

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790568

研究課題名 (和文) LKB1 遺伝子異常に基づく肺がん個別化治療の基礎的検討

研究課題名 (英文) Individualized therapy for lung cancer based on LKB1 mutations.

研究代表者

松本慎吾 (MATSUMOTO SHINGO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10392341

研究成果の概要 (和文)：肺癌の予後改善のためには個々の癌の特性に応じた薬物治療の開発が必要である。近年、種々の悪性腫瘍で、その発生や進展に寄与する活性化分子を標的にした治療法の有効性が示され、臨床導入されつつある。肺癌では、細胞増殖促進分子 mTOR を活性化し得る LKB1 や PTEN 遺伝子の変異が高頻度に存在する。我々は、本研究でこれらの変異と mTOR 阻害剤の感受性との相関を見いだした。このことは、今後の肺癌個別化治療の開発の一助となると考える。

研究成果の概要 (英文)：Individualized drug therapies based on characteristics of cancer cell are needed to improve prognoses of lung cancer patients. It has been reported that targeted agents against activated molecules responsible for cancer developments and progressions were effective in several malignant tumors including lung cancers. Mutations of the LKB1 gene and the PTEN gene that activate mTOR signaling, resulting in cell proliferations, are frequently occurred in lung cancers. In the present study, we revealed that lung cancer cells with LKB1 or PTEN mutations were more sensitive to a mTOR inhibitor than those without the mutations. Thus, it is indicated that the new individualized drug therapy based on the gene mutations might be clinically useful for lung cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、LKB1、抗癌剤感受性、mTOR 阻害剤、PTEN

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の中で肺がんは死亡率が最も高く、5年生存率が約30%という難治がんであ

る。これまで、肺がんの全身化学療法においては種々の殺細胞性抗がん剤が使用されてきたが、治療による奏効率や生存率でみれば

他の悪性腫瘍と比較してその効果は未だ不十分である。その理由の一つに、肺がんの病理学的あるいは分子生物学的多様性がある。我々はこれまでの研究で、同じ組織型の肺がんの中でも個々の腫瘍間で内在するゲノム異常は大きく異なり、また肺がんが多段階的に形成、進展していく過程において様々なゲノム異常の蓄積があることを証明してきた (1, 2)。現在、肺がん治療は大きく小細胞肺がんと非小細胞がんに分けられているが、今後はさらに個々のがんの特性を把握した上で、適切なバイオマーカーに基づいた個別化治療の開発が望まれる。中でも、近年、肺がんの臨床に導入されつつある分子標的治療に対する期待は大きい。現在、有効ながん分子標的治療開発の基盤として、がん細胞の生存あるいは増殖は、細胞に内在する一つの活性化がん遺伝子に依存しているという概念 (oncogene addiction) に基づき、個々のがんにおけるその活性化分子の同定と特異的阻害が重要であると考えられている (3)。近年、肺がん領域においては、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異の存在と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の感受性との相関が見出された。すでに臨床において、EGFR 遺伝子変異を有する肺がん、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の奏効率は約 70~80%と高率であることが示されている。また我々は、この EGFR 遺伝子変異が肺腺がん形成の初期である上皮内がんから高率に存在すること、またこの遺伝子変異は肺腺がんの脳転移まで維持されることを初めて見出し、それぞれ報告している (1, 4)。これらのことは、個々の肺がんに対する適切なバイオマーカーと治療薬の選択により肺がん克服の可能性を示唆する結果である。

2. 研究の目的

そこで我々は、EGFR 遺伝子以外の遺伝子として、細胞内シグナル伝達系のうち細胞増殖シグナルの中心的役割を担う mTOR の上流に位置する LKB1 (serine/threonine kinase 11: STK11) 遺伝子に着目した。がん抑制遺伝子である LKB1 遺伝子は、消化管の過誤腫や様々な悪性腫瘍が好発する遺伝疾患 Peutz-Jegher 症候群の原因遺伝子である。Peutz-Jegher 症候群患者の約 60%に LKB1 遺伝子の胚細胞性変異がみられ、その変異の多くは LKB1 蛋白質の失活を引き起こし、がん細胞の増殖能や浸潤能の獲得に関与する可能性が指摘されている (5)。一方、これまでの報告によると、悪性黒色腫、膵がん、乳がんなどの散発性悪性腫瘍では、LKB1 遺伝子の

