

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16346

研究課題名（和文）前臨床マウスモデルを基盤としたスキルス胃がんの多角的治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of multi-faceted therapeutic strategies for diffuse-type gastric cancer based on a preclinical mouse model

研究代表者

島田 周（Shimada, Shu）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20609705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：スキルス胃がんは予後が悪く、有効な治療方法も確立されていない。我々は独自に開発したスキルス胃がんマウスモデルとその胃がん由来細胞株を用いて、スキルス胃がんのシグナル経路の同定とそのシグナル経路に対する分子標的治療薬の開発を行った。バイオインフォマティクス解析・免疫組織化学解析によりマウススキルス胃がんではRTK/RAS/MAPK経路が活性化していることが明らかとなり、同経路に対する分子標的治療薬であるMEK阻害剤は特異的にアポトーシスを誘導した。また、ヒト胃がんにおいてもE-cadherin異常細胞はMEK阻害剤感受性であり、ヒトスキルス胃がんにもMEK阻害剤が有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、スキルス胃がんマウスモデルとその胃がん由来細胞株という純粋な実験系を用いて、スキルス胃がん重要な役割を果たしているシグナル経路の同定とスキルス胃がん特異的に作用する分子標的治療薬の発見につなげたという点で学術的意義がある。動物モデルとその初代培養細胞株を利用するという本研究手法は他のがん研究にも応用できるという点でも重要である。また、予後が悪く、有効な分子標的治療薬がなかったスキルス胃がんに対してMEK阻害剤が著効することを明らかにしただけでなく、前臨床試験としてスキルス胃がんマウスモデルでの薬効評価も済ませており、臨床試験の準備段階にまで至っているという点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Although diffuse-type gastric cancer (DGC) is one of the most severe malignancy in the world, effective therapeutic strategies have not yet been established. By using our DGC mouse model and mouse DGC cell lines, we tried to identify signaling pathways playing critical roles in diffuse-type gastric carcinogenesis, and develop molecularly targeted agents against the signaling pathways. Bioinformatic and immunohistochemical analysis consistently revealed that the RTK/RAS/MAPK signaling pathway was activated in mouse DGC, and MEK inhibitors specifically eliminated mouse DGC cells by inducing apoptotic events in vitro and in vivo. Moreover, E-cadherin-deficient human gastric cancer cells were susceptible to MEK inhibitors, suggesting that MEK inhibitors could improve prognosis of DGC patients.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胃がん マウスモデル 分子標的治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) スキルス胃がん

胃がんは、世界的に発症数と死亡数が多く、日本においても同様である。その中でも、スキルス胃がんは、浸潤と転移が著しく、術後再発が多く、抗がん剤耐性も強いいため、予後が悪い。ゲノム解析により、ヒトスキルス胃がんでは *TP53*・*CDH1*・*RHOA* 遺伝子に高頻度に異常が認められることがわかったが、治療標的となり得るシグナル経路の同定には至っていない。悪性黒色腫における BRAF 阻害剤・非小細胞肺癌における EGFR 阻害剤の有効性が報告されている昨今、スキルス胃がんにおけるシグナル経路の同定とそのシグナル経路に対する分子標的治療薬の開発は喫緊の課題である。

(2) スキルス胃がんマウスモデル

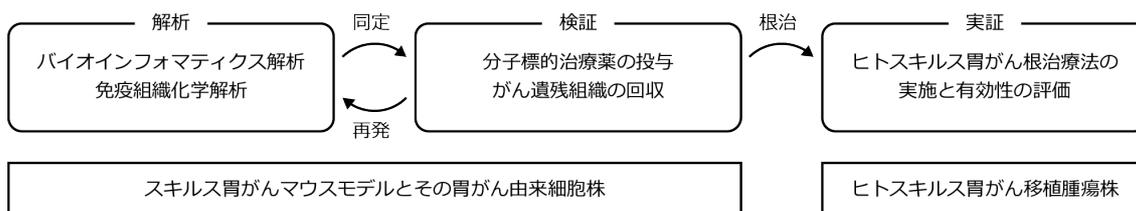
我々は、がん抑制因子 p53 (*Trp53* 遺伝子) と細胞接着分子 E-cadherin (*Cdh1* 遺伝子) を胃特異的に欠損するマウス (DCKO=double conditional knockout) を作製し、ヒトスキルス胃がんを形態学的にも分子生物学的にもよく模倣した世界初の遺伝子改変マウスモデルであることを報告した (Shimada, Yuasa *et al. Gut* 2012)。さらに、DCKO マウスのスキルス胃がん由来細胞株 (GC) と p53 ノックアウトマウスの胃粘膜由来細胞株 (GE) を樹立し、1535 種類の機能既知化合物ライブラリのスクリーニングを行い、スキルス胃がん特異的に作用する低分子化合物として合成エストロゲン mestranol を同定した (Shimada, Tanaka *et al. Br J Cancer* 2018)。

