

令和元年5月31日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07139

研究課題名(和文) 分子標的薬に対する抵抗性獲得における腫瘍上皮細胞と間質細胞との相互作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the interaction between tumor epithelial cells and stromal cells in acquiring resistance to molecular-targeted drugs

研究代表者

藤下 晃章 (FUJISHITA, Teruaki)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・主任研究員

研究者番号：50511870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的薬を用いたがん治療が標準となったが、殆どの固形癌で抵抗性を獲得することが問題となっている。本研究では分子標的薬抵抗性を獲得した大腸がんにおいて、がん微小環境が治療標的になる可能性について検討した。mTOR阻害薬抵抗性を獲得した大腸がんは、がん微小環境を構成する間質細胞で活性化したMAPキナーゼ経路を介したサイトカインの上昇が認められた。活性化したがん微小環境をMEK阻害薬で抑制することでmTOR阻害薬抵抗性大腸がんが抑制されたことから、がん微小環境も分子標的薬抵抗性を克服するための鍵となることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的分子の変異やフィードバック経路の活性化などがん細胞が分子標的薬に対して抵抗性を獲得する方法は様々であり、これまでがん細胞そのものにおける抵抗性獲得機序が研究の対象とされて来た。がん微小環境もまた抵抗性獲得に密接に関与していることが本研究により明らかにされたことで、がん細胞だけでなくがん微小環境を標的とした分子標的薬抵抗性がんの新たな治療戦略の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Although molecular-targeted therapy has become a standard therapy for many cancer types, solid tumors acquire resistance against the targeted therapy in most cases. In this study, I investigated the possibility that the tumor microenvironment could be a therapeutic target for colorectal cancer that acquired resistance against targeted therapy. Colorectal cancer tissues that acquired mTOR-inhibitor resistance showed elevated levels of cytokines via MAP kinase pathway activation in the stromal cells building the tumor microenvironment. Because the mTOR-inhibitor resistance of colorectal cancer was abolished by suppression of the activated tumor microenvironment using a MEK inhibitor, the tumor microenvironment is considered a clue for overcoming resistance against targeted therapies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん がん微小環境 治療抵抗性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんによる死亡者数は食生活の欧米化に伴い著しい増加傾向にあり、現在日本人の最も罹患率の高い悪性腫瘍になった。転移を伴う大腸がんは外科的切除が困難のため予後は極めて悪い(5年生存率は20%未満)。これは効果的な大腸がんの治療薬がないことを示しており、大腸がんの予防・治療標的の探索、そして治療薬の開発が急務となっている。

イマチニブの成功から様々な受容体やタンパクキナーゼに対する分子標的薬が開発され、各種のがんに対する適用が拡大している。その一方で、白血病など一部のがんでは分子標的薬を用いた治療により完全寛解が認められるが、多くの固形がんでは高い奏効率や生存期間を有意に延長させる分子標的薬であっても完治に至らず、がんは抵抗性を獲得し再発する。このような分子標的薬に対する抵抗性獲得機序として、変異による標的分子の構造変化や標的の下流分子の活性化変異など、がん細胞自律的な分子標的薬抵抗性のメカニズムが徐々に明らかにされ、抵抗性克服のための治療方法の開発が行われている。一方、本来細胞が生存や増殖に必要としている分子・シグナル経路を抵抗性獲得に利用することが多く、これらを標的とすることで正常な組織・臓器に対する影響など生体レベルでの効果や安全性に関して不明な点が多い。

生体における腫瘍・がん組織では、がん関連線維芽細胞(CAF)や腫瘍関連マクロファージ(TAM)など、様々な間質細胞がいわゆるがん微小環境を構成し、腫瘍の発生、拡大、浸潤、転移に関与している。これら間質細胞もまた抗がん剤の抵抗性獲得に寄与する可能性を考慮すべきである。実際、メラノーマのRAF阻害薬抵抗性と間質細胞のHGFの発現に相関があることが報告されている(文献1)。今後、分子標的薬を含む抗がん剤抵抗性の研究において微小環境は欠かせない要因の一つとなることが想定されるが、個体レベル、特に大腸がんを始めとするがんの自然発症モデルマウスでの研究報告は少ない。

