

博士論文

卵巣癌腹腔内播種進展における、  
活性型 KRAS 遺伝子変異による MEK 経路を介した  
癌細胞集塊（スフェロイド）形成についての研究

荻島 樹里

## 目次

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 目次.....                       | 2  |
| 要旨.....                       | 3  |
| 序文.....                       | 4  |
| 卵巢癌に対する新規治療.....              | 4  |
| 卵巢癌と遺伝子変異.....                | 5  |
| 卵巢癌腹膜播種と癌細胞集塊（スフェロイド）の関係..... | 7  |
| 癌遺伝子変異とスフェロイド形成.....          | 9  |
| トラメチニブ.....                   | 12 |
| マウス卵巢癌細胞株 ID8 について.....       | 14 |
| 研究目的.....                     | 18 |
| 実験方法.....                     | 19 |
| 結果.....                       | 30 |
| 考察.....                       | 57 |
| 結論.....                       | 66 |
| 謝辞.....                       | 67 |
| 参考文献.....                     | 68 |

## 要旨

卵巣癌腹膜播種において、癌細胞が腹腔内で浮遊型癌細胞集塊すなわちスフェロイドを形成し足場非依存性に増殖していく過程に注目した。マウス卵巣癌細胞株 ID8 と、ID8 に *KRAS* 活性型遺伝子変異を導入した ID8-KRAS では、スフェロイド形成と足場非依存性の細胞増殖能に差を認め、いずれも *KRAS* 活性型変異の導入に伴い亢進することが示唆された。また、浮遊状態の ID8-KRAS では、細胞増殖関連遺伝子、および、MEK 経路と関わる遺伝子の発現上昇を認め、MEK 経路の阻害によりスフェロイド形成と足場非依存性の細胞増殖が抑制されることが示唆された。MEK 阻害薬が今後の卵巣癌腹膜播種の治療薬として期待される。

## 序文

### < 卵巣癌に対する新規治療 >

上皮性卵巣癌の 2018 年の新規患者発生数は全世界において 295,414 人、死亡者数は 184,799 人と推測され、女性の癌関連死の第 8 位となっている<sup>1</sup>。卵巣癌は、進行期が重要な予後因子であり、Ⅲ・Ⅳ期症例の予後が不良であることが知られているが、卵巣癌全体の約 40～50 %をⅢ・Ⅳ期症例が占める<sup>2</sup>。Ⅲ・Ⅳ期の特徴として、腹膜播種の存在が挙げられる。卵巣癌の治療方法は主に手術療法と化学療法であり、原則的にはまず手術を行い、手術所見より進行期を確定し、術後化学療法を追加するのが標準治療である。しかし、腹膜播種を伴うⅢ・Ⅳ期症例においては、腹腔内に病変が広がっているため、手術による根治的な病変の摘出は困難であることが多く、化学療法の組み合わせが不可欠である。Ⅲ・Ⅳ期症例における、手術および化学療法後の腹腔内再発率は約 80 %にのぼると報告されており<sup>2</sup>、進行卵巣癌に対する新規治療は未だ開拓の余地がある。

また、卵巣癌に対するプラチナ製剤を含む化学療法は高い奏効率を示しているが、化学療法抵抗性の場合には有効な治療法が確立されておらず、腹膜播種を伴う進行卵巣癌患者の 5 年生存率は 40%に満たない<sup>2</sup>。抗 VEGF ヒト化モノ

クローナル抗体ベバシズマブや PARP (poly ADP ribose polymerase) 阻害剤などの分子標的治療薬の開発が進められているが、これらは進行卵巣癌における全生存率の向上には至っておらず、進行卵巣癌患者は従来の化学療法に加えて分子標的治療薬を併用しても治療が難しいのが現状である<sup>3,4</sup>。

### < 卵巣癌と遺伝子変異 >

卵巣癌の新規治療の方向性を考えるにあたって、卵巣癌の発生起源に注目してみると、良性腺腫や境界悪性腫瘍から亜段階的に悪性化する過程を踏む卵巣癌 type I と、前癌病変を持たない卵巣癌 type II に分類されることが知られている<sup>5</sup>。Type I の特徴としては、進展速度が遅く、巨大だが卵巣に限局することがほとんどである。一方、type II は概して高分化で進展が速いが、その起源が卵巣外の卵管采にあり、そこから発生した卵管上皮内癌が卵巣に二次性に波及し卵巣癌が生じるという説が提唱されている<sup>6</sup>。

それぞれが卵巣癌全体において占める割合は、type I が 66 %、type II は 34 % と type I が多い<sup>7</sup>。Type II は腫瘍進展が速いため予後不良であることが多いが、type I の中でも、明細胞腺癌や粘液性腺癌は早期発見が困難であり、type II と比較して必ずしも予後がいいとはされていない<sup>6,8</sup>。現在は type ごとの治療法は確

立されていないが、それぞれに対する個別の治療については検討の余地がある。

Type ごとの遺伝子変異に着目してみると、type I 卵巣癌においては、*KRAS*、*BRAF*、*PTEN*、*PIK3CA*、*CTNNB1*、*ARID1A*、*PPPWR1A* などのさまざまな遺伝子変異が認められることが典型的であり<sup>9-11</sup>、type I 卵巣癌のおよそ40%は*KRAS*変異を有する<sup>12</sup>。さらに、*KRAS*変異を伴う転移性 type I 卵巣癌は、*KRAS*変異を伴わない転移性 type I 卵巣癌に比べて予後不良であるという報告もあり<sup>13</sup>、type I 卵巣癌における*KRAS*変異陽性の意義は大きいと言える。また、*KRAS*変異は type I 卵巣癌の前癌病変とも言える卵巣境界悪性腫瘍にもみられ、*KRAS* G12V変異を持つ漿液性境界悪性腫瘍患者は、変異を持たない同患者に比べて生存期間が短いという報告もある<sup>14</sup>。

一方、type II 卵巣癌は、その95%以上に*TP53*変異が存在することが知られている<sup>15</sup>。*TP53*変異は化学療法抵抗性や高再発率との関連が報告されているが<sup>16</sup>、type II の中でも、高分化型漿液性腺癌 (High-grade serous carcinoma; HGSC) においては、野生型*TP53*群の方が*TP53*変異群に比べて、有意に生存期間が短く、化学療法抵抗性が高いことも報告されている<sup>17</sup>。The Cancer Genome Atlas (TCGA) の解析によると、野生型*TP53*患者の3分の1に、*RAS*変異あるいは*RAS*関連遺伝子の活性型変異があることが明らかになっており<sup>18</sup>、type II 卵巣癌における野

生型 *TP53* 患者の予後不良要因としてこれらの *RAS* 関連遺伝子変異の影響も無視できない。

このように、卵巣癌における *KRAS* 変異に着目すると、*type I* 卵巣癌では *KRAS* 変異陽性が占める割合が多く、*type II* 卵巣癌では予後不良群との関わりが知られていることから、*KRAS* 変異をターゲットにした治療法の開発は今後の卵巣癌治療に有用である可能性がある。

#### <卵巣癌腹膜播種と癌細胞集塊（スフェロイド）の関係>

冒頭で述べたように、予後不良である進行卵巣癌の特徴のひとつとして、腹膜播種が挙げられる。乳癌や大腸癌などの他の癌種では、原発巣から隣接臓器や血管内へ癌細胞が浸潤し、その後、骨・肝臓・脳などの他臓器へ血行性転移するという過程が一般的であるが<sup>19</sup>、卵巣癌においては、他の癌種と異なり、原発巣から遊離した癌細胞が腹腔内を經由して直接腹膜や大網に運ばれ転移するという経緯をたどる<sup>20,21</sup>。

この卵巣癌細胞は、腹腔内へ移行する前に、上皮間葉転換（*Epithelial to mesenchymal transition*; *EMT*）という変化を生じることが知られているが、これは上皮細胞が細胞基底膜から離脱し、細胞間接着が喪失し、原発巣から遊離す

る働きである<sup>22,23</sup>。EMTによって遊離した卵巣癌細胞は単細胞あるいは集塊を形成し腹水中へ放たれる。このとき形成される癌細胞の集塊はスフェロイドと呼ばれている<sup>24-27</sup>。(スフェロイドの定義は一元的ではなく、癌幹細胞を指す場合もあるが、本研究におけるスフェロイドは、足場非依存性に増殖する癌細胞集塊を指す。) これらスフェロイド内の癌細胞が、次にフィブロネクチンなどの細胞接着分子の受容体であるインテグリンの発現を上昇させ、腹水中から腹膜へ接着することによって、腹膜への播種が促進されるとされている<sup>28</sup>。

このように、卵巣癌腹膜播種においてスフェロイドを形成しながら癌細胞が腹腔内で増殖する過程を模倣した、3D培養法という *in vitro* の培養法が知られている。3D培養法とは、単層細胞培養と比較して生体に近い結果を得ることを目的に開発された培養法であり、2002年頃より注目され始めてきた。ヒトの組織や臓器は3D構造であるが、通常、培養細胞の評価は単層細胞培養、つまり2D構造での評価が行われることが多い。そこで、細胞形態や細胞間相互作用、細胞分化の過程がより生体内に近い3Dの細胞培養方法についての研究が始まった<sup>29-32</sup>。3D培養は、細胞の形や極性評価のほか、遺伝子発現、細胞増殖能、形態形成能、運動性、細胞分化などの評価のために用いられ、2D培養との比較によりそれらが評価されていることも多い。3D培養の方法には複数の手法が存在し、評価す

る項目の違いによって培養方法が選択されている。例えば、Non-adhesive surface 細胞培養法、spinner flask 細胞培養法、rotary 細胞培養法、hanging drop 細胞培養法、micromolding techniques の利用、centrifugation pellet 法、external force enhancement 法など多数ある<sup>33,34</sup>。これらの培養法は、乳癌や悪性黒色腫においても応用されているが<sup>35,36</sup>、卵巣癌腹膜播種における腹腔内スフェロイドを模倣した培養方法としても広く応用されている<sup>37-39</sup>。He らの報告では、卵巣明細胞腺癌において、膜タンパク CDCP1 (CUB-domain-containing protein 1) が腹膜播種へもたらす影響を評価するために、ヒト卵巣明細胞腺癌細胞株を 3D 培養法で培養し、形成されたスフェロイドの CDCP1 発現について評価している<sup>24</sup>。

そこで、本研究においても、腹腔内スフェロイドの足場非依存性細胞増殖を模倣する実験系として 3D 培養法を用い、癌細胞株を細胞接着性の低いプレートで培養する方法を選択した<sup>40</sup>。

### <癌遺伝子変異とスフェロイド形成>

前述したように、*KRAS* 変異は卵巣癌の予後不良因子とも捉えられ、*KRAS* 変異をターゲットとした治療法については検討する意義がある。*KRAS* 遺伝子は、RAS ファミリーの 1 つで、RAS-RAF-MEK-ERK 経路の上流に位置する。

RAS-RAF-MEK-ERK 経路においては、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) からの細胞増殖シグナルが RAS タンパクを介し核に伝達されて細胞増殖が亢進することが知られており、この経路は RAS または RAF ファミリー内の遺伝子変異により活性化される<sup>41,42</sup>。つまり、*KRAS* 遺伝子に活性型変異が生じると、癌細胞の異常増殖が促進される。RAS 関連遺伝子には、*KRAS*、*NRAS*、*HRAS* があるが、これらがヒトの癌では最も変異が多いことが知られている。

遺伝子変異がもたらす発癌機序については、さまざまな報告がある。卵巣癌・卵管癌・腹膜癌においては、細胞の不死化や細胞増殖の促進、癌細胞のアポトーシス抑制が、遺伝子変異によって生じることが知られており<sup>20,43-45</sup>、後述する通り、腹膜播種も遺伝子変異によって促進されるという報告がある。

大腸癌においては、*KRAS* 活性型変異がある場合はない場合に比べて、播種病変が増加傾向であるという報告がある<sup>46,47</sup>。卵巣癌における *KRAS* 変異と播種の関連性については明らかになっていないが、2016 年の Yoshida らの報告では、卵巣癌腹膜播種についての研究で、*KRAS* 活性型変異導入によって腹腔内における免疫細胞分布が変化し、炎症性サイトカインが増加することで、腹膜播種を誘導し腫瘍形成を促進している可能性を示している<sup>48</sup>。しかし、*KRAS* 活性型変

異が腹腔内のスフェロイド形成に影響をもたらすかどうかについての報告はいまだなく、検討の余地がある。

一方、*KRAS* 変異と癌細胞の足場非依存性細胞増殖との関連については、複数の報告があり、Sunaga らは、*KRAS* 活性型変異を伴うヒト非小細胞肺癌細胞株において *KRAS* をノックダウンすると、接着細胞の培養すなわち 2D 培養では細胞増殖に変化は生じないが、浮遊細胞の培養すなわち 3D 培養では著明に細胞増殖が減衰することを報告している<sup>49</sup>。これは、非小細胞肺癌の足場非依存性の細胞増殖において、*KRAS* 活性型変異が重要な役割を果たすことを示している。また、*KRAS* 活性型変異を有するヒト大腸癌細胞株を 3D 培養すると、ミトコンドリア代謝を介して細胞増殖するという報告もあり<sup>50</sup>、*KRAS* 活性型変異と癌細胞の足場非依存性増殖との間には関連性があると言える。

これらの事実を踏まえて、本研究では、*KRAS* 活性型変異が卵巣癌の進展に与える影響について明らかにすることを目的とした。具体的には、*KRAS* 活性型変異が腹膜播種形成を促進すると仮定し、*KRAS* 活性型変異によって、足場非依存性の細胞増殖能が亢進するかどうか、また亢進するとすればその原因は何かを追求することを目的とした。その評価のために 3D 培養法を利用し 2D 培養との比較を行うこととした。

## <トラメチニブ>

前述した通り、RAS-RAF-MEK-ERK 経路は癌細胞増殖に関わる経路であり、さまざまな癌でこの経路が過剰に活性化していることが知られている<sup>41,42</sup>。そのため、以前より悪性腫瘍の治療標的として注目されてきたが、近年、より選択的なRAS-RAF-MEK-ERK 経路の阻害についての研究と、新薬の開発が進められている。

その中でもMEK阻害薬の治療効果が見出され、すでに臨床応用が始まっている。MEK阻害薬のひとつ、トラメチニブは、RAS-RAF-MEK-ERK経路におけるMEK1およびMEK2活性を特異的に阻害する選択的なアデノシン3'-リン酸非競合阻害薬であり、BRAFやCRAF、ERK1/2は阻害しないとされている。経口生物活性を有し、IC50は0.92 ~ 3.4 nMである<sup>51</sup>。

トラメチニブはさまざまな癌種で効果を評価されているが、動物モデルにおける知見に基づいて、有害事象低減と薬効の増強を目的に、RAF阻害薬との併用療法が試みられている<sup>52</sup>。悪性黒色腫や非小細胞肺癌に対して、BRAF阻害薬であるダブラフェニブとの併用療法が国内でも認可されている<sup>53-56</sup>。

トラメチニブとダブラフェニブとの併用療法は、2016年3月に*BRAF* V600E/K (コドン 600 のバリンからグルタミン酸への点突然変異) 遺伝子変異を有する

根治切除不能な悪性黒色腫に対して、初めて国内で承認されたが<sup>57</sup>、2018年7月には、同悪性黒色腫への外科的切除後の術後補助療法としても承認された<sup>58</sup>。

