

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15283

研究課題名(和文) 早期反応性マーカーを用いた胃癌RTK/KRAS標的治療における感受性予測法の確立

研究課題名(英文) Establishment of prediction system for RTK/KRAS targeting therapy in gastric cancer using early response biomarker.

研究代表者

平下 有香 (Hirashita, Yuka)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：70771955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌や大腸癌ではRTK/KRASシグナルに関連する遺伝子異常が検出される。申請者はこれまでRTK/KRAS標的治療としてMEK阻害剤の感受性とその感受性予測マーカーの探索に取り組んできた。細胞株を用いた実験ではMEK阻害剤の増殖抑制効果と薬剤投与後早期のS6タンパクのリン酸化レベルの変化率が非常に高い相関を示した。さらに胃癌および大腸癌患者から癌オルガノイドを樹立し、trametinib(MEK阻害剤)の感受性を調べ、その感受性とS6リン酸化レベルが細胞株と同様高い相関を示すことを明らかとした。また最後にマウス移植モデルでもS6タンパクのリン酸化レベルの変化は検出可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌ゲノム時代を迎え、遺伝子異常を標的とした個別化医療が可能となった。しかし遺伝子異常だけでは、分子標的治療薬の感受性が完全に予測できずより精度の高いバイオマーカーが望まれている。本研究では癌オルガノイドを用いて薬剤投与と早期のタンパク質リン酸化レベルの変化による感受性予測法は、癌オルガノイドを用いた従来の感受性試験と比べ、少量の検体量でより早期に検出可能であった。またKRASなどの遺伝子変異だけでは予測不可能な耐性を示す症例も見つけることが可能であった。申請者の示す予測法は遺伝子異常と組み合わせることで、RTK/KRASシグナル標的治療において、より精度の高い感受性予測法の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer (GC) and is characterized by genomic alteration with RTK and KRAS signaling pathway, therefore, targeting of the RTK/KRAS downstream pathways could help to broaden the applicability of molecular targeted therapy for GC. We established patient-derived GC organoid (additionally CRC organoid) to analyze the sensitivities of organoids to MEK inhibitor treatment. Furthermore, we showed that the change in pS6 level after MEK inhibition was well correlated with responsiveness to trametinib. We proposed predict system with patient-derived organoids, the change in pS6 could be a useful biomarker for RTK/KRAS signal targeting therapy.

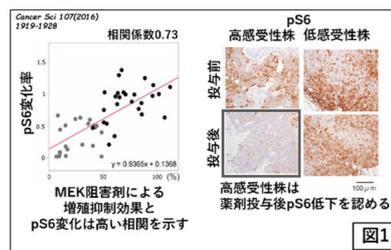
研究分野：消化器内科

キーワード：バイオマーカー 感受性予測

1. 研究開始当初の背景

胃癌を始めとする消化器癌において患者間での遺伝子異常が多様であることが特徴である。新たな分子標的治療法を確立するためには、精度の高いバイオマーカーの同定とそれによる治療前の患者の選別が必要となる。胃癌および大腸癌では RTK (Receptor Tyrosine Kinase : ERBB2, MET, EGFR, FGFR2)および その下流の KRAS、BRAF を含む RTK/KRAS シグナルに関わる因子の異常が高頻度に検出される。この結果は、これらの異常によって引き起こされる RTK/KRAS シグナルの活性が、癌細胞の増殖や浸潤に重要であることを示唆する。これまで、進行胃癌での RTK/KRAS シグナルを標的とした多くの分子標的治療薬の臨床試験が実施されてきた。しかし基礎研究において高い有効性が認められているにも関わらず、実際の臨床試験では有意な結果を残せていない。

申請者はこれまで、RTK/KRAS シグナル標的治療薬の一つである MEK 阻害剤の胃癌における有効性の検討とバイオマーカーの探索を行ってきた。それらの解析の中で、胃癌に MEK 阻害剤の有効群が存在することを *in vitro* および *in vivo* で明らかにした。興味深いことに、MEK 阻害剤への感受性は薬剤投与による S6 タンパク活性の変化率により判別が可能であることを見出した。これらの結果は、RTK 増幅および KRAS 変異などの遺伝子異常による予測よりも高い相関を示し、早期 (薬剤投与後 6 時間) に検出可能であった (図 1)。これらの結果は、癌細胞に薬剤投与後に早期引き起こされるタンパク活性変化による判定が RTK/KRAS シグナル標的治療の精度の高い感受性予測法となる可能性を示唆する。



