

中山人間科学振興財団活動報告書 2020 年度国際交流助成（海外渡航）

研究テーマ

PDX ライブラリーを活用した薬剤耐性機序の解明と個別化医療への応用

氏名

田中 涼太 (Research Fellow)

所属

Thomas Jefferson University, Department of Medical Oncology

(Pennsylvania, USA)

【背景】

従来、癌領域の研究において薬効評価に主に使用されてきたのが、ヒト癌細胞株である。しかし、ヒト癌細胞株を免疫不全マウスに移植した Cell line-derived xenograft (CDX) マウスモデルは、ヒト腫瘍組織の不均一性を再現できないため、CDXをもとに新規に開発された抗癌剤のうち 95%以上の薬剤が、ヒトを対象とした臨床試験の段階で、抗腫瘍効果がないと判定される(1)。その理由としては、継代数を重ね不死化されたヒト癌細胞株は、本来の生物学的特性を失っていること、また癌の進展や転移に深く関与している癌間質細胞が欠如している事が挙げられる。そこで 2016 年にアメリカ国立がん研究所は、従来のヒト癌細胞株の使用を中止し、ヒト腫瘍異種移植 (Patient-Derived tumor Xenograft: PDX) マウスモデルの使用を開始した(2)。このモデルは、患者内に存在した腫瘍自体の持つ不均一性だけでなく、間質を含む微小環境をもマウス内でそのまま再現する事が可能である。今現在、癌治療薬開発のモデルとして世界で最も期待されており、新規癌治療の探究や個別化医療の実現につながるものと注目されている。

【研究目的】

脈絡膜悪性黒色腫 (Uveal Melanoma: UM) の約 80%は、G タンパク質受容体における GTPase をコードする GNAQ/11 の遺伝子異常を有しており、その異常は PKC を介した RAS-MAPK 経路や YAP 経路などのシグナル伝達経路を活性化させることで腫瘍の進行に関与する(3)。そのため、GNAQ/11 の遺伝子異常を有する腫瘍には、PKC 阻害剤が非常に有用であることがわかってきた(4)。しかし、シグナル伝達は非常に複雑で、PKC 阻害剤のみでは効果が不十分であり、MEK 阻害剤や PI3K 阻害剤などと併用する事が必要であると報告されている

(5)。その理由として、派遣先機関は、Hepatocyte Growth Factor: HGF が MAPK シグナル経路阻害剤に対する薬剤耐性獲得の機序に大きく関与していることを報告している(6)。そこで我々は、転移性 UM に対して PKC 阻害剤と MET 阻害剤を併用する事で非常に高い腫瘍抑制効果があると考え(図 1)、その効果を PDX マウスモデルで評価するため本研究を立案した。最終的に、臨床試験への導入および効果的な治療法の確立、*in vivo* における薬剤耐性獲得の機序を解明する。

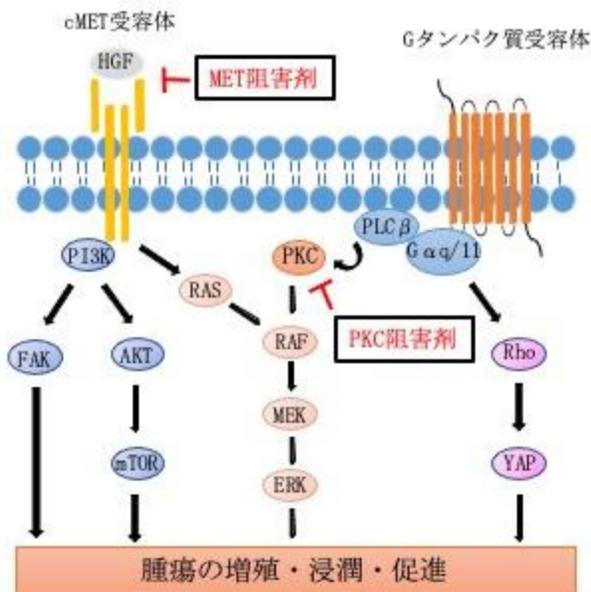


図 1. Gタンパク質受容体およびcMET受容体のシグナル伝達経路

図 1. Gタンパク質受容体およびcMET受容体のシグナル伝達経路

【研究方法、研究内容】

(1) 対象と研究デザイン

MET 阻害剤は、マルチキナーゼ阻害剤であるが、HGF/MET 経路を主に阻害する薬剤であり、HGF/MET 経路に依存度の高い腫瘍でより効果が発揮される事が期待される。まずは、UM 細胞株を使用し、*in vitro*, *in vivo* において human HGF: hHGF が存在する環境下で PKC 阻害剤と MET 阻害剤が相乗的に作用することを確認する。その後、hHGF ノックインマウスで PDX マウスモデルを作成し、併用療法の薬効評価を行う。

