

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21591814

研究課題名（和文）癌遺伝子 K-Ras 及び Myc を標的とした新規肺癌治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel Myc and K-Ras targeted therapies for the treatment of lung cancer

研究代表者 深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：20379845

研究成果の概要（和文）：Myc 遺伝子における四アミノ酸置換型 dimerization domain: Omomyc は、Myc family に属する C-Myc、N-Myc、L-Myc の発現異常のある癌組織に細胞死を誘導し (Soucek et al. Oncogene 17: 2463-2467 1998)、さらに K-Ras 変異を有する肺癌に対し特異的細胞死を誘導することが報告されている (Soucek et al. Nature 2008)。Omomyc を発現できるリコンビナント・アデノウイルスベクター：Ad-Omomyc は、Myc を発現している肺癌細胞株：A549 に細胞増殖抑制効果を誘導する一方で Myc 発現の低い肺癌細胞株：H441 またはヒト正常肺腺維芽細胞：NHLF においてこれらの効果は認められなかった。PI 染色および Flowcytometry を用いた細胞周期解析にて Ad-Omomyc は A549 細胞に有意な subG0/G1 population の増加を誘導したが、H441 細胞また NHLF における増加は認められず、このことより、Omomyc は Myc 発現の高い肺癌特異的に細胞死を誘導できることが示唆された。ドキシサイクリン投与により肺癌を発症するマウス：CCSP-rtTA/Tet-op-K-Ras4bG12D において、Ad-Omomyc の経気管投与後、発症肺癌に対する抗腫瘍効果が認められ、腫瘍に対する Tunel 染色の結果、Ad-Omomyc 投与群において縮小腫瘍内に apoptosis が認められた。さらに Ad-Omomyc は A549 肺癌細胞接種により作製されたヌードマウス皮下腫瘍に対してコントロール群に比べ有意な腫瘍縮小効果を示した。また治療後の体重の変化はコントロール群と比べ有意差を認めなかった。以上より、Omomyc を用いた K-Ras 変異肺癌に対する新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Myc is an oncogenic transcription factor that promotes tumorigenesis. Recently, a dominant negative form of Myc (Omomyc) was shown to cause regression of lung tumors in a mouse model of lung cancer caused by *KRAS* mutation, suggesting that Myc might be a potential therapeutic target to treat the *KRAS* lung cancer. However, it is not yet known whether Omomyc can also inhibit the growth of human lung tumors that carry a similar *KRAS* mutation. In the present study, we demonstrate that Omomyc induces cell death of *KRAS*-mutated human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo*. However, Omomyc does not induce cell death in human lung adenocarcinoma H441 cells that also carry the *KRAS* mutation. Interestingly, A549 cells express high levels of Myc, while H441 cells

do not. Co-expression of exogenous Myc with Omomyc in H441 cells induces cell death, indicating that Omomyc requires high levels of Myc to induce cell death in *KRAS* mutation-positive lung adenocarcinoma. Here, we show for the first time that *KRAS* mutation-positive lung cancer displaying high levels of Myc could be treated by inhibiting Myc transactivation function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、呼吸器外科学

キーワード：肺癌・Myc・K-Ras

1. 研究開始当初の背景

肺癌発症に関連する遺伝子異常として、p53・Rb等の癌抑制遺伝子の不活化の他にMyc・K-Ras等の癌原遺伝子の点突然変や増幅による活性化が挙げられる。Mycは多くのヒト発癌に関与し、過剰発現する癌細胞においてその発現を抑制すると、腫瘍抑制さらにapoptosisが誘導されることが知られている。一方K-Ras変異型非小細胞肺癌は、gefitinib或は他の化学療法における負の効果因子であることが報告されている。

2. 研究の目的

Omomycを肺癌に発現できるベクター開発を行い、その抗腫瘍効果を*in vitro*および*in vivo*にて検討するとともに抗癌剤との併用効果を検討し新しい新肺癌治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

研究初年度において、Omomycを発現型できるアデノウイルスベクターを作製。肺癌組織型別またK-Ras及びMycのstatusの異なる肺癌細胞株、正常細胞を用いた機能評価を行った。

