

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07942

研究課題名（和文）大腸癌初代培養CTOSを用いた、BMP-EGFRクロストークの機序と多様性の解明

研究課題名（英文）The mechanisms of BMP-EGFR cross talk in colorectal organoids

研究代表者

近藤 純平（Junpei, Kondo）

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80624593

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）：患者由来の大腸癌オルガノイドを用いた検討から、BMP阻害剤LDN193189は、EGFR分解誘導因子であるLRIG1の発現誘導を介してMEK依存性大腸癌において増殖抑制効果をもたらした。In vivoにおいても、MEK阻害剤trametinibとLDN193189の併用は効果的に腫瘍増殖を抑制した。患者選択の観点からは、患者由来オルガノイドを用いたMEK依存性試験やLRIG1誘導の評価を組み合わせることによりLDN感受性症例を抽出でき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

BMP阻害剤は良性疾患である炎症性貧血の治療薬として臨床試験が行われており、抗腫瘍薬よりも副作用は低レベルであると考えられる。このような薬剤が抗腫瘍薬の効果を増強する目的で用いることができれば、がん治療の選択肢は大きく広がる。今回の検討では、BMP阻害剤の効果が期待できる症例を選択する機能的バイオマーカーの開発も同時に進めることができたため、将来的に臨床試験を行う段階に至った場合も高い成功率が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The BMP pathway affects colorectal cancer (CRC) cells differently than normal cells, sometimes promoting tumor growth and other times suppressing it. We found that CRC cells reside in a BMP-rich environment. Inhibiting BMP with LDN193189 slows CRC organoid growth by reducing EGFR levels through LRIG1-mediated protein degradation. In CRC organoids, BMP inhibition induces LRIG1 expression, which correlates with growth suppression. Knocking down LRIG1 rescued LDN193189-mediated growth inhibition. Combining LDN193189 with trametinib, a MEK inhibitor, cooperatively inhibited CRC growth in vitro and in vivo. These results suggest that simultaneous BMP and MEK inhibition could be a promising CRC treatment. Studying LRIG1 induction and growth suppression in patient-derived organoids may help identify potential responders to this therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸癌 EGFR オルガノイド BMP LRIG1 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EGFR シグナル経路の活性化は、大腸癌細胞の生存・増殖を促進する重要な要素であり、臨床的にはセツキシマブ、パニツムマブといった EGFR を標的とした分子標的治療が既に広く行われている。しかし、KRAS 変異症例の一部や BRAF 変異症例ではこれら EGFR 阻害治療が無効であることや、有効例からの耐性化など克服すべき課題は多い。EGFR シグナル経路には、様々なシグナル経路とのクロストークが報告されており、EGFR 標的治療の耐性機序としても重要である。これまでに、HGF/MET、IGF/IGFR などの増殖因子シグナル経路と EGFR 経路のクロストークがセツキシマブ耐性機序として報告され、新たな治療標的として注目されている。我々は先行する科学研究において、BMP/SMAD 経路と EGFR/MEK 経路にこれまで報告のないクロストークが存在すること、および BMP・MEK 阻害剤併用が効果的である可能性を見出した。

2. 研究の目的

先行研究では、一部の大腸癌オルガノイドにおいて BMP 阻害剤が EGFR タンパクの減少および下流の MEK シグナル経路の抑制をもたらすことを見出していた。そこで本研究では BMP/SMAD 経路の抑制が EGFR シグナルを抑制する機序の詳細と多様性を明らかにすることを目的とした。さらに、EGFR/MEK 標的治療の有効症例を予測するバイオマーカーを確立し、さらに BMP・MEK 阻害剤併用療法の臨床応用への橋渡しを目指すこととした。

3. 研究の方法

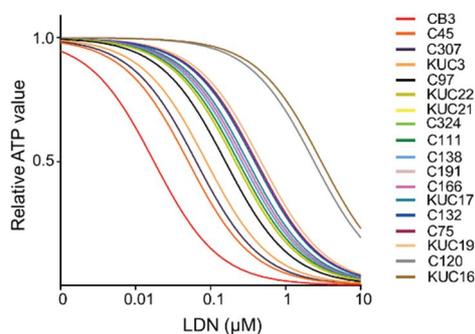
臨床検体由来の 20 症例分の大腸癌オルガノイドを用い、BMP 阻害の効果とそれに伴う遺伝子発現の変化や EGFR 経路の活性を評価し、BMP 阻害剤が EGFR を抑制する機序を明らかにする。また BMP 阻害剤の効果を移植腫瘍治療実験により評価し、生体での有効性を検証する。さらに、BMP 阻害が有効となる症例を選別するために、オルガノイドを用いたバイオマーカーの開発を行う。