(3) 抗がん剤の薬効評価の問題点

一般的に、抗がん剤の薬効評価にはヒトがん細胞株の免疫不全マウス皮下移植腫瘍モデルが利用されている。しかし、がん細胞株は臨床のがん細胞とは形質が大きく乖離しており、免疫不全マウス皮下移植腫瘍も原発巣のがん微小環境を反映していないという問題点がある。我々は、このような問題を解決するために、マウスのがん原発巣という生体・臨床に極めて近い実験環境で研究を展開していくことにした。そうすることで、ヒトへの早期臨床応用を見据えた分子標的治療の確立、再発と耐性獲得の真のメカニズムの解明とその回避方法の構築を達成することが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

DCKO マウスの胃がん原発巣と GC 細胞株を利用して多方面から解析を行い、スキルス胃がんでは活性化しているシグナル経路を同定する。そのシグナル経路に対する分子標的治療薬を DCKO マウスに投与して、腫瘍増殖や生存期間への影響、遺伝子発現や病理所見の変化を解析する。抗がん剤単独投与下でも再発や耐性獲得が認められた場合、がん遺残組織を回収して、がん細胞自体の形質変化やがん微小環境からの影響を解析することにより、再発と耐性獲得のメカニズムを明らかにする。そして、そのメカニズムを標的とする薬剤を探索して、DCKO マウスの胃がんへの効果を評価する。



3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクス解析

DCKO マウスのスキルス胃がん原発巣とコントロールマウスの正常胃粘膜上皮のマイクロアレイ解析データ (GSE25302) を利用して、GSEA (=Gene Set Enrichment Analysis) によりパスウェイ解析を行った。

(2) 免疫染色・western blotting 解析

DCKO マウスのスキルス胃がんの組織切片に対して、phospho-Erk 抗体 (Cell Signaling Technology, 20G11)・phospho-Smad2 抗体 (Cell Signaling Technology, 138D4)・phospho-Stat3 抗体 (Cell Signaling Technology, D3A7) を使用して免疫染色を行った。アポトーシス解析には cleaved caspase 3 抗体 (Cell Signaling Technology, 5A1E) を使用した。また、Seoul National University College of Medicine, Department of Pathology の Woo Ho Kim 教授の協力のもと、DCKO マウススキルス胃がんの tissue microarray を作成し、同様に免疫染色を行った。Western blotting 解析についても同じ抗体を使用した。

(3) 細胞培養

GC 細胞株は F12 培地+5%ウシ胎児血清 (FBS=fetal bovine serum) で、GE 細胞株は DMEM 培地+10%FBS で培養した。ヒト胃がん細胞株は各々DMEM 培地+10%FBS または RPMI -1640 培地+10%FBS で培養した。

(4) 細胞増殖アッセイ

12 ウェルのプレートに各々 10^4 細胞/ウェルで播種し、24 時間後に薬剤を投与し、さらに 48 時間後に MTT を利用して細胞増殖を解析した。

(5) スフェア形成能アッセイ

24 ウェルの Ultra-low attachment プレートに各々 10^3 細胞/ウェルで播種し、DMEM/F12 培地+EGF/FGF/insulin/hydrocortisone 内で 14 日間培養し、スフェア数を算定した。

(6) フローサイトメトリー解析

PI (=propidium iodide) 染色および Annexin-V/PI 染色後に FACSCalibur を利用して、細胞周期停止・アポトーシスを解析した。

