

# 博士論文

Collagen type I が誘導する  
分子標的薬耐性機構の解明

山崎 翔太

# Collagen type I が誘導する 分子標的薬耐性機構の解明

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

2020 年度 博士論文

47177309 山崎翔太

指導教官 石井源一郎

## 目次

I. 要旨.....	P.5
II. 略語表.....	P.9
III. 背景.....	P.13
(1) がん細胞における間質細胞と細胞外マトリクス	
(2) がん組織における細胞外マトリクスの役割	
(3) 肺がんの組織型および肺がんにおける代表的な遺伝子変異	
IV. 本研究の目的.....	P.16
V. 実験材料および実験方法.....	P.17
VI. Collagen type I によるがん細胞の分子標的薬耐性の惹起	
(i) 序論.....	P.28
(ii) 目的.....	P.30
(iii) 結果.....	P.31

(1) Collagen type I による PC-9 および HCC827 細胞における EGFR-TKI 耐性	
(2) Collagen type I によるがん細胞の表現型変化の検討	
(3) Collagen type I によるがん細胞の EGFR 下流シグナル変化の検討	
(4) Collagen type I によるがん細胞の側副シグナル変化の検討	
(5) Collagen type I によるがん細胞の Akt 下流シグナル変化の検討	
(6) mTOR 抑制による Collagen+ 群の細胞形態変化および EGFR-TKI 耐性の解除	
(7) 臨床検体を用いた Collagen type I の堆積と EGFR-TKI における奏功性の相関	
(iv) 考察.....	P.38
(v) 結論.....	P.43

## VII. Collagen type I による mTORC1 活性化機構の解明

(i) 序論.....	P.44
(ii) 目的.....	P.46
(iii) 結果.....	P.47

(1) Collagen type I による PC-9 細胞の mTORC1 局在変化	
(2) PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み確認	
(3) Collagen type I による PC-9 細胞の代謝変化における検討	
(4) Collagen type I を構成する主要なアミノ酸による PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性と mTORC1 活性化における検討	

(5) PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み機構における検討	
(6) Macropinocytosis 抑制における PC-9 細胞の Collagen type I 取り込み変化の検討	
(7) 肺がん以外のがん種における Collagen type I による抗がん剤耐性	
(8) TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の取り込み確認	
(9) TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の取り込み抑制の検討	
(iv) 考察.....	P.58
(v) 結論.....	P.63
VIII. 総括.....	P.64
IX. 図表説明.....	P.66
X. 参考文献.....	P.81
XI. 謝辞.....	P.88
XII. 図表	

# I. 要旨

## Collagen type I が誘導する分子標的薬耐性機構の解明

学籍番号 47-177309 がん先端生命科学分野 山崎 翔太

### 【序論】

がん組織は、がん細胞と周囲を取り囲む間質細胞（線維芽細胞、免疫細胞等）、そして細胞間隙を充填する細胞外マトリクス（コラーゲン等）から構成される。間質細胞や細胞外マトリクスは、組織構造や組織恒常性の維持に重要な役割を果たしているのみならず、がん細胞の薬剤耐性にも寄与していることが報告されてきた。したがって、がん細胞における薬剤感受性を検討するためには、がん細胞自身の因子とがん細胞以外の因子、双方を解明することが重要である。近年、がん薬物療法の一つとして細胞分裂が活発な細胞を標的とした抗がん剤ではなく、特定の分子やシグナル経路を標的とした分子標的薬が用いられている。特に、EGFR-TKI (Epidermal Growth Factor – Tyrosine Kinase Inhibitor) は EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 遺伝子変異陽性のがん患者に対して適用とされている。約 70% の症例に対しては高い治療効果を示すことが知られているが、耐性を示す症例も数多く存在しており、臨床上の問題とされる。がん細胞の EGFR-TKI 耐性機構に関しては、EGFR-T790M を代表とした二次的遺伝子変異や Met 増幅、HGF (Hepatocyte Growth Factor) の過剰発現によるバイパス経路の活性化が知られている。しかし、これらは主にごん細胞自身に関する因子であり、がん細胞以外の因子の関与については未だ解析が進んでいない。

本研究の目的は、がん組織内における主要な細胞がマトリクスであるコラーゲンに着目し、コラーゲンによるがん細胞の分子標的薬耐性 (EGFR-TKI) に与える影響及びその分子機構を解明することである。

### 【本論】

#### 1. コラーゲンによるがん細胞の EGFR-TKI 耐性

EGFR 変異陽性肺腺がん細胞株 PC-9、HCC827 を用いて、コラーゲンの有無における EGFR-TKI に対する感受性変化を検討した。コラーゲンの存在下では、両細胞株において EGFR-TKI に対する生細胞率の増加が認められ、コラーゲンによる EGFR-TKI 耐性の惹起が認められた。次に、コラーゲンによる EGFR-TKI 耐性の責任因子の同定を試みた。EGFR における下流シグナルの変化を明らかにするために、ERK1/2, Akt のリン酸化について検討した。その結果、コラーゲンの有無に関わらず、EGFR-TKI の添加により ERK1/2、Akt のリン酸化は減少した (図 1)。また、EGFR-TKI 耐性に関わると報告のあった側副シグナルにおける生存因子のリン酸化 (Focal Adhesion Kinase, FAK, Jun N-terminal Kinase, JNK, p38, STAT3) を検討したが、EGFR-TKI の添加によってコラーゲンの有無に関わらず、各生存因子のリン酸化に変動は認められなかった。以上の結果から、コラーゲン存在下におけるがん細胞は、ERK1/2, Akt 及び側副シグナル以外の変化により EGFR-TKI

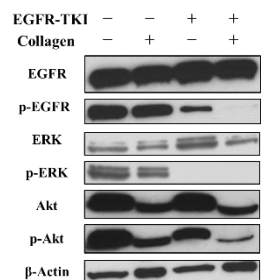


図1. EGFR-TKI 処理によるがん細胞の生存シグナル変化

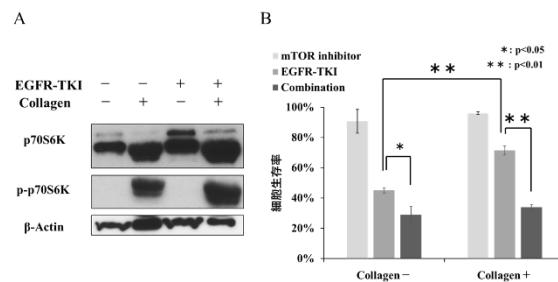


図2. コラーゲンの存在下における mTOR 活性化および薬剤相乗効果

耐性を示す可能性が示唆された。そこで、ERK1/2,Akt のさらに下流に位置する mammalian Target of Rapamycin (mTOR) に着目した。その結果、コラーゲン存在下の細胞では、EGFR-TKI 添加後においても mTOR が顕著に活性化されていた (図 2A)。さらに mTOR 阻害剤と EGFR-TKI を添加すると、コラーゲン存在下で認められていた EGFR-TKI に対する耐性が解除された (図 2B)。

上記の結果により、コラーゲン存在下で引き起こされる肺腺がん細胞株の EGFR-TKI 耐性は、肺がん細胞の mTOR がコラーゲンにより活性化され引き起こされる可能性があることを明らかにした (図 3)。

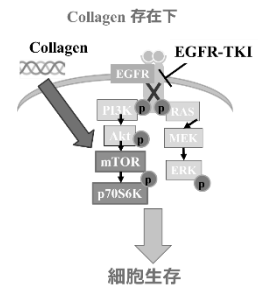


図3. コラーゲンによるがん細胞のシグナル伝達変化および mTOR 活性化

## 2. コラーゲンによるがん細胞の mTOR 活性化機構の解明

修士課程までの研究をふまえ、分子標的薬耐性のメカニズムとして、がん微小環境の主な構成因子であるコラーゲンがシグナル伝達を伴うことなく、がん細胞の mTOR を活性化する可能性を見出した。しかし、どのような機構によってがん細胞の mTOR を活性化しているのか、その詳細な分子機構の解明には至っていない。これまでにシグナル伝達を伴わない mTOR 活性化は、細胞内アミノ酸や栄養因子の蓄積依存的に生じるという報告がされてきた。

以上から、がん細胞内および細胞外でコラーゲンが分解され蓄積した分解産物により mTOR の活性化が生じた結果、がん細胞の分子標的薬耐性を引き起こすと仮説を立てた (図 4)。

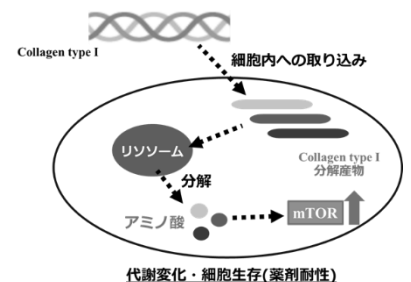


図4. コラーゲンによる mTOR 活性化機構における仮説

初めに、蛍光標識したコラーゲンを用いることで肺がん細胞株にコラーゲンが取り込まれるか検討した。蛍光標識したコラーゲンを 1h,48h 処理した PC-9 における蛍光強度を検討した結果、PC-9 の蛍光強度は増加を認め、コラーゲンを細胞内に取り込むことが明らかになった。既存の報告から、コラーゲンが細胞内に取り込まれる機構として、1) 細胞外におけるコラーゲンの分解を通して、細胞内へとコラーゲンが取り込まれる機構と 2) 細胞内へと直接的にコラーゲンが取り込まれる機構、が考えられていた。そこで、両者の機構を阻害することによるコラーゲンの取り込み変化を検討した。

細胞外におけるコラーゲンの分解は、コラーゲン分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP) が担っている。そのため、MMP 阻害剤を用いることで、コラーゲンの細胞内への取り込み変化を検討した。MMP 阻害剤 (GM6001) 48h 処理後の PC-9 における蛍光強度は、コントロール群と同程度であり、コラーゲンの取り込みは変化を認めなかった。さらに、GM6001 および EGFR-TKI を 72h 処理し、PC-9 の細胞生存率を検討した。しかしながら、GM6001 と EGFR-TKI を併用した群では、コラーゲン存在下における細胞生存率の上昇が認められ、コラーゲンによる EGFR-TKI 耐性が引き起こされていた。以上の結果から、コラーゲンが細胞内に取り込まれる機構としては、細胞外のコラーゲン分解を伴わず、直接的に細胞内へとコラーゲンを取り込む可能性が考えられた。

コラーゲンを直接的に細胞内へ取り込む機序として、既存の報告から 3 つのエンドサイトーシス様式が寄与する可能性を考えた。エンドサイトーシスは、クラスリン依存性・カベオラ依存性・マクロピノサイトーシスの 3 種類に大別することができる。そのため、各エンドサイトーシス様式における阻害剤を用いて、PC-9 におけるコラーゲンの取り込みを検討した。クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤 (Pitstop2)、クラスリン・カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤 (Dyngo4a) 48h 処理後の

PC-9 における蛍光強度はコントロール群と変わらず、2つのエンドサイトーシス様式はコラーゲンの取り込みに関与しないことが明らかになった。しかしながら、マクロピノサイトーシス阻害剤 (EIPA) 48h 処理後の PC-9 における蛍光強度は、コントロール群と比べ有意に低下しており、コラーゲンの取り込みが低下していることを認めた (図 5A)。さらに、EIPA を用いてコラーゲンによる EGFR-TKI 耐性の解除を試みた。EIPA および EGFR-TKI を 72h 処理し PC-

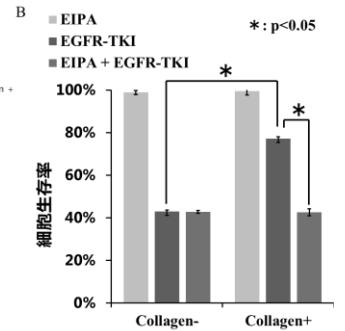
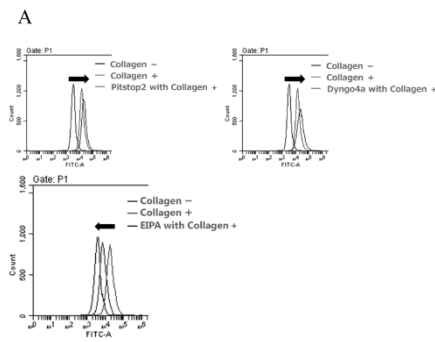


図5. EIPAによるコラーゲンの取り込み抑制および細胞生存率低下

9の細胞生存率を検討した結果、コラーゲン存在下で認められたEGFR-TKI耐性が解除され、コラーゲン非存在下と同程度の細胞生存率であった (図 5B)。また、コラーゲン存在下のPC-9において、EIPA処理をおこなうことによりmTORの活性化が抑制されることが認められた (data not shown)。

次に、マクロピノサイトーシスを引き起こす主要因子の抑制による細胞内へのコラーゲンの取り込みおよびがん細胞のEGFR-TKI耐性変化を検討した。マクロピノ

サイトーシスは、Rac1を介したシグナル伝達によって活性化されることが知られている。そのため、Rac1を抑制することによりマクロピノサイトーシス阻害を行い、マクロピノサイトーシスとコラーゲンによるEGFR-TKI耐性との相関を検討した。Rac1を阻害する方法としては、Rac1阻害剤およびshRNAによる抑制を用いた。Rac1阻害剤をがん細胞に48h処理し、がん細胞内へのコラーゲンの取り込みを検討した結果、がん細胞内へのコラーゲンの取り込みが有意に抑制されていることを認めた (図 6A)。Rac1阻害剤とEGFR-TKIを用いた併用処理を行った結果では、コラーゲン存在下の細胞生存率はコラーゲン非存在下の細胞生存率と同程度に減少を認め、コラーゲンによるがん細胞のEGFR-TKI耐性が解除されていることが明らかになった (図 6B)。さらに、shRac1コンストラ

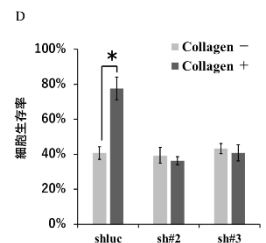
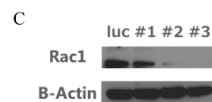
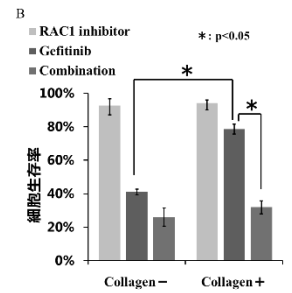
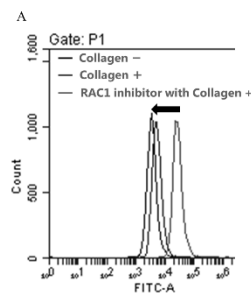


図6. Rac1阻害によるコラーゲンの取り込み抑制および細胞生存率低下

クトを作成し、細胞に導入した (図 6C)。shRac1を用いたRac1

の抑制も同様に、shRac1導入群においてコラーゲンによるEGFR-TKI耐性の解除を認めた (図 6D)。

上記の結果より、コラーゲンが引き起こすEGFR-TKIは、マクロピノサイトーシスによりコラーゲンを細胞内に取り込むことにより引き起こされることが示唆された。

### 3. コラーゲンの主な構成アミノ酸によるがん細胞のEGFR-TKI耐性

コラーゲンは、3つの主要なアミノ酸であるグリシン・プロリン・ヒドロキシプロリンによって約60%が構成されていることが知られている。そのため、これらの各3アミノ酸をがん細胞に添加することで、EGFR-TKIに対する耐性の惹起を確認した。グリシンを500μMおよび5mMで72h処理し、グリシン非添加群との細胞生存率を比較した。しかし、

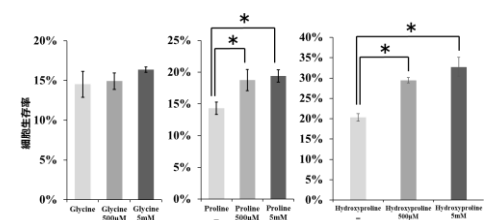


図7. 各アミノ酸添加による細胞生存率変化



グリシンの添加による細胞生存率の上昇は確認できず、グリシンは EGFR-TKI の耐性に関与しないことが明らかになった。一方、プロリンおよびヒドロキシプロリン添加群においては、非添加群と比べ細胞生存率が上昇し EGFR-TKI 耐性が認められた (図 7)。さらに、各アミノ酸による EGFR-TKI 耐性は mTOR 阻害剤と EGFR-TKI の併用により解除することができ、各アミノ酸は mTOR を活性化させ EGFR-TKI 耐性を引き起こしている可能性が示された。

上記の結果より、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれたコラーゲンは、アミノ酸レベルにまで分解されることでがん細胞の mTOR を活性化可能であることが考えられた。

### 【結論と展望】

本研究では、がん組織中の主要な細胞外マトリクスであるコラーゲンによって、がん細胞の mTOR が活性化され EGFR-TKI 耐性を引き起こすことを初めて示した。mTOR の活性化が上流の生存因子に非依存であることから、シグナル伝達経路以外の mTOR 活性化経路を探索した結果、マクロピノサイトーシスによりコラーゲンを取り込むことで mTOR を活性化させるという新規機構を見出した (図 8)。さらに、マクロピノサイトーシスおよび mTOR 阻害剤と EGFR-TKI を併用することにより、コラーゲンが誘導する EGFR-TKI 耐性を解除できたことから、薬剤を併用することにより EGFR-TKI 耐性の克服に繋がることが期待される。現在は、コラーゲン存在下におけるがん細胞のメタボローム解析を行っており、コラーゲンによるがん細胞内の代謝変化を明らかにすることで、コラーゲンがどのような代謝経路を介して mTOR を活性化するのか検討している。同定した代謝経路において、安定同位体標識したコラーゲン等の作成を行うことで、コラーゲン由来アミノ酸が実際のがん細胞内において、代謝されていく詳細な過程を検討できると考える。

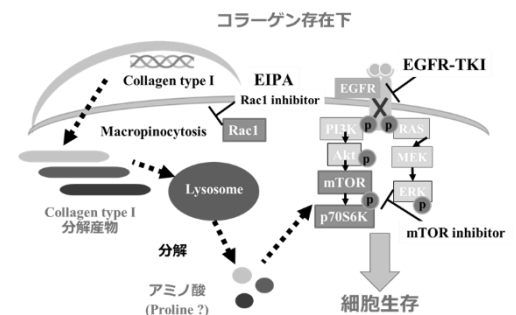


図8. Graphical abstract

### 【発表論文】

1. **Yamazaki S**, Higuchi Y, Ishibashi M, Hashimoto H, Yasunaga M, Matsumura Y, Tsuchihara K, Tsuboi M, Goto K, Ochiai A, Ishii G.  
Collagen type I induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated cancer cells via mTOR activation through Akt-independent Pathway. *Cancer Science*. 2018;109(6):2063-2073
2. Suzuki E, **Yamazaki S**, Naito T, Hashimoto H, Okubo S, Udagawa H, Goto K, Tsuboi M, Ochiai A, Ishii G.  
Secretion of high amounts of hepatocyte growth factor is a characteristic feature of cancer-associated fibroblasts with EGFR-TKI resistance-promoting phenotype: A study of 18 cases of cancer-associated fibroblasts.  
*Pathol Int*. 2019;69(8):472-480.
3. Hisamitsu S, Miyashita T, Hashimoto H, Neri S, Sugano M, Nakamura H, **Yamazaki S**, Ochiai A, Goto K, Tsuboi M, Ishii G.  
Interaction between cancer cells and cancer-associated fibroblasts after cisplatin treatment promotes cancer cell regrowth.  
*Hum Cell*. 2019;32(4):453-464.
4. **Yamazaki S**, Maruyama A, Makinoshima H, Su Yinghan, Goto K, Ochiai A, Ishii G.  
Macropinocytosis of collagen type I induce drug resistance of cancer cells. In preparation

## II. 略語表

AKT	Akt8 virus oncogene cellular homolog
ATP	Adenosine Triphosphate
BCL2	B-cell lymphoma 2
BIM	Bcl-2-like protein 11
BSA	Bovine serum albumin
c-Met	Tyrosine-protein kinase Met
CMV	human Cytomegalovirus immediate early promoter
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-TKI	Epidermal Growth Factor Receptor – Tyrosine Kinase Inhibitor
EIPA	Ethylisopropyl amiloride 3-Amino-N-(aminoiminomethyl)-6-chloro-5-[ethyl(1-methylethyl)amino]-2-pyrazinecarboxamide

ERK	Extracellular Signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
hGAPDH	human Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
hVps34	human phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
HGF	Hepatocyte growth factor
IRS1	Insulin receptor substrate 1
GC/MS	Gas Chromatography-Mass spectrometry
GTP	Guanosine Triphosphate
IgG	Immunoglobulin G
ITGB4	Integrin Subunit Beta 4
LC/MS	Liquid Chromatography-Mass spectrometry
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MMP	Matrix metalloproteinase
mRFP	monomeric Red Fluorescent protein

mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin Complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin Complex 2
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFS	Progression-free survival
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
p70S6K	p70S6 kinase
Rac1	RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1
RFS	Recurrence-free survival
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shluc	short hairpin luciferase

shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
STAT3	Signal Transducers and Activator of Transcription 3
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
uPARAP	Mannose receptor C type 2
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WB	Western blotting
5-FU	5-Fluorouracil

### III. 背景

#### (1) がん組織における間質細胞と細胞外マトリクス

がん組織は、がん細胞と周囲を取り囲む間質細胞、そして細胞間隙を充填する細胞外マトリクスから構成される (Fig 1)。間質細胞には、組織構造の支持に重要な線維芽細胞や体内に侵入したウイルスを排除し、体内の恒常性を維持する免疫細胞が挙げられる<sup>1-3</sup>。また、細胞外マトリクスは、代表的なものとして構造タンパク質である Collagen や糖タンパク質であるフィブロネクチン等様々なものが知られている。がん組織中に含まれている細胞外マトリクスを Table 1 に示す<sup>4,5</sup>。がん組織中において、がん細胞と周囲を取り囲む間質細胞や細胞外マトリクスは相互に作用し合うことで、がんの進展や治療の感受性に関わるがん微小環境を構築する。

#### (2) がん組織における細胞外マトリクスの役割

がん組織中では、がん細胞と間質細胞における線維芽細胞の相互作用により通常組織に比べ細胞外マトリクスが堆積している<sup>6</sup>。堆積した細胞外マトリクスは、がん細胞における細胞表面分子を介した直接接触および液性因子を介した間接接触により、がん細胞の生物像に重大な変化をもたらす<sup>7,8</sup>。さらに、細胞外マトリクスの堆積上昇に伴う組織間圧の上昇は、血液灌流の低下を引き起こすことでがん細胞への薬剤送達やがん細胞の進展に影響を及ぼすことが知られている<sup>8,9</sup>。このようにがん組織中にお

ける細胞外マトリクスは、様々な機構によりがん細胞の悪性化に影響を与え、がん組織の進展を促す。

がん組織中に堆積する細胞外マトリクスの中において、多量に含まれるものは **Collagen type I** であることが知られている<sup>10</sup>。**Collagen type I** は、膵臓や頭頸部がんにおいて抗がん剤耐性に関与することや、がん細胞の表現型変化を誘導することで浸潤や転移を促進することが報告されている<sup>11-14</sup>。そのため、がん組織中における細胞外マトリクス、特に **Collagen type I** によるがん細胞への影響を明らかにすることは、がん組織における理解を深める上で非常に重要である。

### **(3) 肺がんの組織型および肺がんにおける代表的な遺伝子変異**

肺がんは、組織型の違いから腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の 4 種類に分類されている。中でも、腺癌は日本における肺がんの 50% を占めることが報告されており、重要な組織型の 1 つである<sup>15</sup>。近年の肺腺癌における遺伝子解析から、様々な発がんおよびがんの悪性化に関わる遺伝子の変異が明らかになってきた。特に **Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)** 遺伝子変異は、肺腺癌患者の 50% を占める主要な遺伝子変異であることが知られている。**EGFR** は、**ErbB** ファミリーに属する膜貫通型の受容体チロシンキナーゼであり、細胞膜表面に存在する。**EGFR** における代表的な変異は、エクソン 19 の欠失変異とエクソン 21 の点突然変異 (**L858R**) であり、**EGFR** 遺伝子変異の約 90% を占めている<sup>16,17</sup>。これらの変異は、**EGFR** の恒常

的なリン酸化を促すことで下流に存在する細胞生存因子へのシグナル伝達が活性化し、細胞増殖促進および抗アポトーシス性の獲得等によるがんの進展や治療抵抗性の獲得を有することが報告されている<sup>18</sup>。そのため、近年では **EGFR** を標的とした薬剤の開発が行われ、**EGFR** 遺伝子変異陽性の肺腺癌患者に対して用いられている。



#### IV. 本研究の目的

本研究の目的は、がん組織における主要な細胞外マトリクスである Collagen type I に着目し、肺がん細胞の薬剤耐性獲得およびその分子機構を明らかにすることである。

## V. 実験材料および実験方法

### 1) 細胞培養

使用した細胞株を Table 2 に示す。PC-9 細胞、HCC827 細胞、A427 細胞、H1299 細胞 (ヒト肺腺癌細胞株) は、1% L-Glutamine (Life Technologies) を添加した RPMI 1640 medium (SIGMA) を用い、A549 細胞 (ヒト肺腺癌細胞株) は DMEM – F12 medium (SIGMA) を用いた。TE-10 細胞 (ヒト食道扁平上皮癌細胞株)、BxPC-3 細胞 (ヒト膵臓腺癌細胞株)、293T 細胞 (ヒト胎児腎細胞) は RPMI 1640 medium を用い、HCT116 細胞 (ヒト結腸腺癌細胞株) は DMEM medium (SIGMA) で培養を行った。いずれの medium においても、10% Fetal bovine serum (FBS) (SIGMA)、1% Penicillin/Streptomycin (SIGMA) の添加を行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 2) がん細胞株 (PC-9, HCC827, TE-10, HCT116, BxPC-3) における mRFP 標識

mRFP 遺伝子を組み込んだ CSII-CMV-mRFP ベクター (理化学研究所; 三好浩之先生より提供) 5 $\mu$ g を、3 $\mu$ g の pCAG-HIV 及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev ベクターと共に 500 $\mu$ l の Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) に加え、5 分間室温でインキュベートした (A 液)。また、20 $\mu$ l の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 500 $\mu$ l の Opti-MEM I Reduced Serum Medium に加え、5 分間室温でインキュベートした (B 液)。A 液と B 液を混合した後、20 分間室温でインキュベートした。この混合液を、

24 時間前に 6cm dish (日本 BD) に播種した  $1.0 \times 10^6$  個の 293T 細胞に添加した。添加後 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間ごとに medium 交換を行い、48 時間培養した。培養上清を 0.45 μm filter (Millipore) に通した後、前日、10 cm dish (日本 BD) に播種した  $1.0 \times 10^6$  個の PC-9 及び HCC827 細胞に添加した。4 時間後に 10% FBS、1% Penicillin/Streptomycin、1% L-Glutamine 含有 RPMI1640 medium を加え 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 48 時間培養後に細胞を回収した。

### 3) Fluorescence activated cell sorter (FACS) による蛍光陽性細胞の選別

mRFP により蛍光標識した  $1.0 \times 10^6$  個のがん細胞 (PC-9、HCC827、TE-10、HCT116、BxPC-3) を 500 μl の 3% PBS/FBS に懸濁し、FACS caliber (BD Biosciences) および FACS Aria II (BD Biosciences) を用いて細胞の蛍光陽性率を測定した。さらに、各細胞の mRFP 陽性分画を FACS Aria II を用いて sorting 後培養した。その後、再度 FACS caliber および FACS Aria II を用いてそれぞれの細胞分画における蛍光陽性率を確認した。

### 4) Collagen gel 上における細胞培養法

Collagen type I を用いた細胞培養法として以下の方法を用いた。24 well culture plate (BD Falcon) に 1.2 ml の各 medium を添加し、0.4 μm pore の Cell Culture Insert (BD Falcon) を各 well にセットした。Cell Culture Insert の上層に 100 μl の Collagen type

I (新田ゼラチン) を重合させた後、Collagen gel 上に mRFP により蛍光標識した  $8.5 \times 10^3$  個の各がん細胞を 200 $\mu$ l の medium に懸濁、播種したものを Collagen+ 群、Cell Culture Insert の上層に直接  $8.5 \times 10^3$  個の蛍光標識した各がん細胞を 200 $\mu$ l の medium に懸濁、播種したものをコントロール群 (Collagen- 群) とした。

#### 5) 蛍光標識したがん細胞の生存割合における算出方法

Collagen+ および Collagen- の条件化において、PC-9-mRFP 細胞を  $1.0 \times 10^4$ 、 $3.0 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^4$ 、 $7.0 \times 10^4$  個を Cell Culture Insert の上層に播種した。細胞播種 12 時間後に Cell Culture Insert を Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄後、蛍光顕微鏡 Biorevo BZ-9000 (Keyence) により各細胞数の蛍光像を撮影した。細胞割合の算出には画像解析ソフトである ImageJ を用いて解析を行った。撮影した画像から細胞全体の蛍光部分を抽出し、全体の面積から蛍光割合を算出することで細胞蛍光割合を評価した。Collagen+ 群および Collagen- 群において、それぞれ細胞数と細胞蛍光割合の相関関係は、 $R^2 \geq 0.97$  と強い相関を示したため、本研究では細胞数の代替指標として細胞蛍光割合を用いて評価を行った (Supp Fig 1A, 1B)。

#### 6) がん細胞の薬剤処理

検討に用いたがん細胞 (PC-9、HCC827、TE-10、HCT116、BxPC-3) は、実験に使用する 2 日前に  $1.0 \times 10^6$  細胞/10 cm dish で、各細胞に適した medium を用いて播種し

た。0 日目に mRFP により蛍光標識した  $8.5 \times 10^3$  の各がん細胞を Collagen- および Collagen+ の条件化に播種し、1 日目に各がん細胞の薬剤処理を行った。使用した薬剤および終濃度を Table 3 に示す。また、薬剤処理群に対するコントロール群として各薬剤の溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) および生理食塩水を添加した medium を各がん細胞に処理した。薬剤添加 72 時間後に PBS で洗浄後、各がん細胞の蛍光像を蛍光顕微鏡 Biorevo BZ-9000 により撮影し、生存細胞数を細胞蛍光割合にて評価し、薬剤処理群の細胞蛍光割合をコントロール群の細胞蛍光割合で割ることにより生存細胞割合を算出した。

