

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960547

氏名 新津宏明

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：テネシー州ナッシュビル（国名：アメリカ合衆国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

幹細胞マーカーLrig1 を発現する大腸癌細胞による化学療法抵抗機構の解明と克服

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日～令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：ヴァンダービルト大学

部局名：Department of Medicine

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1. アゾキシメタン・デキストラン硫酸塩によるマウス大腸腫瘍発生モデルの確立

アゾキシメタンは大腸上皮における遺伝子突然変異を誘導する変異原で、腹腔内投与反復により大腸腫瘍を発生させることが広く知られている。一方で、アゾキシメタンはマウス系統により、その感受性が異なる。本研究の目標は、マウスの大腸腫瘍内における、*Lrig1*陽性ないしは*Lgr5*陽性細胞の動態を観察するであり、このために有用な*Lrig1*^{Apple}および*Lgr5*^{EGFP-ires-CreERT2}レポータマウスは、アゾキシメタン抵抗性を示すC57B6/J系統と129系統のinbredで維持されている。アゾキシメタン10mg/kgの腹腔内投与4回による腫瘍発生を試みたが、腫瘍は20%のマウスで発生するのみで、腫瘍発生率を改善する方法が必要と考えられた。

我々は、皮膚腫瘍発生に用いられる2段階発がんモデル(変異原+炎症誘導)を応用し、アゾキシメタンにデキストラン硫酸塩自然飲水を追加した大腸腫瘍プロトコールを確立した(Figure 1A)。この方法では、アゾキシメタン初回投与から70日に約90%のマウスが遠位大腸に腫瘍を発生する(Figure 1B-D)。さらに、前述のレポータマウス系統の交配によって得られた*Lrig1*^{Apple/+}; *Lgr5*^{EGFP-ires-CreERT2/+}マウスに、本法で大腸腫瘍を発生させ、*Lrig1*および*Lgr5*の発現を確認すると、*Lrig1*は腫瘍全体に発現が認められるのに対して、*Lgr5*は腫瘍細胞の約半数に散在することが確認された(Figure 2. 対照群)。これは正常大腸・小腸上皮において、これらの幹細胞マーカーが陰窓底部円柱細胞に主に発現しているのと異なっており、腫瘍細胞自体が幹細胞様性質を持つ可能性が示唆された。

2. 大腸腫瘍発生マウスへの化学療法の至適化

続いて、アゾキシメタン・デキストラン硫酸塩により大腸腫瘍を発生した*Lrig1*^{Apple/+}; *Lgr5*^{EGFP-ires-CreERT2/+}マウスにおける、5-fluorouracil(5-FU)とイリノテカンの至適投与量を検討した。まず、イリノテカン 50mg/kg (day1)+5-FU 50mg/kg (day2)の weekly regimen を検討した。投与期間中は、マウス大腸カメラ(Karl Storz社製)により腫瘍径の経時観察を行ったが、期待された腫瘍縮小は得られず、8サイクル時点で腫瘍を回収し、化学療法が*Lrig1*および*Lgr5*陽性細胞に与える影響を検討した。化学療法終了3日後では、*Lgr5*陽性細胞数が減少しているのに対し、*Lrig1*陽性細胞は引き続き大部分の腫瘍細胞に認められた。さらに、化学療法終了8日、15日後では*Lgr5*陽性細胞が増加し、腫瘍内に散在していた。このことから、*Lgr5*陽性細胞が化学療法に感受性を示す一方で、*Lrig1*陽性細胞は化学療法に抵抗性であり、化学療法からの回復にあたって、*Lgr5*陽性細胞が増加し、無治療群と同様の*Lrig1*/*Lgr5*分布に回復することがわかった(Figure 2)。

一方で、前述の化学療法レジメンでは長期の化学療法を要することや、実際に腫瘍縮小が認められないことが課題であると考えられた。そこで、化学療法剤の投与量増加を検討し、このマウスモデルではイリノテカン 50mg/kg (day1、毎週投与)+5-FU 30mg/kg (day1-4、4日連続投与)まで安全に投与が可能であることがわかった(Figure 3)。上記と同様に、腫瘍における*Lrig1*陽性細胞および*Lgr5*陽性細胞の動態を確認したところ、化学療法終了直後において、*Lgr5*陽性細胞の大部分が消失していたが、腫瘍実質と間質の間に残存していることがわかった。一方で*Lrig1*は腫瘍細胞の大部分に発現していた。現在、レーザキャップチャーマイクロダイセクション法により、*Lgr5*陽性部分と、*Lgr5*陰性部分を個別に回収し、RNAseq法による転写産物プロファイリングを遂行中である。