4. 研究成果

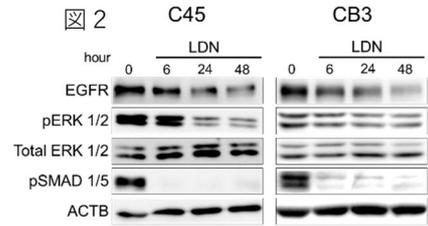
(1) BMP 阻害剤 LDN193189 は大腸癌オルガノイドの増殖を抑制する

18 症例の大腸癌オルガノイドを用いて BMP 阻害剤 LDN193189(LDN)の増殖への影響を検討した。培養したオルガノイドの viability を ATP アッセイ(Celltiter-Glo)により評価したところ、IC50 で 100 倍以上の感受性の多様性をみとめた(図 1)。大腸がんの増殖に重要である EGFR 経路の活性を

図 1

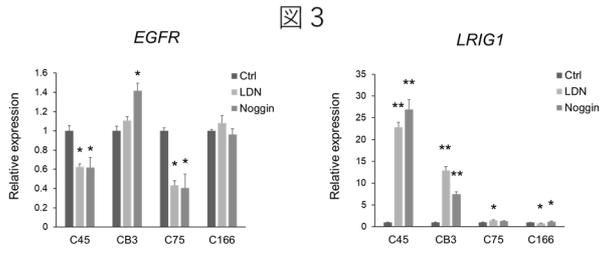


Western blot で評価したところ、LDN 添加により EGFR 総蛋白量の減少と下流の pERK の抑制が認められた(図 2)。以上のように、大腸がんオルガノイドにおいて、BMP 阻害は EGFR の減少を伴う増殖抑制をもたらした。



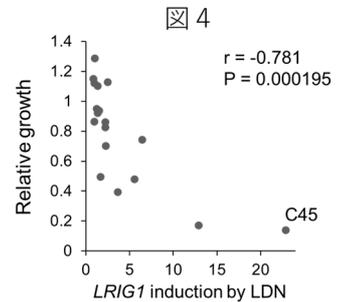
(2) BMP 阻害により、LRIG1 誘導を介した EGFR タンパク分解がおこる

この EGFR の減少は、mRNA レベルの抑制ではなく(図 3 左)、翻訳後のタンパク安定性によるものと考え検索したところ、EGFR 分解誘導タンパクである LRIG1 が LDN 感受性株において強く誘導されていることを見出した(図 3 右)。



さらに LDN による LRIG1 の誘導は、オルガノイドの増殖抑制と

相関し(図 4)、また LRIG1 の tet-on システムによる inducible knock down 株では LDN による増殖抑制を rescue した(図 5)。



以上より、LDN によって LRIG1 誘導を介した EGFR 蛋白の分解が

大腸癌オルガノイドの増殖を抑制することが示された。

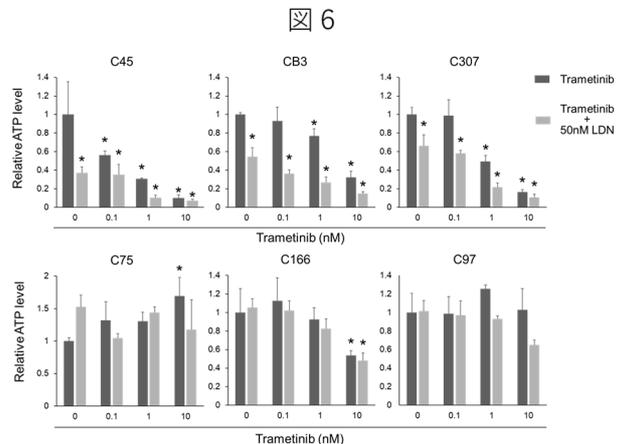
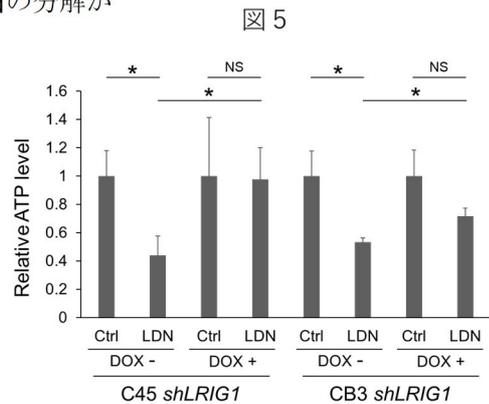
(3) LDN は MEK 依存性症例において、LRIG1 発現と相関した感受性を示す

