

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290053

研究課題名(和文) KRas遺伝子、またはBRAF遺伝子変異癌細胞における薬剤抵抗性のシステム解析

研究課題名(英文) Systems analysis of intrinsic resistance to MEK inhibitor in KRas- or BRAF-mutated cancer cells

研究代表者

青木 一洋 (AOKI, Kazuhiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：80511427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Ras-ERKシグナル伝達系の中のKRas遺伝子、もしくはBRAF遺伝子に変異が入った癌細胞におけるMEK阻害剤に対する抵抗性のメカニズムを解析した。その結果、BRAF変異癌細胞はMEK阻害剤を処理するとERK活性と細胞増殖が比例して減少するのに対し、KRas変異癌細胞はMEK阻害剤処理によりERK活性が減少するがmTOR経路を介して細胞増殖が維持されることが分かった。またKRas変異癌細胞はMEK阻害剤とPI3K阻害剤の併用が効果的であることも見出し、その分子メカニズムを実験と数理モデルにより明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed molecular mechanisms of intrinsic resistance to MEK inhibitor in BRAF- or KRas-mutated cancer cells. In BRAF-mutated cancer cells, MEK inhibitor linearly reduced ERK activity and cell proliferation rate, whereas KRas-mutated cancer cells showed non-linear relation between ERK activity and cell proliferation induced by MEK inhibitor, thereby showing resistance to MEK inhibitor. This was mediated by mTOR pathway, and we confirmed that co-treatment with MEK inhibitor and PI3K/mTOR inhibitor synergistically decreased cell proliferation rate. The molecular mechanisms underlying mTOR-mediated intrinsic resistance to MEK inhibitor in KRas-mutant cancer cells were further analyzed by experiments and mathematical modeling. We found that not only feedback regulations between ERK and mTOR pathways but also transcriptional regulation by ERK pathway substantially contributed to the intrinsic resistance to MEK inhibitor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：内因的抵抗性 FRETイメージング 数理モデル シミュレーション KRas BRAF ERK PI3K

1. 研究開始当初の背景

癌は過去 20 年以上にわたって日本人の死亡原因の第一位を占め、現在では年に 30 万人以上の方が癌で亡くなっており、「癌の克服を目指す研究」への社会的な要請はますます高まっている。

細胞は外界からの種々の刺激を細胞膜上の受容体で感知し、その情報を細胞内へと伝えることで細胞機能や恒常性を維持している。これが細胞内シグナル伝達である。細胞内シグナル伝達の破綻は細胞の癌化を引き起こす。その中でも Ras-ERK シグナル伝達系は細胞の増殖や分化といった根本的な細胞機能に貢献しているだけでなく、様々な腫瘍の発生に関与している。

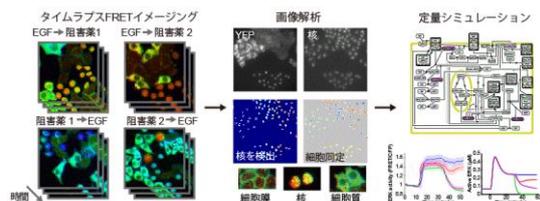
Ras-ERK シグナル伝達系の中でも、KRas 遺伝子と BRAf 遺伝子はそれぞれ全悪性腫瘍のなかで約 30%、20%の患者に変異が認められているまさにハブ遺伝子である。変異が入り活性化した KRas、BRAf タンパク質はどちらも下流の ERK 分子を活性化する。すでに、これらの遺伝子に変異が入った癌を標的とした MEK 阻害薬が開発されている。しかしながら、前臨床結果から、同一の経路を活性化するにもかかわらず、BRAf 遺伝子に変異がある細胞では MEK 阻害薬に感受性が高く、一方 KRas 遺伝子に変異が入った細胞は MEK 阻害薬に感受性が低いことが報告されている。このような分子標的薬に対して元来備えている耐性は「内因的な耐性 (intrinsic resistance)」として知られており、薬剤処理によってゲノムに変異が入って耐性が起こる「獲得的な耐性 (acquired resistance)」とは異なる。内因的な耐性については、細胞内シグナル伝達系のフィードバック制御やクロストークによって引き起こされると考えられているが、フィードバック制御のような複雑なシステムを組み込んだシグナル伝達系のシミュレーションが困難なために十分な検証がなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、KRas 遺伝子、または BRAf 遺伝子変異をもつ癌細胞に対して効果の高い分子標的薬の組み合わせとその分子機構をイメージング、数理モデルにより定量的に示すことである。先述のように、KRas 遺伝子に変異をもつ癌細胞は内在的に MEK 阻害薬に対して耐性を持つ。本研究では、(1) KRas 遺伝子変異癌細胞の内因的な MEK 阻害薬耐性の分子機構を明らかにすること、(2) (1)で明らかにした分子機構から MEK 阻害薬と既存の分子標的薬の組み合わせによる併用効果を評価すること、(3) 数理モデルによる最適な併用療法戦略の予測と検証すること、の 3 点に研究目標を絞る。