(2) *In vitro* での薬効評価

MET 遺伝子の増幅を認める UM 細胞株 (TJU-001)、MET 遺伝子の増幅を認めない UM 細胞株 (92.1) において、hHGF の存在下での 2 剤併用療法の効果を、細胞増殖アッセイ、Western Blot で確認する。

(3) *In vivo* での薬効評価

各細胞株において、hHGF ノックインマウスで肝腫瘍モデルを作成し、2 剤併用療法の効果を検討する。派遣先研究室では、肝腫瘍モデルの樹立および In Vivo Imaging System: IVIS での治療効果判定の方法を確立している (7, 8)。

(4) PDX ライブラリーを活用した薬効評価

hHGF ノックインマウスにおいて、派遣先研究室で樹立した PDX ライブラリーを活用して PDX マウスモデルを作成し、2 剤併用療法の効果を検討する。また、PDX ライブラリーには、多種多様な遺伝子異常を有した腫瘍や、各種薬剤に対し抵抗性を獲得した腫瘍が存在する。PKC 阻害剤と MET 阻害剤の併用療法が最も効果をもたらす集団を同定するバイオマーカーの探索や、薬剤耐性獲得の機序の解明を行う。

【研究結果】

(1) *In vitro*での薬効評価

MET 遺伝子の増幅を認める TJU-001 細胞株において、hHGF 存在下で PKC 阻害剤単独では薬剤への耐性が增強することを確認した(図2)(未発表)。また、PKC 阻害剤および MET 阻害剤の2剤を併用することで、hHGF の存在下で2剤の相乗効果が強くなることを確認した(図3)(未発表)。