これらの症例より、LDN 感受性例(C45, CB3, C307)と

LDN 耐性例(C75, C166, C97)のオルガノイド

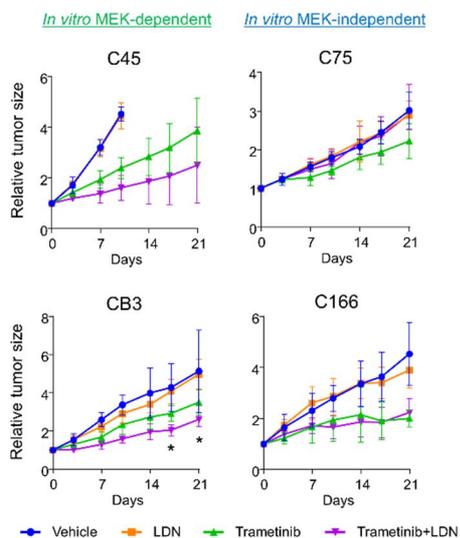
を代表として MEK 阻害剤 trametinib に対する感受性を検討した。その結果、LDN 感受性例でのみ trametinib による増殖抑制

をみとめ、さらに trametinib と MEK 阻害剤の併用効果が認められた。



In vivo における LND の有用性を検証すべく、オルガノイドを免疫不全マウスに移植し治療実験を行った。その結果、MEK 依存性症例において、LDN 単剤では抗腫瘍効果をもとめなかったが、Trametinib と LDN の併用効果をもとめた(図7)。

図7



(4) 考察

BMP 阻害剤は、EGFR 分解誘導因子である LRIG1 の発現誘導を介して MEK 依存性大腸癌において増殖抑制効

果をもたらした。患者選択の観点からは、患者由来オルガノイドを用いた MEK 依存性試験や LRIG1 誘導の評価を組み合わせることにより LDN 感受性症例を抽出できる可能性が示された。

今後、LRIG1 以外の機序因子の検討や、LDN 単剤では in vivo における効果が不十分であった原因などを探索し、より臨床応用に近づけるよう研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimizu Shota, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Ota Kasumi, Kamada Mayumi, Harada Yohei, Tanaka Yoshihisa, Nakazawa Mai Adachi, Tamada Yoshinori, Okuno Yasushi, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Coffey Robert J, Fujiwara Yoshiyuki, Inoue Masahiro	4. 巻 NA
2. 論文標題 Inhibition of the BMP pathway suppresses tumor growth via downregulation of EGFR in MEK/ERK-dependent colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.11.01.514643	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Kawata Mayuko, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Ito Yu, Yokoi Takeshi, Hamanishi Junzo, Mandai Masaki, Kimura Tadashi, Inoue Masahiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Polarity switching of ovarian cancer cell clusters via SRC family kinase is involved in the peritoneal dissemination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15493	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 Coppo Roberto, Kondo Jumpei, Iida Keita, Okada Mariko, Onuma Kunishige, Tanaka Yoshihisa, Kamada Mayumi, Ohue Masayuki, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Inoue Masahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Distinct but interchangeable subpopulations of colorectal cancer cells with different growth fates and drug sensitivity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105962 ~ 105962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.105962	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 Fukuoka Tomoya, Moriwaki Kenta, Takamatsu Shinji, Kondo Jumpei, Tanaka-Okamoto Miki, Tomioka Azusa, Semba Manami, Komazawa-Sakon Sachiko, Kamada Yoshihiro, Kaji Hiroyuki, Miyamoto Yasuhide, Inoue Masahiro, Bessho Kazuhiko, Miyoshi Yoko, Ozono Keiichi, Nakano Hiroyasu, Miyoshi Eiji	4. 巻 41
2. 論文標題 Lewis glycosphingolipids as critical determinants of TRAIL sensitivity in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4385 ~ 4396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02434-3	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 Onuma Kunishige, Sato Yumi, Okuyama Hiroaki, Uematsu Hiroyuki, Homma Keiichiro, Ohue Masayuki, Kondo Jumpei, Inoue Masahiro	4. 巻 255
2. 論文標題 Aberrant activation of Rho/ROCK signaling in impaired polarity switching of colorectal micropapillary carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5748	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Roberto Coppo, Jumpei Kondo, Kunishige Onuma, Masahiro Inoue
2. 発表標題 Subpopulations with distinct and interchangeable capacity of spheroid formation and growth in colorectal cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Shimizu, Jumpei Kondo and Masahiro Inoue
2. 発表標題 BMP inhibition suppresses colorectal cancer growth via negative regulation of EGFR
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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
研究 分担 者	井上 正宏	京都大学・医学研究科・特定教授	
	(Inoue Masahiro)		
	(10342990)	(14301)	

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