

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791000  
 研究課題名（和文）悪性胸膜中皮腫の受容体型チロシンキナーゼ異常の解析と新規治療戦略の開発

研究課題名（英文） Receptor tyrosine kinase-targeted therapeutic approaches in malignant mesothelioma

研究代表者

福井 高幸（FUKUI TAKAYUKI）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号：70463198

研究成果の概要（和文）：悪性中皮腫における受容体型チロシンキナーゼの活性化について抗体アレイを用いて網羅的に調べた結果、複数の受容体型チロシンキナーゼが活性化しており、中でも高頻度に MET と EGFR が同時に活性化していることを明らかにした。MET および EGFR 特異的阻害剤による効果を調べたところ、単剤処理では増殖に与える影響は弱かったが、併用にて強い増殖抑制が観察され、下流のシグナルである AKT の活性化も低下がみられた。中皮腫においては複数の受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の併用が有効であり、特に MET と EGFR の阻害剤の併用が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We determined activation status of Receptor tyrosine kinases (RTK) in 15 malignant mesothelioma cell lines using phospho RTK antibody array. Phospho-RTK array analysis revealed that MET was simultaneously activated with other RTKs, including EGFR, ErbB2, ErbB3 and platelet-derived growth factor receptor-. Combination of MET and EGFR inhibitors triggered stronger inhibition on cell proliferation and invasion of MPM cells than that of each *in vitro*. These results indicated that coactivation of RTKs was essential in mesothelioma cell proliferation and/or survival, thus suggesting that simultaneous inhibition of RTKs may be a more effective strategy for the development of molecular target therapy for MPM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学

#### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露に関連

しており、今後患者数の急速な増加が予測され社会問題となっている。悪性中皮腫の治療

としては主に抗がん剤治療が行われているがその効果は低く、現在のところ有効な治療法は確立されていない。近年、悪性腫瘍に対する分子標的薬剤が注目され、肺癌、乳癌などでは受容体型チロシンキナーゼ(RTK)を標的とした薬剤が臨床で用いられて大きな成果をあげている。悪性中皮腫の多くの症例において RTK である上皮成長因子受容体(EGFR)の発現がみられ、下流のシグナルが活性化していることが報告されている。しかし EGFR 特異的阻害剤の臨床試験では EGFR の活性の低下がみられるものの、有意な治療効果は得られていない。また MET, PDGFR などの発現の上昇および活性化も報告されているおり、他の RTK の活性化が悪性胸膜中皮腫の発症・進展に関わっている可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

悪性中皮腫における EGFR, PDGFR などの個々の受容体チロシンキナーゼの発現および活性化についての報告はなされ、特異的阻害剤の効果について報告がなされてきた。しかし臨床試験ではいずれの阻害剤においても明らかな抗腫瘍効果はみられていない。阻害剤に抵抗性である理由のひとつとして中皮腫においては複数の受容体型チロシンキナーゼが同時に活性化している可能性が示唆される。本研究では多くの細胞株および臨床検体を用いて悪性胸膜中皮腫における受容体型キナーゼの発現および活性化についての網羅的な解析を行い、活性化様式を明らかにする。さらに中皮腫発症における個々の RTK の役割を細胞生物学的に明らかにし、RTK を標的とした新たな治療戦略の可能性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 悪性中皮腫における受容体型チロシンキナーゼの発現と活性化についての解析

我々が樹立した日本人患者由来の中皮腫細胞株 14 細胞株と欧米人由来の 6 細胞株の計 20 細胞株を用いて EGFR, MET の発現および活性化について調べる。さらに他の RTK に関しては 42 個の RTK の活性化を検出可能な phospho-RTK 抗体アレイを用いて、RTK の活性化を網羅的に検出し、中皮腫細胞株における RTK の活性化様式を明らかにする。また手術検体より蛋白を抽出し、phospho-RTK 抗体アレイにより RTK の活性化様式についても明らかにする。中皮腫の複数のサンプルにおいて共通して活性化している受容体型チロシンキナーゼを明らかにし、特異的抗体により発現、活性化についての確認をする。また下流のシグナルである MAPK, AKT の活性化についても検討を行う。

### (2) 受容体型チロシンキナーゼの遺伝子変

## 異検索

EGFR, MET などは肺癌や他の悪性腫瘍でも遺伝子変異による活性化が報告されている。悪性胸膜中皮腫の細胞株および臨床検体においてもこれらの遺伝子解析を行い変異の有無を明らかにする。また中皮腫で活性化している他の RTK についても変異解析を行う。

