

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790522
 研究課題名（和文） 胃がんにおける PI3K 活性化機構の解明とキナーゼ阻害薬の個別化治療への応用
 研究課題名（英文） Mechanism of PI3K activation and individualized anti-kinase therapy in gastric cancer
 研究代表者
 向原 徹 (Mukohara Toru)
 神戸大学・医学部附属病院・特命准教授
 研究者番号：80435718

研究成果の概要（和文）：新規多標的キナーゼ阻害薬である foretinib は *MET* 遺伝子に増幅のある胃がん細胞のみならず *FGFR2* に遺伝子増幅のある細胞にも有効であることが新たに分かった。少なくとも一部の胃がん細胞では *MET* や *FGFR2* を核としたシグナルネットワークが存在し、効率的な PI3K 経路活性化に関わっていることが示唆された。Foretinib はこのネットワークを破壊することで効果を発揮することが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Foretinib, the novel multi-kinase inhibitor, appears effective against gastric cancer cells harboring not only *MET* but also *FGFR2* amplification. There appears inter-RTK signaling networks with *MET* or *FGFR2* at their core in at least part of gastric cancer cells, and the networks may contribute to efficient PI3K signaling. Foretinib exerts its inhibitory effects by blocking the networks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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：境界医学・応用薬理学

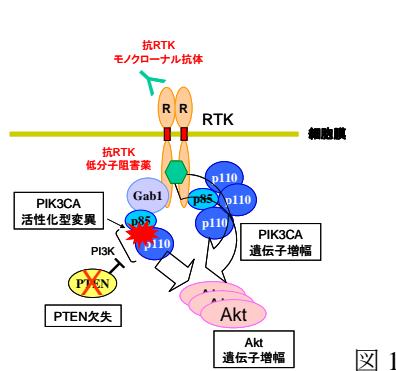
キーワード：シグナル伝達、個別化治療、胃がん、PI3K

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行胃がんは予後不良かつ分子標的薬の導入が遅れているがん種である。

(2) PI3K 経路はがんの腫瘍形成性やキナーゼ阻害薬の感受性に強い影響を及ぼすことが示唆されている。

(3) PI3K の異常活性化機構として、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) 遺伝子の増幅・変異、PIK3CA や PTEN の遺伝子変異、シグナルタンパク相互作用などが挙げられる (図 1)。



(4) PI3 経路の活性化機構を正確に把握することは、キナーゼ阻害薬の個別化につながりうる。

(5) Foretinib (GSK1363089)は臨床開発中の新規チロシンキナーゼ阻害薬であり、MET の他、VEGFRs、PDGFR-β、Flt-3、Kit、Tie2 への阻害活性が報告されている。

(6) Foretinib を含めた MET 阻害薬に対する獲得耐性の機序は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 胃がんに対するキナーゼ阻害薬の個別化治療に向けた基礎データを構築すること。

(2) MET 阻害薬に対する獲得耐性の機序を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 表 1 に挙げた胃がん細胞株を用いて、foretinib の細胞増殖効果と、細胞内刺激伝達におよぼす影響を観察した。

表 1. 胃がん細胞株と PI3K 経路活性化に関わる遺伝子変化

Cell line	Amplification in			PIK3CA mutation
	MET	FGFR2	HER2	
KATO-III	NO	YES	NO	NO
MKN-45	YES	NO	NO	NO
MKN-1	NO	NO	NO	E541K
MKN-7	NO	NO	YES	NO
MKN-74	NO	NO	NO	NR

(2) 細胞増殖の評価：MTS assay

(3) 細胞内シグナル：Western blot phospho-RTK array (R&D)

(4) FGFR3 および HER3 の knockdown: siRNA (Invitrogen)

(5) 獲得耐性株の樹立：MKN-45 細胞を Foretinib、PHA665752 に長期間曝露し樹立した。

4. 研究成果

(1) 5 種類の胃がん細胞株における、foretinib の細胞増殖抑制効果を評価したところ、KATO-III (FGFR2 増幅) と MKN-45 (MET 増幅) において高い効果を示した (図 1A)。

