

エルロチニブとトラメチニブの併用投与は *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腫瘍形成を抑制する

津田 都子

愛知学院大学 薬学部 生体有機化学講座

【概要】

2017年9月、パシフィコ横浜で開催された「第76回 日本癌学会学術総会」に参加し、以下の卒業研究の一部をポスター発表した。

【背景・目的】

日本における死因の第一はがんであり、未だ増加傾向である。近年では食の欧米化に伴い大腸がんによる死因が男女とも増加しており、男性では3位、女性では1位であることが報告されている。大腸がんの治療の第一は外科的切除であり、浸潤・転移のない場合、予後は極めて良好である。一方、浸潤・転移のある大腸がん患者は予後が極めて悪いことから、浸潤・転移を標的とした治療法の開発が急務である。

細胞の増殖や成長において上皮増殖因子受容体(EGFR)経路や分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)経路が重要な役割を果たしており、この経路の阻害薬は様々ながん治療に使用されている。EGFRの過剰発現や活性化変異が高頻度で確認されていることから、肺がんではEGFRチロシンキナーゼ阻害薬であるゲフィチニブやエルロチニブが既に使用されている⁽¹⁾。また悪性黒色腫ではBRAF遺伝子変異が高頻度で確認されており、BRAF阻害薬ダブラフェニブやMEK阻害薬トラメチニブなどMAPK経路を標的とした治療が行われている⁽²⁾。

家族性大腸ポリープ症モデルマウスである*Apc*遺伝子変異マウスにEGFR阻害薬エルロチニブまたはMEK阻害薬トラメチニブをそれぞれ投与したところ、腸管腫瘍形成を有意に抑制した⁽³⁾。

浸潤性大腸がんにおけるEGFR経路やMAPK経路の役割を検証するため、浸潤性大腸がんモデルマウスである*cis-Apc/Smad4*複合変異マウスにエルロチニブまたはトラメチニブを単独で投与した

が腺がん形成や浸潤に対する抑制効果はほとんど認められなかった⁽⁴⁾。

本研究では、エルロチニブとトラメチニブの併用が*cis-Apc/Smad4*複合変異マウスの腸管腫瘍形成を抑制する可能性について検証した。

【方法】

1.使用動物と薬剤

13週齢前後の雌の*cis-Apc/Smad4*マウス(C57BL/6N)に、トラメチニブ(1mg/kg/day)とエルロチニブ(50mg/kg/day)または対照群として溶媒(vehicle投与)を2週間または8週間経口投与した。

2.腸管腺がん形成数の測定

小腸及び大腸を切除後、PBSで洗浄し、長軸方向に切開した。10%ホルマリン-PBSで一晩固定後、腺がんの数と大きさを実体顕微鏡下で測定した。

3.細胞増殖の測定

視野(400倍)あたりのBrdU(ブロモデオキシウリジン)陽性腺がん細胞数を算出した。

4.タンパク質発現解析

回腸腺がん及びその周辺の正常組織を採取し、ウエスタンブロット法により評価した。p-EGFR(Y1068)、EGFR、p-c-Fos(S32)、c-Fos、COX2、p-ERK1/2(T202/Y204)、 β -ACTINに対する抗体を使用した。

5.組織学的解析

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いヘマトキシリン&エオジン(HE)染色及び免疫染色(p-EGFR、p-ERK1/2、p-c-Fos)を行った。

6. 腺がん浸潤深度の評価

2 mm 以上の腸管腺がん組織切片 (4 μm) を 200 μm 毎に回収し、HE 染色を行い、腺がん浸潤先端が最も深く到達した領域を、粘膜、粘膜下層、粘膜筋板、漿膜に分類・評価した。

【結果】

エルロチニブとトラメチニブの併用投与は *cis-Apc/Smad4* マウスの 1.5 mm 以上の腺がん (ポリープ) 数をコントロール群 (vehicle 投与) と比べて有意に減少させた。

BrdU 染色において、コントロール群 (vehicle 投与) と比較して、エルロチニブとトラメチニブの併用投与によって BrdU 陽性細胞数が有意に減少しており、EGFR と MAPK 経路の同時阻害は腸管腫瘍細胞の増殖を抑制させることが示唆された。

