

6. がん増殖シグナルの局在制御機構解明と新規治療標的の探索

公益財団法人がん研究会がん化学療法センター基礎研究部 部長 片山 量平

概要

がん細胞では、遺伝子変異などにより細胞増殖シグナルが異常活性化することで無限に増殖し、やがて人を死に至らしめます。これらの増殖シグナルに関与する分子群の機能解析は進んできましたが、それらの分子群が何処でどの様に働いているのかといった、時空間的制御機構は十分明らかではありません。本研究ではタンパク質局在の可視化技術などを駆使し、がん細胞でのシグナル伝達がどのようにして伝えられているのかを、シグナル構成分子の同定とその局在を明らかにすることで、新たに増殖シグナルの依存性や治療抵抗性機構などが明らかにできると考え研究を進めました。対象がん種としては大腸がん（特に KRAS 変異型）と非小細胞肺癌（特にドライバーがん遺伝子陽性肺癌）を選択し、特に患者由来の初代培養がん細胞株を複数種用いて、種々解析を行いました。その結果、KRAS 変異大腸がんの中には、KRAS 阻害薬耐性を示すものがあり、一部では KRAS の局在が膜から細胞質へと変わること増殖シグナルの変容をしていることを見出しました。また、ALK や RET 融合遺伝子陽性肺癌における治療抵抗性機構として、それぞれ間質細胞由来のリガンド Gas6 を介した Axl 活性化、EGFR 抑制分子の喪失による増殖シグナル活性化による耐性とその克服法を見出しました。

本研究遂行には貴重な臨床検体の使用が必須でした。研究への検体利用を同意いただきました患者様、そのご家族の皆様にご心より御礼を申し上げます。そして、本研究は三菱財団 研究助成金なくしては遂行できませんでした。助成いただきましたこと心より御礼申し上げます。

背景および目的

がんは、我が国における死因の第1位であり、近年その治療法は目覚ましい進歩を遂げてきてはいるものの、より効果的な治療法の開発が求められている。がんは、遺伝子変異などにより細胞増殖シグナルが異常活性化し、細胞死シグナルの破綻、浸潤・転移能の獲得、抗腫瘍免疫からの逃避能の獲得などにより悪性形質を獲得することで発生・進行していく。従って、がんが生じた遺伝子異常等を明らかにし、がんが正常細胞とは異なる点やがんの特性を明らかにしていくことで、新たながんの治療標的になりうる因子・経路の同定につながる。細胞がん化の際には、がんを引き起こす原因となる遺伝子変異など（ドライバーがん遺伝子など）が生じる。それらの多くは、細胞増殖シグナルを制御する受容体型チロシンキナーゼや細胞内キナーゼなどに変異が生じたものであり、恒常的な細胞増殖シグナルが活性化され、がん化を起こす。この時がん細胞はドライバーがん遺伝子産物からの過剰な増殖シグナルに「依存した」状態となっているため、ドライバーがん遺伝子産物の機能を阻害する薬剤などにより増殖停止と細胞死が誘導され、抗腫瘍効果が得られる。このドライバーがん遺伝子産物からの増殖シグナルについては、どこで、どのくらいの種類のたんぱく質がどの程度集まってどのようにシグナルが伝達されているのかといった時空間的制御機構は殆ど明らかとなっていない。また、ドライバーがん遺伝子からのシグナルが分子標的薬などにより遮断された際に、どのようにしてがん細胞は生き延び（増殖シグナルを維持し）、やがて薬剤耐性を獲得していくかについてのシグナル変容は十分には明らかでない。そこで、本研究では、タンパク質局在の可視化技術などを駆使し、がん細胞での増殖シグナル伝達がどのようにして伝えられているの

かを、シグナル構成分子の同定とその局在を明らかにすることで、増殖シグナルの依存性や治療抵抗性機構などを解明し、新規治療標的の探索研究へとつなげていくことを目的とした。