体細胞性変異は 1~4%と極めて稀である (6)。しかしながら我々は、肺がん細胞株 70 例中 21 例 (30%) と高率に LKB1 遺伝子の変異や欠失が存在することを見出し、さらに、腺がん、大細胞がん、扁平上皮がん、小細胞がんといった様々な肺がん組織型でこの遺伝子異常が存在することを明らかにした (7)。また、肺腺がんの臨床検体を用いた解析により、LKB1 遺伝子異常は喫煙者の腺がん中存在し、低分化腺がん有意に多いという結果を得た。以上より、体細胞 LKB1 遺伝子異常は喫煙と関連する肺がんの形成や進展に関わる重要なゲノム異常である可能性が考えられる。また、最近、Ramsey らの研究でも、LKB1 遺伝子の失活がマウスに低分化で転移しやすい予後の悪い肺がんを発生させることが明らかとなった (8)。これらのことは、LKB1 が肺がんの新たな標的分子になる可能性を示す重要な知見であると考えられる。従って、今回我々は、肺がんにおける LKB1 遺伝子異常と分子標的薬を含む種々の抗がん剤の感受性との関連を明らかにすることを本研究の目的とした。また、LKB1 同様、肺がん発生、進展に関与すると言われる癌抑制遺伝子である PTEN 遺伝子異常と抗がん剤感受性との関係も併せて検討した。

引用文献

1. Matsumoto S, Iwakawa R, Kohno T *et al.* Frequent EGFR mutations in noninvasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int J Cancer* 118 (10): 2498-2504, 2006
2. Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S *et al.* Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin Cancer Res* 13 (1): 111-120, 2007
3. Weinstein IB. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297 (5578):63-64, 2002
4. Matsumoto S, Takahashi K, Iwakawa R *et al.* Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 119 (6): 1491-1494, 2006
5. Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 75: 137-163, 2006
6. Avizienyte E, Loukola A, Roth S *et al.* LKB1 somatic mutations in sporadic tumors. *Am J Pathol* 154 (3): 677-681, 1999
7. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K *et al.* Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene* 26 (40):5911-5918, 2007
8. Ji H, Ramsey MR, Hayes DN *et al.* LKB1

modulates lung cancer differentiation and metastasis.

Nature 448 (7155):807-810, 2007

3. 研究の方法

(1)肺がん細胞株における LKB1 の遺伝子異常と蛋白質発現

肺がん細胞株 (A549, Ma29, 11-18, PC14, Lu99, EBC1 など) における LKB1 遺伝子異常を、genomic PCR, multiplex PCR および direct sequencing を用いて確認する。また、western-blotting を用いてそれぞれの細胞における LKB1 蛋白質発現の違い、および LKB1 の下流の AMPK/mTOR/p70S6K の活性化の違いを検出する。

(2)LKB1 遺伝子異常の有無による抗がん剤感受性の違い

上記細胞における、mTOR 阻害剤 (ラパマイシン)、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (ゲフィチニブ) および微小管作用薬 (ビノレルビン、パクリタキセル) の細胞増殖抑制効果や殺細胞効果を MTT assay を用いて比較する。それぞれ単剤によって効果に差がない場合には他剤との併用効果を検討する。

(3)mTOR を中心とする細胞内シグナル伝達系の活性化

mTOR 阻害剤や EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による EGFR/PI3K/AKT, LKB1/AMPK および mTOR/p70S6K のそれぞれの蛋白質発現やシグナル活性化への影響を western-blotting を用いて検出する。

