

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0317

研究課題名（和文）薬剤耐性コロニーをモデルとした癌再発抑制へ繋がる化合物同定に関する研究（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Identification of potential compounds that suppress cancer relapse on the drug tolerant colony model (Fostering Joint International Research)

研究代表者

西塚 哲 (Nishizuka, Satoshi)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・特任教授

研究者番号：50453311

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 15ヶ月

研究成果の概要（和文）：進行胃癌根治手術後にはコンベンショナルな抗癌剤（コ抗癌剤）による術後補助化学療法が行われるが、30-40%の患者は再発を経験する。コ抗癌剤に接触した癌細胞では様々なシグナル伝達が活性化するが、そのシグナル伝達経路に対する分子標的薬を投与すれば癌関連死抑制へ繋がるはずである。本研究では胃癌再発を抑制する化合物（ α -amanitin）・分子標的薬（GDC-0941）を同定したほか、治療後再発にH. pyloriの感染状態が関連すること、血中変異DNAが再発を予測することを示した。最終的にゲノム・トランスクリプトーム、タンパク、細胞、動物モデル、および疫学レベルでの統合的解析を展開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シーケンス技術の発展とともに遺伝子変異を投薬根拠とする「がんゲノム医療」が行政主導のもと推進されている。一方、多くの分子標的薬では標的分画であるタンパクが遺伝子変異によって制御されている証拠は乏しい。本研究は、薬剤耐性の直接的責任分子であるタンパクの動態を基に至適分子標的薬を選定するために立案された。胃癌再発抑制に働く化合物・薬剤は同定されたが、これらが遺伝子変異に起因する証拠は得られなかった。一方、H. pyloriや血中変異DNAの癌診断における意義を確認した。本研究成果は学術的には遺伝子変異による投薬効果の検証を推進し、社会的には遺伝子変異に偏らない癌診断を再認識するという意義がある。

研究成果の概要（英文）：Conventional chemotherapy is performed after gastrectomy with curative intent. However, the relapse rate is still 30-40%. The conventional chemotherapy activates various signaling pathways; therefore it is thought that the inhibition of such pathways would suppress gastric cancer relapse. We identified a compound (α -amanitin) and a molecular targeting drug (GDC-0941), both suppressed gastric cancer relapse. Moreover, we demonstrated that H. pylori infection status was associated with the relapse and circulating tumor DNA predicts the relapse. Finally, we developed an integrated analysis including the levels of genome/transcriptome, protein, cell, model animals, and epidemiology.

研究分野：システム医学

キーワード：癌再発 薬剤耐性 統合解析 治療後モニタリング 腫瘍マーカー

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

癌に対する根治的手術(癌の遺残が視認できない状態)後に行う補助化学療法では再発率が30-40%である。この事実は、根治的手術後にも視認できない大きさ、かつ化学療法に耐性のある細胞集団が存在し、再発の究極的な原因となっていると想定される。癌治療後の再発は癌関連死の主たる原因であるため、予後の改善には再発の抑制が必須である。先行研究では、術後補助化学療法後の再発に関わる細胞集団を Drug Tolerant Colonies(DTC)と捉え、DTCの細胞分子生物学的解析および DTC 抑制性に働く化合物の同定を行ってきた。その経過として、RNA polymerase II 阻害剤である -Amanitin の癌性腹膜炎抑制効果、 -Amanitin の標的として TAF15 遺伝子の同定、および DTC のプロファイル法としての Colony Lysate Array(CoLA)法の開発を行っていた。また、これらの技術を集積し、術後化学療法の中心的薬剤である 5-FU に焦点を絞り、独自に開発した異種同所同組織移植法(Orthotopic Xenograft, OX)を用いて、5-FU 耐性細胞集団における PI3K 活性化による悪性形質獲得機構を確認した。また、OX モデルの腫瘍増殖能は PI3K 阻害剤 GDC0941 投与によりほぼ完全に抑制され、コ抗癌剤耐性腫瘍を分子プロファイルによる分子標的薬投与により治療できる可能性を示した。実際、再発癌は多様性を持つ細胞集団である。従って現段階ではゲノムによる個別化よりもシグナル伝達の共通点に対する分子標的薬を選択することが現実的であり、PC 等従来薬での効果が限定的な難治性再発癌には病態に特化した新規治療標的の同定が待たれる。このような背景から、我々の再発癌研究では「至適分子標的薬の選択」と「新規治療標的分子の創薬に繋がる技術開発」を重要視してきた。我々は研究開発当初から一貫して再発癌の抑制が癌関連死の減少に最も効果的につながることを主張してきたが、本研究は逆相タンパクアレイ(Reverse-Phase Protein Array, RPPA)を用いてコ抗癌剤投与により活性化されるタンパクをモジュール単位として捉えること、そのシグナルに対して抑制的に働く分子標的薬を同定するために立案された。