(7) 皮下移植腫瘍解析、DCKO マウス原発腫瘍解析

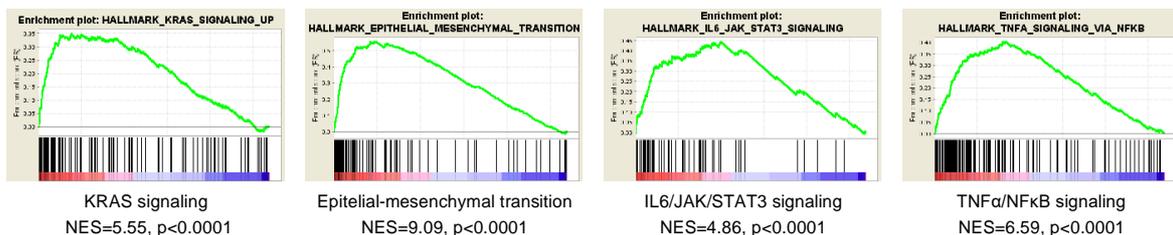
KSN ノードマウスに各々 10^6 細胞/箇所を Matrigel とともに皮下注射し、14 日後に腫瘍径が 1cm 前後となったことを確認し、薬剤投与を開始した。DCKO マウスは 9 か月齢から薬剤投与を開始した。

4. 研究成果

[結果]

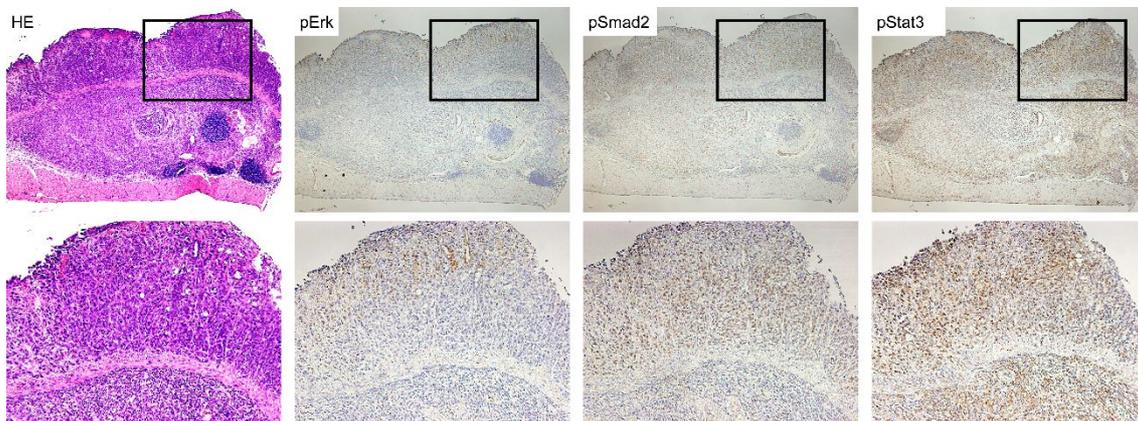
(1) バイオインフォマティクス解析

GSEA により DCKO マウスのスキルス胃がんでは 液性増殖因子 (RTK/RAS/MAPK) 上皮間葉転換 (TGF /SMAD) 炎症 (IL6/STAT3、TNF /NF B) などのシグナル経路が活性化していると予測された。



(2) 免疫染色

(1)で予測されたシグナル経路の活性化について免疫組織化学的に解析を行った。DCKO マウスのスキルス胃がんでは、一部の細胞が phospho-Erk 陽性 (RTK/RAS/MAPK 経路) であり、多くの細胞が phospho-Smad2 陽性 (TGF /SMAD 経路)・phospho-Stat3 陽性 (IL6/STAT3 経路) であり、バイオインフォマティクス解析の結果と矛盾しなかった。

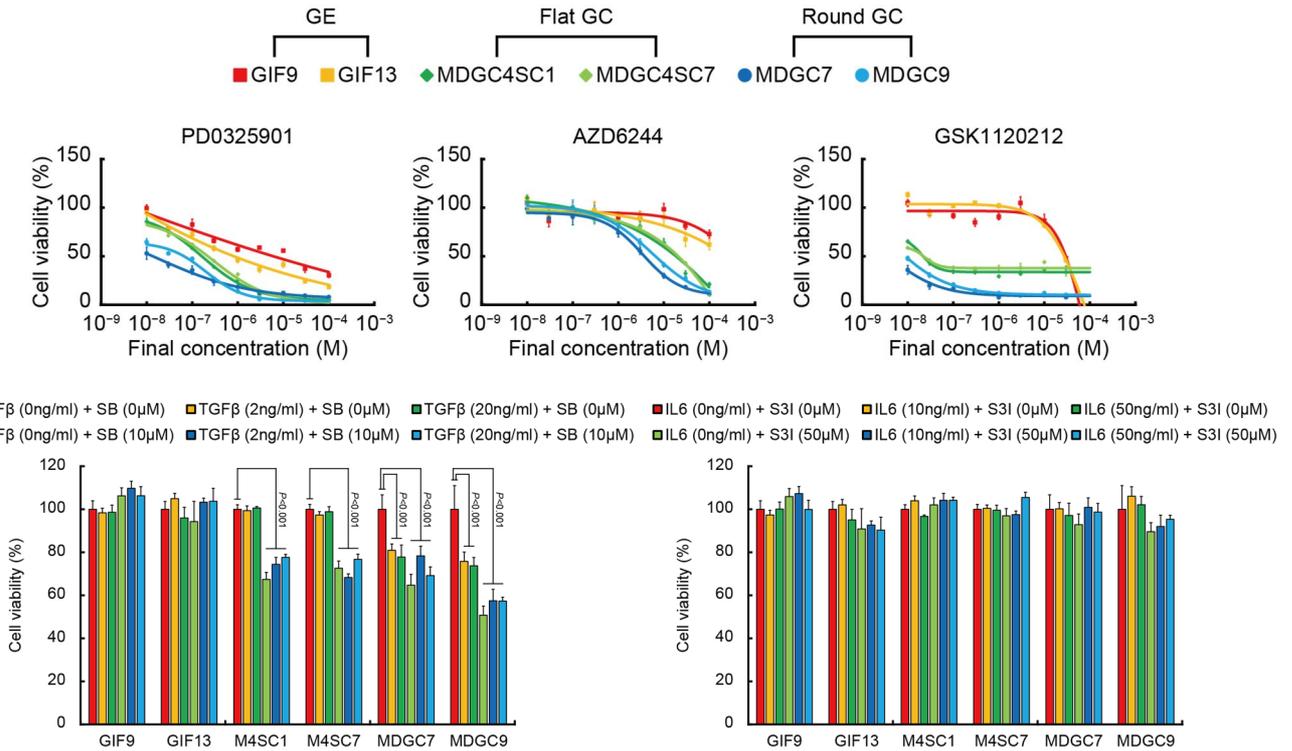


(3) Western blotting 解析

マウススキルス胃がん由来 GC 細胞株とマウス正常胃粘膜由来 GE 細胞株において western blotting 解析を行ったところ、GC 細胞株は phospho-Erk 陽性・phospho-Stat3 陽性であった。phospho-Smad2 は陰性であったが、TGF は間質から分泌されており、間質がない実験条件下では TGF /SMAD 経路は活性化しないと考えられた。

