

進行癌のエクソソームを介した薬剤耐性獲得の分子機序の 解明と新規癌治療戦略の開発

所属： 北海道大学 大学院医学研究院 生化学分野 分子生物学教室

助成対象者：橋本 あり

概要

膵癌は診断時に局所浸潤や遠隔転移を認め予後不良となる。多くの場合膵管上皮に由来し、*KRAS* 変異と *p53* 変異が代表的な **driver mutation** である。本研究では、乳癌等の悪性度進展に関わる Arf6 経路が *KRAS* 変異と *TP53* 変異の協調により高発現・活性化されることで膵癌の悪性度進展や CD63 含有エクソソーム分泌に関与すること、Arf6 活性化に必須であるメバロン酸経路もエクソソーム分泌に関わること、さらに、Arf6 を高発現する膵癌細胞によるエクソソームに薬剤抵抗性関連因子が含まれていることを見出した。Arf6 が悪性膵癌の治療抵抗性を担う実行分子であること並びに膵癌治療の分子標的となる可能性が示唆された。

abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which arises from the ductal epithelium, is one of the most aggressive types of human malignancy. Although *KRAS* and *TP53* mutations were identified as major drivers of PDAC, the molecular basis of tumor malignancy via these mutations remains unclear. Here we show that *KRAS* and *TP53* oncogenes cooperatively activate the Arf6 pathway, leading to the development of malignancy in PDAC. Furthermore, we demonstrated that Arf6 is involved in the regulation of the secretion process of exosomes containing CD63, and the mevalonate pathway, which is essential for Arf6 activation, is also important for exosome secretion in PDAC cells that have

acquired mesenchymal traits. We also found that exosomes secreted by PDAC cells expressing high levels of Arf6 contain substances for drug resistance. These findings suggested that Arf6 is the critical factor responsible for drug resistance during pancreatic tumor progression and promising new biomarker for pancreatic cancer diagnosis and therapy.

研究内容

背景

癌の最大の脅威はその転移性及び放射線あるいは薬剤に対する治療抵抗性にある。癌の進行過程において、癌細胞は浸潤・転移形質、幹細胞性、及び、薬剤耐性を獲得する。その分子機序に関して、上皮-間充織形質転換 (Epithelial- mesenchymal transition; EMT) に類似した現象の関与が示唆されている(1)。しかしながら、癌の EMT プロセスにおいて、どのような微小環境の変化と連動して、転移性及び治療抵抗性獲得に関与するのか未だ不明な点が多い。

これまでに、低分子量 G 蛋白質 Arf6 を基軸としたシグナル経路 (Arf6 経路) が乳癌や腎癌などの浸潤形質獲得や血管新生に関与することを明らかにしてきた(2,3)。さらに、Arf6 経路が EMT を介して誘導される間葉特異的因子 EPB41L5 を必須成分とする間葉型シグナル経路であり、浸潤・転移性、及び、抗癌剤抵抗性に関与すること(4)、乳癌において癌幹細胞性誘導に関わる EMT 転写因子 ZEB1 が EPB41L5 遺伝子発現に関与することを見出した(5)。また、変異 p53 による細胞内メバロン酸代謝経路活性の亢進が Arf6 経路の活性化、浸潤・転移だけでなく、抗癌剤に対する薬剤抵抗性にも関与する新規作用機序を明らかにした。特に、メバロン酸経路阻害剤スタチン処理により、Arf6 経路を高発現する間葉形質を獲得した乳癌細胞の浸潤・転移、及び、薬剤耐性も抑制することを報告した(4)。

最近、膵癌に関する研究を行った。膵癌は極めて予後不良であり、患者 5 年生存率が数%を超えない。主な原因は、初期診断時に既に局所悪性度 (局所浸潤) が進行していることや、場合によっては遠隔転移もみられることである。このようなことは他の癌にも見られることであるが、膵癌において顕著であり、初期治療がある程度効を奏しても、頻々と転移・再発が生じ致命的となる。病理標本ゲノム数理解析からも、膵管癌では実質的癌増殖が始まる数年前には転移能を有する subclone 細胞が生じていることが示されている。現行治療として、外科的切除に加え、放射線治療や Gemcitabine などの抗癌剤が用いられてい

るが、いずれも効力は限定的であり、これまでにない観点からの新たな治療法の創出が待たれている。膵癌は多くの場合膵管上皮に由来し *KRAS* 変異と *p53* 変異が代表的な *driver mutation* である(6)。これらの変異によって、膵癌の浸潤・転移性が獲得されることが動物実験により示されているが、その分子の実態は不明である。また、膵癌は他の癌種と比べ治療抵抗性が高く、最近注目されている免疫チェックポイント療法もあまり有効ではない。このような高い薬剤抵抗性や放射線抵抗性の根本的要因も不明である。

