

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591008

研究課題名(和文)胆嚢癌の細胞内シグナルネットワークに対する分子標的治療の臨床への橋渡しの検討

研究課題名(英文)Molecular targeting therapy against intracellular signaling network in gallbladder cancer

研究代表者

佐々木 隆 (Sasaki, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10569106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胆嚢癌は、胆道癌の中で最も予後不良であり、治療の分子標的も明らかになっていない。胆嚢癌手術検体自験例においてMAPKシグナルおよびPI3Kシグナルの活性化がみられたため、我々は臨床応用目的に開発された経口MEK阻害剤(MAPKシグナル阻害)、mTOR阻害剤(PI3Kシグナル阻害)の抗腫瘍効果をヒト胆嚢癌培養細胞株を用いてin vitro、in vivoの系にて検討した。両シグナルにはクロストークがあり、併用投与による同時阻害が、細胞周期の制御・アポトーシスの増強により、in vitroの細胞増殖およびin vivoの皮下腫瘍増大を有意に阻害し、単独投与よりも併用投与の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gallbladder cancer is the most common type with the worst prognosis among the bile duct cancers. The mechanism of disease and novel effective therapeutics still remain to be fully investigated. Analysis of human gallbladder cancer tissues demonstrated that MAPK and PI3K signaling pathways were frequently coordinately dysregulated in one third of the patients examined. We report here that the combination therapy using CI-1040, an inhibitor of MEK and RAD001, an inhibitor of mTOR, synergistically inhibited human gallbladder cancer cell proliferation in vitro and tumor growth of the xenograft model in vivo. Compared to the single treatment with CI-1040 or RAD001, the combination therapy significantly induced cell cycle arrest and apoptosis with decreased cyclin D1 expression. These findings suggest that the double blockade of MAPK and mTOR signaling pathways might inhibit the signal crosstalk and benefit patients with advanced gallbladder cancer with hyperactivated these signalings.

研究分野：消化器内科学 胆膵癌

キーワード：胆嚢癌 MAPKシグナル PI3Kシグナル MEK阻害剤 mTOR阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

### **胆道癌は世界中で日本に最も多い癌であり、その中で胆嚢癌は最も予後不良で、その病態に基づく新たな治療法の開発は急務である**

現在胆道癌は日本人の癌死の第6位を占め、近年ますます増加傾向にある。胆道癌には肝内胆管癌・肝外胆管癌・乳頭部癌・胆嚢癌が含まれるが、その中で胆嚢癌は最も予後が悪く、5年生存率は最難治癌といわれる膵癌同様に5%程度と依然として極めて不良である。膵癌においては特徴的な遺伝子異常や多段階発癌経路が明らかとなり、様々な分子標的治療も試験されてきたが、胆嚢癌では、膵癌に比べこのような研究や治療介入も遅れているのが現状である。胆道癌が世界中で最も多い我が国から、その予後改善へ向けた情報を発信していく義務があると考えられる。

### **胆嚢癌の化学療法とその問題点**

胆嚢癌は、胆道癌の中でも無症状のうちに肝臓内へ広範に浸潤し、診断時既に手術不能な状態で発見されることが多くみられる。これらの患者の多くが化学療法を受けることになるが、胆嚢癌に対し保険適応となっている化学療法は、gemcitabine、S-1と海外にかなり遅れて本邦でも承認された gemcitabine + cisplatin の3種類のみであり、これらに不応となった後に使える標準治療薬はない。我々は、進行胆道癌患者に対し、自主臨床試験により積極的に新たな化学療法を行い、既に報告もしてきている (UMIN00000590 進行胆道癌に対する gemcitabine / S-1 併用療法の第 相試験; UMIN00001614 Gemcitabine 耐性胆道癌に対する S-1 単独療法; UMIN00001615 他治療不応の進行胆道癌に対する gemcitabine / cisplatin 併用療法; Sasaki et al., Invest New Drugs 2010 & 2011; Sasaki et al., Cancer Chemother Pharmacol 2010 & 2011; Sasaki et al., Oncology 2009)。

