

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16175

研究課題名（和文）がん組織におけるHGF-METシグナル活性化機構の解明と、その阻害療法の開発

研究課題名（英文）Investigation of activation mechanisms and exploration of inhibition therapy of HGF-MET signal in cancer microenvironment

研究代表者

木脇 拓道 (Kiwaki, Takumi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40866068

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）：がん周囲微小環境において間質から供給される肝細胞増殖因子 HGF およびがん細胞に存在する受容体 MET で構成される HGF 依存性 MET 活性化シグナルの意義および阻害療法について解析を行った。HGF 依存性 MET シグナルは、Hepatocyte growth factor inhibitor-1 (HAI-1) によって制御されており、HAI-1 発現低下によって MET を介した細胞増殖が亢進した。HAI-1 発現低下腫瘍に対して、HAI-1 と類似の機能を有する合成 HGF 活性化阻害剤を投与したところ、壊死領域が増加し、合成 HGF 活性化阻害剤の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HGF 依存性 MET 活性化の制御は、転移性腫瘍や抗がん剤耐性を獲得した腫瘍に対して、新たな治療選択肢を提供する。本研究では、HGF-MET シグナルが亢進している一部の腫瘍において、合成 HGF 活性化阻害剤が治療効果を発揮することが実験動物レベルで示唆された。今後の研究の進展により、合成 HGF 活性化阻害剤の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the significance and inhibitory therapy of the HGF-dependent MET activation signaling, which consists of the stromal-derived hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor MET on cancer cells. We showed that HGF-dependent MET signaling is regulated by hepatocyte growth factor inhibitor-1 (HAI-1), and that decreased expression of HAI-1 enhanced MET-mediated cell proliferation. Synthetic HGF activation inhibitors with functions similar to HAI-1 increased necrotic areas in tumors with reduced HAI-1 expression. The results suggest the usefulness of synthetic HGF activation inhibitors.

研究分野：人体病理学

キーワード：MET HGF がん周囲微小環境 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ型受容体 MET は、がん細胞の細胞膜上に広く発現し、その活性化はがん細胞の生存・増殖・浸潤に寄与する。MET は肝細胞増殖因子 (HGF) と結合して活性化されるが、HGF の産生・成熟にはがん周囲微小環境が重要な役割を果たしている (図 1)。がん関連線維芽細胞から分泌された HGF 前駆体 (pro-HGF) はがん細胞膜上に発現するセリンプロテアーゼである Matriptase や Hepsin、血漿中に存在する HGF activator (HGFA) などによって切断されて成熟し、成熟した HGF は MET に結合し下流シグナルを伝達する (HGF-MET シグナル)。がん細胞にみられる HGF-MET シグナル異常活性化の機序として、MET 遺伝子の変異や増幅による自己活性化に加え、がん周囲微小環境から供給される HGF を介した MET の活性化、すなわち HGF 依存性 MET 活性化の重要性が指摘されている。

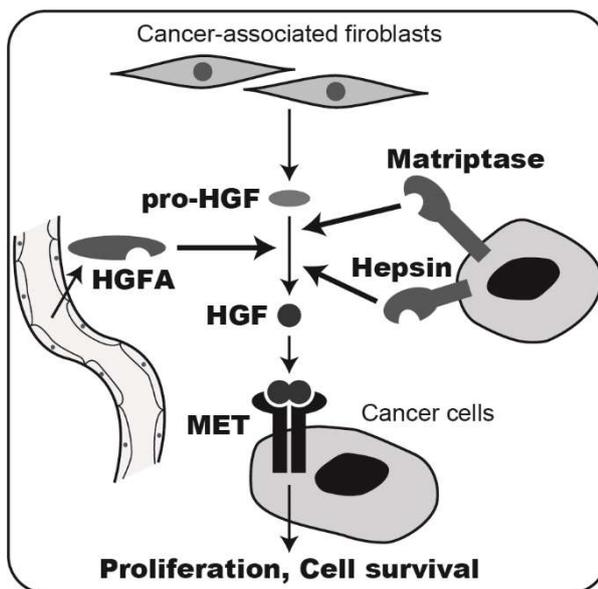


図 1 がん周囲微小環境における HGF 依存性 MET 活性化機構

2. 研究の目的

HGF 依存性 MET 活性化の制御は、HGF-MET シグナル標的療法の新たな選択肢となるのみならず、分子標的治療薬耐性獲得後の二次治療としても期待される。しかしながら、HGF 依存性 MET 活性化の詳細な分子機構や、その阻害戦略についての知見は限られており、さらなる検討が求められている。そこで本研究では、がん周囲微小環境における HGF 依存性 MET 活性化に焦点を当て、マウスモデルを用いてその分子機構を明らかにするとともに、合成 HGF 活性化阻害剤の効果を検討し、新たな HGF-MET シグナル標的療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた HGF 依存性 MET 活性化機構の解析