## 7) 定量的 RT-PCR 法

Collagen- および Collagen+ の条件化で培養したがん細胞を PBS で 3 度洗浄した後、TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて total Ribonucleic acid (RNA) を抽出した。その後、クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により RNA を精製し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて Complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA) を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq TM (Takara) を用いて、Smart Cycler System (Takara) および Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara) により定量的 RT-PCR を行った。標的遺伝子の Messenger RNA (mRNA) の発現は、human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH) で標準化した。

定量的 RT-PCR 法で使用したプライマーは全て Takara より購入し、使用したプラ

イマーは Table 4 に示す。

## 8) 免疫組織化学的染色

### (i) 培養細胞における免疫染色

作製した細胞の Collagen<sup>-</sup> および Collagen<sup>+</sup> 群におけるパラフィン包埋サンプルから、4.0 μm 厚の組織切片を作製した。キシレンとエタノールを用いた脱パラフィン処理後、0.3% 過酸化水素を含有したメタノールに 30 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。その後、pH 6.7 のクエン酸 Buffer (LSI メディエンス) または pH 9.0 Tris-EDTA Buffer (Dako) で 95°C, 20 分間の抗原賦活化処理を H2850 Microwave Processor (EBSciences) を用いて行った。各一次抗体を 4°C、Overnight 条件で反応させた後に、二次抗体として goat anti-mouse IgG HRP (EnVision/HRP system: Dako) または goat anti-rabbit IgG HRP (EnVision/HRP system: Dako) を用い、室温で 30 分間反応させた。その後、Envision+ system (Dako) 及び 3,3'-diaminobenzidine を用いた化学発色を行うことで標的タンパク質を茶色に発色した。核の対比染色には、ヘマトキシリン (二倍法: 武藤化学) を用いた。本検討で用いた一次抗体の詳細は Table 5 に示す。

### (ii) 腫瘍組織における Collagen type I の免疫組織化学的染色

EGFR 変異陽性肺腺癌患者 87 症例を対象にして免疫組織化学的染色を行った。症例は、肺腺癌に対して外科的切除を施行後に再度発症し、EGFR-TKI 治療を行った患者を選定した。組織切片は上記で示す (i) の過程に則り、抗 Collagen type I 抗体を用いて Collagen type I の免疫染色を行った。染色した細胞切片の高解像度画像は、NanoZoomer (浜松ホトニクス) を用いて撮影した。使用した検体は、国立がん研究センター東病院の倫理審査に受理され、研究を行っている (研究課題番号; 2014-70)。

### (iii) がん細胞の蛍光免疫染色

がん細胞を 0 日目に Culture slides 8 well (BD) に  $1.0 \times 10^4$  個/well ずつ播種した。2 日目に PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。抗体の膜透過性を高めるために 0.05% TritonX-100 /PBS に 15 分間浸した。その後、非特異的結合をブロックするために 0.1% Bovine serum albumin (BSA)/PBS に 30 分間浸し、一次抗体を加え 4°C、Overnight 条件で反応させた。本検討で用いた一次抗体の詳細は Table 5 に示す。二次抗体には、anti-mouse Alexar Flour 488 抗体 (Invitrogen) および anti-rabbit Alexar Flore 546 抗体 (Invitrogen) を用いた。核染色と封入には、DAPI 入り水溶性封入剤である VECTASHIELD (VECTOR) を使用した。コントロールとして抗体を添加していない群、二次抗体のみを添加した群を作成し、露光時間の設定を行った。

観察には、蛍光顕微鏡 Biorevo BZ-9000 を用いて 20 倍で検鏡した。

#### (iv) 免疫染色した培養細胞の計数法

各切片当たり 20 倍視野で全ての細胞を数え、視野内の細胞における各種マーカーの陽性細胞および共陽性細胞の割合を算出した。

#### (v) 免疫染色した腫瘍組織の Collagen type I 陽性率および群分け

Collagen type I を免疫染色した組織切片を ImageJ を用いて解析を行った。腫瘍組織間質における Collagen type I 陽性率を算出し、50% 以上を Collagen-rich 群と定義し、臨床統計解析を行った。

### 9) Western blotting (WB) 法

Lysis Buffer に Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics) 及び phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics) を添加し、細胞を溶解した。その後、Amicon Ultra-4 (Milipore) を用いて 10kDa 以上のタンパク質を濃縮した。Bradford 法を用いて、タンパク質濃度を定量し、タンパク質量を 20 $\mu$ g に揃えた。それを Sample Buffer [2M Tris-HCl (pH 6.8), 20% sodium dodecyl sulfate (SDS), Glycerol, 1% Bromophenol Blue] 及び 2-メルカプトエタノールを混合し、100°C で 5 分間加熱した。その後、10% ゲルおよび 7.5% ゲル (Bio-Rad) にサンプルを添加し、200V で 35 分間電気泳動し



た。電気泳動後、PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) に転写し、Blocking buffer を用いてブロッキングを行った。一次抗体を用いて、4°C で一晩インキュベートした。本検討で用いた一次抗体の詳細は Table 5 に示す。翌日、Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) [137mM NaCl, 20mM Tris-HCl(pH7.6), 1% Tween20] で洗浄したのち、二次抗体 Amersham ECL Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase Linked Species-Specific Whole Antibody 及び Amersham ECL Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Linked Species-Specific Whole Antibody (GE Healthcare) を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。バンドの検出には ECL Western Blotting Reagents (GE Health care) を用いた。

#### 10) がん細胞における Collagen type I の取り込み評価

0 日目に  $3.0 \times 10^5$  個の PC-9-mRFP 細胞を 6cm dish (BD Falcon) に播種し、1 日目に DQ-Fluorescein-conjugated collagen type I (Life technologies) を  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  で添加し、1 時間および 48 時間暴露後に PBS で洗浄後、共焦点顕微鏡 LSM 710 (ZESIS) を用いて対物レンズ 20 倍で検鏡した。細胞全体像を mRFP の赤色蛍光で撮影、Collagen type I の取り込みを Fluorescein の緑色蛍光にて撮影した。また、フローサイトメトリーを用いて、PC-9、TE-10、HCT116 の 3 種類の細胞株における Collagen type I の取り込みを評価した。各がん細胞株を 0 日目に  $3.0 \times 10^5$  個/6cm dish に播種し、1 日目に DQ-Fluorescein-conjugated collagen type I を  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  で添加および薬剤で処理

し、1時間および48時間暴露後にPBSで洗浄した。各細胞を1mlの3% FBS/PBSに懸濁して、BD Accuri C6 plus (BD Biosciences) を用いてCollagen陽性細胞数およびMean Fluorescence Intensity (MFI) を測定した。

## 11) メタボローム抽出および解析

0日目に $1.0 \times 10^6$ 細胞/10 cm dishで、PC-9を播種した。1日目にCollagen type Iを重合させずに添加し、添加群をCollagen+群および非添加群をCollagen-群とした。Collagen type I添加後、1, 6, 24, 48時点においてPC-9のメタボロームを回収した。回収方法は、マンニトール (Wako) を用いて作製した5%マンニトール水溶液でPC-9を洗浄後、マンニトールを完全に除去した。LC/MS用メタノール (Wako) を800 $\mu$ l添加し、振とう後に内部標準液としてイソプロピルリンゴ酸 (Wako) 5 $\mu$ gを添加した。30秒間静置後、サンプルを回収した。サンプルは、国立がん研究センター・鶴岡連携拠点 がんメタボロミクス研究室に輸送し、メタノールを溜去後にPresh-SPF AOSキット (アイスティサイエンス) を用いてGC/MS測定を行った。尚、本検討は代謝産物の抽出を研究者自身が行った後に、解析およびデータ構築における全ての工程を国立がん研究センター・鶴岡連携拠点 がんメタボロミクス研究室 丸山 亜美様に委託し、行っていただいた。

## 12) Collagen type I 含有アミノ酸添加実験

0 日目に  $1.0 \times 10^6$  細胞/10 cm dish で、PC-9 を播種した。1 日目に Glycine、Proline、Hydroxyproline (SIGMA) を  $500 \mu\text{M}$ 、 $5 \text{mM}$  で処理すると同時に、Gefitinib (EGFR-TKI) 処理およびコントロールとして DMSO 処理を行った。アミノ酸および薬剤添加 72 時間後に PBS で洗浄後、各がん細胞の細胞数を計測し細胞生存率を算出した。

## 12) がん細胞への shRNA ベクターの導入

レンチウイルスベクターを用いた PC-9 への shRNA 導入は以下の手順で行った。ターゲット遺伝子に対する siRNA 配列の設計は siDirect 2.0 を用いて行った。設計したオリゴヌクレオチドの化学合成およびアニーリング反応を行うことで、Table 4 に示した相補配列を得た (siDirect を用いて設計した siRNA 配列部位を赤字で示した)。得られた相補配列を XbaI および BglII 制限酵素で処理した pENTR4-H1 ベクター (理化学研究所) に DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara) を用いてライゲーションし、DH5 $\alpha$  (TOYOBO) へと形質転換することでエントリークローンを得た。得られたエントリークローンと CS-Rfa-EG (理化学研究所) とのライゲーション反応を行い (Gateway LR Clonase: Life Technologies)、DH10B (Invitrogen) へと形質転換することで shRNA 発現用ベクターを得た。PCAG-HIV, pCMV-VSV-G-RSV-Rev および shRNA ベクターを 293T 細胞へとトランスフェクションすることで感染用のレンチウイルスを得た。トランスフェクションには LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen) を用いた。レンチウイルスベクターを含む 293T 細胞の培養上清は  $0.45 \mu\text{m}$  filter により細

胞成分を除去し、8  $\mu\text{g/ml}$  のポリブレン (Santa Cruz Biotechnology) を添加後、PC-9 へと添加することで形質転換を行った。

### 13) 統計処理

全ての結果は、 $\text{mean}\pm\text{SD}$  値で示した。統計比較は、F 検定を用いることで等分散の確認を行った後、スチューデントの  $t$  検定を用いて統計解析し、両側検定において  $P$  value が 0.05 未満であった場合に有意差があるとみなした。臨床統計解析は、 $\chi^2$  検定およびカプランマイヤー法を用いて統計解析を行い、 $P$  value が 0.05 未満であった場合に有意差があるとみなした。

## VI. Collagen type I によるがん細胞の分子標的薬耐性の惹起

### (i) 序論

近年のがんに対する治療として、特定のシグナルや分子を標的とした分子標的薬を用いることが主流である。分子標的薬の代表的なものとしては、**Epidermal Growth Factor - Tyrosine Kinase Inhibitor (EGFR-TKI)** が挙げられる。EGFR-TKI は、切除不能 EGFR 遺伝子変異陽性の肺腺癌患者において、高い治療効果を示すが 20-30% の症例では初期耐性を示すことが知られている<sup>19-27</sup>。さらに、初期の段階では奏功していた症例において、がん細胞が EGFR-TKI に対して耐性を獲得することにより、再発をきたすことも知られている<sup>28-30</sup>。ゆえに、EGFR-TKI におけるがん細胞の初期耐性および獲得耐性機構の解明は、EGFR-TKI を用いたがん治療の重要な課題として考えられている。がん細胞における EGFR-TKI の獲得耐性は、EGFR T790M 変異や Tyrosine-protein kinase Met (c-Met) の増幅、Hepatocyte Growth Factor (HGF) の過剰発現、がん細胞の上皮間葉転換等の形質変化など、近年様々な報告がなされてきた<sup>31,32</sup>。しかしながら、EGFR-TKI の初期耐性においては、CRIP1 発現や Bcl2-like protein 11 (BIM) 遺伝子多型が EGFR-TKI の初期耐性に関わること等が報告されてきたが、未だ解明が進んでいない<sup>33-37</sup>。さらに、EGFR-TKI の初期耐性および獲得耐性の解明においては、がん細胞自身に関する因子の変化に焦点を当てた報告が多く、がん細胞

以外の因子における関与について未だ解析が進んでいないことが挙げられる。

前述したように、がん組織は、がん細胞と非がん細胞である間質細胞や細胞外マトリクスによって構築されており、がん組織中に存在する細胞外マトリクスは **Collagen type I** が多量に含まれていることが知られている。従って、**Collagen type I** を代表としたがん細胞以外に関する因子による **EGFR-TKI** 耐性機構を明らかにすることは、**EGFR-TKI** 耐性を示す症例における治療効果の向上につながることを期待される。

(ii) 目的

本研究の目的は、Collagen type I の EGFR 変異陽性肺腺癌細胞株における EGFR-TKI 耐性への寄与を明らかとし、耐性に関わる責任因子を同定することである。

研究は、細胞蛍光割合および細胞形態を同時に評価可能な観察系 (Fig 2) を用いて、以下の手順で行った。

1. EGFR 変異陽性ヒト肺腺癌細胞株である PC-9 および HCC827 細胞を用いて、Collagen type I が EGFR-TKI 耐性へ関与するかどうかを検討した。
2. Collagen type I における EGFR-TKI 耐性の関与を検討した結果、Collagen type I は PC-9 および HCC827 細胞において EGFR-TKI 耐性に関与することが示された。そこで、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性の責任因子を同定した。
3. 臨床検体を用いて、Collagen type I と EGFR-TKI 耐性の相関について臨床統計解析を行うことで、生体内における本現象の有無を確認した。

### (iii) 結果

#### (1) Collagen type I による PC-9 および HCC827 細胞における EGFR-TKI 耐性

Collagen type I が EGFR-TKI 耐性に関与するかを検討するため、レンチウイルスを用いて mRFP ベクターを細胞に導入し蛍光標識した PC-9-mRFP および HCC827-mRFP 細胞を用いて、Gefitinib (EGFR-TKI) 処理後の細胞生存率変化を Collagen+ 群と Collagen- 群において検討した (Fig 3A,3B)。その結果、両細胞株における Collagen+ 群では、Collagen- 群と比較し有意に細胞生存割合の上昇が認められた (Fig 3C)。以上の結果から、Collagen type I は PC-9 と HCC827 において EGFR-TKI 耐性を誘導することが示唆された。そこで、我々は Collagen type I による EGFR-TKI 耐性に関わる責任因子の同定を試みることにした。

#### (2) Collagen type I によるがん細胞の表現型変化の検討

Collagen type I による EGFR-TKI 耐性においてがん細胞の上皮間葉転換における表現型変化が関与するかについて検討を行った。本検討では、上皮系細胞のマーカーとして E-cadherin, 間葉系細胞のマーカーとして Vimentin を用いた。定量的 RT-PCR による Collagen+ 群および Collagen- 群における PC-9 の E-cadherin と Vimentin の遺伝子発現を検討した結果、各条件下における両遺伝子の発現は変化が認められなかった (Fig 4A)。さらに、免疫組織化学的染色を用いてタンパク質レベルに



おける上皮間葉転換マーカーの発現を検討した。PC-9 および HCC827 において E-cadherin と Vimentin の染色を行った結果、両細胞株の Collagen+ 群および Collagen- 群において E-cadherin の染色が認められ、Vimentin の染色は認められなかった (Fig 4B, 4C)。以上より、PC-9 および HCC827 細胞は上皮系細胞のマーカーが発現し、間葉系細胞のマーカーが発現しないことが明らかとなった。このことから、Collagen type I は両細胞株において上皮間葉転換を誘導しないことが示唆され、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性は上皮間葉転換に伴う表現型変化が要因でないことが明らかになった。そこで、EGFR-TKI の作用点である EGFR 下流シグナルに着目し、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性に関わる責任因子の同定を試みることにした。

### (3) Collagen type I によるがん細胞の EGFR 下流シグナル変化の検討

EGFR-TKI の作用機序は、EGFR の Adenosine triphosphate (ATP) 結合部位に競合的に結合することで、EGFR の自己リン酸化および下流シグナルを抑制することが知られている<sup>38</sup>。そのため、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性に EGFR 下流シグナルの変化が関わるかについて、WB 法を用いて各タンパク質のリン酸化を検討した。EGFR-TKI の作用点である EGFR のリン酸化の発現は、Gefitinib 処理により Collagen+ 群および Collagen- 群の双方において抑制が認められた。さらに、EGFR 下流の主要な生存因子である Extracellular signal-regulated kinase (ERK) および AKT8

virus oncogene cellular homolog (Akt) のリン酸化を検討した。Collagen+ 群および Collagen- 群の双方における ERK および Akt のリン酸化の発現は、Gefitinib 処理により抑制および減弱していることが認められた (Fig 5A)。以上から、Collagen+ 群および Collagen- 群の双方における EGFR、ERK、Akt のリン酸化は、EGFR-TKI 処理により抑制および減弱されることが明らかになった。検討した生存因子のリン酸化上昇が Collagen+ 群において認められないことから、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性において EGFR、ERK、Akt のリン酸化は関与しないことが明らかになり、ERK および Akt の更に下流に存在する生存因子や側副シグナルにおける生存因子が関与している可能性が考えられた。

#### (4) Collagen type I によるがん細胞の側副シグナル変化の検討

EGFR-TKI 耐性に寄与するがん細胞の側副シグナル変化として、過去に EGFR-TKI 耐性に関与すると報告のあった Signal Transducers and Activator of Transcription 3 (STAT3)、Focal adhesion kinase (FAK)、p38 のリン酸化について検討した<sup>31,39</sup>。STAT3 は、Collagen+ 群および Collagen- 群の各条件下においてリン酸化の発現が認められなかった。次に、FAK は Collagen+ 群で発現が認められず、Collagen- 群における Gefitinib 処理下のみでリン酸化の発現が認められた。さらに、p38 は、Gefitinib 処理下における Collagen- 群で Collagen+ 群よりリン酸化の発現が上昇していた (Fig 5B)。以上の結果から、STAT3、FAK、p38 のリン酸化は Collagen- 群と比較し、

Collagen+ 群において発現が上昇しないことが明らかになった。Collagen+ 群において検討した生存因子のリン酸化上昇が認められないことから、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性において STAT3、FAK、p38 のリン酸化は関与しないことが明らかになり、ERK および Akt の更に下流に存在する生存因子が関与している可能性が考えられた。

#### (5) Collagen type I によるがん細胞の Akt 下流シグナル変化の検討

これまでの検討により、Collagen+ 群における EGFR-TKI 耐性機構には、ERK や Akt といった EGFR 下流シグナル変化 および 側副シグナルの変化が関与しないことが明らかになった。そのため、ERK および Akt の更に下流に存在する生存因子の関与を考えた。また、細胞の形態観察において Collagen+ 群は Collagen- 群と比較し、細胞が大きくなっていた (Supp Fig 2)。そこで、ERK および Akt の更に下流に存在し、細胞の大型化を引き起こす因子として知られる Mammalian target of rapamycin (mTOR) に着目した<sup>40 41</sup>。mTOR の活性化は、mTOR 下流に存在する p70S6 kinase (p70S6K) のリン酸化上昇を活性化指標として用いることで検討が可能である。そのため、Collagen+ 群および Collagen- 群における p70S6K のリン酸化を検討することにした。p70S6K は、Collagen+ 群において PC-9 および HCC827 の両細胞株で高度にリン酸化が認められ、Gefitinib 処理前後においても Collagen+ 群における p70S6K のリン酸化状態に変化は認められなかった (Fig 5C)。

つまり、Collagen+ 群においては、Collagen type I における何らかの刺激により Akt 非依存的に mTOR が活性化しており、その活性化が Gefitinib 処理下においても持続していることにより EGFR-TKI 耐性を示す可能性が考えられた。

#### (6) mTOR 抑制による Collagen+ 群の細胞形態変化および EGFR-TKI 耐性の解除

Collagen+ 群における p70S6K のリン酸化変化から、Collagen type I による mTOR の活性化が考えられた。そのため、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性に mTOR の活性化が関与するののかについて検討を行った。mTOR inhibitor である Rapamycin および Everolimus の処理下では、Collagen+ 群は Collagen- 群と比較して細胞生存割合の減少は認められなかった。Gefitinib 処理下においては、Collagen+ 群における細胞生存割合が Collagen- 群に比べ有意に上昇し、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性が確認された。さらに、EGFR-TKI と Rapamycin および Everolimus の併用処理下においては、Collagen+ 群の細胞生存割合が有意に低下し Collagen- 群と同程度の細胞生存割合になることが明らかになった (Fig 6A, 6B)。以上の結果から、EGFR-TKI と mTOR inhibitor を併用することにより、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性の解除が可能であることが示唆された。次に、前述した Collagen+ 群における細胞の大型化について mTOR 抑制における細胞形態変化を検討した。Rapamycin を用いて、Collagen+ 群および Collagen- 群における細胞面積を検討した結果、mTOR 抑制によって Collagen+ 群の細胞面積が有意に低下し、Collagen-

群と同程度の細胞面積になることが明らかになった (Fig 6C, 6D)。以上のことから、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性は、Collagen type I による mTOR の活性化が要因であることが示唆された。さらに、EGFR-TKI と mTOR inhibitor の併用により Collagen type I による EGFR-TKI 耐性が解除できること、mTOR の活性化により Collagen+ 群の細胞は大型化していることが明らかになった。

#### (7) 臨床検体を用いた Collagen type I の堆積と EGFR-TKI における奏功性の相関

EGFR 遺伝子変異陽性ヒト肺腺癌患者 87 名の検体を用いて、Collagen type I の堆積と EGFR-TKI の奏功性における臨床統計解析を行った。用いた患者検体の臨床病歴的背景を Table 7 に示す。まず、免疫組織化学的染色によって Collagen type I を染色し、ImageJ を用いて Collagen type I 陽性割合を算出した。そして、腫瘍間質における先行研究から Collagen type I 陽性割合において 50% 以上の陽性群を Collagen-rich 群および 50% 未満の群を Control 群と定義し<sup>42</sup>、2 群間においてがんが再発せずに生存している期間である Recurrence-free survival (RFS) と投薬治療中にごんが進行せず安定した状態である期間を示す Progression-free survival (PFS) について臨床統計解析を行った (Fig 7A)。その結果、Collagen-rich 群および Control 群における RFS は変化が認められず、PFS のみが Collagen-rich 群において有意に短縮されていた (Fig 7B)。がんの悪性度を示す RFS は変化がなく、がん治療の奏功性を示す PFS が変化していたことから、Collagen type I は治療奏功性に影響を及ぼすこ

とが明らかになった。以上から、生体内においても細胞株の検討と同様に Collagen type I による EGFR-TKI 耐性が生じる可能性が考えられた。

#### (iv) 考察

本研究では、EGFR 遺伝子変異陽性ヒト肺腺癌細胞株を用いて Collagen type I によるがん細胞の mTOR 活性化が要因である EGFR-TKI 耐性を示した。まず、我々は EGFR 遺伝子変異陽性ヒト肺腺癌細胞株を用いて Collagen+ 群および Collagen- 群における EGFR-TKI 処理下での細胞生存率を検討した。Collagen+ 群における細胞生存率は、Collagen- 群と比較し有意な上昇を認め、Collagen type I による EGFR-TKI 耐性の惹起を示した。Collagen type I による EGFR 遺伝子変異陽性ヒト肺腺癌細胞株の EGFR-TKI 耐性の惹起については本研究が世界で初めての報告であり、がん細胞以外の因子である細胞外マトリクスが EGFR-TKI における耐性機構に関与するという根拠を提供した。

EGFR-TKI 耐性機構として、EGFR 下流におけるシグナル伝達の変化が挙げられる。EGFR 下流に存在する生存因子である ERK および Akt のリン酸化亢進は EGFR-TKI 耐性に寄与することが報告されている<sup>31</sup>。また、側副シグナルとしては Stat3 や p38 のリン酸化亢進が知られている<sup>31</sup>。さらに、Collagen type I のような細胞外マトリクスは、その受容体であるインテグリンを介してがん細胞の薬剤耐性に関与することが報告されている<sup>39</sup>。本研究では、Collagen+ 群および Collagen- 群間において、ERK、Akt、Stat3、p38、FAK において顕著なリン酸化変化は認められず、EGFR-TKI 処理下においてそれぞれの因子におけるリン酸化は抑制および減少していることが

認められた。EGFR-TKI 処理下における Collagen+ 群において、特異的にリン酸化が上昇している生存因子は認められなかったことから、上記生存因子は Collagen type I による EGFR-TKI 耐性に関与する責任因子でないことが示唆された。

Collagen+ 群 における特徴的な変化として細胞の大型化が認められた。細胞の大型化の要因としては、細胞周期の変化や細胞内タンパク質合成の上昇が報告されている<sup>43-45</sup>。そこで我々は、細胞の大型化に関与し ERK や Akt の下流に存在する生存因子として mTOR に着目した。mTOR は、mTOR Complex 1 (mTORC1) および mTOR Complex 2 (mTORC2) と呼ばれる機能の異なる 2 種類のタンパク質複合体を形成している<sup>46</sup>。mTORC1 は、タンパク質合成および細胞周期の進行を制御しており、代謝を制御することが知られている<sup>47</sup>。また、mTORC2 は、Akt などのキナーゼを介して細胞骨格や細胞の生存に寄与していることが知られている<sup>48</sup>。本研究では、Akt における Serine473 のリン酸化を検討した。Akt における Serine473 のリン酸化部位は、mTORC2 と直接的に相互作用を行うことが知られている<sup>49</sup>。前述の通り、EGFR-TKI 処理下において Collagen+ 群では Akt における Serine473 のリン酸化が抑制されていた。そのため、本研究で発見された Collagen type I が誘導する EGFR-TKI 耐性機序において mTORC2 は関与しないことが示唆された。そのため、Collagen+ 群では mTORC1 の活性化が引き起こされている可能性を考え、mTORC1 の活性化を確認した。mTOR の活性指標である p70S6K は、mTORC1 のシグナル伝達において直下に存在する分子であり、Collagen+ 群において顕著なリン酸化が認められた。この



ことから、Collagen type I による mTOR の活性化において mTORC1 の重要性が考えられた。さらに、Collagen+ 群における EGFR-TKI 処理前後では p70S6K のリン酸化状態は変わらず、高度なリン酸化状態が維持されていることも明らかになった。これは、がん細胞が Collagen type I と接触することにより mTOR の活性化が引き起こされ、EGFR-TKI 処理下でも mTOR の活性化が維持されている可能性が考えられる。また、EGFR-TKI および 2 種類の mTOR inhibitor の併用処理により Collagen+ 群における細胞生存率の低下が認められたことから、mTOR 活性化が EGFR-TKI 耐性における責任因子であることが明らかになった。本検討に用いた Rapamycin は、mTORC2 に作用せず mTORC1 特異的な活性をもつ mTOR inhibitor であることが報告されている<sup>50,51</sup>。このことから、本研究により明らかにした Collagen type I による EGFR-TKI 耐性は、mTORC1 の活性化が重要であり、mTORC2 は関与しないことが示唆された。さらに、本研究で明らかにした Collagen type I による EGFR-TKI 耐性は、Collagen type I により mTORC1 の活性化が引き起こされ、EGFR-TKI 処理下においても mTORC1 の活性化が維持されていることが要因であるため、EGFR-TKI の初期耐性機構であることが示唆された。また、Collagen+ 群において Akt のリン酸化が低下する理由として、mTORC1 による Insulin receptor substrates 1 (IRS1) の抑制が挙げられる<sup>49,51</sup>。IRS1 は Akt を中心した Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナル伝達において最も上流に存在する分子であり、IRS1 の抑制は Akt の抑制に繋がることが知られている<sup>49</sup>。そのため、Collagen+ 群における mTORC1 の活性化に伴

い、IRS1 が抑制されることにより Akt のリン酸化が低下する可能性が考えられる。

本研究では、臨床検体における Collagen type I の堆積と EGFR-TKI の奏功割合において Collagen-rich 群において PFS の有意な短縮が認められた。この結果から、我々が明らかにした Collagen type I によるがん細胞の EGFR-TKI 耐性が生体内においても同様に引き起こされている可能性が考えられた。しかしながら、本検討の制限が 2 点存在しており、更なる検討を行うことでより確実な検証が可能であると考えられる。1 点目は、Collagen type I が豊富な腫瘍組織における mTORC1 の活性化を直接検討できていない点である。mTORC1 の活性化は p70S6K のリン酸化で検討可能である。しかしながら、染色特異性の欠如から適切な p70S6K のリン酸化抗体を用いた検討ができないことが挙げられた。そのため、染色特異性の高い p70S6K のリン酸化抗体を入手することや代替となるマーカーを用いて Collagen type I が豊富な腫瘍を染色することで、本研究により明らかにされた Collagen type I による mTORC1 活性化および EGFR-TKI 耐性における生体内での確認が行える可能性が考えられる。

2 点目は、用いた臨床検体数の制限である。Collagen-rich 群および Control 群 に大別する際に、Collagen-rich 群における検体数が少数であった。そのため、より多くの検体を用いることにより Collagen-rich 群を増加させた後に臨床統計解析を行うことで、生体内における Collagen type I による EGFR-TKI の詳細な解析が行える可能性があると考えられる。さらに、本現象を生体に応用していくためには、マウス等を用いた動物実験が必要不可欠である。しかしながら、マウスにヒト由来腫瘍を播種させ

た場合では外部から加えたヒト由来 Collagen type I は分解されるため、マウスにおけるがん自然発症モデルマウスを用いる必要があると考えられる点。また、EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌におけるがん自然発症モデルマウスは現在研究段階であり、使用ができない点。以上の2点から、マウスにおける検討を行うことは困難であることが考えられる。そのため、革新的な3次元培養モデルとして知られるオルガノイド等を活用することにより、生体に近い環境の中における Collagen type I が誘導する EGFR-TKI 耐性の検討を行うことができる可能性がある。

さらに、Collagen type I による mTOR の活性化において EGFR 遺伝子変異陽性の細胞株特異的なものであるか疑問が残っていた。そこで、EGFR 遺伝子変異陰性細胞株 (A549、A427、H1299) においても Collagen type I による mTORC1 の活性化を検討した結果、mTORC1 の活性化が認められた (Supp Fig 3)。このことから、Collagen type I による mTORC1 の活性化は、EGFR における遺伝子変異の有無に関わらず、普遍的な現象である可能性が考えられた。今後は肺がんに限らず、様々な臓器由来がん細胞株を用いて Collagen type I による mTORC1 の活性化を検討することにより、臓器横断的ながん細胞の治療を目指した有用な知見になりうることを期待される。

