

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09165

研究課題名(和文) KRAS遺伝子変異肺癌におけるNamp1阻害による抗腫瘍効果とその作用機序の検証

研究課題名(英文) Efficacy of inhibition of Namp1 in KRAS mutated non-small cell lung cancer

研究代表者

大崎 能伸 (Ohsaki, Yoshinobu)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30191935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子変異を有する肺癌に対して、Namp1阻害剤の抗腫瘍効果とそのメカニズムを検証した。複数の肺癌細胞株を用いた実験の結果、Namp1阻害剤の効果に関して、治療に感受性のある群、薬剤抵抗性の群、中間の群に分けられることが明らかとなった。また、その作用メカニズムを検証した結果、Namp1阻害剤が、Rbタンパクのリン酸化を抑制すること、MAPKシグナル経路を抑制すること、Bimタンパクのリン酸化を抑えること、H2AXの発現を亢進させ、DNA傷害を引き起こすこと、を突き止めた。さらに次世代シーケンサーを用いて、KRAS遺伝子変異を有する肺癌症例を同定するシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study is to evaluate efficacy of namp1 inhibitor in KRAS mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) and to study the mechanisms. We found that KRAS mutated NSCLC cell lines were divided into three groups; cell lines sensitive to FK866, a namp1 inhibitor; those resistant to the inhibitor; intermediate sensitivity. Our study revealed that FK866 inhibited phosphorylation of Rb at ser 807/811, suppressed MAPK signaling pathways, decreased phosphorylation of Bim at ser 69, and increased H2AX levels. These findings suggest that the namp1 inhibitor causes DNA damage, suppresses cell cycle through alteration of Rb and MAPK pathways, and induces apoptosis through stabilization of Bim.

研究分野：肺癌

キーワード：KRAS NSCLC Namp1

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は悪性腫瘍の死因で第1位を占めている。肺癌は進行期で発見される場合が多く、主に化学療法が標準治療の1つとして用いられている。その治療成績は決して良い現状ではなかったが、近年、肺癌の遺伝子変異の解析による個別化治療が発達し、過去の成績と比べて治療予後は改善してきている。医師主導型の臨床試験では、上皮成長因子受容体(EGFR)やALKに対する特異的阻害剤(Tyrosine kinase inhibitor)が、特定の変異を持つ肺癌で有効であることが示されている<sup>1),2)</sup>。

これら遺伝子変異解析によって肺癌の個別化治療が進められている一方、有効な治療法の無いタイプの肺癌が問題となっている。その代表格がKRAS遺伝子変異肺癌(KRASmt肺癌)であり、KRAS遺伝子変異の発見から30年以上経過している現在でも、有効な治療法は確立していない。その理由として、KRAS特異的な阻害剤の開発が難しいことも挙げられるが、一方でKRASmt肺癌では増殖の鍵となる細胞内シグナルが多種多様であることも理由の1つと考えられている。そこで、近年KRASmt肺癌に対して、従来の治療法に加えて様々な治療ターゲットを組み合わせたカクテル療法の概念が提唱され始めている<sup>3)</sup>。このため、KRASmt肺癌に対する新たな治療ターゲットの発見と臨床応用が重要な課題の1つとされている。

我々は、がん治療の新たなターゲットとして、細胞内エネルギー代謝に関するNicotinamide phosphoribosyltransferase(Nampt)に着目した。Namptは細胞内のエネルギー産生と細胞増殖に関与していることが知られている。これまでにKRASmt肺癌において、Namptの機能を解析した報告はない。我々は、Namptが新たな治療ターゲットとなりうると考え、研究を計画した。

## 2. 研究の目的

NamptがKRASmt肺癌に対して新たな治療ターゲットとなることを検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) KRAS 遺伝子変異を有する肺癌における Nampt 阻害の効果とメカニズムの検証

表1のように、KRAS遺伝子変異を有する肺癌細胞株(A549, A427, H23, H157, H460, H358, H441, H2009, H1792, Calu-1, Calu-6)を実験に用いた。

表1. KRAS 遺伝子変異をもつ肺癌細胞株

細胞名	遺伝子変異	アミノ酸置換
A427	35G>A	G12D
A549	35G>A	G12S
H23	34G>T	G12C
H157	34G>C	G12R
H460	183A>T	Q61H
H358	34G>T	G12C
H441	35G>T	G12V
H2009	35G>C	G12A
H1792	34G>T	G12C
Calu-1	34G>T	G12C
Calu6	181TC>CA	Q61K

これら細胞株へ、Nampt阻害剤であるFK866(SelleckChem)を投与し、72時間培養したのち、Acid phosphatase assayを用いて細胞増殖能を評価した。感受性の違いにより、KRASmt肺癌細胞株を、Sensitive, Intermediate, Resistantの細胞株へ分類した。

