

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07926

研究課題名(和文) 癌初代培養CTOS法を用いた、大腸癌新規治療とバイオマーカー同時開発の基盤確立

研究課題名(英文) Simultaneous development of novel treatment and companion biomarker of colorectal cancer based on CTOS method

研究代表者

近藤 純平 (Jumpei, Kondo)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80624593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CTOSパネルを用いた感受性試験の結果、BMP阻害剤が新規治療薬候補となりうることを見出した。シグナル経路の評価の結果、BMP阻害剤の増殖抑制効果が弱い群ではBMPR/SMAD経路の恒常的な不活性化状態や、BMPリガンドの自己分泌欠損などがみられた。BMP阻害剤感受性例では、BMP阻害によるMEK/ERK経路の抑制がみられた。BMP阻害剤と併用効果のある薬剤としては、cetuximabよりもMEK阻害剤において、より強い効果が認められた。In vitroのBMP阻害の効果と、マウス移植腫瘍を用いたin vivoでのBMP阻害剤/MEK阻害剤の併用効果には相関する傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTOSを用いた薬剤感受性アッセイ、移植腫瘍治療などにより、新規治療法の候補が導出された。またIn vitroでのCTOSを用いた感受性アッセイは、機能的バイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。さらに、併用効果をもたらす分子機序およびバイオマーカー開発に向け、取得したデータの解析を継続することで、より有効な治療法や患者選択に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Drug sensitivity assay using colorectal CTOS suggested that BMP inhibitor is a candidate for a novel drug in a portion of colorectal cancer cases. Constitutive inactivation of BMP/SMAD pathway as well as lack of autocrine BMP ligands might be the cause of insufficient effect of BMP inhibitor. BMP inhibition suppressed MEK/ERK pathway in sensitive cases. Combination effect was observed with MEK inhibitor, but not with cetuximab, both in vitro and in vivo xenograft experiments. In vitro sensitivity assay results, which well correlated with in vivo effect of BMP/MEK inhibition is suggested to be a potential functional biomarker.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 オルガノイド 薬剤感受性 バイオマーカー 多様性

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する EGFR を標的とした分子標的治療薬 (セツキシマブ、パニツムマブ) は、既存の化学療法との併用により奏効率の向上をもたらした。しかし KRAS, BRAF 遺伝子変異や MET, HER2 遺伝子増幅などが検出される症例では抗 EGFR 療法は有効でなく、これらの症例への治療法開発が大きな課題である。耐性例への治療法は開発されつつあるが選択肢は少ない。例えば KRAS 変異症例に対してはパニツムマブ + MEK 阻害剤併用療法が第 相臨床試験中であるが、さらなる治療選択肢の開発が望まれている。

このように、進行癌の予後改善のためには新しい治療法の開発のみならず、適切な治療法を選択するバイオマーカーの開発が必要である。さらに、臨床試験の成功率を向上させ、承認後の患者不利益を最小限に抑えるため、新規治療法とバイオマーカーを同時に開発することが望まれる。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、新しい癌 3 次元初代培養系 CTOS 法を開発し、大腸癌における分子標的治療耐性症例への治療とバイオマーカー開発の道筋を示してきた。先行研究では、大腸癌 CTOS を用いて症例間のセツキシマブ感受性を比較検討し、KRAS 変異症例には 2 つのグループ、つまりセツキシマブ完全無効群 (無治療との差なし) と部分有効群 (縮小効果はないが、無治療より有意に増大を抑制) が存在することを明らかにした。さらに、セツキシマブ部分有効群では MEK 阻害剤とセツキシマブとの併用効果が得られる一方、完全無効群では併用効果も得られないことを見出し、両群を層別化する機能的バイオマーカーの候補も報告した。本課題ではその成果を拡大し、これまで蓄積してきた CTOS パネルを用いて、新規治療法とバイオマーカーの同時開発を基盤技術として確立することを目的とする。この汎用性の高い基盤技術が確立すれば、様々な癌の新規治療の開発が加速される。

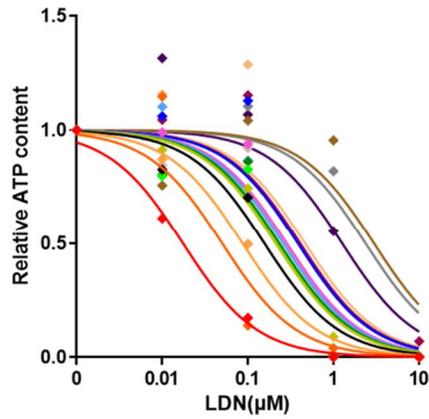
3. 研究の方法

予備実験では、一部の CTOS で BMP/MEK 阻害剤併用セツキシマブ療法が *in vivo*, *in vitro* ともに有効なことが確認された。そこで *In vitro* において CTOS パネルを用いた薬剤感受性評価を行い、感受性の症例間多様性を検討した。さらに、*In vitro* の結果と *in vivo* での治療効果の相関性を確認するため、マウス移植腫瘍の治療実験を行った。また、分子的バイオマーカー開発を行うべくシグナル経路の活性を評価し、症例間の多様性を評価した。