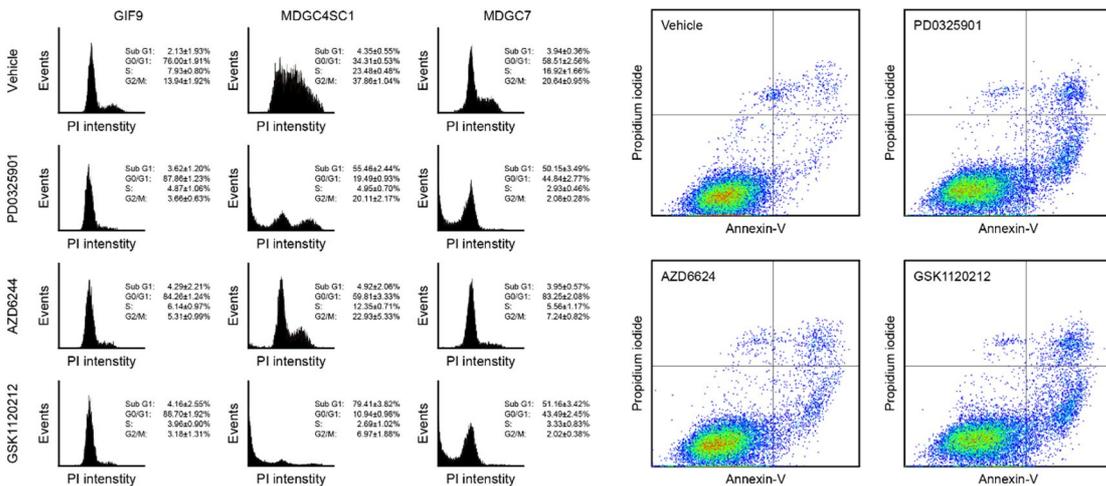
(4) 薬剤感受性解析

GC 細胞株と GE 細胞株に MEK 阻害剤 PD0325901・AZD6244・GSK1120212 を投与したところ、いずれの MEK 阻害剤も GC 細胞株特異的に作用した。一方、TGF β リコンビナント蛋白を投与したところ、GC 細胞株は線維芽細胞様の形態へと変化し、上皮間葉転換が生じている可能性が示唆されたが、細胞増殖・スフェア形成はむしろ抑制された。これらの現象は TGF β R1 阻害剤 SB431592 投与により阻害された。また、IL6 リコンビナント蛋白および STAT3 阻害薬 S3I-201 を投与したところ、細胞増殖・スフェア形成には大きな影響はなかった。



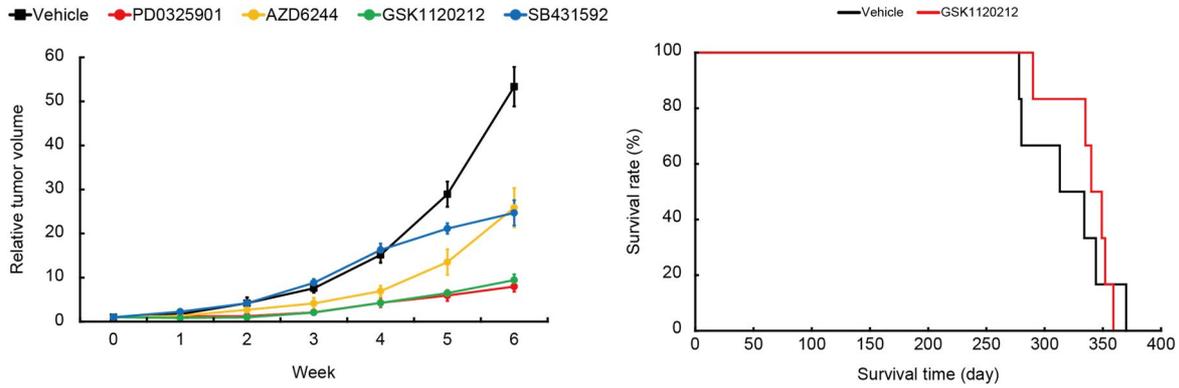
(5) フローサイトメトリー解析

PI 染色後にフローサイトメトリー解析を行ったところ、特に PD0325901・GSK1120212 投与により sub G1 分画が増加しており、細胞周期停止ではなくアポトーシスが生じていると考えられた。実際、Annexin-V/PI 染色後にフローサイトメトリー解析を行ったところ、PD0325901・GSK1120212 投与によりアポトーシスが顕著に誘導されていることがわかった。Western blotting 解析においても、MEK 阻害剤投与により cleaved caspase 3 が増加していることが確認された。