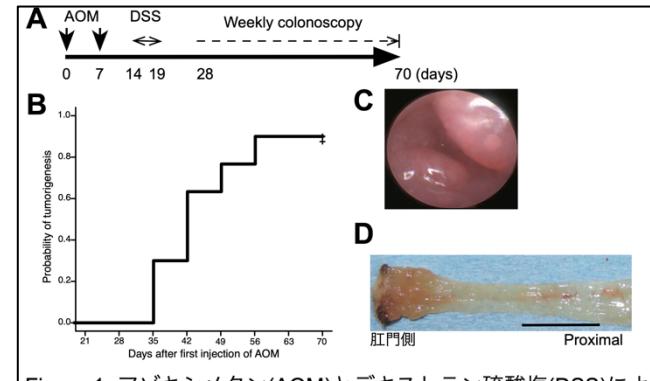


Figure 1. アゾキシメタン(AOM)とデキストラン硫酸塩(DSS)による大腸腫瘍発生モデル

(A) 投与スケジュール：AOM 10mg/kg/weekly, DSS 2%, 5日間自由飲水 (B) 大腸腫瘍発生までの期間 (C) 大腸腫瘍の大腸内視鏡観察像 (D) 治療開始後70日目の大腸腫瘍(肉眼像)

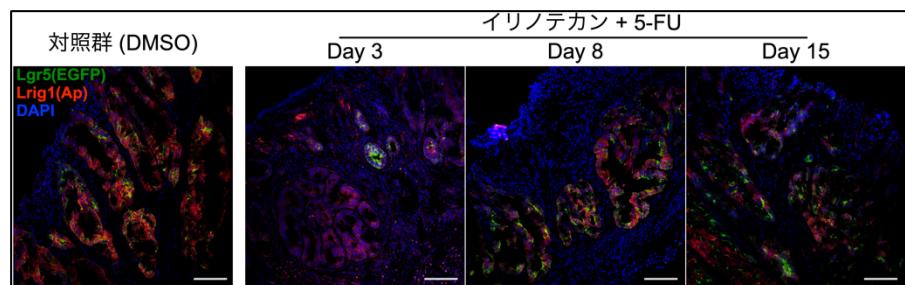
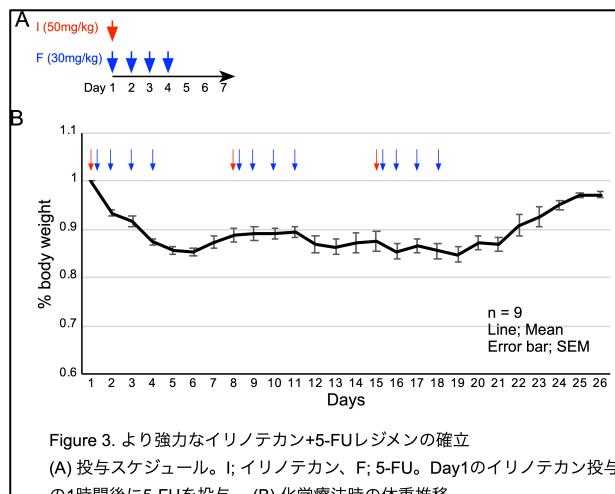


Figure 2. 化学療法が大腸腫瘍内の*Lrig1*および*Lgr5*陽性細胞に与える影響

AOM/DSS誘発性腫瘍発生マウスを8サイクルのイリノテカン+5-FUで治療後、*Lrig1*陽性細胞(赤色蛍光)と*Lgr5*陽性細胞(緑色蛍光)の動態を観察した。対照群では大部分の腫瘍細胞が*Lrig1*陽性であるのに対して、*Lgr5*陽性細胞は全体の半数で、散在していた。一方、治療終了後3日では、大部分の*Lgr5*陽性細胞は消失していたが、*Lrig1*陽性細胞は残存していた。治療終了後、8日、15日後には*Lgr5*陽性細胞は対照群と同等まで回復している。核染色：DAPI, Scale Bar: 100μm



3. LRIG1 のがん抑制機能についての検討

Lgr5 は増殖が盛んな腸管上皮幹細胞のマーカーであるのに対して、Lrig1 は腸管上皮幹細胞のうち、比較的増殖の緩やかな一群で発現していることがわかっている(Powell AE, Cell 2012)。一方で、化学療法は激しく増殖する細胞でより感受性が高く、このことが Lgr5 ないしは Lrig1 陽性細胞の化学療法感受性に関与していることが示唆される。しかし、Lrig1 陽性腸管幹細胞が比較的緩やかな増殖をきたすメカニズムは明らかではない。ひとつには、Lrig1 は ERBB をはじめとした、受容体型チロシンキナーゼの阻害機能をもち、これらの抑制により細胞増殖が抑制されていることが考えられる。