(4)微小管関連分子の発現および活性化と微小管の動態観察

微小管作用薬による MARK や Tau などの微小管関連分子の発現および活性化への影響を western-blotting を用いて検出する。また、微小管作用薬投与後の細胞核内微小管の動態を免疫蛍光法を用いて観察する。

(5)RNAi による LKB1 発現低下が及ぼす抗がん剤感受性および関連蛋白質発現への影響

LKB1 が正常発現している肺がん細胞株に RNAi を導入することで LKB1 発現を低下させ、上記抗がん剤感受性への影響や mTOR 周辺のシグナル活性化および微小管関連分子の活性化への影響をそれぞれ MTT assay や western-blotting を用いて検証する。

(6) 肺がん細胞株における PTEN の遺伝子異常と蛋白質発現

肺がん細胞株 (N417, Lu135, Lu134, MS1 など) における LKB1 遺伝子異常を、genomic PCR, multiplex PCR および direct sequencing を用いて確認する。また、western-blotting を用いてそれぞれの細胞における LKB1 蛋白質発現の違い、および LKB1 の下流の AMPK/mTOR/p70S6K の活性化の違いを検出する。

(7)PTEN 遺伝子異常の有無による抗がん剤感

受性の違い

上記細胞における、mTOR 阻害剤 (ラパマイシン)、PI3K 阻害剤 (LY294002)、MEK 阻害剤 (PD98059)、細胞障害性抗がん剤 (CDDP) の細胞増殖抑制効果や殺細胞効果を MTT assay を用いて比較する。それぞれ単剤によって効果に差がない場合には他剤との併用効果を検討する。

(8)mTOR を中心とする細胞内シグナル伝達系の活性化

mTOR 阻害剤や TK 阻害剤による PI3K/AKT/mTOR/p70S6K のそれぞれの蛋白質発現やシグナル活性化への影響を western-blotting を用いて検出する。

4. 研究成果

(1)肺がん細胞株における LKB1 の遺伝子異常と蛋白質発現

LKB1 遺伝子異常のある細胞 A549, Ma29 では LKB1 蛋白質の発現が消失しており、mTOR の活性化の指標である p70S6K のリン酸化が亢進していた。

(2)LKB1 遺伝子異常の有無による抗がん剤感受性の違い

LKB1 遺伝子異常のある細胞 A549, Ma29 では LKB1 遺伝子異常のない細胞 Lu99, EBC1 と比較して mTOR 阻害剤ラパマイシンの感受性が高いのに対し、ビンカアルカロイド系抗がん剤、タキサン系抗がん剤の感受性が低かった。

(3)mTOR を中心とする細胞内シグナル伝達系の活性化

LKB1 遺伝子異常のある細胞 A549, Ma29 と LKB1 遺伝子異常のない細胞 Lu99, EBC1 のいずれも mTOR 阻害剤ラパマイシンの投与により、時間依存的に p70S6K のリン酸化が抑制されていた。以上のことより、LKB1 遺伝子異常のある細胞 A549, Ma29 では、LKB1 の蛋白質欠損により mTOR が恒常的に活性化されており、細胞の増殖、生存が活性化 mTOR に依存していると考えられた。

(4)微小管関連分子の発現および活性化と微小管の動態観察

このことについては現在、解析が進行中である。

(5)RNAi による LKB1 発現低下が及ぼす抗がん剤感受性および関連蛋白質発現への影響

このことについては現在、解析が進行中である。

(6) 肺がん細胞株における PTEN の遺伝子異常と蛋白質発現

PTEN 遺伝子変異を有する Lu134A, N417 は PTEN 蛋白質の発現を認めなかったのに対し、PTEN 遺伝子変異のない MS1, Lu135 では発現を認めた。また、Lu134A, N417 では MS1, Lu135 に比べて、リン酸化 AKT の発現が高かった。同様に、S6RP のリン酸化も MS1, Lu135 と比

