

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06992

研究課題名(和文) 膵癌におけるMAPキナーゼ阻害薬耐性機構の解明と新規治療法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of resistance to MAP kinase inhibitor in pancreatic cancer and establishment of novel therapeutic strategy targeting to the resistance

研究代表者

守山 正胤 (Moriyama, Masatsugu)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90239707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌はMAPキナーゼという分子の働きが異常に亢進しており、それによって高レベルの増殖能や浸潤能を維持している。したがって、MAPキナーゼの働きを抑える阻害薬は膵癌の治療薬として有望であることが期待される。しかし、これまで施行された臨床試験ではMAPキナーゼの有効性は示されていない。本研究では、膵癌細胞で発現されるClusterinという分子が細胞生存能を高め、MAPキナーゼ阻害薬抵抗性に関わることを示した。さらに、Clusterinの発現を抑制するとMAPキナーゼ阻害薬の効果が認められるようになることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最も予後不良な癌のひとつである。その理由として、顕著な有効性を示す抗がん剤治療法が開発されていないことが挙げられる。したがって膵癌の治療成績を改善するためには、膵癌の発症・進展に関わる分子メカニズムを解明して、その知見に基づく新規治療法の開発が強く望まれる。本研究では、MAPキナーゼ阻害薬抵抗性獲得に関与する分子Clusterinを同定した。さらに、Clusterinを標的とした治療を併用することでMAPキナーゼ阻害薬の有効性が回復することを示した。今後、ClusterinとMAPキナーゼを標的とする新規膵癌治療法の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that an activated MAP kinase contributes to maintain the higher levels of cell growth potential and invasiveness in pancreatic cancer. Therefore, an inhibitor to the MAP kinase is expected to be a promising agent against the pancreatic cancer. However, to date, several clinical trials have failed to demonstrate the efficacy of MAP kinase inhibitor to the patients with pancreatic cancer. In this study, we showed that Clusterin, expressed in pancreatic cancer cells, was involved in the increased cell viability and the resistance to MAP kinase inhibitor. Furthermore, we exhibited the synergistic suppressive effects on cell growth by combination of the treatment with MAP kinase inhibitor and downregulation of Clusterin.

研究分野：分子病理学

キーワード：膵癌 MAPキナーゼ阻害薬 耐性機構

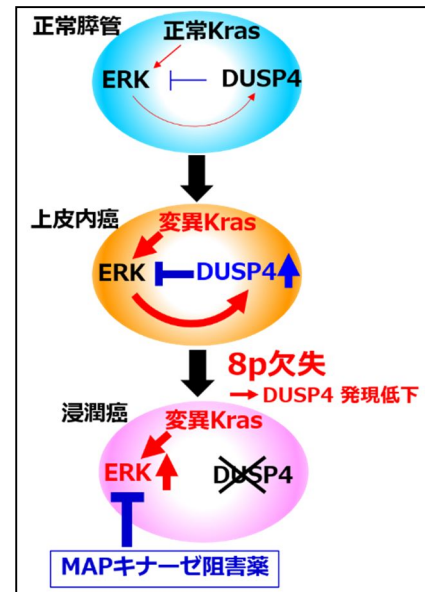
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な癌のひとつで、5年生存率は9.1%に過ぎない。したがって治療成績を改善するためには、膵癌の発症・進展に関わる分子メカニズムを解明して、その知見に基づく新規治療法の開発が強く望まれる。私は、膵癌の上皮内癌と浸潤癌のゲノム異常を比較することにより、膵癌の浸潤過程で8番染色体短腕が欠失すること、そのゲノム領域に存在するDUSP4遺伝子の発現低下によりMAPキナーゼが活性化すること、活性化したMAPキナーゼは膵癌細胞の浸潤能を亢進すること、MAPキナーゼ阻害薬が膵癌治療として有効であることを明らかにした(右図、Cancer Res, 2016 76: 2626-2636)。