申請者はこれまでにmTOR経路やEGFR経路、MEK/ERK経路などが大腸がんの治療標的となる可能性について検討してきた。家族性大腸ポリープ症のモデルマウス(Apc遺伝子変異マウス)を用いこれら阻害薬が良性腫瘍形成を抑制することを既に報告している。浸潤性腺がんを形成する大腸がんモデルマウス(Apc/Smad4複合遺伝子変異マウス)を用いて、腸腺がん形成に対するmTOR、EGFR、MEK/ERK各経路の阻害薬の影響を検証したところ、mTOR阻害薬は腺がん形成を抑制したが、EGFR阻害薬およびMEK阻害薬による抑制効果は認められなかった。またmTOR阻害薬を長期間投与した場合、管腔側への腫瘍の拡大は抑制されるが、浸潤部の腫瘍は抵抗性を獲得する事を見出している。さらに浸潤部周辺の間質細胞でMEK経路の活性化が認められたことから、管腔側と異なる浸潤部の環境が、がん細胞の薬剤抵抗性獲得に寄与する事が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、大腸がんの分子標的薬、特にmTOR阻害薬に対する抵抗性獲得における微小環境の役割について、浸潤性大腸がんモデルマウスを用いて解明し、分子標的薬に抵抗性を示すがんの微小環境が治療標的となる可能性についても検証する。

### 3. 研究の方法

#### 大腸がんのmTOR阻害薬抵抗性獲得機構の解明

大腸がんモデルマウスであるcis-Apc/Smad4複合遺伝子欠損マウス(Apc/Smad4マウス)にmTORキナーゼ阻害薬AZD8055(20 mg/kg)を経口投与し、mTOR阻害薬抵抗性腸腺がんを形成させる。また溶媒投与したApc/Smad4マウスの腸腺がんをコントロールとする。この大腸がん組織においてPhospho-RTK ArrayおよびCytokine Arrayを実施することで、関連する分子やシグナル経路の同定を行う。またレーザーマイクダイゼクションにより、がん組織からがん細胞とそれを取り囲む間質細胞をそれぞれ分離採取し、mTOR阻害薬に対する抵抗性獲得に関わる可能性のある遺伝子発現の検証を行う。

#### mTOR阻害薬抵抗大腸がんに対するMEK阻害薬およびEGFR阻害薬の併用投与の検証

Apc/Smad4マウスにmTOR阻害薬(AZD8055, 15 mg/kg)とMEK阻害薬(Trametinib 0.6 mg/kg)またはEGFR阻害薬(Erlotinib, 15 mg/kg)を併用投与し、腸がん形成数および浸潤の頻度を測定する。

### 4. 研究成果

#### mTOR阻害薬はがん微小環境のMAPキナーゼ経路を活性化させる。

mTOR阻害薬抵抗性腺がんでは活性化している分子を同定するためPhospho-RTK Arrayを実施した。mTOR阻害薬抵抗性腺がんにおいてコントロールの腺がんよりもEGFRやHER2、PDGFRなど受容体型チロシンキナーゼ(RTK: receptor tyrosine kinase)のリン酸化レベルが増大していた。またウエスタンブロットによりRTKのシグナル下流にあるMAPキナーゼERKのリン酸化を検証したところmTOR阻害薬抵抗性腺がんにおいて増加が認められた。さらにリン酸化EGFR抗体およびリン酸化ERK抗体を用いた免疫染色により、mTOR抵抗性腺がんにおけるEGFRとERKの活性化細胞を検証したところ、リン酸化EGFRは腺がん腫瘍上皮細胞で、リン酸化ERKは浸潤部間質細胞でそれぞれ強いシグナルが認められた(図1)。また大腸がん細胞株を用いてmTOR阻害薬を処理したところDLD-1やSW837などではEGFRのリン酸化レベル

が増大したが ERK のリン酸化レベルに変化は認められなかった。一方、マウス腸管から単離した初代培養した線維芽細胞に mTOR 阻害薬を処理すると、PDGFR のリン酸化レベルが上昇し、ERK のリン酸化レベルも上昇していた。以上の結果から mTOR 阻害薬抵抗性腺がん組織で認められた EGFR や ERK のリン酸化レベルの上昇は、フィードバック効果により腺がん上皮細胞では EGFR、微小環境を構成する線維芽細胞では PDGFR および MAP キナーゼ経路の活性化が引き起こされ、抵抗性に関与することが示唆された。