2. 研究の目的

RPPA によるシグナル解析技術を用いた至適分子標的薬の選択戦略と我々が同定した RNAPII の PC 成立における新規治療標的としての可能性を検証し、臨床への橋渡しが可能となる理論基盤を構築することを目的として設定した。

3. 研究の方法

コ抗癌剤治療後再発に対する治療戦略として、分子標的薬はコ抗癌剤不応性固形癌、RNAPII 阻害剤は PC を対象とする。以下(1)-(3)はコ抗癌剤治療後の至適分子標的薬の選択法、(4)は PC 予防と関連して RNAPII 結合タンパクをコードする TAF15 の機能解明を目指すものである。申請当時、立案根拠となった(1)-(4)の方法に加え、(5)として急速に普及した次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer, NGS)による 400 以上の癌・薬剤代謝関連遺伝子変異検索、およびトランスクリプトーム解析を行った。また、当初予定していたタンパクおよび細胞生物学的解析に加えて遺伝子解析の結果を含めた解析を行うことにより、(6)に述べる統合的な解析が可能となった。さらに再発癌に関する迅速な臨床応用として、NGS、デジタル PCR および RPPA による(7)進行癌モニタリング法を確立した。

(1)コ抗癌剤誘導性シグナル伝達解析: 8 種類の胃癌細胞株(MKN45, MKN45/5FU, MKN74, MKN74/5FU, MKN1, GCIY, GSS, IWT1)をコ抗癌剤(5-FU, cisplatin, etoposide, docetaxel)に接触させ、時間および濃度依存性に誘導される増殖シグナルを中心に RPPA で得られた高次データからリファレンスマップを作成する。各細胞株で誘導される活性化シグナルから、細胞間に共通の活性化モジュールを同定する。

(2)薬剤耐性細胞集団における活性化モジュール抽出: 化学療法後再発の起点となる細胞集団は、DTC と共通点が多い。先行実験からコ抗癌剤存在下で出現する DTC ではシグナル伝達解析で同定された活性化モジュールを持つクローンが多いと予想される。CoLA を用いてその割合を検証し、対応する分子標的薬のコ抗癌剤投与後 DTC に対する抑制効果を予測する。

(3)OX モデルによる再発癌抑制の検証: 再発癌のモデルとして、生着を確認したヒト胃癌細胞をマウス胃粘膜下層に移植する。移植 1 週間後にコ抗癌剤を投与し、コ抗癌剤抵抗性細胞を生存させる。その後 CoLA 解析の結果から DTC 抑制に有効と思われた分子標的薬を投与する。移植後 4-6 週で開腹し腹腔内の腫瘍を観察する。

(4)免疫沈降(IP)-RPPA の開発: 基課題では RNA polymerase II 阻害剤(RNAPIIi)である -AMA の腹腔内投与がシスプラチン耐性の PC 抑制に効果的であった。治療標的として RNAPII 結合タンパク TAF15 が同定されたが、耐性を持つ薬剤の種類により TAF15 の結合パートナーが異なることが予想された。IP-RPPA は一つのタンパクに結合するタンパクを IP で回収し、RPPA 上で一次抗体ライブラリを用い結合パートナーを同定する技術である。本申請ではコ抗癌剤の種類により変化する TAF15 結合タンパクを捉え、RNAPII/TAF15 複合体形成を阻害する化合物スクリーニングへの足掛かりとする。また、RNAPII を治療標的とする視点からも PC 抑制における -AMA の作用機序を明らかにしておく必要がある。

(5)シーケンシング解析: 上記 8 つのヒト胃癌細胞株を対象とし、癌関連遺伝子(400 種類)、薬剤耐性関連遺伝子(40 種類)のターゲットシーケンシングを行う。いずれもターゲットサイズは 2Mb、平均カバレッジは 500 程度で行う。トランスクリプトーム解析では、上記 8 つのヒト胃癌細胞株を対象とし、上記 4 種類の抗癌剤投与後に変化する RNA 種の同定を試みる。