しかし、これまで施行された臨床試験で膵癌患者に対するMAPキナーゼ阻害薬の有効性は示されていない。そこで、生体での膵癌細胞に対するMAPキナーゼ阻害薬の効果を検証するために、ヒト膵癌細胞を同所移植した免疫不全マウスを用いて治療実験を施行した。治療群では投与開始直後から腫瘍は増殖が抑制されて2週間ごろには検出限界値以下まで縮小した。しかし、すぐに抗腫瘍効果は消失して、2週目以降は治療群と対照群の腫瘍はほぼ同様な増大傾向を示した。その結果、治療群の生存期間はわずかに延長したものの、最終的には両群のすべてのマウスが癌死に至った。以上の結果から、治療群ではMAPキナーゼ阻害薬耐性獲得に関わる分子機構が早期に発動されることが示唆された。

私は、この阻害薬耐性に関わる分子機構を明らかにして、それを制御することができれば、MAPキナーゼ阻害薬に対する感受性が回復して治療効果の改善が見込まれるのではないかと考え、本研究を企画した。



### 2. 研究の目的

本研究では、以下の項目について解析を進める。

- (1) 耐性獲得に関わる分子の同定  
前述の治療実験では耐性獲得が早期に認められたことから、新たなゲノム異常が付加されたサブクローンが出現してそれが再増殖した可能性よりも、エピゲノムレベルの変化に基づく遺伝子発現変化が耐性獲得に関わる可能性が高いと考える。そこで治療群と対照群の膵腫瘍の遺伝子発現プロファイルと比較して、発現変動によって耐性獲得に関与する分子を同定する。
- (2) 耐性獲得機序の解明  
同定した耐性関連遺伝子の機能解析を行い、耐性獲得メカニズムを解明する。
- (3) 耐性克服のための治療法の開発  
耐性獲得に関与するシグナルパスウェイの構成分子を標的とした新規治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

- (1) 耐性獲得に関わる分子の同定  
免疫不全マウス (NOD/scid) にヒト膵癌細胞株 (MIA PaCa-2) を同所移植 3 週後に、マウスを 2 群に分け、治療群に対し MAP キナーゼ阻害薬 (PD325901) の経口投与 (12.5 mg/kg/mouse/day) を開始する。対照群には同量の溶媒のみを投与する。治療開始 30 日目に全マウスを屠殺して膵腫瘍を摘出する。各膵腫瘍より RNA を回収してマイクロアレイを用いた網羅的発現解析を施行する。対照群に比べて治療群の膵腫瘍で有意に発現が変動している遺伝子を抽出し、耐性関連遺伝子候補とする。  
抽出した耐性関連遺伝子の発現変動を検証する。mRNA レベルの検証は、リアルタイム PCR 法で行う。タンパクレベルの検証は Western blot 法および免疫組織化学で行う。  
抽出した耐性関連遺伝子が実際に耐性獲得に関与しているのか、また、移植実験で用いた MIA PaCa-2 以外の膵癌細胞株についても同様の耐性機構が働いているのかについて、in vitro の実験系で検討する。耐性獲得腫瘍で発現が亢進している遺伝子については siRNA を用いたノックダウンで、発現が低下している遺伝子についてはレンチウイルスベクターを用いた一過性遺伝子導入で耐性能がキャンセルされるか否かを検証する。

- (2) 耐性関連シグナルパスウェイの解明

治療群と対照群の膵腫瘍を用いた網羅的発現解析の結果をパスウェイ解析データベース (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems) に連携して、耐性関連候補遺伝子が担うシグナルパスウェイの概要を得る。特に、MAP キナーゼパスウェイとのクロストークに注目する。

治療群と対照群の膵腫瘍からタンパクを抽出して、リン酸化タンパクアレイを用いて、

主要な癌関連シグナルパスウェイに関わる分子の活性化を半網羅的に解析する。

上記2つの解析結果から、耐性関連候補遺伝子のシグナルパスウェイを構成する分子の中で、標的分子となり得る分子を抽出する。もし既に阻害薬あるいは分子標的薬が存在する分子があれば治療の標的分子候補とする。