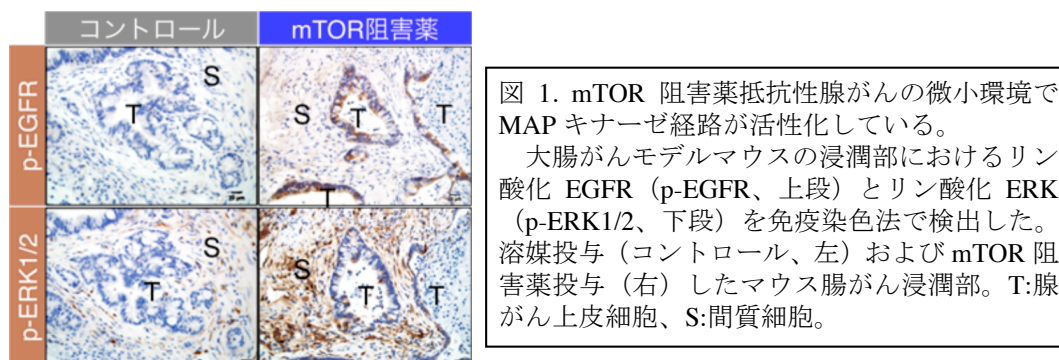


図 1. mTOR 阻害薬抵抗性腺がんの微小環境で MAP キナーゼ経路が活性化している。  
大腸がんモデルマウスの浸潤部におけるリン酸化 EGFR (p-EGFR、上段) とリン酸化 ERK (p-ERK1/2、下段) を免疫染色法で検出した。溶媒投与 (コントロール、左) および mTOR 阻害薬投与 (右) したマウス腸がん浸潤部。T:腺がん上皮細胞、S:間質細胞。

mTOR 阻害薬抵抗性腺がんの微小環境ではサイトカイン Timp1 の発現が上昇した。

がん微小環境を構成する間質細胞が分泌するサイトカインやケモカインはがんの拡大、浸潤、転移を促進させる (文献 2、3、4)。そのため Cytokine Array を用いて mTOR 抵抗性腺がん組織中のサイトカインを網羅的に調査したところ、コントロールと比べて Timp1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) や Il1-ra (Interleukin-1 receptor antagonist)、Icam1 (intercellular adhesion molecule 1) の上昇が認められ、また Timp1 は mRNA レベルで増加していた。さらにレーザーマイクロダイゼクションにより腺がん上皮と間質を分離回収し、Timp1 の発現を検証したところ、mTOR 抵抗性腺がん組織の間質で著しい上昇が認められた (図 2)。Timp1 はマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)の阻害タンパクであるが血管新生や腫瘍増殖、転移などがんの進展を促進させることも報告されていることから (文献 5)、がん微小環境を構成する間質細胞ではこれらサイトカインの増加を介してがん細胞の mTOR 抵抗性獲得に加担していることが示唆された。

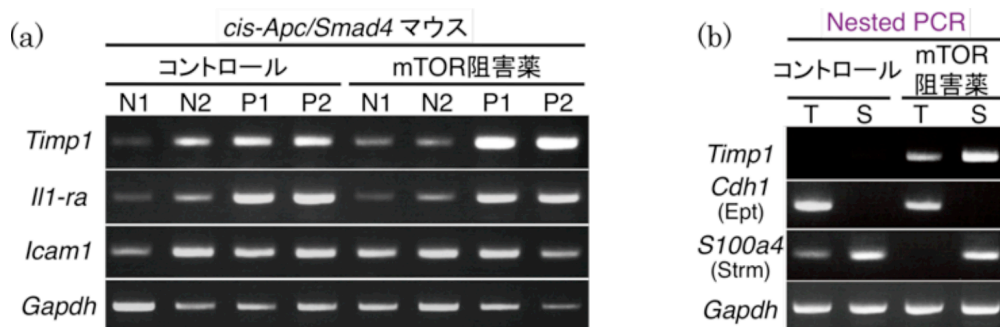


図 2. mTOR 阻害薬抵抗性腺がんの微小環境で Timp1 が増加している。  
a. mTOR 阻害薬を投与した大腸がんモデルマウスの回腸腺がん (P) と周辺正常組織 (N) における Timp1、Il1-ra、Icam1 遺伝子発現を RT-PCR 法により検出した。b. レーザーマイクロダイゼクションにより腺がん上皮 (T) と間質細胞 (S) を分離回収した後、RT-nested PCR により Timp1 遺伝子発現を検証した。Cdh1 : 上皮マーカー、S100a4 : 間質マーカー。