また胆道癌では、悪性胆道閉塞による閉塞性黄疸及び胆道感染・胆管炎を繰り返し生じやすい。黄疸や感染が存在すると化学療法の継続も困難となるため、我々は複数のステント留置等による胆道ドレナージを積極的に行い黄疸・感染をコントロールしてきた。このようなドレナージの方法についても自主臨床試験を行ってきた (UMIN000003568 胆管用逆流防止弁つき Covered Metallic stent(Anti-reflux Stent)の非切除悪性胆道閉塞症例に対する有用性の検討)。

このような工夫の結果、無増悪生存期間・全生存期間は徐々に延長しつつあるが、まだ決して満足できる状態ではない。使用できる化学療法剤の選択肢が依然として僅かであり、化学療法のみでは予後の改善はこれ以上大きくは望めない状態である。

胆嚢癌に比して膵癌は分子生物学的研究

や遺伝子改変動物モデルに近年かなり進展が見られてきており、正常な膵臓上皮に KRAS、P16INK4A、TP53、SMAD4 などの遺伝子の異常が段階的に蓄積するにつれ前癌病変が出現し段階的に進展し、浸潤癌に至るという多段階発癌経路がコンセンサスを得ている。また、このような臨床の膵癌で見られる遺伝子異常やシグナルの異常をマウスやラットの膵臓内で再現することにより、ヒト膵癌の組織像をよく模倣する遺伝子改変モデルが得られてきた。我々も膵臓特異的変異型 Kras 発現+TGF-beta II 型受容体ノックアウトによる膵発癌マウスモデルを樹立し報告した (Ijichi et al., Genes Dev 2006)。一方、胆道癌、中でも胆嚢癌では、このような遺伝子異常の蓄積も不明であり、したがって臨床像を近似できる遺伝子改変モデルも樹立されていない。

過去には、手術検体の免疫染色により MAPK シグナルの活性化 (ERK のリン酸化) や PI3K シグナルの下流分子である mTOR の活性化がみられたという報告が散見される。我々は、これまで当院にて切除された胆嚢癌手術検体 30 例について、東京大学医学部研究倫理委員会により承認された研究計画書に基づき事前に文書による同意を得た上で、リン酸化 ERK 及び mTOR の下流分子である S6 のリン酸化を免疫染色にて検討した。また、KRAS, BRAF, PIK3CA 各遺伝子の hot spot といわれる領域の遺伝子変異についても検索した。その結果、上記の遺伝子変異は見られなかったが、リン酸化 ERK 及びリン酸化 S6 の発現をそれぞれ 33%、60%と高頻度に認め、両シグナルとも活性化している例が有意に多かった。したがって、これらのシグナル系の障害が新規分子標的治療となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ヒト胆嚢癌細胞株における MAPK シグナルおよび PI3K シグナルの活性化を調べ、それらシグナルに対する MEK 阻害剤・mTOR 阻害剤の in vitro および in vivo における抗腫瘍効果とその機序を検討することにより、胆嚢癌に対する両シグナルの同時阻害による相乗的新規分子標的治療の可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト胆嚢癌細胞株 TGBC1TKB、NOZ の in vitro での細胞増殖を対照群、MEK 阻害剤 CI-1040 投与群、mTOR 阻害剤 RAD001 投与群、CI+RAD 併用群の4群で比較検討する。
- (2) (1)と同様の4群において、細胞内の MAPK および PI3K シグナルの活性化および阻害の状況を Western blot にて確認する。
- (3) (1)と同様の4群において、フローサイトメトリーにて細胞周期およびアポトーシス

について検討すると共に、細胞周期関連蛋白やアポトーシス関連蛋白の発現を Western blot にて検討する。

(4) ヒト胆嚢癌細胞株をヌードマウスに皮下移植した xenograft を用い、対照群、CI-1040 投与群、RAD001 投与群、CI+RAD 併用群の腫瘍の増大を経時的に観察し、抗腫瘍効果を比較検討する。