(3) 耐性制御を併用した MAP キナーゼ標的治療法の開発

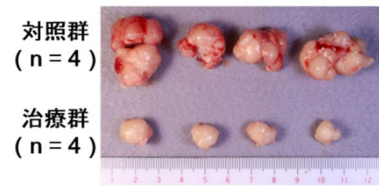
MAP キナーゼ阻害薬の耐性に関わる分子を阻害することで MAP キナーゼ阻害薬の効果が回復・改善するか否かを *in vitro* で検証する。細胞培養プレートにまいた膵癌細胞株に、MAP キナーゼ阻害薬のみ、耐性関連分子阻害薬のみ、MAP キナーゼ阻害薬と耐性関連分子阻害薬の両方を添加する。経時的に細胞の増殖能、アポトーシス誘導性を測定して比較する。

ヒト膵癌組織における CLU の発現動態を免疫組織化学で解析する。対象は、当大学附属病院で膵癌切除術が施行され、5 年以上術後の経過が追跡された症例 91 例である。CLU 発現レベルと病床病理学的因子（年齢、性別、深達度、分化度） 予後との関連性について検討する。

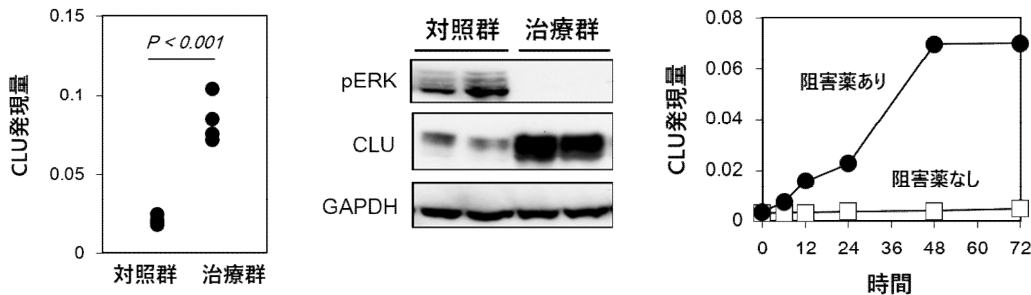
4. 研究成果

(1) MAP キナーゼ阻害薬耐性化に関わる分子の同定

MIA PaCa-2 移植・治療実験で得られた膵腫瘍の外観（右図）を示す。治療群の腫瘍は対照群に比較して明らかに小さいが、既に耐性を獲得し増大傾向にある。

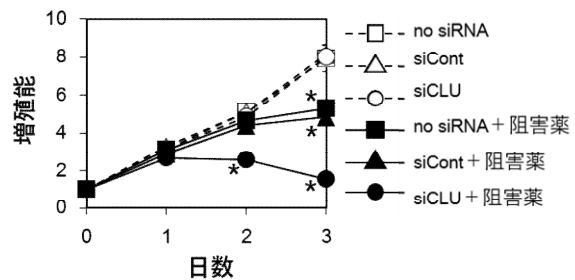


各膵腫瘍より RNA を回収してマイクロアレイを用いた網羅的発現解析を施行した。その結果、対照群に比べて治療群の膵腫瘍で有意に発現が変動している遺伝子として Clusterin (CLU) が抽出された。（下左と中図）。MAP キナーゼ阻害薬添加による CLU の発現誘導は、MIA PaCa-2 の 2 次元培養下においても観察された（下右図）。



ヒト膵癌細胞株 27 株を用いて MAP キナーゼ阻害薬添加による CLU 発現誘導について調べたところ、発現誘導は 11 株でみられた。また、10 株については添加前から高レベルの CLU 発現が認められた。

MIA PaCa-2 で発現誘導される CLU が、MAP キナーゼ阻害薬耐性化に関与していることを検証するために、siRNA を用いて CLU 発現を抑制したところ、MAP キナーゼ阻害薬感受性が亢進して増殖能は顕著に低下した（右図）。



以上の結果から、MAP キナーゼ阻害薬の投与によって発現誘導された CLU は、MIA PaCa-2 の MAP キナーゼ阻害薬耐性能を増強していることが示唆された。

(2) 耐性制御を併用した MAP キナーゼ標的治療法の開発

ヒト膵癌細胞株 21 株を用いて、MAP キナーゼ阻害薬と CLU 発現抑制の併用による治療効果を検討した。13 株（61.9%）で、併用の有効性が認められた。添加による CLU 発現誘導について調べたところ、発現誘導は 11 株でみられた。また、併用が無効な細胞株のうち 2 株（9.5%）では、CLU 発現抑制単独で有意な増殖抑制効果を認めた。

ヒト膵癌の切除組織 91 例を用いて、CLU の発現動態を免疫組織化学で解析した。非癌部の膵組織では、CLU の発現はラ氏島細胞のみに限局していた。一方、膵癌組織においては 46 例（50.6%）の症例で癌細胞の細胞質に CLU 発現を観察した。発現は癌の分化度と関連し、高分化癌で高率に発現を認めた。

本研究で得られた知見から、CLU は膵癌細胞において MAP キナーゼ阻害薬に対する抵抗性を高める分子であることが明らかになった。また、膵癌細胞株を用いた治療実験で、CLU を標的とした治療と MAP キナーゼ阻害薬の併用が、約 7 割の細胞株で増殖を抑制することが分かった。さらに半数のヒト膵癌組織で CLU の発現亢進が観察されたことから、少なくとも半数の膵癌症例においては CLU と MAP キナーゼを標的とした治療の併用が有効であることが期待される。今後、CLU の発現誘導のメカニズムを解明する。さらに耐性化に関わる下流シグナルパスウェイを同定して、その膵癌の治療標的としての有用性を検討する予定である。本研究の成果を含む論文はほぼ完成しており現在投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakada C, Hijiya N, Tsukamoto Y, Yano S, Kai T, Uchida T, Kimoto M, Takahashi M, Daa T, Matsuura K, Shin T, Mimata H, Moriyama M.	4. 巻 251
2. 論文標題 A transgenic mouse expressing miR-210 in proximal tubule cells shows mitochondrial alteration: possible association of miR-210 with a shift in energy metabolism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 12-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5394	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 Iwasaki K, Ninomiya R, Shin T, Nomura T, Kajiwara T, Hijiya N, Moriyama M, Mimata H, Hamada F	4. 巻 109
2. 論文標題 Chronic hypoxia-induced slug promotes invasive behavior of prostate cancer cells by activating expression of ephrin-B1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci. Oct;	6. 最初と最後の頁 3159-3170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13754	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 Fukumoto T, Ikebe E, Ogata M, Kohno K, Kuramitsu M, Sato Y, Fife N, Matsumoto T, Yahiro T, Ikeda M, Kusano S, Okayama A, Horii M, Hijiya N, Tsukamoto Y, Hirashita Y, Moriyama M, Ahmed K, Hasegawa H, Nishizono A, Saito M, Iha H	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Sequences of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes from Newly Established Adult T-Cell Leukemia Cell Lines in Oita Prefecture, Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announc.	6. 最初と最後の頁 e00090-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.00090-18	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 Abe I, Teshima Y, Kondo H, Kaku H, Kira S, Ikebe Y, Saito S, Fukui A, Shinohara T, Yufu K, Nakagawa M, Hijiya N, Moriyama M, Shimada T, Miyamoto S, Takahashi N	4. 巻 15
2. 論文標題 Association of fibrotic remodeling and cytokines/chemokines content in epicardial adipose tissue with atrial myocardial fibrosis in patients with atrial fibrillation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Rhythm.	6. 最初と最後の頁 1717-1727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hrthm.2018.06.025	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 一万田 充洋, 泥谷 直樹, 赤木 智徳, 白下 英史, 衛藤 剛, 猪股 雅史, 守山 正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現パターンとその意義について
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平下 有香, 水上 一弘, 沖本 忠義, 兒玉 雅明, 白下 英史, 猪股 雅史, 守山 正胤, 村上 和成
2. 発表標題 RAS/BRAF変異型進行大腸癌における早期反応性マーカーを用いたtrametinib感受性予測法の検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一万田 充洋, 泥谷 直樹, 赤木 智徳, 白下 英史, 衛藤 剛, 猪股 雅史, 守山 正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現変動の意義
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泥谷 直樹, 一万田 充洋, 塚本 善之, 内田 智久, 中田 知里, 赤木 智徳, 衛藤 剛, 伊波 英克, 猪股 雅史, 守山 正胤
2. 発表標題 大腸癌におけるDUSP4発現低下は増殖能および浸潤能を亢進させる
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------