(6)分子生物学的統合解析: 8 種類のヒト胃癌細胞株と 4 種類の抗癌剤の関係において、各抗癌剤に対する各細胞の増殖抑制アッセイのデータと遺伝子変異の関連を明らかにする。また、

GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)を用いて、抗癌剤接触後に enrich されている発現遺伝子群を明らかにする。RPPA では抗癌剤の接触濃度ごとに時系列で追跡したデータから、遺伝子変異・発現との整合性を探る。

(7) 進行癌モニタリング法の開発：疫学的手法を用いて東北・北海道の多施設より進行胃癌症例を集積し進行癌予後予測を行う。また、胃癌を含む消化器癌を対象として、原発巣の multi-regional sequence を行い、複数か所のサンプリング部位で共通する「founder 変異」、アリル頻度から推定する「trunk 変異」を同定する。さらに、これらの変異における原発巣および血中腫瘍由来 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)のアリル頻度の相関、および治療後モニタリングにおける意義について検証する。

4. 研究成果

本研究申請では当初の RPPA 解析によるタンパクレベルでのシグナル伝達

(1) コ抗癌剤誘導性シグナル伝達解析：RPPA によるコ抗癌剤に対するシグナル伝達は我々が確立したプロトコルにより、シート状に増殖した細胞を抗癌剤接触後に時系列で回収して解析した。同一条件の繰り返しを含め、合計で 2,000 サンプルを回収し、全実験を 1 枚の RPPA にプリントした。RPPA 1 枚につき 1 種類の抗体でタンパク量を検出し画像解析を経て定量化を行った。コ抗癌剤は特定の分子を標的にするものではないが、現在まで cisplatin 接触により RAS-MEK-ERK のモジュールおよびインターフェロンを介した免疫シグナルが活性化されている可能性が示唆されている(投稿準備中)。

(2) 薬剤耐性細胞集団における活性化モジュール抽出：DTC は一定の分子モジュールの活性化により耐性を獲得していると予想していたが、CoLA による解析では、薬剤、細胞、濃度などのパラメータにかかわらず「幹細胞性」または「上皮性」のタンパク発現が stochastic に生じていることが示唆された(Kume et al, *Sci Rep*, 2016)。一方で、特定の薬剤を用いてその耐性機序を分子生物学的に検証すると、5-FU では PI3K パスウェイ、cisplatin では転写レベルでの RNase Polymerase の阻害がその抑制に重要な役割を果たしていた(Kume et al, *Sci Rep*, 2016; Ishida et al, *Sci Rep*, 2017)。これら一連の検証により、CoLA が薬剤耐性細胞集団の分子解析に有効な技術であることを示した(Kume et al, *Anal Chem*, 2017)。

(3) OX モデルによる再発癌抑制の検証：ヒト胃癌細胞 MKN45 の 5-FU 耐性株として樹立された MKN45/5FU を用いた OX モデルを確立した。MKN45 と MKN45/5FU を構成する細胞集団の 5-FU 感受性に違いが生じていることが明確な表現型の違いの原因であると考え、5-FU 存在下に CoLA による分子解析を行った。MKN45/5FU から生じる DTC に特徴的な分子経路の活性化として、リン酸化 PI3K が同定された。PI3K パスウェイの異常は AKT、mTOR、および PTEN 等についても確認された。また、興味深いことに OX として生着した細胞でも胃内に留まるものより転移をきたしたものでその傾向が顕著であった。従って、PI3K パスウェイを阻害する分子標的薬を用いれば OX の胃内での増殖や転移を抑制できるのではと仮説を立てた。PI3K 阻害剤として知られる GDC-0941 を OX マウスに投与したところ、OX マウスの 83%でその生着・転移が抑制された。また、真の分子標的をウェスタンブロットにより確認したところ、最も GDC-0941 に影響を受けているのは S6 のリン酸化であることが明らかとなった。以上から、5-FU 耐性胃癌では PI3K 阻害剤が有効であることが示唆された(Ishida et al, *Sci Rep*, 2017)。

