

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07190

研究課題名(和文) がん細胞におけるMT1-MMPによるEphA2切断を介した抗がん剤耐性とその克服

研究課題名(英文) Cleavage of EphA2 by MT1-MMP and its participation to drug resistance

研究代表者

菊地 慶司 (KIKUCHI, KEIJI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：90372094

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)：BRAF変異を持つHT29大腸がん細胞においてMT1-MMPの発現をRNAiにより抑制し、MT1-MMPがvemurafenib (vem)への抵抗性に関与するという結果を得た。vemに耐性のHT29細胞を取得したが、EphA2の発現が著しく低下しており、MT1-MMPによって切断されたEphA2とvem抵抗性との関係は検証できなかった。

また、collagen-Iを用いた3次元培養においてHT29細胞のvem感受性が増加するが、その機序として、collagen-Iへの接着よりも細胞が接着する足場の堅さがERBBファミリーキナーゼの発現と活性化を介してvemへの耐性に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において抗がん剤(分子標的薬)に対する耐性の克服は重要な課題である。本研究により、MT1-MMPが分子標的薬(BRAF変異を標的とするvemurafenib)に対する耐性に関与している可能性が示された。また細胞が接着する足場のかたさ(rigidity)がERBBファミリーの活性を介して細胞にvemurafenibに対する抵抗性を付与することが示された。これはがんにおいてしばしば認められる組織の繊維化ががん細胞に抗がん剤に対する耐性に関与していることを示唆し、がん組織の繊維化が抗がん剤に対する感受性の指標となりうること、また組織の繊維化の抑制により抗がん剤の作用を増強する可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：MT1-MMP cleaves EphA2 between ligand binding domain and transmembrane region. In this study, we aimed to investigate whether MT1-MMP contributes to the drug resistance through cleavage of EphA2. RNAi-mediated deprivation of MT1-MMP sensitized HT29 colon cancer cells carrying BRAF V600E mutation to vemurafenib (vem), implying contribution of MT1-MMP to drug resistance. We asked if vemurafenib-resistant HT29 cells harbor increased amounts of MT1-MMP-cleaved EphA2. We found that expression of EphA2 is rather decreased in vem-resistant HT29 cells comparing to the parental cells, which hampered evaluation of contribution of cleavage or phosphorylation of EphA2 in vem-resistance.

We also found HT29 cells cultured in 3-dimensional collagen-I gel (3D-coll) showed higher sensitivity to vem comparing to those cultured on plastic surface. Cell adhesion to rigid surface rather than adhesion to collagen-I confers resistance to vem through activation of ERBB family kinases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：薬剤耐性 MT1-MMP 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

(1) MT1-MMP による EphA2 の切断：従来 MT1-MMP は細胞外マトリックスを分解し、また MMP 群を活性化することによってがん細胞の浸潤・転移、増殖に関与するものとされてきた。しかし近年、MT1-MMP が細胞膜表面の受容体や蛋白質を切断することによって細胞内シグナル伝達系を活性化することで細胞の悪性化に寄与していることが示されてきている。我々は MT1-MMP が EphA2 に結合し、リガンド結合部位と膜貫通ドメインの間で EphA2 を切断することを見出し、切断型 EphA2 は Ephrin 非依存的に細胞の浸潤能およびマウスにおける造腫瘍能を亢進させ、oncogenic に機能するようになって可能性を示した (Koshikawa et al, *Cancer Res.* 75:3327, 2015)。

(2) EphA2 分子標的薬剤耐性への関与：EphA2 は Ras、Rac、Rho などの small GTPase の活性の調節を介してがん細胞の運動・浸潤、増殖に関与することが報告されているが、加えて EphA2 はがん細胞の抗がん剤耐性に関与することが報告されてきている。乳癌細胞において EphA2 は ErbB2 のシグナルを増強し、trastuzumab に対する抵抗性を付与する (Zhuang et al, *Cancer Res.* 70:299, 2010)。また最近、メラノーマにおいて BRAF (V600E 変異) の阻害薬である vemurafenib に対する抵抗を獲得した細胞では EphA2 の過剰発現がおこり、耐性が EphA2 に依存していることが示されている (Paraiso et al, *Cancer Discovery* 5:264, 2015; Miao et al, *Cancer Discovery* 5:273, 2015)。

(3) MT1-MMP の抗がん剤耐性への関与：これについてはきわめて知見が乏しいのが現状である。我々は上記の背景 1) と 2) より、MT1-MMP が抗がん剤耐性への関与は MT1-MMP が標的として切断する分子の機能・シグナル伝達経路と、分子標的薬剤が標的とする分子の機能・シグナル伝達経路とが重なっている場合に薬剤耐性が出現するのではないかと考え、まず EphA2 が関与する分子標的薬への耐性を軸としてこの点を検証することを考えた。