### (3) 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の腫瘍抑制効果についての検討

悪性胸膜中皮腫で活性化している受容体型チロシンキナーゼの阻害による腫瘍の増殖および運動能の抑制効果を明らかにする。増殖に関しては MTT アッセイ、細胞周期解析、運動能・浸潤能に関してはボディアンチチャンパーアッセイにより評価する。抑制効果が得られたものについては下流のシグナルに与える影響についても解析を行う。単独の阻害では効果が明らかでないものについては、phospho-RTK 抗体アレイの結果同定された RTK の複数の阻害剤を組み合わせる抑制効果について検討を行う。

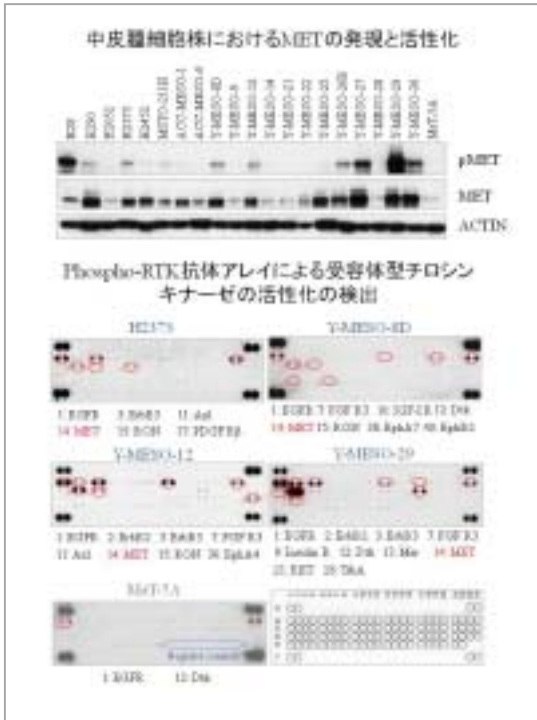
## 4. 研究成果

### (1) 悪性中皮腫における受容体型チロシンキナーゼの発現と活性化についての解析

中皮腫細胞株における受容体型チロシンキナーゼの一つである MET の発現について、20 細胞株を用いて解析を行ったところ、14 細胞株において正常中皮由来の細胞株 MeT-5A と比較して mRNA レベルで 2 倍以上の発現がみられた。多くの細胞株において蛋白レベルにおいても発現の上昇がみられ、リン酸化抗体による活性化の検出では血清飢餓状態においても 13 細胞株で活性化が認められた(図 1)。35 の臨床検体を用いた免疫組織学的検討においても、28 症例(80%)の症例で MET の発現がみられ、陽性例のうち 19 症例においてリン酸化抗体により MET の活性化が検出された。MET のリガンドである Hepatocyte Growth Factor (HGF)の発現をリアルタイム PCR にて調べたところ、1 細胞株で発現の上昇がみられたが、他の細胞株では MeT-5A と発現は同レベルであった。以上より中皮腫において MET の発現の上昇と活性化が高頻度に検出されることが明らかになった。しかしリガンドである HGF の自己分泌による活性化機構とは別の機構が考えられた。また他の RTK の活性化について phospho-RTK 抗体アレイを用いて調べたところ、細胞株においては MET 以外にも EGFR, ErbB2, ErbB3, PDGFR, RON など複数の RTK の活性化がみられた(図 1)。MET と下流のシグナル経路である MAPK, AKT の活性化について調べたところ、MAPK の活性化は多くの細胞でコントロールである MeT-5A と同等であった。AKT に関しては MET の活性化とは強い相関はみられないも

の、MET の活性化している細胞においては、AKT の強い活性化がみられた。MeT-5A では活性化は弱いものであった。

図 1 : 中皮腫における MET の発現および活



性化と phospho-RTK 抗体アレイによる受容体型チロシンキナーゼの活性化の検出

( 2 ) 受容体型チロシンキナーゼの遺伝子変異検索

MET の活性化が高頻度に検出され、さらにリガンド非依存性に活性化していることから、遺伝子変異による活性化の可能性が考えられ、MET 遺伝子のコーディング領域を含む 21 エクソンの遺伝子検索を行った。すべての細胞株において活性化型の遺伝子変異は検出されなかった。また EGFR のエクソン 18~21, 下流のシグナル分子である PIK3CA などの変異解析を行ったが、いずれの分子の変異も検出されなかった。

( 3 ) 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の腫瘍抑制効果についての検討

MET の活性化が中皮腫において高頻度に見られることから、MET の活性化がみられる 3 細胞株において MET を RNAi によりノックダウンし細胞の増殖に与える影響について調べた。ノックダウンにはレンチウイルスによる ShRNA の系を用いた。ShRNA によりいずれの細胞においても著明な MET の発現の低下がみられることが確認された。Y-MESO-29 では MET のノックダウンにより 40% 程度の増殖の抑制がみられ、AKT の活性の低下がみられた。NCI-H290 では