3. 研究の方法

(1) プロジェクト 1:



Ras-ERK シグナル伝達系と PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達系のクロストークやフィードバック制御を解析するために、HeLa 細胞をもちいて EGF 刺激によるこれらの分子活性の時間変化を FRET イメージングにより定量化した。標的分子は EGFR, Ras, ERK, PKA, JNK, S6K である。これらのデータを用いて Ras-ERK 経路と PI3K-Akt-mTOR 経路の定量的なシミュレーションモデルを構築し、これらのシグナル伝達系のクロストークを抽出した。

(2) プロジェクト 2:

KRas 変異癌細胞、および BRAf 変異癌細胞に ERK 活性を可視化する FRET バイオセンサー、または S6K 活性を可視化する FRET バイオセンサーを安定的に導入した細胞株をトランスポゾンにより樹立し、これらの細胞に MEK 阻害剤、PI3K 阻害剤の単独投与、もしくは併用投与し、その処理過程での活性の変化と細胞数の変化をタイムラプスイメージングにより定量化した。

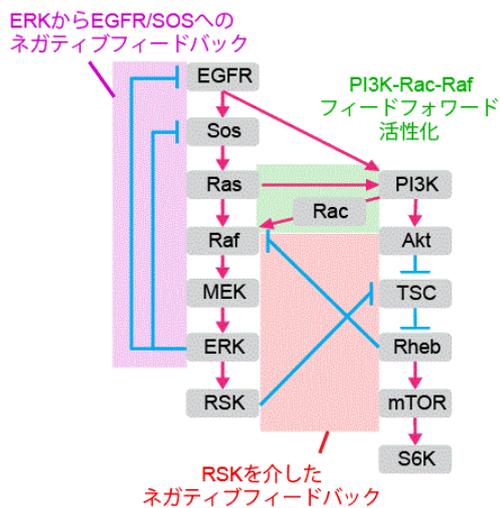
4. 研究成果

プロジェクト 1 に関して、まず FRET バイオセンサーを安定的に発現する HeLa 細胞 6 ラインを樹立し、3 ラインずつミックスしてイメージングすることで、効率の良くデータを取得するイメージング系を確立した。さらに、阻害剤として、EGFR 阻害剤、MEK 阻害剤、PI3K 阻害剤、RSK 阻害剤を EGF 刺激の前処理、後処理の組み合わせを含めて、合計 60 種類のデータを取得した。次に、これらの画像データから、画像処理により大量にデータを抽出し、時系列データの解析を行った。

次に、これまで開発してきた定量的な EGF-Ras-ERK シグナル伝達モデル (Aoki, 2011, PNAS; Kamioka, 2010, JBC; Matsunaga-Udagawa, 2010, JBC; Fujioka, 2006, JBC) をすべて統合し、さらに PI3K-Akt-mTOR シグナル伝達経路を追加した。FRET イメージングにより得られた実験データをもとに、パラメーターの値が分かっていない PI3K-Akt-mTOR 経路のパラメーター値を推測し、さらに阻害剤の結果から ERK 経路と mTOR 経路に含まれるフィードバックやクロストークを推定した。