また、ウエスタンブロット法を用いて *cis-Apc/Smad4* マウスの回腸正常部及び腸管腺がんの EGFR、ERK のリン酸化状態の検証を行ったところ、EGFR のリン酸化は腺がん組織において増大し、ERK のリン酸化では減少が認められた。そしてこれらの活性化はエルロチニブとトラメチニブの併用投与によって強力に抑制された。また MAPK 経路によって制御される転写因子であり、がん遺伝子産物でもある c-Fos は正常組織に比べ腺がんでのタンパク及びリン酸化レベルともに増大しており、エルロチニブとトラメチニブの併用投与によりいずれも減少した。

さらに、エルロチニブ及びトラメチニブの単独投与はコントロールと比べ c-Fos タンパクレベル及びリン酸化レベルを減少させたが、併用によりさらなる減少が認められたことから、EGFR の活性化も c-Fos の発現に関与しており、腺がん形成を促進させる可能性が示唆された。

cis-Apc/Smad4 マウスの腸管腺がんにおける EGFR 経路及び MAPK 経路活性化細胞及びリン酸化 c-Fos 発現細胞を、EGFR、ERK1/2、c-Fos のリン酸化抗体を用いた免疫染色により検証した。その結果、リン酸化 EGFR、リン酸化 ERK1/2、リン酸化 c-Fos はそれぞれ腺がん組織における陽性細胞の局在と異なることから、*cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腺がんにおける c-Fos の発現は EGFR 経路

と MAPK 経路からそれぞれ独立して制御を受けている可能性が示唆された。

さらに、エルロチニブとトラメチニブを 8 週間併用投与した *cis-Apc/Smad4* マウスの腸管腺がんの浸潤能を評価した。これまでの研究により浸潤深度は腸管腺がんの大きさに比例し、2 mm 以上の腺がんでは確実に浸潤が確認できることから、各群 2 mm 以上の腺がんを浸潤の評価対象とした⁽⁵⁾。エルロチニブとトラメチニブの併用投与群及びコントロール群の腸管腺がんは共に 30% 以上が最も深い漿膜にまで浸潤先端が到達しており、粘膜から漿膜へ向かう浸潤様式に有意な差は認められなかった。

【考察】

エルロチニブとトラメチニブの長期間の併用により腺がん形成数が有意に抑制されたことから、この併用療法は浸潤性大腸がん治療の選択肢の一つとなる可能性がある。また、エルロチニブとトラメチニブの併用投与は c-Fos の発現を抑制したことから、これらを介して腺がん形成を抑制したと考えられる。

免疫染色によって EGFR 経路と MAPK 経路は腫瘍内で別々に活性化がみられたことから、それぞれを抑制することで強力に腫瘍形成を抑制できることを示唆している。

これらの結果から、EGFR 阻害薬と MEK 阻害薬の併用は大腸がん治療における選択肢の一つとなるかもしれないことが示唆された。

【参考文献】

- (1) Sharma SV, *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews cancer*. 2007. 7:169-181.
- (2) Flaherty KT, *et al.* Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med*. 2012. 367: 1694-1703.
- (3) Fujishita T, *et al.* Antitumor activity of the MEK inhibitor trametinib on intestinal polyp formation in *Apc^{A716}* mice involves stromal COX2. *Cancer Sci*. 2015. 106:692-629. (未発)

表データ)

- (4) Fujishita T, *et al.* Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2017. (online publication)
- (5) Kitamura T, *et al.* SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1⁺ myeloid cells that promote invasion. *Nat Gene*. 2007. 39:467-475.

【感想】

卒業研究を通して多くのことを学ぶことができ、今回の日本癌学会での発表は私にとって大変貴重な経験でした。愛知学院大学薬学会の援助により学会へ参加させて頂き、様々な方の研究発表や講演を聴くことでがん研究の最先端について触れ、これからのがん治療についての知識を深めることができ、とても有意義な時間を過ごすことができましたと思います。

最後に、卒業研究及び学会発表を行うにあたり、多くの先生方にご指導をいただき、感謝の気持ちでいっぱいです。