2. 研究の目的

本研究では患者から樹立した癌オルガノイドを樹立し、RTK/KRAS 標的治療薬において、早期反応性マーカーの同定とその検出法を確立し、精度の高い新規感受性予測法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞株を用いた薬剤感受性試験とマーカー候補の抽出

それぞれの細胞株を 4×10^4 に希釈し 96well プレートにまき 24 時間培養する。その後段階棄却した抗がん剤/分子標的治療薬を投与し 72 時間培養。細胞増殖への影響を CellTiter 96® Aqueous (sigma 社)を用いて解析する。感受性株 3 株、耐性株 3 株を選出し、薬剤投与前後に細胞株からタンパク回収を行う。ウエスタンブロット法にて感受性株に特異的に検出される反応を認める因子の抽出を複数個行う。

(2) 癌オルガノイドの樹立

胃癌に加え RTK/KRAS 異常の頻度が高い大腸癌において癌オルガノイドの樹立を行った。詳細は Sato (Gastroenterology, 2011), Kijima (Cell Mol Gastroenterol Hepatol., 2018)らの方法に従った。用いたサンプルは内視鏡生検または外科的切除検体を用いた。大腸癌オルガノイドのセレクションは Wnt を除いた培地によって行った。

(3) 癌オルガノイドを用いた薬剤感受性試験

トリプル処理および $15\mu\text{m}$ と $70\mu\text{m}$ のフィルターに通すことで、サイズを均一にした ($15-70\mu\text{m}$ サイズの癌オルガノイドを使用) 癌オルガノイドに段階希釈した分子標的治療薬を投与し 5 日間培養し細胞増殖への影響を 3D Celltiter Glo (Promega 社)を用いて測定した。

(4) 感受性予測マーカーの検出

薬剤投与した癌オルガノイドからタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法で目的のタンパク質のリン酸化レベルの検出を行った。また蛍光免疫染色での評価も行った。4%パラホルムアルデヒドでオルガノイドを固定し 0.5% Triton-PBS 透過処理を行った。透過処理を行ない、蛍光免疫染色を行った。蛍光顕微鏡で観察を行った。

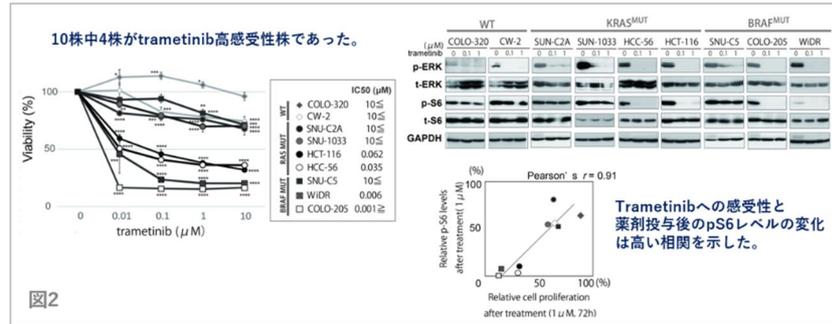
(5) 皮下移植実験

生体内での感受性予測マーカーの検出を行うため、免疫不全マウス (NSG マウス) への癌オルガノイド皮下移植を行った。NSG マウスの皮下へ移植し腫瘍径が 100cm^3 となった時点で、分子標的治療薬を投与し、腫瘍を摘出。免疫染色法にて生体内におけるマーカーの検出を行った。

4. 研究成果

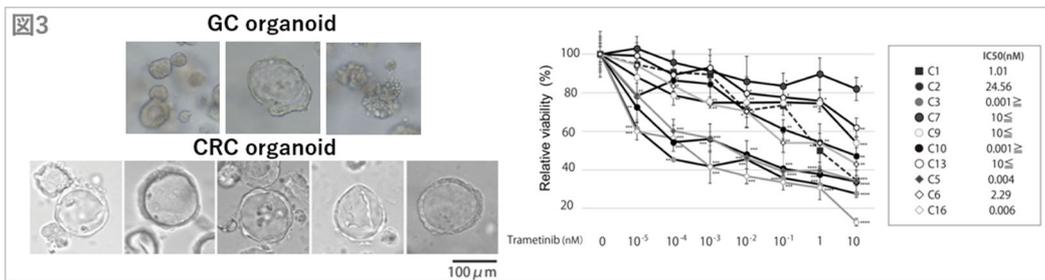
(1) 細胞株(胃癌・大腸癌) MEK 阻害剤感受性と早期反応性マーカーの同定

胃癌細胞株と同様に、RTK/KRAS シグナルを標的とした治療が有効であると予想される大腸癌細胞株 (RAS 変異 BRAF 変異を含む) においても、RTK/KRAS シグナルを標的とした分子標的治療薬の一つである Trametinib (MEK 阻害剤) を投与し IC50 を算出することで感受性を評価した。我々がこれまで明らかとしてきた胃癌細胞株の結果と同様、約半数に感受性の高い細胞が含まれ、薬剤投与後の pS6 レベルの変化率と感受性が高い相関を示した。



(2) 癌オルガノイドの樹立

外科的切除術または内視鏡生検より採取した組織を用いて癌オルガノイドを樹立した。胃癌オルガノイドの樹立については、正常胃上皮粘膜の混入が高頻度で生じるため顕微鏡下で正常上皮オルガノイドと形の異なるオルガノイドを選別することで癌オルガノイドを抽出した。大腸癌オルガノイドについては、ほぼ全症例で APC 変異による WNT 経路の活性化が引き起こされていることが知られているため、培地中から WNT を抜くことにより、正常大腸上皮からの選別を胃・大腸癌オルガノイドをそれぞれ 20、14 ラインの樹立に成功した (図 3 左)

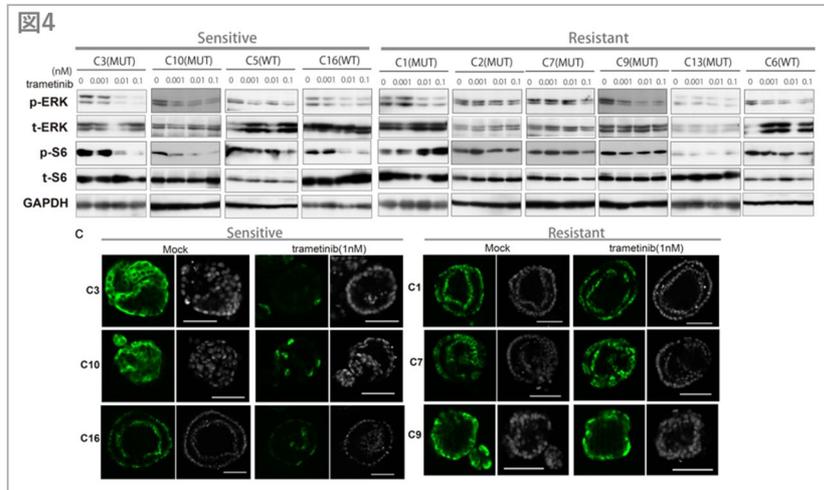


(3) オルガノイドを用いた薬剤感受性試験

正常細胞とのセレクションを培養条件によって行うことが可能であり、かつ比較的安定した増殖を認めた大腸癌オルガノイドを用いて、まず trametinib を投与を行い感受性試験を行った。代表的なデータを図 3 右に示す。細胞株と同様に約半数の症例 (4/10) が高い感受性を示した。

(4) 早期反応性マーカーの検出

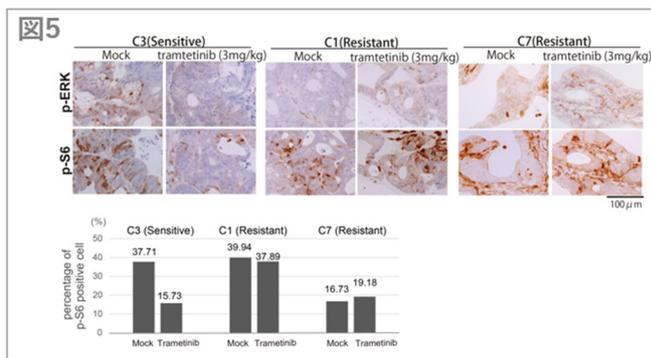
申請者はこれまで胃癌細胞および大腸癌細胞において、薬剤投与後のタンパク質リン酸化の変化率が、その薬剤感受性を反映するマーカー候補であると報告してきた。MEK 阻害剤の反応マーカーとしては MEK 阻害剤を投与した数時間~24 時間後のリン酸化リボソームタンパク質 S6 (pS6) の低下に着目してきた。今回、癌オルガノイドにおいても、感受性の高い症例においてのみ有意な pS6 レベルの低下をウエスタンブロットでも蛍光免疫染色によっても検出することができた。これらの結果は、実際に薬剤を投与し増殖アッセイを行うよりもより少量の検体量で早期に検出可能な有能な感受