Nampt阻害剤の投与による、細胞内シグナル変化を網羅的に調べるため、逆相タンパク質アレイ(Reverse Phase Protein Array: RPPA)を用いて評価した。FK866もしくはプラセボ薬を投与したKRASmt肺癌細胞株(A427)より、各々タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を用いて、RPPAの解析を行った。

RPPAに含まれていないAutophagyに関するタンパク質の発現解析には、別途、Western Blotによる解析を行った。同様にA427細胞へFK866を投与し、プラセボ薬を投与した細胞と比較し、Autophagy関連タンパクの発現を比較した。

### (2) 次世代シーケンサーによる臨床検体の KRAS 遺伝子変異の解析

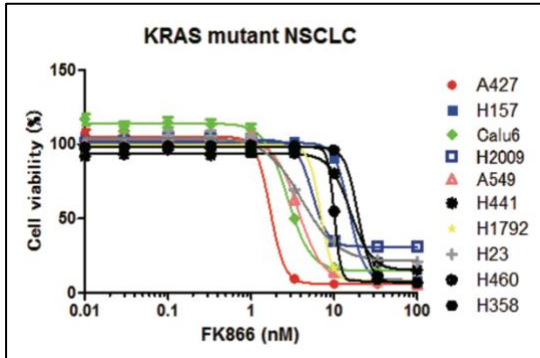
次世代シーケンサーを用いて臨床検体における遺伝子変異を解析した。次世代シーケンサーにはIon Torrent(Thermo Fischer)を用いた。解析パネルとしてIon AmpliSeq Colon & Lung cancer Panelを、解析ソフトにはIon ReporterやCLC Genomics Workbench(CLC bio Japan)を用い、主要な遺伝子変異を検索した。臨床検体からのDNA抽出には、GeneRead DNA FFPE kit(QIAGEN)を用い、次世代シーケンサーのライブラリー作成には、Ion Ampliseq Library kit 2.0, Library kit plusを用いた。

#### 4. 研究成果

(1) KRAS 遺伝子変異を有する肺癌における Nampt 阻害の効果とメカニズム

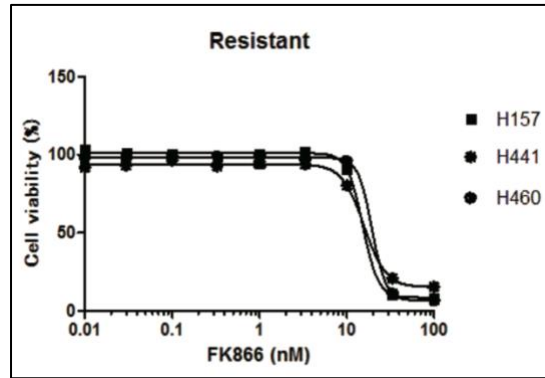
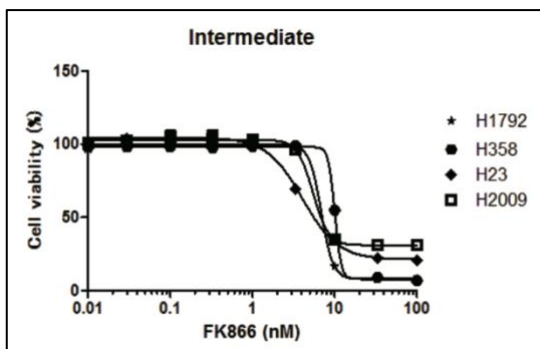
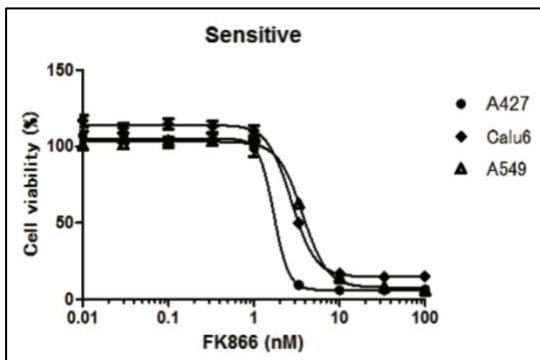
KRASmt 肺癌細胞株における Nampt 阻害剤の効果を検証した結果、KRASmt 肺癌細胞株内で抗腫瘍効果に違いが認められた (図 1)。

図 1. Nampt 阻害剤(FK866)の細胞増殖抑制効果



KRASmt 肺癌を FK866 の効果別に検証した結果、Sensitive, intermediate, Resistant の群に分けることができた (図 2)。

