

がん微小環境がもたらす治療抵抗性獲得機構の解明と 新規治療標的の開発

愛知県がんセンター（研究所）がん病態生理学分野
主任研究員 藤下 晃章

（共同研究者）

愛知県がんセンター（研究所）がん病態生理学分野 主任研究員 小島 康

はじめに

殆どの固形がんで、高い奏効率や生存期間を有意に延長させる分子標的薬であっても完治に至らず、がん細胞は治療抵抗性を獲得し再発することが確認されている。化学療法剤や分子標的薬に対する抵抗性獲得機序として薬剤排出の促進、標的分子の変異や下流分子の変異・活性化などが明らかにされており、それはがん細胞自律的な現象として捉えられている。

一方、生体におけるがん細胞は血管新生やがん関連線維芽細胞、マクロファージをはじめとする免疫細胞など様々な影響を周辺間質細胞（がん微小環境）から受けているが、がん微小環境が治療抵抗性に与える影響については生体レベルで殆ど検証されていなかった。

浸潤性大腸がんモデルマウスを用いた解析から、大腸がん浸潤部の微小環境が分子標的薬であるmTOR阻害薬によって活性化し、がん細胞の薬剤抵抗性獲得に積極的に寄与することを見出した⁽¹⁾。本研究では治療抵抗性がんの克服に向け、マルチオミクス解析により、間質細胞由来の治療薬抵抗性関連分子の同定と治療手段の探索を行う。

結 果

1. mTOR阻害薬抵抗性腺がんでは酸化的リン酸化や脂肪酸代謝に関連する遺伝子群が変動している。

本研究では分子標的薬抵抗性腺がんモデルとして浸潤性大腸がんモデルマウスである *cis-Apc/Smad4* マウスを使用した⁽²⁾。このマウスにmTOR阻害薬AZD8055 (20mg/kg p.o.) を2ヶ月間投与すると腸がんの管腔側への拡大を抑えるものの、漿膜側の腺がんは抵抗性を獲得し、

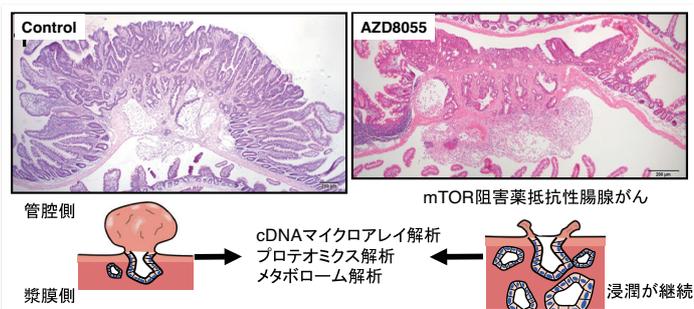


図1. 本研究で使用する大腸がんモデルマウスに発生したmTOR阻害薬抵抗性腸管腺がん

浸潤が持続する(図1)。

分子標的抵抗性腺がんの遺伝子発現を検証するために、溶媒投与したマウスの腸腺がん(コントロール)とmTOR阻害薬抵抗性腺がんを用いてcDNAマイクロアレイを実施した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)により酸化的リン酸化、脂肪酸代謝、脂肪生成に関連する遺伝子群に変動が認められた(表1)。

続いて、mTOR阻害薬抵抗性腺がんにおけるタンパク発現をプロテオミクス解析により検証した。MetascapeによるEnrichment解析によりタンパク翻訳、解糖系、脂肪酸代謝に関わるタンパク群がmTOR阻害薬抵抗性腺がんでは減少が認められた(図2)。mTORは、タンパク合成や代謝を制御する分子であり、これらの結果から、mTOR阻害薬抵抗性腺がんにおいてもmTORの機能そのものは阻害薬によって抑制され続けていることが示唆された。

Oxidative phosphorylation
Fatty acid metabolism
Adipogenesis
Interferon alpha response
Bile acid metabolism

表1. mTOR阻害薬抵抗性腸管腺がんに変動する遺伝子群

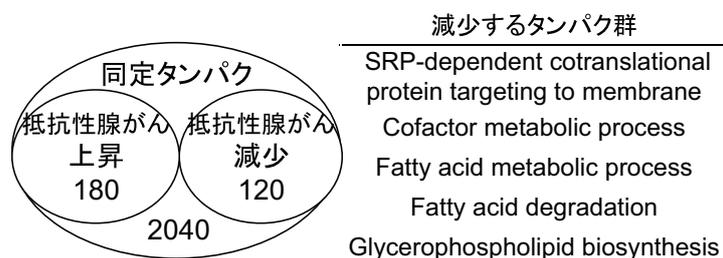


図2. mTOR阻害薬抵抗性腸管腺がんでは減少するタンパク群

減少するタンパク群
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
Cofactor metabolic process
Fatty acid metabolic process
Fatty acid degradation
Glycerophospholipid biosynthesis

2. mTOR阻害薬抵抗性腺がんではヒスタミンおよびその代謝産物が増加している。

さらに、mTOR阻害薬抵抗性腺がんにおける代謝産物の変化を検証するためにメタボローム解析を実施したところ、特定のアミノ酸の量がmTOR阻害薬抵抗性腺がんでは著しく変動していた。特にヒスタミンとその代謝産物である1-メチルヒスタミンは正常組織では検出されないが、mTOR阻害薬抵抗性腺がんでは著しく増大した(図3)。一方、腫瘍組織中のヒスタミンの原料であるヒスチジン量はmTOR阻害薬の影響を受けなかった。

腸管のヒスタミンは肥満細胞や好塩基球で主に産生される

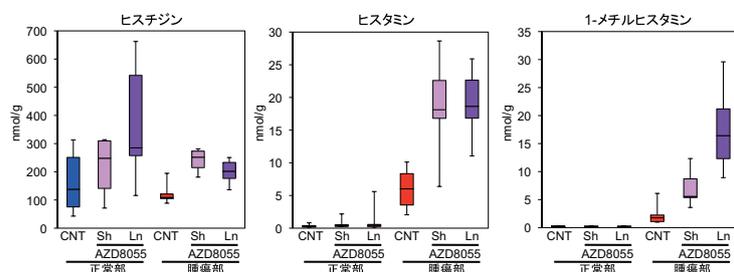


図3. mTOR阻害薬抵抗性腸管腺がんではヒスタミンが増大している。Sh: 2週間、Ln: 8週間投与 = mTOR阻害薬抵抗性

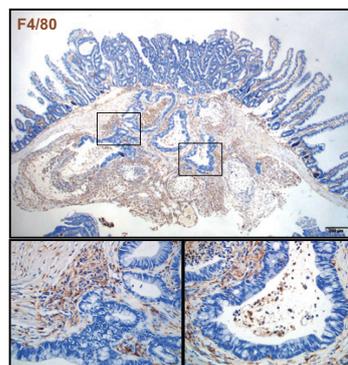


図4. 腸管腺がん浸潤部にF4/80陽性マクロファージが多数集積している。mTOR阻害薬抵抗性腸管腺がん組織をF4/80抗体を用いて免疫染色した。

下図: 上図黒枠の拡大

他、マクロファージなどでも一過性に産生される。我々はmTOR阻害薬抵抗性腺がん組織中の肥満細胞をc-Kit抗体を用いた免疫染色により検証したが、その存在は確認されなかった。一方、F4/80陽性のマクロファージは浸潤部組織に多数確認された(図4)。

3. ヒスタミン阻害薬の併用投与によりmTOR阻害薬抵抗性腺がんの浸潤を抑制する。

mTOR阻害薬抵抗性腺がん組織中のヒスタミンが抵抗性に関わる可能性について検証するため、ヒスタミン受容体の発現をレーザーマイクロダイゼクションにより腺がん上皮と間質を分離し、RT-PCRにより確認した。腺がん上皮および間質においてヒスタミンH1

