

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461982

研究課題名(和文) microRNAを介した胃癌における抗HER2抗体耐性機序の解明

研究課題名(英文) Clarification of the microRNA pathway regulating resistance to Trastuzumab in gastric cancer

研究代表者

林 尚子 (HAYASHI, Naoko)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：20452899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：トラスツズマブ感受性株であるNCI-N87を同定し、同株にトラスツズマブの持続投与を6か月間行うことでトラスツズマブ耐性胃癌細胞株を作製した。耐性株と親株でmicroRNA(miR) microarrayを用いて耐性に関与するmiRの網羅的に解析を行い、耐性に関与するmiR-21/PTEN pathwayとmiR-223/FBXW7-MCL1 pathwayを同定した。miR-223強制発現株では、トラスツズマブ投与下においてアポトーシスの割合が減少し、さらに、アポトーシス関連タンパクの発現低下を認めた。これらのことから耐性機序には抗アポトーシスが関与することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established the Trastuzumab resistance gastric cancer (GC) cell line with continuous Trastuzumab administration. Parent GC cell line and resistance GC cell line are subjected to miR microarray. We identified miR-21 which can regulate PTEN and miR-223, which can regulate FBXW7, using miR array analysis using by resistance cell lines which we established. Overexpression of miR-21 decreased PTEN expression and the sensitivity of gastric cancer cells to Trastuzumab, while suppression of miR-21 restored PTEN expression and the sensitivity of GC cells to Trastuzumab. Similarly, Overexpression of miR-223 decreased FBXW7 expression and the sensitivity of gastric cancer cells to Trastuzumab, while suppression of miR-223 restored FBXW7 expression and the sensitivity of GC cells to Trastuzumab. Moreover, overexpression of miR-223 significantly suppressed Trastuzumab-induced apoptosis. These findings suggest that this pathway may be crucial to the mechanism of resistance to Trastuzumab in GC.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 トラスツズマブ microRNA 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界で4番目に頻度の高い癌であり、癌関連死因としては2番目の癌腫である。中でも東アジア、東欧、中南米では有病率が高く、年間70万人が胃癌で死亡している。早期胃癌の予後が改善している一方で、切除不能胃癌の予後は依然として不良である。そのため胃癌の総死亡者数自体は低下しておらず、進行胃癌の予後向上は解決されるべき重要な課題である。

胃癌において切除不能進行・再発症例、あるいは非治癒切除症例は化学療法が治療の基本となる。さらに近年、消化器癌の治療において分子標的薬剤が重要な役割を担っている。切除不能・再発胃癌に対する分子標的薬に関する比較第Ⅲ相試験では、Bevacizumab (抗 Vascular endothelial growth factor (VEGF) ヒト化モノクローナル抗体)、Trastuzumab (抗 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) ヒト化モノクローナル抗体)、Cetuximab (抗 Epidermal growth factor receptor (EGFR) ヒト化モノクローナル抗体)、Panitumumab (抗 EGFR 完全ヒト型 IgG2 モノクローナル抗体) が検証された。その結果、Bevacizumab、Cetuximab、Panitumumab の乗せ効果は実証されなかったが、HER2 陽性進行再発胃癌に対して Capecitabine + CDDP (XP 療法) あるいは 5-FU + CDDP (FP 療法) に Trastuzumab を併用する群が化学療法群に比べて生存期間を有意に延長した (MST: 13.8 カ月 vs. 11.1 カ月, $p=0.0046$)。この結果は、胃癌における分子標的治療薬の有効性を初めて示したものであった。この結果を受けて、本邦においても2011年に胃癌に対して Trastuzumab が保険適用となり、HER2 陽性例に対しては XP 療法あるいは FP 療法と Trastuzumab の併用療法が標準治療となった。

乳癌においては、Trastuzumab は1998年から実臨床で使用され、元来予後不良とされていた HER2 陽性乳癌の予後を劇的に改善させた。しかし、実臨床でその耐性化が問題となっており、1年以内に耐性化が出現するとの報告もある。乳癌における Trastuzumab 耐性獲得の分子生物学的メカニズムとしては、薬剤が結合する部位の二次的変異により、薬剤が結合できなくなる 下流シグナルの変化 EGFR や HER3 のリガンドによる

HER2/EGFR や HER2/HER3 のヘテロダイマー形成化などが報告されている。特に下流シグナルの変化に関しては、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt 経路を介した耐性機序や microRNA(miR) の変化による耐性機序が報告される。このように乳癌においては Trastuzumab 耐性のメカニズムの解明が徐々に進んでいるが、胃癌においてはまだ明らかにされていないことが現状である。

2. 研究の目的

HER2 陽性胃癌細胞株を用いて、Trastuzumab 耐性株を作製し、耐性株と親株を用いて miR マイクロアレイを行い、網羅的に Trastuzumab 耐性に関わる miR を解析し、HER2 下流シグナルの変化から Trastuzumab 耐性機序の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

乳癌細胞株を用いた先行論文に従って、Trastuzumab を低濃度量である $5\mu\text{g/ml}$ にて投与を開始し、2週間ごとに濃度を漸増させ最終的に $100\mu\text{g/ml}$ にて6か月間培養を行い、Trastuzumab 耐性胃癌細胞株を作成する。その細胞株と親株を用いて、miR マイクロアレイを行い、耐性にかかわるとされる miR を検出する。

さらに同定された miR の下流シグナルの変化や miR の強制発現や抑制を行い、Trastuzumab 感受性の変化を観察する。

4. 研究成果

HER2 陽性胃癌株化細胞のうち、Trastuzumab 感受性株である NCI-N87 を同定し、同株に Trastuzumab の持続投与を6か月間行った。親株と持続投与を行った株で、Trastuzumab を用いて Growth assay を行うと、耐性が形成され、Trastuzumab 耐性株が作成された。Trastuzumab 耐性株と親株で microRNA microarray を用いて耐性に関与する microRNA の網羅的に解析を行った。

今まで薬剤耐性にかかわることが報告されている miR21 や miR223 を同定した。

in silico で miR-21/PTEN 経路と miR-223/FBXW7 経路を同定した。

胃癌細胞株において HER2 陽性で、miR-21 発現低下し、PTEN 発現が上昇している NCI-N87 と miR-21 が発現上昇し、PTEN 発現

が低下している NUGC4 の 2 種類の細胞株を用いて以下の実験を進めた。NCI-N87 へ miR-21 の強制発現(mimic)をおこなったところ PTEN 発現が低下し、AKT のリン酸化が上昇した。逆に、NUGC4 に miR-21 の発現抑制(inhibitor)をおこなったところ PTEN 発現が上昇し、AKT のリン酸化が低下した。同様に miR-21 を NCI-N87 へ miR-21 の強制発現を行い、Trastuzumab を用いて Growth assay を行ったところ、元来 Trastuzumab に感受性を示していた細胞株が、感受性が低下した。逆に、NUGC4 に miR-21 の発現抑制を行い、Trastuzumab を用いて Growth assay を行ったところ、Trastuzumab に対して感受性が上昇した。

次に miR-223/FBXW7 経路に注目した。NCI-N87 を用い、FBXW7 を si にて発現抑制すると、Trastuzumab の感受性が低下した。NCI-N87 親株に対して miR-223 の強制発現を行ったところ、FBXW7 発現は低下し、その下流である MCL1・c-Myc・c-Jun の発現は上昇した。元来、Trastuzumab に対して感受性を示していた細胞株が、miR-223 強制発現にて Trastuzumab に対して耐性を示すように変化した。NCI-N87 Trastuzumab 耐性株に対して miR-223 の発現抑制を行ったところ、FBXW7 発現は上昇し、その下流である MCL1・c-Myc・c-Jun の発現は低下した。miR-223 発現抑制にて耐性化していた細胞が感受性を回復した。

耐性の機序の一因として、抗アポトーシスによる変化を考え、FACS を用いてアポトーシスの変化を観察した。miR-223 の強制発現により PI 陰性 かつ Annexin V 陽性細胞の割合が有意に減少しており、アポトーシス細胞が減少したと考えられた。アポトーシス関連タンパクである cleaved PARP の発現も明らかに低下しており、Trastuzumab の感受性の変化の一因として、アポトーシスが関与していることが示された。

また、miR-223-FBXW7 経路が Trastuzumab に特異的な耐性かどうかを確認するために、胃癌株化細胞(NCI-N87)とその Trastuzumab 耐性株を用いて、cisplatin との感受性について検討した。NCI-N87 (miR-23 低発現)に対して、miR-223 を強制発現させたところ、cisplatin の感受性は上昇した。逆に NCI-N87 Trastuzumab 耐性株 (miR-223 高発現)に対

して、miR-223 を強制抑制したところ、cisplatin の感受性は低下した。これは Trastuzumab とは逆の効果であった。この事象は miR-223 が FBXW7 を制御することで抗アポトーシス効果を引き起こし Trastuzumab 耐性につながるという側面と、MCL1 や c-Myc、c-Jun といった細胞周期を促進させるタンパク質発現が上昇することで、細胞周期に依存する cisplatin の感受性上昇につながるという側面があることが考えられた。これらのことにより、miR-223/FBXW7 経路は Trastuzumab に特異的な耐性経路であることが考えられた。

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 2 件)

1. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ishimoto T, Ida S, Imamura Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. The sensitivity of gastric cancer to trastuzumab is regulated by the miR-223/FBXW7 pathway. *Int J Cancer* 2015 Apr 1;136(7):1537-45. 査読有
DOI: 10.1002/ijc.29168.

2. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ida S, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto S, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to Trastuzumab. *Ann Surg Oncol* 21(1): 343-350, 2014 査読有
DOI: 10.1245/s10434-013-3325-7.

[学会発表](計 8 件)

1. 岩槻政晃, 澤山浩, 馬場祥史, 坂本快郎, 吉田直矢, 馬場秀夫
「胃癌における trastuzumab 二次耐性に関与する遺伝子の同定」
第 27 回日本消化器癌発生学会総会、2016 年 9 月 15 日、城山観光ホテル(鹿児島県)
2. 岩槻政晃, 江藤弘二郎, 藏重淳二, 小澄敬祐, 黒田大介, 江藤二男, 馬場祥史, 坂本快郎, 吉田直矢, 馬場秀夫
「胃癌におけるトラスツズマブ二次耐性獲得のメカニズムの解明」
第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 14 日、リーガロイヤルホテル大阪(大阪府)
3. Masaaki Iwatsuki, Junji Kurashige, Kojiro Eto, Yoshifumi Baba, Yasuo

- Sakamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
 “Comprehensive Analysis of secondary-resistant genes for trastuzumab in gastric cancer”
 Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research、2016年2月19日、Hyatt Regency Maui (アメリカ・マウイ)
4. Masaaki Iwatsuki、Kojiro Eto, Hideo Baba
 “Molecular mechanism of secondary-resistant for trastuzumab in gastric cancer.”
 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI 2016)、2016年1月21日、Moscone West Building (アメリカ・サンフランシスコ)
5. 岩槻政晃、藏重淳二、江藤弘二郎、糸山明莉、黒田大介、江藤二男、小澄敬祐、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫
 「胃癌におけるトラスツズマブ二次耐性に関する microRNA の同定」
 第26回日本消化器癌発生学会総会、2015年11月20日、米子全日空ホテル(鳥取県)
6. 江藤 弘二郎、岩槻 政晃、石本 崇胤、今村 裕、井田 智、馬場 祥史、岩上志朗、坂本 快郎、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
 「胃癌における FBXW7-MCL1 pathway を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」
 第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月17日、郡山総合体育館(福島県)
7. Kojiro Eto, Masaaki Iwatsuki, Takatsugu Ishimoto, Hideo Baba.
 “Sensitivity to trastuzumab for gastric cancer is regulated by miR-223/FBXW7 pathway.”
 AACR Annual Meeting 2014. 2014年4月7日、San Diego Convention Center (アメリカ・サンディエゴ)
8. 江藤 弘二郎、岩槻 政晃、石本 崇胤、今村 裕、井田 智、馬場 祥史、岩上志朗、坂本 快郎、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
 「胃癌における FBXW7 を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」
 第114回日本外科学会、2014年4月4日、国立京都国際会館(京都府)

〔図書〕(計2件)

1. 江藤 弘二郎、石本 崇胤、井田 智、今村 裕、岩上 志朗、馬場 祥史、坂

本 快郎、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
 消化器がんと microRNA
 臨床化学. 43(2):99-105, 2014.

2. 江藤 弘二郎、岩槻 政晃、石本 崇胤、馬場秀夫
 胃癌における microRNA21-PTEN 経路を介したトラスツズマブ耐性.
 Surgery Frontier 21(2): 220-223, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 尚子 (HAYASHI, Naoko)
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
 研究者番号: 20452899

(2) 研究分担者

石本 崇胤 (ISHIMOTO, Takatsugu)
 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任講師
 研究者番号: 00594889

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)
 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師
 研究者番号: 20599708

岩槻 政晃 (IWATSUKI, Masaaki)
 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教
 研究者番号: 50452777

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

江藤 弘二郎 (ETO, Kojiro)
 公益財団法人 がん研究会・その他部局等・医員