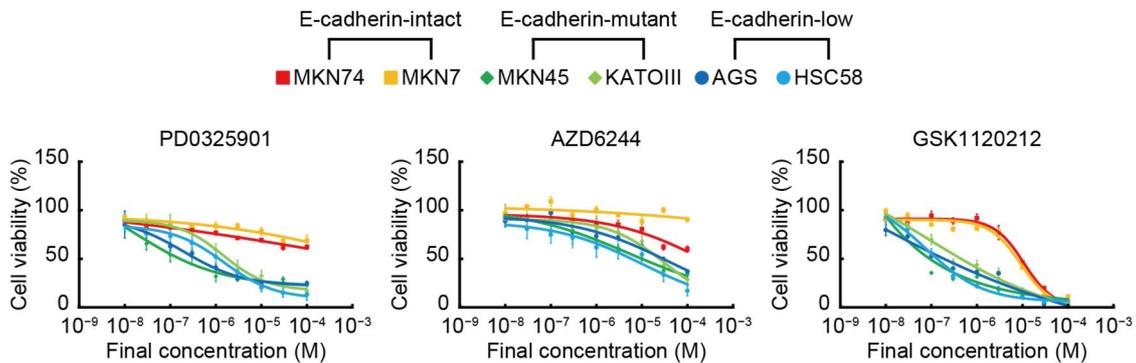
(6) 皮下移植腫瘍解析、DCKO マウス原発腫瘍解析

ヌードマウスに GC 細胞株を皮下移植し、PD0325901・AZD6244・GSK1120212 を投与したところ、PD0325901・GSK1120212 投与群では腫瘍増殖抑制効果が顕著に認められた。特に低濃度 (3mg/kg/day) で著効する GSK1120212 に注目し、DCKO マウスに投与したところ、わずかではあるが予後改善効果が認められた。GSK1120212 投与群の DCKO マウスのがん遺残組織では cleaved caspase 3 陽性細胞が多数認められ、アポトーシスが誘導されていたが、線維芽細胞が多数残存しており、腫瘍体積自体はあまり変化していないことがわかった。



(7) ヒト胃がん細胞の薬剤感受性解析

ヒト胃がん細胞株に MEK 阻害剤を投与したところ、E-cadherin 正常株 (MKN74, MKN7) と比較して、E-cadherin 変異株 (MKN45, KATOIII)・E-cadherin 陰性株 (AGS, HSC58) には MEK 阻害剤が著効することがわかった。



[考察]

バイオインフォマティクス解析・免疫組織化学解析によりマウススキルス胃がんでは RTK/RAS/MAPK 経路が活性化しており、同経路に対する分子標的治療薬である MEK 阻害剤が特異的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、ヒト胃がんにおいても E-cadherin 異常細胞は MEK 阻害剤感受性であり、ヒトスキルス胃がんにも MEK 阻害剤が有効である可能性が示唆された。

MEK 阻害剤は、免疫不全マウス皮下移植腫瘍モデルでは顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められたが、DCKO マウス原発腫瘍モデルでは予後改善効果は軽微であった。スキルス胃がんの特徴として線維芽細胞の増生があるが、DCKO マウスのスキルス胃がんにおいて MEK 阻害剤投与により腫瘍細胞はアポトーシスにより減少しているが、線維芽細胞は残存していた。MEK 阻害剤単独治療では DCKO マウスの死亡原因である胃がんからの出血・幽門狭窄による体重減少の改善には至らなかったためであると考えられた。これは、微量の出血が致命的であったり、わずかな腫瘍増大でも幽門狭窄が生じたりするなど、マウス個体が小さいことに起因しており、ヒトスキルス胃がん治療においては臨床問題となる可能性は低いと考えられた。

近年、スキルス胃がんの網羅的マルチオミクス解析により約半数の症例で KRAS 変異・KRAS, FGFR2, MET, HER2, EGFR 増幅などの RTK/RAS/MAPK 経路異常が認められるという報告 (Tanaka et al. Nat Cancer 2021) もあり、RTK/RAS/MAPK 経路がスキルス胃がんの治療標的として有望である可能性が高い。本研究で有効性が確認された MEK 阻害剤 GSK1120212 はトラメチニブとして保険収載されており、悪性黒色腫・非小細胞肺がんに対する治療薬として認可されている。スキルス胃がんマウスモデルでの臨床試験も済みであり、スキルス胃がん患者へのトラメチニブ投与について臨床試験を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shu Shimada
2. 発表標題 Identification of selective inhibitors of mouse E-cadherin/p53-deficient diffuse-type gastric cancer cells
3. 学会等名 Post A3-2020 Symposium on Epigenetic Signature of Carcinogenesis (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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		
韓国	Department of Pathology	Seoul National University	Prof. Woo Ho Kim