方法

これまでに樹立済みの臨床検体由来がん細胞株(PDC)に加えて、新たに PDC を樹立し、薬剤感受性・抵抗性機構とその克服法を探索した。まず、大腸がんについては、がん研究会の倫理審査委員会承認済みのプロトコルに則り同意の得られた大腸がん患者の手術残余組織片から患者由来細胞株 (PDC) の樹立を行った。その後、手術検体のシーケンス解析から KRAS 変異を特定し、KRAS 変異陽性の大腸がん PDC を中心に用いて KRAS 阻害薬への感受性・抵抗性の分子機構解析を行った。その際に、細胞内の KRAS を含むタンパク質の局在について蛍光免疫染色法などを用いて解析した。また、薬剤ライブラリを用いたスクリーニングと遺伝子変異解析等を実施し、耐性メカニズムを探索した。

肺がんに関しても同様にがん研究会の倫理審査委員会承認済みのプロトコルに則り同意の得られた患者検体由来の PDC を樹立すると共に、既に樹立していた検体由来 PDC も用いて、患者由来 PDC に Cas9 を導入・発現させた細胞株を複数樹立し、ゲノムワイドの sgRNA ライブラリを導入し、どのような遺伝子をノックアウト (KO) すると治療感受性・抵抗性が変化するかをスクリーニングした。また、ALK 陽性肺がん患者由来細胞株を用いた検討では、ALK 阻害薬を処理した後に残存した抵抗性細胞 (Drug tolerant persister: DTP 細胞) の生存に関わる因子を探索し、その因子由来の生存・増殖シグナルがどのように活性化されているかについて解析を行った。発見した抵抗性メカニズムに応じて抵抗性克服法の探索研究も行い、動物実験による検討も行った。

結果および考察

大腸がんの研究について：KRAS 活性化変異陽性の大腸がん手術検体の残余分から樹立した初代培養がん細胞株 (PDC) の多くは KRAS 阻害薬単剤には初期耐性を示し、KRAS のみに依存性した細胞増殖や生存は示さず、KRAS 阻害薬の存在下では別のシグナル経路や因子が代償的に活性化することで耐性に寄与する可能性が示唆された。薬剤ライブラリを用いたスクリーニングと遺伝子変異解析等を実施し、耐性機序を探索した結果、「KRAS 阻害薬の存在下で受容体型チロシンキナーゼである EGFR の活性化に依存するグループ」と「細胞の生存や増殖、代謝に関連する PI3K/AKT 経路に依存するグループ」の少なくとも 2 つに分けられることが判明した。新たな耐性機序の解明のため、後者のグループに属する PDC に注目し、詳細な解析を実施したところ、ある PDC では KRAS 変異の他に Her2 遺伝子の増幅と PI3K の変異を有しており、PI3K/AKT 経路が強力に活性化していることが判明し、この細胞では PI3K と mTOR を同時に阻害することで強い増殖抑制効果が得られ、Her2 増幅によって KRAS 変異を有しながらも PI3K/AKT 経路に依存していることが示唆された。さらに興味深い点として、Her2 を遺伝子ノックアウトにより欠損させたところ、この細胞は、KRAS-MAPK 経路への依存性が高くなることが明らかになった。そこで、この細胞が依存するシグナル経路のスイッチがどのようなメカニズムで起こったのかを解析したところ本来細胞膜で活性化する KRAS がこの Her2 増幅の PDC では細胞質に主に局在し、Her2 をノックアウトした細胞では細胞膜に局在することが判明した。即ち、Her2 増幅型の KRAS 変異大腸がんでは KRAS の局在異常によって KRAS-MAPK 経路の依存性が低下し、KRAS 阻害薬への耐性が生じていることを発見した。本研究では遺伝子変異やタンパク質発現変化だけでは解明できなかったタンパク質の細胞内局在の変化によって誘導される耐性機序を見出すことに成功した。