これは、**BRAF V600E/K** 変異を有する **Stage III**の悪性黒色腫患者のうち、外科的切除後の 870 人を対象とした第Ⅲ相二重盲検無作為化比較試験の結果に基づいている。投与期間 12 ヶ月で、ダブラフェニブ（1 回 150 mg、1 日 2 回、連日投与）とトラメチニブ（1 回 2 mg、1 日 1 回、連日投与）併用群 438 人と、プラセボ群 432 人を比較した試験で、プラセボ群と比較して、併用群で再発または死亡のリスクを 53 %低下させ、統計学的に有意な無再発生存期間の延長が認められた（無再発生存期間中央値：併用群未到達、プラセボ群 16.6 ヶ月、ハザード比 0.47（95%信頼区間：0.39 - 0.58）、 $p < 0.001$ ）。

卵巣癌における **MEK** 阻害薬の効果に関しては、再発低分化漿液性腺癌に対するセルメチニブの効果が第Ⅱ相試験まで報告されている<sup>59</sup>。今後、卵巣癌に対する **MEK** 阻害薬の応用が期待されるところであるが、卵巣癌腹膜播種におけるトラメチニブの効果は未知である。本研究では、**KRAS** 活性型変異を有する卵巣癌の治療標的を検討することを目的とし、現在、**MEK** 阻害薬の中でも最も臨床開発が進んでいるトラメチニブを選択した。

<マウス卵巣癌細胞株 ID8 について>

ID8 細胞は、メスの C57BL/6 マウスから採取した卵巣から、卵巣上皮細胞のみを切除し初代培養した後に、20 回以上継代して樹立されたマウスの卵巣癌細胞株である<sup>60</sup>。初代培養中は細胞増殖が緩徐であり、上皮成長因子の添加が必要であるが、20 回以上継代を行うと、形質転換しその細胞増殖スピードは速くなり、上皮成長因子の添加は不要となる。樹立された細胞株をメスの C57BL/6 マウスへ腹腔内投与すると、腹腔内に腫瘍細胞が形成され、腹水の産生が認められることから、卵巣癌の腹膜播種モデルとしてさまざまな研究で利用されている<sup>61-67</sup>。ID8 細胞を投与したマウスの死亡までの期間は、約 114 日間である。

ID8 細胞の染色体分析の結果から、複数の染色体において異数体が認められており、この点においてヒトの上皮性卵巣癌との共通点とされている<sup>68,69</sup>。また、広域の腹膜播種をもたらすことから、組織学的および病理学的にはヒト卵巣癌における HGSC と類似し、type II 卵巣癌の特徴を有するとされている<sup>60,70</sup>。

また、ID8 細胞は明らかな遺伝子変異を持たないとされており、新たに遺伝子変異の導入や不活性化等を行うことで、遺伝子変異を有する卵巣癌モデルとして ID8 を応用することが可能である。Yoshida らも、ID8 細胞に *KRAS* G12V 活性化型変異を導入することで ID8-KRAS 細胞を作製し、*KRAS* 活性化型変異を有する

マウス卵巣癌細胞株として使用している<sup>48</sup>。*KRAS* G12V 活性型変異は、*KRAS* 遺伝子のコドン 12 における、グリシンからバリンへの変異を示しているが、ヒトの卵巣癌における *KRAS* 変異の約 37%を占めるとされており、予後不良因子にも挙げられている<sup>71</sup>。これに倣い、本研究においても、*KRAS* 活性型変異がもたらしうる腹膜播種のメカニズム解明や新規治療法の探索を行うため、ID8 に *KRAS* G12V 活性型変異を導入した ID8-KRAS を用意し実験に用いた。前述の通り、ID8 は type II 卵巣癌の特徴を有すると言われているが、ID8 に *KRAS* 活性型変異を導入することで、type II 卵巣癌だけでなく、*KRAS* 活性型変異が多く認められる type I 卵巣癌の特性も有する卵巣癌細胞株を作製し得た。

また、Yoshida らは、ID8 と ID8-KRAS をマウスへ投与した卵巣癌腹膜播種モデルを用い、腹腔内の播種増殖や炎症について評価しているが、その中で、使用しているマウスは 8 週齢の C57BL/6J メスが用いられており、腹水量が十分貯留した時の体重が 23 g であったこと、またその際の腹水量は、ID8 も ID8-KRAS も約 5 ml であったことを示している<sup>48</sup>。細胞株投与後のマウスの体重が 23 g に達した時点で安楽死させ、各評価を行っていることから、本研究でも体重 23 g に達した時点を実験のエンドポイントとし、実験を行った。

また、同報告では、*in vitro* では ID8 と ID8-KRAS の細胞増殖能に差がみられ

なかったにも関わらず、*in vivo* では ID8-KRAS を投与したマウスで、ID8 を投与したマウスよりも、腹腔内播種の形成および腹水の産生が速いことを報告している。マウスの体重が 23 g に達するまでの日数は、ID8 は細胞投与後約 12 週間、ID8-KRAS は約 2 週間であった<sup>48</sup>。この結果より、2D 培養の比較では違いの認められなかった ID8 と ID8-KRAS が、マウス腹腔内では播種形成や腹水産生速度に差を生じたことが分かり、Yoshida らは、この原因を *KRAS* 活性型変異による炎症性サイトカイン増加の影響と考察している。この報告の中では、腹腔内播種巣の増殖能や腹水中のサイトカインの評価は行われているが、腹腔内に浮遊している癌細胞自体の増殖能については定量的な比較は行われていない。

一方、ID8 モデルを使用して腹腔内の浮遊癌細胞の評価を行った報告がある。Yin らの報告では、卵巣癌の腹腔内では、マクロファージの周囲に癌細胞が集積してスフェロイドを形成することで、細胞増殖能を保つというメカニズムについて報告している<sup>26</sup>。彼らは、ID8 を投与したマウスにおいて産生された腹水を回収し、その中の細胞集塊をスフェロイドと定義し、回収した腹水の鏡検により腹水中のスフェロイド形態および数を評価し、また、スフェロイドの Ki67 免疫染色を行うことで細胞増殖能を評価している。さらに、卵巣癌患者の腹水を回収し、ID8 マウスの腹水と同様に、腹水中のスフェロイド形態および数の評価

と細胞増殖能評価を行い、スフェロイドとマクロファージの相互関係について報告している。しかし、遺伝子変異に伴う、卵巣癌の腹腔内浮遊癌細胞の細胞増殖能については評価されていない。

本研究では、これらの既報に基づき、ID8-KRAS を用いた 2D 培養と 3D 培養との比較、および ID8 投与マウスと ID8-KRAS 投与マウスの腹腔内浮遊癌細胞の比較を行うことで、卵巣癌腹膜播種における *KRAS* 活性型変異導入に伴う足場非依存性増殖の変化について評価することとした。

## 研究目的

卵巣癌腹膜播種において、マウス卵巣癌細胞株 ID8 と *KRAS* 活性型変異を導入した ID8-*KRAS* を用いて、遺伝子変異と腹腔内癌細胞の足場非依存性増殖能の関連性について明らかにし、癌細胞の足場非依存性増殖を抑制する方法を追求することを目的とした。

1. ID8 細胞と *KRAS* 活性型変異導入株である ID8-*KRAS* 細胞の、培養方法による増殖能の違いを評価する
2. 腹腔内における癌細胞増殖能が、*KRAS* 活性型変異導入により増強するかを明らかにする
3. *KRAS* 活性型変異導入により、足場非依存性の細胞増殖能が増強する要因を明らかにする
4. MEK 経路の阻害によって、*KRAS* 活性型変異導入株のスフェロイド形成が阻害され、足場非依存性の細胞増殖能が抑制されるかどうか、*in vitro* および *in vivo* においてそれぞれ明らかにする

## 実験方法

### 1. 試薬

- MEK1/2 inhibitor Trametinib (GSK1120212) (Selleck Chemicals, Houston, USA)
- DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

### 2. 細胞培養

マウス卵巣癌細胞株 ID8 細胞と ID8-KRAS 細胞を用いた。ID8-KRAS 細胞は、ヒトの *KRAS* G12V 活性型変異を ID8 細胞に導入し、清野透先生（国立がん研究センター研究所、東京、日本）に作製していただいた。導入方法は、pCLXSN-KRASG12V を作製し、LXSN-KRASG12V ウイルスを、ID8 細胞に感染させ、遺伝子導入を行った。800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の G418 存在下で 7 日間培養し、耐性細胞を選別し、*KRAS* 活性型変異発現型 ID8 細胞、すなわち ID8-KRAS 細胞を得た<sup>48</sup>。

次に、ID8 細胞と ID8-KRAS 細胞に、CSII-CMV-EGFP (lentivirus) を用いて、GFP 遺伝子をそれぞれ導入し、ID8-GFP 細胞と ID8-KRAS-GFP 細胞を得た。GFP 導入は、清野透先生と吉松有紀先生（国立がん研究センター研究所、東京、日本）に行っていた。

両細胞は、10%ウシ胎児血清 (Thermo fisher scientific, Massachusetts, USA) と抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液) (Wako, Osaka, Japan) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wako) で維持し、5%CO<sub>2</sub>、37 °C下で培養した。

接着細胞の培養すなわち 2D 培養は接着細胞用の細胞培養プレートあるいはディッシュを用い、浮遊細胞の培養すなわち 3D 培養は、後述する通り超低接着プレートあるいはディッシュ (Corning, New York, USA) を用いて培養を行った。

### 3. 浮遊細胞培養法 (3D 培養法)

1×10<sup>5</sup> 個 / ml の細胞を超低接着プレート (Corning) に播種し、5%CO<sub>2</sub>、37 °C下で、48 時間培養した<sup>72</sup>。DNA マイクロアレイ解析や細胞カウント、細胞増殖能評価に用いた細胞は 10 cm ディッシュで培養し、アポトーシス評価、MEK 阻害薬投与実験に用いた細胞は 6 ウェルプレートで培養した。浮遊細胞を集める際、播種した細胞を培地ごと回収し、100 g、2 分間遠心し、0.25%トリプシン / EDTA (Wako) を添加してシングルセルに分離した。

#### 4. *In vivo*マウス卵巣癌腹膜播種モデル

マウスはC57BL/6Jを用い、日本エスエルシー株式会社(静岡、日本)より購入した。

Specific pathogen free飼育エリアで、日照サイクル12時間、1ケージあたり5匹で飼育した。木材性の床敷を使用した。

ID8-GFP細胞とID8-KRAS-GFP細胞を、 $1 \times 10^6$  個 / mlとなるよう、DMEM培地で濃度調整し、平均体重約18 gの8週齢メスマウスの腹腔内へ、調整した細胞懸濁液を1匹あたり1 mlずつ、イソフルラン麻酔下に投与した<sup>48</sup>。

マウスは、癌細胞投与後、体重23 gを越えた時点をエンドポイントとした<sup>48</sup>。エンドポイント時には、イソフルラン麻酔薬を過剰吸入させ、安楽死させた<sup>48</sup>。安楽死の際はマウスの体重と腹水量を評価した。

マウスは全44匹を使用した。その内訳は、細胞増殖能評価実験で各群6匹ずつ、アポトーシス評価実験で各群6匹ずつ、MEK阻害薬投与実験で各群10匹ずつを使用した。

#### 5. 生存細胞数評価

生存細胞数評価のため、*in vitro*において、10 cm ディッシュに各ディッシュ  $1 \times 10^6$  個の細胞を播種し、48 時間培養した後に鏡検し細胞形態を撮影した。その後、全細胞を回収し、接着細胞数および浮遊細胞数をカウントした。2D 培養

では、上清除去後、0.25 %トリプシン / EDTA (Wako) を添加して接着細胞を剥がした後に、PBS で洗浄して細胞懸濁液を回収した。その後、1500 rpm、5 分間遠心して、上清除去し、ペレットを PBS で懸濁、トリパンプルー染色液を 1:1 の割合で混和し、セルカウンターで細胞数を測定した。3D 培養では、培地ごと細胞懸濁液を回収し、0.25 %トリプシン / EDTA (Wako) を添加してシングルセルに分離した。その後、100 g、2 分間遠心して、上清除去し、ペレットを PBS で懸濁、トリパンプルー染色液を用いて、2D 培養細胞と同様に細胞数を測定した。

## 6. 細胞増殖能評価

*In vitro* と *in vivo* において、それぞれ細胞増殖能を評価した。

*In vitro* では、ID8-GFP 細胞と ID8-KRAS-GFP 細胞を、それぞれ 10 cm ディッシュを用い、各ディッシュ  $1 \times 10^6$  個の細胞を播種した。各細胞を 2D 培養および 3D 培養でそれぞれ 48 時間培養した後、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を各ディッシュ 10  $\mu\text{M}$  となるように添加し、その 2 時間後に細胞を回収した<sup>73</sup>。回収した細胞懸濁液は PBS で洗浄した。EdU を検出するために、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 flow cytometry assay kit (Life Technologies, Massachusetts, USA) を

用いて、EdU を Alexa Fluor 647 で染色した。EdU 染色された細胞を、製品のプロトコル通りに固定処理を施行後、FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, NJ, USA) でフローサイトメトリーを行い、GFP と EdU を検出し、GFP 陽性細胞中の EdU 陽性細胞を EdU 陽性率として算出した。フローサイトメトリーのデータは、FlowLogic software (Inivai Technologies, Melbourne, Australia) を用いて解析した。(EdU 陽性率 (%) = 100 × (GFP 陽性細胞中の EdU 陽性細胞数 / 全細胞中の GFP 陽性細胞数))

*In vivo* では、ID8-GFP 細胞と ID8-KRAS-GFP 細胞を  $1 \times 10^6$  個 / 匹ずつ、それぞれマウス腹腔内へ投与し、その 48 時間後に 40  $\mu$ l EdU (200  $\mu$ g, 20 mM) / PBS 500  $\mu$ l / 匹をさらに腹腔内投与した<sup>74,75</sup>。EdU を投与して 2 時間後に、生理食塩水 8 ml を腹腔内投与し、腹腔内洗浄液として回収後、100  $\mu$ M セルストレイナーでろ過した。1500 rpm、5 分間遠心し、上清除去後、赤血球溶血処理を行った。

*In vitro* と同様、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 flow cytometry assay kit (Life Technologies) を用いて、EdU 染色を行った。フローサイトメトリーで解析し、FSC および SSC に基づいて癌細胞の範囲を同定し、さらに GFP 陽性エリアでゲーティングした。GFP と EdU を検出し、GFP 陽性細胞中の EdU 陽性細胞を EdU 陽性率として算出した。(EdU 陽性率 (%) = 100 × (GFP 陽性癌細胞中の EdU

陽性細胞数 / 全癌細胞中の GFP 陽性癌細胞数) )

## 7. Annexin-V FITC アポトーシス評価

*In vitro* と *in vivo* において、それぞれアポトーシス率を評価した。

*In vitro*では、ID8-GFP細胞とID8-KRAS-GFP細胞を、それぞれ6 ウェルプレートを用い、各ウェル $4 \times 10^5$  個の細胞を播種した。各細胞を、2D培養および3D培養でそれぞれ24時間培養した後、細胞を回収した。回収した細胞懸濁液は、Annexin-V

Apoptosis Detection Kit (Abcam, Massachusetts, USA)を用いて、製品のプロトコルに従いアポトーシスを評価した。Annexin-V FITCで細胞染色を行い、フローサイトメトリーを用いて検出し、全細胞中のAnnexin-V陽性細胞の割合をアポトーシス率とした。

*In vivo*では、ID8-GFP細胞とID8-KRAS-GFP細胞を $1 \times 10^6$ 個 / 匹ずつ、それぞれマウス腹腔内へ投与し、その24時間後に生理食塩水8 mlを腹腔内投与し、腹腔内洗浄液として回収後、100  $\mu$ Mセルストレイナーでろ過した。1500 rpm、5分間遠心し、上清除去後、赤血球溶血処理を行った。細胞懸濁液を、GFP-Certified Apoptosis / Necrosis Detection Kit (Enzo Life Sciences, Inc. New York, USA)を用いて、製品のプロトコルに従いアポトーシスを評価した。Annexin-V EnzoGoldで細胞染色を