口腔扁平上皮癌細胞株 SAS および HSC3 を用いて、癌細胞における HGF 依存性 MET 活性化機構を解析した。まず、SAS および HSC3 における HGF および MET の発現を RT-PCR 法で検討し、MET リン酸化の有無をウエスタンブロット法で確認した。さらに、HGF 活性化に関与する Hepatocyte growth factor activator inhibitor (HAI)-1 および HAI-2 などの関連分子の発現も RT-PCR 法で検討した。次いで、siRNA を用いた HAI-1 のノックダウンおよび CRISPR-Cas9 を用いた HAI-1 のノックアウトを行い、ノックダウン・ノックアウト細胞 (SAS HAI-1-KD および HSC3 HAI-1-KO) における MET リン酸化の程度をウエスタンブロット法で検討した。

(2) in vitro での合成 HGF 活性化阻害剤の作用検討

前項で作成したノックアウト細胞に対し、合成 HGF 阻害剤 ZFH7116 を投与して細胞増殖能や MET リン酸化の程度を評価した。また、生体内での HGF-MET シグナルを再現するため、線維芽細胞株 MRC5 の培養上清をノックアウト細胞株に添加したうえで、ZFH7116 を投与して細胞増殖能や MET リン酸化の程度を評価した。

(3) in vivo での合成 HGF 活性化阻害剤の作用検討

HAI-1 KO 細胞 (SAS および HSC3) をヒト HGF 導入 SCID マウス (hHGF-KI マウス) に皮下移植し、腫瘍形成能、腫瘍径、組織形態および MET リン酸化の程度を評価した。さらに、腫瘍移植 hHGF マウスに ZFH7116 を腹腔内投与し、腫瘍径や組織形態、MET リン酸化の程度を評価した。

(4) 患者腫瘍由来オルガノイドおよびマウス移植モデルの樹立

3次元培養系で HGF 依存性 MET 活性化機構を解析することを目的として、患者腫瘍由来オルガノイド (Patient-derived organoid; PDO) やマウス移植モデル (Patient-derived xenograft; PDX) を作成した。口腔癌や大腸癌の手術検体から組織を採取し、コラゲナーゼで細胞を分離してマトリゲルに包埋する方法 (Sato T, et al. Gastroenterology 2011;141(5):1762-1772) で PDO を作成した。また、患者腫瘍組織を直接 SCID マウスに皮下移植し、PDX を作成した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた HGF 依存性 MET 活性化機構の解析

使用した口腔扁平上皮癌細胞株 SAS および HSC3 においては、MET および HAI-1 の発現がみられたが、HGF の発現はみられなかった。いずれの細胞株においても MET リン酸化は確認できなかったが、ヒト HGF (hHGF) またはマウス HGF (mHGF) を添加すると MET のリン酸化がみられた。mHGF 添加でみられる MET リン酸化は限定的で、下流シグナルを伝達する Tyr 1349 のリン酸化は確認できなかったことから、HGF-MET シグナルの再現には mHGF ではなく hHGF の存在が必須であることが確認された。

HAI-1 発現を減弱させた SAS HAI-1-KD および HSC-HAI1-KO 細胞株においては、いずれも MET リン酸化が亢進し、細胞増殖能の亢進もみられた。このことから、HAI-1 が MET リン酸化を制御し、細胞増殖を抑制していることが示唆された。

(2) in vitro での合成 HGF 活性化阻害剤の作用検討

SAS HAI-1-KD および HSC3 HAI-1-KO 細胞株に ZFH7116 を添加しても、MET リン酸化や細胞増殖能には有意な影響を及ぼさなかった。しかし、pro-HGF を含んでいると想定される線維芽細胞 MRC5 の培養上清を細胞株に添加した上で ZFH7116 を投与すると、ZFH7116 によって細胞増殖能が低下する傾向が見出された。ただし、この実験については検討が十分ではなく、in vitro における合成 HGF 活性化阻害剤の作用については今後も継続して研究を行っていく必要がある。

(3) in vivo での合成 HGF 活性化阻害剤の作用検討

SAS HAI-1-KD 細胞株およびコントロール株を hHGF-KI マウスに移植した。コントロール細胞株の移植実験では、形成された腫瘍の MET リン酸化の程度は hHGF-KI マウスおよび HGF 野生型マウスで変化がみられなかったが、HAI-1-KD 細胞株の移植実験では、hHGF-KI マウスに移植した群は野生型マウス群と比較して有意に MET リン酸化が亢進した (図2)。形成された腫瘍の大きさも、有意差はみられなかったものの、hHGF-KI マウスでより大きな腫瘍が形成される傾向がみられた。この結果から、HAI-1 発現が低下した腫瘍細胞においては、HGF を介した MET リン酸化の亢進により、腫瘍増殖が亢進することが示唆された。なお、HSC3 HAI-1-KO 細胞においては hHGF-KI マウスに移植しても野生型マウスとの間で腫瘍形成能や増殖能に明らかな変化を認めなかった。