P-1 肺癌細胞株におけるOmomycのapoptosis誘導能の検討

P-2 肺癌特異的Omomyc発現型アデノウイルス

スベクターの作製と機能評価

平成22年度において、Omomycの*in vivo*での抗腫瘍効果を肺癌モデルマウスを用いて解析し、また正常細胞・組織障害の検討を行った。

P-3 肺癌モデルマウスにおける抗腫瘍効果の検討

P-4 正常細胞・組織障害の評価

研究計画最終年度において抗癌剤・分子標的薬との併用効果の検討を行った。

P-5A *in vitro*における抗癌剤・分子標的薬剤と併用効果の検討

P-5B *in vivo*での併用効果の検証

4. 研究成果

P-1 肺癌細胞株におけるOmomycのapoptosis誘導能の検討

Omomycを発現できるリコンビナント・アデノウイルスベクター：Ad-Omomyc (Ad-CMV/Omomyc)を作製し、各種細胞に感染させることでその抗腫瘍効果を検討した。Immunoblot解析により肺癌細胞株(A549, H441)ヒト正常肺繊維芽細胞(NHLF)におけるMyc発現はA549株にて強発現が認められた一方で、他2種細胞株では低値であった。

Ad-Omomyc を感染後 72 時間後、いずれの細胞種においても Omomyc の exogenous な発現が確認された。しかし Ad-Omomyc は肺癌細胞株: A549 に対して、有意な細胞増殖抑制効果および apoptosis を誘導した一方で Myc 発現の低値であった H441 株に対してこれらの効果は認められなかった

P-2 肺癌特異的 Omomyc 発現型アデノウイルスベクターの作製と機能評価
肺癌特異的転写システム:TTS (Fukazawa T et al. Cancer Res. 2004) による Omomyc 発現型ベクター: Ad-TTS/Omomyc を各種細胞に感染させることでその抗腫瘍効果を検討した。Ad-TTS/Omomyc は肺癌細胞株: H441 および A549 に対して Omomyc を発現させることが可能であったが、これらの肺癌細胞における Omomyc 発現は Ad-Omomyc (Ad-CMV/Omomyc) に比し弱く、A549 に対する細胞増殖抑制効果および誘導された apoptosis は低値であった。

P-3 肺癌モデルマウスにおける抗腫瘍効果の検討

in vivo における Ad-Omomyc の抗腫瘍効果を解析する為に、K-Ras 変異型肺癌モデル・ダブルトランスジェニックマウスを用い検討を行った。当該マウスは肺上皮特異的プロモータ (CCSP promoter) 下に変異 K-Ras 遺伝子 (K-Ras4b^{G12D}) を発現し、ドキシサイクリン (Dox) を飲水させることでおよそ 2 ヶ月 (On Dox 2m) で肺腺癌が発症する。Ad-Omomyc の経気管投与後の腫瘍に対する Tunel 染色の結果、Ad-Omomyc 投与群において縮小腫瘍内に apoptosis が認められた。また Ad-Omomyc は A549 肺癌細胞接種により作製されたヌードマウス皮下腫瘍に対してコントロール群に比べ有意な腫瘍縮小効果を示した。

P-4 正常細胞・組織障害の評価

Immunoblot 解析の結果、Ad-Omomyc を感染後 72 時間後、ヒト正常肺繊維芽細胞株: NHLF に対して exogenous な Omomyc 発現させることが可能であった。一方で Omomyc による NHLF 細胞増殖の抑制や apoptosis の誘導は認められなかった。さらに *in vivo* においては A549 肺癌細胞接種により作製されたヌードマウス皮下腫瘍への Ad-Omomyc を感染後マウスの有意な体重減少は認められなかった。

P-5A *in vitro* における抗癌剤・分子標的薬剤と併用効果の検討

P-5B *in vivo* での併用効果の検証

抗癌剤併用効果の検討において cisplatin は A549 細胞に対する Ad-Omomyc の細胞死を増強させたが、この併用効果は、上述の

CCSP-rtTA/Tet-op-K-Ras4bG12D 肺癌マウスを用いた検討において認められなかった。

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 Fukazawa T, Maeda Y, Matsuoka J, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Morita I, Faiola F, Durbin ML, Soucek L, Naomoto Y.

Inhibition of Myc effectively targets KRAS mutation-positive lung cancer expressing high levels of Myc.

Anticancer Research. 30: 4193-4200, 2010(査読有).

[学会発表] (計 3 件)

① 深澤拓也、K-Ras 及び Myc を標的とした新規非小細胞肺癌治療法の開発、第 52 回日本肺癌学会学術集会、2011 年 11 月 4 日、大阪国際会議場

② 深澤拓也、K-Ras 及び Myc を標的とした肺癌治療法の開発のための基礎的検討、第 64 回日本胸部外科学会学術集会、2011 年 10 月 10 日 名古屋国際会議場

③ 深澤拓也、Adenoviral mediated expression of Omomyc induced growth inhibition and apoptosis in lung cancer expressing Myc、第 101 回米国癌学会年次総会、2010 年 4 月 18 日 Washington DC

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：20379845

(2) 研究分担者

松岡 順治 (MATSUOKA JYUNJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30332795

山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40379730

猶本 良夫 (NAOMOTO YOSHIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00237190

(3) 連携研究者

なし