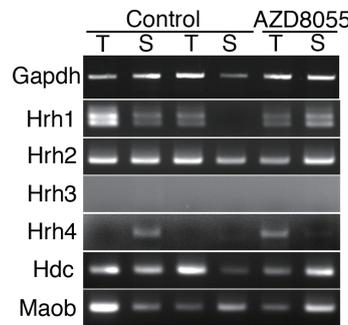


図5. 腺がん上皮(T)と間質細胞(S)でヒスタミンH1受容体とH2受容体が発現している。レーザーマイクロダイゼクションにより組織を分離した。AZD8055:mTOR阻害薬抵抗性腺がん

受容体(Hrh1)およびH2受容体(Hrh2)の発現が認められた(図5)。そのため、H1受容体阻害薬(マレイン酸クロルフェニラミン 40mg/kg i.p.)とH2受容体阻害薬(ファモチジン 40mg/kg i.p.)をAZD8055(20mg/kg p.o.)とそれぞれ単独または併用投与し、8週間後に*cis-Apc/Smad4*マウスの腸腺がん形成および浸潤に対する影響を検証した。AZD8055、H1受容体阻害薬またはH2受容体阻害薬単独投与は、腺がん形成数および浸潤抑制効果が認められなかった。また、AZD8055とH1受容体阻害薬の併用も腺がん形成と浸潤抑制効果が認められなかった。一方、AZD8055とH2受容体阻害薬の併用では腺がん抑制効果は認められなかったが、浸潤抑制傾向が認められた。さらにAZD8055とH1およびH2受容体阻害薬の三剤併用では、腺がん形成の抑制効果は認められなかったが、漿膜側への浸潤を有意に抑制した(図6)。以上の結果から、mTOR阻害薬抵抗性腺がんにおいて上昇したヒスタミンは腺がん組織のヒスタミンH1とH2受容体を介して浸潤を促進させる可能性が示唆された。

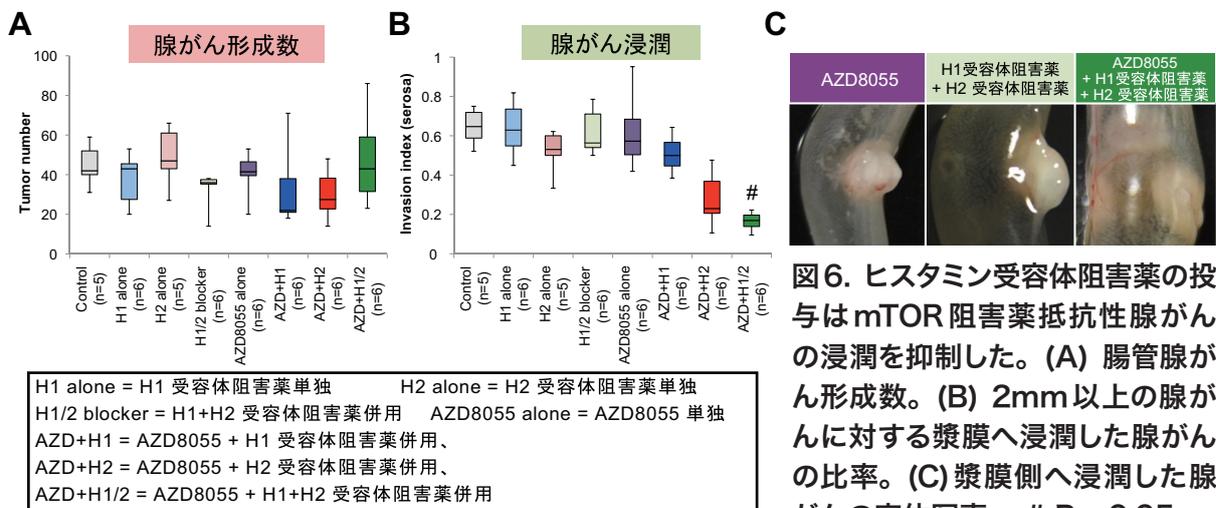


図6. ヒスタミン受容体阻害薬の投与はmTOR阻害薬抵抗性腺がんの浸潤を抑制した。(A) 腸管腺がん形成数。(B) 2mm以上の腺がんに対する漿膜へ浸潤した腺がんの比率。(C) 漿膜側へ浸潤した腺がんの実体写真。# P < 0.05

考 察

本研究結果によりmTOR阻害薬抵抗性獲得機構の一つとして、組織中の代謝状態の変動によるヒスタミンの上昇が関与していることが示された。これまでに大腸がん担がんマウスモデルに対しヒスタミンH2受容体阻害薬が腫瘍拡大を抑制することが報告されており、血管新生を抑制するなどが微小環境に影響を与えた結果だと考えられている^(3, 4)。一方、大腸炎誘発大腸化学発がんマウスモデルにおいて、大腸がん組織のヒスタミン合成酵素の働きを欠損させた遺伝子改変マウスを使用した場合、腫瘍促進作用のある顆粒球が活性化して大腸腫瘍形成が促進すること、つまりヒスタミンが腫瘍抑制的に作用することが報告されている⁽⁵⁾。しかしながら、同じ大腸化学発がんモデルに対してヒスタミン各種受容体阻害薬を投与したところ、H2受容体阻害薬またはH3受容体阻害薬の単独投与により腫瘍形成を抑制することも報告されている⁽⁶⁾。同じ大腸化学発がんモデルを用いてヒスタミンそのものと受容体をそれぞれ抑制することで、相反する結果が出ていることについては慎重な検証が必要であるが、ヒスタミン合成酵素がマウスの誕生時から全身で欠損することで免疫反応や血管新生など炎症を起点とした様々影響が通常のマウスとは異なる可能性が危惧される。従って、本研究を含む各種大腸がんモデルに対するヒスタミン受容体阻害薬の効果を考慮すると、大腸がんにおけるヒスタミンは腫瘍促進的に働いていると捉えることが合理的である。

本研究では、ヒスタミン阻害薬の投与だけでは腺がん形成や浸潤を抑制できなかった。mTOR阻害薬抵抗性腺がんが増大しているヒスタミンの供給源が浸潤部に集積しているマクロファージであるとすれば、ヒスタミン阻害薬とmTOR阻害薬の併用効果が腺がんの数に影響を与えず、腺がんの浸潤に限定して抑制することを説明できる(図7)。今後、ヒスタミンの供給源を探ることで微小環境の役割を明確にしたい。また、プロテオミクス解析結果からmTOR阻害薬抵抗性腺がん中存在するマクロファージだけが特異的に産生するタンパクを発見しており、がん細胞の抵抗性獲得との関係について確認して行きたい。

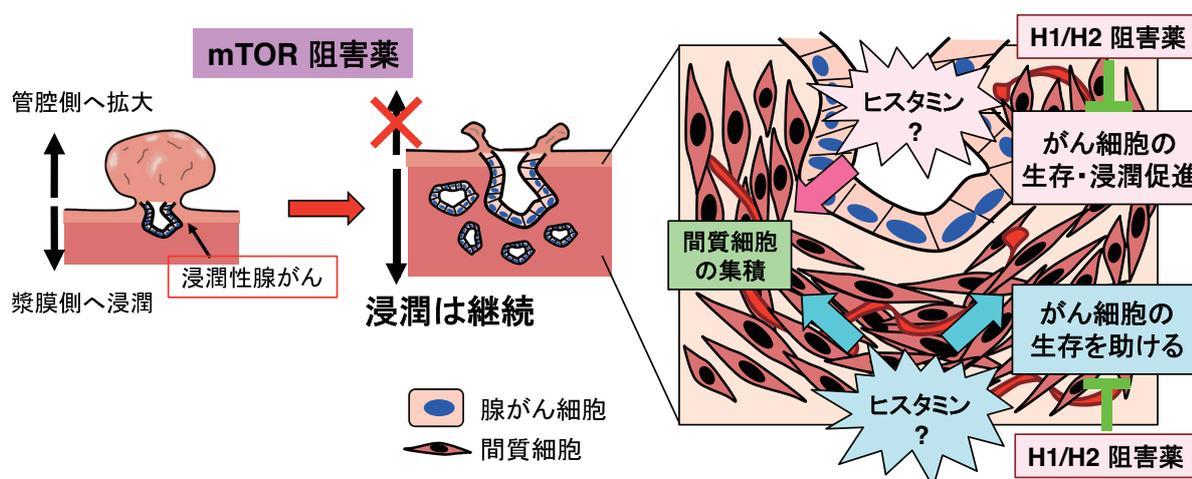


図7. 本研究結果の概略図

要 約

大腸がん患者数は近年増加しており、特に他臓器への転移がその死因の大半を占めていることから、新規軸の大腸がん転移の予防・治療法の開発が急務である。大腸がんを自然発症する遺伝子改変マウスを用いて、がん微小環境が、大腸がんの浸潤・転移を促進させるだけでなく、mTOR阻害薬に対する抵抗性獲得にも寄与することをこれまでに明らかにした。

この抵抗性獲得機序を解明するため、浸潤性大腸がんのモデルマウスである *cis-Apc/Smad4* マウスを用いて、メタボローム解析を行った。mTOR阻害薬抵抗性浸潤性腺がん組織では種々の代謝産物の濃度が上昇していたが、特にヒスタミン及びその関連代謝産物（1-メチルヒスタミン）の濃度が一段と高かった。一方、腺がん浸潤部の微小環境においてマクロファージや顆粒球の集積が認められたことから、これらの細胞がヒスタミンの供給源である可能性が示唆された。浸潤性大腸がん組織におけるヒスタミンの役割を解明するため、ヒスタミン受容体受容体に対する阻害薬をmTOR阻害薬との併用投与したところ、いずれの拮抗薬の併用も腫瘍形成そのものには影響を与えなかったが、mTOR阻害薬とH1受容体拮抗薬、H2受容体拮抗薬との3種併用によって、腺がんの漿膜下への浸潤が有意に抑制された。

これらの結果から、浸潤性大腸がんのmTOR阻害薬抵抗性にヒスタミンが関与すること、そしてヒスタミンを抑制することにより、転移の第一歩である大腸がんの浸潤を抑制できる可能性が示唆された。

文 献

1. Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, Aoki M. Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene*. 36:6480 – 6489. 2017.
2. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes. *Cell*. 92:645 – 56. 1998
3. Takahashi K, Tanaka S, Ichikawa A. Effect of cimetidine on intratumoral cytokine expression in an experimental tumor. *Biochem Biophys Res Commun*. 281:1113 – 1119. 2001.
4. Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, Perna F, Magnelli L, Fanti E, Bani D, Messerini L, Fabbioni V, Perigli G, Capaccioli S, Masini E. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 11:6807 – 6815. 2005.
5. Yang XD, Ai W, Asfaha S, Bhagat G, Friedman RA, Jin G, Park H, Shykind B, Diacovo TG, Falus A, Wang TC. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b⁺Ly6G⁺ immature myeloid cells. *Nat Med*. 17:87 – 95. 2011.
6. Tanaka T, Kochi T, Shirakami Y, Mori T, Kurata A, Watanabe N, Moriwaki H, Shimizu M. Cimetidine and Clobenpropit Attenuate Inflammation-Associated Colorectal Carcinogenesis in Male ICR Mice. *Cancers*. 8 (2) :E25. 2016.