(4) 免疫沈降(IP)-RPPA の開発：RNAPIII である -AMA の腹腔内投与がシスプラチン耐性の PC 抑制に効果的であることを報告した(Kume et al, *Sci Rep*, 2016)。このことから発展的に TAF15 の結合パートナーを IP により同定しようと試みたが、TAF15 を補足する抗体が十分に機能しなかったため、コ抗癌剤による DNA 傷害に反応する p53 を用いて技術を確認することを試みた。現在まで、コ抗癌剤のうち 5-FU と cisplatin 接触下で TP53 に結合可能性のある 20 個余りのタンパクの結合状態が異なってくるのがわかった。これらの転写因子構成タンパクの変化は DNA 傷害性薬剤では確認されたが、対照として検証した微小管重合阻害剤 docetaxel や分子標的薬 gefitinib では確認できなかった(投稿準備中)。

(5) シークエンス解析：癌関連遺伝子および薬剤耐性遺伝子の変異探索では、今回対象とした 8 種の胃癌細胞株に特定の遺伝子に変異が集積していることはなかったが、Gene Ontology 解析を行ったところ細胞周期関連遺伝子、クロマチン構成関連遺伝子はほぼすべての細胞株で少なくとも 1 つの遺伝子変異が見られた。また、トランスクリプトームデータについて GSEA を行ったところ、各 DNA 傷害性コ抗癌剤に感受性を示した細胞株では免疫に関連した GO に濃縮が見られた。Docetaxel では感受性を示した細胞に GO 濃縮が見られなかった。

(6) 分子生物学的統合解析：(1)-(5)の各データを統合し、細胞増殖アッセイとゲノム、ゲノムとトランスクリプトーム、トランスクリプトームとシグナル伝達、およびシグナル伝達と細胞増殖データ、のフローで整合性を確認している。2019 年 5 月に保険収載が決定したがゲノム医療では、遺伝子変異をもとに分子標的薬の適応を決める治療方針が採用されることが予想される。しかしながら、ほとんどの癌患者はまずコ抗癌剤で治療され、その治療により主たる病巣を構成する細胞集団が変化する。治療前の遺伝子変異を投与根拠とする場合は実際に標的となっているタンパクの活性化等を検証するなど慎重な姿勢も必要であることを本研究から発信したい。これらの結果は現在投稿準備中である。

(7) 進行癌モニタリング法の開発：上記細胞株を用いた研究から進行胃癌の予後に PI3K パスウェイの異常が関与していることが示唆された。進行胃癌手術検体 160 例から、PI3K のサブユニットをコードする *PIK3CA* の変異解析およびパスウェイタンパクの免疫染色を行ったところ、

PIK3CA 変異頻度は低いこと、またリン酸化 AKT が予後良好の指標になることが示唆された (Ito et al, *J Surg Res*, 2017)。また、興味深いことに *H. pylori* 感染陽性群では胃癌術後化学療法による予後が 5 年生存率で約 20% 良好であった (Nishizuka et al, *J Surg Oncol*, 2018)。胃癌・大腸癌の multi-regional sequence から、founder 変異を同定した。興味深いことに、founder 変異は一般に腫瘍内でアリル頻度が高く、またアリル頻度が高いものは ctDNA として検出される割合も高かった。このことは、複数個所のサンプリングが必ずしも必要でなく、日常診断では 1 か所の生検や検体採取のシーケンスでアリル頻度が十分に高い遺伝子変異を同定すれば ctDNA による治療後モニタリングに有用であることが示された。また、ctDNA の血中でのアリル頻度は 1% 以下であり、NGS の安定した検出限界よりも低いことが多い。我々は 0.01% のアリル頻度変異でも安定して検出が可能な dPCR を採用した。実際には、dPCR は一度に一つの遺伝子変異しか検出できないが、NGS に比べ遥かに簡便で安価であるため、治療後モニタリングに必要な多数回 (3 か月ごと 3 年で 12 回) のフォローに適している。また、腫瘍で高アリル頻度であったものを治療後モニタリングすることにより、転移や再発を血清マーカーや CT などよりも数か月から半年程度早期に検知できることを確認した。一方、dPCR の難点はプライマープローブの設計・合成であるが、高頻度変異遺伝子を中心に現在プライマープローブライブラリーを設計している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- 1: Nishizuka SS, Sato KA, Hachiya T. A Pipeline for ctDNA Detection Following Primary Tumor Profiling Using a Cancer-Related Gene Sequencing Panel. *Methods Mol Biol*. 2019;1908:229-241. [査読有]
- 2: Nishizuka SS, Tamura G, Nakatochi M, Fukushima N, Ohmori Y, Sumida C, Iwaya T, Takahashi T, Koeda K; Northern Japan Gastric Cancer Study Consortium. *Helicobacter pylori* infection is associated with favorable outcome in advanced gastric cancer patients treated with S-1 adjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol*. 2018 Apr;117(5):947-956. [査読有]
- 3: Kume K, Nishizuka SS. Colony Lysate Arrays for Proteomic Profiling of Drug-Tolerant Persister of Cancer Cell. *Anal Chem*. 2017 Sep 5;89(17):8626-8631. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01215. Epub 2017 Aug 11. [査読有]
- 4: Ito C, Nishizuka SS, Ishida K, Uesugi N, Sugai T, Tamura G, Koeda K, Sasaki A. Analysis of PIK3CA mutations and PI3K pathway proteins in advanced gastric cancer. *J Surg Res*. 2017 May 15;212:195-204. [査読有]
- 5: Ishida K, Ito C, Ohmori Y, Kume K, Sato KA, Koizumi Y, Konta A, Iwaya T, Nukatsuka M, Kobunai T, Takechi T, Nishizuka SS. Inhibition of PI3K suppresses propagation of drug-tolerant cancer cell subpopulations enriched by 5-fluorouracil. *Sci Rep*. 2017 May 23;7(1):2262. [査読有]
- 6: Kume K, Ikeda M, Miura S, Ito K, Sato KA, Ohmori Y, Endo F, Katagiri H, Ishida K, Ito C, Iwaya T, Nishizuka SS. -Amanitin Restrains Cancer Relapse from Drug-Tolerant Cell Subpopulations via TAF15. *Sci Rep*. 2016 May 16;6:25895. [査読有]