mTOR 阻害薬抵抗性腺がんに対する MEK 阻害薬または EGFR 阻害薬の併用は mTOR 阻害薬抵抗性獲得を抑制する

mTOR 阻害薬抵抗性腺がんでは EGFR および MAP キナーゼ経路が腺がん上皮および間質でそれぞれ活性化していることから、erlotinib (EGFR 阻害薬) または trametinib (MEK 阻害薬) をそれぞれ AZD8055 (mTOR 阻害薬) と併用投与することで、腺がん形成に及ぼす影響を調査した。溶媒投与 (コントロール) と比較して mTOR 阻害薬単独投与は腫瘍形成数を減少させたが、EGFR 阻害薬または MEK 阻害薬単独投与では腺がん形成は抑制されなかった (図 3a)。また、mTOR 阻害薬、EGFR 阻害薬または MEK 阻害薬単独投与はいずれも腺がんの浸潤を抑制しなかった (図 3b)。一方、mTOR 阻害薬と EGFR 阻害薬または MEK 阻害薬の併用投与により腺がん形成および浸潤はコントロールや mTOR 阻害薬単独投与と比較して有意に抑制された (図 3b)。さらに EGFR 阻害薬ではなく、MEK 阻害薬と mTOR 阻害薬の併用により Timp1 遺伝子発現レベルが抑制されたことから、間質細胞においてフィードバックを介した MAP キナーゼ経路の活性化によって Timp1 の発現が調節されていることが明らかとなった (図 3c)。以上の結果から、本研究により mTOR 阻害薬抵抗性腺がんの克服には腺がん上皮で誘発された

EGFR の活性化を抑制することで可能となること、さらにはがん微小環境の間質細胞で活性化が引き起こされた MAP キナーゼ経路を阻害することによっても可能となることが明らかとなった (図 3d)。

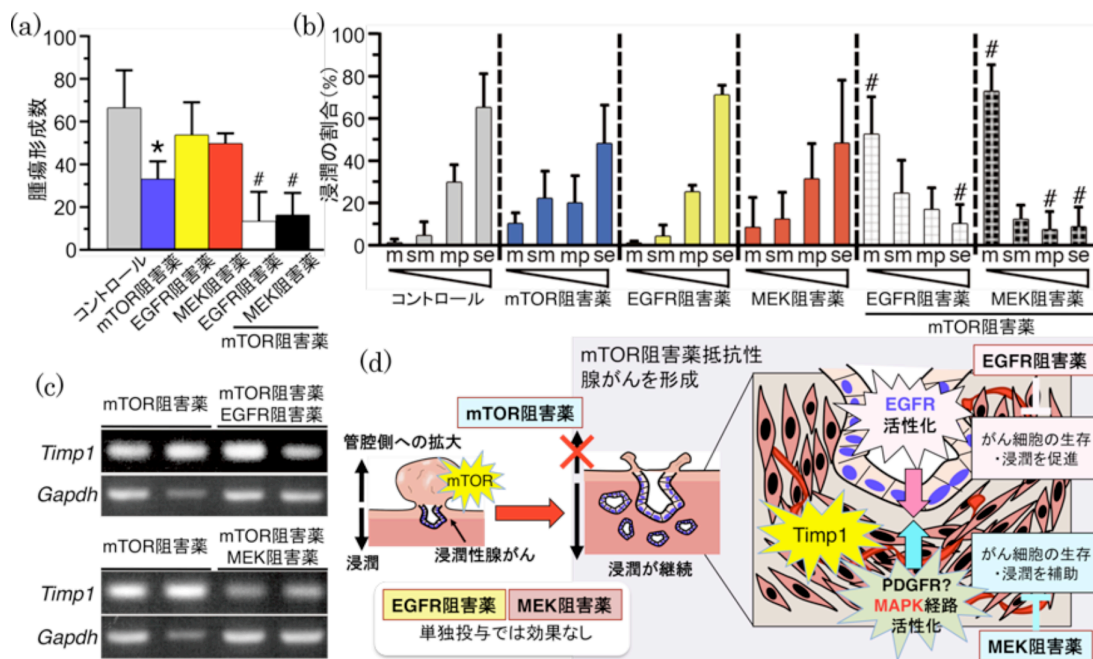


図 3. mTOR 阻害薬と MEK 阻害薬の併用投与は大腸がんモデルマウスの腺がん形成を抑制する。a. 各種阻害薬を投与したモデルマウスの腺がん形成数。b. 各種阻害薬を投与したモデルマウスの浸潤の割合。m: 粘膜層、sm: 粘膜下層、mp: 筋板層、se: 漿膜へ浸潤したがんを示す。c. mTOR 阻害薬と EGFR 阻害薬 (上) または MEK 阻害薬 (下) の併用投与が腺がんが *Timp1* 遺伝子発現に及ぼす影響について RT-PCR により検証した。d. 本研究の概略図。

標的分子の変異やフィードバック経路の活性化などががん細胞は様々な方法で分子標的薬に対し抵抗性を獲得する。一方、多くの分子標的薬は本来細胞が生存や増殖に必要としている分子やシグナル経路も抑制する可能性があり、副作用の観点から安全で適切な選択が求められている。大腸がん微小環境もフィードバックによって活性化し、大腸がん細胞の分子標的薬抵抗性獲得に寄与すること、そしてがん微小環境も抵抗性克服のための標的となることが本研究によって初めて明らかになった。今後臨床において、活性化したがん微小環境が分子標的薬抵抗性を示すがんに対して治療標的の一つとなることが期待される。

#### <引用文献>

1. Straussman R, *et al.* Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012; 487: 500-504.
2. Kitamura T, *et al.* SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nat Genet*. 2007; 39: 467-475.
3. Kitamura T, *et al.* Inactivation of chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1) suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 13063-13068.
4. Fujishita T, *et al.* Antitumor activity of the MEK inhibitor trametinib on intestinal polyp formation in *Apc*<sup>Δ716</sup> mice involves stromal COX-2. *Cancer Sci*. 2015; 106: 692-699.
5. Herszényi L, *et al.* The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 13240-13263.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, Oshima M, Nakagawa T, Akamoto S, Tabata S, Saitoh K, Kato K, Sato S, Igarashi K, Aizawa Y, Kajino-Sakamoto R, Kojima Y, Fujishita T, Enomoto A, Hirayama A, Ishikawa T, Taketo MM, Kushida Y, Haba R, Okano K, Tomita M, Suzuki Y, Fukuda S, Aoki M, Soga T. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114: E7697-E7706. doi: 10.1073/pnas.1710366114. 査読有り
- ② Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, Aoki M. Tumor microenvironment

confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2017; 36: 6480-6489. doi: 10.1038/onc.2017.242. 査読有り

- ③ Aoki M, Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017; 407: 153-189. doi: 10.1007/82\_2017\_6. 査読無し

[学会発表] (計 9 件)

- ① 藤下 晃章、小島 康、三城 恵美、曾我 朋義、武藤 誠、青木 正博. Involvement of histamine in the invasion of mTOR-inhibitor resistant intestinal tumors. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 27 日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ② 小島 康、藤下 晃章、三城 恵美、梶野 リエ、武藤 誠、青木 正博. Roles of Dio2 (deiodinase, iodothyronine, type II) in colorectal tumorigenesis. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 27 日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ③ 梶野 リエ、藤下 晃章、武藤 誠、青木 正博. Roles of intestinal epithelial MyD88 in intestinal tumor formation in *Apc* mice. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 27 日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ④ 藤下 晃章、津田 都子、小島 康、武藤 誠、青木 正博. Roles of EGFR activation in drug resistance of intestinal tumors. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑤ 津田 都子、藤下 晃章、小島 康、武藤 誠、青木 正博. Combination treatment with erlotinib and trametinib suppresses intestinal adenocarcinoma formation in *cis-Apc/Smad4* mice. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑥ 梶野 リエ、藤下 晃章、武藤 誠、青木 正博. Role of intestinal epithelial MyD88 in intestinal tumorigenesis in *Apc<sup>+Δ716</sup>* mice. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑦ 藤下 晃章、梶野 リエ、小島 康、武藤 誠、青木 正博. Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance to invasive intestinal adenocarcinoma. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑧ 小島 康、今度 ゆり子、藤下 晃章、梶野 リエ、武藤 誠、青木 正博. Role of Deionase, Iodothyronine, Type II in Colon Tumorigenesis. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑨ 梶野 リエ、藤下 晃章、武藤誠、青木正博. Elucidation of the relevance of JNK-mTORC1 pathway activation to neuropeptides during intestinal tumorigenesis. 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

[図書] (計 0 件)

[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：  
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：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

- ① がん病態生理学分野 (トピック)  
[https://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi\\_byotai/07katsudo.html](https://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi_byotai/07katsudo.html)
- ② 愛知県がんセンター プレスリリース  
大腸がんが薬剤抵抗性を獲得する新しいメカニズムの発見～がん細胞は周囲の正常細胞を

積極的に利用して耐えている～  
<https://www.pref.aichi.jp/cancer-center/cc/press/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

※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。