20% 程度の増殖抑制がみられ、NCI-2373 では増殖抑制はみられなかった。これらの細胞では AKT の活性の低下は軽度もしくは観察されなかった。次に MET の特異的阻害剤である SU11274 および PHA665752 処理による増殖抑制について 13 の細胞株を用いて検討したところ、5  $\mu$ M の濃度において NCI-H290, Y-MESO-29 で 30% 程度の増殖抑制がみられたが、他の細胞株では軽度もしくは増殖抑制はみられなかった ( 図 2 )。

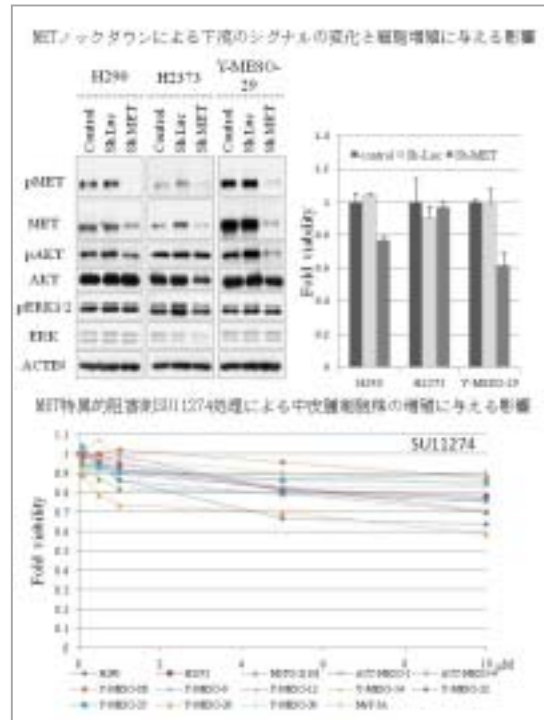


図 2 : MET ノックダウンおよび特異的阻害剤処理による中皮腫細胞株の増殖に与える影響

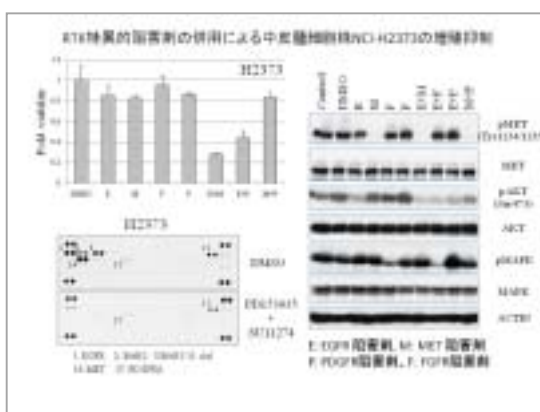
MET の活性化している細胞株では EGFR および ErbB2, ErbB3 の活性化も検出されることから EGFR の特異的阻害剤である PD15035 の影響について調べた。11 の細胞株で増殖抑制について調べたところ 3 細胞株で増殖抑制がみられたが、他の細胞株では効果は弱いものであった。NCI-H2373 においては MET, EGFR, ErbB3 および PDGFR の活性化が検出されることから、MET, EGFR および PDGFR に対する各阻害剤処理の細胞増殖に与える影響について調べた。各阻害剤単独では増殖抑制はみられず、EGFR および MET の阻害剤の併用により強い増殖抑制がみられた。また EGFR と PDGFR 阻害剤の併用によっても増殖抑制が認められた。一方 MET および PDGFR 阻害剤の併用では効果は弱いものであった ( 図 3 )。他の 6 細胞株においても EGFR と MET の阻害剤の併用にて強い増殖抑制がみられた。下流のシ

グナル経路として AKT の活性の低下と増殖抑制において相関がみられたが、MAPK の活性との相関関係はみられなかった。

さらに MEK の阻害剤である PD98059 および PI3-kinase の阻害剤である LY294002 の増殖に与える影響について調べたところ、LY294002 では 20  $\mu$ M において 50~70% の強い増殖抑制がみられた。また運動・浸潤能の抑制も観察された。一方 PD98059 では 0~20% 程度の増殖抑制がみられるのみであった。

以上より悪性中皮腫においては複数の RTK の活性化が検出され、各 RTK 特異的阻害剤単独では増殖に与える影響は弱かったが、複数の阻害剤の併用が有効であった。また下流のシグナル経路とし PI3-kinase を介する経路が重要であることが示唆された。

図 3 : RTK 特異的阻害剤の併用による中皮腫



細胞株の増殖抑制

#### 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)

Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y: Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. Carcinogenesis 30: 1097-1105, 2009 (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[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

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-03.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

福井高幸 (FUKUI TAKAYUKI)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号: 70463198

(2)研究分担者

(3)連携研究者