

論文の内容の要旨

論文題目

膵発癌モデルマウスを用いたゲムシタビンとエルロチニブの併用効果の検討

氏名 宮林 弘至

【目的】ヒト切除不能膵癌に対する化学療法の第一選択はゲムシタビンであり、以後数々の臨床試験がなされてきたが、それを凌駕する治療法は確立されていない。その中でゲムシタビンと **Epidermal growth factor receptor(EGFR)**阻害剤エルロチニブの併用療法はゲムシタビン単独と比較して 2 週間と僅かながら生存期間の有意な延長が認められ、本邦でもごく最近、膵癌に対する保険適用薬剤として承認されたところである。一方、EGFR 阻害剤の効果予測因子としては、大腸癌では **KRAS** 変異陽性例では EGFR 阻害剤は無効であることがわかっており、非小細胞肺癌では EGFR 活性化変異のある症例で効果があることがわかっているが、膵癌では **KRAS** 変異が 90%以上に存在し、また EGFR 活性化変異がまれであることから、膵癌におけるエルロチニブの効果の詳細は分かっていない。当研究室では、これまでにヒト膵癌のモデルとなる内因性 **KrasG12D** 発現 + **Tgfr2** ノックアウトモデルを報告してきた。本研究ではこのモデル用いて、ゲムシタビンとエルロチニブの併用効果について検討した。

【方法】膵発癌モデルマウスは 3 種の独立した遺伝子改変マウス、**Tgfr2^{flx/flx}**、

Ptf1a-Cre、LSL-Kras^{G12D/+}、の交配により、目的の遺伝子型 Ptf1a-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{fllox/fllox} というマウスを作成した。この膵発癌モデルマウスは臨床的にも病理学的にもヒトの膵癌とよく類似しておりヒト膵癌の良いモデルと考えられる。このマウスに対し、ゲムシタビン単独、ゲムシタビン+エルロチニブ併用投与を行い生存期間を比較した。生後 7 週で膵組織を回収してリン酸化 EGFR、リン酸化 ERK などの免疫染色を施行すると共に、膵組織の溶解液を Western blot やリン酸化受容体型チロシンキナーゼ(RTK)アレイを用いて解析し、ゲムシタビンとエルロチニブが細胞内のシグナル伝達や受容体型チロシンキナーゼへ与える影響を検討し、作用機序の解明を試みた。In vitro の検討では内因性 KrasG12D 発現+Tgfbr2 ノックアウトモデルから分離したマウス膵癌細胞 K375、K399、内因性 KrasG12D 発現モデルから分離したマウス PanIN 細胞 K512、K518 とマウス線維芽細胞 K643f を用い、ヒト膵癌細胞は ATCC から購入した AsPC-1、BxPC-3、Capan-1、CFPAC-1、SU8686 を用いて検討した。ゲムシタビンとエルロチニブ投与時の細胞内シグナル伝達への影響を Western blot で検討し、細胞周期を flow cytometry で検討した。ゲムシタビン投与時の EGFR リガンドの mRNA の発現を定量的 RT-PCR で検討し、分泌量は EGF、Amphiregulin、TGF- α の ELISA kit を用いて検討した。またゲムシタビン投与時の EGFR/ERBB2 のヘテロダイマー形成の影響は免疫沈降法を用いて検討した。

【結果】膵発癌モデルマウスに各薬剤を投与して生存期間を比較すると、平均生存日数はコントロール群 52.5 日に対し、ゲムシタビン単独群が 69 日、ゲムシタビン+エルロチニブ併用群が 74 日とゲムシタビン単独でもコントロールと比較して有意に生存期間を延長したが、エルロチニブを併用することでさらに有意に生存期間が延長した。マウス膵組織の免疫染色でゲムシタビン単独群ではリン酸化 EGFR、リン酸化 ERK の活性が見られ、エルロチニブ併用群ではそれが抑制された。さらにマウス膵組織から回収したタンパク溶解液で Western blot を施行し細胞内シグナル伝達を調べると、ゲムシタビン単独群ではリン酸化 ERK の活性が見られ、エルロチニブ併用群ではそれが抑制された。またゲムシタビン単独群では EGFR の発現が亢進し、エルロチニブ併用群では発現が抑制された。In vitro の検討で、まず KRAS 変異のある膵癌細胞でもエルロチニブが