(5) (4)と同様の4群において、投与4週後の xenograft を摘出し、組織学的検索及び MAPK シグナルと PI3K シグナルの変化の生化学的検索を行う。

(6) (4)と同様の4群において、TUNEL assay によりアポトーシスの検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト胆嚢癌細胞株 TGBC1TKB、NOZ のいずれにおいても、CI-1040、RAD001 それぞれの単独投与により有意に細胞増殖が抑制され、CI+RAD 併用群では更に増殖抑制効果が認められた。

(2) Western blot では、両細胞株対照群においては phospho-ERK、phospho-AKT、phospho-S6 の強い発現がみられ、MAPK シグナルおよび PI3K シグナルの活性化が in vitro でも生じていることがわかった。また CI 群では phospho-ERK の減弱、RAD 群では mTOR よりも下流にある phospho-S6 および total S6 の減弱がみられ、CI+RAD 群では phospho-ERK と phospho-S6、total S6 両方の減弱が認められ、分子標的薬として細胞内で効果を発揮していることが確認された。この際、RAD 投与群においては phospho-ERK と phospho-AKT の増強が認められ、MAPK シグナルと PI3K シグナル間のクロストークの存在が示唆された。CI+RAD 併用群ではそれらを同時に抑制していることが示された。

(3) フローサイトメトリーでは、各単独投与群で G1-S phase の有意な増加があり、細胞周期が G1-S arrest を生じていた。CI+RAD 併用群では G1-S arrest の更なる増強がみられた。一方、sub-G1 phase は単独投与群では有意な増加を示さなかったが、CI+RAD 併用群では有意に増加しており、アポトーシスが増強していることが示された。Western blot では、細胞周期関連蛋白として、各単独投与群で CDC25A と CDK2 の発現減弱がみられ、併用群ではさらに発現が抑制されていた。Cyclin D1 については、各単独投与群では対照群と比べ有意な発現変化がみられなかったが、併用投与群では有意に発現レベルの減少がみられた。またアポトーシス関連蛋白として、cleaved PARP が各単独投与群でやや増加しており、併用投与群で著明な増加がみられた。Cleaved Caspase-3 発現は併用群でのみ有意な増加がみられた。

これら G1-S arrest およびアポトーシスの増強により、in vitro の細胞増殖抑制効果がみられたものと考えている。

(4) KRAS 遺伝子が野生型である TGBC1TKB をヌードマウスの皮下に移植し xenograft モデルを作成した。この皮下腫瘍担癌マウスに対し、上記4群にて in vivo における皮下腫瘍サイズの経過を観察したところ、各群とも経時的に腫瘍サイズは増大を示したが、対照群に比べ、各単独投与群はそれぞれ有意に腫瘍増大速度の抑制を示し、併用投与群は単独投与群に比べ、さらに有意に腫瘍の増大を遅延させた。

(5) (4)の各群の腫瘍組織像は、H&E では形態的には明らかな相違は指摘し得なかったものの、CI 投与群では phospho-ERK 発現の顕著な抑制があり、RAD 投与群では phospho-S6 発現の顕著な抑制がみられ、CI+RAD 群では両者の顕著な抑制がみられていた。さらに、RAD 投与群では、腫瘍組織においても phospho-ERK 発現の増強を示唆する腫瘍細胞が見受けられた。腫瘍増殖のマーカーである PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 染色では、対照群では腫瘍細胞の強い核染色がみられたのに対し、各単独投与群ではその減弱があり、併用投与群ではさらなる減弱がみられた。

(6) (4)の各群の腫瘍組織において TUNEL assay を行うと、各単独投与群はそれぞれ陽性の腫瘍細胞 (アポトーシスに陥った腫瘍細胞) の増加を示し、併用投与群では、さらなる増加を呈していた。