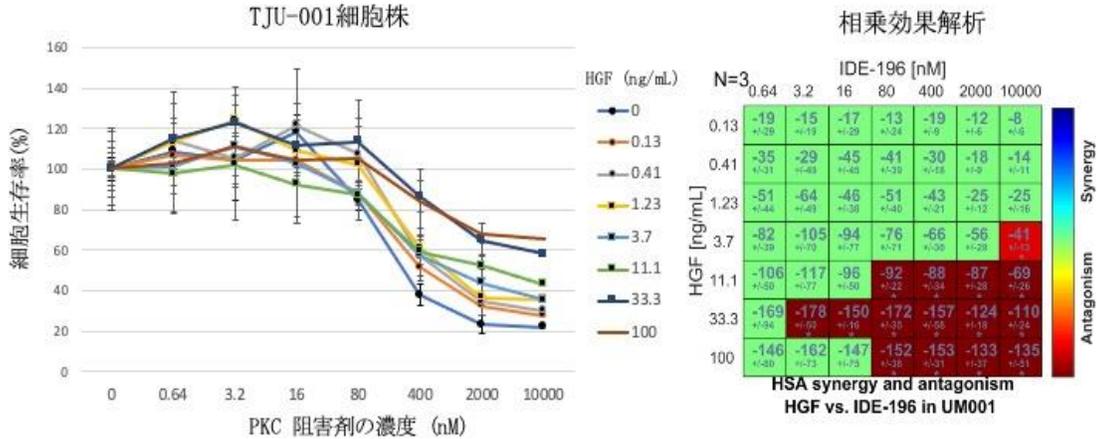


図2. HGFによるPKC阻害剤に対する薬剤耐性

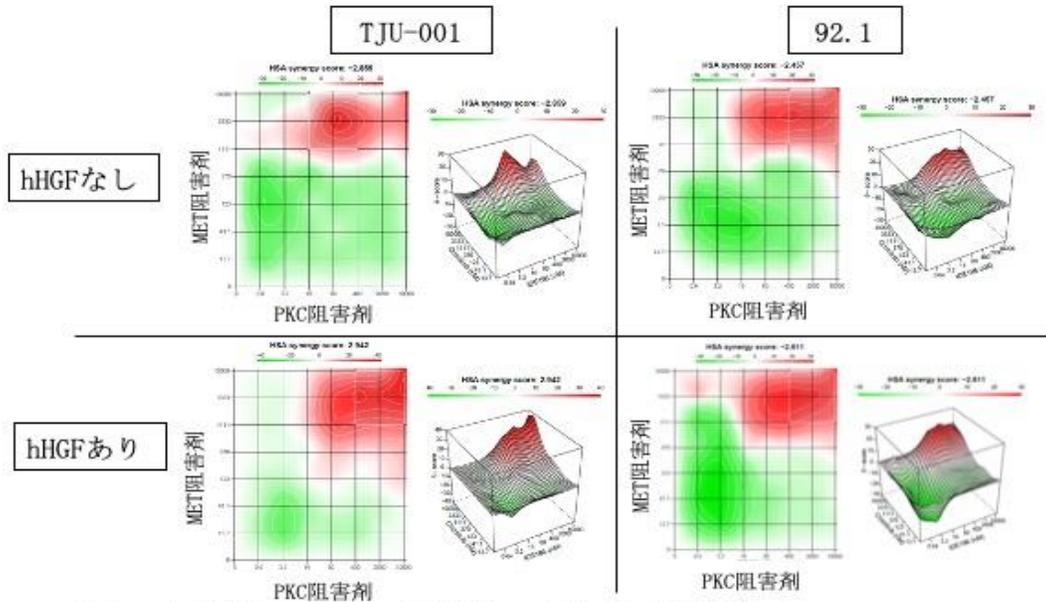


図3. 相乗効果スコア -PKC阻害剤とMET阻害剤の併用療法-

(2) *In vivo*での薬効評価

hHGF ノックインマウスにおいて、TJU-001 の肝腫瘍モデルを作成し、薬剤投与を開始した。腫瘍のモニタリングおよび薬効の評価は、IVISで行っている。

【考察と今後の展望】

*In vitro*の結果から、hHGF 存在下では PKC 阻害剤単独よりも、PKC 阻害剤および MET 阻害剤の併用療法が効果的であることが認められた。現在も留学を継続しており、計画した研究を継続している。また本研究を完遂した暁には、3 つの大きなインパクトと将来の展望が予想される。第 1 に転移性 UM、特に UM 肝転移に対する新たな治療法が確立されること、第 2 にその確立された治療法に対して効果のある集団を同定できるようになる可能性があることや、薬剤耐性獲得の機序解明の一助となる可能性が期待できること。そして最後に、PDX ライブラリーを有効に活用することで、*in vivo*での結果が実臨床に還元できるだけでなく、患者に代わり実臨床の経過を予想できる真の個別化医療の実現に繋がると考えている。

最後に、転移性 UM における新規治療法を開発し、世界の UM 治療に貢献するとともに、帰国後には日本での膵癌治療に還元することもまた目指している。派遣先研究室で得た、PDX ライブラリーを活用した治療法の開発から臨床試験への導入・主導までに至る、Translational Research を構築するノウハウを持ち帰り、前所属の大阪市立大学肝胆膵外科において継続した研究を行いたいと考えている。

【謝辞】

留学にあたり、助成いただきました公益財団法人、中山人間科学振興財団の皆様には厚く御礼を申し上げます。また、留学期間中にご指導を賜りました Thomas Jefferson University, Department of Medical Oncology の先生方や、留学前よりご指導を賜りました大阪市立大学大学院、消化器・肝胆膵外科の医局の先生の皆様はこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) J A DiMasi, J M Reichert, L Feldman, A Malins. Clinical approval success rates for investigational cancer drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. (2013) 94; 329-335
- (2) L Heidi. US cancer institute to overhaul tumour cell lines. *Nature*. (2016) 530;391
- (3) M Croce, S Ferrini, Ulrich Pfeffer, R Gangemi. Targeted therapy of uveal melanoma: recent failures and new perspectives. *Cancers*. (2019) 11;846
- (4) X Chen, Q Wu, L Tan, D Porter, MJ Jager, C Emery et al. Combined PKC and MEK inhibitor in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations. *Oncogene*. (2014) 33;4724-4732
- (5) G Carita, E Frisch-Dit-Leitz, A Dahmari, C Raymondie, N Cassoux, S Piperno-Neumann et al. Dual inhibition of protein kinase C and p53-MDM2 or PKC and mTORC1 are novel efficient therapeutic approaches for uveal melanoma. *Oncotarget*. (2016) 7;33542-33556

(6)H Cheng, M Terai, K Kageyama, S Ozaki, PA McCue, T Sato et al. Paracrine effect of NRG1 and HGF drives resistance to MEK inhibitors in metastatic uveal melanoma. *Cancer Research*. (2015) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0370

(7)S Ozaki, R Vuyyuru, K Kageyama, M Terai, M Ohara, H Cheng et al. Establishment and characterization of orthotopic mouse models for human uveal melanoma hepatic colonization. *The American Journal of Pathology*. (2016) 186;43-56

(8)T Sugase, BQ Lam, M Danielson, M Terai, AE Aplin, JS Gutkind et al. Development and optimization of orthotopic liver metastasis xenograft mouse models in uveal melanoma. *Journal of Translational Medicine*. (2020) 18;208