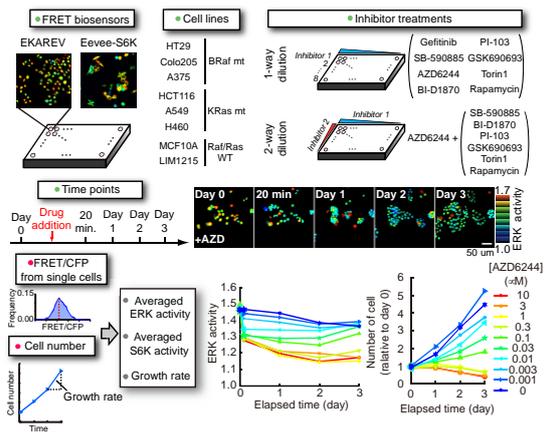
これらの解析の結果、Ras-ERK 経路と PI3K-Akt-mTOR 経路の中でドミナントに作

用するクロストーク反応を複数同定することができた。負のフィードバック経路として、ERK → Sos 経路、ERK → EGFR 経路、ERK → TSC → RheB → Raf 経路を同定し、さらにコヒーレントなフィードフォワード経路として Ras → PI3K → Raf 経路を同定した。これらのクロストーク反応を組み込むことで、EGF 刺激による ERK や Akt, S6K の活性変化、さらには阻害剤による摂動に対しても合理的に再現することができるシミュレーションモデルを構築することができた。さらには、このシステムに KRas 変異、または BRAf 変異を組み込み、MEK 阻害剤、PI3K 阻害剤の単独、もしくは併用投与による抗がん作用を検討した。数値計算の結果、ERK と Akt のリン酸化の総和が抗がん作用と強く相関することが分かった。定量的なシミュレーションモデルから KRas 変異癌細胞の MEK 阻害剤に対する内因的な抵抗性の分子機構として、恒常活性化型 KRas 変異分子が ERK だけでなく PI3K-Akt-mTOR 経路を活性化することが原因であることを見出すことができた。これらの結果は、Fujita Y, et al., FEBS J, 2014 に報告した。

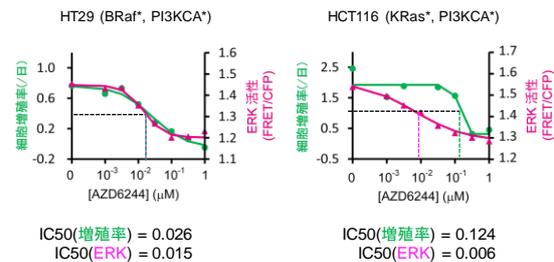


プロジェクト2では、実際の KRas 変異癌細胞株と BRAf 変異癌細胞株を用いて、MEK 阻害剤に対する内因的な抵抗性を FRET イメージングによるタイムラプス観察データを用いてより詳細に検討した。まず、ERK、または S6K の FRET バイオセンサーを安定的に発現する癌細胞株をトランスポゾンにより樹立した。この細胞を 96 well ガラス底ディッシュに播種し、電動ステージと自動焦点が設置されている倒立型蛍光顕微鏡で画像を掲示的に取得した。このとき、前のタイムポイントと同じ位置の画像を取得することで、どれだけ細胞数が増減したのかを直接測定し、細胞増殖速度を見積もった。

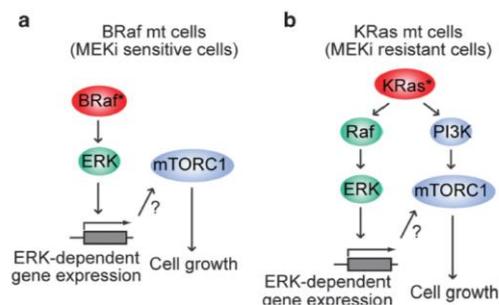
その結果、BRAf 変異癌細胞は MEK 阻害剤の濃度を上げると線形に ERK 活性が減少し、それに比例して細胞増殖速度が線形に減少することが分かった。PI3K 阻害剤に対してはほとんど応答しなかった。つまり BRAf 変異



癌細胞は ERK 経路に依存している pathway addiction 状態であることが分かった。一方、KRas 変異癌細胞は、MEK 阻害剤を処理すると、BRAf 変異癌細胞と同様、その濃度に応じて線形に ERK 活性が減少したが、細胞増殖速度は高濃度 MEK 阻害剤のときのみ減少することが分かった。しかし、PI3K 阻害剤を処理すると、KRas 変異癌細胞は PI3K 阻害剤に対してより感受性が高いことが分かった。つまり、KRas 変異癌細胞の細胞増殖は、ERK 経路に依存していないことが明らかになった。