以上から、胆嚢癌において MAPK シグナルおよび PI3K シグナルの同時活性化が高頻度にみられ、それぞれのシグナルを抑制する MEK 阻害剤および mTOR 阻害剤は一定の抗腫瘍効果を示すものの、特に mTOR を阻害すると MAPK シグナルの活性化や mTOR の上流の AKT を活性化するシグナル間のクロストークが惹起されるため、両阻害剤の併用投与により両シグナルを同時に阻害することで相乗的な抗腫瘍効果が得られ、胆嚢癌の制御にはより望ましい治療戦略と考えられた。その抗腫瘍効果の機序としては、細胞周期蛋白の発現抑制による G1-S arrest とアポトーシスの増加を介していることが示された。本研究で用いた薬剤は臨床応用を目的に経口剤として開発されたものであり、今後の臨床における胆嚢癌の個別化医療として、生検検体で ERK と S6 の活性化を確認し、両者の活性化がみられた患者では本研究のような併用投与を行うというような臨床応用の可能性が示されたと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Ito Y, Yasuda I, Toda N, Yagioka H, Matsubara S, Hanada K, Maguchi H, Kamada H,

Hasebe O, Mukai T, Okabe Y, Maetani I, Koike K. Improvement of prognosis for unresectable biliary tract cancer, World Journal of Gastroenterology, 査読有, 19 巻, 2013, 72-77

Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Ito Y, Yasuda I, Toda N, Kogure H, Hanada K, Maguchi H, Sasahira N, Kamada H, Mukai T, Okabe Y, Hasebe O, Maetani I, Koike K. A randomized phase II study of gemcitabine and S-1 combination therapy versus gemcitabine monotherapy for advanced biliary tract cancer, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 査読有, 4 巻, 2013, 973-979

Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Takahara N, Akiyama D, Yagioka H, Kogure H, Matsubara S, Ito Y, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Toda N, Tada M, Koike K. A retrospective study of gemcitabine and cisplatin combination therapy as second-line treatment for advanced biliary tract cancer, Chemotherapy, 査読有, 59 巻, 2013, 106-111

Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Koike K. Current status of chemotherapy for the treatment of advanced biliary tract cancer, Korean Journal of Internal Medicine, 査読有, 28 巻, 2013, 515-524  
佐々木隆, 肝門部胆管癌に対する内科的治療の進歩, 外科, 査読有, 75 巻, 2013, 475-478

Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Ito Y, Yasuda I, Toda N, Yagioka H, Matsubara S, Hanada K, Maguchi H, Kamada H, Hasebe O, Mukai T, Okabe Y, Maetani I, Koike K. Treatment outcomes of chemotherapy between unresectable and recurrent biliary tract cancer, World Journal of Gastroenterology, 査読有, 20 巻, 2014, 18452-18457

〔学会発表〕(計 5 件)

佐々木隆、切除不能進行胆道癌に対する治療成績の検討、第 48 回日本胆道学会学術集会、2012、東京

佐々木隆、進行胆道癌に対する GEM+CDDP 併用療法の治療成績、第 50 回日本癌治療学会学術集会、2012、横浜  
佐々木隆、進行胆道癌に対する集学的治療の標準化に向けて、第 55 回日本消化器病学会大会(JDDW)、2013、高輪

毛利大、胆嚢癌化学療法における内臓脂肪の臨床的意義、第 22 回日本消化器関連学会週間、2014、神戸

佐々木隆、胆道癌術後 gemcitabine 不応例に対する 2nd line S-1 の治療成績、第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014、横

浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://today-tansui.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
佐々木 隆 (SASAKI, Takashi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10569106

(2)研究分担者  
毛利 大 (MOURI, Dai)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20582513

研究分担者  
伊地知 秀明 (IJICHI, Hideaki)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70463841

研究分担者  
池上 恒雄 (IKENOUE, Tsuneo)  
東京大学・医科学研究所・准教授  
研究者番号：80396712