較して Lu134A, N417 で亢進していた。以上より、PTEN 遺伝子変異を有する肺小細胞癌細胞では、PTEN 蛋白質の欠損により PI3K/AKT/mTOR 経路が活性化されていると考えられた。

(7)PTEN 遺伝子異常の有無による抗がん剤感受性の違いと mTOR を中心とする細胞内シグナル伝達系の活性化

まず、PIK3 阻害剤 LY294002 で処理した場合、MS1 と比較して N417 で高い細胞増殖抑制効果を示した。50 μ M の LY294002 を投与した際のリン酸化 AKT とその下流のリン酸化 S6RP の発現変化を経時的にみると、N417, MS1 とともに時間依存的にこれらの発現が抑制されていた。mTOR 阻害剤ラパマイシンで処理した場合にも同様に、MS1 と比較して N417 で高い細胞増殖抑制効果を示した。また、ラパマイシン 10 nM 投与で mTOR 活性を示すリン酸化 S6RP の発現は、N417 と MS1 のいずれも時間依存的に抑制されていた。以上の結果より、LY294002 あるいはラパマイシンの投与によって、活性化 Akt や活性化 mTOR は N417、MS1 とともに同様に抑制されるにも関わらず、細胞増殖抑制効果には両者で差があることから、N417 は MS1 に比して、その細胞増殖が PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化に依存していることが示唆された。次に細胞増殖に関わるもう一つのシグナル伝達経路 MEK/ERK を抑制する MEK 阻害薬 PD98059 と細胞障害性抗癌剤 CDDP を用いて同様に検討したところ、PD98059 は N417 と MS1 で感受性に差はなく、いずれに対しても細胞増殖抑制効果は低かった。また、10 μ M の PD98059 を投与した際のリン酸化 ERK の発現変化を確認したところ、両者でいずれも時間依存的に抑制されていたことから、これらの細胞では、その細胞増殖が活性化 ERK に依存していないと考えられた。一方、CDDP は N417, MS1 とともに細胞増殖を抑制したが、2 つの細胞間でその効果に差はなかった。以上より、PTEN 遺伝子変異の有無による薬剤感受性の差は、PI3K/Akt/mTOR 経路を抑制する薬剤で特異的に生ずることが示唆された。

以上のことは、今後、動物実験で再現性を検証し、細胞実験同様、LKB1 や PTEN 遺伝子異常と抗癌剤感受性との相関が見いだされれば、臨床試験を計画する予定である。

これらのことが証明されれば、現在、非小細胞肺癌において臨床的に行われている「EGFR 遺伝子変異の有無による EGFR 阻害剤の選択」に匹敵する、新たな肺癌個別化治療の開発につながると期待される。

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 1 件)

①中崎博文、肺小細胞癌細胞株 PTEN 遺伝子変異の有無と TK/PI3K/AKT/mTOR 経路の活性阻害を介した細胞増殖抑制効果の検討、米子医学雑誌、61 巻、p20-29、2010 年、査読有

[学会発表] (計 2 件)

①中崎博文、松本慎吾 他、肺小細胞癌株における PTEN 欠失と mTOR 阻害剤感受性との関係、第 18 回日本がん転移学会学術集会、2009 年 7 月 23 日、北海道旭川グランドホテル

②松本慎吾、武田賢一、中崎博文、井岸正、松波馨士、小谷昌広、上田康仁、陶山久司、千酌浩樹、山崎章、清水英治、非小細胞肺癌株における LKB1 遺伝子変異と抗癌剤感受性との関係、第 49 回日本肺癌学会学術集会、2008 年 11 月 13 日、北九州国際展示場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本慎吾 (MATSUMOTO SHINGO)
鳥取大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：10392341

研究協力者

中本成紀 (NAKAMOTOMASAKI)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：70379642

橋本 潔 (HASHIMOTO KIYOSHI)

鳥取大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：50379640

武田賢一 (TAKEDA KENNICHI)

鳥取大学・医学部・大学院生

中崎博文 (NAKAZAKI HIROFUMI)

鳥取大学・医学部・大学院生