

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830090

研究課題名(和文) KRAS変異大腸がんの治療標的の探索

研究課題名(英文) The exploration of therapeutic target against colon cancer with KRAS mutation

研究代表者

藤下 晃章 (Fujishita, Teruaki)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号：50511870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子の活性化型変異は大腸がん患者のおよそ40%で確認されており、この変異を有する大腸がん患者に対して効果的な治療法は確立されていない。本研究ではKRASの下流にあるMEK/ERK経路が大腸がんの治療標的になる可能性について検証した。Kras変異のない家族性大腸ポリープ症モデルマウスにおいてMEK/ERK経路の活性化は腫瘍間質細胞で認められ、COX2の発現や血管新生を介しポリープ形成を促進させることを解明した。一方、MEK阻害薬がKras変異大腸がんモデルマウスの腺がん形成を抑制したことから、KRAS変異の有無に関わらずMEK/ERK経路は大腸がんの治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Activating mutations in KRAS gene are found in about 40% of colon cancer patients, and effective treatment for these patients with KRAS mutation is yet to be established. This study determined whether the MEK/ERK signaling, a downstream pathway of KRAS, would be a therapeutic target for colon cancer. The MEK/ERK signaling was activated in the stroma of intestinal polyps of a mouse model for familial adenomatous polyposis, and was responsible for promoting intestinal polyp expansion through stimulation of COX2 expression and angiogenesis. Treatment with a MEK inhibitor blocked intestinal adenocarcinoma formation in a mouse model for Kras mutant colorectal cancer. These results suggest that the MEK/ERK signaling may be an attractive therapeutic target for colon cancer regardless of the KRAS mutation status.

研究分野：総合生物

キーワード：マウスモデル 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡者数は増加の一途をたどり、総死因の実に3分の1近くががんとなっている。大腸がんは、食生活の欧米化に伴い増加傾向にあり、2020年には日本人の最も罹患率の高い悪性腫瘍になると予想されている。近年、上皮増殖因子受容体(EGFR)に対する分子標的薬(セツキシマブ、パニツムマブ)による治療は進行性の大腸がん患者の予後を有意に改善させる薬として注目を集めているが、同時にKRASに変異がある大腸がんに対して効果が低いことも明らかになっている。

KRAS 遺伝子の活性化型変異がおよそ40%の大腸がん患者で確認されている。この遺伝子はEGFRなど増殖因子受容体の下流に位置するSmall GTPaseをコードし、上流からの刺激を正に制御し、主にMAPキナーゼ(MAPK)経路及びPI3キナーゼ(PI3K)経路を介して細胞増殖及び成長促進、並びに細胞死の抑制作用をもたらす。従ってKRAS変異は上流の制御を受けず常に増殖刺激を誘導するため、EGFR標的薬に抵抗性を示し、現在までにKRAS変異大腸がんに対して有効な治療方法は確立されていない。

申請者はこれまでに腸管腫瘍のマウスモデルを用いて良性腫瘍である腸管腺腫および悪性の腸管腺がんの形成過程における増殖シグナル経路の役割について、特にmTOR経路を中心に解明してきた。本研究ではKRAS変異を併せ持つ大腸がんモデルマウスを作出し、変異型KRASを有する腸がんに対して、有効な分子標的薬の効果を検証する。

2. 研究の目的

本研究では家族性大腸腺腫症のマウスモデルを用いて良性腫瘍である腸管腺腫および悪性の腸管腺がんの形成過程における増殖シグナル経路の役割、特に、KRASの下流経路の一つであるMAPK(MEK/ERK)経路の役割を解明し、その阻害薬がKRAS変異大腸がんマウスモデルの腺がん形成を抑制する可能性について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腸管良性腫瘍(ポリープ)形成におけるMAPK(MEK/ERK)経路の活性化状態の検討。