所属先研究室より、Lrig1 ノックアウトマウスでは、近位十二指腸において、EGFR、ERBB2-3 の発現上昇、ERK1/2 活性の上昇とともに、6 月齢で腺腫が自然発生することが報告されていた(Powell AE, Cell 2012, Wang Y, Am. J. Pathol. 2015)が、この腫瘍発生メカニズムがどの受容体型チロシンキナーゼによるものかは不明であった。そこで、この Lrig1 ノックアウトマウスに、EGFR のノックアウトを誘導した時の、十二指腸腫瘍発生に及ぼす影響を検討した。

Lrig1^{CreERT2} マウスは、Lrig1 の転写開始部位に CreERT2 カセットを置換したアレルをもち、Lrig1 転写活性部位に一致して CreERT2 を発現し、かつ Lrig1 がノックアウトされている。このマウスに *Egfr^{fl/fl}* マウスを交配し、*Lrig1^{CreERT2/CreERT2}; Egfr^{fl/fl}* マウスを作製した。このマウスモデルでは、Lrig1 のノックアウトされた細胞のみで、タモキシフェン誘導性に *Egfr* のノックアウトが追加できる。2 月齢のマウスにタモキシフェンを投与し、6 月齢での腫瘍発生を確認したところ、タモキシフェン非投与群では、全例に腫瘍発生を認めたが、タモキシフェン投与群では半数のマウスで腫瘍を発生したのみで、しかもその腫瘍体積はコントロール群と比較して、有意に小さかった (Figure 4A)。このことから、LRIG1 の腫瘍抑制効果は、EGFR に大きく依存していることが示唆された。さらに、タモキシフェン投与群で残存した腫瘍の発生メカニズムを検討したところ、*Egfr* ノックアウトに伴って、代償的に ERBB3 活性が上昇していることがわかった (Figure 4B-4C)。以上より、この十二指腸腫瘍発生モデルにおいて、LRIG1 は EGFR/ERBB3 を介して作用していることが示唆された。

4. LRIG1 のヒト大腸癌における検討

LRIG1 のマウスモデルにおける十二指腸腫瘍発生メカニズムは明らかになったが、大腸腫瘍、とくにヒト大腸癌における、LRIG1 の機能、意義は依然不明であった。我々は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の公共データセットを解析することで、ヒト大腸癌における LRIG1 の遺伝子変異、遺伝子発現量について検討した。

LRIG1 の遺伝子変異の検討では、LRIG1 の遺伝子変異はヒト大腸癌の 4%に観察されるに過ぎず、変異部位は遺伝子全体に散在して見られ、明らかなホットスポットは認められなかつた。

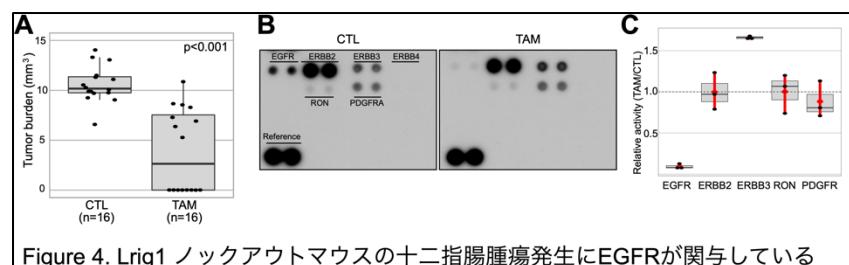


Figure 4. Lrig1 ノックアウトマウスの十二指腸腫瘍発生にEGFRが関与している
(A) *Lrig1CreERT2/CreERT2; Egfr flox/flox* マウスにおいて、タモキシフェン誘導性 *Egfr* ノックアウトが十二指腸腫瘍発生に与える影響。(B, C) 同マウスモデルの十二指腸腫瘍における受容体型チロシンキナーゼ活性の比較。(B) RTK array のイムノブロット、(C) B に示したプロットの定量的評価。CTL群に対するTAM群の相対的活性をドットプロットと箱ひげ図に示し、赤色の棒で95%信頼区間を示す。

続いて、LRIG1 遺伝子発現について検討した。LRIG1 の遺伝子発現は、正常細胞に比べ、大腸癌で有意に低下しており (Figure 5A)、LRIG1 のがん抑制機能が示唆された。さらに、大腸癌のどのサブセットで LRIG1 遺伝子発現が低下しているかを検討したところ、*BRAF*^{V600E} 変異を有し、マイクロサテライト不安定性かつ CpG アイランド高メチル化を高頻度に伴う大腸癌 (*BRAF*^{V600E}/MSI-H/CIMP-H 大腸癌)において、特にその遺伝子発現が低下していた (Figure 5B–5D)。さらに、この特徴を有する大腸癌細胞株である HT29、RKO において脱メチル化剤であるアザシチジン投与で、LRIG1 の発現が回復し、EGFR、ERBB2–3 の蛋白質レベルの低下も認められたことから (Figure 5E, 5F)、*BRAF*^{V600E} 変異大腸癌において、CIMP-H を介した LRIG1 遺伝子発現低下のメカニズムが示唆された。

過去の研究報告によると *BRAF*^{V600E} 変異大腸癌に対する、BRAF 阻害剤単剤治療は、治療反応性に EGFR 活性の上昇をきたすことで、抵抗性を示すとされ、EGFR 阻害(中和抗体ないしはチロシンキナーゼ阻害剤)の併用が必要である。さらに、国際共同第 3 相試験 (BEACON CRC 試験)の結果を受け、BRAF 阻害剤(エンコラフェニブ)と EGFR 中和抗体(セツキシマブ)が現在の標準治療である。我々は、LRIG1 が BRAF 阻害剤投与前にも EGFR および他の ERBB 活性の上昇に関与しているのではないかという仮説を立て、その検証を行うべく、すでに解析・報告が完了した第 2 相臨床試験 (SWOG1406) の検体を用いて、LRIG1 の発現量と clinical response や生存期間との関連の検討を開始している。この解析により、LRIG1 が低下例で、EGFR 中和抗体に加え、より広いスペクトラムで ERBB チロシンキナーゼ活性を阻害るべきかという疑問に答えることが期待されている。

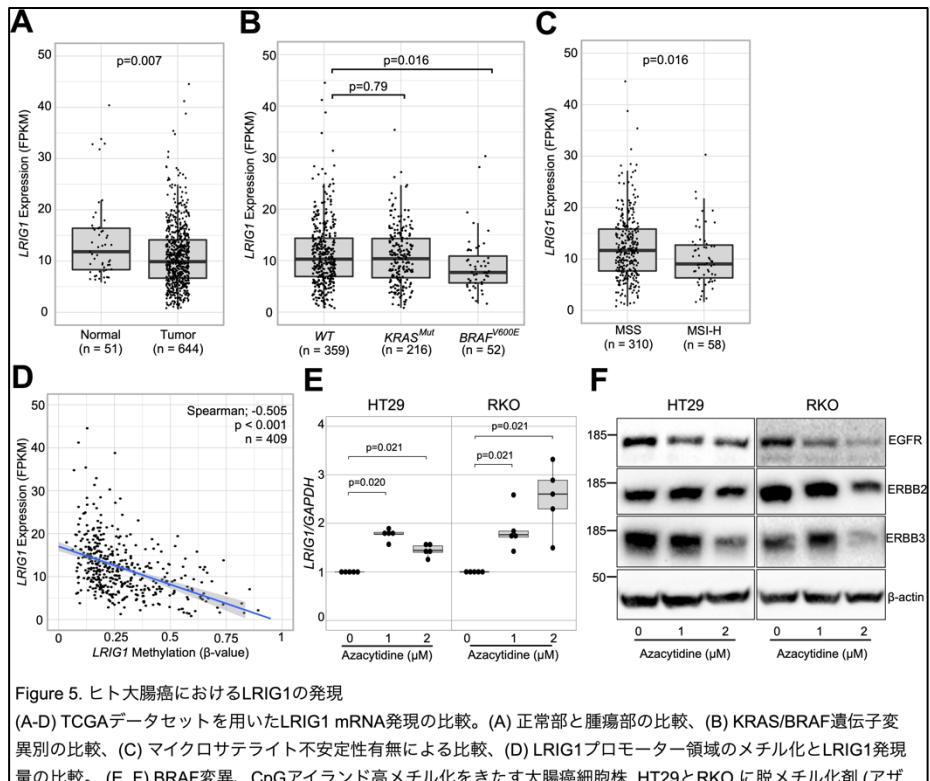


Figure 5. ヒト大腸癌におけるLRIG1の発現

(A-D) TCGAデータセットを用いたLRIG1 mRNA発現の比較。(A) 正常部と腫瘍部の比較、(B) KRAS/BRAF遺伝子変異別の比較、(C) マイクロサテライト不安定性有無による比較、(D) LRIG1プロモーター領域のメチル化とLRIG1発現量の比較。(E, F) BRAF変異、CpGアイランド高メチル化をきたす大腸癌細胞株、HT29とRKO、に脱メチル化剤(アザシチジン)を投与し、LRIG1 mRNA発現量(E)とEGFR, ERBB2-3蛋白質レベル(F)を比較