肺がんの研究について：RET 融合陽性肺がん患者から検査などの残余組織検体を頂き、がん細胞株の樹立を行った。RET 陽性肺がん細胞株 JFCR-190 と JFCR-175 は、それぞれ、CCDC6-RET と KIF5B-RET 融合遺伝子を有している。これら細胞株と、購入可能な RET 融合遺伝子陽性肺がん細胞株 LC2/ad 細胞を用いて、RET 阻害薬抵抗性に関連する遺伝子を、CRISPR/Cas9 のノックアウトスクリーニングで探索した。JFCR-190 細胞にゲノムワイドの sgRNA ライブラリ (1 つの遺伝子をノックアウトするために 3~6 個の sgRNA が含まれる) を導入し、RET 阻害薬を約 9 日間処理して、その後生存した細胞に含まれた sgRNA を調べたところ、ERF1 (MIG6) 遺伝子のノックアウトが RET 阻害薬抵抗性に関与していることが強く示唆された。この結果を LC2/ad 細胞も用いて検証

したところ、MIG6 ノックアウト細胞では、EGFR 経路が過剰に活性化され、薬剤耐性が誘導されることが明らかになった。特にヒトの血中濃度に相当する 1 ng/mL 以下という低濃度のリガンド (EGF) を共処理することで、顕著な EGFR 活性化が認められ RET 阻害薬耐性が認められた。また、この耐性は、EGFR 経路の阻害抗体や低分子阻害薬を RET 阻害薬に併用することで克服された。RET 以外にも、ALK 陽性肺がんでも治療残存細胞の生存に関わるシグナルを解析したところ、受容体チロシンキナーゼ Axl が治療抵抗性がん細胞では亢進すると共に、そのリガンドである Gas6 は in vivo においては腫瘍内に入り込んできた線維芽細胞や一部のマクロファージが高発現し、Axl 発現治療残存細胞の増殖シグナルを担っていることを発見した。

結語

本研究では、がんにおける増殖シグナルが時空間的にどのように制御され、がんの治療薬感受性・抵抗性に関わるかの一端を明らかにすることができた。将来的には、このシグナル場の制御機構にどのようなタンパク質群が関わっているかを網羅的に解明していくと共に、その制御機構を操作することで、治療抵抗性細胞を感受性細胞に変容できるかといったことにも挑戦できるようになることが期待される。

(完)

発表論文

- 1) Maruyama K, Shimizu Y, Nomura Y, Oh-hara T, Takahashi Y, Nagayama S, Fujita N, *Katayama R. Mechanisms of KRAS inhibitor resistance in KRAS-mutant colorectal cancer harboring Her2 amplification and aberrant KRAS localization. NPJ Precis Oncol. 2025 Jan 6;9(1):4. doi: 10.1038/s41698-024-00793-6.
- 2) Wei X, Uchibori K, Kondo N, Utsumi T, Takemoto A, Koike S, Takagi S, Yanagitani N, Nishio M, *Katayama R. MIG6 loss increased RET inhibitor tolerant persister cells in RET-rearranged non-small cell lung cancer. Cancer Lett. 2024 Nov 1;604:217220. doi: 10.1016/j.canlet.2024.217220.
- 3) Utsumi T, Mizuta H, Seto Y, Uchibori K, Nishio M, Okamoto I, *Katayama R. AXL-Mediated Drug Resistance in ALK-Rearranged NSCLC Enhanced by GAS6 From Macrophages and MMP11 Positive Fibroblasts. Cancer Sci. 2025 Apr;116(4):1034-1047. doi: 10.1111/cas.70006.
- 4) Huang T, *Takagi S, Koike S, *Katayama R. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family members promotes synergistic cell death with ER stress inducers by disrupting autophagy in glioblastoma. Cell Death Discov. 2025 Jul 24;11(1):340. doi: 10.1038/s41420-025-02632-4.
- 5) Suzuki Y, Takeuchi M, Koike S, Takagi S, *Katayama R. Osteocyte-like differentiation of osteosarcoma by inorganic phosphate. Differentiation. 2025 Sep 8;146:100912. doi: 10.1016/j.diff.2025.100912.