(2) 選択的 MET 阻害薬である PHA665752 に反応させたところ、MKN-45 のみ高感受性であった (図 1B)。このことから、foretinib は

MKN-45 と KATO-III では、異なる作用メカニズムを持つことが示唆された。

(3) KATO-III と MKN-45 における、foretinib と PHA665752 の細胞内シグナルに対する効果をみたところ、いずれの細胞株においても、MET のリン酸化は抑制された。一方で下流シグナル分子である Akt や ERK1/2 のリン酸化は MKN-45 でのみ観察された (図 2)。このことから、KATO-III に対する foretinib の効果は、MET 非依存性であることが示唆された。

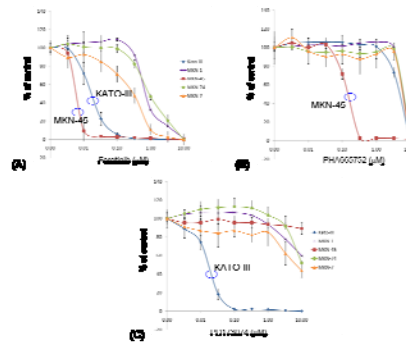


図 1

(4) KATO-III は FGFR2 に遺伝子増幅があるため、FGFR の選択的阻害薬である PD173074 に反応させたところ、KATO-III でのみ高い細胞増殖抑制 (図 1C)、および FGFR と下流シグナル分子のリン酸化抑制が観察された (図 2)。同様に、foretinib も KATO-III のリン酸化型 FGFR を抑制した。このことから、KATO-III に対する foretinib の効果は、FGFR2 を介していることが強く示唆された。

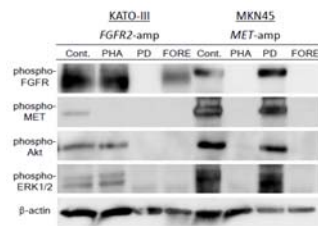


図 2

(5) FGFR に対する foretinib の効果は過去に報告されていなかったが、別の FGFR2 増幅胃がん細胞株である OCUM-2M においても、同様の効果が確かめられた (図 3)。

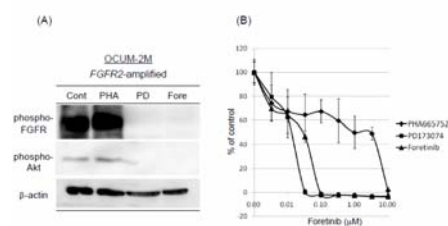


図 3

(6) 図 2 に示すように、KATO-III においては、FGFR2 の抑制に呼応して MET が抑制され、MKN-45 においては MET の抑制に呼応して FGFR2 が抑制されることから、それぞれ FGFR2、MET を核としたシグナルネットワークがあることが予想された。さらにその存在を確認すべく、phospho-RTK array を用いて、それぞれの薬剤の他の RTK のリン酸化への影響を調べたところ (図 4A: KATO-III、図 4B: MKN-45)、図 5 に示すように、それぞれ、FGFR2、MET を核とした RTK シグナルネットワークの存在が示唆された。