[学会発表](計 7 件)

- 1: Nishizuka S, Iwaya T. Circulating tumor DNA as a tool for monitoring gastrointestinal tumor burden dynamics in the therapeutic context. 2018 77th Japanese Cancer Association (Osaka, Japan)
- 2: Nishizuka SS. Microbiota and Chemotherapy: A Downstream Finding of RPPA Biomarker Screening. 2017 7th RPPA Global Workshop (Dublin, Ireland)
- 3: Nishizuka SS, Endo F, Sato KA, Iwaya T. 2016 75th Japan Cancer Association (Yokohama, Japan)
- 4: Nishizuka SS. Profiling Drug-Tolerant Cancer Cell Subpopulations Using RPPA. 2016 6th RPPA Global Workshop (Reutlingen, Germany)
- 5: Nishizuka SS, Ishida K, Ito C, Nukatsuka M, Kobunai T, Takechi T, Kume K, Iwaya T. 2016 1st The Naito Conference (Sapporo, Japan)
- 6: 西塚 哲. がん研究における定量生物学. 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016 (京都)
- 7: Nishizuka SS, Ishida K, Ohmori Y, Kume K, Ito C, Konta A, Koizumi Y, Nukatsuka M, Kobunai T, Takechi T, Iwaya T. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase suppresses propagation of drug-tolerant cancer cell subpopulations enriched by 5-fluorouracil. 107th American Association for Cancer Research. 2016 (New Orleans, USA)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称：胃癌モデル動物の作製方法
発明者：西塚 哲、石田 馨
権利者：岩手医科大学
種類：特許願
番号：2017-080566
出願年：2017年
国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：がんの診断のためのプローブ/プライマーライブラリー
発明者：西塚 哲、岩谷 岳
権利者：岩手医科大学
種類：特許願（2019年5月14日特許査定）
番号：2018-143912
取得年：2019年
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nishizukalab.org>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Lance Liotta

ローマ字氏名：Lance Liotta

所属研究機関名：George Mason University

部局名：Center for Applied Proteomics and Molecular Medicine, College of Science

職名：University Professor

研究協力者氏名：Gordon Mills

ローマ字氏名：Gordon Mills

所属研究機関名：University of Texas, MD Anderson Cancer Center

部局名：Department of Systems Biology

職名：Professor and Chair

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：久米 浩平

ローマ字氏名：Kume Kohei

研究協力者氏名：石田 馨

ローマ字氏名：Ishida Kaoru

研究協力者氏名：岩谷 岳

ローマ字氏名：Iwaya Takeshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。