細胞内成分の放出機構であるエクソソームは、細胞間相互作用の媒体として重要であり、癌の EMT 及び悪性度進行に関与することが明らかとなっている(7)。特に、放射線療法あるいは抗癌剤療法に伴って腫瘍微小環境のストローマ細胞から分泌される RNA を含むエクソソームにより癌細胞の薬剤耐性・幹細胞性が誘導されること、癌細胞が分泌するエクソソームが癌の転移先の *niche* 形成に関わること、抗癌剤の細胞外への排出に関与することが報告されている。また、エクソソームの含有物を調べることによる癌の診断の可能性についても多くの研究者が着目している。しかしながら、癌の悪性度進展に伴うエクソソームの生合成・分泌過程の分子機序の詳細は未解決の問題として残っている。

目的

本研究では、薬剤抵抗性の高い膵癌を解析対象とし、膵癌 *driver oncogenes* による悪性度進展と間充織形質特異的 *Arf6* 経路との関連を明らかにすると共に、*Arf6* 経路の活性化に伴うエクソソームの生合成・分泌過程の分子機序を明らかにし、*Arf6* 経路による薬剤耐性などの治療抵抗性獲得の作用機序を解明することを目的とする。さらに、癌の悪性化のバイオマーカーとしての検討も進め、新しい視点からの癌診断・治療方法の開発に資することを目的とする。

結果

種々の膵癌細胞を用いて *Arf6* 経路因子の発現を解析すると、*KRAS* 変異と *p53* 変異を有する間葉形質を獲得したヒト膵癌細胞 MiaPaCa-2, Panc-1 及び膵癌モデルマウス(*Pdx-Cre*, *LSL-KrasG12D/+*, *LSL-p53R172H/+*)由来細胞 KPC において、*Arf6* 経路因子の発現が高くなっていることを見出した。これらの細胞において、膵癌の悪性度関連因子 PDGF を用いて刺激すると *Arf6* が活性化され、浸潤能が誘導される。*Arf6* の活性化因子である GEP100 の発現を抑制すると PDGF 刺激による *Arf6* 活性が抑制され、*Arf6* 経路因子 (*GEP100*, *Arf6*,

AMAP1, EPB41L5)の発現抑制では、PDGF 刺激依存的な浸潤能が抑制された。ヒト膵癌病理標本解析において、PDGFR β , AMAP1 の発現は膵癌の約半数に高発現しており、患者の低全生存性 (poor overall survival) と低無増悪生存期間 (poor progression-free survival) とに統計的有意性をもって相関した。

続いて、膵癌 driver oncogenes である KRAS 変異と Arf6 経路因子との関連を解析した。その結果、KRAS 変異の発現抑制は、Arf6 及び Arf6 のエフェクター因子 AMAP1 の発現を抑制した。Arf6 mRNA 5'UTR には、G-quadruplex と呼ばれる構造が存在する。G-quadruplex 構造を持つ mRNA の翻訳には RNA helicase 活性を示す mRNA 翻訳複合体構成因子である eIF4A が必要である。eIF4A は、PDCD4 (Programmed cell death 4) と会合し、タンパク質の翻訳を抑制することが知られている。KRAS 変異は PDCD4 の発現を抑制する転写因子を誘導することで、eIF4A を介した Arf6 の発現誘導に関わっていることが示された。実際、eIF4A 阻害剤 Silvestrol は、Arf6 蛋白質発現を著しく阻害した。一方、AMAP1 mRNA の 5'-UTR には mTORC1 依存的翻訳遺伝子に共通な TOP (5' terminal oligopyrimidine) モチーフが存在し、その翻訳が mTOR-Raptor により活性化される eIF4E 依存的であることを見出した。引き続き、膵癌細胞における p53 変異と Arf6 経路との関連を解析した結果、p53 変異の発現抑制は PDGF 刺激依存的 Arf6 活性及び浸潤能を抑制した。乳癌を用いた解析において、RTK (受容体型チロシンリン酸化酵素) による Arf6 活性化にはメバロン酸経路活性とその酵素 geranylgeranyl-transferase II (GGT- II)、並びに GGT-II によって脂質修飾を受けた Rab11b が重要であることを明らかにしている(4)。間葉形質を獲得した膵癌細胞においても、メバロン酸経路、GGT- II 及び Rab11b は PDGF 刺激依存的 Arf6 活性及び浸潤能に重要であることが分かった。これらの結果は、KRAS 変異と TP53 変異とが協調することによって、Arf6 経路因子群の発現の促進及び活性化も促し、そのことによって膵癌の悪性度進展が進行することを示しており、膵癌特有の分子実態の一端を明らかにした。

