

## 論文の内容の要旨

論文題目 Collagen type I が誘導する分子標的薬耐性機構の解明  
氏名 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、臨床上的問題とされる。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

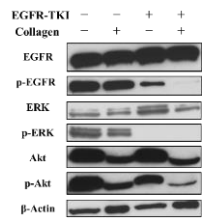


図1. EGFR-TKI 処理によるがん細胞の生存シグナル変化

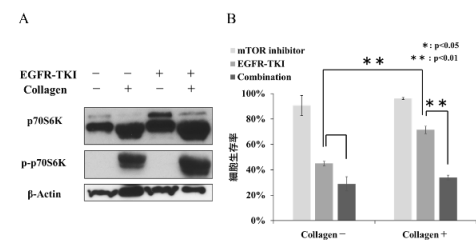


図2. コラーゲンの存在下における mTOR 活性化および薬剤相乗効果

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 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)。

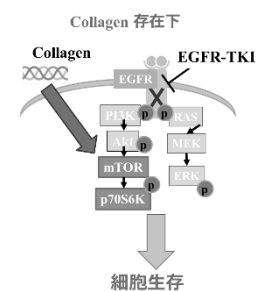


図3. コラーゲンによるがん細胞のシグナル伝達変化およびmTOR活性化

## 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)。

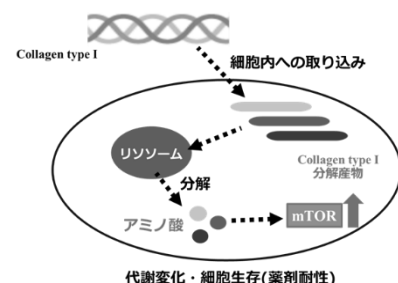


図4. コラーゲンによるmTOR活性化機構における仮説

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-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。

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 コンストラクトを作成し、細胞に導入した (図 6C)。shRac1 を用いた Rac1 の抑制においても同様に、shRac1 導入群においてコ

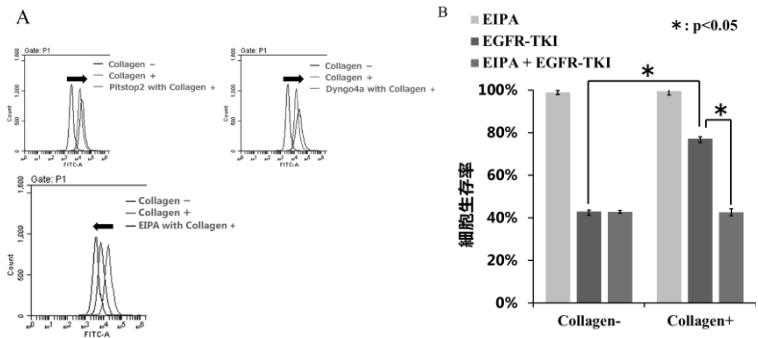


図5. EIPAによるコラーゲンの取り込み抑制および細胞生存率低下

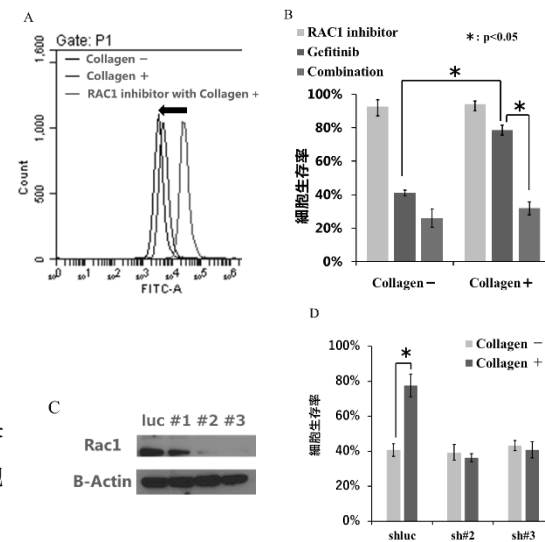


図6. Rac1 阻害によるコラーゲンの取り込み抑制および細胞生存率低下

ラーゲン存在下における 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すことが示唆された。

### 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 種類の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 500 $\mu$ M 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、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。

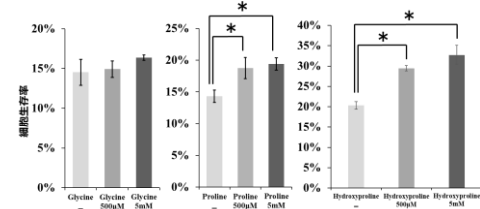


図7. 各アミノ酸添加による細胞生存率変化

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、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的であることから、シグナル伝達経路以外の mTOR 活性化経路を模索した結果、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を期待される。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することができると思う。

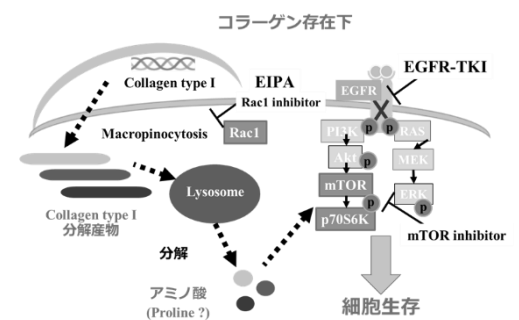


図8. Graphical abstract