図 2. 効果別の Growth curve



FK866 の抗腫瘍効果のメカニズムを検証するため、RPPA によるタンパク質発現変化を網羅的に解析した結果、

- ① p.RB ser807/811 のリン酸化を抑制し、cell cycle において抑制的に働く
- ② MAPK シグナルが FK866 で抑制される
- ③ Bim Ser69 のリン酸化が抑制されることで、Bim の分解が抑制される
- ④  $\gamma$ H2AX の発現が亢進しており、DNA 傷害が生じている。

というメカニズムの関与が示唆された (図 3)。

一方、Autophagy 関連タンパクに関しては、FK866 投与により変化は乏しく、Autophagy の関与は否定的であった (図 4)。

図 3. A427 細胞における RPPA 解析

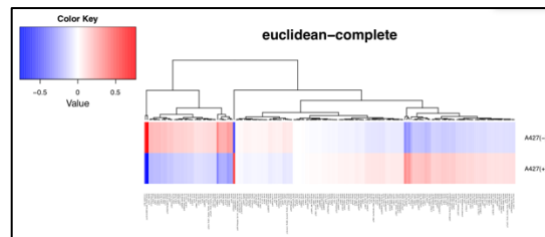
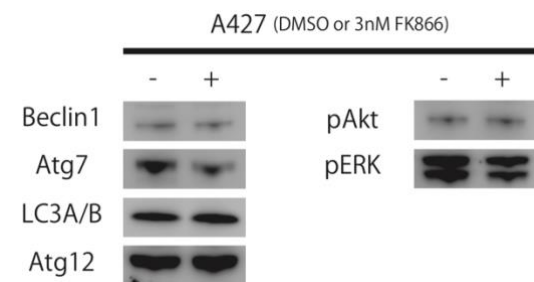


図 4. Autophagy 関連タンパクの変化

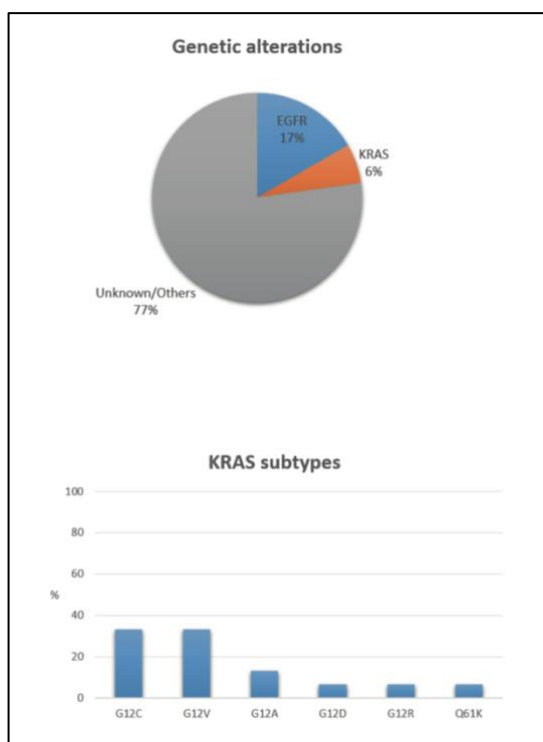


## (2) 次世代シーケンサーによる KRAS 遺伝子変異の解析

臨床検体を用いて KRAS 遺伝子変異陽性の肺癌症例を特定するため、次世代シーケンサーによる解析を行った。合計、27 例の非小細胞肺癌検体を解析し、KRAS 遺伝子変異が陽性の肺癌症例を特定することができた (図 4)。

その結果、KRAS 遺伝子変異陽性肺癌では、その他の遺伝子変異を合併しているケースが比較的多く見られたため、今後、KRAS 遺伝子変異陽性例について、Namt 遺伝子の解析を追加する計画を設けた。

図 4. KRAS 遺伝子変異解析



### <引用文献>

1. Makoto Maemondo, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. NEJM.2010;362:2380-8.
2. Alice T. Shaw, et al. Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. NEJM.2013;368:2385-94
3. Ruth Nussinov, et al Pathway Drug cocktail: targeting Ras signaling based on structural pathways. Trends in Molecular Medicine.2013;19:695-704.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. Shunsuke Okumura, Yoshinobu Ohsaki, et al. Efficacy of Pemetrexed-based chemotherapy in patients with NSCLC harboring KRAS mutations. AACR. 2016. USA.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大崎 能伸 (OHSAKI, Yoshinobu)  
旭川医科大学病院・医学部・教授  
研究者番号：30191935

### (2)研究分担者

奥村 俊介 (OKUMURA, Shunsuke)  
旭川医科大学病院・医学部・助教  
研究者番号：10516339

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし