

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07675

研究課題名(和文) 抗EGFR抗体獲得耐性大腸癌におけるMUC1-Cを標的とした適応型治療の開発

研究課題名(英文) Development of adaptive therapy targeting MUC-1C in colorectal cancer with acquired anti-EGFR antibody resistance

研究代表者

松田 宙(Matsuda, Chu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・消化器外科副部長

研究者番号：00379207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗EGFR抗体治療耐性後の大腸癌転移性腫瘍に対し、腫瘍内不均一性と、薬剤耐性クローンにおけるMUC1の関連性を検証することを目的として研究を計画した。殺細胞性抗癌薬のL-OHPと5FUを大腸癌細胞株へ長期暴露し、薬剤耐性株を樹立した。抗EGFR抗体耐性大腸癌細胞株LIM1215の抗EGFR抗体耐性能を確認した。耐性獲得までのMUC1変化を確認するため、短期暴露株のMUC1について解析したところ、発現増加を確認した。その他下流分子については現在精査中である。腫瘍内不均一性、およびEGFRシグナルの変異ステータスとの関連性を調べるべくシングルセル解析を行った。現在データの解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌薬剤耐性株を作成し、短期暴露株においてMUC1発現増加を確認した。長期暴露株については現在解析中である。腫瘍内不均一性を詳細な解析し、原発巣と肝転移巣の発現型の違いを明らかにし、MUC1との関連性を明らかにする。MUC1による薬剤耐性クローンの制御が可能か検証し、MUC1を標的とした個別化医療Precision Medicineの確立へつなげる可能性を模索していく。

研究成果の概要(英文)：Our study was designed to examine the association of MUC1 with intratumoral heterogeneity and drug-resistant clones in metastatic colorectal cancer with acquired anti-EGFR antibody resistance.

Long-term exposure of colon cancer cell lines to L-OHP and 5FU, which are cytotoxic anticancer drugs, established drug-resistant strains. We confirmed that the anti-EGFR antibody-resistant colon cancer cell line LIM1215 has resistance to the anti-EGFR antibody. In order to investigate changes in MUC1 until the acquisition of resistance, we analyzed the MUC1 in short-term exposure strains, and confirmed increased expression of MUC1. Other downstream molecules are currently under investigation. Single-cell analysis was performed to investigate the association of MUC1 with intratumoral heterogeneity and mutational status of EGFR signaling. We are currently analyzing the data.

研究分野：大腸癌 低侵襲手術 化学療法

キーワード：大腸癌 MUC1 治療抵抗性 腫瘍内不均一性

1. 研究開始当初の背景

近年のがんゲノム解析により、がんの腫瘍内不均一性についての理解が深まりつつある。我々のグループでは、これまで食道扁平上皮癌における患者間の不均一性を明らかにし (Sawada et al. *Gastroenterology* 2016)、さらに、東京大学医科学研究所との共同研究において、腫瘍内の異なる複数領域から DNA を取得し全エクソームシーケンスを行う多領域分割シーケンスにより大腸癌における腫瘍内不均一性とクローン進化の形式を明らかにした (Uchi et al. *PLoS Genetics*. 2016)。腫瘍内不均一性が、がんの化学療法における治療不応性や耐性化の原因となっていることが推測されるが、これまでの研究のほとんどが腫瘍形成の過程における解析についてであり、化学療法治療という過程の中で、実際どのように遺伝子変異が蓄積されながらがんが進化するのか、どのように耐性クローンが生まれ、その結果、腫瘍内不均一性がどう変化していくかについての検討はなされていない。

近年のがんの不均一性の理解に伴い、腫瘍の薬剤耐性化に対する治療法として Adaptive therapy (適応型治療) が提唱されている。この治療法は、薬剤強度により、薬剤感受性クローンと耐性クローンを共存・競合させて腫瘍の大きさを制御するというものである。大腸癌に対する抗 EGFR 抗体治療の過程で起こる耐性化の機序が、KRAS 変異や EGFR 遺伝子の細胞外領域におけるサブクローナル変異の獲得など EGFR 経路上のゲノム変異であることがわかりつつあり、腫瘍内では EGFR 経路の活性化を獲得した耐性クローンが増殖し、感受性クローンが減少している状態が推測される。臨床への適切な Adaptive therapy の導入には、耐性化腫瘍内不均一性への詳細な理解と、活性化した耐性クローンを効率的に抑制する手段が必要である。Mucin1 (MUC1) は、乳癌、大腸癌をはじめ様々な癌腫で過剰発現するヘテロ二量体の癌抗原あり、MUC1-C 末端と N 末端から形成されている。正常細胞では、MUC1-N 末端は細胞表面を物理的に防御しており、C 末端は炎症やその他のストレスに反応して活性化される。癌細胞においては、N 末端は腫瘍細胞表面から放出され、C 末端が 2 量体形成することで様々なエフェクターと相互作用することにより癌抗原として機能する。MUC1-C 末端は、extracellular domain (ED) 領域、transmembrane domain (TM) 領域、cytoplasmic domain (CD) 領域から構成され、CD 領域のアミノ酸配列により、MUC1-C は直接的に MEK→ERK 経路、PI3K/AKT 経路と NF- κ B p65 経路を活性化することが報告されている。これらの背景に基づき、我々は乳癌における薬剤耐性での MUC1-C の重要性について明らかにし、GO-203 による MUC1-C の阻害が、MEK/ERK 経路、PI3K/AKT 経路、NF- κ B p65→BCL2A1 経路の抑制により、強力なアポトーシスを誘導することを示した (Hiraki M. et al. *Signal Transduct Target Ther.* 2018, *Sci Rep.* 2016)。以上より、本研究課題の核心をなす学術的問いは、『MUC1-C を標的遺伝子として抗 EGFR 抗体獲得耐性クローンを制御しうるか』である。

2. 研究の目的

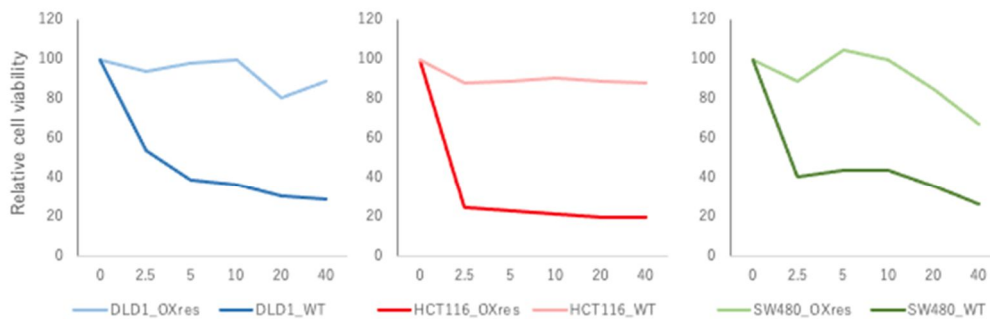
抗 EGFR 抗体治療耐性後の大腸癌転移性腫瘍に対し、奏効率・予後といった臨床データと照合し、腫瘍の多領域分割シーケンス、MUC1-C 発現解析を行うことで腫瘍内不均一性の詳細な解析を行い、さらに MUC1-C による薬剤耐性クローンの制御が可能かを検証することで、MUC1-C を標的とした個別化医療 Precision Medicine を確立することを目的として研究を計画した。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株を用いて薬剤耐性株を作成する。使用する薬剤はL-OHP、5FU、cetuximab、およびpanitumumabである。それぞれの薬剤耐性細胞株において、MUC1、およびMAPK経路の変化がどのように生じているかをRNA、タンパクレベルで解析する。また、抗EGFR抗体薬治療後における腫瘍内不均一性の変化とMUC1発現についての解析を行うため、対象症例となる抗EGFR抗体薬治療後に肝 or 肺切除を行った大腸癌転移症例の集積を試みた。

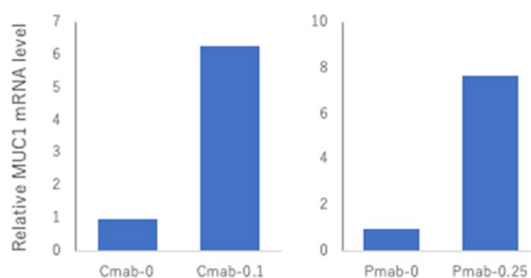
4. 研究成果

大腸癌治療において重要なキードラッグである殺細胞性抗癌薬のL-OHPと5FUに対する薬剤耐性大腸癌細胞株を作成した。それぞれの薬剤を数ヶ月にわたり大腸癌細胞株へ暴露し、薬剤耐性株を樹立した。MTTアッセイを用いて、その耐性能を確認した。細胞株はDLD1、SW480、HCT116を用いた。また、大阪大学研究室で有していた抗EGFR抗体耐性大腸癌細胞株LIM1215の抗EGFR抗体(cetuximab)耐性能を確認した。L-OHP(図)と5FUに対する薬剤耐性大腸癌細胞株6種と抗EGFR抗体耐性大腸癌細胞株LIM1215におけるMUC1発現状況を、PCR、ウェスタンプロット法で確認中である。



薬剤耐性大腸癌細胞株の作成：OX (L-OHP) に対する耐性株

耐性獲得までにMAPK経路の阻害下でMUC1の変化とそのメカニズムを確認するため、長期暴露株ではなく、短期暴露株での実験も並行して行った。48-72時間の抗EGFR抗体(cetuximab/panitumumab)暴露によるMUC1発現の変化を確認したところ、PCR法によってMUC1の発現増加を確認した。その他MAPK経路の下流分子については現在精査中である。



抗EGFR抗体短期暴露によるMUC1発現の変化

抗EGFR抗体薬治療後における腫瘍内不均一性の変化とMUC1発現についての解析を行うため、対象症例となる抗EGFR抗体薬治療後に肝、あるいは肺切除を行った大腸癌転移症例の集積を試みたが、対象症例が非常に限られていた。そのため、MUC1を含めた各遺伝子発現について、腫瘍内でのheterogeneity、およびMAPK経路の変異ステイタスとの関連性について注目することとし、大腸癌切除検体の腫瘍部について、シングルセル解析を行った。現在数例を解析へ提出し、データの解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	植村 守 (UEMURA MAMORU) (10528483)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	平木 将之 (HIRAKI MASAYUKI) (80621036)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員 (14401)	

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