株を野生型マウスに移植した肝転移モデルを作成し、血中 MMP-7 をウエスタンブロット法で検出した。In vitro ではヒト活性型 MMP-7 がマウス IGFBP を分解することを確認できたが、血中の MMP-7 は pro-form しか検出できなかった (図 1)。

図1. Western Blot for hMMP-7



さらに、ルシフェラーゼアッセイにて量的な評価を行ったが、やはり活性型 MMP-7 が血中にみられていないことから、ヒト proMMP-7 を導入しても肝転移は増加せず、IGF 中和療法の効果について有意差は確認できなかった (図 2、KM が IGF 中和抗体投与群)。

図2. Colon26LuciferaseMMP7/Mock肝転移モデル
ルシフェラーゼ発光量



これらの結果から、ヒトとマウスの MMP-7 の分子構造に大きな差異はないが、マウスの微小環境下では、ヒト MMP-7 は活性化できないとの結論に至った。全身の IGF 活性化機構は極めて厳密に制御され、通常、血中 bioactive IGF は極めて低濃度で維持されている。さらに、IGF 活性化機構を活性化させる MMP-7 の活性化機構もまた厳密に制御されていると考えられた。がんの転移機構には局所の微小環境が極めて重要で、生理的な癌間質相互作用が必須であり、その観点から考えると、ヒトの病態と同様の生理的なモデルによる検証が必要と考えられた。

(4) 今後の検討課題と展望

今後は、生理的なモデルによる精密な検証が必要であり、マウスおよびヒト MMP-7 (それぞれ pro-form と active form) を導入したマウス癌細胞株を用いた肝転移モデルを作成する。そして、in vivo で MMP-7 の活性化が確認されたモデル (予想としてはマウス MMP-7 においては pro-form と active form、ヒト MMP-7 においては active form のみ) において増幅された bioactive IGF が肝転移形成過程に伴い経時的に増加することを確認する。その結果、IGF 中和療法の治療効果マーカーとしての有用性が検討できる。さらに、MMP-7 発現の差異による治療効果の違いを確認することで、高い治療効果を発揮できる治療対象症例選択のためのバイオマーカーとしての有用性が検討できる。今回の我々の研究結果によって、IGF 中和療法における治療効果ならびに症例選択マーカー探索のための安定した動物モデル実験の環境が整ったといえる。今後の実験結果により、IGF を標的とした分子標的治療における POC が得られ、さらに、IGF シグナル経路が多くの腫瘍に共通する生存シグナルであることから、横断的な腫瘍の理解にもつながり、さらなる治療法開発に発展する可能性を有している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyamoto S, Nikaido M, Setoyama T	4. 巻 November 2019
2. 論文標題 Importance of matrix metalloproteinase-7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 27-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----