S6K の FRET バイオセンサーを用いた解析から、KRas 変異癌細胞の細胞増殖は ERK 経路よりも mTOR 経路に依存していること、また ERK 経路の下流で転写を介した mTOR の活性化機構があることを明らかにした。最後に、KRas 変異癌細胞において MEK 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用により相乗的に抗がん活性が上昇することを見出した。これらの結果は Komatsu N, et al., Oncogene, 2015 に報告した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)
すべて査読有

1. Yamao M, Aoki K, Yukinawa N, Ishii S, Matsuda M, Naoki H. Two New FRET Imaging Measures: Linearly Proportional to and Highly Contrasting the Fraction of Active Molecules. *PLoS One*. 2016, 11:e0164254. doi: 10.1371/journal.pone.0164254
2. Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Matsuzaki F, Sehara-Fujiwara A. Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 2016, 6:28873. doi: 10.1038/srep28873
3. Maryu G, Matsuda M, Aoki K. Multiplexed fluorescence imaging of ERK and Akt activities and cell-cycle progression. *Cell Structure and Function*, 2016, 41:81-92. doi: 10.1247/csf.16007.
4. Inaba K, Oda K, Aoki K, Sone K, Ikeda Y, Miyasaka A, Kashiyaama T, Fukuda T, Makii C, Arimoto T, Wada-Hiraie O, Kawana K, Yano T, Osuga Y, Fujii T. Synergistic antitumor effects of combination of PI3K/mTOR and MEK inhibition (SAR245409 and pimasertib) in mucinous ovarian carcinoma cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. *Oncotarget*, 2016, 7:29577-91. doi: 10.18632/oncotarget.8807
5. Nagata Y, Kontani K, Enami T, Kataoka K, Ishii R, Totoki Y, Kataoka TR, Hirata M, Aoki K, Nakano K, Kitanaka A, Sakata-Yanagimoto M, Egami S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shiozawa Y, Yoshizato T, Suzuki H, Kon A, Yoshida K, Sato Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Miyano S, Nureki O, Shibata T, Haga H, Shimoda K, Katada T, Chiba S, Watanabe T, Ogawa S. Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 2015, 127; 596-604. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-644948>
6. Yamao M, Naoki H, Kunida K, Aoki K, Matsuda M, Ishii S. Distinct predictive performance of Rac1 and Cdc42 in cell migration. *Scientific Reports*, 2015, 5; 17527. doi:10.1038/srep17527
7. Aoki K. Visualization of Intracellular Signaling with Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Biosensors. *Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*, 2015, Springer, 31-41. doi

10.1007/978-4-431-55561-2

8. Komatsubara AT, Matsuda M, Aoki K. Quantitative analysis of recombination between YFP and CFP genes of FRET biosensors introduced by lentiviral or retroviral gene transfer. *Scientific Reports*, 2015, 5; 13283. doi:10.1038/srep13283
9. Komatsu N, Fujita Y, Matsuda M, Aoki K. mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells. *Oncogene*, 2015, 34; 5607-5616. doi:10.1038/ncr.2015.16
10. Hiratsuka T, Fujita Y, Naoki H, Aoki K, Kamioka Y, Matsuda M. Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse epidermis. *eLife*, 2015, 4 e05178. doi: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.05178.001>
11. Sadaie W, Harada Y, Matsuda M, Aoki K. Quantitative in vivo fluorescence cross-correlation analyses highlight the importance of competitive effect in the regulation of protein-protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*, 2014, 34; 3272-90. doi: 10.1128/MCB.00087-14
12. Fujita Y, Komatsu N, Matsuda M, Aoki K. FRET-based quantitative analysis of feedforward and feedback loops in EGFR signaling and the sensitivity to molecular targeting drugs. *FEBS Journal*, 2014, 281; 3177-92. doi: 10.1111/febs.12852

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 青木 一洋, 実験と数理・統計を組み合わせた癌研究, 第 1 回肺癌バイオカンファレンス, 2016/9/24, 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社, 東京都品川区

〔図書〕(計 1 件)

1. 小林 徹也, 青木 一洋 編集, 「バイオ画像手取り足取りガイド」、羊土社、2014 年、221 ページ

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/qsimulationproject/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 一洋 (AOKI, Kazuhiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ
エンスセンター・教授

研究者番号 : 80511427