4. 研究成果

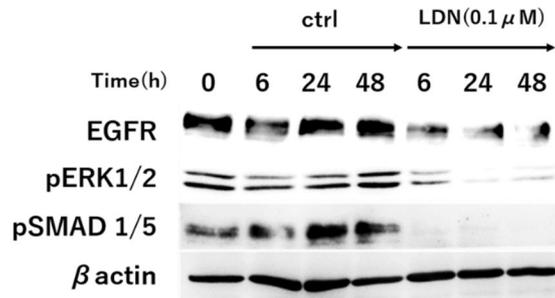
本研究では、CTOS パネルを用いた感受性試験の結果、BMP 阻害剤が新規治療薬候補となりうることを見出した。多数の大腸がん CTOS ラインを用いた BMP 阻害剤感受性試験により、感受性症例の詳細な分布が明らかとなった (図 1)。BMP 阻害剤への感受性は、明らかな感受性例 / 耐性例の 2 群に分類されるのではなく、その IC50 はむしろ正規分布に近い分布を示した。シグナル経路の評価の結果、BMP 阻害剤により増殖が抑制される機序・されない機序については、単一の因子により規定されるのではなく、複数の機序が存在することが明らかとなった。例えば、BMP 阻害剤に対し比較的效果が弱い群では、BMPR/SMAD 経路の恒常的な不活性状態や、BMP リガンドの autocrine の欠損など、多様な機序がその原因となっていた。また BMP 阻害剤感受性例の多くで

【図 1】
 BMP阻害剤LD193189(LDN)の複数症例由来のCTOSにおける感受性試験結果。
 各濃度のLDNを添加し5日間培養後、ATP活性を測定することで生存性・増殖率の指標とした。各色のdataが1症例分の結果を表す。



は、BMP 阻害による MEK/ERK 経路の抑制がみられた。MEK/ERK 経路の阻害には、EGFR タンパクの減少が相関しており、BMP 阻害により直接的あるいは間接的に EGFR を制御する機序の存在が示唆された(図 2)。

【図 2】
 BMP阻害剤(LDN193189) の添加により、総EGFRおよび下流のERK1/2のリン酸化が抑制される症例のウェスタンブロット。同症例では、in vivoでのMEK阻害剤との併用効果もみとめた。



BMP 阻害剤と併用効果のある薬剤としては、cetuximab よりも MEK 阻害剤において、より強い効果が認められた。In vitro の BMP 阻害の効果と、マウス移植腫瘍を用いた in vivo での BMP 阻害剤/MEK 阻害剤の併用効果には相関する傾向が認められた。In vitro での CTOS を用いた感受性アッセイは、機能的バイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。さらに、併用効果をもたらす分子機序およびバイオマーカー開発に向け、取得したデータの解析を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hagihara Takeshi, Kondo Jumpei, Endo Hiroko, Ohue Masayuki, Sakai Yoshiharu, Inoue Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Hydrodynamic stress stimulates growth of cell clusters via the ANXA1/PI3K/AKT axis in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56739-7	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 -

1. 著者名 Kondo Jumpei, Inoue Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 470 ~ 470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8050470	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 -

1. 著者名 Kondo Jumpei, Ekawa Tomoya, Endo Hiroko, Yamazaki Kanami, Tanaka Norio, Kukita Yoji, Okuyama Hiroaki, Okami Jiro, Imamura Fumio, Ohue Masayuki, Kato Kikuya, Nomura Taisei, Kohara Arihiro, Mori Seiichi, Dan Shingo, Inoue Masahiro	4. 巻 110
2. 論文標題 High-throughput screening in colorectal cancer tissue-originated spheroids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 345 ~ 355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13843	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 -

1. 著者名 Endo Hiroko, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Ohue Masayuki, Inoue Masahiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Small subset of Wnt activated cells is an initiator of regrowth in colorectal cancer organoids after irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4429 ~ 4441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14683	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 -

1. 著者名 Kondo Jumpei, Huh Won Jae, Franklin Jeffrey L, Heinrich Michael C, Rubin Brian P, Coffey Robert J	4. 巻 252
2. 論文標題 A smooth muscle derived, Braf driven mouse model of gastrointestinal stromal tumor (GIST): evidence for an alternative GIST cell of origin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 441 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5552	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 Arita Takahiro, Kondo Jumpei, Kaneko Yuka, Tsutsumi Miho, Kanemaru Mai, Matsui Mari, Arakawa Yukiyasu, Katoh Norito, Inoue Masahiro, Asai Jun	4. 巻 99
2. 論文標題 Novel ex vivo disease model for extramammary Paget 's disease using the cancer tissue-originated spheroid method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 185 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.07.006	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 Kubota Satoshi, Tanaka Mie, Endo Hiroko, Ito Yu, Onuma Kunishige, Ueda Yutaka, Kamiura Shoji, Yoshino Kiyoshi, Kimura Tadashi, Kondo Jumpei, Inoue Masahiro	4. 巻 524
2. 論文標題 Dedifferentiation of neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix in hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 398 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.024	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Jumpei Kondo
2. 発表標題 Heterogeneous response to the blockade of BMP pathway in combination with RAS/MEK inhibition in colorectal cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S Shimizu, J Kondo, M Inoue
2. 発表標題 Heterogeneous response to the blockade of BMP pathway in colorectal cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤純平、井上正宏（佐々木 博己編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド	

〔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
研究 分 担 者	井上 正宏 (Inoue Masahiro) (10342990)	京都大学・医学研究科・特定教授 (14301)	

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		
米国	Vanderbilt University		