行い、フローサイトメトリーを用いて検出し、GFP陽性細胞中のAnnexin-V陽性細胞の割合をアポトーシス率とした。

## 8. DNAマイクロアレイ法

ID8細胞とID8-KRAS細胞を、2D培養と3D培養でそれぞれ48時間培養し、各培養細胞からRNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、RNAを抽出した。RNAサンプルを回収し、3D-Geneマウスオリゴチップ24k (Toray Industries Inc., Tokyo, Japan) を用いて、オリゴDNAマイクロアレイ解析を行った。aRNA合成には、the Amino Alkyl MessageAMP II aRNA amplification kit (Applied Biosystems, California, USA) を用いた。Cy5で標識されたアミノアリルRNAとハイブリダイゼーションバッファーを、製品のプロトコル通りに16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションシグナルは3D gene scanner (Toray Industries Inc.) を用いて獲得され、3D gene extraction (Toray Industries Inc.) で追加処理を行った。各遺伝子で検出されたシグナル値は、global normalizationによって検出中央値を25に調整して正規化された。

シグナル値2倍以上の変化があり、 $p$ 値  $< 0.05$ であった転写産物を、発現の変動がある遺伝子と捉えた。

## 9. 定量的real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR)

DNAマイクロアレイ解析に用いたRNAサンプルを用い、RT-PCRkit (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて逆転写を行った。Light Cycler 480 (Roche, Basel, Switzerland)によってcDNAを増幅し、PPIAによって補正した $\Delta\Delta Ct$ 法で各RNAの発現を評価した。

使用したプライマーと条件は表に示す。

| 遺伝子       | プライマー     | 配列 (5'-3')                   | アニーリング<br>温度(°C) |
|-----------|-----------|------------------------------|------------------|
| PPIA      | Sense     | <i>CAGGTCCTGGCATCTTGTCC</i>  | 63               |
|           | Antisense | <i>ATGCCCGCAAGTCAAAGAA</i>   |                  |
| Tescalcin | Sense     | <i>CCTACCATTCGCAAGGAGAA</i>  | 60               |
|           | Antisense | <i>TTCTCGATGTGAGGGTTTCC</i>  |                  |
| Ifitm1    | Sense     | <i>CTTCAAAGCCGAGAGATG</i>    | 59               |
|           | Antisense | <i>CCACCATCTTCCTGTCCCTA</i>  |                  |
| Sprr2a2   | Sense     | <i>GGTCACTGCTGTTTCATTTCT</i> | 60               |
|           | Antisense | <i>ATTAGACCATCACCAAAGGGG</i> |                  |
| Gas6      | Sense     | <i>AGGTCTGCCACAACAACCA</i>   | 63               |
|           | Antisense | <i>GCGTAGTCTAATCACGGGGG</i>  |                  |
| Dusp5     | Sense     | <i>TGCACCACCCACCTACACTA</i>  | 63               |
|           | Antisense | <i>ATGTCAGCAGTGTGGCTGTC</i>  |                  |

## 10. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析

DNAマイクロアレイ解析で発現に差のあった遺伝子群について、分子パスウェイ解析プログラムGeneCodisを用いて、KEGGパスウェイと照合し、解析を行った<sup>76-78</sup>。

## 11. MEK阻害薬投与実験

*In vitro*では、ID8-KRAS-GFP細胞を、6 ウェルプレートを用いて、各ウェル  $2 \times 10^5$  個播種し、それぞれ2D培養および3D培養を行った。細胞播種直後に、MEK阻害薬トラメチニブ (GSK1120212) (Selleck Chemicals)、または、同量のDMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich) を添加した。トラメチニブは、0、1、10、100 nMの濃度勾配をつけてそれぞれ投与した。48時間培養後に鏡検し、細胞形態像を撮影した。その後、細胞を回収し、前述の通り、細胞増殖能評価を行った。EdU陰性細胞に対するEdU陽性細胞の割合を細胞増殖能とした。

*In vivo*においては、ID8-KRAS-GFP細胞を  $1 \times 10^6$  個 / 匹ずつマウス腹腔内へ投与し、同時にトラメチニブ投与を開始した。トラメチニブ投与群の1匹あたりの投与量は、トラメチニブ 18  $\mu\text{g}$  / 0.5 %メチルセルロース・0.2 % Tween 80 (Sigma-Aldrich) 200  $\mu\text{l}$  / 匹を、連日腹腔内投与した。対照群へは0.5 %メチル

セルロース・0.2% Tween 80 (Sigma-Aldrich) 200  $\mu$ l / 匹を腹腔内投与した<sup>79</sup>。投与は1日1回、1週間に6日間、計3週間行い、体重を1日おきに計測した。エンドポイントは、前述の論文に基づき、対照群は体重23 gを越えた時点で、トラメチニブ投与群はID8-KRAS-GFP投与から35日の時点とした。腹腔内のスフェロイド形成評価のため、生理食塩水8 mlを腹腔内投与し腹腔内洗浄液として回収後、100  $\mu$ Mセルストレイナーでろ過し、1500 rpm、5分間遠心、上清を破棄した。その後、赤血球溶血処理を行い、バフィーコートスポイトで吸い上げた後、10 cmディッシュに播種し、鏡検して細胞形態像を撮影した。また、安楽死させた際に、腹水量を評価し、エンドポイントに到達するまでの日数を比較した。

## 12. 統計学的解析

各データは平均値  $\pm$  標準誤差で記載した。2群間の比較に関しては、JMP Pro 13 (SAS Institute Inc., NC, USA) を用いてstudent t検定を行った。0.05未満のp値を有意差ありとみなした。多重比較においては、RT-PCRの結果におけるp値はMicrosoft Office Excel 2011 (BellCurve, Tokyo, Japan) を用いてHolm法で算出した。*In vitro* のトラメチニブ投与実験におけるp値は、JMP Pro 13 (SAS Institute Inc., NC, USA) を

用いてDunnett検定で算出した。マイクロアレイ解析におけるp値はFDR法で調整した。

生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、比較法はログランク検定を用いた。

## 結果

### 1. マウス卵巣癌細胞株ID8と*KRAS*活性型変異を導入したID8-*KRAS*における、 2D培養下と3D培養下の細胞増殖能の違い

#### 1-1. *KRAS*活性型変異導入によって、2D培養では細胞形態と生存細胞数に変化はみられなかったが、3D培養ではスフェロイド形成の増加を認め生存細胞数が増加した

ヒト腹腔内において、卵巣癌細胞が腹腔内に浮遊し、足場非依存性に増殖する環境を模倣して、マウス卵巣癌細胞株を3D培養法で培養し、スフェロイド形成の評価を行った。*KRAS*活性型変異を導入することにより、2D培養と3D培養で細胞形態や生存細胞数に違いが生じるかどうかを検討し、足場非依存性細胞増殖における*KRAS*変異の意義について評価することとした。

超低接着型プレートにID8-GFP細胞とID8-*KRAS*-GFP細胞を播種し、3D培養を行い、2D培養と比較した。以下、2D培養下のID8-GFP細胞とID8-*KRAS*-GFP細胞をそれぞれID8-2D、ID8-*KRAS*-2D、3D培養下のID8-GFP細胞とID8-*KRAS*-GFP細胞をそれぞれID8-3D、ID8-*KRAS*-3Dと表記する。2D培養下と3D培養下で、ID8-GFPとID8-*KRAS*-GFPのそれぞれの細胞増殖を形態学的に評価した結果、2D培養下では2つの細胞株 (ID8-2D、ID8-*KRAS*-2D) に細胞増殖の違いは認められなかったが、3D

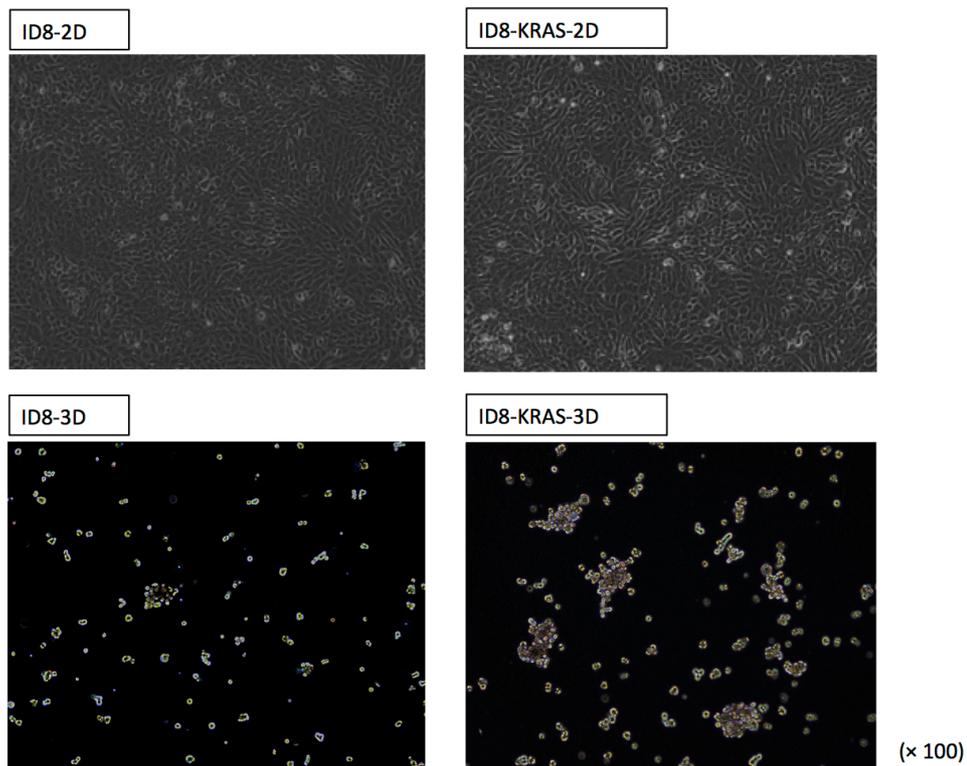
培養下では2つの細胞株 (ID8-3D、ID8-KRAS-3D) の間に大きな違いを認めた。

ID8-KRAS-GFPは、3D培養開始後、すみやかに癌細胞の集塊、すなわちスフェロイドを形成し、48時間培養後もその形態を維持していた。一方、ID8-GFPは、3D培養下ではほとんどスフェロイドを形成せず、48時間培養後もスフェロイドはほとんど認められなかった(図1-A)。

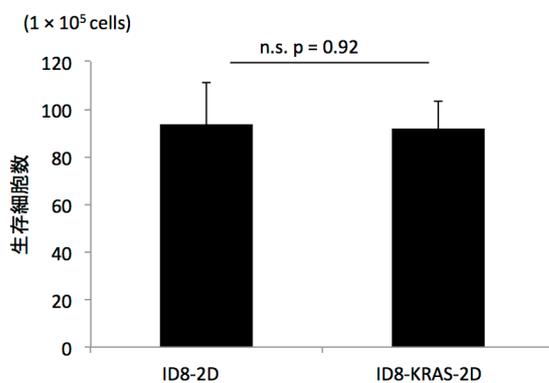
次に、2Dまたは3D培養下における、ID8-GFPとID8-KRAS-GFPの生存細胞数を、培養開始後48時間でそれぞれカウントした。ID8-2Dは  $(93.9 \pm 17.1) \times 10^5$  cellsであったのに対して、ID8-KRAS-2Dは  $(91.8 \pm 11.6) \times 10^5$  cellsで有意差は認められなかった ( $p = 0.92$ )。一方、ID8-3Dは  $(3.1 \pm 0.4) \times 10^5$  cellsであったのに対し、ID8-KRAS-3Dは  $(5.6 \pm 0.4) \times 10^5$  cellsと、ID8-KRAS-GFPが有意に増加していた ( $p < 0.05$ ) (図1-B、1-C)。

これらの結果より、3D培養下において、*KRAS*活性型変異導入株においては、*KRAS*活性型変異非導入株よりもスフェロイド形成が促進される可能性が示唆された。また、3D培養下では、*KRAS*活性型変異導入株において、*KRAS*活性型変異非導入株よりも癌細胞の生存細胞数が有意に増加していた。

A



B



C

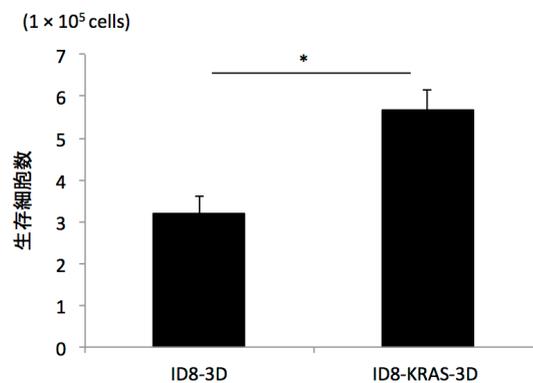


図1 ID8細胞とID8-KRAS細胞の2D培養と3D培養における細胞増殖形態と生存細胞数

ID8-GFPとID8-KRAS-GFPを、それぞれ $1 \times 10^6$ 個ずつ細胞播種し、2Dおよび3D培養で48時間培養した。

A. 2D培養および3D培養における細胞鏡検像を撮影した。(倍率100倍)

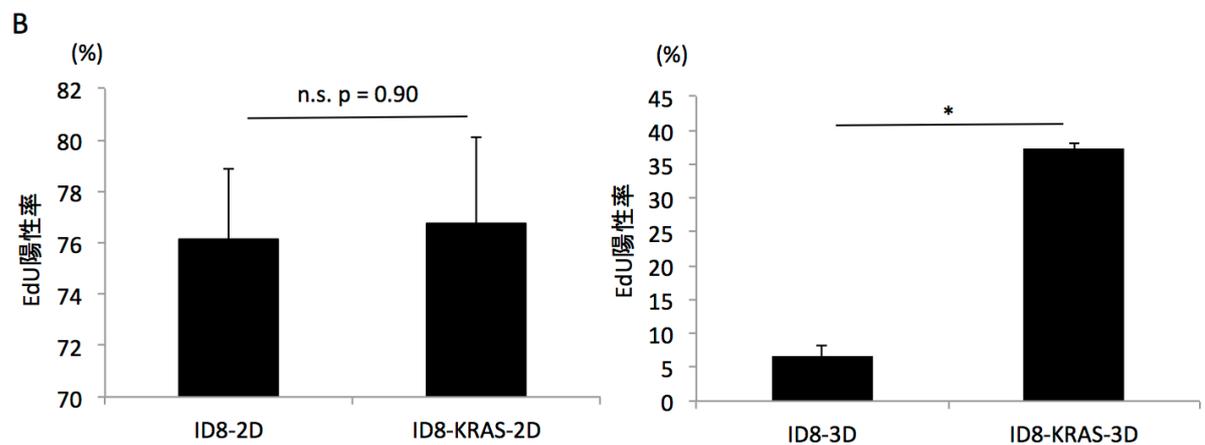
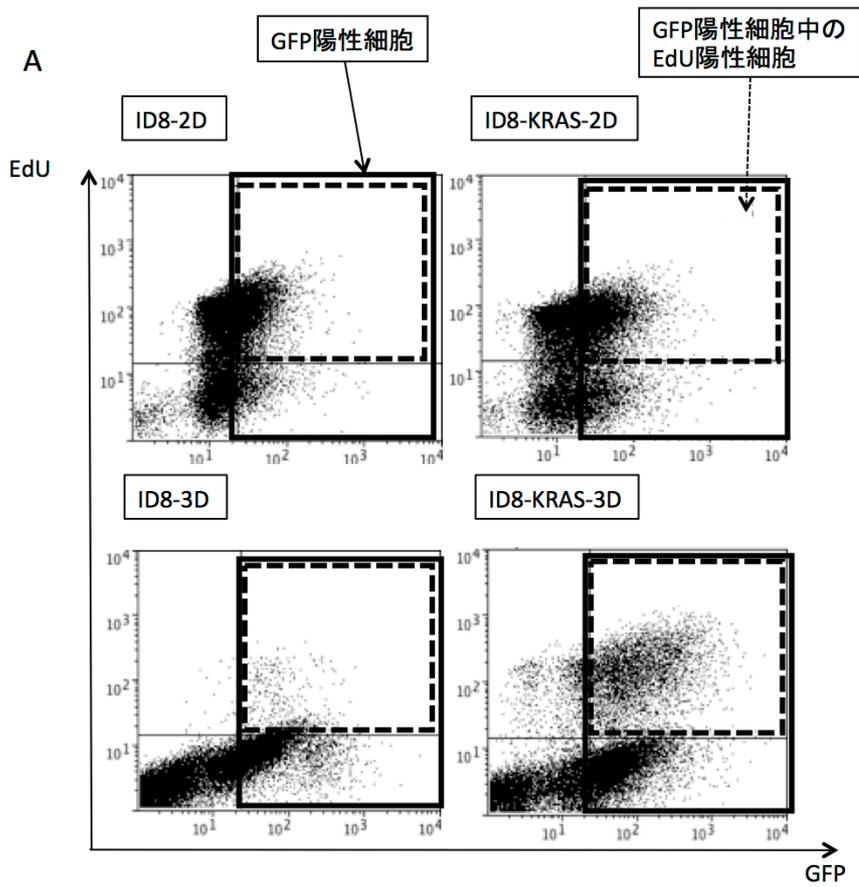
B-C. ID8-GFPとID8-KRAS-GFPを、48時間培養後、生存細胞数を評価した。独立した試験を3回行い、その平均  $\pm$  標準誤差で結果を示した。(\*  $p < 0.05$ )

