

細胞外マトリクスによるがん細胞の分子標的薬耐性機構の解明

2017 年 3 月修了

47-156360 がん先端生命科学分野

山崎翔太

指導教員 石井源一郎 教授

[背景・目的]

がん組織は、がん細胞及び非がん細胞である間質細胞や細胞外マトリクスで構成される。間質細胞や細胞外マトリクスは、組織構造を支持する上で重要な役割を果たしている一方、がん細胞の増殖能や浸潤能に影響を与える。また、これらはがん細胞の薬剤耐性にも寄与していることが多数報告されてきた。従って、実際のがん細胞に対す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。近年がんに対する治療としては、増殖速度が比較的早い細胞を狙う抗がん剤ではなく、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。特に、EGFR-TKI (Epidermal Growth Factor – Tyrosine Kinase Inhibitor)は切除不能 EGFR (Epidermal growth factor Receptor) 遺伝子変異陽性のがん患者に対する治療に用いられている。全体の 70-80% の症例に対しては一定の治療効果を示すが、耐性を示す症例も数多く存在する。EGFR-TKI 耐性機構に関しては、EGFR-T790M などの二次的遺伝子変異や Met 増幅、HGF (Hepatocyte growth factor) の過剰発現が知られているが、これらは主にな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、がん組織内の主な細胞外マトリクスであるコラーゲンに着目し、コラーゲンが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。

キーワード ; がん組織、がん、細胞外マトリクス (コラーゲン)、分子標的薬 (EGFR-TKI)

[方法]

- (1) 分子標的薬感受性の検討において細胞生存率及び細胞形態変化を同時に観察可能な新規観察系の構築を試みた。
- (2) コラーゲン存在下における分子標的薬感受性変化を検討した。
- (3) 分子標的薬耐性の分子機構について薬剤の取り込みや生存シグナル変化を検討した。
コラーゲン存在下で惹起された耐性を、阻害剤を用いて解除することにより生存率を検討した。

[結果・考察]

1) 細胞生存率及び細胞形態変化を同時に検討できる新規観察系の構築

EGFR-TKI に感受性が高い肺腺癌細胞株 PC-9, HCC827 (EGFR 遺伝子変異陽性)を mRFP で蛍光標識し、EGFR-TKI の殺細胞効果及びがん細胞の表現型の評価を可能とする系を確立した (図 1)。

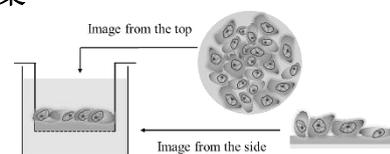


図1. 細胞生存率及び細胞形態変化を同時に検討できる新規観察系

2) コラーゲンによるがん細胞株の分子標的薬感受性変化の検討

コラーゲン存在下における PC-9, HCC827 群はコラーゲン非存在下における群と比較し、EGFR-TKI 投与後の細胞生存率が有意に上昇した (図 2)。このことから、コラーゲンにより両細胞株における EGFR-TKI に対する耐性が惹起される可能性が示唆された。

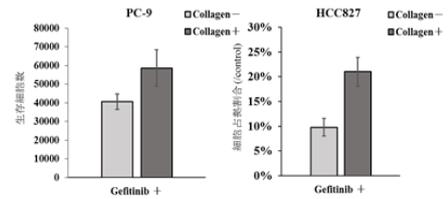


図2. コラーゲンによるがん細胞株の分子標的薬感受性変化

3) コラーゲンによるがん細胞株の薬剤取り込み能変化の検討

コラーゲン存在下における PC-9 群は、コラーゲン非存在下群と比較し、薬剤の取り込み能及び薬剤を取り込んでいる細胞の割合に変化は認められなかった (図 3)。このことから、コラーゲンにより惹起される分子標的薬耐性は、薬剤の取り込み能ではなく生存シグナル伝達の変化に起因するものであることが示唆された。

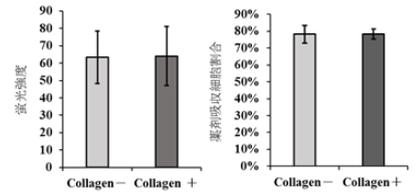


図3. コラーゲンによるがん細胞株の薬剤取り込み能変化

4) EGFR 下流シグナルに存在する生存因子におけるリン酸化の検討

EGFR-TKI 処理により コラーゲン存在下及び非存在下どちらの群でも EGFR のリン酸化が抑制されていた。また、EGFR 下流の生存因子である ERK (Extracellular Signal-regulated kinase) 及び Akt (AKT8 virus oncogene cellular homolog) のリン酸化も同様に EGFR-TKI 処理群において減少した (図 4)。さらに、コラーゲン存在下では、非存在下よりも pAkt の発現が減少していた。このことから、EGFR 下流に存在する生存因子である ERK 及び Akt はコラーゲンにより惹起される分子標的薬耐性の要因ではないことが示唆された。

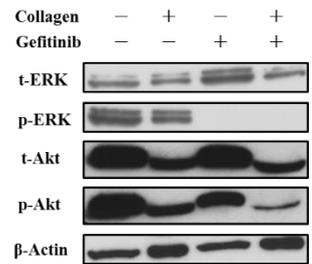


図4. EGFR-TKI 処理によるがん細胞内の生存シグナル伝達変化

5) コラーゲン存在下でリン酸化が亢進する生存因子の同定

1) コラーゲン存在下では細胞の腫大が認められたこと、2) 上記結果より、ERK/Akt よりさらに下流のシグナルに変化が起きている可能性を考慮し、Akt 下流の生依存因子である mTOR の活性化に着目した。その結果、mTOR (Mammalian target of rapamycin) の活性化の指標である p70S6K がコラーゲン存在下にて高度にリン酸化されていた。また、mTOR の阻害剤である Rapamycin の併用により、コラーゲン非存在下と同程度まで細胞生存率が低下した (図 5)。

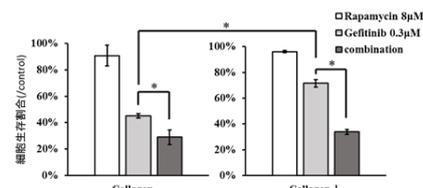
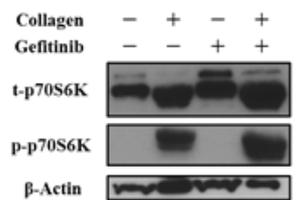


図5. コラーゲン存在下における mTOR の活性化及び薬剤相乗効果

[結論]

コラーゲン存在下においてがん細胞株(EGFR 遺伝子変異陽性)のシグナル経路が変化し、mTOR の活性化によって分子標的薬耐性が惹起される機構を新たに明らかにした (図 6)。

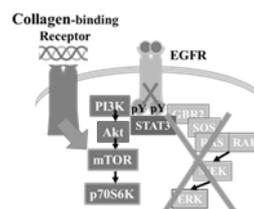


図6. 本研究で明らかにしたシグナル概略図