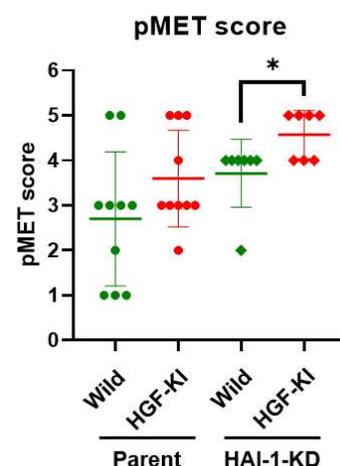
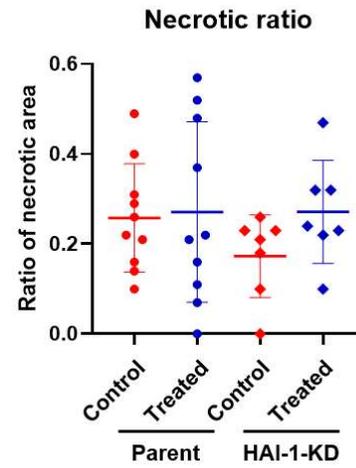


図2 移植腫瘍における MET リン酸化

次いで、hHGF-KI マウスに SAS HAI-1-KD 細胞株を移植した実験系を用いて、ZFH7116 を腹腔内投与し、腫瘍径や壊死領域の大きさ、MET リン酸化の程度を検討した。薬剤投与群と非投与群との間で、MET リン酸化の程度や腫瘍径には顕著な差はみられなかったものの、壊死領域の割合は、薬剤投与群において上昇する傾向がみられた (図 3)。実験系の選択や薬剤の投与経路・投与期間、薬剤自体の構造など更なる検討を要する点は多く残されているが、HAI-1 発現が減弱した腫瘍においては ZFH7116 などの合成 HGF 活性化阻害剤が有効である可能性を見出すことができた。



(4) 患者腫瘍由来オルガノイドおよびマウス移植モデルの樹立

大腸癌 5 例および口腔癌 2 例の PDO 作成を試みた。

大腸癌は 5 例中 4 例、口腔癌は 2 例いずれもで PDO を樹立することができ、成功率は 85.7% (6/7) であった (表 1)。また、4 例で PDX 作成を試み、そのうち 1 例 (25%, 1/4) で安定して継代することに成功した。今後、樹立した PDO および PDX モデルを HGF 依存性 MET 活性化機構の解明に活用していく予定である。

図 3 阻害剤投与実験における腫瘍壊死領域

Cell line	Primary site	Histological type	pT	PDO	PDX
MPL-CR1	Colon (C)	Adeno ca. (tub2)	T3	○	×
MPL-CR2	Rectum (Rb)	Adeno ca. (muc)	T4a	○	○
MPL-CR3	Rectum (RS)	Adeno ca. (tub2)	T3	○	×
MPL-CR4	Rectum (Ra)	Adeno ca. (tub1)	T1	×	—
MPL-CR5	Colon (S)	Adeno ca. (tub2)	T4	○	—
MPL-Or1	Tongue	Squamous cell ca. (well diff.)	T3	○	×
MPL-Or2	Tongue	Squamous cell ca. (well diff.)	T1	○	—

表 1 本研究で樹立した PDO, PDX

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Koji, Yamashita Fumiki, Kawaguchi Makiko, Izumi Aya, Kiwaki Takumi, Kataoka Hiroaki, Kaneuji Takeshi, Yamashita Yoshihiro, Fukushima Tsuyoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Decreased prostatic expression is associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1434 ~ 1445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00575-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Fumiki, Kaieda Takashi, Shimomura Takeshi, Kawaguchi Makiko, Lin Chen Yong, Johnson Michael D., Tanaka Hiroyuki, Kiwaki Takumi, Fukushima Tsuyoshi, Kataoka Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of the polycystic kidney disease domain in matriptase chaperone activity and localization of hepatocyte growth factor activator inhibitor 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Izumi Aya, Yamamoto Koji, Kawaguchi Makiko, Yamashita Fumiki, Fukushima Tsuyoshi, Kiwaki Takumi, Tanaka Hiroyuki, Yamashita Yoshihiro, Kataoka Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Insufficiency of hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 confers lymphatic invasion of tongue carcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiwaki Takumi, Kataoka Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Patient-Derived Organoids of Colorectal Cancer: A Useful Tool for Personalized Medicine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 695 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm12050695	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木脇 拓道
2. 発表標題 患者由来がんオルガノイドを用いた新規抗がん療法の開発
3. 学会等名 第39回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木脇 拓道
2. 発表標題 ヒト HGF 導入 SCID マウスを用いた HGF-MET シグナル解析と阻害治療の開発
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

宮崎大学医学部病理学講座腫瘍・再生病態学分野 http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/patho2/ ResearchGate https://www.researchgate.net/profile/Kiwaki-Takumi 宮崎大学医学部病理学講座腫瘍・再生病態学分野 http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/patho2/ ResearchGate https://www.researchgate.net/profile/Kiwaki-Takumi
--

6. 研究組織			
<table border="1"><thead><tr><th>氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)</th><th>所属研究機関・部局・職 (機関番号)</th><th>備考</th></tr></thead></table>	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
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
---------	---------