1-2. *KRAS*活性型変異導入によって、2D培養では細胞増殖能は変化しないが、

3D培養では細胞増殖能が亢進した

続いて、各細胞の増殖能を定量的に評価するため、培養細胞におけるEdU陽性率を測定した。ID8-2DとID8-*KRAS*-2Dは、48時間培養後のEdU陽性率が変わらなかった (ID8-2D  $76.2 \pm 2.7\%$  対 ID8-*KRAS*-2D  $76.7 \pm 3.3\%$ 、 $p = 0.90$ ) のに対して、ID8-*KRAS*-3Dは48時間培養後では、ID8-3DよりもEdU陽性率が約5倍高かった (ID8-3D  $6.7 \pm 1.5\%$  対 ID8-*KRAS*-3D  $37.3 \pm 0.8\%$ 、 $p < 0.05$ ) (図2-A、2-B)。

以上より、*KRAS*活性型変異導入によって、3D培養下での細胞増殖能が亢進する可能性が示唆された。



## 図2 ID8細胞とID8-KRAS細胞の2D培養と3D培養における細胞増殖能

ID8-GFPとID8-KRAS-GFPを、それぞれ $1 \times 10^6$  個ずつ細胞播種し、2Dおよび3D培養で48時間培養した。

A. EdU を用いて、細胞増殖能を評価した。48 時間培養した細胞に EdU 10  $\mu$ M を添加し、2 時間培養後、EdU を Alexa Fluor 647 で染色し、EdU 陽性率を評価した。回収した培養細胞中の GFP 陽性細胞における EdU の陽性率を比較した。GFP 陽性細胞の範囲を実線で囲み、GFP 陽性細胞中の EdU 陽性細胞の範囲を点線で囲み示した。独立した 3 回の試験の代表的なデータを示した。

B. GFP陽性細胞とEdU陽性細胞をフローサイトメトリーで評価し、GFP陽性細胞中のEdU陽性細胞をEdU陽性率として算出した。独立した3回の試験の代表的なデータを示した。また、その平均  $\pm$  標準誤差で結果を示した。(\*  $p < 0.05$ ) (EdU 陽性率 (%) =  $100 \times (\text{GFP陽性細胞中のEdU陽性細胞数} / \text{全細胞中のGFP陽性細胞数})$ )

### 1-3. 3D培養下での癌細胞アポトーシス率は、*KRAS*活性型変異導入により変化しなかった

各細胞の増殖能に続いて、アポトーシス率を評価するために、ID8-2D、ID8-3D、ID8-KRAS-2D、ID8-KRAS-3DにおけるAnnexin-V染色を評価した。ID8-2DとID8-KRAS-2Dの比較と、ID8-3DとID8-KRAS-3Dの比較においては、アポトーシス率に優位な差を認めなかった (ID8-2D  $1.5 \pm 0.3$  % 対 ID8-KRAS-2D  $2.2 \pm 0.8$  %,  $p = 0.46$ 、ID8-3D  $29.3 \pm 2.0$  % 対 ID8-KRAS-3D  $27.0 \pm 3.1$  %,  $p = 0.60$ ) (図3)。

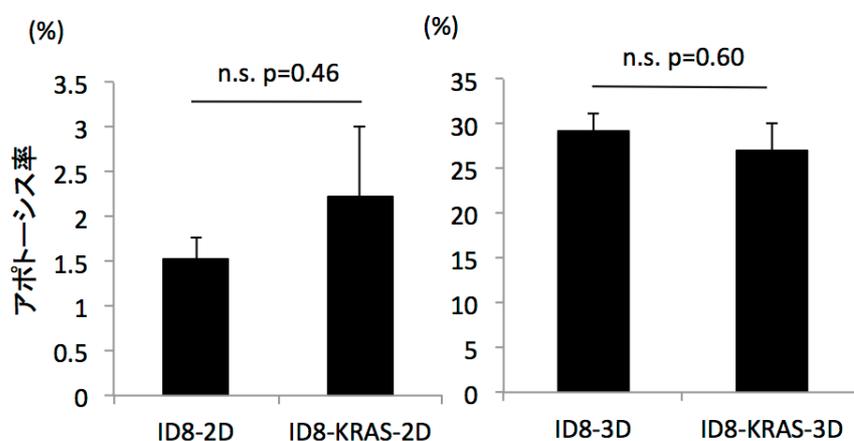


図3 *In vitro*におけるID8細胞とID8-KRAS細胞中のアポトーシス評価

ID8-GFPとID8-KRAS-GFPをそれぞれ $1 \times 10^6$ 個播種し、48時間2D培養と3D培養を行った。浮遊細胞と接着細胞をともに回収し、PBS洗浄し、Annexin V-FITC (5  $\mu$ l)を細胞浮遊液に添加してAnnexin-V染色を行った。染色した細胞をフローサイトメリーで解析し、Annexin-V陽性のアポトーシス細胞の割合を算出した。独立した試験を3回行い、その平均  $\pm$  標準誤差で結果を示した。 (\*  $p < 0.05$ )

## 2. 腹腔内における癌細胞増殖能は、*KRAS* 活性型変異導入により増強した

### 2-1. *KRAS* 活性型変異導入により、腹腔内癌細胞の細胞増殖能が亢進した

これまでの結果より、2D 培養では ID8 と ID8-KRAS の形態や細胞増殖能に違いは認めなかったが、3D 培養ではいずれも大きく異なることが明らかになった。つまり、細胞が浮遊している状態において、*KRAS* 活性型変異が導入されると、スフェロイドの形成能や癌細胞増殖能が亢進する可能性が示唆された。

そこで、生体腹腔内の浮遊細胞においても、実際に癌細胞増殖能が亢進するかどうかを評価するために、ID8-GFP と ID8-KRAS-GFP をマウスの腹腔内へ投与し、それらの細胞増殖能を評価した。ID8-GFP と ID8-KRAS-GFP をそれぞれマウスへ投与し、48 時間後に回収した腹腔内洗浄液における、GFP 陽性癌細胞の割合と EdU 陽性率を評価した (図 4-A)。その結果、全回収細胞における GFP 陽性癌細胞の割合は、ID8  $0.2 \pm 0.1 \%$ 、ID8-KRAS  $1.4 \pm 0.6 \%$  ( $p = 0.10$ ) であった (図 4-B)。

さらに、GFP 陽性癌細胞中の EdU 陽性細胞の割合は、ID8-KRAS において ID8 より有意に増加を認めた (ID8  $14.8 \pm 3.7 \%$ 、ID8-KRAS  $26.1 \pm 2.4 \%$ 、 $p < 0.05$ ) (図 4-C)。

これらの結果より、腹腔内の浮遊癌細胞は、ID8 よりも ID8-KRAS で有意に増

殖能が増進することが示された。

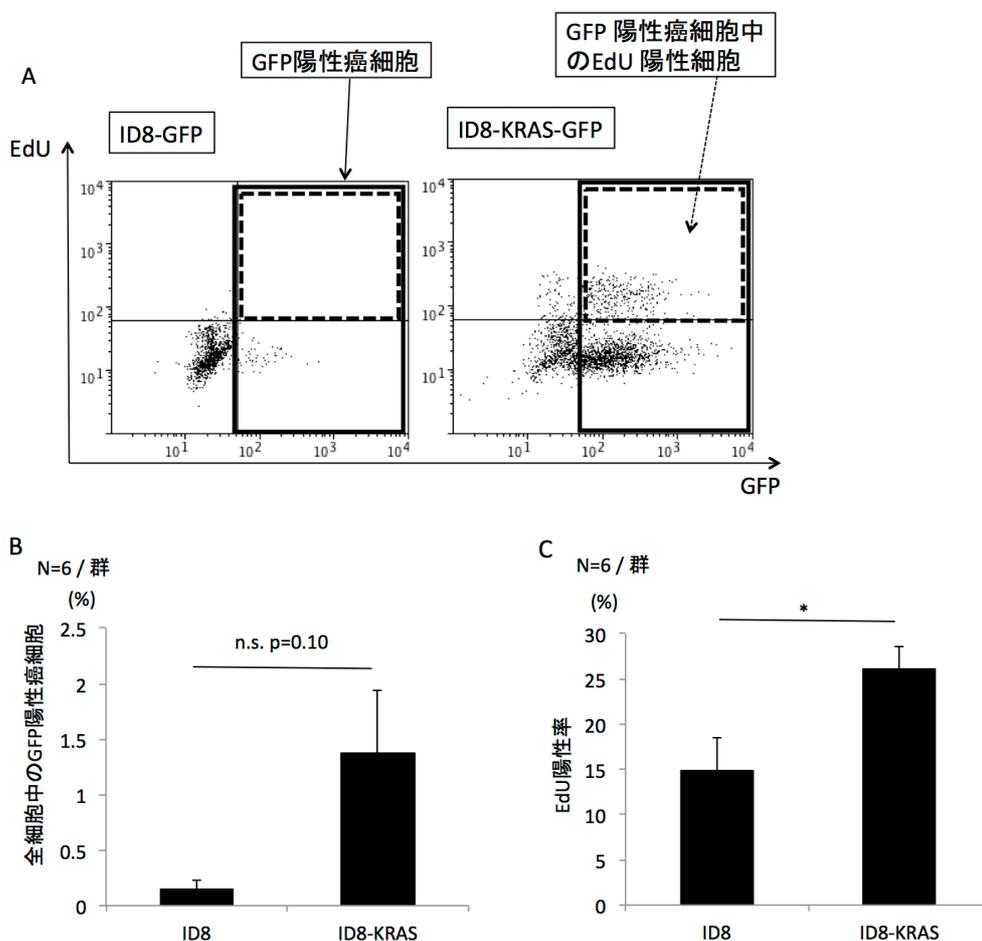


図4 *In vivo*におけるID8細胞とID8-KRAS細胞の細胞増殖能評価

ID8-GFPとID8-KRAS-GFPをそれぞれマウスの腹腔内へ投与し、48時間後にEdUを腹腔内投与した。EdU投与の2時間後に、生理食塩水8mlを腹腔内投与し、腹腔内洗浄液として回収した。EdUをフローサイトメトリーで検出するために、EdUをAlexa Fluor 647で標識した。

A. 腹腔内洗浄液中のGFP陽性癌細胞におけるEdUの陽性率を比較した。GFP陽性癌細胞の範囲を実線で囲み、GFP陽性細胞中のEdU陽性細胞の範囲を点線で囲み示した。独立した3回の試験の代表的なデータを示した。

B. 腹腔内洗浄液中の全細胞におけるGFP陽性癌細胞の割合を定量的に解析した。独立した試験を3回行い、その平均 ± 標準誤差で結果を示した。(\* p < 0.05、各群n = 6)

C. GFP陽性癌細胞におけるEdU陽性細胞の割合を定量的に解析した。独立した試験を3回行い、その平均 ± 標準誤差で結果を示した。(\* p < 0.05、各群n = 6)

## 2-2. 腹腔内浮遊細胞のアポトーシス率は *KRAS* 活性型変異導入により変化しなかった

次に、*in vivo* においても、*in vitro* と同様にアポトーシス率をそれぞれ評価した。癌細胞を投与してから48時間後の腹腔内浮遊癌細胞の数はID8とID8-KRASで変化がなかったため、24時間後のアポトーシス評価を行った。その結果、GFP陽性癌細胞中のAnnexin-V陽性細胞は、ID8とID8-KRASの間で差を認めなかった（ID8  $20.2 \pm 4.0\%$ 、ID8-KRAS  $17.2 \pm 3.9\%$ 、 $p = 0.63$ ）（図5）。

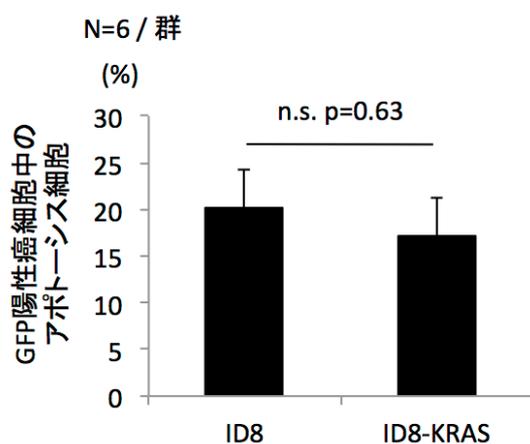


図5 *In vivo*におけるID8細胞とID8-KRAS細胞のアポトーシス評価

ID8-GFPとID8-KRAS-GFPを $1 \times 10^6$ 個ずつマウスへ腹腔内投与し、24時間後に腹腔内洗浄液を回収した。遠心分離し、PBS洗浄後、Annexin-V染色を行った。染色した細胞をフローサイトメトリーで解析し、GFP陽性細胞中のAnnexin-V陽性細胞の割合を評価した。独立した試験を3回行い、その平均  $\pm$  標準誤差で結果を示した。（\*  $p < 0.05$ 、各群 $n = 6$ ）

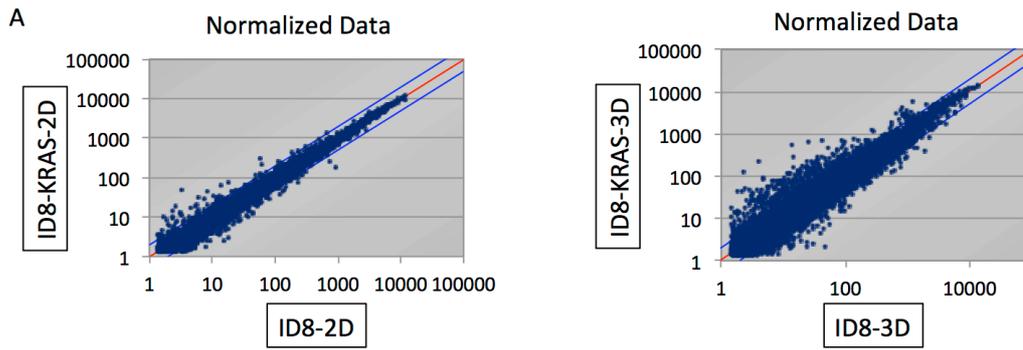
### 3. ID8細胞とID8-KRAS細胞の遺伝子発現プロファイルの違いについて

#### 3-1. KRAS 活性型変異導入による遺伝子発現の変化は、2D 培養下よりも 3D 培養下で大きく、細胞増殖関連の遺伝子発現が増加した

ここまでの結果より、ID8とID8-KRASにおいて、2D培養と3D培養では、アポトーシス率に変化は認められなかったが、生存細胞数と細胞増殖能が異なることが明らかになった。培養法によってこれらの違いが生じる要因を探るため、各培養条件における、遺伝子発現の変化について評価した。方法として、ID8-2D、ID8-3D、ID8-KRAS-2D、ID8-KRAS-3Dの各細胞から、それぞれtotal RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。

まず、ID8-2D対ID8-KRAS-2D、ID8-3D対ID8-KRAS-3Dにおいて、それぞれの遺伝子発現を比較すると、ID8-2DとID8-KRAS-2Dでは遺伝子発現パターンは似通っていたが、ID8-3DとID8-KRAS-3Dでは遺伝子発現パターンに大きな違いを認めた（図6-A）。

それぞれの比較において、上昇および低下した遺伝子数を比べると、ID8-3DとID8-KRAS-3Dを比較した場合の方が、ID8-2DとID8-KRAS-2Dを比較した場合よりも、変動した遺伝子の数が多かった（図6-B）。



**B**

|                       | 上昇遺伝子数 | 低下遺伝子数 |
|-----------------------|--------|--------|
| ID8-2D vs ID8-KRAS-2D | 66     | 187    |
| ID8-3D vs ID8-KRAS-3D | 777    | 549    |

**図 6 ID8-2D 対 ID8-KRAS-2D、ID8-3D 対 ID8-KRAS-3D を比較した DNA マイクロアレイ解析**

ID8 と ID8-KRAS を、 $1 \times 10^6$  個播種し、2D 培養と 3D 培養でそれぞれ 48 時間培養した。それぞれのサンプルから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

A. ID8-2D 対 ID8-KRAS-2D、ID8-3D 対 ID8-KRAS-3D の遺伝子発現を比較し、プロットで表した。

B. マイクロアレイ解析で発現量に差のあった遺伝子の数を表に示した。正規化されたシグナル値が 2 倍以上上昇した遺伝子と 2 倍以上低下した遺伝子を抽出した。

さらにパスウェイ解析を行ったところ、ID8-3D と ID8-KRAS-3D の比較では、cell cycle や DNA replication といった細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子の発現が、ID8-3D よりも ID8-KRAS-3D で有意に上昇していることが認められた (表1)。

つまり、3D 培養では、2D 培養と比べて、KRAS 活性型変異が導入されたことによる発現遺伝子の変化が大きく、変化のあった遺伝子群は細胞増殖や細胞周期に関連することが明らかになった。

表1 ID8-3Dと比較してID8-KRAS-3Dで発現上昇していた遺伝子群のKEGG解析結果

| パスウェイ<br>アノテーション                         | 遺伝子名   | 遺伝子<br>数 | p 値*     |
|--|--|----------|----------|
| (KEGG) 04110: Cell cycle                 | Ccnb1, Mad2l1, Cdk1, Orc1, Chek2, Mcm3, Ccna2, PcnA, Espl1, Ccnd1, Bub1, Skp2, Dbf4, Orc6, Rbl1, Mcm4, Chek1, E2f1, Mcm6, Cdkn2d, Cdc25b, Cdc20, Mcm2, Bub1b, Cdc6, Wee1, Ccnb2, Ccne1, Cdc45, Anapc7, Cdc25c, Plk1, Mcm7, Mcm5, Ttk | 35       | 4.97E-30 |
| (KEGG) 03030: DNA replication            | Mcm3, PcnA, Pola1, Prim2, Pole, Rfc5, Prim1, Mcm4, Rfc2, Lig1, Mcm6, Pola2, Mcm2, Pold2, Rnaseh2b, Rfc3, Rpa2, Mcm7, Fen1, Mcm5, Pole2, Rpa3   | 22       | 1.81E-28 |
| (KEGG) 00240: Pyrimidine metabolism      | Tk1, Pola1, Ctps, Prim2, Pole, Dut, Cda, Umps, Prim1, Dck, Upp1, Pola2, Pold2, Dtymk, Dctd, Tyms, Rrm2, Polr3g, Pole2, Rrm1, Uck2  | 21       | 1.31E-15 |
| (KEGG) 03420: Nucleotide excision repair | PcnA, Pole, Rfc5, Rfc2, Lig1, Pold2, Rfc3, Rpa2, Pole2, Rpa3   | 10       | 3.59E-12 |
| (KEGG) 03030: DNA replication            |  |          |          |
| (KEGG) 03410: Base excision repair       | Gm5518, PcnA, Pole, Lig1, Neil3, Pold2, Hmgb1, Tdg, Fen1, Pole2, Mutyh, Ung  | 12       | 8.87E-12 |
| (KEGG) 04110: Cell cycle                 | Mcm3, PcnA, Mcm4, Mcm6, Mcm2, Mcm7, Mcm5   | 7        | 1.13E-11 |

|   |   |    |          |
|---|---|----|----------|
| (KEGG) 03030: DNA replication                         |   |    |          |
| (KEGG) 03420: Nucleotide excision repair              | Pcna, Rfc5, Rfc2, Lig1, Pold2, Rfc3, Rpa2, Rpa3   |    |          |
| (KEGG) 03030: DNA replication                         |   | 8  | 4.67E-10 |
| (KEGG) 03430: Mismatch repair                         |   |    |          |
| (KEGG) 04110: Cell cycle                              | Ccnb1, Mad211, Cdk1, Ccna2, Bub1, Cdc25b, Ccnb2, Anapc7,  |    |          |
| (KEGG) 04914: Progesterone-mediated oocyte maturation | Cdc25c, Plk1  | 10 | 6.88E-10 |
| (KEGG) 03430: Mismatch repair                         | Pcna, Rfc5, Rfc2, Exo1, Lig1, Pold2, Rfc3, Rpa2, Rpa3   | 9  | 9.50E-10 |
| (KEGG) 04114: Oocyte meiosis                          | Mad211, Cdk1, Espl1, Bub1, Aurka, Ppp2r1b, Sgol1, Calml3, Rps6ka2, Cdc20, Ccnb2, Ccne1, Anapc7, Cdc25c, Plk1, Fbxo5 | 16 | 1.05E-09 |

p 値\*: FDR 法で修正した p 値

### 3-2. 3D 培養下で *KRAS* 活性型変異が導入されると、癌進展に関連する遺伝子の発現が上昇した

*KRAS* 活性型変異導入によって、3D 培養下の癌細胞増殖能の亢進がもたらされる原因を明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析を用いて、今回は ID8-2D 対 ID8-3D と ID8-KRAS-2D 対 ID8-KRAS-3D の遺伝子発現パターンを解析した。

その結果、ID8 と ID8-KRAS、いずれの比較においても、2D 対 3D では、発現遺伝子の変化は大きく認められた (図 7-A、7-B)。

そこで、発現が上昇した遺伝子群の方へ注目してみると、ID8-2D 対 ID8-3D と ID8-KRAS-2D 対 ID8-KRAS-3D で共通して上昇していたのは 1015 遺伝子、ID8-2D 対 ID8-3D のみで上昇していたのが 1118 遺伝子、ID8-KRAS-2D 対 ID8-KRAS-3D のみで上昇していたのが 638 遺伝子であった (図 7-C)。

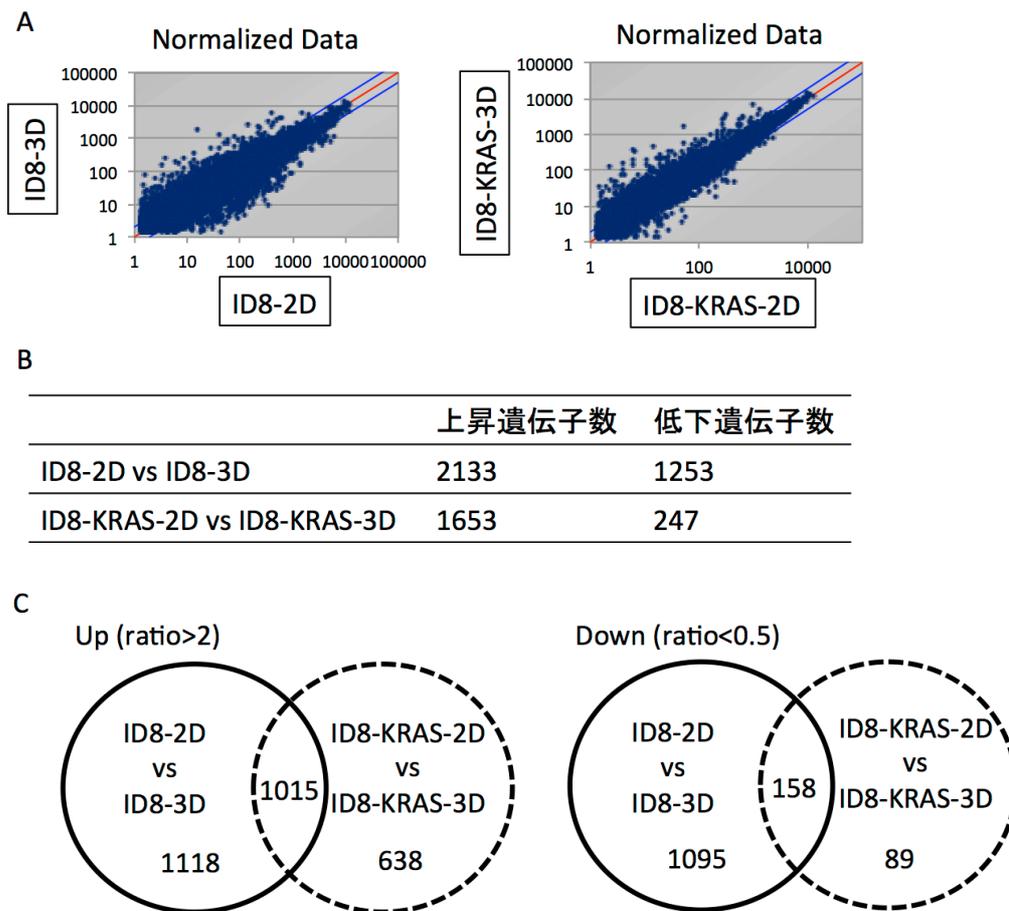


図7 ID8-2D 対 ID8-3D、ID8-KRAS-2D 対 ID8-KRAS-3D を比較した cDNA マイクロアレイ解析

ID8 と ID8-KRAS を、 $1 \times 10^6$  個播種し、2D 培養と 3D 培養でそれぞれ 48 時間培養した。それぞれのサンプルから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

A. ID8-2D 対 ID8-3D、ID8-KRAS-2D 対 ID8-KRAS-3D の遺伝子発現を比較し、プロットで表した。

B. マイクロアレイ解析で発現量に差のあった遺伝子の数を表にした。正規化されたシグナル値が 2 倍以上上昇した遺伝子と 2 倍以上低下した遺伝子を抽出した。

C. ID8-2D と ID8-3D、ID8-KRAS-2D と ID8-KRAS-3D で、共通して上昇（左）あるいは低下（右）を認めた発現遺伝子数をベン図で表した。

次に、*KRAS* 活性型変異導入によってもたらされると考えられる、3D 培養下の癌細胞増殖のメカニズムを明らかにするため、ID8-KRAS-2D 対 ID8-KRAS-3D の比較において ID8-KRAS-3D のみで上昇している遺伝子に着目した。正規化されたシグナル値が 100 以上の遺伝子の中で、ID8-KRAS-2D と比較して ID8-KRAS-3D で 3 倍以上の上昇を認めた遺伝子を有意に変動のある遺伝子として抽出した (表 2)。これらの中で、tescalcin (*Tesc*)、interferon-induced transmembrane protein 1 (*Ifitm1*)、small proline-rich protein 2A2 (*Spr2a2*)、growth-arrest-specific protein 6 (*Gas6*)、dual-specificity phosphatase 5 (*Dusp5*) が最も上昇していた分子であった。これらの遺伝子のうち、*Tesc*、*Ifitm1*、*Gas6*、*Dusp5* は、癌進展と関連があるという報告がある<sup>80-87</sup>。

**表 2 ID8-KRAS-3D のみで上昇していた発現遺伝子**

ID8-KRAS-2D と比較して、ID8-KRAS-3D で 3 倍以上上昇を認め、かつ正規化されたシグナル値が 100 以上の遺伝子上位 15 位までを表に示した。

| 遺伝子名                 | 正規化シグナル値 |        |             |             |
|----------------------|----------|--------|-------------|-------------|
|                      | ID8-2D   | ID8-3D | ID8-KRAS-2D | ID8-KRAS-3D |
| <i>Tesc</i>          | 286      | 282    | 347         | 1191        |
| <i>Ifitm1</i>        |          | 25     | 132         | 668         |
| <i>Sprr2a2</i>       | 18       | 14     | 73          | 550         |
| <i>Gas6</i>          |          | 62     | 28          | 340         |
| <i>Dusp5</i>         | 81       | 91     | 80          | 322         |
| <i>Sprr2b</i>        | 14       | 14     | 63          | 288         |
| <i>Txnip</i>         | 117      | 173    | 75          | 277         |
| <i>Tgfb1</i>         |          |        | 4           | 156         |
| <i>2610318N02Rik</i> | 70       | 31     | 38          | 136         |
| <i>Spink4</i>        |          | 25     | 2           | 131         |
| <i>Cma1</i>          | 3        | 2      | 13          | 126         |
| <i>Bcam</i>          | 52       | 93     | 39          | 124         |
| <i>Vldlr</i>         | 10       | 12     | 20          | 120         |
| <i>C1qtnf1</i>       | 30       | 50     | 25          | 116         |
| <i>Rgs3</i>          | 25       | 39     | 29          | 112         |

RT-qPCR を用いて、これら上位 5 つの遺伝子発現レベルが、*in vitro* で ID8-KRAS-3D において最も上昇していることを確かめた (図 8)。

これらの結果より、*KRAS* 活性型変異の導入に加えて、3D 培養を行って初めて、癌進展に関連する遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。

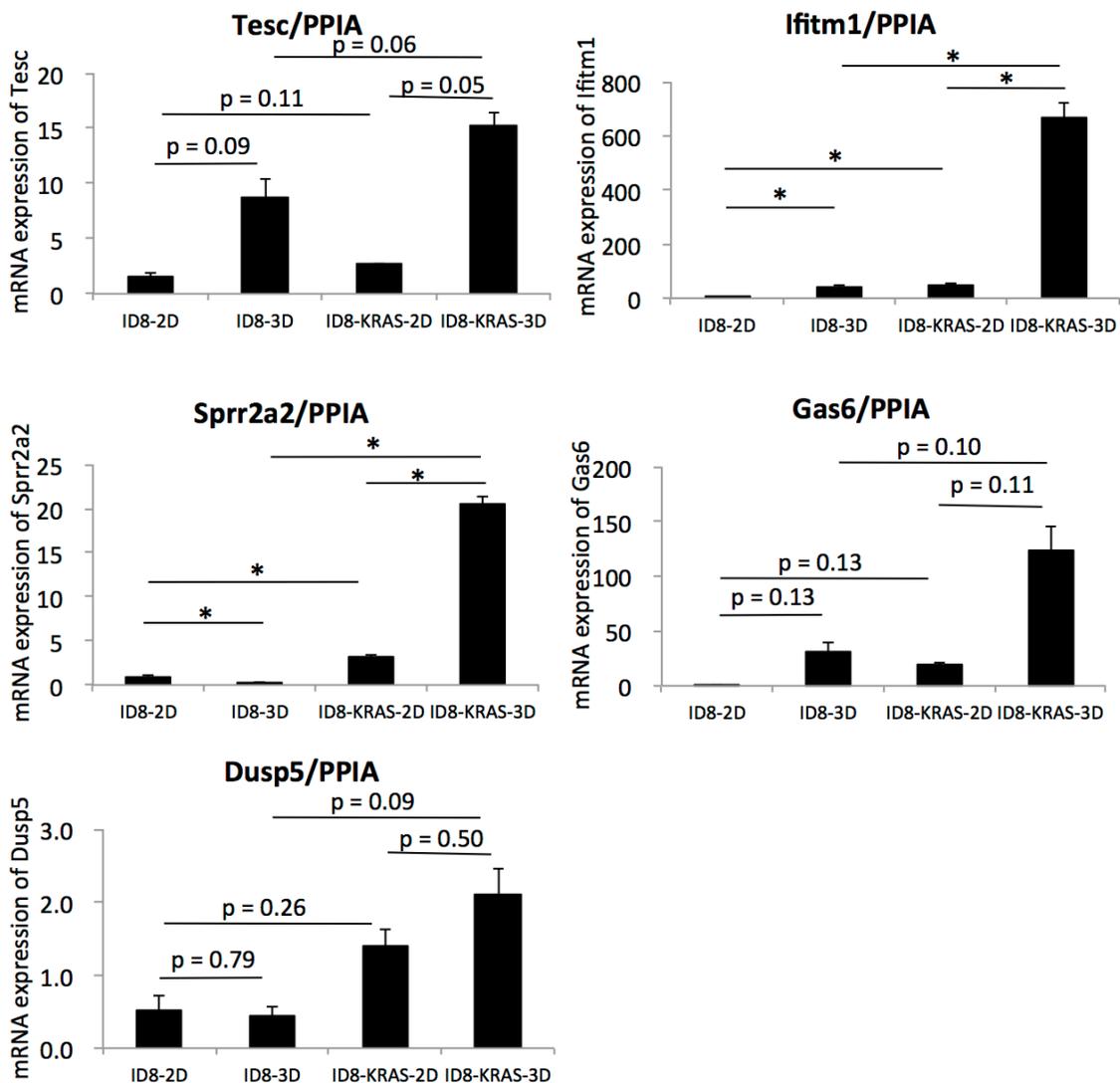


図 8 ID8-KRAS-3D で上昇を認めた遺伝子の発現評価

ID8-KRAS-3D で上昇を認めた遺伝子の発現を評価した。ID8-KRAS-3D のみで上昇していた遺伝子のうち、上位 5 つの遺伝子の mRNA レベルを RT-qPCR で評価した。それぞれの発現レベルは、PPIA を内因性の参照遺伝子として、比較 Ct 法で算出した。独立した試験を 3 回行い、その平均 ± 標準誤差で結果を示した。

(\*  $p < 0.05$ )

#### 4. MEK 経路の阻害によって、細胞浮遊状態における *KRAS* 活性型変異導

入株のスフェロイド形成が阻害され、細胞増殖能が抑制された

##### 4-1. 3D 培養下において、MEK 阻害薬は *KRAS* 活性型変異導入株のスフェ

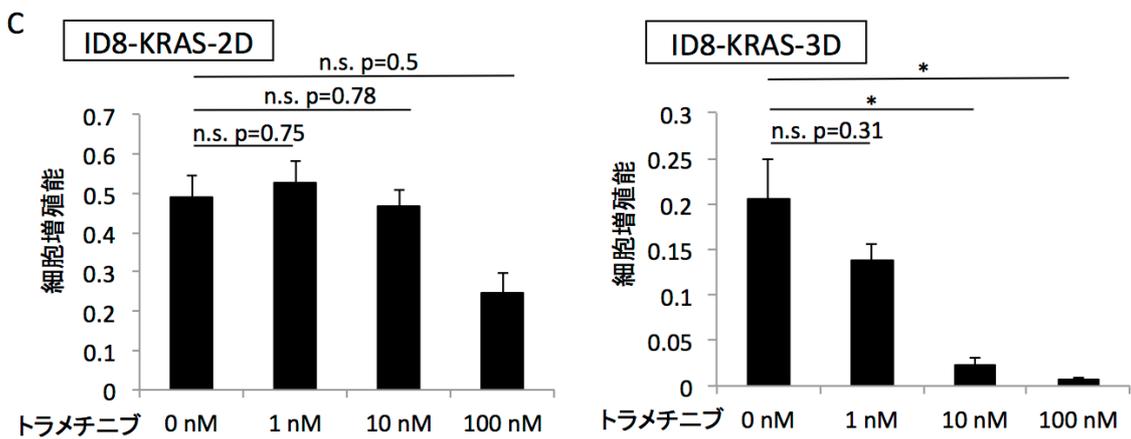
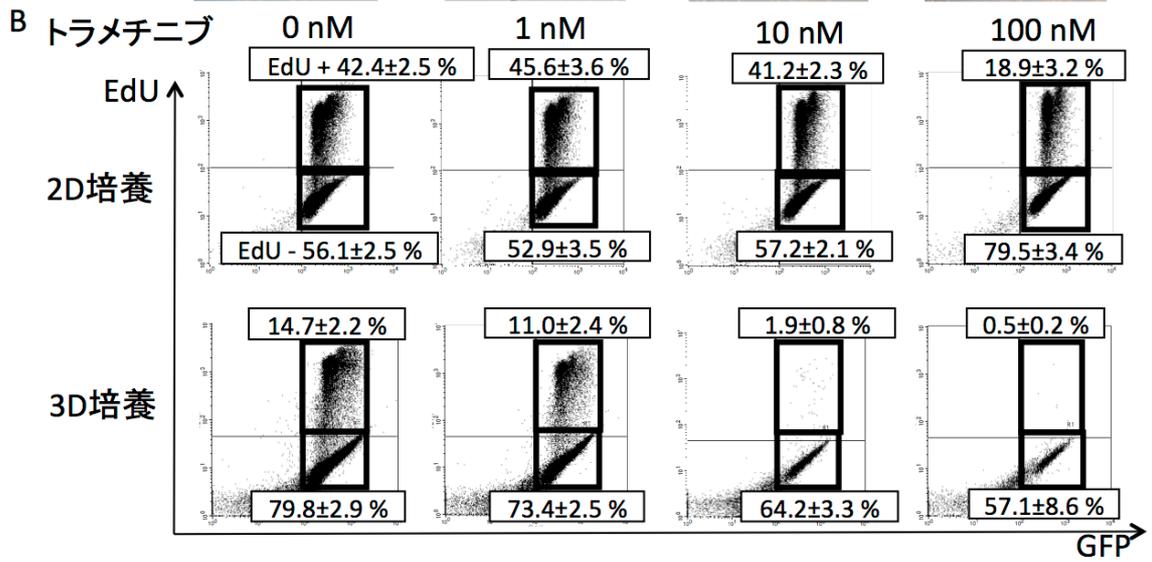
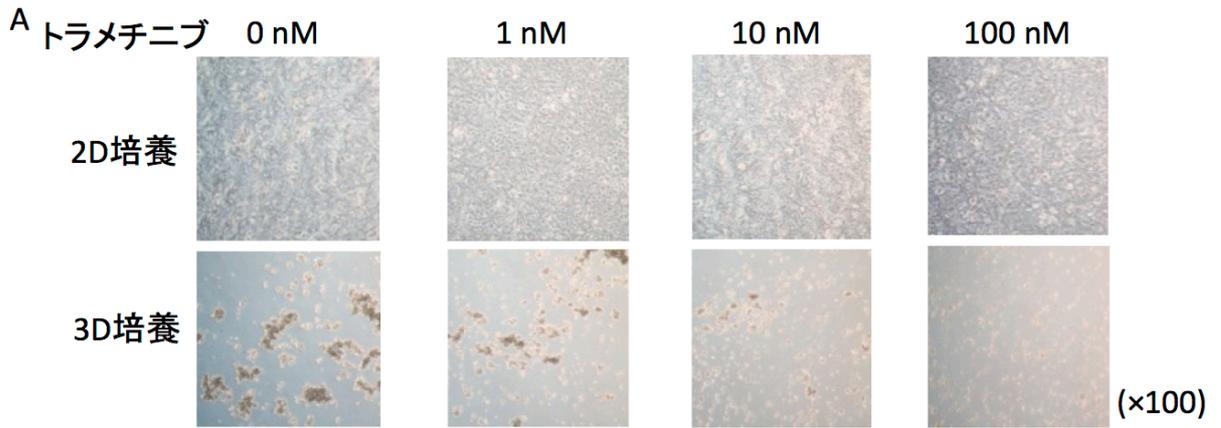
ロイド形成と細胞増殖能を抑制した

前述の遺伝子発現解析の結果より、ほかの細胞では発現上昇しておらず、ID8-*KRAS*-3Dのみで発現上昇している遺伝子が明らかになったが、その中でも、*Tesc*、*Iftim1*、*Gas6*は、RAS-RAF-MEK-ERK経路と関連することが知られている<sup>81,88-90</sup>。また、RAS-RAF-MEK-ERK経路は、*KRAS*活性型変異に伴う発癌様式において重要な経路であることもすでに知られている<sup>41,42</sup>。そのため本研究では、*KRAS*活性型変異が導入された3D状態つまり足場非依存性細胞の状態における、癌細胞増殖に対する治療ターゲットとしてRAS-RAF-MEK-ERK経路に注目した。

RAS-RAF-MEK-ERK経路の阻害薬の中でも、MEK阻害薬は、すでに卵巣癌を含むいくつかの癌において臨床試験で使用されている<sup>59,91</sup>。そして、MEK阻害薬の中で、トラメチニブは最初にFDAの承認を受けたMEK阻害薬であり、悪性黒色腫や非小細胞肺癌において*BRAF*変異を有する場合に、ダブラフェニブとの併用で用いられている<sup>92</sup>。そこで、今後、卵巣癌における臨床応用も考慮し、本研究でもトラメチニブを選択した。

まず、*in vitro*において、ID8-KRASにおけるトラメチニブ投与下での細胞増殖形態を評価した。その結果、2D培養下では細胞形態に変化を認めなかったが、3D培養下ではトラメチニブ高濃度の場合にスフェロイド形成が抑制されたことが鏡検下で確認された（図9-A）。また、細胞増殖能を定量的に評価した結果、2D培養ではトラメチニブはいずれの濃度でも細胞増殖能に影響を及ぼさなかったが、3D培養では、10 nMと100 nMで細胞増殖能が低下した（図9-B、9-C）。

このようにMEK阻害薬トラメチニブは、3D培養において、*KRAS*活性型変異導入株のスフェロイド形成と細胞増殖をともに抑制した。



### 図9 ID8-KRAS細胞におけるMEK阻害薬によるスフェロイド形成と細胞増殖能への影響

ID8-KRAS-GFPを $2 \times 10^5$  個播種し、トラメチニブを異なる濃度 (0、1、10、100 nM) で投与し、それぞれ2D培養と3D培養で48時間培養した。

A. 2D培養と3D培養において、48時間培養した癌細胞を鏡検した。(倍率100倍)

B-C. トラメチニブ投与後、48時間培養した細胞に、10  $\mu$ M EdU を添加し、さらに2時間培養した。EdUはAlexa Fluor 647で染色し、GFP陽性細胞におけるEdU陽性率をフローサイトメトリーで解析した。独立した試験を3回行い、代表的なデータをBに示した。また、EdU陰性細胞に対するEdU陽性細胞の割合を算出し、Cにグラフ化し示した。独立した試験を3回行い、その平均  $\pm$  標準誤差で結果を示した。 (\*  $p < 0.05$ )

#### 4-2. MEK 阻害薬は生体内においてもスフェロイド形成を抑制し、*KRAS* 活性化型変異に伴う癌形成を抑制した

最後に、ID8-*KRAS* の *in vivo* における MEK 阻害薬の効果を評価した。

ID8-*KRAS*-GFP をマウスの腹腔内へ投与すると同時に、トラメチニブ投与を開始した。1匹あたりのトラメチニブ投与量は、18  $\mu\text{g}$ /日とし、連日腹腔内投与（1日1回、週6日間）を行った。対照群へは同量の溶媒を腹腔内投与した。マウスを安楽死させる際に、腹水量とエンドポイント到達日数、スフェロイド形成像を評価した。

その結果、トラメチニブは腹水産生を著明に抑制した（対照群  $3.5 \pm 0.5$  ml 対トラメチニブ群 0 ml、 $p < 0.05$ ）（図 10-A）。また、エンドポイント到達日数の中央値は対照群で 18.5 日であったのに対し、トラメチニブ群はいずれも体重 23 g に達することなく、生存率を改善した（ $p < 0.001$ ）（図 10-B）。

マウス安楽死の際に、腹腔内のスフェロイド形成像を評価したところ、対照群と比較して、トラメチニブ治療群でスフェロイド形成の抑制が顕著であった（図 10-C）。なお、マウスの健康状態は治療前後で変化なく、トラメチニブ投与による有害事象は認められなかった。

これらの結果より、トラメチニブは、*KRAS* 活性型変異導入に伴う腹水産生を抑制し、生存率を改善したと言える。また、トラメチニブ投与により、*KRAS* 活性型変異導に伴う腹腔内スフェロイド形成も抑制し得た。

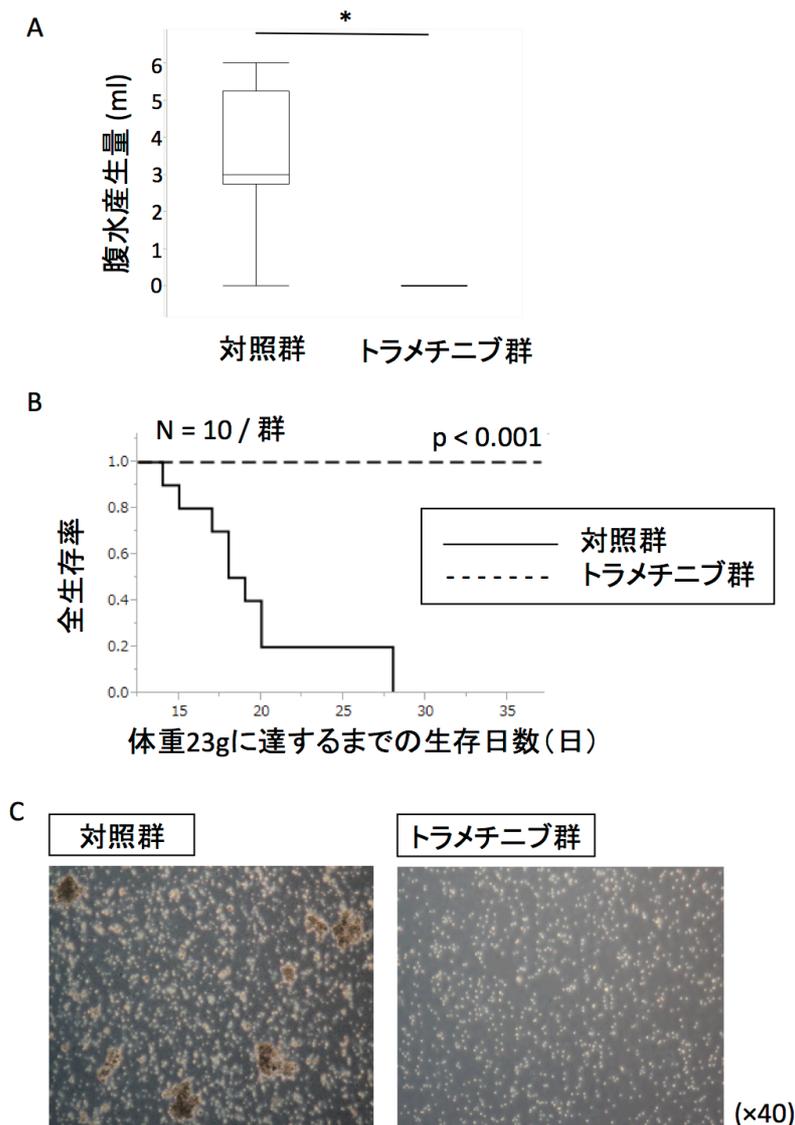


図 10 *In vivo* における、ID8-KRAS に対する MEK 阻害薬投与による癌形成と腹腔内スフェロイド形成への影響

$1 \times 10^6$  個 / 匹の ID8-KRAS-GFP をマウスの腹腔内へ投与し、MEK 阻害薬トラメチニブ投与群と対照群で比較した。マウスの体重が 23 g を越えた時点で安楽死させた。

A. 安楽死時にマウスの腹水を回収し、量を測定した。統計学的解析は t 検定を用いた。(\*  $p < 0.05$ )

B. マウスの生存率を、各群 10 匹ずつで評価し、 Kaplan-Meier 曲線を示した。両群の比較はログランク検定を用いた。

C. 安楽死時に、腹水あるいは腹腔内洗浄液を回収し、浮遊癌細胞を鏡検した。代表的な顕微鏡写真を示した。(倍率 40 倍)

## 考察

本研究では、マウス卵巣癌細胞株ID8と同株に*KRAS*活性型変異を導入した細胞株ID8-*KRAS*を用いて、*KRAS*活性型変異が卵巣癌における足場非依存性の細胞増殖に影響を及ぼすかどうかを評価し、また、RAS-RAF-MEK-ERK経路において*KRAS*の下流をターゲットとした卵巣癌の新たな治療戦略を検討した。

### 1. 卵巣癌腹膜播種の過程において、*KRAS* 活性型変異が癌細胞増殖に与える影響について

まず、マウス卵巣癌細胞株 ID8 と *KRAS* 活性型変異を導入した ID8-*KRAS* を、2D 培養と 3D 培養、2 つの培養法でそれぞれ培養し、その細胞形態と生存細胞数を評価した。この結果より、*KRAS* 活性型変異導入によって、2D 培養では 48 時間培養後の細胞形態や生存細胞数は変化しなかったが、3D 培養においては 48 時間培養後の細胞集塊、すなわちスフェロイドの増加と、生存細胞数増加を認めた (図 1)。次に、各培養法における細胞増殖能を評価した結果、2D 培養では *KRAS* 活性型変異導入による変化はみられなかったが、3D 培養では *KRAS* 活性型変異導入によって細胞増殖能が亢進した (図 2)。また、3D 培養下では *KRAS* 活性型変異導入によって生存細胞数が増加したことから、ID8-*KRAS* よりも ID8

でアポトーシスが亢進していると仮定し、各培養法におけるアポトーシス率を評価したが、結果、2D 培養でも 3D 培養でも差を認めなかった (図 3)。

これらの結果をまとめると、マウス卵巣癌細胞株 ID8 は、*KRAS* 活性型変異が導入されても、接着細胞の培養では細胞増殖に変化を生じないが、浮遊細胞の培養では、*KRAS* 活性型変異導入に伴い、生存細胞数の増加と細胞増殖能の亢進を認めた。つまり、足場非依存の状態において、*KRAS* 活性型変異が導入されると、癌細胞増殖が亢進することが示唆され、この結果は、序論で紹介した既報の結果とも一致する<sup>49,50</sup>。

そこで次に、ID8 と ID8-*KRAS* をそれぞれマウス腹腔内へ投与して、マウスの腹腔内における足場非依存性癌細胞増殖を評価した。癌細胞を投与して 48 時間後の、マウス腹腔内の全細胞における癌細胞の割合は、ID8 と ID8-*KRAS* で有意な差は認められなかったが、ID8-*KRAS* で多い傾向にあった (図 4-B)。さらに、癌細胞の細胞増殖能を評価した結果、ID8-*KRAS* で ID8 よりも有意に細胞増殖能が亢進していた (図 4-C)。また、*in vitro* と同様、アポトーシスの評価も行ったが、腹腔内における癌細胞のアポトーシス率は ID8 と ID8-*KRAS* で差は認められなかった (図 5)。これらの結果から、生体の腹腔内において、*KRAS* 活性型変異導入により、癌細胞の細胞増殖能が亢進することが示唆された。

Yoshida らの研究結果においても、*KRAS* 活性型変異導入により腹膜播種形成が促進されることを示しているが、ID8 を投与したマウスと ID8-*KRAS* を投与したマウスからそれぞれ腹膜播種組織を採取し、Ki67 染色を行って播種巣の細胞増殖能を比較した結果では、両者の間で染色率に差を認められていない<sup>48</sup>。本研究の結果とあわせて考えると、腹膜に播種した癌細胞はすでに足場依存性に細胞増殖していると考えられ、*in vitro* における 2D 培養と同じ状態であると仮定できる。一方、本研究で評価した、マウス腹腔内洗浄液中の癌細胞は、足場非依存の状態にあり、腹膜へ播種する途中の過程にあると考えられる。これは *in vitro* における 3D 培養と同じ状態と考えると、*KRAS* 活性型変異に伴う腹膜播種形成促進の要因として、*KRAS* 活性型変異の導入により足場非依存性の癌細胞増殖が亢進したためと推察される。

また、ID8-*KRAS* は 3D 培養下でスフェロイドを多く形成したが、ID8 は 3D 培養下でもスフェロイド形成が ID8-*KRAS* より乏しかった (図 1-A)。本研究では、スフェロイド形成能の定量的な評価は行っていないが、スフェロイド形成の鏡検結果から、*KRAS* 活性型変異の導入によってスフェロイドの形成そのものが促進された可能性が示唆された。このスフェロイド形成の促進が、*KRAS* 活性型変異導入に伴う足場非依存性の癌細胞増殖能亢進に寄与している可能性が示

唆された。

## 2. 足場非依存性の状態において *KRAS* 活性型変異導入に伴い癌細胞増殖能が亢進する要因について

*KRAS* 活性型変異の導入により足場非依存性の癌細胞増殖が亢進する要因を明らかにするため、2D 培養・3D 培養における ID8 と ID8-*KRAS* の DNA マイクロアレイ解析を行った。2D 培養同士と 3D 培養同士を比較すると、3D 培養同士を比較した場合の方が、発現遺伝子の変化が大きいことが明らかになり (図 6)、癌細胞が足場非依存性に増殖する際に遺伝子発現の変化が生じると考えられた。また、足場非依存性増殖において、*KRAS* 活性型変異の導入によるその他の遺伝子発現の変化を同定するため、ID8-3D と ID8-*KRAS*-3D の発現遺伝子を比較したところ、パスウェイ解析の結果より、細胞増殖や細胞周期関連の遺伝子群が ID8-*KRAS*-3D で上昇していることが明らかになった (表 1)。このことより、足場非依存性増殖において、*KRAS* 活性型変異が導入されると細胞増殖が亢進することが、発現上昇した遺伝子からも明らかになり、細胞増殖能評価の結果と一致する結果が得られた。

次に、2D 培養対 3D 培養の発現遺伝子を比較した結果、ID8-*KRAS*-2D と比較

して ID8-KRAS-3D のみで上昇を認めた遺伝子が明らかになった (図 7、表 2)。

それらの遺伝子の中で、*Tesc*、*Ifitm1*、*Gas6*、*Dusp5* は、癌進展と関連があるという報告がある<sup>80-87</sup>。*Tesc* は、別名 calcineurin-homologous protein 3 (CHP3) と言われ、細胞分化と増殖のレギュレーターとして知られる。マウスの心臓・脳・胃や、ヒトの血球・造血細胞に高発現するが、脳奇形やいくつかの癌で高発現することが知られている<sup>83,84</sup>。ERK 経路の下流に位置し、細胞分化を調節する転写因子、Ets ファミリーの発現に関与する<sup>88</sup>。*Ifitm1* は、IFITM ファミリーの 1 つで、インターフェロンにより発現が誘導される。IFITM タンパクは、生殖胚細胞の成熟・分化や、免疫反応シグナリングに関わる。頭頸部癌・口腔癌 (扁平上皮癌) の早期浸潤との関連や、胃・食道癌での過剰発現が報告されており<sup>93</sup>、*Ifitm1* の発現は ERK 経路の活性化によって誘導されるという報告がある<sup>94</sup>。

*Gas6* は、ビタミン K 依存性タンパクで、多様な生物活性を有する<sup>80</sup>。*Gas6* は ERK キナーゼを活性化し、さまざまな癌での高発現が認められている<sup>95</sup>。*Gas6* 受容体の *Axl* が卵巣癌で高発現することが知られており、肝細胞癌でも腫瘍浸潤を促進すると報告されている<sup>80-82,96</sup>。*Dusp5* は、腫瘍抑制に働くことが知られているホスファターゼである<sup>85-87,89,90</sup>。

この中で、*Tesc*、*Ifitm1*、*Gas6* は、ERK 経路の活性化に関わる遺伝子であるこ

とから、*KRAS* 活性型変異が足場非依存性の細胞増殖を亢進させる要因のひとつとして、ERK 経路の活性化に関わる可能性が示唆された。

RAS の活性化により足場非依存性の細胞増殖が亢進するという現象に関してはすでに多数の研究報告があるが、どの経路を介しているかという詳細なメカニズムについてはいまだ明らかになってはいない<sup>49,50,97-99</sup>。本研究の結果より、*KRAS* 活性型変異の導入、つまり RAS 活性化に伴う足場非依存性細胞増殖の亢進には、ERK 経路の活性化が関与している可能性が考えられた。ERK の上流には RAF-MEK があることから、RAS 活性化により、この RAF-MEK-ERK 経路が活性化し、足場非依存性細胞増殖に寄与している可能性が示唆された。

### 3. MEK 阻害による、足場非依存性の細胞増殖とスフェロイド形成の抑制効果について

最後に、RAF-MEK-ERK 経路の阻害によって、*KRAS* 活性型変異がもたらす足場非依存性の細胞増殖が、抑制されるかどうかを評価した。

MEK 阻害薬トラメチニブは、抗悪性腫瘍薬として臨床使用されており、さまざまな癌種で効果を評価されている<sup>53-59</sup>。しかし、卵巣癌腹膜播種におけるその効果はまだ明らかではない。本研究結果において、ID8-*KRAS* が RAF-MEK-ERK

経路を介して足場非依存性細胞増殖を促進していると考えられたため、MEK 阻害薬によるその抑制効果とスフェロイド形成に影響を与えるかどうかを評価した。その結果、スフェロイドの定量的なカウントは行っていないが、形態的評価では、MEK 阻害薬トラメチニブが、高濃度で 3D 培養下での ID8-KRAS のスフェロイド形成を抑制することが明らかになった (図 9-A)。また、濃度依存性に 3D 培養下の ID8-KRAS の細胞増殖も抑制した (図 9-B、C)。ただし、トラメチニブの IC50 は 0.92 ~ 3.4 nM であり、本実験で細胞増殖抑制およびスフェロイド形成抑制の効果がみられたのは、10 nM 以上であった。2D 培養・3D 培養いずれにおいても、100 nM 投与下で細胞死は認められていないが、効果が得られるのに十分な濃度であったと考えられるため、1 ~ 10 nM の間の段階で細胞増殖抑制効果が出現するかについてはさらに検討する余地がある。

また、本実験では、MEK 阻害薬投与によって、RAS 下流蛋白の発現が低下したことは確認できておらず、本研究で得られた結果が RAF-MEK-ERK 経路を阻害した結果であると断定はできないため、その点においても今後検討の余地がある。

トラメチニブの生体への投与実験の結果からは、トラメチニブ投与群で対照群と比較して有意に腹水産生の抑制と生存率の改善が認められた (図 10-A、B)。

ただし、実際に臨床でヒトへ使用されているトラメチニブの投与量は 2 mg / 日であり、成人体重が約 60 kg の場合、0.033 mg / kg の投与濃度となる<sup>53-58</sup>。本研究でマウスへ投与した量は 18 µg / 日であり、これは 1 mg / kg の投与濃度であるため、ヒトへの投与量の約 30 倍の濃度で投与したことになる。本研究では先行研究に倣って上記の投与量に設定し<sup>79</sup>、実験結果からはトラメチニブ投与群のマウスに有害事象は認められなかったが、さらに少ない投与量でも効果が認められる可能性があり、投与量に関しては検討の余地がある。

また、トラメチニブは、RAS-RAF-MEK-ERK 経路における MEK1 および MEK2 活性を特異的に阻害し、BRAF や CRAF、ERK1/2 は阻害しないとされている<sup>51</sup>。

しかし、細胞内では特定の経路を阻害した場合に、他の経路が活性化される反応が知られており、その結果によりさまざまな経路の活性化がもたらされることがある<sup>100-102</sup>。そのひとつとして、ERK シグナルの阻害により PI3K/AKT 経路の活性化が誘導されることが知られており<sup>103</sup>、本研究の結果も、一概に ERK 経路の阻害のみにより生じた結果ではなく、慎重に捉える必要があるが、有害事象のない範囲で癌細胞の足場非依存性増殖抑制効果が認められた。また、スフェロイドの形成も *in vitro* 同様、定量的ではないが確認され (図 10-C)、スフェロイドの形成抑制が、腹水産生抑制と生存率改善に寄与した可能性がある。

これらの結果より、MEK 阻害により ID8-KRAS の足場非依存性細胞増殖が抑制され、また、腹腔内のスフェロイドの形成も抑制される可能性が示唆された。

そのため、MEK 阻害は *KRAS* 活性型変異を有する卵巣癌腹膜播種に対する治療のひとつとして有用である可能性が考えられた。

また、近年、スフェロイド形成の阻害を標的とした治療も新たな癌治療として注目されており<sup>25</sup>、本研究の結果より、MEK 阻害薬投与によってスフェロイド形成が抑制され、腹水産生抑制と生存率の向上に關与している可能性があることから、スフェロイド形成を抑制すること自体が、卵巣癌腹膜播種の進行抑制に寄与する可能性がある。

## 結論

本研究は、ヒトの腹腔内環境を模倣した*in vitro*の3D培養を用いた卵巣癌の研究に新しい知見を加えた。また、*KRAS*活性型変異によって、足場非依存性の癌細胞増殖が亢進し、卵巣癌の腹膜播種形成を促進する可能性が示唆された。足場非依存性の癌細胞増殖をもたらす一因として、*MEK*経路活性が関与することが明らかになった。そのため、*MEK*阻害薬は*KRAS*活性型変異を有する卵巣癌腹膜播種に対する治療のひとつとして有用である可能性がある。さらに、*KRAS*活性型変異に伴う足場非依存性の癌細胞増殖には、スフェロイド形成の亢進も関与している可能性があり、スフェロイド形成を抑制することも癌細胞腹膜播種に対する治療標的として考慮される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案、実験手技、論文執筆に至るまでご指導頂きました現日本大学産婦人科学教室主任教授(前東京大学医学部産婦人科学教室准教授)の川名敬先生に深く感謝の意を表します。また東京大学医学部産婦人科の田口歩先生にも、日々きめ細やかなにご指導頂きましたことに心より感謝いたします。

東京大学医学部産婦人科教授の藤井知行先生、大須賀穰先生には当教室の教授として、研究のご支援、ご指導を賜りました。また、東京大学医学部産婦人科の冨尾賢介先生、足立克之先生、永松健先生、織田克利先生には、研究カンファランスや教室研究会などで研究に対する助言など、様々な角度からご支援いただきました。

当研究室で共に研究して参りました中村寛江先生、藤本麻葉先生、吉田光代先生、西島明先生、川田淑子先生、佐藤雅和先生、河田啓先生には、カンファランスや実験において様々なアドバイスやご協力を頂きました。

また、国立がん研究センター研究所の清野透先生、吉松有紀先生には、ID8細胞へのKRAS変異導入とGFPの導入につき、ご支援、ご指導を賜りました。改めて感謝の意を表します。

## 参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 0, 1-31 (2018).
2. Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 95, S161-192 (2006).
3. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 365, 2473-2483 (2011).
4. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RHJ, Sonke GS, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer : a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 16, 87–97 (2015).
5. Cho KR, Shih IeM. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol.* 4, 287-313 (2009).
6. Kurman RJ and Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am.J.Surg.Pathol.* 34, 433-443 (2010).
7. Yoshimoto M, Tokuda A, Yaginuma Y. The origin and carcinogenesis of ovarian

carcinoma. 熊本大学医学部保健学科紀要第14号, 22-32 (2018).

8. Cobb LP, Gaillard S, Wang Y, Shih IeM, Secord AA. Adenocarcinoma of Mullerian origin: review of pathogenesis, molecular biology, and emerging treatment paradigms.

Gynecol Oncol Res Pract. 2, 1 (2015).

9. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. Am J Pathol. 164, 1511-1518 (2004).

10. Jones S, Wang TL, Shih IeM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma.

Science 330, 228-231 (2010).

11. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. N Engl J Med. 363,

1532-1543 (2010).

12. Khabele, D. KRAS in Ovarian Cancer. My Cancer Genome

<https://www.mycancergenome.org/content/disease/ovarian-cancer/kras/> (2015).

13. Jones S, Wang TL, Kurman RJ, Nakayama K, Velculescu VE, Vogelstein B, et al.

Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. J Pathol.

226, 413-420 (2012).

14. Tsang YT, Deavers MT, Sun CC, Kwan SY, Kuo E, Malpica A, et al. KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumour are associated with recurrent low-grade serous carcinoma. *J Pathol.* 231, 449-456 (2013).
15. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol.* 221, 49-56 (2010).
16. Brachova P, Muetting SR, Carlson MJ, Goodheart MJ, Button AM, Mott SL, et al. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum- and taxane-based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma. *Int J Oncol.* 46, 607–618 (2015).
17. Wong KK, Izaguirre DI, Kwan SY, King ER, Deavers MT, Sood AK, et al. Poor survival with wild-type TP53 ovarian cancer? *Gynecol Oncol.* 3, 565-569 (2013).
18. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609-615 (2011).
19. Gupta G and Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679–695 (2006).
20. Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian

cancer. *Lancet Oncol.* 7, 925–934 (2006).

21. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 177, 1053–1064 (2010).

22. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 17, 548–558 (2006).

23. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and IG-cams in cancer. *Nat Rev.* 4, 118–132 (2004).

24. He Y, Wu AC, Harrington BS, Davies CM, Wallace SJ, Adams MN, et al. Elevated CDCP1 predicts poor patient outcome and mediates ovarian clear cell carcinoma by promoting tumor spheroid formation, cell migration and chemoresistance. *Oncogene* 35, 468–478 (2016).

25. Condello S, Morgan CA, Nagdas S, Cao L, Turek J, Hurley TD, et al.

$\beta$ -Catenin-regulated ALDH1A1 is a target in ovarian cancer spheroids. *Oncogene* 34, 2297–2308 (2015).

26. Yin M, Li X, Tan S, Zhou HJ, Ji W, Bellone S, et al. Tumor-associated

macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 126, 4157–4173 (2016).

27. Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, et al.

Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix

metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma

cells. *Cancer Res.* 67, 2030–2039 (2007).

28. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny HA, Salgia R, et al. C-Met

overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for

inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res.* 67, 1670–1680 (2007).

29. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—A

growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol.* 15,

405-412 (2005).

30. Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional

matrices. *Curr Opin Cell Biol.* 14, 633-639 (2002).

31. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev*

*Mol Cell Biol.* 7, 211-224 (2006).

32. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue

architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.*

22, 287-309 (2006).

33. Kusamori K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. Development of multicellular spheroid for cell-based therapy. *Drug Delivery System* 28, 45-53 (2013).
34. Lin RZ and Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 3, 1172-1184 (2008).
35. Berking C and Herlyn M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol Histopathol.* 16, 669–674 (2001).
36. Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 69-70, 42-51 (2014).
37. White EA, Kenny HA, Lengyel E. Three-dimensional modeling of ovarian cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 0, 184-192 (2014).
38. Burlison KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Skubitz AP. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol.* 93, 170–181 (2004).
39. Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML, Ahmed N. Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *J Carcinog.* 6, 11 (2007).

40. Yamada KM and Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 130, 601-610 (2007).
41. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.*72, 2457-2467 (2012).
42. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell* 170, 17-33 (2017).
43. Ali A, Li X. Oncogenic molecular pathways: mechanisms, mutations and inhibitors. *Ann Hematol Oncol*. 3, 1108 (2016).
44. Johnson GL, Stuhlmiller TJ, Angus SP, Zawistowski JS, Graves LM. Molecular pathways: adaptive kinome reprogramming in response to targeted inhibition of the BRAF-MEK-ERK pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 20, 2516-2522 (2014).
45. Mullany LK, Richards JS. Minireview: animal models and mechanisms of ovarian cancer development. *Endocrinology*. 153, 1585–1592 (2012).
46. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of *KRAS* mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 205, 858-862 (2009).

47. Birgisson H, Edlund K, Wallin U, Pahlman L, Kultima HG, Mayrhofer M, et al. Microsatellite instability and mutations in BRAF and KRAS are significant predictors of disseminated disease in colon cancer. *BMC Cancer* 15, 125 (2015).
48. Yoshida M, Taguchi A, Kawana K, Adachi K, Kawata A, Ogishima J, et al. Modification of the tumor microenvironment in KRAS or c-MYC-induced ovarian cancer-associated peritonitis. *PLoS One* 11, e0160330 (2016).
49. Sunaga N, Shames DS, Girard L, Peyton M, Larsen JE, Imai H, et al. Knockdown of oncogenic KRAS in non-small cell lung cancers suppresses tumor growth and sensitizes tumor cells to targeted therapy. *Mol Cancer Ther.* 10, 336–346 (2011).
50. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 8788–8793 (2010).
51. Yamaguchi T, Kakefuda R, Tajima N, Sowa Y, Sakai T. Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 39, 23-31 (2011).
52. Ishii N. Progress of research and development of MAPK pathway inhibitors.

Folia Pharmacol. Jpn. 141, 15-21 (2013).

53. Lugowska I, Kosela-Paterczyk H, Kozak K, Rutkowski P. Trametinib: a MEK inhibitor for management of metastatic melanoma. *Onco Targets Ther.* 8, 2251-2259 (2015).

54. Saini S, Tulla K, Maker AV, Burman KD, Prabhakar BS. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective. *Mol Cancer.* 17, 154 (2018).

55. Weart TC, Miller KD, Simone CB 2nd. Spotlight on dabrafenib/trametinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: place in therapy. *Cancer Manag Res.* 10, 647-652 (2018).

56. Kondyli M, Larouche V, Saint-Martin C, Ellezam B, Pouliot L, Sinnott D, et al. Trametinib for progressive pediatric low-grade gliomas. *J Neurooncol.* 1–10 (2018).

57. Dhillon S. Dabrafenib plus Trametinib: a Review in Advanced Melanoma with a *BRAF V600* Mutation. *Target Oncol.* 11, 417-428 (2016).

58. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 377, 1813-1823 (2017).

59. Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V, Lankes HA, Coleman R, Morgan MA, et al.

Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 14, 134–40 (2013).

60. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, et al.

Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer.

*Carcinogenesis* 21, 585–591 (2000).

61. Bak SP, Walters JJ, Takeya M, Conejo-Garcia JR, Berwin BL. Scavenger

receptor-A–targeted leukocyte depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression.

*Cancer Res.* 67, 4783-4789 (2007).

62. Duraiswamy J, Freeman GJ, Coukos G. Therapeutic PD-1 pathway blockade

augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune

decline in ovarian cancer. *Cancer Res.* 73, 6900-6912 (2013).

63. Bak SP, Alonso A, Turk MJ, Berwin B. Murine ovarian cancer vascular leukocytes

require arginase-1 activity for T cell suppression. *Mol Immunol.* 46, 258-268 (2008).

64. Ward KK, Tancioni I, Lawson C, Miller NL, Jean C, Chen XL, et al. Inhibition of

focal adhesion kinase (FAK) activity prevents anchorage-independent ovarian

carcinoma cell growth and tumor progression. *Clin Exp Metastasis.* 30, 579-594 (2013).

65. Gil M, Komorowski MP, Seshadri M, Rokita H, McGray AJ, Opyrchal M, et al.

CXCL12/CXCR4 blockade by oncolytic virotherapy inhibits ovarian cancer growth by decreasing immunosuppression and targeting cancer-initiating cells. *J Immunol.* 193, 5327-5337 (2014).

66. Zhang Y, Nowicka A, Solley TN, Wei C, Parikh A, Court L, et al. Stromal cells derived from visceral and obese adipose tissue promote growth of ovarian cancers. *PLoS One* 10, e0136361 (2015).

67. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, et al. Epigenetic silencing of Th1 type chemokines shapes tumor immunity and immunotherapy. *Nature* 527, 249-253 (2015).

68. Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Heintz PA, Hermans J, Fleuren GJ. Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer* 59, 317-323 (1987).

69. Braly PS. The current status of flow cytometry in gynecologic oncology. *Oncology (Williston Park)*. 6, 23-28 discussion 31-3 (1992).

70. Cho S, Sun Y, Soisson AP, Dodson MK, Peterson CM, Jarboe EA, et al. Characterization and evaluation of pre-clinical suitability of a syngeneic orthotopic mouse ovarian cancer model. *Anticancer Res.* 33, 1317-1324 (2013).

71. Khabele, D. KRAS c.35G>T (G12V) Mutation in ovarian cancer. My Cancer Genome <https://www.mycancergenome.org/content/disease/ovarian-cancer/kras/37/> (2017).
72. Sato M, Kawana K, Adachi K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, et al. Spheroid cancer stem cells display reprogrammed metabolism and obtain energy by actively running the tricarboxylic acid (TCA) cycle. *Oncotarget* 7, 33297–33305 (2016).
73. Carlier G, Maugein A, Cordier C, Pechberty S, Garfa-Traoré M, Martin P, et al. Human fucci pancreatic beta cell lines: new tools to study Beta cell cycle and terminal differentiation. *PLoS One* 9, e108202 (2014).
74. Nakamura M, Shibata K, Hatano S, Sato T, Ohkawa Y, Yamada H, et al. A genome-wide analysis identifies a notch-RBP-J $\kappa$ -IL-7R $\alpha$  axis that controls IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cell homeostasis in mice. *J Immunol.* 194, 243–251 (2015).
75. Stack G, Jones E, Marsden M, Stacey MA, Snelgrove RJ, Lacaze P, et al. CD200 receptor restriction of myeloid cell responses antagonizes antiviral immunity and facilitates cytomegalovirus persistence within mucosal tissue. *PLoS Pathog.* 11, 1–20 (2015).
76. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, et

- al. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 37, W317-322 (2009).
77. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 8, R3 (2007).
78. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: A non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, 478–483 (2012).
79. Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, Jansen PW, Wilkinson AW, Liu S, et al. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature* 510, 283–287 (2014).
80. Laurance S, Lemarié CA, Blostein MD. Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Adv Nutr.* 3, 196–203 (2012).
81. Huang RY, Antony J, Tan TZ, Tan DS. Targeting the AXL signaling pathway in ovarian cancer. *Mol Cell Oncol.* 4, e1263716 (2016).
82. Paccetz JD, Vogelsang M, Parker MI, Zerbini LF. The receptor tyrosine kinase Axl in cancer: Biological functions and therapeutic implications. *Int J Cancer* 134, 1024–

1033 (2014).

83. Kang YH, Han SR, Kim JT, Lee SJ, Yeom YI, Min JK, et al. The EF-hand calcium-binding protein tescalcin is a potential oncotarget in colorectal cancer.

*Oncotarget* 5, 2149–2160 (2014).

84. Lee JH, Choi SI, Kim RK, Cho EW, Kim IG. Tescalcin/c-Src/IGF1R $\beta$ -mediated STAT3 activation enhances cancer stemness and radioresistant properties through ALDH1. *Sci Rep.* 8, 10711 (2018).

85. Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* 22, 5586–5591 (2003).

86. Shin SH, Park SY, Kang GH. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 in gastric cancer by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol.* 182, 1275–1285 (2013).

87. Yan X, Liu L, Li H, Huang L, Yin M, Pan C, et al. Dual specificity phosphatase 5 is a novel prognostic indicator for patients with advanced colorectal cancer. *Am J Cancer Res.* 6, 2323–2333 (2016).

88. Levay K, Slepak VZ. Tescalcin is an essential factor in megakaryocytic differentiation associated with Ets family gene expression. *J Clin Invest.* 117, 2672–

2683 (2007).

89. Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA, Keyse SM. Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cell Signal* 21, 1794–1805 (2009).

90. Buffet C, Catelli MG, Hecale-Perlemoine K, Bricaire L, Garcia C, Gallet-Dierick A, et al. Dual specificity phosphatase 5, a specific negative regulator of ERK signaling, is induced by serum response factor and Elk-1 transcription factor. *PLoS One* 10, e0145484 (2015).

91. Zhao Y, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 11, 385–400 (2014).

92. Wright CJ, McCormack PL. Trametinib: first global approval. *Drugs.* 73, 1245-1254 (2013).

93. Hatano H, Kudo Y, Ogawa I, Tsunematsu T, Kikuchi A, Abiko Y, et al. IFN-induced transmembrane protein 1 promotes invasion at early stage of head and neck cancer progression. *Clin Cancer Res.* 14, 6097-6105 (2008).

94. Kim JY, Kim H, Suk K, Lee WH. Activation of CD147 with cyclophilin a induces the expression of IFITM1 through ERK and PI3K in THP-1 cells. *Mediators Inflamm.* 2010, 821940 (2010).
95. Wu G, Ma Z, Cheng Y, Hu W, Deng C, Jiang S, et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 17, 20 (2018).
96. Lee HJ, Jeng YM, Chen YL, Chung L, Yuan RH. Gas6/Axl pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of Slug in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 35, 769-775 (2014).
97. Kang JS, Krauss RS. Ras induces anchorage-independent growth by subverting multiple adhesion-regulated cell cycle events. *Mol Cell Biol.* 16, 3370-3380 (1996).
98. Thullberg M, Gad A, Le Guyader S, Stromblad S. Oncogenic H-Ras V12 promotes anchorage-independent cytokinesis in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 20338-20343 (2007).
99. Fujita-Sato S, Galeas J, Truitt M, Pitt C, Urisman A, Bandyopadhyay S, et al. Enhanced MET translation and signaling sustains K-Ras driven proliferation under anchorage-independent growth conditions. *Cancer Res.* 75, 2851-2862 (2015).
100. Lehr S, Kotzka J, Avci H, Sickmann A, Meyer HE, Herkner A, et al. Identification

of major ERK-related phosphorylation sites in Gab1. *Biochemistry*. 43, 12133-12140 (2004).

101. Ebi H, Corcoran RB, Singh A, Chen Z, Song Y, Lifshits E, et al. Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human *KRAS* mutant colorectal cancers. *J Clin Invest*. 121, 4311-4321 (2011).

102. Li X, Huang Y, Jiang J, Frank SJ. ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cell Signal*. 20, 2145-2155 (2008).

103. Turke AB, Song Y, Costa C, Cook R, Arteaga CL, Asara JM, et al. MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Res*. 72, 3228-3237 (2012).