性予測マーカーとなりうると思う。

(5) 移植モデルでの検証

最後に生体内においてこの早期反応性マーカーが検出可能か検証を行った。NSG マウスの皮下に *in vitro* で高い感受性を示した 1 症例と耐性を示した症例 (2 例) の移植を行い、trametinib を経口投与し 6 時間後に腫瘍を回収し免疫染色にて pS6 の変化を知らべた。感受性の有無に関わらず ERK の活性は押さえられている一方で感受性を示す症例についてのみ pS6 低下を認めた。(図 5)



(6) まとめと今後の展開

癌ゲノム時代を迎えそれぞれの症例で検出される遺伝子異常を標的とした個別化医療の実現が望まれている。当初 RTK/KRAS シグナルの標的治療の 1 つとして MEK 阻害剤に着目し、RTK/KRAS シグナルを活性化させることが知られている RTK, KRAS, BRAF の変異やゲノムコピー数異常の症例においては高い効果を示すと予測していたがそれらの遺伝子異常のみでは MEK 阻害剤の感受性予測は不可能であった。一方申請者の注目した薬剤投与数時間の細胞における反応をマーカーとする試みは、その感受性と高い相関を示した。本研究ではオルガノイド培養技術を導入することで、精度が高いだけでなく、少量の検体で早期に検出可能な効果予測法の確立が期待される。

今後胃癌オルガノイドについて更に MEK 阻害剤に加え RTK/KRAS シグナル阻害剤として AKT/mTOR シグナルや RTK 標的治療の感受性予測マーカーの探索に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tokoro Masanori, Gotoh Koro, Kudo Yoko, Hirashita Yuka, Iwao Masao, Arakawa Mie, Endo Mizuki, Oribe Junya, Masaki Takayuki, Honda Koichi, Kakuma Tetsuya, Seike Masataka, Murakami Kazunari, Shibata Hiroataka	4. 巻 7
2. 論文標題 Tocopherol suppresses hepatic steatosis by increasing CPT 1 expression in a mouse model of diet induced nonalcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Obesity Science & Practice	6. 最初と最後の頁 91～99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osp4.460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirashita Teijiro, Hirashita Yuka, Iwashita Yukio, Endo Yuichi, Kiyonaga Maki, Matsumoto Shunro, Hijiya Naoki, Moriyama Masatsugu, Murakami Kazunari, Inomata Masafumi	4. 巻 4
2. 論文標題 S6 ribosomal protein phosphorylation is associated with malignancy of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 571～579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mizukami Kazuhiro, Katsuta Makoto, Okamoto Kazuhisa, Fukuda Kensuke, Ogawa Ryo, Kawahara Yoshinari, Hirashita Yuka, Sato Yuto, Fukuda Masahide, Okimoto Tadayoshi, Kodama Masaaki, Fujioka Toshio, Murakami Kazunari	4. 巻 67
2. 論文標題 Influence of acotiamide on ¹³ C-urea breath test for <i>Helicobacter pylori</i> diagnosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 332～337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.20-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mizukami Kazuhiro, Matsunari Osamu, Ogawa Ryo, Hirashita Yuka, Okamoto Kazuhisa, Fukuda Kensuke, Sonoda Akira, Akiyama Hidetoshi, Ozaka Sotaro, Kawahara Yoshinari, Okimoto Tadayoshi, Kodama Masaaki, Murakami Kazunari	4. 巻 2019
2. 論文標題 Examine the Availability and Safety of Mucosal Cutting Biopsy Technique for Diagnosis of Gastric Submucosal Tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology Research and Practice	6. 最初と最後の頁 1～6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/3121695	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 Kodama Masaaki, Okimoto Tadayoshi, Mizukami Kazuhiro, Fukuda Kensuke, Ogawa Ryo, Okamoto Kazuhisa, Matsunari Osamu, Wada Yasuhiro, Hirashita Yuka, Murakami Kazunari	4. 巻 65
2. 論文標題 Evaluation of a Novel Anti-H. pylori Antibody Detection Kit by Latex Turbidimetric Immunoassay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Laboratory	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7754/Clin.Lab.2018.180918	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 Kodama Masaaki, Okimoto Tadayoshi, Mizukami Kazuhiro, Fukuda Kensuke, Ogawa Ryo, Okamoto Kazuhisa, Matsunari Osamu, Kawahara Yoshinari, Hirashita Yuka, Murakami Kazunari	4. 巻 65
2. 論文標題 Differences in <i>Helicobacter pylori</i> and CagA antibody changes after eradication between subjects developing and not developing gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 71 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19-30	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 Kawahara Yoshinari, Kodama Masaaki, Mizukami Kazuhiro, Saito Tomoko, Hirashita Yuka, Sonoda Akira, Fukuda Kensuke, Matsunari Osamu, Okamoto Kazuhisa, Ogawa Ryo, Okimoto Tadayoshi, Murakami Kazunari	4. 巻 65
2. 論文標題 Endoscopic gastric mucosal atrophy as a predictor of colorectal polyps: a large scale case-control study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 153 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19-47	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 Wada Yasuhiro, Kodama Masaaki, Mizukami Kazuhiro, Okimoto Tadayoshi, Fuchino Takafumi, Tsutsumi Koshiro, Fukuda Masahide, Hirashita Yuka, Fukuda Kensuke, Okamoto Kazuhisa, Ogawa Ryo, Kushima Ryoji, Murakami Kazunari	4. 巻 54
2. 論文標題 Differences in Regression Patterns of Complete and Incomplete Intestinal Metaplasia at Ten Years after <i>Helicobacter pylori</i> Eradication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 185 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00069	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 Okamoto Kazuhisa, Kodama Masaaki, Mizukami Kazuhiro, Okimoto Tadayoshi, Abe Hisanori, Ogawa Ryo, Fukuda Kensuke, Matsunari Osamu, Hirashita Yuka, Wada Yasuhiro, Fukuda Masahide, Murakami Kazunari	4. 巻 69
2. 論文標題 Immunohistochemical differences in gastric mucosal damage between nodular and non-nodular gastritis caused by <i>Helicobacter pylori</i> infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 216 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.20-179	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 Kodama Masaaki, Okimoto Tadayoshi, Mizukami Kazuhiro, Hirashita Yuka, Wada Yasuhiro, Fukuda Masahide, Matsunari Osamu, Okamoto Kazuhisa, Ogawa Ryo, Fukuda Kensuke, Kudo Yoko, Kawahara Yoshinari, Murakami Kazunari	4. 巻 36
2. 論文標題 Gastric mucosal changes, and sex differences therein, after <i>Helicobacter pylori</i> eradication: A long term prospective follow up study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 2210 ~ 2216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15477	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 Hirashita Yuka, Tsukamoto Yoshiyuki, Kurogi Shusaku, Hijiyama Naoki, Nakada Chisato, Uchida Tomohisa, Hirashita Teijiro, Hiratsuka Takahiro, Akagi Tomonori, Ueda Yoshitake, Shiroshita Hidefumi, Etoh Tsuyoshi, Mizukami Kazuhiro, Honda Koichi, Okimoto Tadayoshi, Kodama Masaaki, Inomata Masafumi, Moriyama Masatsugu, Murakami Kazunari	4. 巻 101
2. 論文標題 Early response in phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to trametinib in colorectal cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1036 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00590-w	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 Huang A., Hirashita T., Urakawa S., Hirashita Y., Alzghari T., Milsom J. W.	4. 巻 25
2. 論文標題 Complex polypectomy in the sigmoid colon using a double-balloon endoluminal intervention platform	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Techniques in Coloproctology	6. 最初と最後の頁 599 ~ 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10151-020-02400-9	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平下 有香
2. 発表標題 除菌後胃粘膜におけるeEF1Aジメチル化と胃癌発症との相関
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuka Hirashita
2. 発表標題 Dimethylation level of eEF1A and the gastric mucosa after Helicobacter pylori (H. pylori) eradication therapy
3. 学会等名 American College of Gastroenterology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平下 有香
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27回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平下 有香
2. 発表標題 膵IPMN癌化・浸潤過程におけるmTORC1活性と糖の取り込みとの相関
3. 学会等名 第114回日本消化器病学会 九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平下 有香
2. 発表標題 eEF1A dimethylation level in the basal area of Helicobacter pylori-eradicated gastric mucosa is associated with the risk of gastric cancer
3. 学会等名 10月第80回癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平下 有香
2. 発表標題 研究生活を通して思うこと
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会 キャリア支援委員会企画
4. 発表年 2021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