増殖抑制効果を持つことを示し、Flow cytometry を用いて、エルロチニブが膵癌細胞に対して G1 期停止を起こすことを示した。Western blot で KRAS 変異のある膵癌細胞では既に下流の MAPK が活性化しているのであるが、EGFR からの刺激で MAPK シグナルがさらに活性化し、エルロチニブの投与でその活性化が抑制されることが示された。また *in vivo* の結果と同様に、膵癌細胞株を用いた *in vitro* の検討でもゲムシタビンの投与でリン酸化 ERK が活性化し、エルロチニブの併用で抑制された。ゲムシタビンによる EGFR-MAPK 経路の活性化のメカニズムの解析のため、膵癌細胞株を用いてゲムシタビン投与時の EGFR リガンドの mRNA を定量的 RT-PCR で検討すると、ゲムシタビンの投与で K375 では Egf と Tgf-a が増加し、Capan-1 と CFPAC-1 では EGF、Amphiregulin、TGF-a が増加した。マウス膵組織の溶解液で ELISA を施行すると、ゲムシタビン投与群ではコントロール群に比較して Amphiregulin、Egf の分泌が増加していることを確認した。また受容体型チロシンキナーゼリン酸化アレイでは、EGFR 高発現のゲムシタビン単独群でリン酸化 ERBB2 の活性化を認め、エルロチニブ併用でリン酸化 ERBB2 活性化が抑制された。マウス膵組織の溶解液で施行した Western blot でも同じ結果が得られ、マウス膵組織の免疫染色では、ゲムシタビン投与群で ERBB2 の発現亢進を認め、エルロチニブ併用群で発現が低下していた。マウス膵癌細胞株 K375 を使用した *in vitro* の実験でもゲムシタビンの投与により ERBB2 の発現、リン酸化ともに増強し、エルロチニブ併用投与でともに抑制された。さらに K375 で EGFR の活性化に伴い EGFR と ERBB2 のヘテロダイマーが形成され、エルロチニブ併用でそれが抑制されることを免疫沈降法を用いて示した。エルロチニブの効果として間質細胞(線維芽細胞、好中球、マクロファージ)に対する影響の可能性も示唆されたが、*in vitro* の実験でゲムシタビンとエルロチニブはマウス膵線維芽細胞の細胞内シグナル伝達に影響を与えなかった。また治療したマウスの膵癌組織において好中球とマクロファージの免疫染色を施行したが、コントロール群と比べて特に大きな違いを認めなかった。これらからエルロチニブの主要な効果は間質細胞よりも膵癌細胞における EGFR-MAPK シグナルに対するものと考えられた。

【考察】今回用いた内因性 KrasG12D 発現+Tgfr2 ノックアウトモデルは臨床的

にも病理組織学的にもヒトの膵癌とよく類似しており、ヒト膵癌の良いモデルと考えられる。その上、ヒト膵癌に対する標準治療薬ゲムシタビンがこのマウスモデルの生存期間を有意に延長させたことから、このマウスモデルは化学療法に対する感受性もヒト膵癌と類似しており、膵癌に対する治療レジメンを評価するのに有用と考えられる。また、ゲムシタビンとエルロチニブの併用投与によりさらに生存期間の延長を示しており、このマウスモデルは生存期間の評価だけでなく、治療レジメンの作用機序の解析にも有用であると考えられる。

本研究では、**KRAS** 変異が高率である膵癌における **EGFR** 阻害剤の効果のメカニズムの一端を明らかにすることができた。ゲムシタビンが **EGFR-MAPK** シグナルを活性化し、**KRAS** 変異のある膵癌においてもエルロチニブの併用でこの活性化が劇的に抑制された。**KRAS** 変異は大腸癌において、**EGFR** 活性型変異は非小細胞肺癌において **EGFR** 阻害剤の効果予測因子とされているが、これは膵癌にはあてはまらないと考えられる。本研究では膵癌における **EGFR** 阻害剤の効果予測因子の同定までには至らなかったが、膵癌患者において **EGFR** と **ERBB2** が高発現し、かつ **TGF- β** シグナルの破綻した一群が、この併用療法のよい適応であることが示唆される。**EGFR** 阻害剤の効果のメカニズムの解明から効果予測因子につなげていくことは今後の課題である。

今回の検討では、間質細胞(線維芽細胞、好中球、マクロファージ)に対する影響は認めなかったが、近年、膵癌の微小環境における腫瘍と間質の相互作用は注目を集めており、間質に対するエルロチニブの効果についてはまだ検討の余地があると考えられ、**VEGF** 阻害剤などの他の分子標的治療薬との併用がより効果的となり得るかといった検討も必要と考えている。

内因性 **KrasG12D** 発現+**Tgfbr2** ノックアウトモデルは化学療法感受性もヒト膵癌に類似していると考えられ、治療薬の効果やメカニズムを解明するのに有用である。そして効果の予測因子・より効果のある治療薬の組み合わせ・より効果の得られる患者集団の特定など臨床的に重要な事項にも新たな知見を与えてくれる可能性がある。このような遺伝子改変マウスを用いたトランスレーショナルな研究が、難治癌である膵癌克服のための病態理解や有効な治療法の発展に役立つと考えられる。