## (v) 結論

Collagen type I による mTORC1 の活性化を示し、mTORC1 の活性化が生じることにより EGFR-TKI 処理下のがん細胞は生存していることを示した (Fig 8)。また、この耐性機構は EGFR-TKI と mTOR inhibitor により解除可能であることも明らかになった。臨床検体における解析においても、Collagen type I が豊富な腫瘍では EGFR-TKI の奏功が低下しており、生体内においても同様に Collagen type I による EGFR-TKI 耐性が生じている可能性が示唆された。本研究の成果は、Collagen type I のような細胞外マトリクスが EGFR-TKI の耐性に寄与するという新たな概念を提供し、がん組織におけるがん以外の因子を考慮した将来の創薬および治療に貢献することが期待される。

## VII. Collagen type I による mTORC1 活性化機構の解明

### (i) 序論

これまでの検討により、Collagen type I はがん細胞の mTORC1 を Akt 非依存的に活性化させる。さらに、前述した mTORC1 の活性化は、EGFR-TKI 処理下において EGFR-TKI 初期耐性に繋がることを明らかにした。また、EGFR 遺伝子変異陽性のヒト肺腺癌細胞株のみならず、EGFR 遺伝子変異陰性のヒト肺腺癌細胞株においても同様に本現象が認められることが明らかになり、EGFR 変異の有無によらない普遍的な現象である可能性が考えられた。しかしながら、Collagen type I がどのような機構により mTORC1 の活性化を引き起こしているのか、未だ解明できていないことが挙げられた。

mTORC1 は、本来アミノ酸や Growth factor 等の栄養源を感知した後に、リソソーム表面上に局在変化することで活性化する<sup>50,52</sup>。活性化した mTORC1 は、タンパク質の翻訳を介して細胞の成長や増殖を制御するタンパク質キナーゼであることが知られている<sup>52,53</sup>。また、Akt 非依存的な mTORC1 の活性化では、脂質キナーゼである human phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (hVps34) がアミノ酸によって Akt 非依存的に mTORC1 の活性化を引き起こすことが報告されている<sup>54</sup>。さらに、Leucin や Arginine といったアミノ酸は Rag GTPase を mTORC1 に結合させ、mTORC1 の活性化を引き起こすことも知られている<sup>55-57</sup>。これらの知見から、Collagen

type I による Akt 非依存的な mTORC1 の活性化は、アミノ酸等の栄養源による mTORC1 の活性化機構を介している可能性が考えられた<sup>58</sup>。

細胞がマトリクスを栄養源として使うためには、以下の経路が考えられた。1つ目は、細胞外において Matrix metalloproteinases (MMPs) のようなマトリクス分解酵素により Collagen type I を細胞内に吸収可能な Collagen peptide にして取り込む方法。2つ目は、エンドサイトーシス等の機構により細胞外マトリクスを直接的に細胞内へ取り込む方法である<sup>59</sup>。また、膵管腺癌と上皮細胞は細胞外マトリクスを細胞内に取り込むことにより細胞生存や増殖を引き起こしていることが報告されている<sup>60,61</sup>。これらのことから、Collagen type I が Akt 非依存的に mTORC1 を活性化させる機構としては、Collagen type I をがん細胞が前述した経路により細胞内に取り込み、細胞内に蓄積した分解産物が mTORC1 を活性化している可能性が考えられた (Fig 9)。

## (ii) 目的

本研究の目的は、Collagen type I によるがん細胞の Akt 非依存的な mTORC1 活性化機構を明らかにすることである。また、肺がんのみならず他のがん種においても本現象が認められるか検討を行い、本現象の普遍性についても検討することである。研究は以下の手順で行った。

1. Collagen type I による mTORC1 活性化に伴う局在変化観察および蛍光標識された Collagen type I を用いた Collagen type I の細胞内取り込み能を検討した。
2. Collagen type I によるがん細胞内の代謝変化および Collagen type I を構成する主要なアミノ酸 (Glycine、Proline、Hydroxyproline) 添加による mTORC1 活性化を検討した。
3. がん細胞における Collagen type I の細胞内取り込み機構を MMPs および Macropinocytosis、Endocytosis の 3 経路から検討を行った。
4. がん細胞において同定した Collagen type I の細胞内取り込み機構が、肺がん以外のがん種においても共通であるのか確認を行った。

### (iii) 結果

#### (1) Collagen type I による PC-9 細胞の mTORC1 局在変化

Collagen type I 由来の栄養因子によって、PC-9 細胞の mTORC1 が活性しているか検討するため、Collagen+ 群および Collagen- 群における蛍光免疫染色によって mTORC1 の局在変化を観察した。観察したタンパク質は、リソソーム表面のマーカである Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2)、mTORC1 の複合体の1つである Raptor を用いた。LAMP2 および Raptor はそれぞれ GFP と mRFP で蛍光標識し、共局在している蛍光部分は黄色蛍光で観察可能である。また、細胞核は DAPI で染色を行った (Fig 10A)。その結果、Collagen+ 群において共局在している黄色蛍光を含む共局在陽性細胞割合が、Collagen- 群と比べ有意に増加していた。また、Raptor の蛍光強度を検討した結果、mRFP の赤色蛍光強度が上昇していた (Fig 10B)。以上の結果から、Collagen type I は PC-9 細胞の mTORC1 をリソソーム表面上に移行させ、活性化させていることが明らかになった。また、Raptor の蛍光強度が上昇していたことから、mTORC1 の発現量を増加させている可能性が考えられた。そこで、Collagen type I によるがん細胞の mTORC1 活性化機構について、Collagen type I およびその分解産物を細胞内に取り込んでいる可能性を検討した。

#### (2) PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み確認

PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み能を検討するために、凝集状



態から分散した状態に移行することにより緑色蛍光を呈する蛍光標識 Collagen type I を用いた。フローサイトメトリーを用いた細胞内に Collagen type I を取り込んだ細胞の検出では、蛍光標識 Collagen type I 添加 1 時間後に蛍光強度の上昇が確認され、48 時間時点においては蛍光強度の上昇が顕著に認められた (Fig 11A, 11B)。さらに、共焦点顕微鏡を用いた蛍光標識 Collagen type I を添加した細胞群における観察では、48 時間時点において PC-9-mRFP 細胞内に緑色の蛍光が観察された (Fig 11C)。このことから、PC-9 細胞は Collagen type I およびその分解産物を細胞内に取り込む可能性が明らかになった。

### (3) Collagen type I による PC-9 細胞の代謝変化における検討

PC-9 細胞が Collagen type I およびその分解産物を取り込む可能性から、PC-9 細胞における代謝変化や Collagen type I 由来の栄養因子が細胞内に蓄積する可能性を考えた。そのため、Collagen+ 群および Collagen- 群におけるメタボローム解析を行い、細胞内における代謝産物を検討した。まず、通常の検討通りに Collagen type I を固相化しその上層に PC-9 細胞を播種し、メタボローム解析を行った。しかしながら Collagen+ 群において、メタボローム解析を行う際に処理した内部標準試料が著しく変化したため解析不能であった。そのため、Collagen type I を固相化せずに液体状のまま PC-9 細胞に処理を行うことにした。PC-9 細胞に液体状の Collagen type I を処理し、1 時間、6 時間、24 時間、48 時間時点におけるメタボローム解析を行った。

その結果、主成分分析において、Collagen+ 群および Collagen- 群は 2 群に大別することができ、各時間時点における Collagen+ 群および Collagen- 群を比較すると、Collagen+ 群は PC1 値が+、PC2 値が- 側にシフトしていることが認められた (Fig 12)。さらに、細胞内において Fold changes > 1.5 で 1 時間、6 時間、24 時間、48 時間時点に共通して上昇が認められた代謝産物は、アミノ酸および糖類であった。上昇が認められていた代謝産物を Table 8 に示す。以上の結果より、Collagen+ 群における PC-9 細胞は Collagen type I を取り込むことにより代謝変化をしていることが明らかになった。そこで、mTORC1 を活性化する要因として挙げられるアミノ酸について、Collagen type I を構成する主要なアミノ酸を用いて PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性の惹起および mTORC1 の活性化について確認を行った。

#### (4) Collagen type I を構成する主要なアミノ酸による PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性と mTORC1 活性化における検討

Collagen type I を構成する主要なアミノ酸は、Glycine、Proline、Hydroxyproline であることが知られている。そのため、Glycine、Proline、Hydroxyproline を用いたアミノ酸添加による PC-9 細胞における EGFR-TKI 耐性の惹起および mTORC1 活性化を検討した。まず、2 種類の濃度における Glycine、Proline、Hydroxyproline を PC-9 細胞に添加し細胞増殖能を検討した。PC-9 細胞の細胞増殖能は、Glycine、Proline、Hydroxyproline 添加による変化は認められなかった (Supp Fig 4)。次に、2 種類の濃度

における Glycine を添加し、PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性変化を検討した。その結果、Glycine 添加群における PC-9 細胞の細胞生存率は、Glycine 非添加群と変わらず、Glycine 添加における PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性の誘導は認められなかった (Fig 13A)。一方、2種類の濃度における Proline および Hydroxyproline を PC-9 細胞に添加すると、Proline および Hydroxyproline 非添加群に比べて細胞生存率が上昇し、両アミノ酸による PC-9 細胞における EGFR-TKI 耐性の惹起が認められた (Fig 13B, 13C)。以上の結果から、Proline および Hydroxyproline が PC-9 細胞における EGFR-TKI 耐性に関与することが明らかになった。

さらに、両アミノ酸による PC-9 細胞における mTORC1 の活性化を検討した。Proline を添加した際に認められた PC-9 細胞の細胞生存率の上昇は、Gefitinib と Everolimus の併用により Proline 非添加群と同程度まで低下した (Fig 13D)。また、Hydroxyproline 添加により PC-9 細胞の p70S6K のリン酸化が上昇し、Gefitinib と Everolimus の併用処理を行うことで細胞生存率が Hydroxyproline 非添加群と同程度まで低下した (Fig 13E, 13F)。以上の結果から、Proline および Hydroxyproline は PC-9 細胞の mTORC1 を活性化させることで、EGFR-TKI 耐性を惹起させることが明らかになった。つまり、Collagen type I 由来アミノ酸によりがん細胞の mTORC1 が活性化可能であり、mTORC1 の活性化は EGFR-TKI 耐性を引き起こす可能性が明らかになった。

(5) PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み機構における検討

(i) GM6001 (MMPs inhibitor) を用いた Collagen type I 取り込み機構の検討

PC-9 細胞が Collagen type I を取り込む機構として、細胞外における MMPs により Collagen type I を細胞内に吸収可能な Collagen peptide にして取り込む機構について検討を行った。MMPs inhibitor である GM6001 処理による PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み変化をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、蛍光標識した Collagen type I 単独処理群での蛍光強度 (赤色) に比べ、GM6001 と Collagen type I の併用処理群における蛍光強度 (青色) の変化は認められなかった (Fig 14A)。さらに、Gefitinib と GM6001 における Collagen type I による EGFR-TKI 耐性解除を検討した。Collagen+ 群および Collagen- 群における Gefitinib と GM6001 の併用処理群を比較すると、Gefitinib 単独処理群と同様に Collagen+ 群において有意な細胞生存率の上昇が認められ、Collagen+ 群における EGFR-TKI 耐性が示された (Fig 14B, 14C)。以上から、MMPs inhibitor は、PC-9 細胞の Collagen type I 取り込みおよび EGFR-TKI 耐性に関与しないことが明らかになった。つまり、Collagen type I の細胞内取り込み機構において、MMPs は関与していないことが示唆された。

(ii) Pitstop2、Dyngo4a (Endocytosis inhibitor) を用いた Collagen type I 取り込み

## 機構における検討

PC-9 細胞が Collagen type I を取り込む機構として、Collagen type I を直接細胞内に吸収する機構である Endocytosis について検討を行った。Endocytosis における機構では、Clathrin 介在性および Caveolae 介在性の 2 経路が知られている<sup>62,63</sup>。そのため、それぞれに対応した inhibitor を用いて、Collagen type I の取り込み機構を検討した。Pitstop2 および Dyngo4a と Collagen type I を併用処理した群の蛍光強度 (青色) は、Collagen type I を単独処理した蛍光強度 (赤色) と比較し変化が認められなかった (Fig 15A)。このことから、Pitstop2 および Dyngo4a は PC-9 細胞の Collagen type I 取り込みを抑制しないことが明らかになった。Clathrin 介在性および Caveolae 介在性の Endocytosis が関与していないことから、細胞内に直接細胞外タンパク質を直接取り込むことができる別の機構として Macropinocytosis に着目した。

- (iii) EIPA (Macropinocytosis inhibitor) を用いた Collagen type I 取り込み機構における検討

EIPA を用いて、PC-9 細胞の Collagen type I 取り込み変化を検討した。EIPA と Collagen type I を併用処理した群の蛍光強度 (青色) は、Collagen type I を単独処理した蛍光強度 (赤色) と比較し低下が認められた (Fig 15B)。

また、EGFR-TKI と EIPA による併用処理下による Collagen+ 群および Collagen- 群における PC-9 細胞の mTORC1 活性化変化を検討した。その結果、Collagen+ 群における Gefitinib 単独処理で認められた p70S6K の高度リン酸化は、Gefitinib と EIPA の併用処理により抑制することが明らかになった (Fig 15C)。このことから、EIPA は PC-9 細胞における Collagen type I の取り込みを抑制し、mTORC1 の活性化を低下させることが明らかになった。さらに、Gefitinib と EIPA の併用処理における Collagen type I による EGFR-TKI 耐性の解除を検討した。Collagen+ 群および Collagen- 群における Gefitinib と EIPA の併用処理群を比較すると、Gefitinib 単独処理群と異なり Collagen+ 群および Collagen- 群の細胞生存率は同程度であった (Fig 15D, 15E)。以上から、EIPA は、Collagen type I による PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性を解除可能であることが示唆された。つまり、Macropinocytosis inhibitor による Macropinocytosis の抑制は、PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込みを抑制および mTORC1 の活性化を抑制することで結果的に、EGFR-TKI 耐性を解除できることが明らかになった。

#### (6) Macropinocytosis 抑制における PC-9 細胞の Collagen type I 取り込み変化の検討

EIPA を用いた検討により、PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み機構に Macropinocytosis が関与していることが示唆された。そこで、EIPA と比較しより標的

が明確な inhibitor が存在し、Macropinocytosis に関わる主要な分子である RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1) に着目した<sup>64,65</sup>。

(i) Rac1 抑制による Collagen type I 取り込み抑制および EGFR-TKI 耐性解除の検討

Rac1 の抑制による Macropinocytosis 抑制における PC-9 細胞の Collagen type I 取り込みおよび EGFR-TKI 耐性変化を検討した。まず、Rac1 inhibitor である NSC23766 を用いて PC-9 細胞における Collagen type I の取り込み変化を検討した。その結果、NSC23766 と Collagen type I を併用処理した群の蛍光強度 (青色) は、Collagen type I を単独処理した蛍光強度 (赤色) と比較し低下が認められた (Fig 16A)。さらに、Gefitinib と NSC23766 における Collagen type I による EGFR-TKI 耐性の解除を検討した。Collagen+ 群および Collagen- 群における Gefitinib と NSC23766 の併用処理群を比較すると、Gefitinib 単独処理群と異なり Collagen+ 群および Collagen- 群の細胞生存率は同程度であった (Fig 16B)。このことから、Rac1 による Macropinocytosis の抑制は PC-9 細胞の Collagen type I 取り込みを抑制し、EGFR-TKI 耐性を解除可能であることが明らかになった。

(ii) shRac1 を用いた Collagen type I 取り込み機構における検討

さらに、Rac1 抑制を shRNA を用いて行い、Collagen+ 群における PC-9

細胞の EGFR-TKI 耐性変化を検討した。まず、PC-9 細胞において shRac1 ベクターをレンチウイルスによって細胞に導入し、Rac1 発現が抑制される PC-9 細胞を樹立した (Fig 16C, 16D)。次に、Collagen+ 群および Collagen- 群における PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性変化を検討した。その結果、PC-9 細胞の shRac1 導入群において Collagen+ 群および Collagen- 群における細胞生存率は同程度であった (Fig 16E)。以上から、Rac1 抑制による Macropinocytosis の抑制は、PC-9 細胞における Collagen type I による EGFR-TKI 耐性を解除できることが示唆された。つまり、PC-9 細胞における Collagen type I による mTORC1 活性化機構には、Macropinocytosis による Collagen type I の取り込みが重要な要素であり、Collagen type I の取り込みは mTORC1 の活性化を誘導し、結果的に EGFR-TKI 耐性を生じさせるという分子機構が示唆された (Fig 17)。

#### (7) 肺がん以外のがん種における Collagen type I による抗がん剤耐性

肺がん以外のがん種において、Collagen type I が抗がん剤耐性に関与するかを検討するため、レンチウイルスを用いて mRFP ベクターを細胞に導入し蛍光標識した TE-10-mRFP、HCT116-mRFP、BxPC-3-mRFP 細胞を用いて、それぞれのがん種における臨床的に用いられている抗がん剤である Cisplatin、5-Fluorouracil (5-FU)、Gemcitabine 処理後の細胞生存率変化を Collagen+ 群と Collagen- 群において検討



した。その結果、BxPC-3-mRFP 細胞以外の TE-10-mRFP および HCT116-mRFP 細胞における Collagen+ 群では、Collagen- 群と比較し有意に細胞生存割合の上昇が認められた (Fig 18A, 18B)。さらに、3 細胞株における mTORC1 の活性化を検討した結果、全ての細胞株において p70S6K の高度なリン酸化が認められ、mTORC1 が活性化していることが明らかになった (Fig 18C)。このことから、Collagen type I は TE-10-mRFP、HCT116-mRFP、BxPC-3-mRFP 細胞の mTORC1 を活性化するものの、TE-10-mRFP および HCT116-mRFP 細胞のみに抗がん剤耐性を誘導することが明らかになった。そこで、Collagen type I によって抗がん剤耐性が誘導された TE-10 および HCT116 の 2 細胞株について、前述したがん細胞における Collagen type I の細胞内取り込みによる薬剤耐性機構が認められるか検討を行うことにした。

#### (8) TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の取り込み確認

(2) と同様に、がん細胞内における Collagen type I の取り込みを確認した。フローサイトメトリーを用いた細胞内に Collagen type I を取り込んだ細胞の検出では、TE-10 および HCT116 の両細胞株において蛍光標識 Collagen type I 添加 1 時間後に蛍光強度の上昇が確認され、48 時間時点においては蛍光強度の上昇が顕著に認められた (Fig 19A, 19B)。このことから、肺がん以外のがん種である TE-10 および HCT116 細胞においても Collagen type I を細胞内に取り込む可能性が明らかになった。

#### (9) TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の取り込み抑制の検討

EIPA を用いた Macropinocytosis 抑制による TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み変化を検討した。TE-10 および HCT116 の両細胞株において EIPA と Collagen type I を併用処理した群の蛍光強度 (青色) は、Collagen type I を単独処理した蛍光強度 (赤色) と比較し低下が認められた (Fig 20A)。同様に、NSC23766 を用いて TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の取り込み変化を検討した。その結果、NSC23766 と Collagen type I を併用処理した群の蛍光強度 (青色) は、Collagen type I を単独処理した蛍光強度 (赤色) と比較し低下が認められた (Fig 20B)。さらに、Cisplatin および 5-FU と NSC23766 の併用処理における Collagen type I による抗がん剤耐性解除を検討した。Collagen+ 群および Collagen- 群における Cisplatin および 5-FU と NSC23766 の併用処理群を比較すると、各抗がん剤単独処理群と異なり Collagen+ 群および Collagen- 群の細胞生存率は同程度であった (Fig 20C)。以上の結果から、EIPA および Rac1 抑制による Macropinocytosis の抑制は、TE-10 と HCT116 細胞の Collagen type I 取り込みを抑制することで各抗がん剤耐性を解除できることが示唆された。

#### (iv) 考察

本研究においては、ヒト肺腺癌細胞株である PC-9 細胞およびヒト食道扁平上皮癌である TE-10 細胞、ヒト結腸腺癌細胞株である HCT116 細胞において、VI 章で示したように Collagen type I が誘導する mTORC1 の活性化を見出した。さらに、mTORC1 の活性化は、Macropinocytosis による Collagen type I の細胞内取り込みに起因することを示し、Collagen type I の細胞内取り込みは細胞内代謝変化を引き起こす可能性を初めて明らかにした。また、Macropinocytosis 抑制による Collagen type I の細胞内取り込み抑制は mTORC1 の活性化を抑制すること、Macropinocytosis 抑制と各細胞に対応した抗がん剤との併用処理により Collagen type I が誘導する薬剤耐性の解除が可能であることを示した。

PC-9 細胞および TE-10 細胞、HCT116 細胞は、Collagen+ 群において特異的に mTORC1 を活性化させていることを見出した。さらに、mTORC1 の複合体の 1 つである Raptor の蛍光強度の上昇から、mTORC1 が発現上昇している可能性が考えられた。mTORC1 の局在変化は、Akt 非依存的な経路として細胞内アミノ酸や栄養因子によって生じることも知られており、Collagen type I により何らかの mTORC1 活性化因子が細胞内に蓄積している可能性が考えられた<sup>66,67</sup>。また、PC-9 細胞および TE-10 細胞、HCT116 細胞は、Collagen type I を細胞内に取り込むことを新たに見出した。さらに、PC-9 細胞の Collagen+ 群と Collagen- 群においてメタボローム解析を行

った結果、Collagen+ 群と Collagen- 群において異なる代謝群に大別されることが明らかになった。このことにより、Collagen type I により PC-9 細胞の代謝経路が変化している可能性が考えられた。詳細な代謝産物解析において、1 時間、6 時間、24 時間、48 時間時点において共通して顕著に上昇が認められた代謝産物はアミノ酸と糖類であった。上昇が認められたアミノ酸は Glutamine であり、糖類において代表的なものは Glucose であった。Glutamine は、がん細胞の増殖や生存において密接に関わっていることが知られている<sup>68,69</sup>。さらに、Glutamine は mTORC1 の活性化に関わっていることも報告されており<sup>70</sup>、Collagen type I による mTORC1 の活性化において非常に重要なアミノ酸であることが考えられる。また、Glucose は Warburg らが提唱したがん細胞特有の代謝である「Warburg effect」に重要であることが知られている<sup>71,72</sup>。「Warburg effect」とは、がん細胞が好氣的環境下および嫌氣的環境下に関わらず、ミトコンドリアの酸化的リン酸化ではなく、解糖系により ATP を産生するという解糖系に偏重した代謝を行うことである<sup>73</sup>。そのため、がん細胞内において Glucose が蓄積する理由として 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、Collagen type I によりがん細胞の「Warburg effect」が活性化することにより、細胞内における Glucose の需要が高まっているため、Glucose の取り込み能が上昇した可能性である。さらに、mTORC1 の活性化は、Glucose 依存的に起こる可能性も報告されており、Glucose の供給過多における mTORC1 活性化の可能性が考えられる<sup>74</sup>。2 つ目は、Glutamine 等のアミノ酸代謝にがん細胞が依存することによる解糖系の低下が考えられる。つまり、

がん細胞内において代謝の Reprogramming が起こることにより Glutamine 代謝が盛んになり、がん細胞内のアミノ酸変動が盛んになることで Glucose が使われることなく、細胞内に蓄積していく可能性が考えられる。

さらに、Collagen type I を構成する主要なアミノ酸である Proline および Hydroxyproline により mTORC1 の活性化が認められた。mTORC1 を直接的に活性化させるアミノ酸としては、Leucin、Arginine が知られている<sup>75</sup>。そのため、Proline および Hydroxyproline が直接的もしくは他のアミノ酸に変化することにより mTORC1 を活性化させていると考えられる。しかしながら、メタボローム解析ではこれら Collagen type I を構成する主要なアミノ酸における顕著な細胞内蓄積は認められなかったため、直接的ではなく他のアミノ酸に変化することにより mTORC1 を活性化させている可能性が推察される。

Collagen type I を取り込む機構として、Macropinocytosis が関与していることを明らかにした。さらに、Macropinocytosis の抑制は Collagen type I における細胞内取り込みの抑制および mTORC1 活性化抑制を認めた。Collagen type I のような細胞外マトリクスを細胞内に取り囲む細胞として、基底膜上皮細胞、M2 macrophage や線維芽細胞等が挙げられる<sup>1</sup>。これらの細胞は、定常状態や飢餓状態において、Macropinocytosis や Mannose receptor C type 2 (uPARAP)、Integrin Subunit Beta 4 (ITGB4) 依存的に細胞外マトリクスを細胞内に取り込み細胞増殖や細胞生存を引き起こしていることが報告されている<sup>61,76-78</sup>。また、大腸がんや膵臓がんにおいて発が

んに関わる Ras 遺伝子に変異が生じているがん細胞では、Macropinocytosis の上昇と mTORC1 の活性化が知られている<sup>79-81</sup>。さらに、膵管腺癌においては、Collagen type I や Collagen type IV を細胞内に取り込むことで細胞内代謝変化を引き起こし、細胞増殖を上昇させていることが報告されている<sup>60</sup>。そのため、本研究で明らかにした Macropinocytosis により Collagen type I を細胞内に取り込み、その分解産物等により mTORC1 が活性化するという研究結果と矛盾しないと考えられる。

また、Macropinocytosis により Collagen type I を細胞内に取り込むという現象は、PC-9 細胞および TE-10 細胞、HCT116 細胞の全ての細胞株において共通して認められたことから、がん細胞において比較的高頻度に認められる現象である可能性がある。しかしながら、Macropinocytosis において特異的なマーカー分子の欠落により、臨床検体を用いた解析が困難な点が挙げられ、現状様々ながん種における細胞株を用いた検討にとどまっている。そのため、Macropinocytosis の特異的なマーカーが発見されることにより生体内における検討が可能になり、細胞外マトリクス周辺におけるがん細胞において本機構が活性化されているか詳細な検討が可能であると考えられる。また、Collagen type I が細胞内に取り込まれた後にどのような peptide やアミノ酸に分解され、mTOR の活性化を引き起こすのか解明に至らなかった。Collagen type I における細胞内分解産物を追跡するには、同位体標識した Collagen type I を用いることにより細胞内に蓄積している物質を同定できる可能性がある。さらに、mTOR を活性化する物質としては現在アミノ酸が知られているが、より活性化効率のよいペプチドが

存在する可能性もあり、細胞内に蓄積する **Collagen type I** 分解産物を今後解析していく必要があると考えられる。また、**Macropinocytosis** によって細胞内に取り込まれる物質は、細胞外マトリクスのみならず **BSA** 等のタンパク質をはじめとした様々なタンパク質を取り込む可能性がある。**Macropinocytosis** は取り込むタンパク質の特異性に欠け、**0.2 $\mu$ m ~ 5 $\mu$ m** のサイズ内におけるタンパク質を細胞内に取り込むことが可能である<sup>82</sup>。そのため、**Collagen type I** に限らず様々な細胞外マトリクスや栄養源となり得るタンパク質を添加することにより、**Macropinocytosis** による **mTORC1** 活性化における選択性が観察できる可能性があると考えられる。

(v) 結論

VI 章で明らかにした、Collagen type I による mTORC1 活性化において Macropinocytosis が Collagen type I の細胞内に取り込みに関与し、mTORC1 を活性化させていることを明らかにした (Fig21)。さらに、Macropinocytosis の抑制および EGFR-TKI の併用処理は Collagen type I における EGFR-TKI 耐性を解除することが可能であった。また、Collagen+ 群および Collagen- 群における代謝変化が生じていることが明らかになり、Collagen type I によるがん細胞の代謝変化が示唆された。代謝変化において変化が顕著な代謝産物は Glutamine および Glucose であり、どちらもがん細胞の代謝において非常に重要とされている代謝産物であった。本研究の成果は、Collagen type I のような細胞外マトリクスが細胞内代謝変化を生じさせると同時に、mTORC1 を活性化させることにより抗がん剤耐性を生じさせるという新規概念を提供している。そのため、生体内における本現象の有用性を検討していくことにより、がん細胞の代謝変化を考慮した新たな治療標的の探索に貢献されることが期待される。



## VIII. 総括

本研究では、Collagen type I による mTORC1 活性化およびそれに付随した EGFR-TKI 耐性の惹起を明らかにした。また、Collagen type I による mTORC1 活性化において Macropinocytosis による Collagen type I の細胞内取り込みが重要なこと、Collagen type I を細胞内に取り込むことによりがん細胞内の代謝変化が生じる可能性があることを明らかにした。さらに、肺がん以外の他がん種における細胞株を用いた検討により、がん細胞が Collagen type I を細胞内に取り込むことで薬剤耐性に寄与するという現象において生体における普遍性が考えられた。

がん組織における抗がん剤暴露後の特徴的な変化として線維化が挙げられる<sup>83</sup>。線維化とは、細胞外マトリクス産生細胞である線維芽細胞が刺激応答性に活性化することで、細胞周囲に細胞外マトリクスを産生することにより組織中に過剰な細胞外マトリクスの堆積が見られる状態である。また細胞外マトリクスの中でも、特に Collagen type I のような膠原線維が堆積することも知られている<sup>84</sup>。線維化をした組織中のがん細胞は、抗がん剤に暴露した後も生存をしていることが挙げられ、がんの再発に関与していることが考えられている<sup>85</sup>。このような病理的所見から、生体内においても本研究で明らかにした現象であるがん細胞が Collagen type I により mTORC1 を活性化させ、抗がん耐性を引き起こしている可能性が考えられる。さらに、このような線維化は臓器横断的に種々の難治がん組織で認められることが挙げられ、本現象が生

体内において普遍的に生じている可能性がある。そのため、がん細胞における **Macropinocytosis** がどのような機構を通じて生じているのかについて今後明らかにしていく必要があると考えられる。**Macropinocytosis** 活性化における受容体やマーカー分子を明らかにすることは、治療選択において有用であり、本研究で考案した **mTORC1** 抑制や **Macropinocytosis** 抑制と抗がん剤の併用が治療成績の向上における治療戦略として期待される。このように、組織恒常性を維持すると考えられてきた **Collagen type I** のような細胞外マトリクスにおいても、がん細胞の栄養源としての役割やがん細胞のシグナル伝達への影響など様々な観点から考察を深めていく必要があり、がん組織における細胞外マトリクスの新たな役割として解明が期待される。

