

令和 6 年 2 月

清水翔太 学位論文審査要旨

主 査 久 郷 裕 之
副主査 梅 北 善 久
同 藤 原 義 之

主論文

Inhibition of the bone morphogenetic protein pathway suppresses tumor growth through downregulation of epidermal growth factor receptor in MEK/ERK- dependent colorectal cancer

(BMP経路阻害は、上皮成長因子受容体制御を介しMEK/ERK-依存的な大腸癌増殖を抑制する)

(著者：清水翔太、近藤純平、小沼邦重、Roberto Coppo、太田可純、鎌田真由美、原田陽平、田中良尚、中澤（足立）麻衣、玉田嘉紀、奥野恭史、河田健二、小瀨和貴、Robert J. Coffey、藤原義之、井上正宏)

令和5年 Cancer Science 114巻 3636頁～3648頁

参考論文

1. The prognostic significance of the comprehensive complication index in patients with gastric cancer

(胃癌におけるcomprehensive complication indexの予後因子としての有用性)

(著者：清水翔太、齊藤博昭、河野友輔、村上裕樹、宍戸裕二、宮谷幸造、松永知之、福本陽二、藤原義之)

令和元年 Surgery Today 49巻 913頁～920頁

2. Prognostic significance of pre- and post-operative red-cell distribution width in patients with gastric cancer

(胃癌における術前・術後の赤血球粒度分布幅の予後因子としての有用性)

(著者：清水翔太、齊藤博昭、河野友輔、村上裕樹、宍戸裕二、宮谷幸造、松永知之、福本陽二、藤原義之)

令和元年 Journal of Gastrointestinal Surgery 24巻 1010頁～1017頁

学位論文要旨

Inhibition of the bone morphogenetic protein pathway suppresses tumor growth through downregulation of epidermal growth factor receptor in MEK/ERK- dependent colorectal cancer

(BMP経路阻害は、上皮成長因子受容体制御を介しMEK/ERK-依存的な大腸癌増殖を抑制する)

TGF β ファミリーに属するリガンド蛋白であるBMP (bone morphogenetic protein) は、正常腸管上皮に対する強力な増殖抑制と分化誘導作用を持つことが知られており、Smadを通してそのシグナルが伝えられる。このBMPの大腸癌における意義には相反する報告があり、一定の見解が得られていない。癌細胞初代培養法は一般的な癌細胞株に比べ患者癌組織の形質を保持することが近年報告されており、癌細胞初代培養法であるCTOS (Cancer Tissue-Originated Spheroid) 法は効率よく癌細胞を調製することができる(Kondo J, et al. 2011. PNAS)。そこで、CTOS法で調製した大腸癌オルガノイドを用い、BMPの大腸癌に対する作用には多様性があるとの仮説の元、腫瘍促進的に作用する大腸癌群においては、BMP阻害が治療薬になり得ると考えた。

方法

18例の大腸癌オルガノイドを用い、in vitroおよびin vivoにおけるBMP阻害剤LDN193189 (LDN) の作用およびその機序を解析した。

結果

(1) 無血清培地におけるLDN (10nM~10 μ M) の作用を検討したところ、増殖抑制効果は患者間で多様性を示し、IC₅₀は最大で約1000倍の差を認めた。Western blottingによるEGFR/MEKシグナル活性の評価では、LDNによりEGFRタンパク量が減少し、ERKのリン酸化が抑制されていた。LDNのオルガノイド増殖抑制並びにEGFR/MEKシグナル変化は、EGFやHeregulin等の増殖因子の添加により減弱した。

(2) LDNによるEGFRの減少は、mRNA量とは相関せず、EGFRのユビキチン化が亢進していたことから、EGFRタンパクレベルでの制御が関与すると考えられた。EGFR分解を誘導する因子として、腸上皮幹細胞マーカーでもあるLRIG1 (Leucine-rich repeats and

immunoglobulin-like domains protein 1) が知られているが、LDNによるオルガノイド増殖抑制とLRIG1誘導が有意に正の相関を示した。LRIG1をノックダウンすると増殖抑制効果ならびにMEK/ERK経路の阻害効果は減弱した。

(3) *in vitro*において、MEK阻害剤（トラメチニブ）とLDNによるオルガノイド増殖抑制効果は有意に正の相関を示した。LDN有効例では、トラメチニブとの併用により、相加的に増殖が抑制され、ERKのリン酸化が抑制された。

(4) オルガノイド移植腫瘍担癌マウスをLDNで治療したところ、単独では*in vitro*有効例も抗腫瘍効果を示さなかった。そこで、担癌マウスをLDNとMEK阻害剤（トラメチニブ）で併用治療したところ、*in vitro*におけるLDN有効例において、LDNはトラメチニブとの併用効果を示した。

考 察

本研究により、BMPの症例間多様性を明らかにし、LRIG1誘導を介したEGFRシグナルの抑制がLDNの増殖抑制機序の一つであることを示した。一方、無血清培地におけるLDNのオルガノイド増殖抑制やEGFR/MEK/ERKシグナル変化は、EGFやHeregulin等の増殖因子の添加により減弱した。かつ、*in vitro*におけるLDN有効例も、*in vivo*ではLDN単剤では抗腫瘍効果を認めなかった。このことからLDNの増殖抑制効果は、残存するEGFRの効率的な刺激や様々なRTKを介したMEK/ERK経路の活性化でマスクされると考えられた。故にMEK阻害が有効例においてBMP阻害が効果を示したと考えられた。近年、進行大腸癌においてEGFR/RAS/MEK/ERK経路を標的とした分子標的薬が化学療法奏効率の向上をもたらしているが、依然完全ではない。本研究で得られた知見は、BMP阻害が治療戦略になる可能性をもつ。

結 論

大腸癌症例の一部において、BMP/MEK阻害剤の併用が新しい治療法となる可能性が示唆された。さらに、オルガノイドを用いた*in vitro*のアッセイやLRIG1誘導をバイオマーカーとして治療有効群を予測できる可能性が示された。