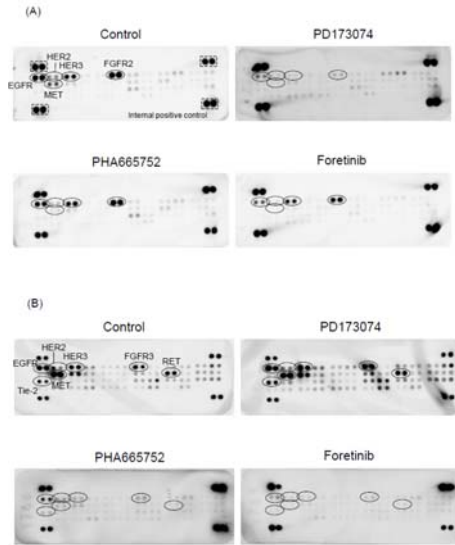


図 4

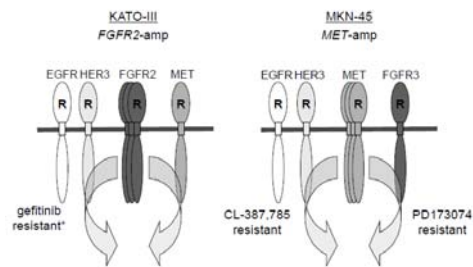


図 5

(7) RTK シグナル軸の下流にある RTK (図 5) はそれぞれの特異的阻害薬に生化学的耐性を示すことが、図 2、図 4 および過去の報告より示唆されたため、MKN-45 における EGFR、HER2 に対する、EGFR/HER2 阻害薬 (CL-387,785) の効果を評価したところ、MKN-45 において増殖と EGFR のリン酸化は、同剤に耐性であることが分かった (図 6)。

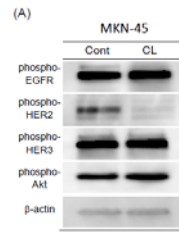


図 6

(7) MKN-45 の RTK シグナルネットワークにおける (図 5)、FGFR3 と HER3 の生化学的、生物学的役割を探索するため、2 つの RTK を siRNA を用いて knockdown したところ、いずれも Akt のリン酸化、および細胞増殖を部分的に抑制した (図 7)。このことから、RTK シグナルネットワークはより効率的な PI3K シグナル伝達、および細胞増殖に関わっている可能性が示唆された。

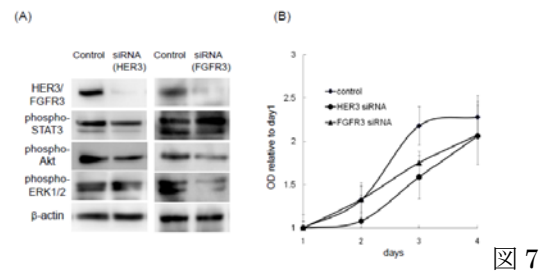


図 7

(8) MKN-45 を PHA665752 に数カ月曝露した後、PHA665752 存在下、非存在下で連続 MTS assay を行ったところ、図 8 に示すように、獲得耐性株 (MKN-45-R) となっていることが確認できた。

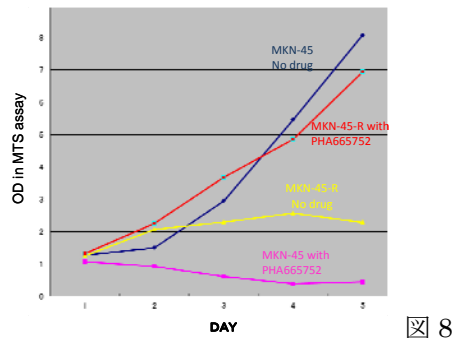


図 8

(8) 結論

① Foretinib は MET のみでなく、FGFR2 にも阻害活性を示す。

② 少なくとも一部の胃がん細胞に遺伝子増幅を伴う RTK を核とした RTK シグナルネットワークが存在し、下流の RTK は PI3K 経路の活性化および増殖に寄与している。

③ RTK ネットワークの下流に位置する特異的 RTK 阻害薬に耐性を示すことがあり、核となる RTK を捉えることが、治療学的に重要である。

(9) 今後

①本成果の一部は、現在論文投稿中である。

②MKN-45-R を用いて、現在その耐性メカニズムを解析中である。

③ Foretinib の FGFR2 への作用について、他のがん種の細胞株を用いて現在検討中である。

④ PI3K をトリガーするタンパクを効率よく同定すべく、質量分析計を用いた研究を現在実施中であり、一定の成果が上がっている。

⑤ 今後、これらのノウハウを軸に、他のアジア型がん（頭頸部がん、食道扁平上皮がん）にも同様の研究を展開する予定である。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

① Mukohara T, Kataoka Y, Tomioka H, Kiyota N, Fujiwara Y, Yashiro M, Hirai M, and Minami H. Foretinib (GSK1363089) inhibits growth of gastric cancer cell lines through blockade of inter-receptor tyrosine kinases networks. 22nd EORTC-NCI-AACR symposium on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics" 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向原 徹 (Mukohara Toru)

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：80435718

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者