次に、薬剤抵抗性が高くかつ Arf6 経路因子を高発現する膵癌細胞 MiaPaCa-2 を用いて、エクソソーム分泌の機序について解析を行った。その結果、Arf6 の発現を抑制すると CD63 を含有するエクソソーム分泌が抑制されたことから、Arf6 経路がエクソソーム分泌に関与していることが考えられた。しかしながら、Arf6 のエフェクター分子 AMAP1 の発現抑制においては、CD63 を含有するエクソソーム分泌に差は見られなかった。膵癌 driver oncogenes である KRAS 変異及び p53 変異の発現抑制では、CD63 を含有するエクソソーム分泌が抑制されることを見出している。Arf6 活性化に必須であるメバロン酸経路、GGT-II

及び Rab11b も MiaPaCa-2 細胞のエクソソーム分泌に関与することを見出した。これらの結果から、間葉形質を獲得した膵癌細胞において膵癌 driver oncogenes を介した Arf6 の高発現及び活性化が、エクソソーム分泌に重要であることが示された。次に、MiaPaCa-2 細胞が分泌するエクソソームを用いて薬剤抵抗性の低い BxPC3 に添加したところ、薬剤抵抗性が増加する傾向が見られた。このことから、Arf6 を介したエクソソームには薬剤抵抗性に関わる因子が含まれていることが示唆された。

今後

本研究成果から、治療抵抗性の高い膵癌において膵癌 driver oncogenes を介した Arf6 経路因子の高発現並びに活性化によって、浸潤・転移性、抗癌剤抵抗性が促進されること、また、Arf6 の高発現並びに活性化はエクソソーム分泌に必須であることが示された。さらに、Arf6 を高発現する膵癌細胞によるエクソソームに薬剤抵抗性関連因子が含有されていることが示唆された。今後、膵癌におけるエクソソーム形成・分泌過程での Arf6 の機能的役割の分子実態を明らかにし、Arf6 を介したエクソソーム分泌と癌の治療抵抗性誘導との関連の全体像の解明を目指す。

引用文献

1. Ye X. & Weinberg RA. (2015) Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol* 25(11);675-686.
2. Hashimoto S., Onodera Y., Hashimoto A., Tanaka M., Hamaguchi M., Yamada A., and Sabe H. (2004) Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6647-6652.
3. Hashimoto S., Mikami S., Sugino H., Yoshikawa A., Hashimoto, A., Onodera Y., Furukawa S., Handa H., Oikawa T., Okada Y., Oya M., and Sabe H. (2016) Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat. Commun.* 7:10656.
4. Hashimoto A., Oikawa T., Hashimoto S., Sugino H., Yoshikawa A., Otsuka Y., Handa H., Onodera Y., Nam JM., Oneyama C., Okada M., Fukuda M., and Sabe H. (2016) P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* 213:81-95.
5. Hashimoto A., Hashimoto S., Sugino H., Yoshikawa A., Onodera Y., Handa H., Oikawa T.,

and Sabe H. (2016) ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis and drug resistance. *Oncogenesis* 5:e259.

6. Makohon-Moore A & Iacobuzio-Donahue CA. (2016) Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer* 16(9):553-565.

7. Greening DW., Gopal SK., Xu R., Simpson RJ., and Chen W. (2015) Exomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 40:72-81.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. Otsuka Y, Oikawa T, Yoshino H, Hashimoto S, Handa H, Yamamoto H, Hashimoto A, and Sabe H. (2018) Frequent overexpression of AMAP1, an Arf6 effector in cell invasion, is character of the MMTV-PyMT rather than the MMTV-Neu human breast cancer model. *Cell Commun Signal* 16(1):1.

[口頭発表]

1. 橋本あり

癌悪性度の代謝側面と癌免疫との関連

第9回シグナルネットワーク研究会、2017年6月10日

2. 橋本あり、橋本茂、及川司、大塚勇太郎、半田悠、小野寺康仁、佐邊壽孝

メバロン酸代謝活性と Arf6 による癌悪性度進展の分子機序並びにスタチン有効性の解析

第97回北海道医学大会腫瘍系分科会・第116回北海道癌談話会、2017年10月21日

[ポスター発表]

1. 橋本あり、橋本茂、古川聖太郎、蔦保暁生、大塚勇太郎、半田悠、小野寺康仁、及川司、平野聡、佐邊壽孝

膀胱癌ドライバー変異は ARF6 経路を介して癌悪性度と PD-L1 発現を促進する

2017年度生命科学系学会合同年次大会（第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会）、2017年12月6日

[その他]

なし