家族性大腸腺腫モデルマウスであるApc⁷¹⁶マウス(Apcマウス)を用いKRASの下流のMAPK経路であるMEK/ERK経路の活性化状態を確認する。MEK/ERK経路の活性化の指標としてMEKの基質であるERKのリン酸化状態を免疫染色法およびウェスタンブロット法により検証する。ERKのリン酸化はCell Signaling Technology (CST)社のanti-phospho-ERK1/2抗体を用いて検出し、MEK阻害薬トラメチニブを2 mg/kg投与したマウスの組織を比較対照とした。また線維芽細胞など間葉系細胞はVimentin、血管内皮細胞はCD34、筋線維芽細胞は α SMA、神経細胞は

β -Tubulin III、リンパ管はLYVE-1、血球細胞はCD45に対する抗体をそれぞれ用いてMEK/ERK経路の活性化の局在を検証した。

(2) 腸管良性腫瘍(ポリープ)形成に対するMEK阻害薬の効果の検討。

MEK阻害薬トラメチニブを2 mg/kgの用量で1日1回Apcマウスに経口投与する。腸管腫瘍形成に対する影響はポリープの大きさおよび形成数を顕微鏡により評価する。血管新生はCD34を免疫染色により、細胞増殖はBrdU標識により測定し、MEK阻害薬による影響を検証する。

(3) Kras変異腸がん形成に対するMEK阻害薬の効果の検討。

Kras変異大腸がんマウスモデルとしてCtnnb1^{AE3}/Kras^{LSLG12D}/villin-CreERT2複合変異マウス(Ctnb/Krasマウス)を用いる。4-hydroxytamoxifen (4OHT) 0.1 mgを腹腔内投与し、腸管特異的に腺がんを形成させる。4OHT投与4週間後からMEK阻害薬トラメチニブ2 mg/kg、mTOR阻害薬AZD8055 20 mg/kg、またはEGFR阻害薬エルロチニブ50 mg/kgを4週間経口投与し腺がん形成に対する効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 腸管良性腫瘍(ポリープ)形成におけるMAPK(MEK/ERK)経路の活性化状態の検討。

リン酸化ERKに対する抗体を用いてウェスタンブロット法により野生型マウスの腸管粘膜、Apcマウスの腸管正常部、及びポリープにおけるMEK/ERK経路の活性化を検証した。野生型マウスの腸管粘膜では上部消化管の十二指腸で最も強く認められ、下部消化管の大腸に向けてERKのリン酸化が減少した(図1A)。一方、ポリープのリン酸化ERKは正常粘膜と比較して、同等か減少傾向が認められた(図1A)。免疫染色によりリン酸化ERKの局在を検証したところ、十二指腸から空腸にかけて陰窩(Crypt)の上皮細胞で認められたが、回腸から大腸の粘膜上皮細胞では殆ど認められなかった(図1B)。一方、十二指腸から大腸の間質細胞の一部でリン酸化ERKのシグナルが認められた(図1B)。またポリープにおいても腫瘍上皮細胞ではなく間質細胞で強いシグナルが認められた(図1C)。トラメチニブによりこれらシグナルが減弱していることから、検出したシグナルは正確にリン酸化ERKの局在を反映している(図1B,C)。また免疫蛍光染色によりポリープ管腔側に多数存在する血管内皮細胞(CD31陽性)や筋線維芽細胞(α SMA)の60~80%でMEK/ERK経路が活性化していたことから(図2)MEK/ERK経路の活性化は主に腫瘍上皮細胞ではなく血管内皮細胞や筋線維芽細胞などの間質細胞を介し、ポリープ形成に関与する可能性を示唆している。

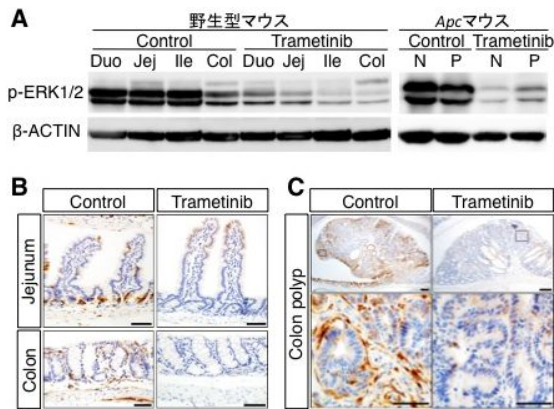


図 1. (A) 野生型マウスおよび *Apc* マウスの腸管における MEK/ERK 経路活性化をウェスタンブロット法により検証. Duo: 十二指腸, Jej: 空腸, Ile: 回腸, Col: 大腸, N: 回腸正常部, P: 回腸ポリープ. (B) 野生型マウスの腸管におけるリン酸化 ERK の免疫染色. (C) *Apc* マウスの大腸ポリープにおけるリン酸化 ERK の免疫染色. 上段枠内の拡大をそれぞれ下段に示す.

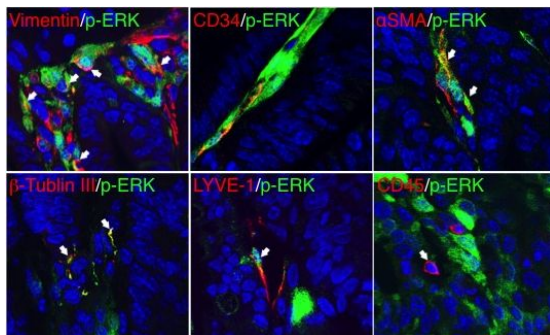


図 2. *Apc* マウスの腸管ポリープにおける MEK/ERK 経路活性化細胞の同定. 赤: 各種マーカー, 緑: リン酸化 ERK, 青: DAPI.

(2) 腸管良性腫瘍 (ポリープ) 形成に対する MEK 阻害薬の効果の検討.

腸管ポリープ形成に対する MEK/ERK 経路の役割を検証するため、*Apc* マウスにトラメチニブ 2 mg/kg 8 週間経口投与を行い、ポリープ形成数を測定した。1.5 mm 以下のポリープ数はコントロール群との差は認められなかった。一方、1.5 mm 以上のポリープ数はトラメチニブ投与により有意に減少しており (図 3A) 残存する 1.5 mm 以上のポリープも退縮が認められたことから、MEK/ERK 経路の活性化はポリープの拡大に関与することを示している (図 3B)。また正常粘膜上皮細胞の増殖に影響はなかったが、腫瘍上皮細胞の増殖はトラメチニブにより抑制されていた (図 4A)。またポリープ拡大に必要な血管新生も抑制されていた (図 4B)。

ポリープ管腔側の血管内皮細胞や筋線維芽細胞などの間質細胞がシクロオキゲナーゼ 2 (COX2) を発現し、血管新生や腫瘍細胞増殖促進を介しポリープの拡大に寄与する

ことが報告されている。トラメチニブの投与により *Apc* マウスのポリープでは COX2 の発現が mRNA 及びタンパクレベルで減少しており (図 5A, B)。COX2 の発現とリン酸化 ERK の発現が一致していることから (図 5C)、ポリープ間質における MEK/ERK 経路の活性化は COX2 の発現に関与していることが推測される。

マウス腸管から単離した線維芽細胞にトラメチニブを処置し、COX2 の発現低下を確認した。さらに、このサンプルを用いサイトカインアレイを行い、血管新生や炎症反応に関するケモカイン CCL2 の発現が有意に低下することを発見した。COX2 阻害薬ロフェコキシブを線維芽細胞に処置した場合も CCL2 の発現を抑制したことから CCL2 の発現は COX2 により制御を受けることを示唆している。

以上の結果から腸管ポリープ形成における間質細胞の MEK/ERK 経路の活性化は COX2-CCL2 の発現を介し、血管新生や腫瘍細胞の増殖を促進させることで、ポリープの拡大に寄与することが明らかになった。

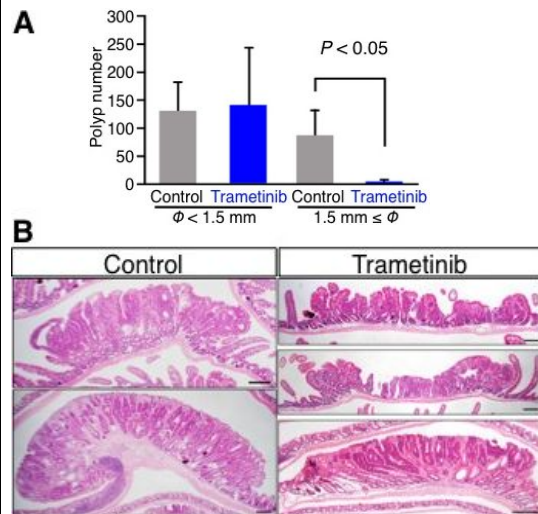


図 3. MEK 阻害薬トラメチニブは *Apc* マウスの腸管ポリープ形成を抑制する. (A) 直径 1.5 mm 未満 (左) と 1.5 mm 以上 (右) のポリープ数. (B) 小腸上と大腸ポリープの HE 染色.

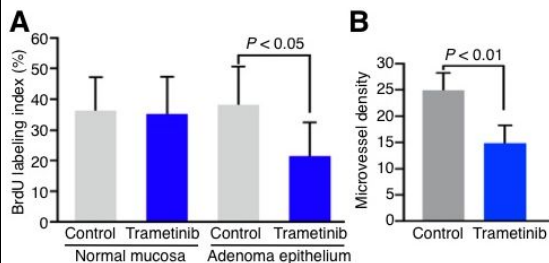


図 4. MEK 阻害薬トラメチニブは *Apc* マウスの腸管腫瘍上皮細胞の増殖と血管新生を抑制する. (A) BrdU 染色による細胞増殖を測定. (B) CD34 染色によるポリープ管腔側の血管新生を測定.

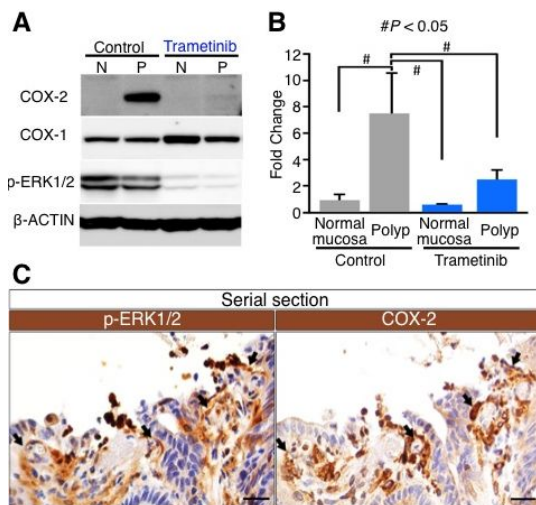


図 5. MEK 阻害薬トラメチニブはポリープ間質細胞の COX2 発現を抑制する。ウェスタンブロット (A) 及び定量的 PCR (B) による COX2 の発現検証。(C) 連続切片を用いた染色による COX2 とリン酸化 ERK の発現局在の検証。

(3) *Kras* 変異腸がん形成に対する MEK 阻害薬の効果の検討。

Ctnb/Kras マウス EGFR 阻害薬エルロチニブ、mTOR 阻害薬 AZD8055、MEK 阻害薬トラメチニブを投与し、腺がん形成にあたる影響を検証した。*Ctnb/Kras* マウスは *villin* プロモータによる制御を受けるため、腺がんの発生は十二指腸から空腸に集中する。エルロチニブを投与したマウスでは多数の腺がんが十二指腸から空腸で認められ、抑制効果が認められなかった(図 6)。一方 AZD8055 やトラメチニブの投与により腺がん形成は強力に抑制されていたことから、*Kras* 変異腸がんに対して MEK 阻害薬および mTOR 阻害薬が有効である可能性を示唆している(図 6)。



図 6. *Ctnb/Kras* マウスの腸管腺がん形成に対する EGFR 阻害薬(左)、mTOR 阻害薬(中央)、MEK 阻害薬(右)の効果の検証。

まとめ

本研究では *KRAS* 変異の有無に関わらず MEK/ERK 経路は大腸がんの間質細胞で活性化しており、COX2 の発現を調節していることを世界で初めて明らかにした。また *KRAS* に変

異のある大腸がんでも MEK/ERK 経路や mTOR 経路が治療標的となる可能性を示した。

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)

Fujishita T, Kajino-Sakamoto R, Kojima Y, Taketo MM, Aoki M.

Antitumor activity of the MEK inhibitor trametinib on intestinal polyp formation in *Apc*⁷¹⁶ mice involves stromal COX-2. *Cancer Science*. 106, 692-699, 2015

doi: 10.1111/cas.12670.

(6月号の表紙を飾る) 査読有り

Hirai H*, Fujishita T*, Kurimoto K, Miyachi H, Kitano S, Inamoto S, Itatani Y, Saitou M, Maekawa T, Taketo MM.

CCR1-mediated accumulation of myeloid cells in the liver microenvironment promoting mouse colon cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 31, 977-989, 2014

doi: 10.1007/s10585-014-9684-z.

(*共同執筆) 査読有り

[学会発表](計 9 件)

小島 康, オリム フローレンス, 藤下 晃章, 武藤 誠, 青木 正博

腸管腫瘍形成における甲状腺ホルモンの役割

第 38 回分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド(神戸市)

梶野 リエ, 藤下 晃章、小島 康、武藤 誠、青木 正博

腸管腫瘍形成における JNK-mTORC1 経路活性化機序の解析

第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 10 日 名古屋国際会議場(名古屋市)

藤下 晃章、梶野 リエ、小島 康、武藤 誠、青木 正博

MEK/ERK 経路の阻害は COX2 および CCL2 の発現レベルを減少させ腸管ポリープ形成を抑制する

第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日 名古屋国際会議場(名古屋市)

小島 康、藤下 晃章、武藤 誠、青木 正博
II 型脱ヨード酵素の大腸がん進展における役割の検討

第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日 名古屋国際会議場(名古屋市)

梶野 リエ、藤下 晃章、小島 康、武藤 誠、

青木 正博
Apc^{Δ716} マウスの腸管腫瘍における
JNK-mTORC1 経路活性化機序の解析
第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

Teruaki Fujishita, Makoto M. Taketo,
Masahiro Aoki
Simultaneous inhibition of mTOR and EGFR
suppresses local invasion of intestinal
adenocarcinoma in *cis-Apc*^{Δ716}/*Smad4*
mice
第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月
25 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

梶野 リエ、藤下 晃章、小島 康、武藤 誠、
青木 正博
腸管腫瘍形成における JNK-mTORC1 経路
活性化機序の解析
第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月
27 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

藤下 晃章、小島 康、梶野 リエ、武藤 誠、
青木 正博
EGF 受容体の活性化は大腸がんモデルマウ
スの大腸がん mTOR キナーゼ阻害薬に対
する耐性をもたらす
第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月
26 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

青木 正博、梶野 リエ、小島 康、武藤 誠、
藤下 晃章
MEK 阻害薬トラメチニブによる *Apc* 変異マ
ウスの腸管ポリープ形成抑制効果
第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月
25 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

〔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：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
藤下 晃章 (FUJISHITA, Teruaki)
愛知県がんセンター (研究所)
分子病態学部・主任研究員
研究者番号：50511870

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：