

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590639

研究課題名(和文) 遺伝子解析とプロテオーム解析を駆使したアジア型がんに対するキナーゼ阻害薬の個別化

研究課題名(英文) individualization of anti-kinase drugs for Asian cancers using genomic and proteomic analysis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：MET遺伝子(がん遺伝子)を過剰発現している胃癌はMETキナーