

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790382

研究課題名(和文)大腸がんにおけるmTORC1経路の役割の解明

研究課題名(英文)The role of mTOR signaling in colorectal cancer

研究代表者

藤下 晃章(Fujishita, Teruaki)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・研究員

研究者番号：50511870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：様々な種類のがんにおいて、細胞の成長・タンパク合成を制御するmTORC1経路の活性化が認められているが、大腸がんにおけるmTORC1経路の役割は十分解明されていない。本研究では大腸がんモデルマウスにmTOR阻害薬を投与し、大腸がん形成に与える影響を解析することで、mTORC1経路が大腸がんの治療標的になりうるか検討した。mTOR阻害薬投与は大腸がんの拡大を抑制し、モデルマウスの生存期間を延長させたが、悪性の指標である浸潤そのものは抑制できなかった。mTOR阻害薬投与によりフィードバック経路が活性化していたことから、この経路を抑制する薬剤との併用が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：mTORC1 signaling promotes cell growth and protein synthesis, and is frequently activated in various types of cancer. However, its involvement in the formation and progression of colorectal cancer remains unclear. This study investigated the roles of mTORC1 signaling in colorectal cancer by treating cis-Apc/Smad4 compound mutant mice, a mouse model for colon adenocarcinoma, with mTOR inhibitors. Although both the mTORC1-selective inhibitor RAD001 and the mTOR kinase inhibitor AZD8055 reduced colon cancer formation and prolonged the survival of cis-Apc/Smad4 mice, they failed to suppress the local invasion of colon cancer cells. Analysis of possible feedback loops revealed EGFR activation in colorectal cancer cells treated with the mTOR inhibitors, suggesting that the resistance to the mTOR inhibitors might have been acquired through activation of EGFR. Combination treatment with EGFR inhibitors may potentiate the efficacy of the mTOR inhibitors against colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 実験病理学

キーワード：腫瘍 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡者数は年々増大しており、特に大腸がんによるものが著しく増加している。大腸がん治療の第一は外科的切除であるが、転移したがんの治療は切除が困難なため予後が極めて悪い。このことは効果的な大腸がんの治療薬が無いことを示しており、治療薬の開発が急務となっている。

様々ながん組織においてタンパク合成や細胞の成長を制御する mTORC1 経路の活性化が認められているが、大腸がんにおける mTORC1 経路の活性化状態やその阻害剤に対する効果は不明である。申請者はこれまでに良性腫瘍である腸管ポリープの形成過程で mTORC1 経路の活性化が必要である事を家族性大腸ポリープ症のモデルマウスである *Apc*^{Δ716} マウスを用いて証明した。特に腸管ポリープ (良性腫瘍) が拡大していく過程で mTORC1 経路が活性化し、細胞増殖などに関わるタンパク合成を調節する事を発見した。また mTORC1 阻害薬を投与することで腫瘍形成を強力に抑制し、*Apc*^{Δ716} マウスの生存期間を延長する事も報告している。

本研究ではこの mTORC1 経路が大腸がんの浸潤・転移においてどのような役割を果たしているのかを大腸がんモデルマウスである *cis-Apc/Smad4* 複合変異マウスを用いて検討する。

2. 研究の目的

本研究では浸潤性の腸管腺がんを形成する大腸がんモデルマウスにおける mTORC1 経路の活性化状態を検討する。また mTORC1 阻害薬、および近年臨床試験での使用が始まっている mTOR キナーゼ阻害薬を投与し、大腸がん形成に与える影響を調査することで、mTORC1 経路が大腸がんの治療標的になりうるかを含め、大腸がんにおける mTORC1 経路の役割を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)大腸がん(腸管腺がん)における mTORC1 経路の活性化状態の検討。

大腸がんモデルマウスである *cis-Apc*^{Δ716}/*Smad4*^{+/+} 複合変異マウス (*cis-Apc/Smad4* マウス)を用い mTORC1 経路の活性化状態を確認する。活性化の指標として mTORC1 の基質である p70S6 キナーゼ、さらにその基質である S6 タンパクのリン酸化状態を免疫染色法およびウェスタンブロット法により検証する。S6 のリン酸化は Cell Signaling Technology 社の anti-Phospho-S6 ribosomal protein 抗体を用いて検出する。

(2)大腸がん(腸管腺がん)に対する mTOR 阻害薬の効果の検討。

mTORC1 阻害薬 Everolimus (RAD001)を 10 mg/kg, または mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 を 20 mg/kg の用量で 1 日 1 回 *cis-Apc/Smad4* マウスに経口投与する。腸管腺がんに対する

影響はポリープ (腸管腺がん) の大きさおよび形成数を実体顕微鏡により、また腸管腺がんの浸潤度は病理学的解析により評価する。血管新生は von Willebrand factor (vWF) を免疫染色により、細胞増殖は BrdU 標識により測定し、mTOR 阻害薬による影響を検証する。

(3)大腸がん細胞株に対する mTOR 阻害薬および Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体阻害薬の効果の検討。

mTOR キナーゼ阻害薬 AZD8055 1 μM、EGF 受容体阻害薬 Erlotinib 10 μM を単独もしくは併用し、大腸がん細胞株の増殖に与える影響を検証する。

4. 研究成果

(1) 大腸がん(腸管腺がん)における mTORC1 経路の活性化状態の検討。

mTORC1 経路の活性化をリン酸化 S6 に対する抗体を用いて免疫染色により検討したところ *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管正常部と比較して腺がん部分でリン酸化 S6 が強く染まっていた (図 1 上段、下段 N:小腸正常部、下段 P:腺がん管腔側)。またウェスタンブロット法により同様の結果を得ている。興味深いことに腸管腺がんの浸潤先端も一部の腺がん細胞がリン酸化 S6 陽性である事から、mTORC1 経路を抑制する事で大腸がんの浸潤も抑制する可能性を示唆している (図 1 下段 IN;腺がん浸潤部)。以上の結果から、以前報告した腸管良性腫瘍と同様、腸管腺がんでも mTORC1 経路が活性化していることを確認した。

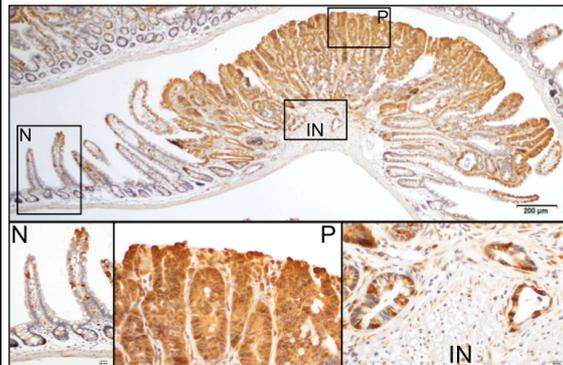


図 1: *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管 (図は小腸) 腺がんにおける mTORC1 経路の活性化。上段枠内の拡大をそれぞれ下段に示す。

(2)大腸がん(腸管腺がん)に対する mTORC1 阻害薬の効果。

腸管腺がんにおける mTORC1 経路の活性化が mTORC1 阻害薬 (RAD001) により抑制できるかどうかを検討した。3 日間投与した *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腺がんにおいてリン酸化 S6 の免疫染色を行ったところ、コントロール (図 1) と比較して、RAD001 を投与した *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管ではリン酸化 S6 陽性細胞が減少していた (図 2 上段、

下段 N:小腸正常部、下段 P:腺がん管腔側))。さらに腸管腺がんの浸潤先端におけるリン酸化 S6 陽性細胞も減少していた(図 2 下段 IN;腺がん浸潤部)。またウェスタンブロット法により同様の結果を得ている。以上の結果から、良性腫瘍と同様に腸管腺がんの mTORC1 経路も RAD001 の投与により抑制可能であり、腺がん形成を抑制することが期待できる。

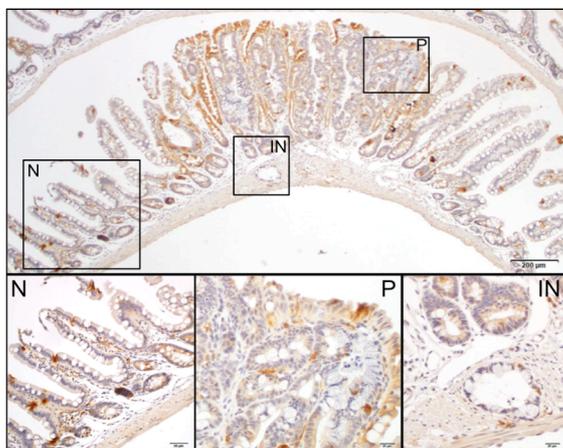


図2:mTORC1 阻害薬を投与した *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管(図は小腸)腺がんにおけるリン酸化 S6 の免疫染色。上段枠内の拡大をそれぞれ下段に示す。

mTORC1 阻害薬(RAD001)により腸管腺がん形成が抑制できるかどうかを検討するため、mTORC1 阻害薬 RAD001 を6週齢から14週齢までの8週間投与した。プラセボ投与群と比較して RAD001 を投与した *cis-Apc/Smad4* マウスのポリープ数(直径 1.5mm 以上)はおおよそ 3%にまで減少していた。さらに血管新生および細胞増殖が RAD001 投与群で有意に減少していた。一方、腸管腺がんの浸潤に対する影響はポリープ数が減少し比較するために必要な数に達しなかったことから、評価できなかった。

従って浸潤が起こり始める 10 週齢から 18 週齢までの 8 週間 RAD001 を投与することで、腺がん形成(ポリープ数)および浸潤に与える影響を検討した。18 週齢まで生存したプラセボ投与群はすべて死亡したため、14 週齢のプラセボ群と比較した場合、RAD001 投与群でおよそ 30%のポリープ数の減少が認められた。筋層および漿膜に浸潤していた腺がんはプラセボ投与群(14 週齢)ではおよそ 50%で確認できた(直径 2mm 以上の腸管腺がん)。一方 RAD001 投与群(18 週齢)ではおよそ 70%の腺がん(直径 2mm 以上)で確認できた。以上の結果から腸管腺がんの形成(ポリープ数)に対して mTORC1 経路の活性化は促進的に働いているが、腺がんの浸潤においては mTORC1 経路の活性化に依存しない事を示唆している。