2. 研究の目的

がん治療において抗がん剤に対する耐性の克服は重要な課題である。MT1-MMP はがん細胞の浸潤・転移・増殖の key regulator であるが、抗がん剤耐性への関与についてはほとんど知られていない。我々は最近 MT1-MMP が EphA2 を切断して細胞の浸潤、造腫瘍性を増強することを見いだしたが、EphA2 は分子標的薬剤の耐性に関与していることが報告されている。本研究は MT1-MMP が EphA2 の切断を介してがん細胞の抗がん剤耐性に関与している可能性を検討し、これを手がかりとして抗がん剤耐性を打破する方法を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) BRAF V600E を標的とする vemurafenib が適用できる大腸がん由来 HT29 細胞を用いて、MT1-MMP・EphA2 のノックダウンが vemurafenib に対する感受性を上昇させるかどうか検討する。

(2) vemurafenib に対する耐性を獲得した HT29 細胞を取得し、EphA2 の発現量、切断型 EphA2 の存在、それらの活性化の状態を検討する。

(3) MT1-MMP、EphA2 が関与するシグナル伝達経路を検討し、vemurafenib 等の抗がん剤に対する耐性を克服する方法を検討する。

4. 研究成果

(1) MT1-MMP が切断する EphA2 の部位の決定

MT1-MMP による EphA2 の切断点については、これまでにヒト繊維肉腫由来の HT1080

細胞および乳がん由来の MDA-MB-231 細胞で報告されているが、両者は一致しておらず、細胞により切断点が異なっている可能性がある。この点を確認するために、ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞に myc タグと His タグを付加した EphA2 と MT1-MMP を共発現させ、MT1-MMP により切断された EphA2 の断片（膜上の C 末端側）を抗 myc タグ抗体と Ni カラムを用いて精製し、断片の N 末端側のアミノ酸配列を mass spectroscopy により決定した。その結果、HCT116 細胞での MT1-MMP による EphA2 の切断点は HT1080 細胞での切断点と一致した結果が得られ、少なくとも当該の切断点については細胞間で保存されることが示された。

(2) MT1-MMP の vemurafenib 耐性への寄与

BRAF 変異 (V600E) を有する大腸がん由来の HT-29 細胞株で MT1-MMP の発現を RNAi により抑制した場合に、BRAF 変異を標的とする分子標的薬 vemurafenib に対する感受性がどのように変化するかを検討した。その結果、MT1-MMP の発現の抑制により、比較的高濃度 (1 μ M ~ 3 μ M) の vemurafenib に対する感受性が増加することが認められた (図 1)。

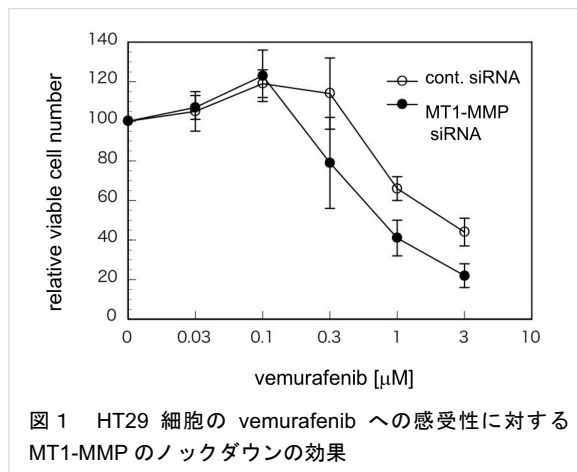


図 1 HT29 細胞の vemurafenib への感受性に対する MT1-MMP のノックダウンの効果

(3) vemurafenib に抵抗性の細胞株の取得と EphA2 の発現

大腸がん由来の HT29 細胞株について、IC50 である 3 μ M の vemurafenib の存在下で生存・増殖する細胞群を選択した。感受性試験を行なったところ、感受性試験においては親株に比べて感受性が低下している (抵抗性を獲得している) という結果とはならなかった。理由は不明である。また、EphA2 の発現を検討したところ、耐性株では EphA2 の発現が著しく低下していた。EphA2 の発現は MAP キナーゼの活性に強く依存していると思われ、vemurafenib への耐性株では耐性とはいえ MAP キナーゼの活性が低下しており、このため EphA2 の発現が低下しているのとも考えられる。EphA2 の発現自体が低下しているため、MT1-MMP により切断された EphA2 の検出をすることができず、切断された EphA2 が vemurafenib に対する耐性に寄与しているのかどうか検討することはできなかった。

(4) 細胞外マトリックスと vemurafenib 耐性

MT1-MMP の活性は細胞外マトリックスの有無・種類によって大きく変化するものと考えられる。そこで大腸がん由来の HT-29 細胞株で、BRAF 変異を標的とする分子標的薬 vemurafenib に対する感受性は細胞を collagen-I ゲルに包埋して培養して検討したところ、通常のプラスチック表面で培養した場合よりも 10 倍程度に高まることが観察された (図 2 A)。一方、collagen-I gel に包埋して培養した細胞で MT1-MMP の発現量が低下することが見出された。これは MT1-MMP が抗がん剤耐性に寄与しているという可能性を支持する (図 2 B)。

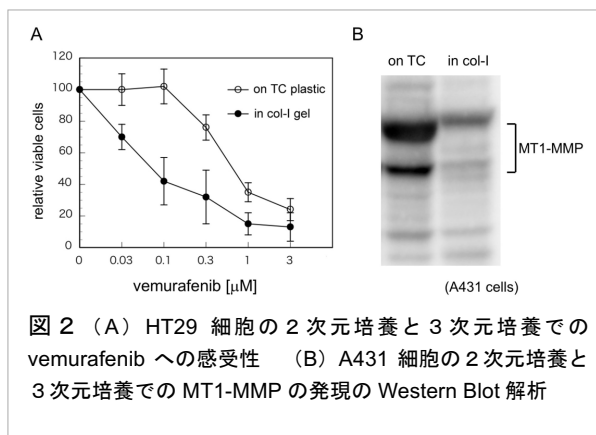


図 2 (A) HT29 細胞の 2 次元培養と 3 次元培養での vemurafenib への感受性 (B) A431 細胞の 2 次元培養と 3 次元培養での MT1-MMP の発現の Western Blot 解析

この分子論的背景を検討し、活性化した Focal adhesion kinase (FAK) および ErbB family kinase (EGFR, ErbB2, ErbB3) の量 (総蛋白質の量および/またはリン酸化の割合) が

collagen-I ゲルに包埋して培養した場合はプラスチック表面で培養した場合に比べ著しく少ないことを見出した (図 3A)。このいずれかが vemurafenib に対する感受性に関与しているのかを確かめるために、FAK 阻害剤および ErbB family kinase 阻害薬(Afatinib)の作用を検討した。

FAK 阻害剤は単剤では vemurafenib の作用を増強しないが Afatinib は比較的高濃度の vemurafenib の作用を増強することがわかった (図 3B)。従って、ErbB family kinase の活性が vemurafenib に対する耐性に関与し、collagen-I ゲルに包埋して培養した場合には、ErbB family kinase の活性が低いために vemurafenib に対する感受性が高まるものと考えられた。ただし、Afatinib は比較的低濃度の vemurafenib の作用を増強しないことから、collagen-I ゲルに包埋して培養した場合の vemurafenib への高い感受性は ErbB の活性が低いこと以外にも原因があると思われる。

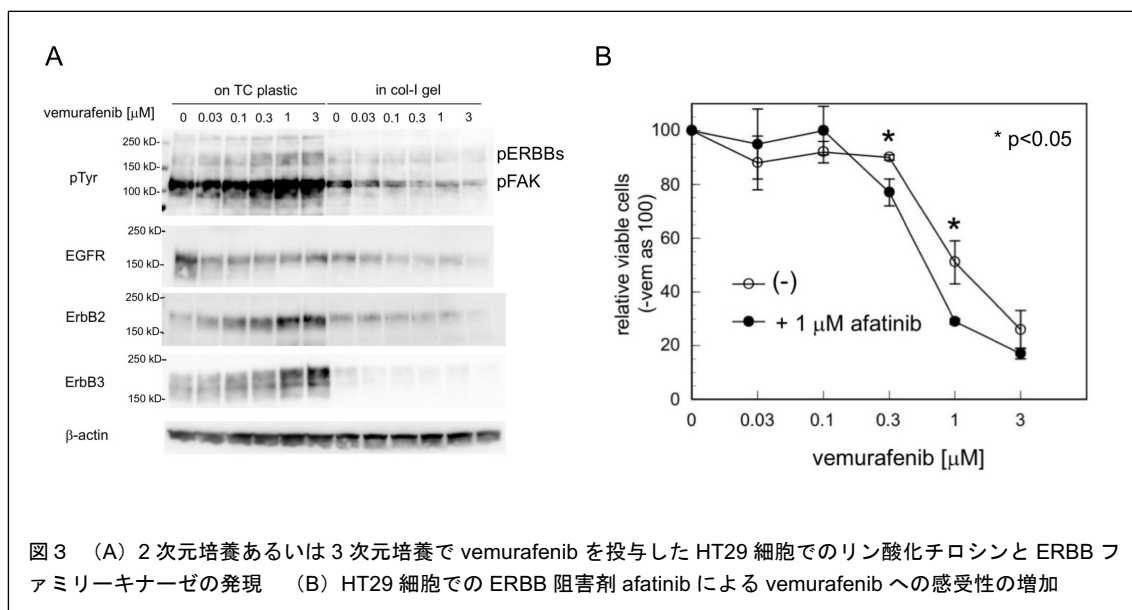


図3 (A) 2次元培養あるいは3次元培養で vemurafenib を投与した HT29 細胞でのリン酸化チロシンと ERBB ファミリーキナーゼの発現 (B) HT29 細胞での ERBB 阻害剤 afatinib による vemurafenib への感受性の増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kikuchi K, Hoshino D	4. 巻 44
2. 論文標題 Sensitization of HT29 colorectal cancer cells to vemurafenib in three-dimensional collagen cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 621-629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbin.11262	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊地慶司
2. 発表標題 3次元コラーゲン培養系での大腸がん細胞のvemurafenibに対する高感受性
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Cal S and Obaya AJ (Eds)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 pp.29-37
3. 書名 Proteases and Cancer	

〔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	星野 大輔 (Daisuke Hoshino) (30571434)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・副技幹・主任研究員 (82713)	