## IX. 図表説明

Table 1. がん組織における細胞外マトリクスのタンパク質

Table 2. 本研究に用いた細胞株と medium

Table 3. 本研究で使用した抗がん剤および各種阻害剤と終濃度

Table 4. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列情報

Table 5. 本研究に用いた一次抗体の詳細

Table 6. sh RNA ベクターの配列情報

Table 7. 本研究で使用した臨床検体における Patient characteristics (n=87)

Table 8. PC-9 細胞のメタボローム解析における 1 時間、6 時間、24 時間、48 時間時点

において共通して上昇が認められた特徴的な代謝産物

### Fig 1. 肺がん組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色像

肺がん組織は、肺がん細胞 (黒く塗りつぶした部分)とその周囲を取り囲む間質細胞および細胞外マトリクスから構成される。

### Fig 2. Collagen type I を用いた観察系の構築

- (A) 蛍光顕微鏡による細胞蛍光割合および細胞形態評価が可能な観察系の概略図
- (B) 本観察系を用いた Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群におけるがん細胞の蛍光顕微鏡による観察像
- (C) 本観察系を用いた Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群におけるがん細胞の細胞切片による形態観察像

### Fig 3. Collagen type I による PC-9 および HCC827 細胞における EGFR-TKI 耐性

- (A) 検討に用いた Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における概略図
- (B) Gefitinb (EGFR-TKI) 処理前後における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群の蛍光顕微鏡による観察像
- (C) Gefitinb 処理による Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における細胞生存率変化。

Collagen<sup>+</sup> 群は、Collagen<sup>-</sup> 群と比較し、有意な細胞生存率の上昇が認められた。

(mean±SD, N=3 \*: P < 0.05)

Fig 4. Collagen type I による PC-9 の上皮間葉転換における表現型変化

- (A) 定量的 RT-PCR による上皮間葉転換に関わるマーカーの発現変化。上皮系細胞のマーカーである E-cadherin 発現と間葉系細胞のマーカーである Vimentin の発現は、Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群間において有意な変化が認められなかった。(mean±SD, N=3)
- (B) 免疫染色による上皮間葉転換に関わるマーカーの染色図。
- (C) 免疫染色における各マーカーの Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群間における陽性細胞数変化。Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群において E-cadherin および Vimentin 陽性細胞数割合は変化が認められなかった。(mean±SD, N=3, n=1000)

Fig 5. Collagen type I による EGFR シグナル伝達および側副シグナル伝達経路における生存因子のリン酸化変化

- (A) Western blotting を用いた Gefitinib 処理前後における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群の EGFR シグナル伝達に関わる生存因子のリン酸化変化。検討した各生存因子のリン酸化は、Gefitinib 処理により Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群で減弱および抑制が認められた。(N=3)
- (B) Western blotting を用いた Gefitinib 処理前後における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群の側副シグナル伝達に関わる生存因子のリン酸化変化。検討した各生存因子のリン酸化は、Gefitinib 処理により Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群

で減弱および抑制が認められた。(N=3)

- (C) Western blotting を用いた Gefitinib 処理前後における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群の ERK および Akt のさらに下流に存在する p70S6K (mTOR 活性化指標) のリン酸化変化。検討した p70S6K のリン酸化は、Collagen<sup>+</sup> 群で高度に認められ、Gefitinib 処理前後において変化は認められなかった。(N=3)

Fig 6. mTOR inhibitor を用いた Collagen<sup>+</sup> 群における表現形変化および EGFR-TKI

耐性の解除

- (A) Rapamycin および Everolimus (mTOR inhibitor) と Gefitinib の併用処理による Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における細胞生存率変化。Rapamycin および Everolimus と Gefitinib の併用処理により Collagen<sup>+</sup> 群の細胞生存率は、Collagen<sup>-</sup> 群と比較し、同定度まで細胞生存率が低下した。(mean±SD, N=3 \*: P < 0.05)
- (B) Rapamycin 処理前後における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における細胞形態変化の観察図。
- (C) Rapamycin 処理前後における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における細胞面積の変化。Collagen<sup>+</sup> 群で観察された細胞の大型化は、Rapamycin 処理により解除が認められた。(mean±SD, N=3, n=100 \*: P < 0.05)

Fig 7. 臨床検体を用いた Collagen type I 堆積による EGFR-TKI 奏功性の低下

(A) 臨床検体における Collagen type I 染色像 (Control tumor, Collagen-rich tumor)。

(B) 臨床検体を用いた Collagen type I の堆積と EGFR-TKI 奏功性における相関。

Collagen-rich tumor は、Control tumor と比較し RFS の変化は認めず、有意に PFS の短縮が認められた。(N=87 \*: P < 0.05)

Fig 8. Collagen type I によるがん細胞のシグナル伝達変化における概略図

本研究により明らかになった Collagen- 群と Collagen+ 群におけるシグナル伝達図を示した。Collagen+ 群は、Collagen type I により mTOR の活性化が認められた。

Fig 9. Collagen type I による mTORC1 活性化機構における仮説図

Collagen type I による mTORC1 活性化機構において、がん細胞内に Collagen type I が取り込まれることで栄養源の役割を担い、mTORC1 を活性化させるという仮説を考えた。

Fig 10. Collagen type I による PC-9 細胞の mTORC1 の局在変化

(A) 蛍光免疫染色による Collagen- 群および Collagen+ 群における LAMP2 と Raptor (mTORC1) および細胞核の染色図

(B) Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における LAMP2 と mTORC1 の共局在陽性細胞割合および Raptor の蛍光強度変化。Collagen<sup>+</sup> 群では、Collagen<sup>-</sup> 群と比較し共局在陽性細胞割合および Raptor の蛍光強度が有意に上昇していた。  
(mean±SD, N=3, n=100 \*: P < 0.05)

Fig 11. PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み

(A) フローサイトメトリーによる PC-9 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。PC-9 細胞は、蛍光標識された Collagen type I 添加 1 時間後から蛍光強度の上昇が認められ、添加 48 時間後においてはより顕著な蛍光強度の上昇を認めた。(N=3, n=10000)

(B) フローサイトメトリーによる PC-9 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析における蛍光強度変化。PC-9 細胞は、蛍光標識された Collagen type I 添加 1 時間後および 48 時間後で顕著な蛍光強度の上昇が認められた。  
(mean±SD, N=3, n=10000 \*: P < 0.05)

(C) 共焦点顕微鏡を用いた PC-9-mRFP 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。PC-9-mRFP 細胞は、48 時間時点において 蛍光標識された Collagen type I の細胞内における取り込みが確認された (白矢印)。(N=3)

Fig 12. Collagen type I による PC-9 細胞の代謝変化



主成分分析を用いて、PC-9 細胞の Collagen- 群および Collagen+ 群における代謝変化を図示した。Collagen+ 群は Collagen- 群と異なる集団に分類され、Collagen type I による PC-9 細胞における代謝変化の可能性が認められた。

Fig 13. Collagen type I を構成する主要なアミノ酸による抗がん剤耐性と mTORC1 活性化

(A) Glycin 添加による PC-9 細胞の EGFR-TKI 処理による細胞生存率変化。PC-9 細胞における生存率は、Glycin 添加による変化は認められなかった。(mean±SD, N=3)

(B) Proline 添加による PC-9 細胞の EGFR-TKI 処理による細胞生存率変化。PC-9 細胞における生存率は、Proline 添加により上昇が認められた。(mean±SD, N=3 \*: P < 0.05)

(C) Hydroxyproline 添加による PC-9 細胞の EGFR-TKI 処理による細胞生存率変化。PC-9 細胞における生存率は、Hydroxyproline 添加により上昇が認められた。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)

(D) Gefitinib と Everolimus の併用処理による Proline 添加における PC-9 細胞の細胞生存率変化。Gefitinib と Everolimus の併用処理は、PC-9 細胞における Proline 添加が誘導する EGFR-TKI 耐性の解除が認められた。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)

- (E) Western blotting を用いた Hydroxyproline 添加における PC-9 細胞の p70S6K のリン酸化変化。PC-9 細胞の p70S6K のリン酸化は、Hydroxyproline 添加により上昇が認められた。(N=3)
- (F) Gefitinib と Everolimus の併用処理による Hydroxyproline 添加における PC-9 細胞の細胞生存率変化。Gefitinib と Everolimus の併用処理は、PC-9 細胞における Hydroxyproline 添加が誘導する EGFR-TKI 耐性の解除が認められた。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)

Fig 14. GM6001 (MMPs inhibitor) を用いた PC-9 細胞における Collagen type I の細胞

内取り込み変化

- (A) フローサイトメトリーによる GM6001 処理下での PC-9 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。GM6001 と Collagen type I 併用処理群は、蛍光標識された Collagen type I 添加 48 時間後において Collagen type I 単独処理群と比較し、蛍光強度の低下が認められなかった。(N=3, n=10000)
- (B) GM6001 と Gefitinib 併用処理における Collagen- 群および Collagen+ 群の蛍光顕微鏡による観察像。
- (C) GM6001 と Gefitinib 併用処理における Collagen- 群および Collagen+ 群における細胞生存率変化。GM6001 と Gefitinib 併用処理における Collagen+ 群は、Collagen- 群と比較し、細胞生存率の変化が認められなかった。(mean±SD, N=3,

\*: P < 0.05)

Fig 15. Pitstop2, Dyno4a (Endocytosis inhibitor) および EIPA (Macropinocytosis inhibitor)

による PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込みと EGFR-TKI 耐性変化

- (A) フローサイトメトリーによる Pitstop2 および Dyno4a 処理下での PC-9 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。Pitstop2 および Dyno4a と Collagen type I 併用処理群は、蛍光標識された Collagen type I 添加 48 時間後において Collagen type I 単独処理群と比較し、蛍光強度の変化が認められなかった。(N=3, n=10000)
- (B) フローサイトメトリーによる EIPA 処理下での PC-9 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。EIPA と Collagen type I 併用処理群は、蛍光標識された Collagen type I 添加 48 時間後において Collagen type I 単独処理群と比較し、蛍光強度の低下が認められた。(N=3, n=10000)
- (C) Western blotting を用いた Gefitinib と EIPA 併用処理下における Collagen- 群および Collagen+ 群の p70S6K のリン酸化変化。検討した p70S6K のリン酸化は、Gefitinib 単独処理下で Collagen+ 群で高度に認められ、Gefitinib と EIPA を併用処理することにより p70S6K のリン酸化は低下した。(N=3)
- (D) EIPA と Collagen type I 併用処理群における Collagen- 群および Collagen+ 群

の蛍光顕微鏡による観察像。

- (E) EIPA と Gefitinib 併用処理における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における細胞生存率変化。EIPA と Gefitinib 併用処理における Collagen<sup>+</sup> 群は、Collagen<sup>-</sup> 群と比較し、細胞生存率が有意に低下した。(N=3, \*: P < 0.05)

Fig 16. Rac1 抑制下における PC-9 細胞の Collagen type I の細胞内取り込みおよび

EGFR-TKI 耐性変化

- (A) フローサイトメトリーによる NSC23766 (Rac1 inhibitor) 処理下での PC-9 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。NSC23766 と Collagen type I 併用処理群は、蛍光標識された Collagen type I 添加 48 時間後において Collagen type I 単独処理群と比較し、蛍光強度の低下が認められた。(N=3, n=10000)
- (B) NSC23766 と Gefitinib 併用処理における Collagen<sup>-</sup> 群および Collagen<sup>+</sup> 群における細胞生存率変化。NSC23766 と Gefitinib 併用処理における Collagen<sup>+</sup> 群は、Collagen<sup>-</sup> 群と比較し、細胞生存率が有意に低下した。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)
- (C) 定量的 RT-PCR を用いた shRac1 による PC-9 細胞のノックダウン効率の検討。sh#2 および sh#3 において shRac1 ベクター導入による PC-9 細胞における顕著な発現抑制が確認された。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)

(D) Western blotting を用いた shRac1 による PC-9 細胞のノックダウン効率の検討。

sh#2 および sh#3 において shRac1 ベクター導入による PC-9 細胞における顕著な発現抑制が確認された。(N=3)

(E) Gefitinib 処理下において shRac1 ベクター導入における PC-9 細胞の細胞生存率

変化。shRac1 導入群 (sh#2, sh#3) における細胞生存率は、Collagen+ 群において Control 群 (shluc) と比較し、有意に低下していた。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)

#### Fig 17. PC-9 細胞における Collagen type I による mTORC1 活性化機構の概略図

本研究により明らかになった PC-9 細胞の Collagen+ 群における mTORC1 活性化機構を示した。がん細胞は、Collagen type I を Macropinocytosis によって細胞内に取り込み、mTORC1 を活性化させることにより EGFR-TKI 耐性を引き起こすことが示された。

#### Fig 18. TE-10、HCT116 および BxPC-3 細胞における Collagen type I による抗がん剤

##### 耐性の誘導および mTORC1 活性化

(A) 各抗がん剤処理前後における Collagen- 群および Collagen+ 群の蛍光顕微鏡による観察像

(B) 各抗がん剤処理による Collagen- 群および Collagen+ 群における細胞生存率

変化。TE-10 および HCT116 細胞における Collagen+ 群は、Collagen- 群と比較し、有意に細胞生存率の上昇が認められた。(mean±SD, N=3 \*: P < 0.05)

(C) Western blotting を用いた各抗がん剤処理前後における Collagen- 群および Collagen+ 群の p70S6K のリン酸化変化。検討した p70S6K のリン酸化は、Collagen+ 群で高度に認められ、各抗がん剤処理前後において変化は認められなかった。(N=3)

Fig 19. TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み

(A) フローサイトメトリーによる TE-10 および HCT116 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析における蛍光強度変化。TE-10 および HCT116 細胞は、蛍光標識された Collagen type I 添加 1 時間後および 48 時間後で顕著な蛍光強度の上昇が認められた。(N=3, n=10000)

(B) フローサイトメトリーによる TE-10 および HCT116 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析における蛍光強度変化。TE-10 および HCT116 細胞は、蛍光標識された Collagen type I 添加 1 時間後および 48 時間後で顕著な蛍光強度の上昇が認められた。(mean±SD, N=3, n=10000 \*: P < 0.05)

Fig 20. Macropinocytosis および Rac1 inhibitor を用いた TE-10 と HCT116 細胞における Collagen type I の細胞内取り込みおよび抗がん剤耐性変化

- (A) フローサイトメトリーによる EIPA 処理下での TE-10 および HCT116 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。EIPA と Collagen type I 併用処理群は、蛍光標識された Collagen type I 添加 48 時間後において Collagen type I 単独処理群と比較し、蛍光強度の低下が認められた。(N=3, n=10000)
- (B) フローサイトメトリーによる NSC23766 (Rac1 inhibitor) 処理下での TE-10 および HCT116 細胞における蛍光標識された Collagen type I の取り込み解析。NSC23766 と Collagen type I 併用処理群は、蛍光標識された Collagen type I 添加 48 時間後において Collagen type I 単独処理群と比較し、蛍光強度の低下が認められた。(N=3, n=10000)
- (C) NSC23766 と各抗がん剤併用処理における TE-10 および HCT116 細胞の Collagen- 群および Collagen+ 群における細胞生存率変化。どちらの細胞株においても NSC23766 と Gefitinib 併用処理における Collagen+ 群は、Collagen- 群と比較し、細胞生存率が有意に低下した。(mean±SD, N=3, \*: P < 0.05)

Fig 21. 本研究によって明らかになったがん細胞における Collagen type I による

#### mTORC1 活性化機構の概略図

本研究により明らかになった Collagen+ 群における mTORC1 活性化機構を示した。がん細胞は、Collagen type I を Macropinocytosis によって細胞内に取り込み、mTORC1 を活性化させることにより EGFR-TKI および各抗がん剤耐性を引き起こ

すことが示された。

Supp Fig 1. コラーゲンを用いた観察系における PC-9-mRFP 細胞の蛍光割合と細胞数の相関

- (A) 本観察系を用いた Collagen- 群および Collagen+ 群における各細胞数における PC-9-mRFP 細胞の蛍光顕微鏡による観察像。
- (B) PC-9-mRFP 細胞の蛍光割合と細胞数の相関。Collagen- 群および Collagen+ 群において、PC-9-mRFP 細胞を播種後 12 時間では蛍光割合と細胞数は強い相関を示した。(mean±SD, N=3,  $R^2 > 0.9$ )

Supp Fig 2. Collagen type I による PC-9 および HCC827 細胞における細胞の大型化

- (A) Collagen- 群および Collagen+ 群における細胞切片を用いた細胞形態変化の観察図。
- (B) Collagen- 群および Collagen+ 群における細胞面積の変化。Collagen+ 群では細胞の面積が有意に上昇し、細胞の大型化が認められた。(mean±SD, N=3, n=100 \*:  $P < 0.05$ )

Supp Fig 3. EGFR 遺伝子変異陰性細胞株 (A549、A427、H1299) における mTORC1 活性化



Western blotting を用いた A549、A427、H1299 細胞における Collagen- 群および Collagen+ 群の p70S6K のリン酸化変化。p70S6K のリン酸化は、全ての細胞株における Collagen+ 群で高度に認められた。(N=3)

#### Supp Fig 4. Collagen type I を構成する主要なアミノ酸による細胞増殖能変化

Glycine、Proline、Hydroxyproline を用いたアミノ酸添加による PC-9 細胞における増殖能変化。Glycine、Proline、Hydroxyproline 添加における 72 時間後の細胞蛍光割合を算出した結果、細胞蛍光割合は各アミノ酸添加によって変化が認められなかった。

(mean±SD, N=3)

## X. 参考文献

- 1 Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews. Cancer* **4**, 839-849, doi:10.1038/nrc1477 (2004).
- 2 Valkenburg, K. C., de Groot, A. E. & Pienta, K. J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. **15**, 366-381, doi:10.1038/s41571-018-0007-1 (2018).
- 3 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 4 Cho, A., Howell, V. M. & Colvin, E. K. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer - A Piece of a Puzzle. *Frontiers in oncology* **5**, 245, doi:10.3389/fonc.2015.00245 (2015).
- 5 Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M. & White, E. S. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. **50**, doi:10.1183/13993003.01805-2016 (2017).
- 6 Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. & Moses, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**, 332-337, doi:10.1038/nature03096 (2004).
- 7 Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology* **196**, 395-406, doi:10.1083/jcb.201102147 (2012).
- 8 Ishii, G., Ochiai, A. & Neri, S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Advanced drug delivery reviews* **99**, 186-196, doi:10.1016/j.addr.2015.07.007 (2016).
- 9 Stylianopoulos, T., Munn, L. L. & Jain, R. K. Reengineering the Physical Microenvironment of Tumors to Improve Drug Delivery and Efficacy: From Mathematical Modeling to Bench to Bedside. *Trends in cancer* **4**, 292-319, doi:10.1016/j.trecan.2018.02.005 (2018).
- 10 Kakkad, S. M. *et al.* Hypoxic tumor microenvironments reduce collagen I fiber density. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **12**, 608-617, doi:10.1593/neo.10344 (2010).
- 11 Cohen, E. *et al.* Collagen I provides a survival advantage to MD-1483 head and neck squamous cell carcinoma cells through phosphoinositol 3-kinase signaling. *Anticancer research* **33**, 379-386 (2013).
- 12 Aoudjit, F. & Vuori, K. Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemotherapy research and practice* **2012**, 283181, doi:10.1155/2012/283181 (2012).
- 13 Dangi-Garimella, S. *et al.* Three-dimensional collagen I promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer through MT1-MMP-mediated expression of HMGGA2. *Cancer research* **71**, 1019-1028, doi:10.1158/0008-5472.can-10-1855 (2011).

- 14 Shields, M. A., Dangi-Garimella, S., Krantz, S. B., Bentrem, D. J. & Munshi, H. G. Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10495-10504, doi:10.1074/jbc.M110.195628 (2011).
- 15 Asamura, H. *et al.* A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **3**, 46-52, doi:10.1097/JTO.0b013e31815e8577 (2008).
- 16 Kosaka, T., Yatabe, Y., Onozato, R., Kuwano, H. & Mitsudomi, T. Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **4**, 22-29, doi:10.1097/JTO.0b013e3181914111 (2009).
- 17 Lynch, T. J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* **350**, 2129-2139, doi:10.1056/NEJMoa040938 (2004).
- 18 Liu, T. C., Jin, X., Wang, Y. & Wang, K. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *American journal of cancer research* **7**, 187-202 (2017).
- 19 Mok, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine* **361**, 947-957, doi:10.1056/NEJMoa0810699 (2009).
- 20 Mitsudomi, T. *et al.* Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **11**, 121-128, doi:10.1016/s1470-2045(09)70364-x (2010).
- 21 Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *The New England journal of medicine* **362**, 2380-2388, doi:10.1056/NEJMoa0909530 (2010).
- 22 Zhou, C. *et al.* Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet. Oncology* **12**, 735-742, doi:10.1016/s1470-2045(11)70184-x (2011).
- 23 Rosell, R. *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **13**, 239-246, doi:10.1016/s1470-2045(11)70393-x (2012).
- 24 Kosaka, T. *et al.* Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer:

- biological and clinical implications. *Cancer research* **64**, 8919-8923, doi:10.1158/0008-5472.can-04-2818 (2004).
- 25 Sica, G. *et al.* A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *The American journal of surgical pathology* **34**, 1155-1162, doi:10.1097/PAS.0b013e3181e4ee32 (2010).
- 26 Jackman, D. *et al.* Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 357-360, doi:10.1200/jco.2009.24.7049 (2010).
- 27 Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Lung cancer. *The New England journal of medicine* **359**, 1367-1380, doi:10.1056/NEJMra0802714 (2008).
- 28 Pao, W. & Chmielecki, J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature reviews. Cancer* **10**, 760-774, doi:10.1038/nrc2947 (2010).
- 29 Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine* **3**, 75ra26, doi:10.1126/scitranslmed.3002003 (2011).
- 30 Yu, H. A. *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 2240-2247, doi:10.1158/1078-0432.ccr-12-2246 (2013).
- 31 Ahsan, A. Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors and Therapeutic Approaches: An Update. *Advances in experimental medicine and biology* **893**, 137-153, doi:10.1007/978-3-319-24223-1\_7 (2016).
- 32 Yano, S. *et al.* Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**, 2011-2017, doi:10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd (2011).
- 33 Park, K. S. *et al.* CRIPTO1 expression in EGFR-mutant NSCLC elicits intrinsic EGFR-inhibitor resistance. *The Journal of clinical investigation* **124**, 3003-3015, doi:10.1172/jci73048 (2014).
- 34 Faber, A. C. *et al.* BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer discovery* **1**, 352-365, doi:10.1158/2159-8290.cd-11-0106 (2011).
- 35 Ng, K. P. *et al.* A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nature medicine* **18**, 521-528, doi:10.1038/nm.2713 (2012).
- 36 Yano, S. *et al.* Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung

- adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer research* **68**, 9479-9487, doi:10.1158/0008-5472.can-08-1643 (2008).
- 37 Engelman, J. A. *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 1039-1043, doi:10.1126/science.1141478 (2007).
- 38 Chang, Y. S., Choi, C. M. & Lee, J. C. Mechanisms of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance and Strategies to Overcome Resistance in Lung Adenocarcinoma. *Tuberculosis and respiratory diseases* **79**, 248-256, doi:10.4046/trd.2016.79.4.248 (2016).
- 39 Howe, G. A. *et al.* Focal Adhesion Kinase Inhibitors in Combination with Erlotinib Demonstrate Enhanced Anti-Tumor Activity in Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one* **11**, e0150567, doi:10.1371/journal.pone.0150567 (2016).
- 40 Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Molecular biology of the cell* **13**, 2276-2288, doi:10.1091/mbc.01-12-0584 (2002).
- 41 Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. & Blenis, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & development* **16**, 1472-1487, doi:10.1101/gad.995802 (2002).
- 42 Xi, K. X. *et al.* Tumor-stroma ratio (TSR) in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients after lung resection is a prognostic factor for survival. *Journal of thoracic disease* **9**, 4017-4026, doi:10.21037/jtd.2017.09.29 (2017).
- 43 Lloyd, A. C. The regulation of cell size. *Cell* **154**, 1194-1205, doi:10.1016/j.cell.2013.08.053 (2013).
- 44 Fingar, D. C. *et al.* mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* **24**, 200-216, doi:10.1128/mcb.24.1.200-216.2004 (2004).
- 45 Fingar, D. C. & Blenis, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**, 3151-3171, doi:10.1038/sj.onc.1207542 (2004).
- 46 Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* **122**, 3589-3594, doi:10.1242/jcs.051011 (2009).
- 47 Laplante, M. & Sabatini, D. M. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science* **126**, 1713-1719, doi:10.1242/jcs.125773 (2013).
- 48 Alessi, D. R., Pearce, L. R. & Garcia-Martinez, J. M. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science signaling* **2**, pe27, doi:10.1126/scisignal.267pe27 (2009).
- 49 Dibble, C. C., Asara, J. M. & Manning, B. D. Characterization of Rictor

- phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* **29**, 5657-5670, doi:10.1128/mcb.00735-09 (2009).
- 50 Sabatini, D. M. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 11818-11825, doi:10.1073/pnas.1716173114 (2017).
- 51 Kim, L. C., Cook, R. S. & Chen, J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* **36**, 2191-2201, doi:10.1038/onc.2016.363 (2017).
- 52 Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 21-35, doi:10.1038/nrm3025 (2011).
- 53 Morita, M. *et al.* mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **14**, 473-480, doi:10.4161/15384101.2014.991572 (2015).
- 54 Byfield, M. P., Murray, J. T. & Backer, J. M. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33076-33082, doi:10.1074/jbc.M507201200 (2005).
- 55 Lee, M. *et al.* Coordination of the leucine-sensing Rag GTPase cycle by leucyl-tRNA synthetase in the mTORC1 signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, E5279-e5288, doi:10.1073/pnas.1801287115 (2018).
- 56 Carroll, B. *et al.* Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. **5**, doi:10.7554/eLife.11058 (2016).
- 57 Lawrence, R. E. *et al.* A nutrient-induced affinity switch controls mTORC1 activation by its Rag GTPase-Ragulator lysosomal scaffold. *Nature cell biology* **20**, 1052-1063, doi:10.1038/s41556-018-0148-6 (2018).
- 58 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 (2017).
- 59 Finicle, B. T., Jayashankar, V. & Edinger, A. L. Nutrient scavenging in cancer. *Nature reviews. Cancer* **18**, 619-633, doi:10.1038/s41568-018-0048-x (2018).
- 60 Olivares, O. *et al.* Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun* **8**, 16031, doi:10.1038/ncomms16031 (2017).
- 61 Muranen, T. *et al.* Starved epithelial cells uptake extracellular matrix for survival. *Nat Commun* **8**, 13989, doi:10.1038/ncomms13989 (2017).
- 62 Kaksonen, M. & Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **19**, 313-326, doi:10.1038/nrm.2017.132 (2018).
- 63 Nabi, I. R. & Le, P. U. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology* **161**, 673-677, doi:10.1083/jcb.200302028 (2003).

- 64 Recouvreux, M. V. & Commisso, C. Macropinocytosis: A Metabolic Adaptation to Nutrient Stress in Cancer. *Frontiers in endocrinology* **8**, 261, doi:10.3389/fendo.2017.00261 (2017).
- 65 Fujii, M., Kawai, K., Egami, Y. & Araki, N. Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. *Scientific reports* **3**, 2385, doi:10.1038/srep02385 (2013).
- 66 Memmott, R. M. & Dennis, P. A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular signalling* **21**, 656-664, doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.004 (2009).
- 67 Zhang, W. *et al.* Evidence of mTOR Activation by an AKT-Independent Mechanism Provides Support for the Combined Treatment of PTEN-Deficient Prostate Tumors with mTOR and AKT Inhibitors. *Translational oncology* **5**, 422-429, doi:10.1593/tlo.12241 (2012).
- 68 Zhang, J., Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *The EMBO Journal* **36**, 1302-1315, doi:10.15252/emj.201696151 (2017).
- 69 Mohamed, A., Deng, X., Khuri, F. R. & Owonikoko, T. K. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer. *Clinical lung cancer* **15**, 7-15, doi:10.1016/j.clcc.2013.09.001 (2014).
- 70 van Geldermalsen, M. *et al.* ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene* **35**, 3201-3208, doi:10.1038/onc.2015.381 (2016).
- 71 Lebelo, M. T., Joubert, A. M. & Visagie, M. H. Warburg effect and its role in tumourigenesis. *Archives of Pharmacal Research* **42**, 833-847, doi:10.1007/s12272-019-01185-2 (2019).
- 72 Bartrons, R. & Caro, J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **39**, 223-229, doi:10.1007/s10863-007-9080-3 (2007).
- 73 Chen, X., Qian, Y. & Wu, S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. *Free radical biology & medicine* **79**, 253-263, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.027 (2015).
- 74 Almacellas, E. *et al.* Phosphofructokinases Axis Controls Glucose-Dependent mTORC1 Activation Driven by E2F1. *iScience* **20**, 434-448, doi:10.1016/j.isci.2019.09.040 (2019).
- 75 Yao, Y., Jones, E. & Inoki, K. Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells. *Biomolecules* **7**, doi:10.3390/biom7030051 (2017).
- 76 Madsen, D. H. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Derived from Circulating Inflammatory Monocytes Degrade Collagen through Cellular Uptake. *Cell reports* **21**,

- 3662-3671, doi:10.1016/j.celrep.2017.12.011 (2017).
- 77 Madsen, D. H. *et al.* M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *The Journal of cell biology* **202**, 951-966, doi:10.1083/jcb.201301081 (2013).
- 78 Bi, Y. *et al.* Endocytosis of collagen by hepatic stellate cells regulates extracellular matrix dynamics. *American journal of physiology. Cell physiology* **307**, C622-633, doi:10.1152/ajpcell.00086.2014 (2014).
- 79 Nakase, I., Kobayashi, N. B., Takatani-Nakase, T. & Yoshida, T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Scientific reports* **5**, 10300, doi:10.1038/srep10300 (2015).
- 80 Sung, S., Choi, J. & Cheong, H. Catabolic pathways regulated by mTORC1 are pivotal for survival and growth of cancer cells expressing mutant Ras. *Oncotarget* **6**, 40405-40417, doi:10.18632/oncotarget.6334 (2015).
- 81 Liu, X. & Ghosh, D. Intracellular nanoparticle delivery by oncogenic KRAS-mediated macropinocytosis. *International journal of nanomedicine* **14**, 6589-6600, doi:10.2147/ijn.s212861 (2019).
- 82 Ha, K. D., Bidlingmaier, S. M. & Liu, B. Macropinocytosis Exploitation by Cancers and Cancer Therapeutics. *Frontiers in physiology* **7**, 381, doi:10.3389/fphys.2016.00381 (2016).
- 83 Mancini, M. L. & Sonis, S. T. Mechanisms of cellular fibrosis associated with cancer regimen-related toxicities. *Frontiers in pharmacology* **5**, 51, doi:10.3389/fphar.2014.00051 (2014).
- 84 Yamauchi, M., Barker, T. H., Gibbons, D. L. & Kurie, J. M. The fibrotic tumor stroma. *The Journal of clinical investigation* **128**, 16-25, doi:10.1172/jci93554 (2018).
- 85 Chandler, C., Liu, T., Buckanovich, R. & Coffman, L. G. The double edge sword of fibrosis in cancer. *Translational research : The Journal of laboratory and clinical medicine* **209**, 55-67, doi:10.1016/j.trsl.2019.02.006 (2019).



## XI. 謝辞

本研究を行うにあたり、5年間にわたり熱心な御指導と御高配を賜りました東京大学新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野教授 兼 国立がん研究センター先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野分野長 石井源一郎教授に御礼申し上げます。

研究や発表に際し、有益な御指導と御助言を賜りました東京大学新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野教授 兼 国立がん研究センター東病院先端医療開発センター センター長 落合淳志教授に深謝致します。日常の議論で多くの知識、示唆を頂きました。

共同研究の形で研究遂行に御尽力頂いた国立がん研究センター・鶴岡連携拠点 がんメタボロミクス研究室 チームリーダー 牧野嶋秀樹先生に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で、親身に御指導、御協力を戴いた国立がん研究センター東病院先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野 藤井誠志先生、小嶋基寛先生、バイオマーカー探索トランスレーショナルリサーチ分野 光永修一先生、山内稚佐子先生、中村優香様、病理・臨床検査トランスレーショナルリサーチ分野 桑田健先生、トランスレーショナルインフォマティクス分野の土原一哉先生、新薬開発分野の安永正浩先生に御礼申し上げます。また研究生活を支えてくださった臨床腫瘍病理分野の大沼世史子さんを始めとしたスタッフ、そして学生の皆様々に感謝致します。

心から尊敬できる先生、先輩方に恵まれ、東京大学大学院生としての5年間、充実した研究生生活を送れたことを幸せに思います。

## XII. 図表

Table 1. がん組織における細胞外マトリクスのタンパク質

がん組織中における細胞外マトリクスのタンパク質名	
Fibril proteins	Collagen type I Collagen type III Collagen type IV Collagen type XI
Glycoproteins	Tenascin-C Tenascin-X Fibronectin Laminin
Proteoglycans	Hyaluron Decorin Lumican Versican Perlecan

Angela C et al., *Frontiers in Oncology*, 2015, (Modified)  
doi.org/10.3389/fonc.2015.00245

Burgstaller G et al., *European Respiratory Journal*, 2017, (Modified)  
doi: 10.1183/13993003.01805-2016

Table 2. 本研究に用いた細胞株と medium

Cell lines	Derived tissue	Medium
A427	ヒト肺腺癌細胞株	
H1299	ヒト肺腺癌細胞株	RPMI 1640
HCC827	ヒト肺腺癌細胞株	1% L-Glutamine
PC-9	ヒト肺腺癌細胞株	
A549	ヒト肺腺癌細胞株	DMEM - F12
TE-10	ヒト食道扁平上皮癌細胞株	
BxPC-3	ヒト膵臓腺癌細胞株	RMPI 1640
293T	ヒト胎児腎細胞株	
HCT116	ヒト結腸腺癌細胞株	DMEM medium

Table 3. 本研究で使用した抗がん剤および各種阻害剤と終濃度

Drug	Drug types	Concentration	Manufacturer
Gefitinib	EGFR-TKI	0.3 $\mu$ M	Tocris Bioscience
Rapamycin	mTOR inhibitor	8 $\mu$ M	東京化成工業
Everolimus	mTOR inhibitor	1 $\mu$ M	Selleckchem
GM6001	MMPs inhibitor	10 $\mu$ M	Millipore
EIPA	Macropinocytosis inhibitor	10 $\mu$ M	SIGMA
Pitstop2	Clathrin - endocytosis inhibitor	30 $\mu$ M	abcam
Dyngo4a	Clathrin and Caveolae - endocytosis inhibitor	60 $\mu$ M	abcam
NSC23766	Rac1 inhibitor	50 $\mu$ M	Tocris Bioscience
Cisplatin	プラチナ製剤	2.5 $\mu$ M	SIGMA
5-FU		10 $\mu$ M	協和キリン
Gemicitabine	ピリジミン系代謝拮抗薬	0.25 $\mu$ M	イーライリリー

Table 4. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列情報

Gene Name	Forward	Reverse
<i>E-cadherin</i>	5' - TTAAACTCCTGGCCTCAAGCAATC - 3'	5' - TCCTATCTTGGGCAAAGCAACTG - 3'
<i>Vimentin</i>	5' - TGAGTACCGGAGACAGGTGCAG - 3'	5' - TAGCAGCTTCAACGGCAAAGTTC - 3'
<i>Rac1</i>	5' - TCAGTTACACAACCAATGCATTTCC - 3'	5' - CAGCTGTATCCCATAAGCCCAGA - 3'
<i>GAPDH</i>	5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC - 3'	5' - TGGTGAAGACGCCAGTGGA - 3'

Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Table 2 (Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

Table 5. 本研究に用いた一次抗体の詳細

Antibody	Host	Dilution	Manufacturer	Experiment
Akt (pan)	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Collagen type I	Rabbit Polyclonal	1:1000	OriGene EU	immunohistochemistry
phospho - Akt	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
E-cadherin	Mouse Monoclonal	1:1000	DAKO	immunohistochemistry
EGFR	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Phospho - EGFR	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
p44/42 ERK	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Phospho - p44/42 ERK	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
FAK	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Phospho - FAK	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
p38	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Phospho - p38	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
p70S6Kinase	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Phospho - p70S6 Kinase	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Rac1	Mouse Monoclonal	1:1500	Cytoskeleton	Western blotting
Stat3	Mouse Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Phospho - Stat3 (Tyr705)	Rabbit Monoclonal	1:1000	Cell signaling	Western blotting
Vimentin	Mouse Monoclonal	1:1000	DAKO	immunohistochemistry
$\beta$ -Actin	Mouse Monoclonal	1:1000	Santa Cruz	Western blotting

Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Table 1 (Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

Table 6. shRNA ベクターの配列情報

Luciferase sh

5' - GATCCCC ACGTTGAGTGCTTCGGAAT ACGTGTGCTGTCCGT **ATTTCGAAGTACTCAGCGT** TTTTT GGAAAT - 3'

3' - GGG TGCAACTCACGAAGCCTTA TGCACACGACAGGCA **TAAAGCTTCATGAGTCGCA** AAAAA CCTTTAGATC - 5'

Rac1 sh#1

5' - GATCCCC GCATGTGTTCTCGATATAA ACGTGTGCTGTCCGT **TTATGTCGGGAACACGTGC** TTTTT GGAAAT - 3'

3' - GGG CGTACACAAGAGCTATATT TGCACACGACAGGCA **AATACAGCCCTTGTGCACG** AAAAA CCTTTAGATC - 5'

Rac1 sh#2

5' - GATCCCC GGGTCGGTCTTTGTGGTTT ACGTGTGCTGTCCGT **AAATCACAAAGACTGATCC** TTTTT GGAAAT - 3'

3' - GGG CCCAGCCAGAAACACCAAA TGCACACGACAGGCA **TTTAGTGTCTGACTAGG** AAAAA CCTTTAGATC - 5'

Rac1 sh#3

5' - GATCCCC GGTGGTGTGTCAGGGAT ACGTGTGCTGTCCGT **ATTCCTGATAATACCAACC** TTTTT GGAAAT - 3'

3' - GGG CCAACCACAACAGTCCCTA TGCACACGACAGGCA **TAAGGACTATTATGGTTGG** AAAAA CCTTTAGATC - 5'



Table 7. 本研究で使用した臨床検体における Patient characteristics (n=87)

Characteristics	No. of patients (%)	Collagen type I		P-value
		Rich N (%)	Control N (%)	
Total	87	6 (7)	81 (93)	
Age				
< 65	43 (49)	2 (5)	41 (95)	0.676
≥ 65	44 (51)	4 (9)	40 (49)	
Gender				
Female	49	2 (4)	47 (96)	0.397
Male	38	4 (11)	34 (89)	
p-T				
T1	28 (32)	1 (4)	27 (96)	0.659
T2, 3, 4	59 (68)	5 (8)	54 (92)	
Smoking status				
Never smoker	52 (60)	3 (6)	49 (94)	0.681
Current+former smoker	35 (40)	3 (9)	32 (91)	
Adjuvant chemotherapy				
Yes/no	32 (37)/55 (63)	1 (17)/5 (83)	31 (38)/50 (62)	0.407

Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Table 3 (Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

Table 8. PC-9 細胞のメタボローム解析における1時間、6時間、24時間、48時間  
時点において共通して上昇が認められた特徴的な代謝産物

Collagen + 群における代謝産物 (Fold changes >1.5)	
Amino acids	Glutamine
Monoamine	Tyramine
Sugars	Fructose or Psicose
	Galactose
	Glucose or Allose
	Sorbose
	Tagatose

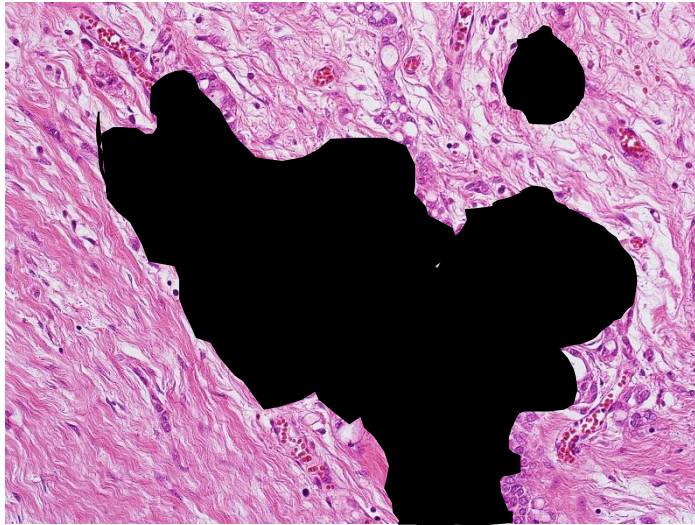
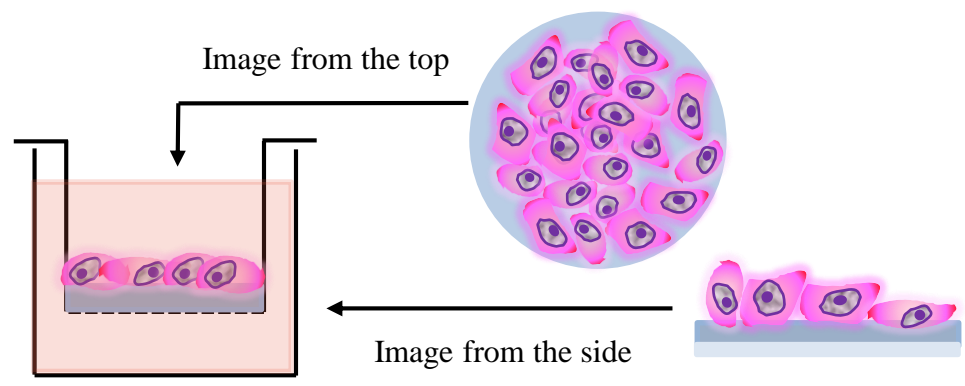
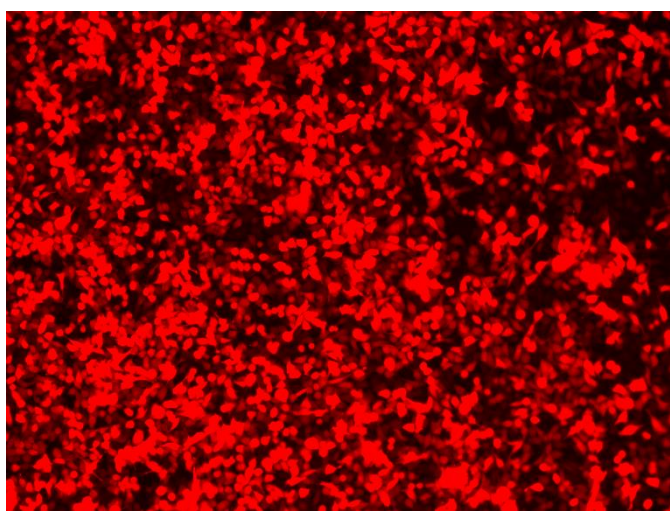


Fig 1. 肺がん組織におけるヘマトキシリン・エオジン染色像  
(黒く塗りつぶした部分：がん細胞)

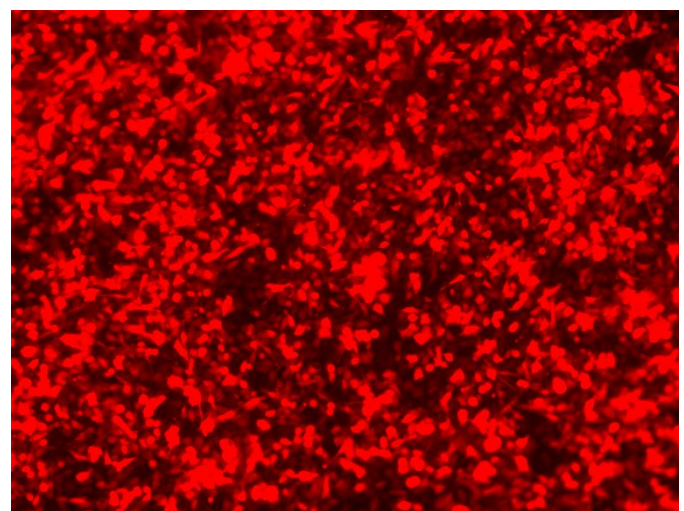
A



B



Collagen -

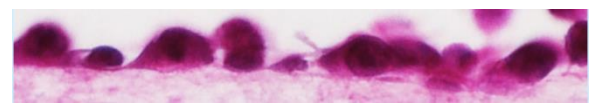


Collagen +

C



Collagen -

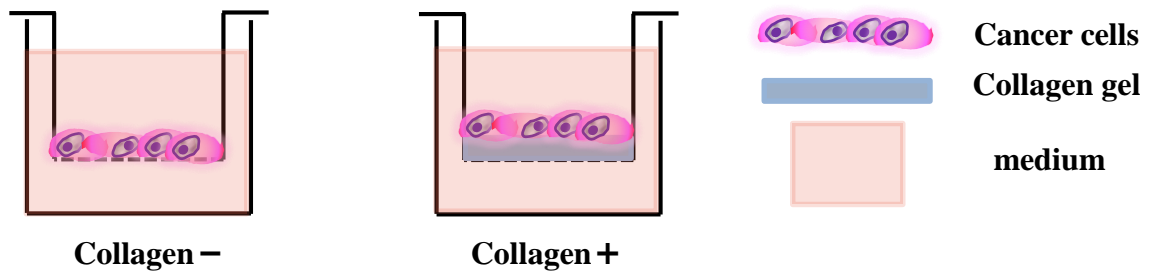


Collagen +

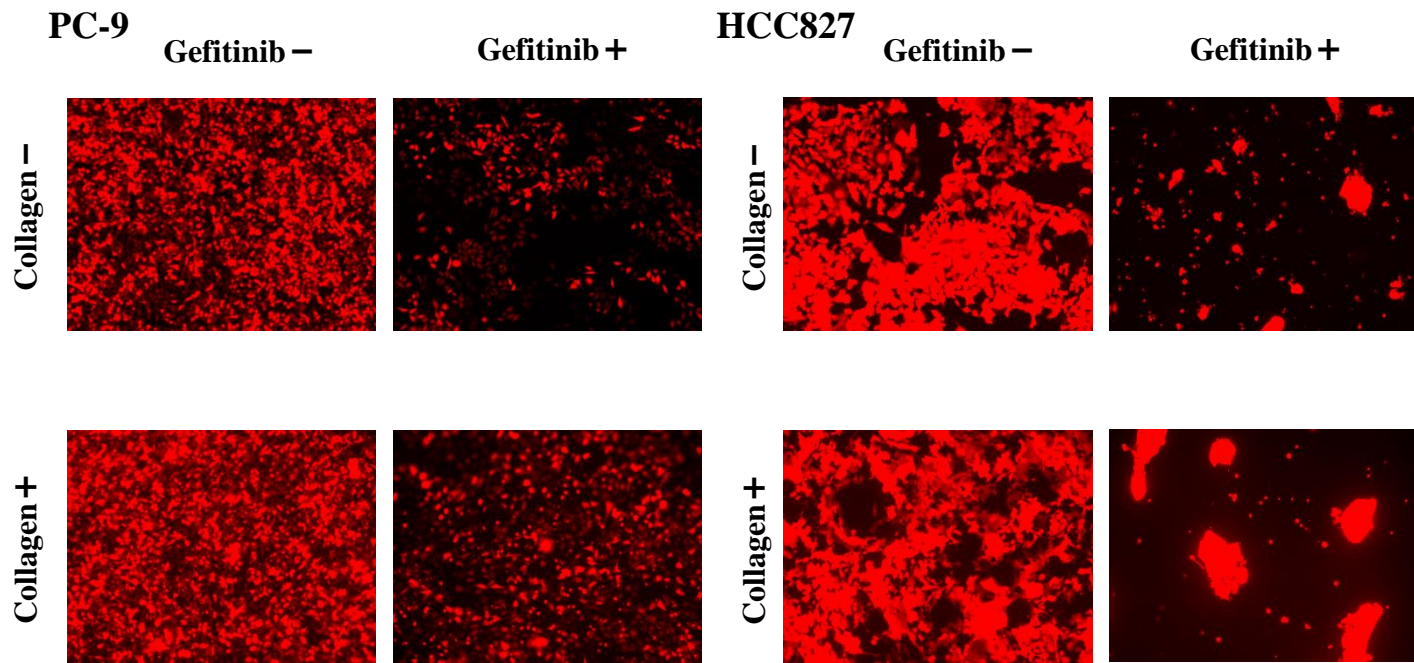
Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Fig 1  
doi: 10.1111/cas.13624.

Fig 2. Collagen type I を用いた観察系の構築

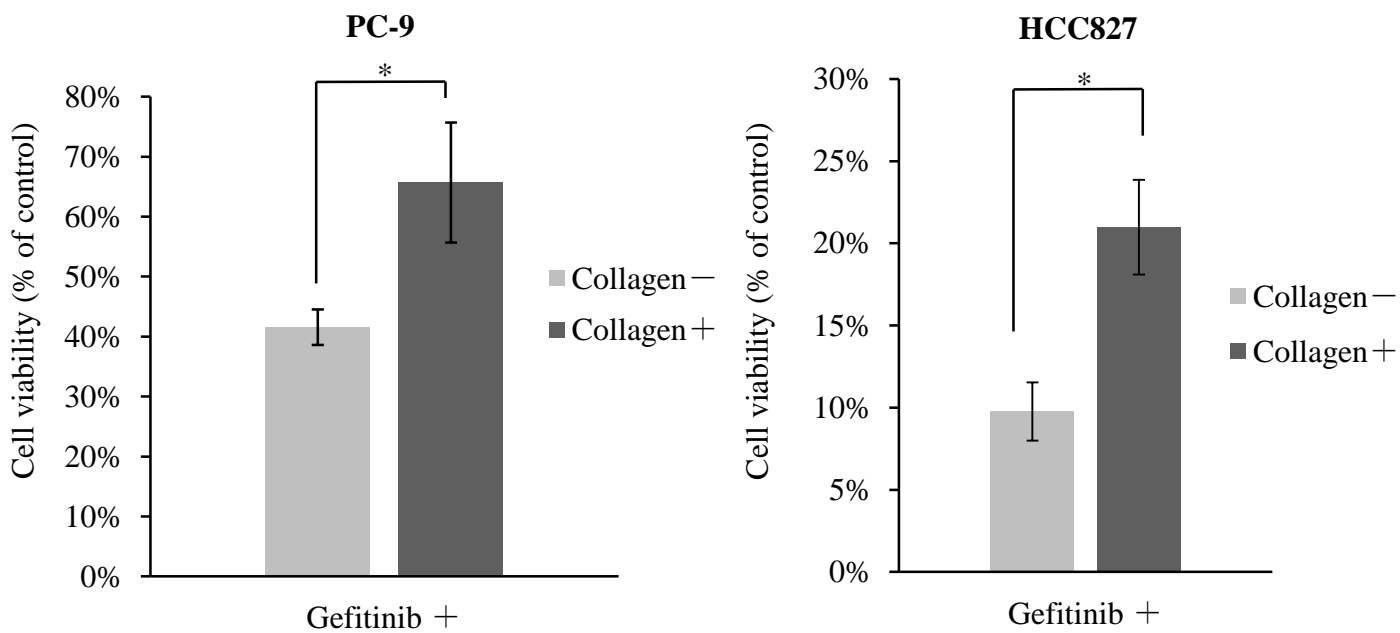
A



B

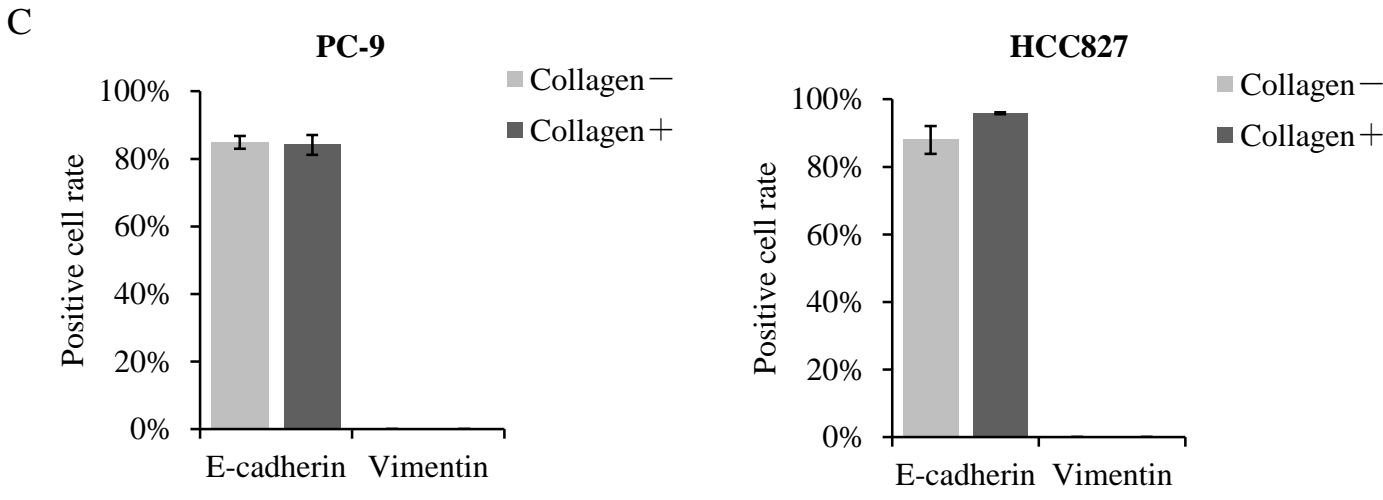
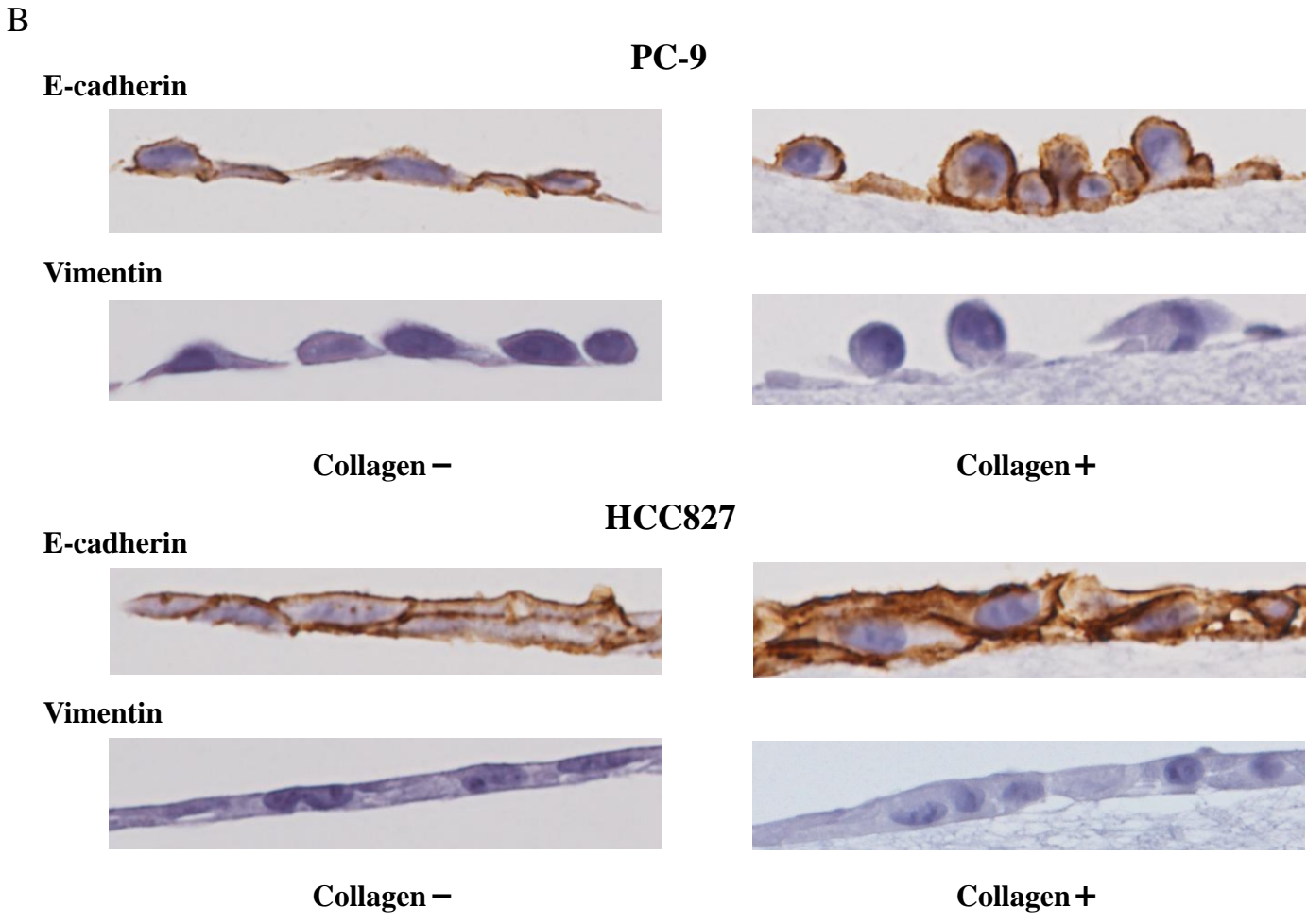
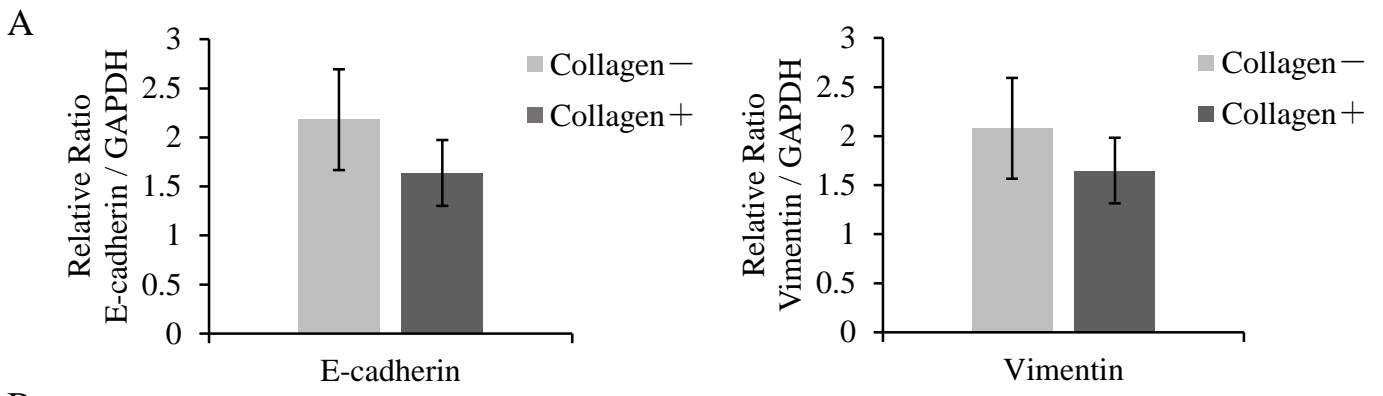


C



Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Fig 1 (Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

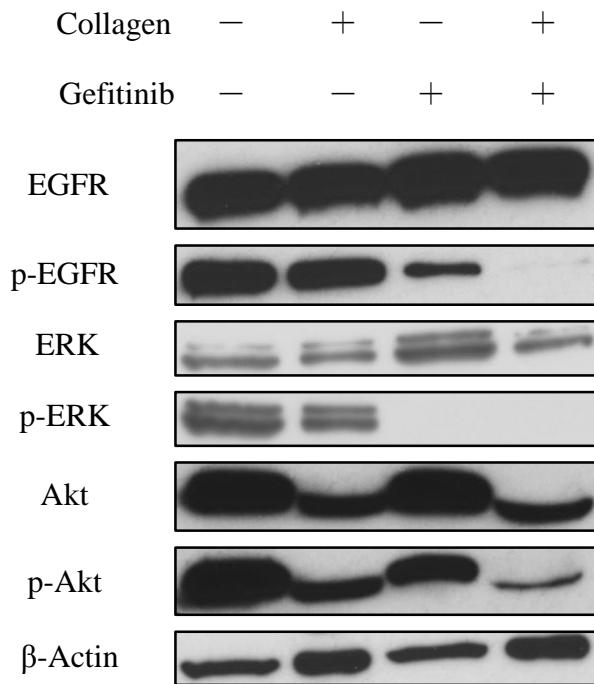
Fig 3. Collagen type I による PC-9 および HCC827 細胞における EGFR-TKI 耐性



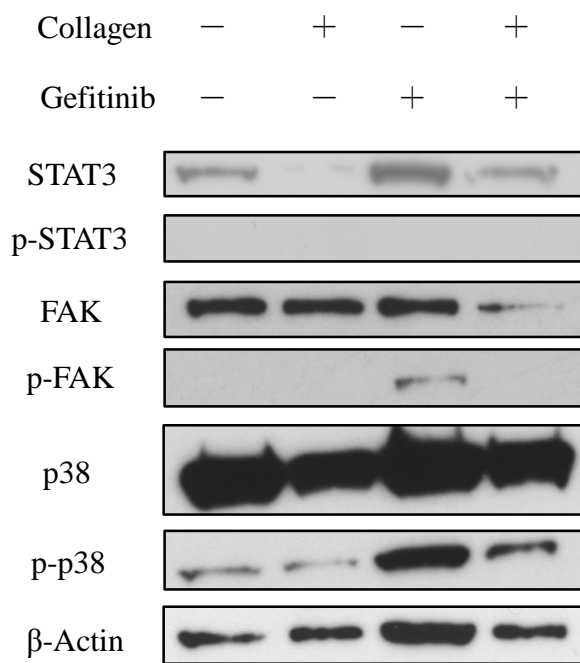
Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Fig 2(Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

Fig 4. Collagen type Iによる PC-9 の上皮間葉転換における表現型変化

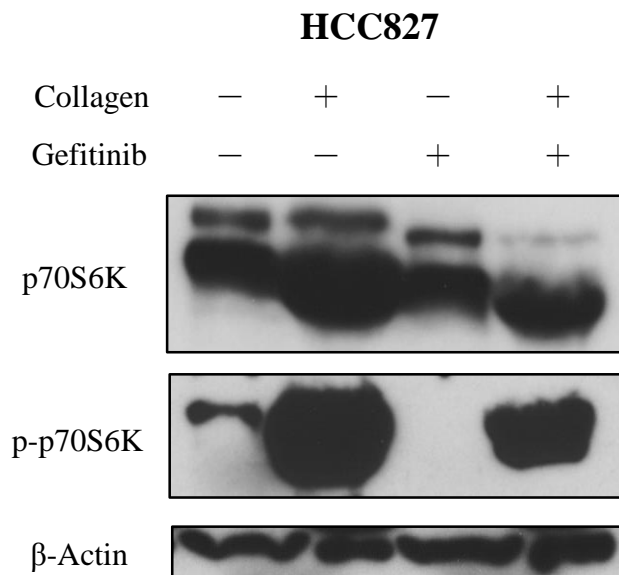
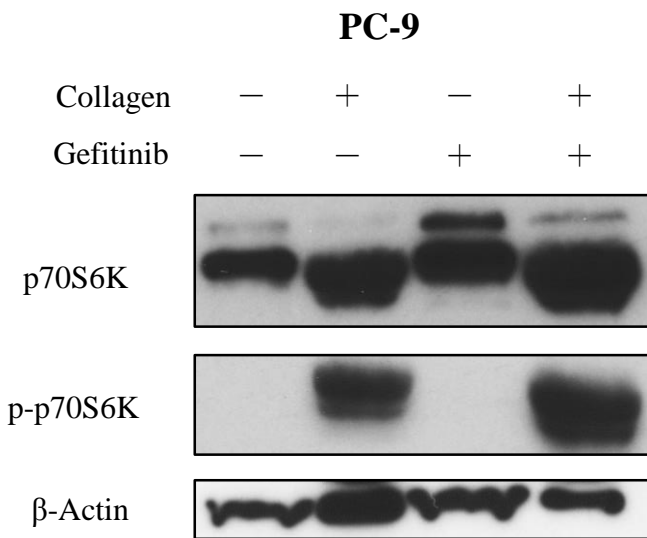
A



B

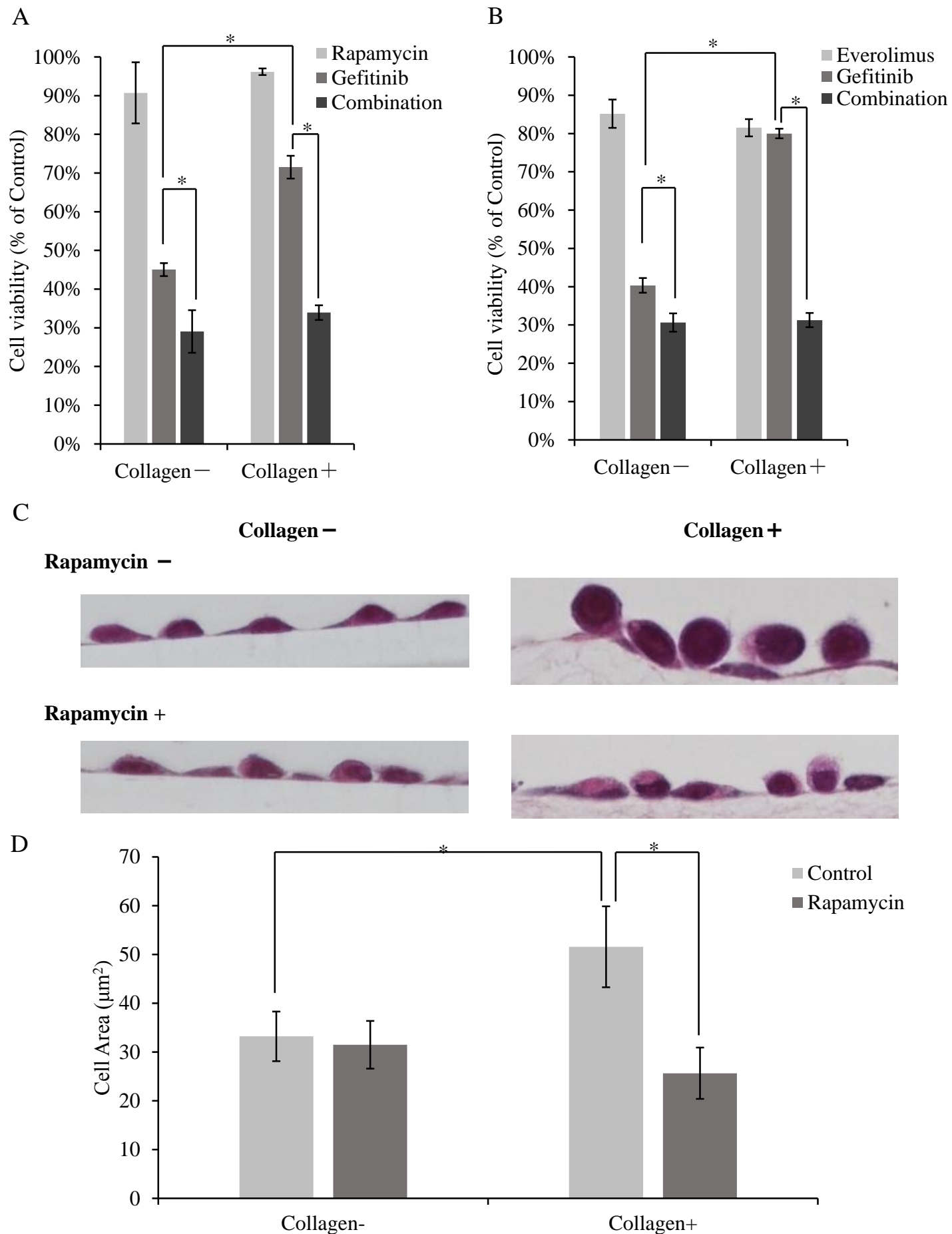


C



Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Fig 3, 4, Supp Fig 3 (Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

Fig 5. Collagen type I による EGFR シグナル伝達および側副シグナル伝達経路における生存因子のリン酸化変化

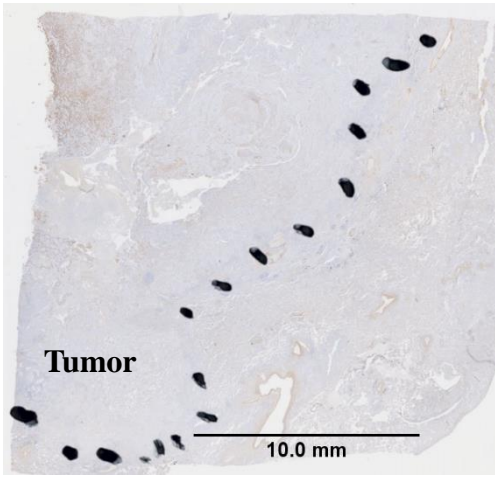


Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Fig 3, 4, Supp Fig 3 (Modified)  
doi: 10.1111/cas.13624.

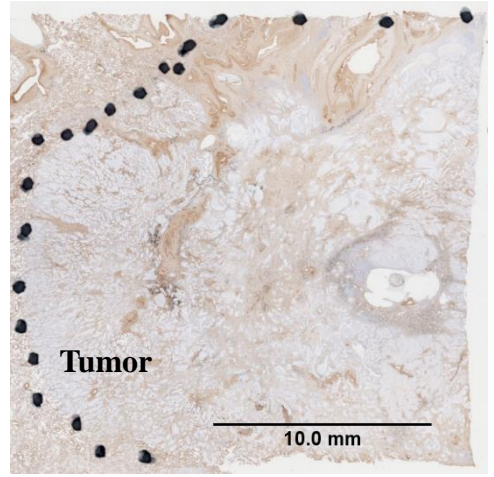
Fig 6. mTOR inhibitor を用いた Collagen+ 群における表現形変化および EGFR-TKI 耐性の解除



A

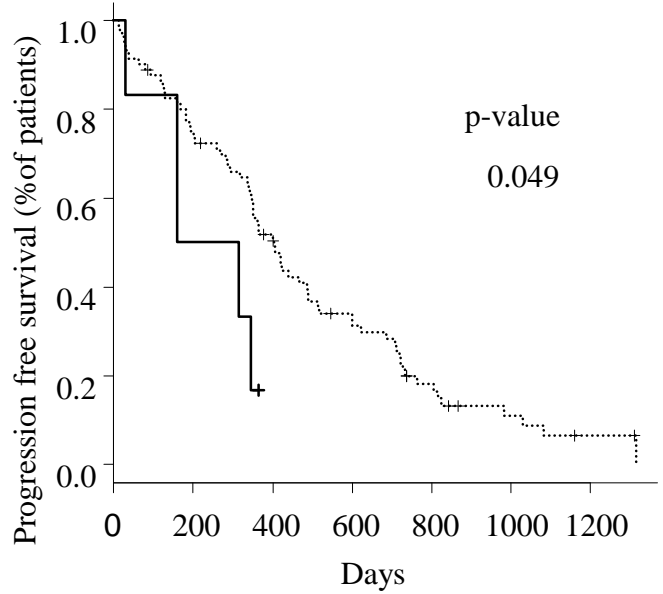
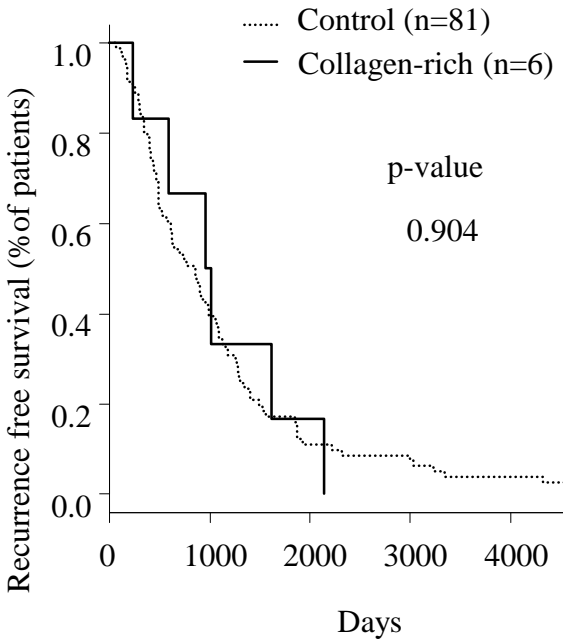


Control tumor



Collagen-rich tumor

B



Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Fig 6  
doi: 10.1111/cas.13624.

Fig 7. 臨床検体を用いた Collagen type I 堆積による EGFR-TKI 奏功性の低下

## Collagen type I 非存在下

## Collagen type I 存在下

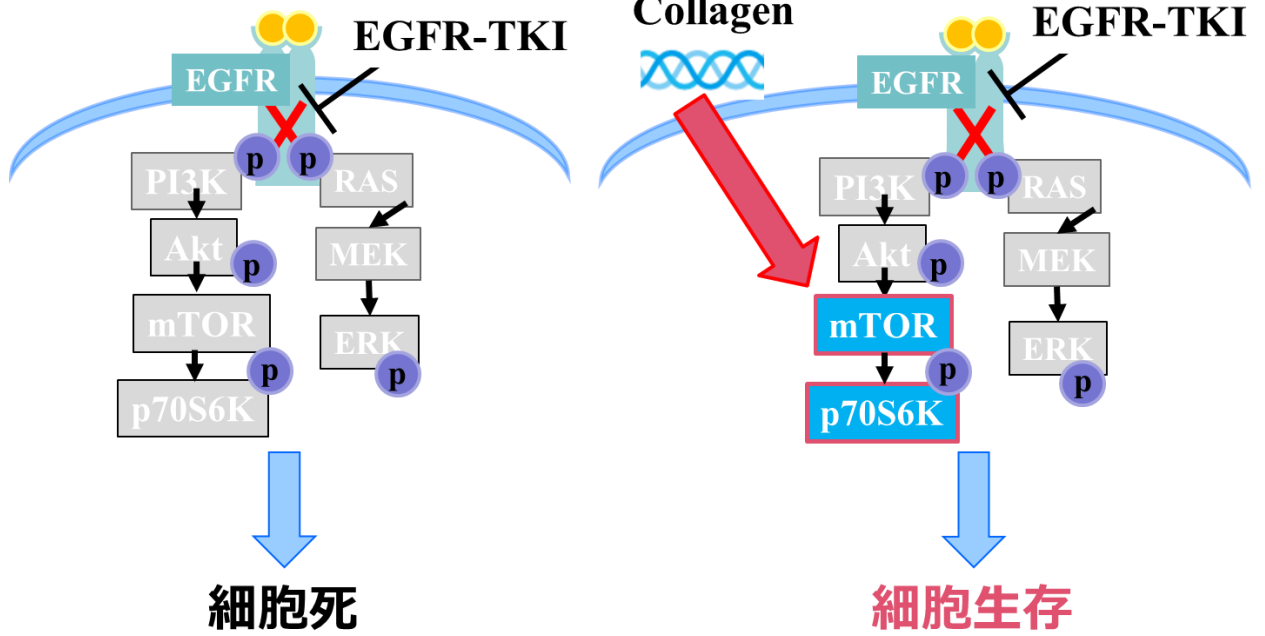


Fig 8. Collagen type I によるがん細胞のシグナル伝達変化における概略図

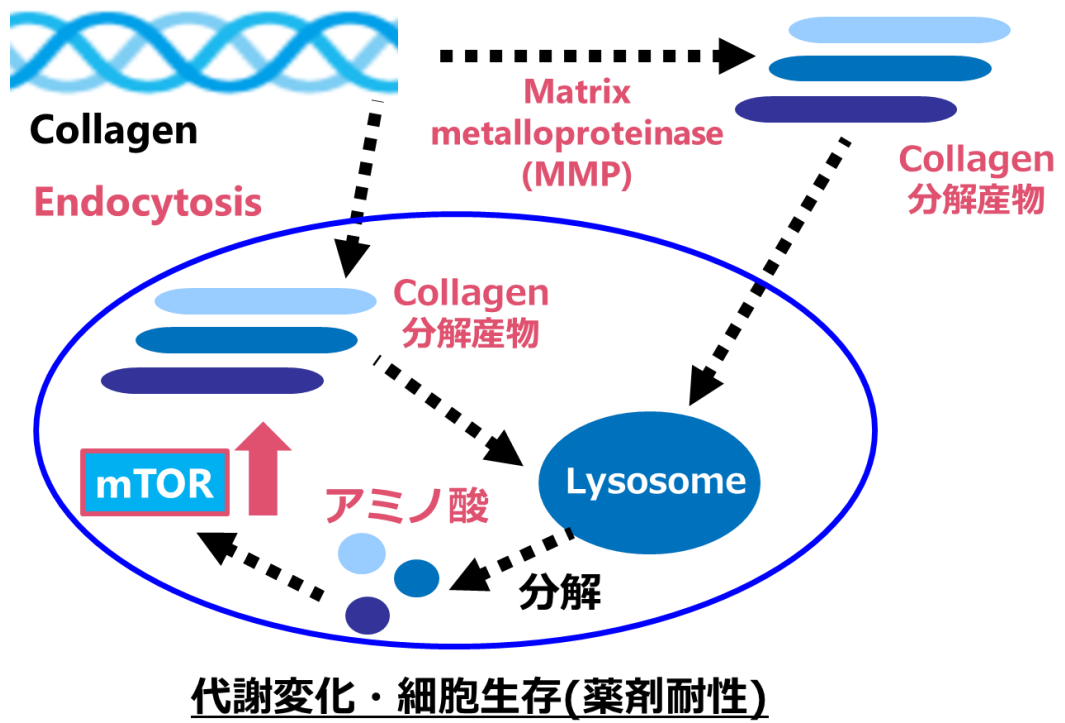
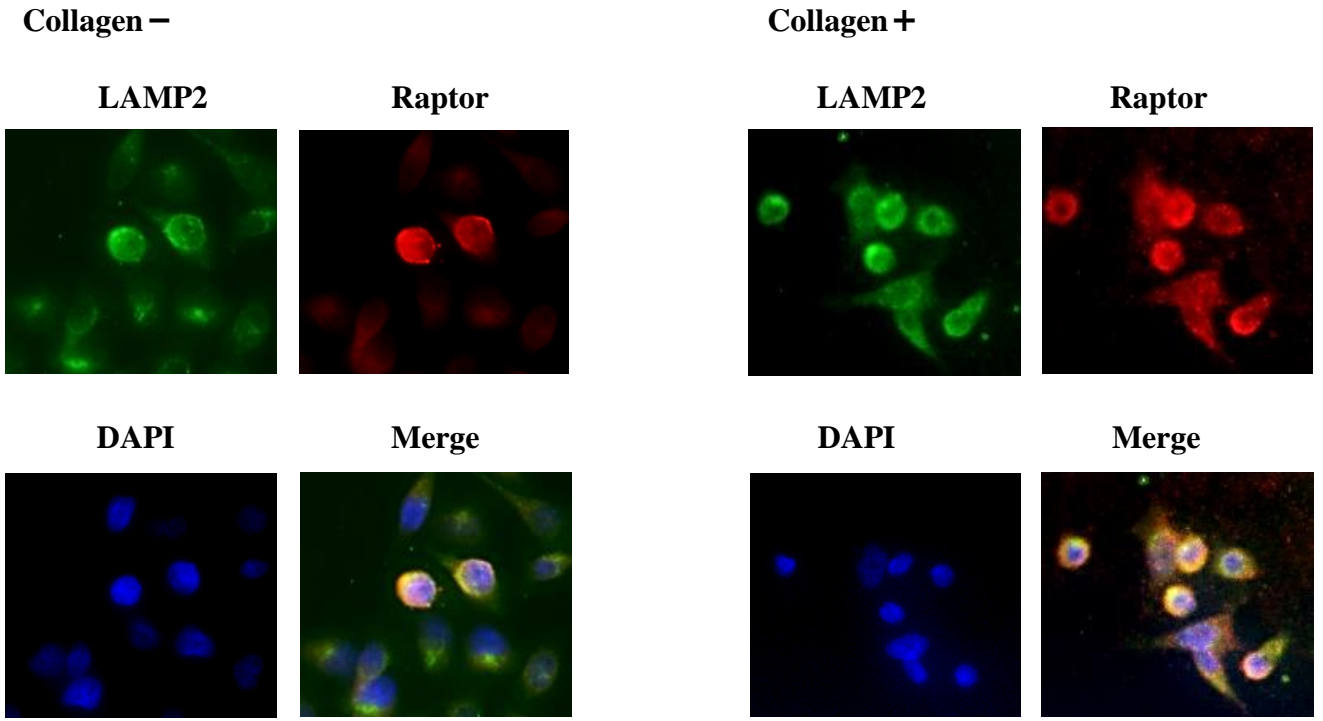


Fig 9. Collagen type I による mTORC1 活性化機構における仮説図

A



B

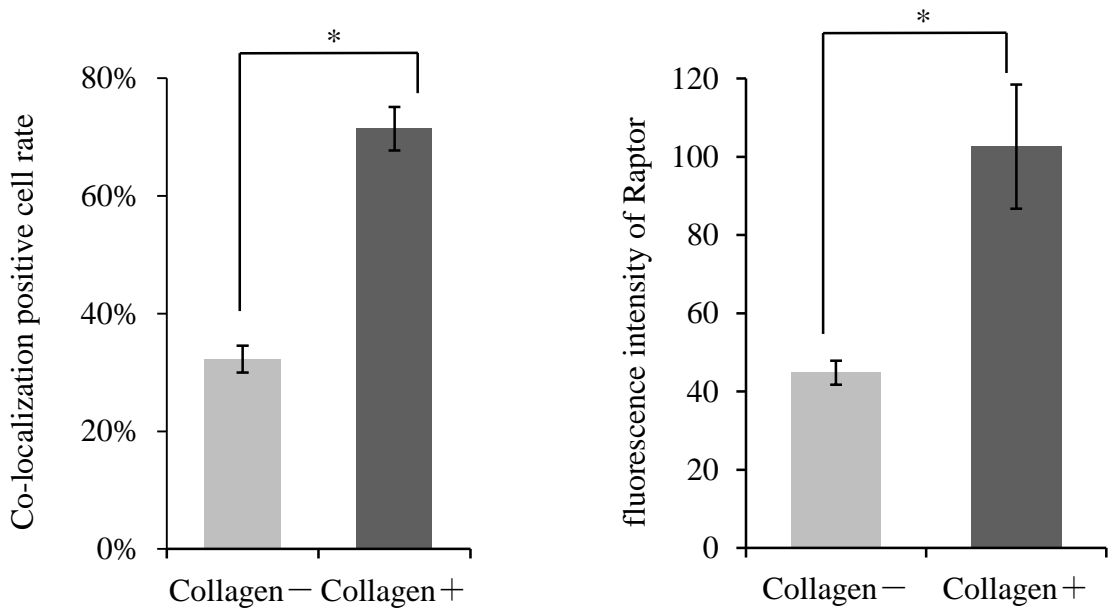
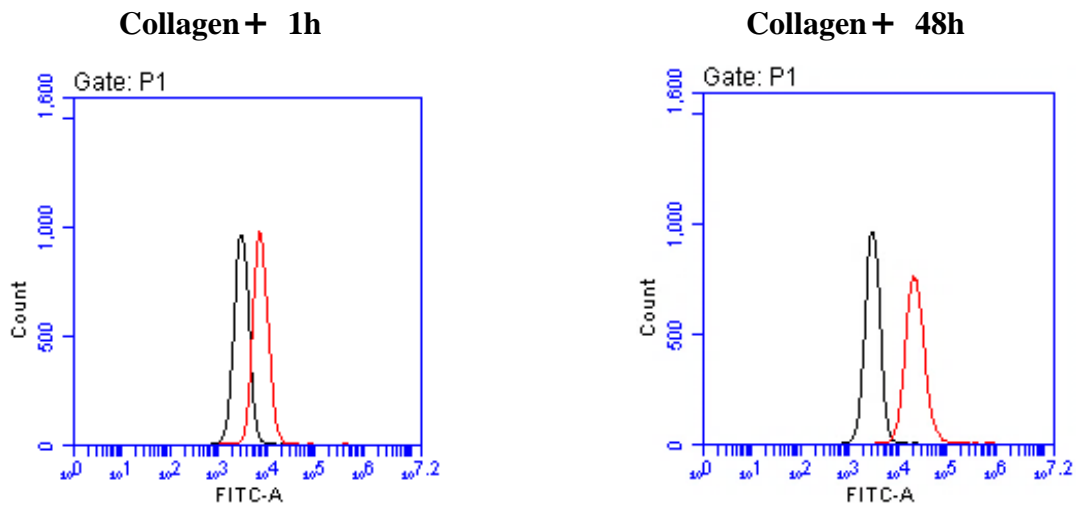
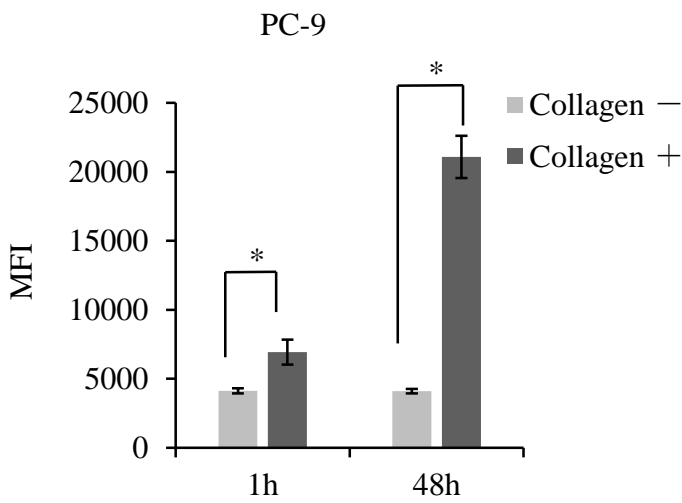


Fig 10. Collagen type Iによる PC-9 細胞の mTORC1 の局際変化

A



B



C

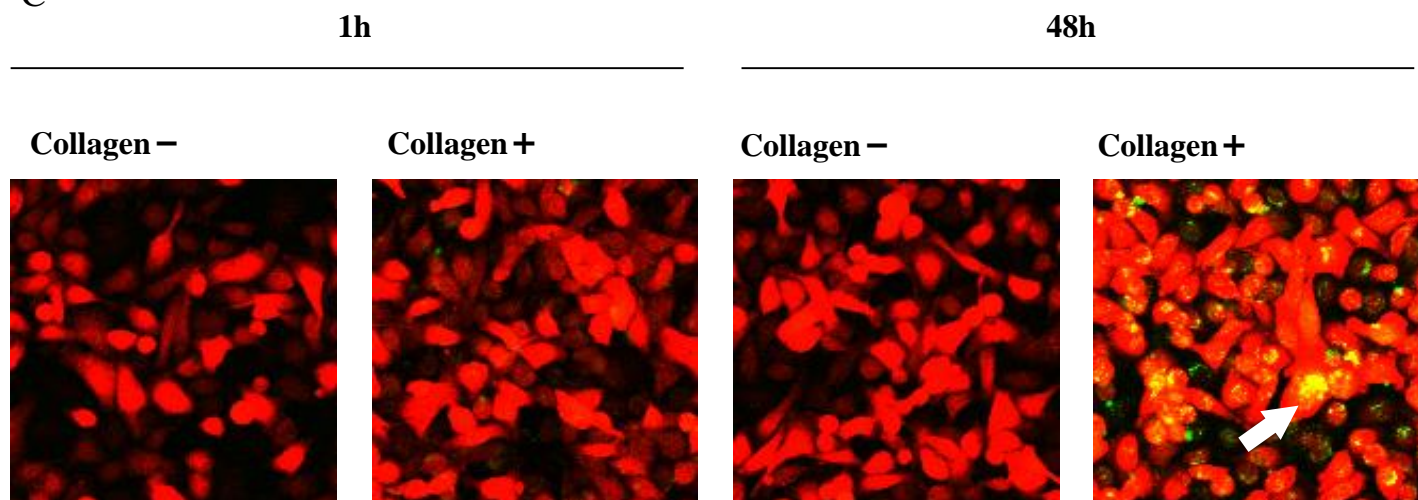


Fig 11. PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み

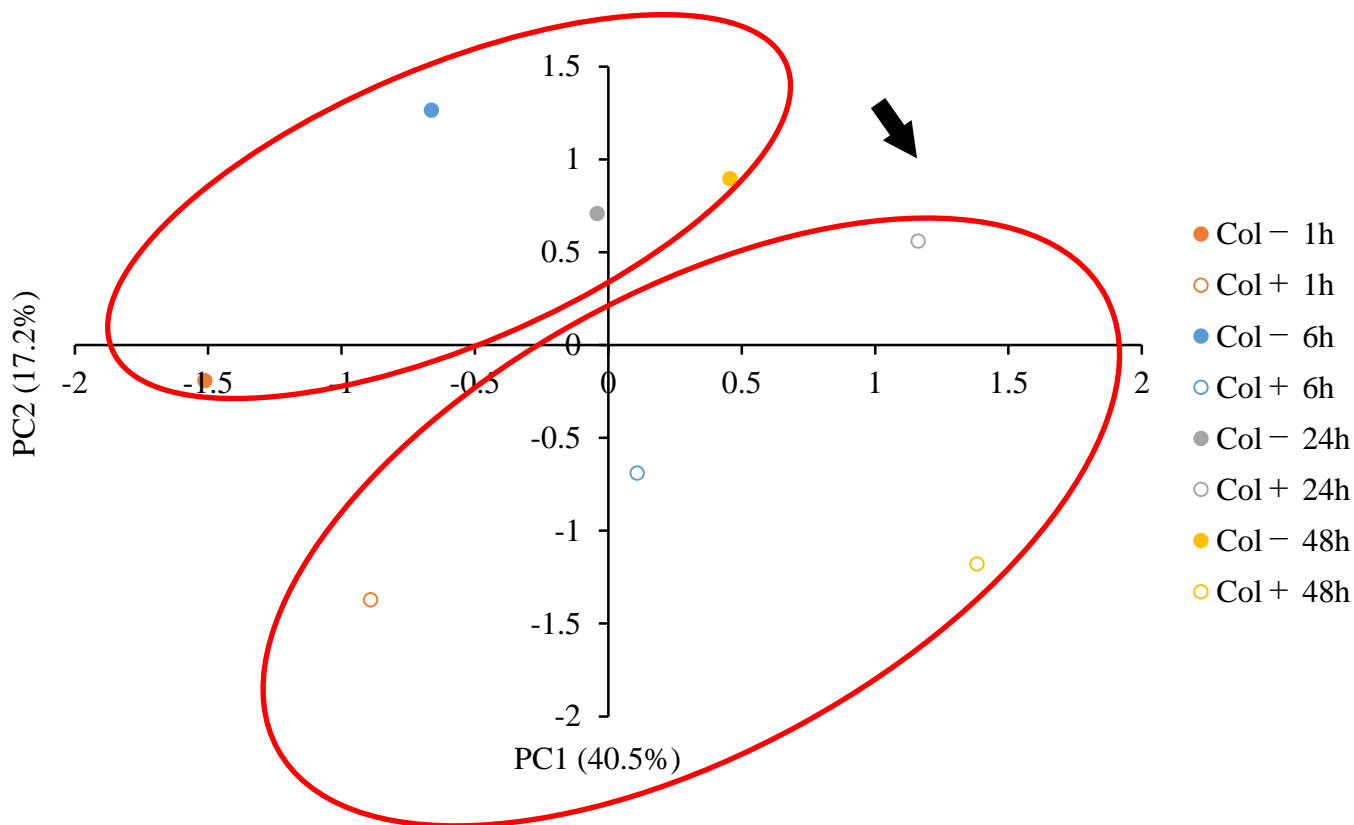


Fig 12. Collagen type Iによる PC-9 細胞の代謝変化

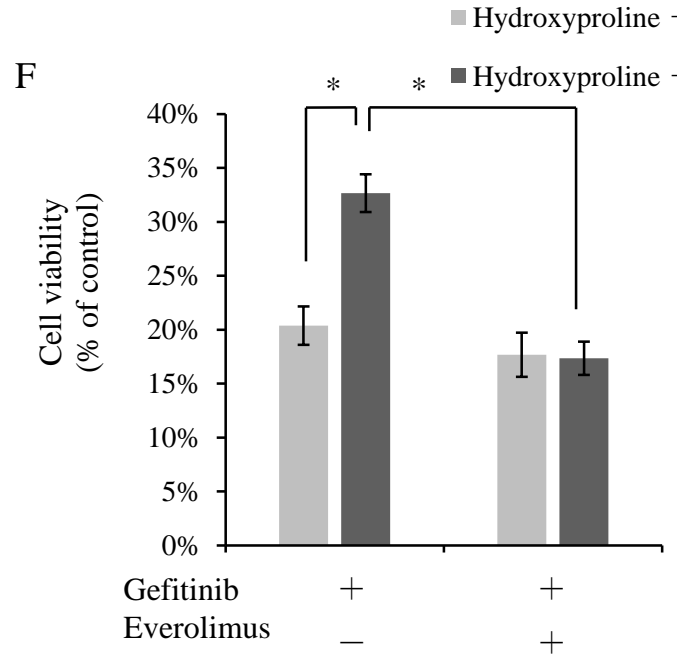
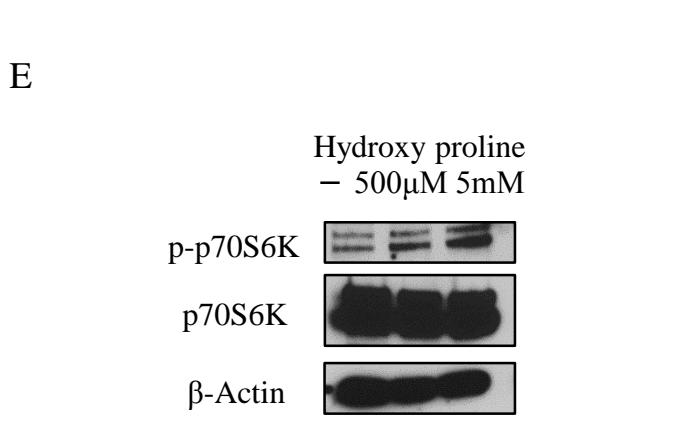
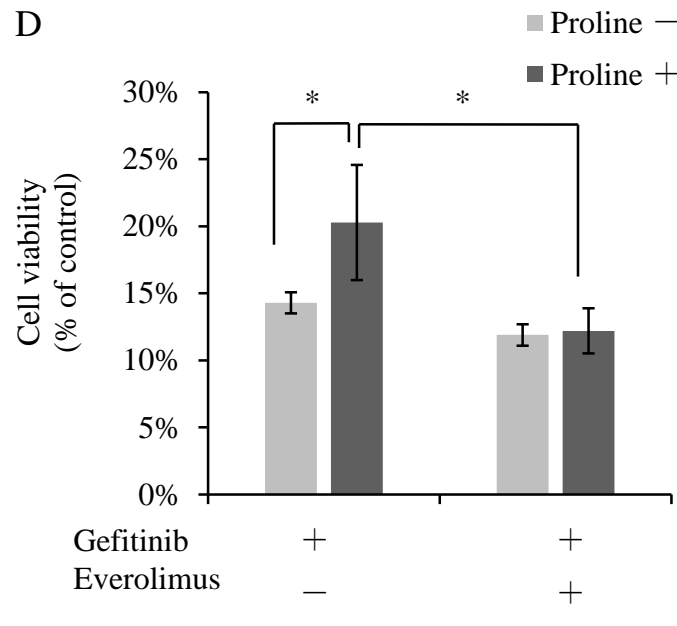
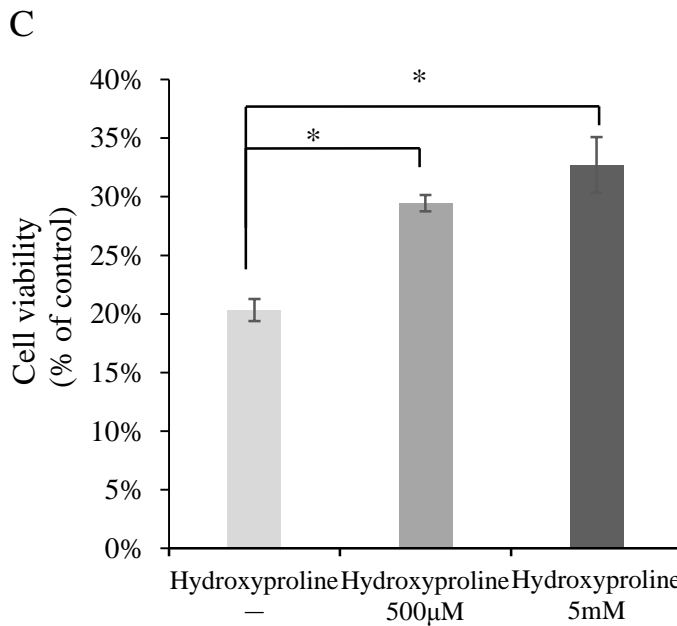
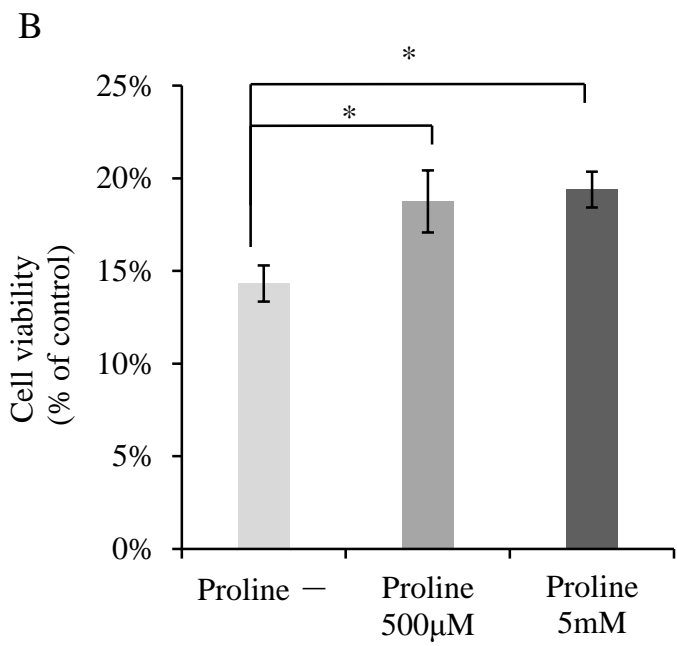
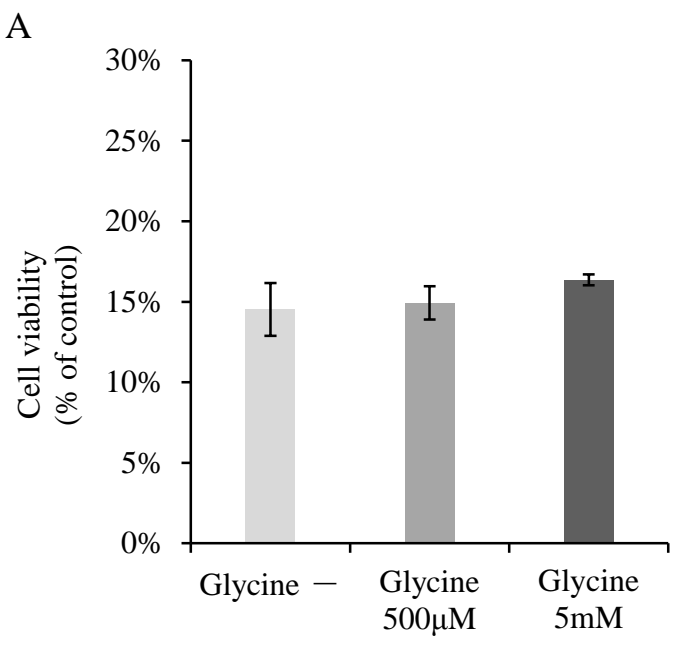


Fig 13. Collagen type I を構成する主要なアミノ酸による抗がん剤耐性と mTORC1 活性化

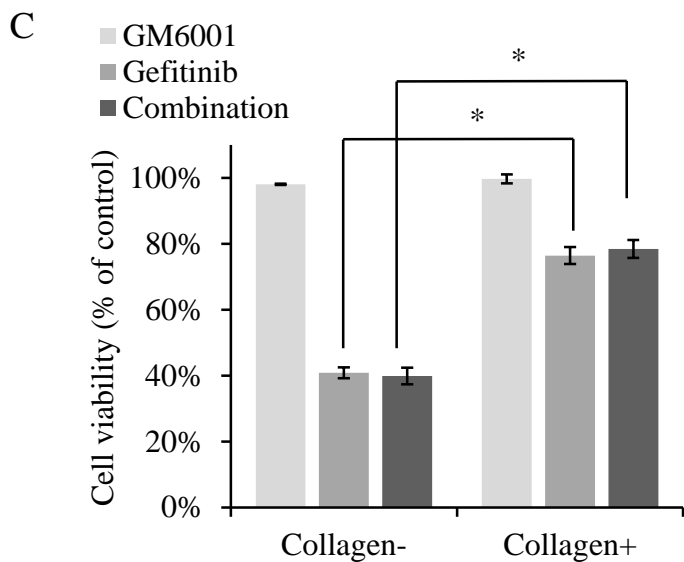
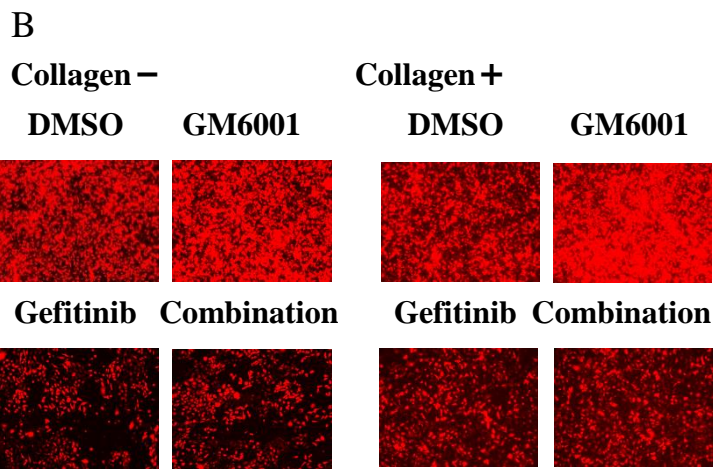
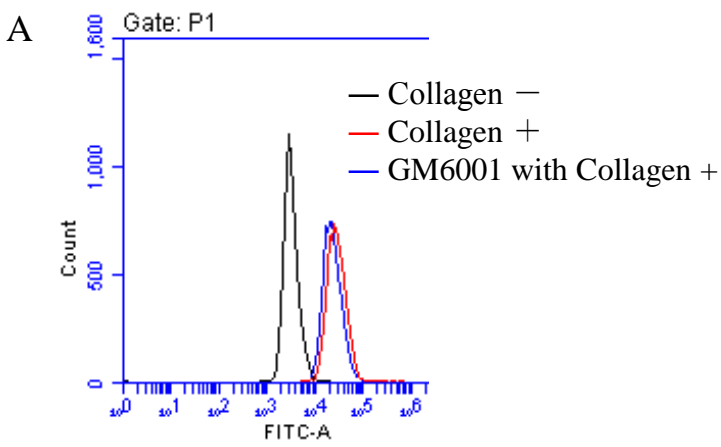
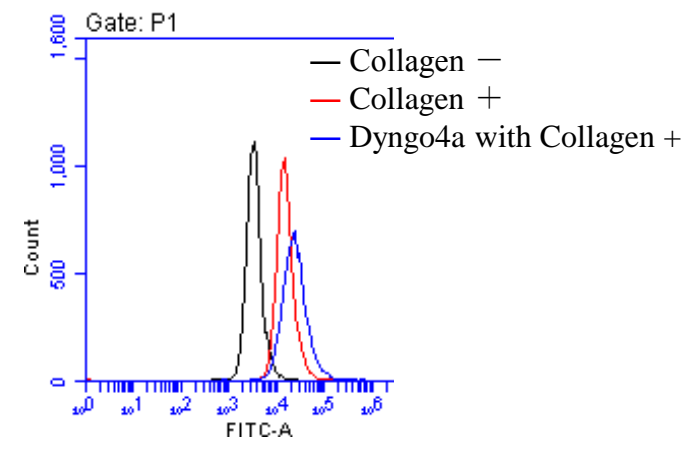
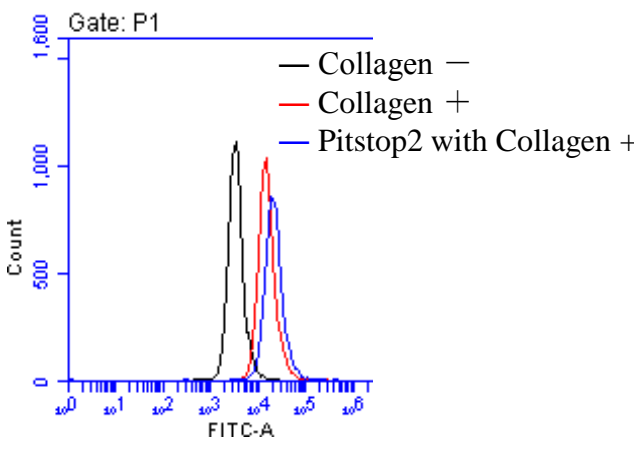


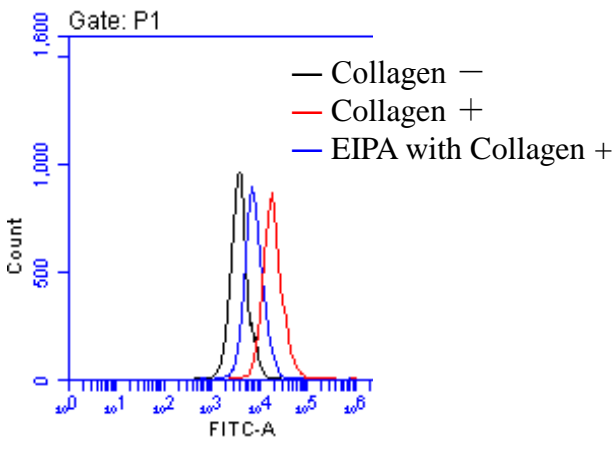
Fig 14. GM6001 (MMPs inhibitor) を用いた PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み変化



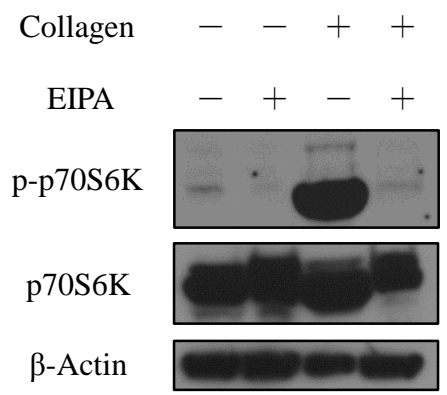
A



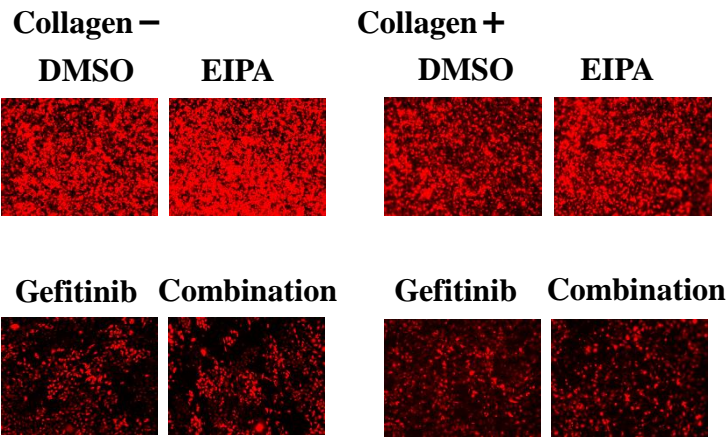
B



C



D



E

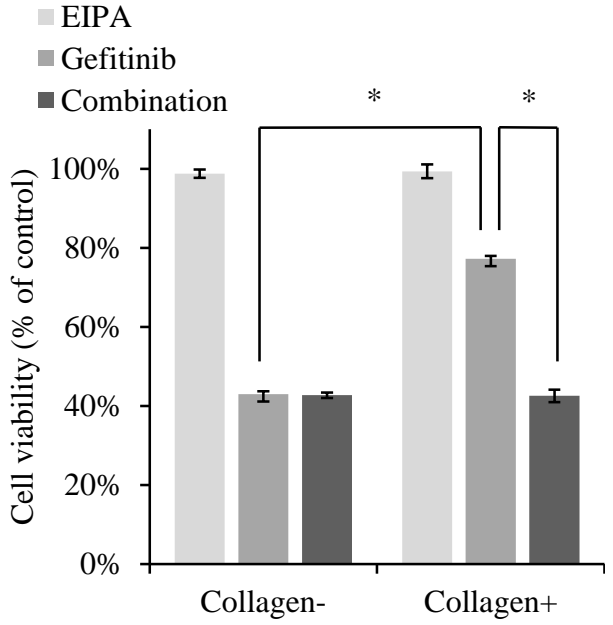
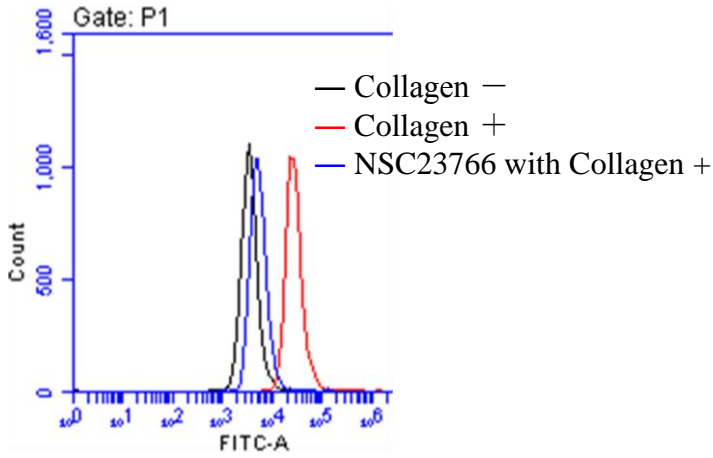
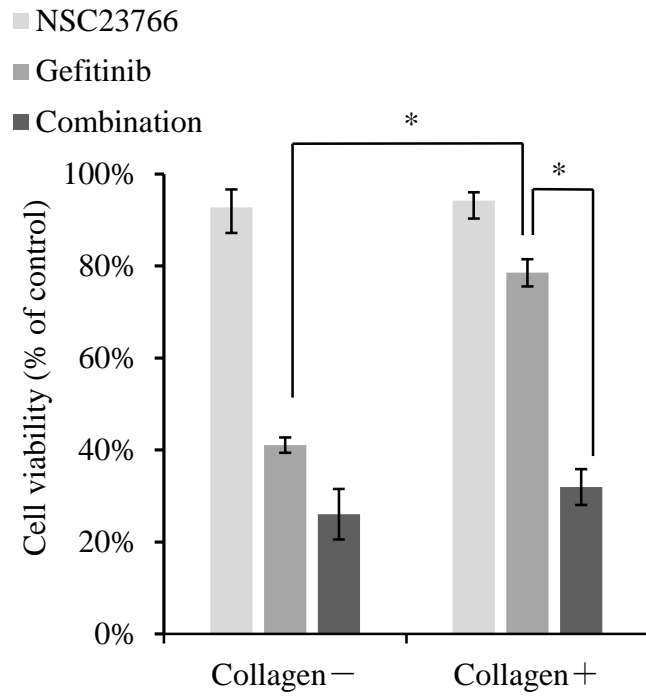


Fig 15. Pitstop2、Dyngo4a (Endocytosis inhibitor) および EIPA (Macropinocytosis inhibitor) による PC-9 細胞における Collagen type I の細胞内取り込みと EGFR-TKI 耐性変化

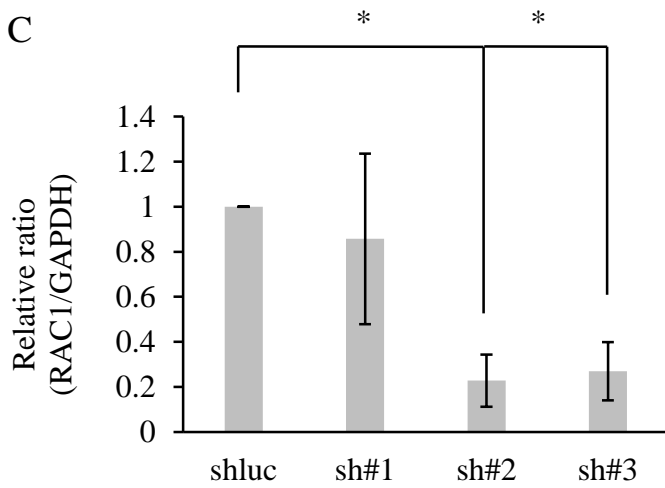
A



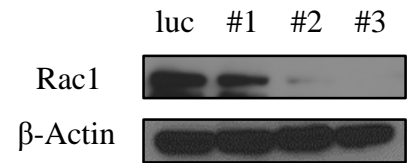
B



C



D



E

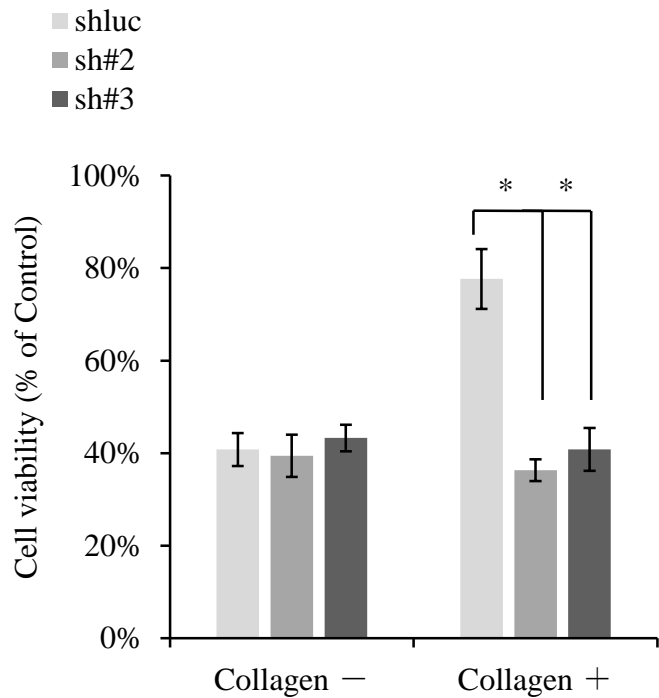


Fig 16. Rac1 抑制下における PC-9 細胞の Collagen type I の細胞内取り込み および EGFR-TKI 耐性変化

## Collagen type I 存在下

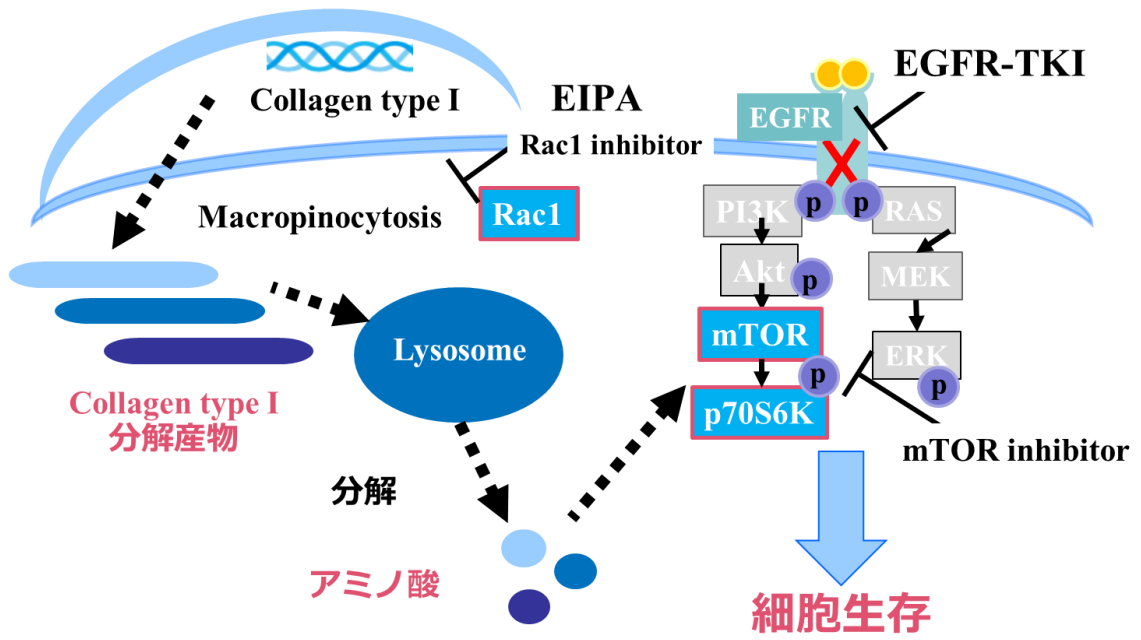
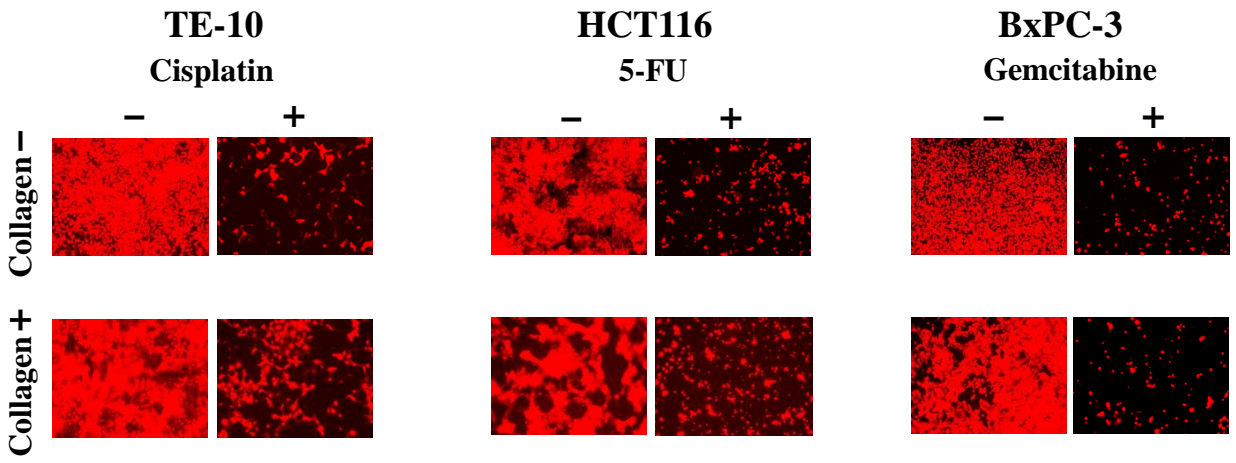
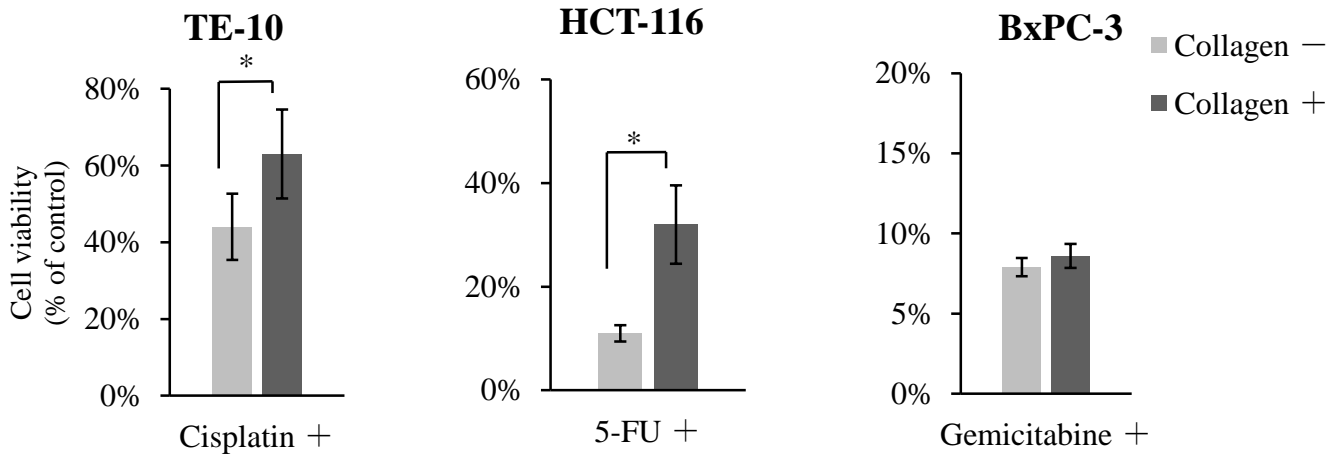


Fig 17. PC-9 における Collagen type I による mTORC1 活性化機構の概略図

A



B



C

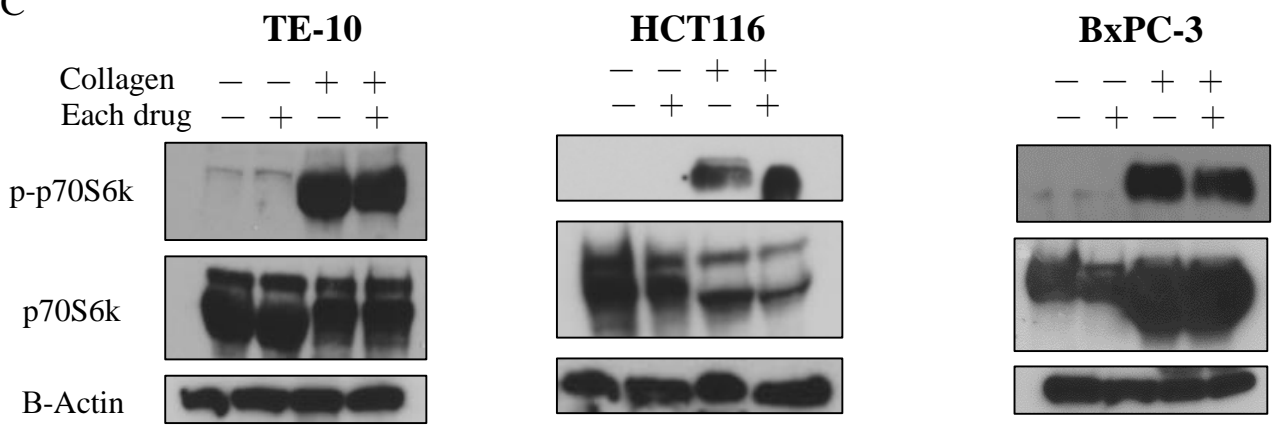
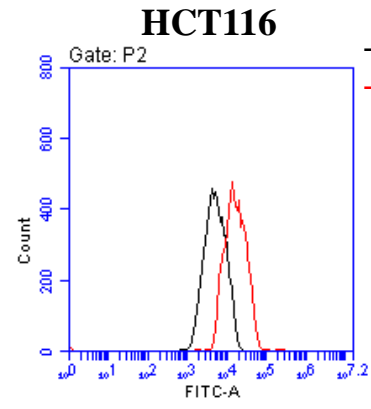
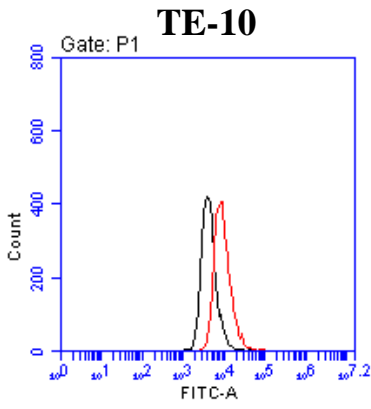


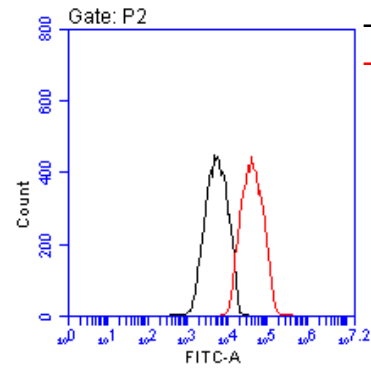
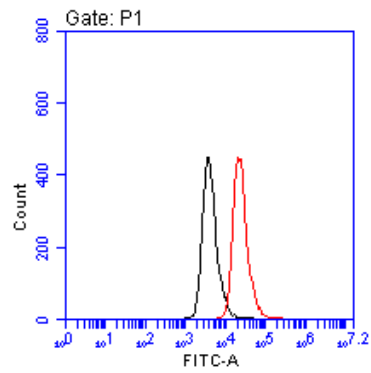
Fig 18. TE-10, HCT116 および BxPC-3 細胞における Collagen type I による 抗がん剤耐性の誘導および mTORC1 活性化

A

Collagen + 1h

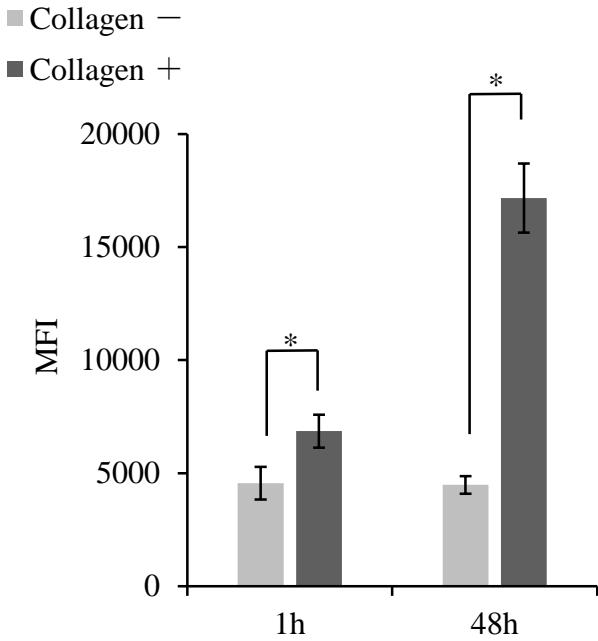


Collagen + 48h



B

TE-10



HCT116

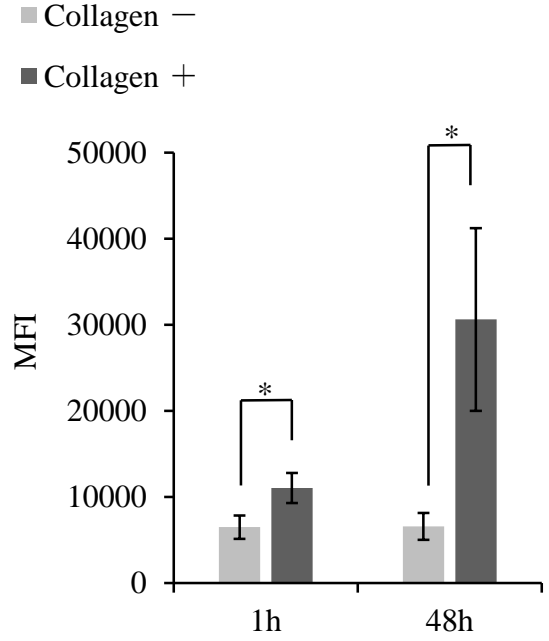
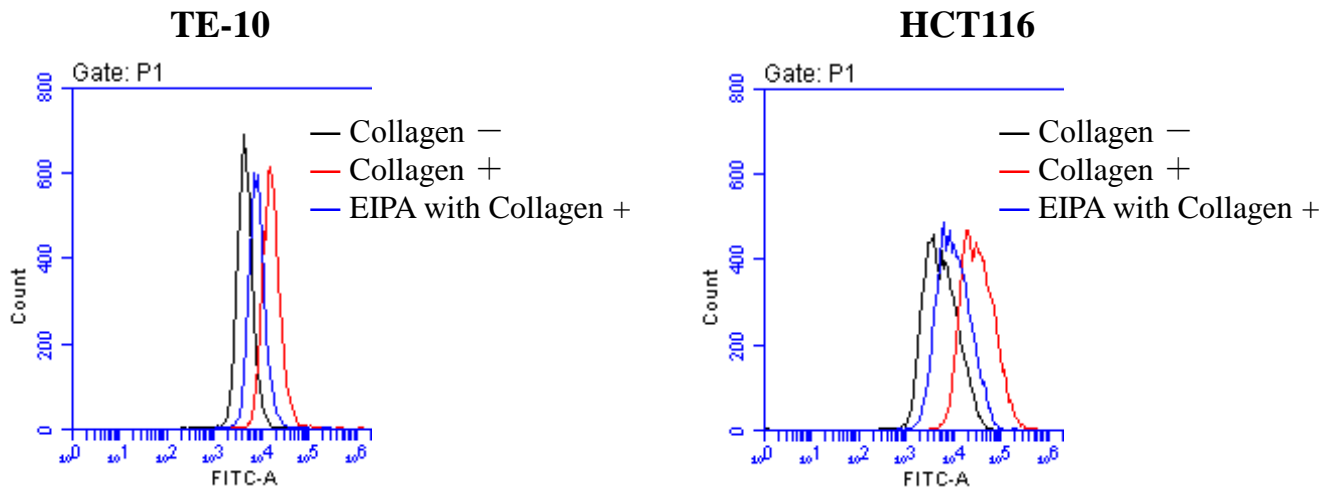
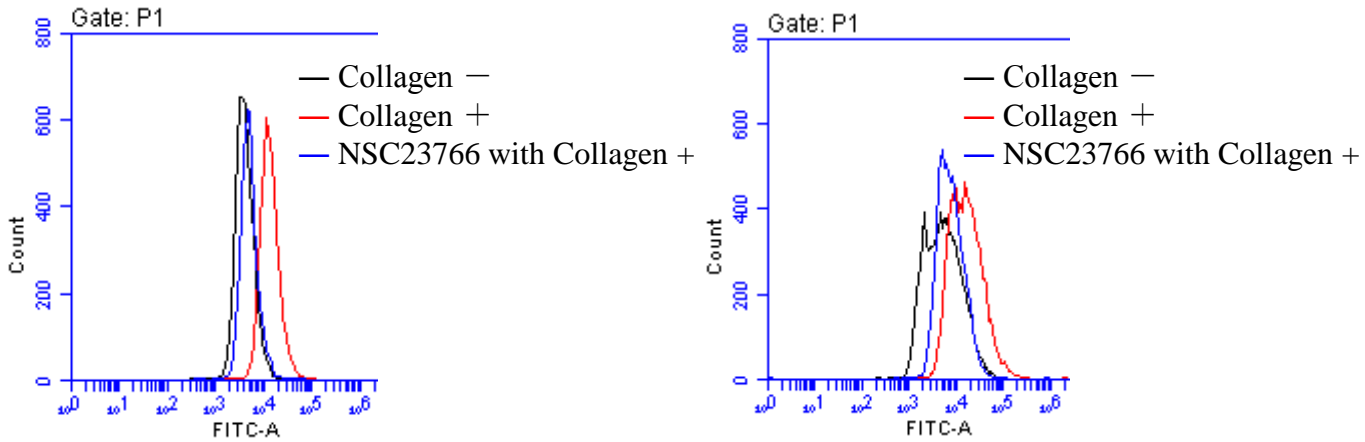


Fig 19. TE-10 および HCT116 細胞における Collagen type I の細胞内取り込み

A



B



C

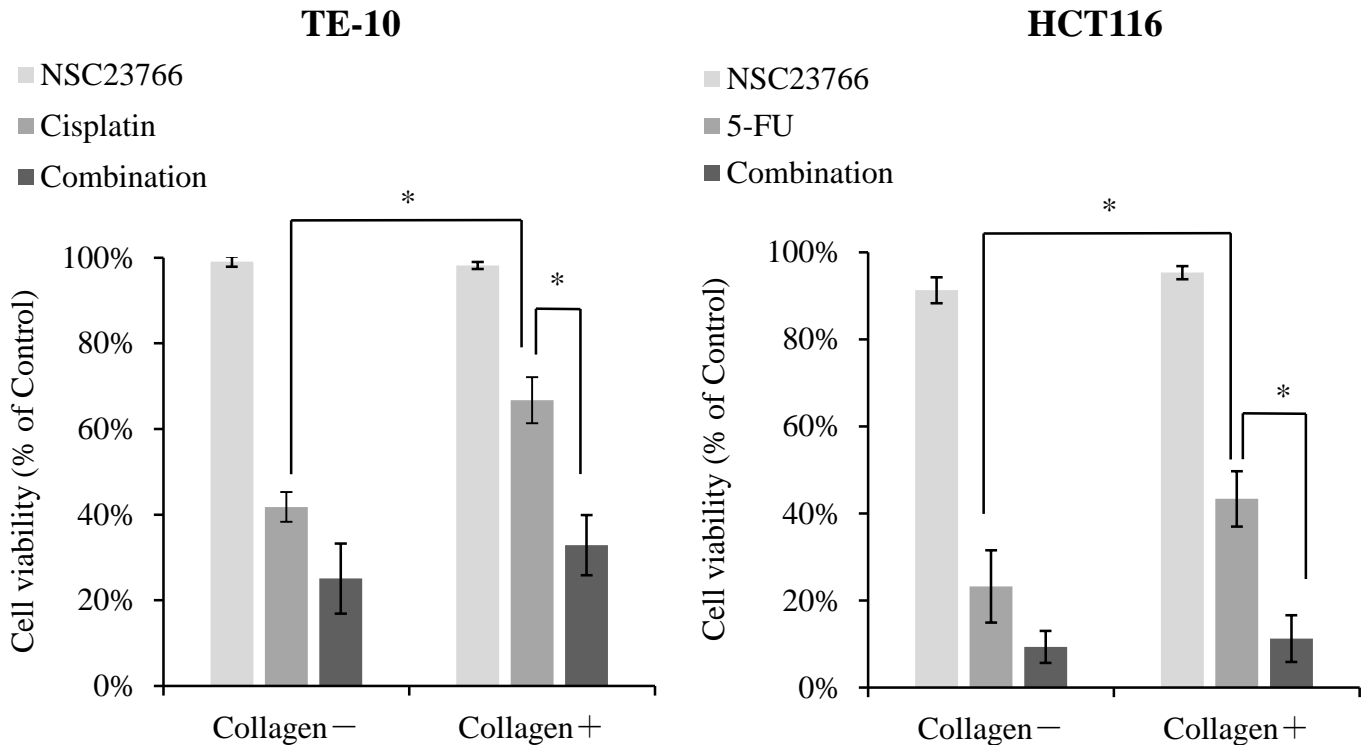


Fig 20. Macropinocytosis および Rac1 inhibitor を用いた TE-10 と HCT116 細胞の Collagen type I の細胞内取り込みおよび抗がん剤耐性変化

## Collagen type I 存在下

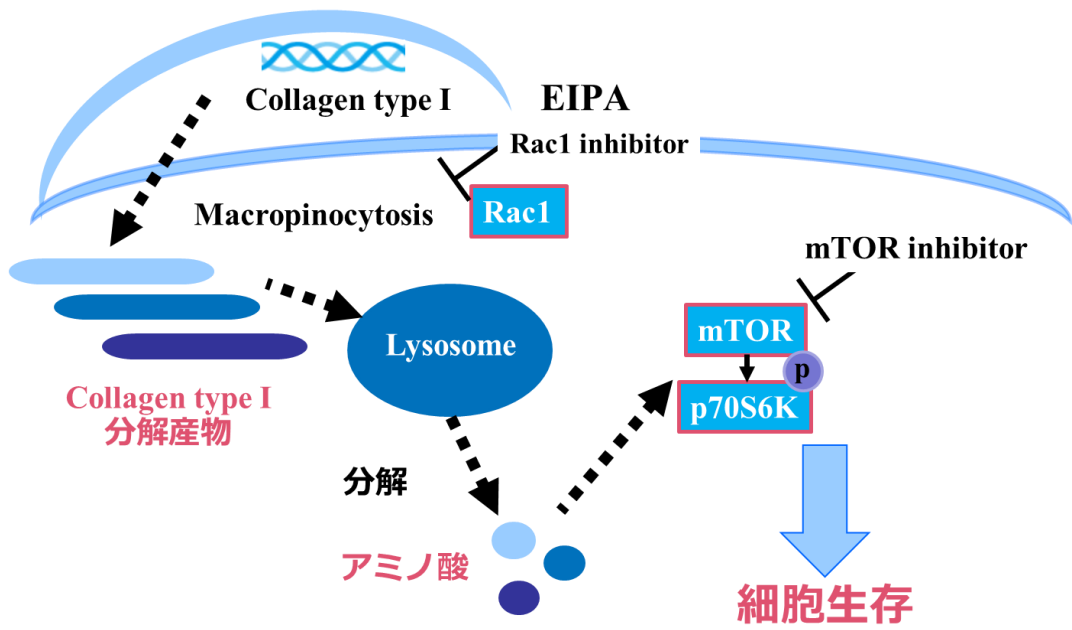
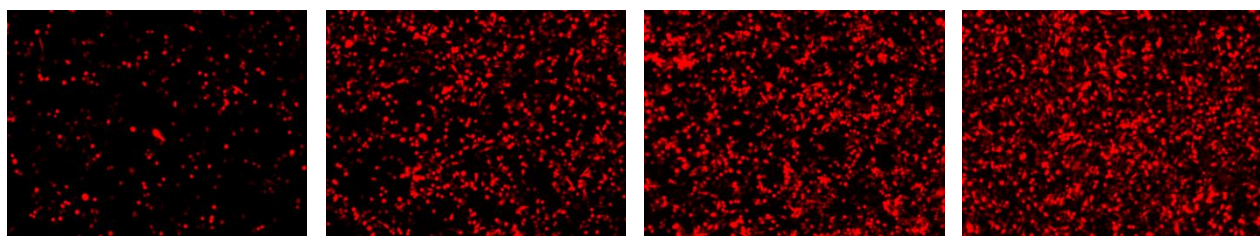


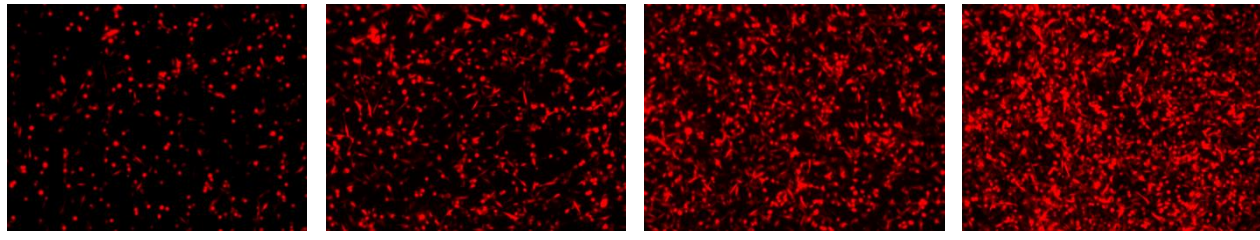
Fig 21.本研究によって明らかになったがん細胞における Collagen type I による mTORC1 活性化機構の概略図

A

Collagen -

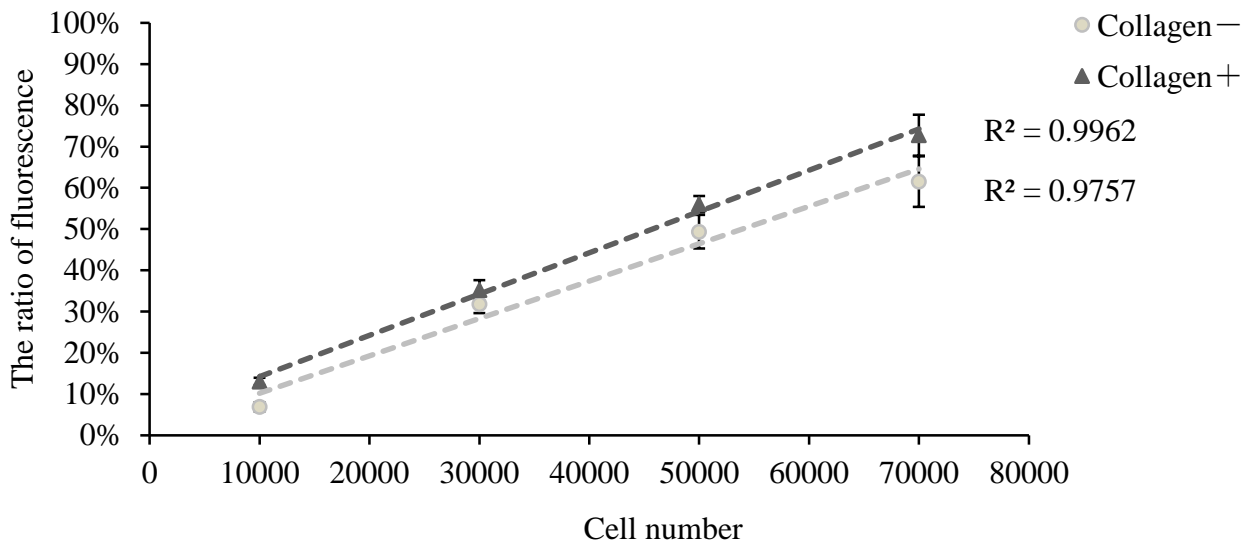


Collagen +



Cell number  $1.0 \times 10^4$  cells/well       $3.0 \times 10^4$  cells/well       $5.0 \times 10^4$  cells/well       $7.0 \times 10^4$  cells/well

B



Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Fig 2  
doi: 10.1111/cas.13624.

Supp Fig 1. コラーゲンを用いた観察系における PC-9-mRFP 細胞の蛍光割合と細胞数の相関



A

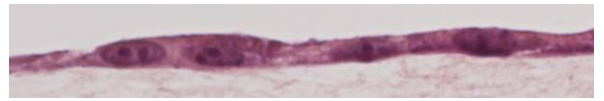
PC-9

Gefitinib -



HCC827

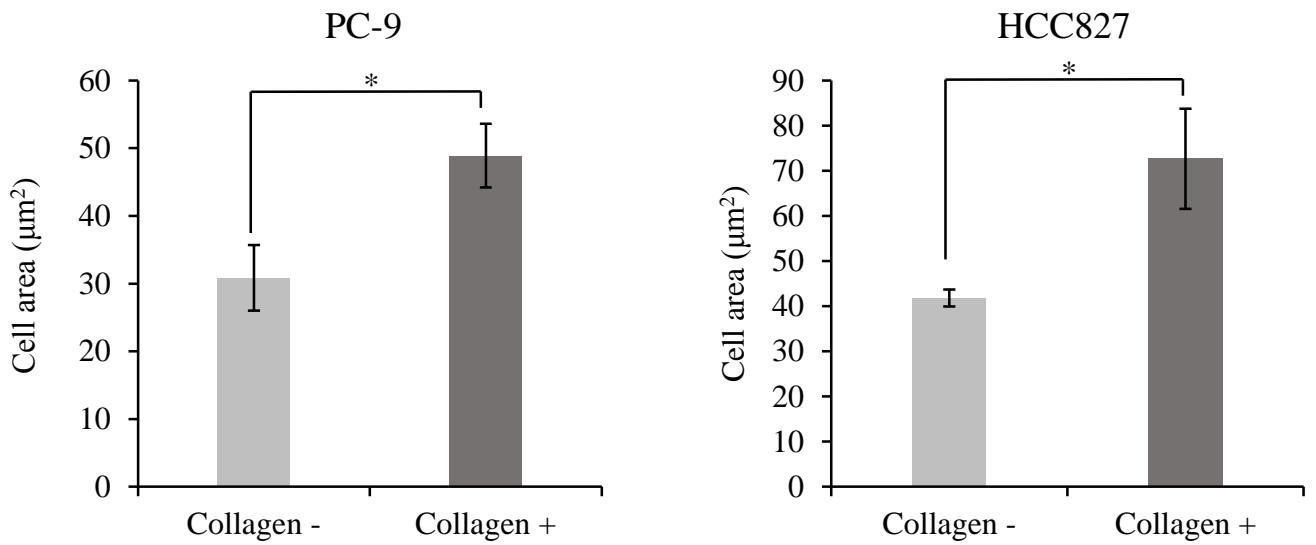
Gefitinib -



Collagen -

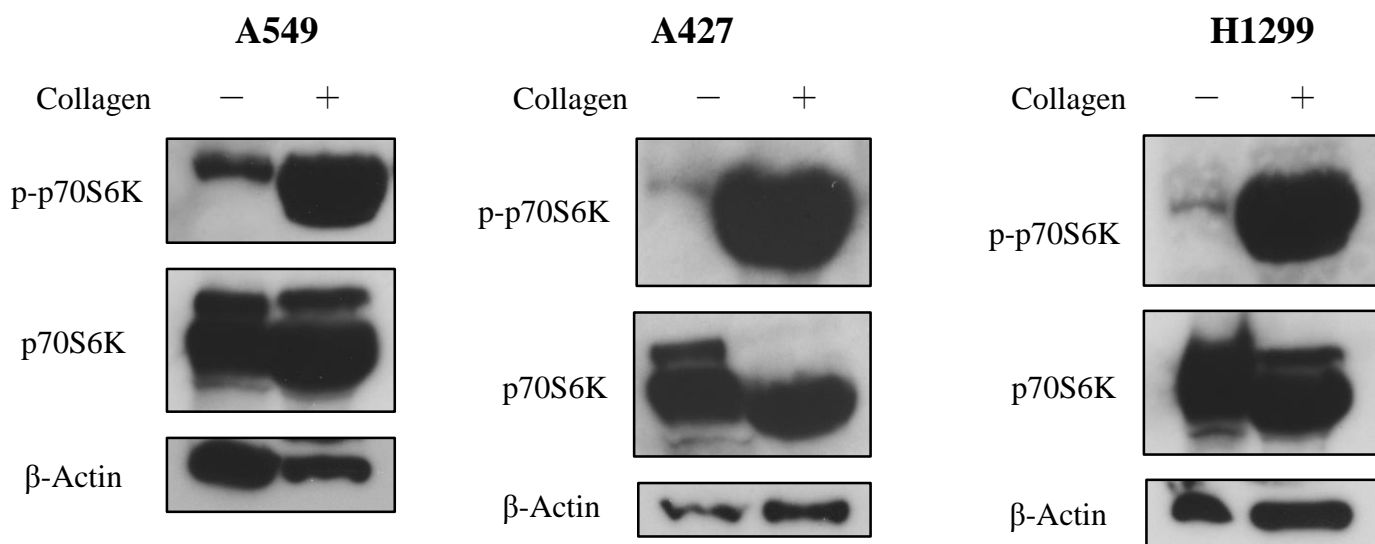
Collagen +

B

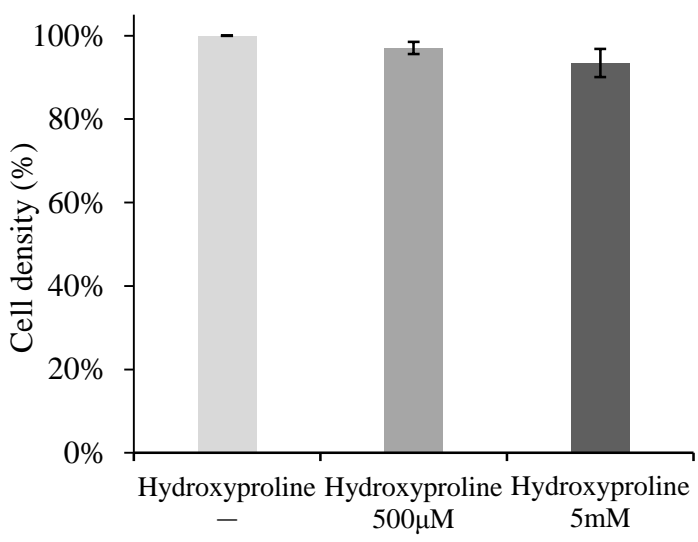
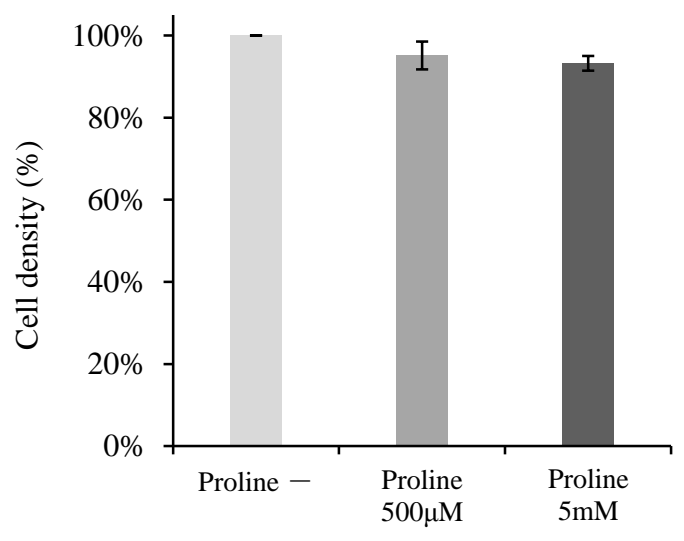
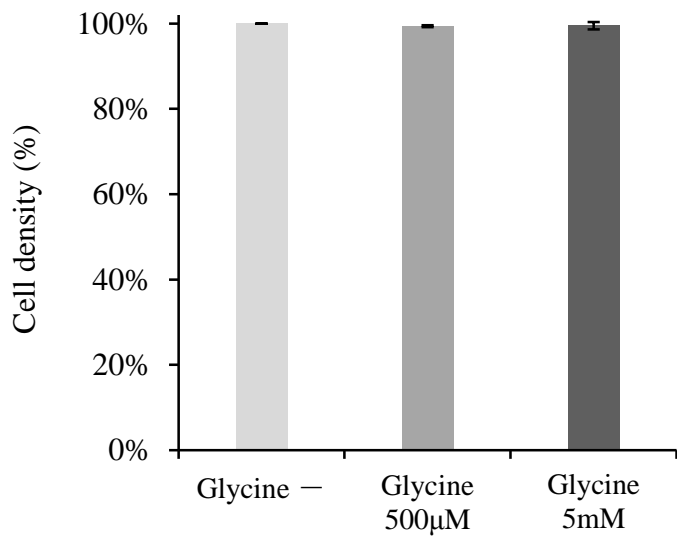


Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Fig 3  
doi: 10.1111/cas.13624.

Supp Fig 2. Collagen type I による PC-9 および HCC827 細胞における細胞の大型化



Yamazaki S et al., Cancer Science, 2018, Supp Fig 6  
doi: 10.1111/cas.13624.



Supp Fig 4. Collagen type I を構成する主要なアミノ酸による細胞増殖能変化