(3)mTOR キナーゼ阻害薬による大腸がん(腸管腺がん)形成に対する影響。

セリンスレオニンキナーゼである mTOR は mTORC1 と mTORC2 の二種類の複合体を形成する。mTORC1 が上述したようにタンパク合成などを制御する一方、mTORC2 は細胞増殖や抗アポトーシスに関わるキナーゼである Akt の 473 番目のセリンをリン酸化する。RAD001 など mTORC1 阻害薬を処置した結果、フィードバック効果により mTORC2 が活性化し Akt のリン酸化(活性化)を促進することが既に報告されている。従って *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腺がんにおいても同様、RAD001 の投与により Akt の活性化が生じ、その結果浸潤が継続していると推測できる。近年 mTOR キナーゼ活性を直接阻害する化合物(mTOR キナーゼ阻害薬)が開発されており、これらは mTORC1 だけでなく mTORC2 も抑制する。我々は mTOR キナーゼ阻害薬である AZD8055 を *cis-Apc/Smad4* マウスに投与し腸管腺がんに対する効果を検証した。2 週間の短期間投与でも 1.5mm 以上の腺がん(ポリープ)形成数はコントロール群と比べおよそ 30%以下にまで減少していた(図 3)。一方、腺がんの浸潤に対する抑制効果は認められなかった。



図3: *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管(図は小腸)腺がん形成に対する mTOR 阻害薬の効果。左から Control、RAD001 10 mg/kg、AZD8055 20 mg/kg を 2 週間投与した小腸腺がんを示す。

以上の結果から腸管腺がんの拡大には mTORC1 経路および mTORC2 経路の活性化が重要である事が明らかとなった。一方、腺がんの浸潤に対しては mTOR 経路に非依存的か、もしくはフィードバック効果により腺がん細胞が mTOR 阻害薬に対して抵抗性を獲得している可能性が示唆された。

(4)腸管腺がんにおける mTOR 阻害薬によるフィードバック経路の同定。

mTOR キナーゼ阻害薬によるフィードバック経路を同定するため、リン酸化受容体型チロシンキナーゼアレイを用い AZD8055 を投与した *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腺がんの解析を行った。興味深いことに AZD8055 の投与により複数の受容体型チロシンキナーゼが活性化していたが、特に EGF(Epidermal Growth Factor)受容体の活性化が顕著に認められた。これらの結果から EGF 受容体の活性化を介して *cis-Apc/Smad4* マウスにおける腸管腺がんは mTOR 阻害薬に対する耐性を獲得していることを示唆している。

従って上記の可能性をより詳細に検証す

るために大腸がん細胞株を用い mTOR 阻害薬のフィードバック効果による EGF 受容体の活性化を調査した。AZD8055 1 μM を大腸がん細胞株に処置したところ *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腺がんと同様 EGF 受容体の活性化(リン酸化)が認められた。EGF 受容体の阻害薬である Erlotinib を併用したところ、それぞれ単独で処置したよりも強力に細胞増殖抑制効果を引き起こし、さらに単独では確認できなかった細胞死のマーカーが発現していた。

以上の結果から、大腸がんにおける mTOR 経路の役割は、初期腺がんの管腔側への拡大には重要であるが、浸潤過程においてはフィードバック経路の活性化により、EGF 受容体の活性化を介し mTOR 阻害薬に対して抵抗性をもたらす。従って mTOR 阻害薬を用いて大腸がんを治療するためには、EGF 受容体阻害薬などを併用する必要がある

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshiro Itatani, Kenji Kawada, Teruaki Fujishita, et al.

Loss of SMAD4 from colorectal cancer cells promotes CCL15 expression to recruit CCR1+ myeloid cells and facilitate liver metastasis. *Gastroenterology*. 査読有り, 2013. 1064-1075.

DOI: 10.1053/j.gastro.2013.07.033.

[学会発表] (計 2 件)

① 藤下晃章, 武藤誠, 青木正博

The mTOR kinase inhibitor AZD8055 suppresses the expansion of intestinal adenocarcinoma in *cis-Apc/Smad4* mice. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

② 藤下晃章, 武藤誠, 青木正博

Suppression of intestinal adenocarcinoma formation in *cis-Apc/Smad4* mice by the mTOR kinase inhibitor AZD8055. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)

[図書] (計 2 件)

① 藤下晃章, 青木正博

JNK シグナル伝達経路は mTORC1 の活性化を介して *Apc*^{Δ716} マウスにおける腸管腫瘍形成を促進する. 日本メディカルセンター. *INTESTINE* Vol. 16 No. 05, 2012 年, 471-473

② 藤下晃章, 青木正博

秀潤社, mTOR と発がん. *細胞工学* Vol. 31 No. 12, 2012 年, 1347-1354

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤下 晃章 (FUJISHITA, Teruaki)

愛知県がんセンター (研究所)・分子病態
学部・研究員

研究者番号: 50511870

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: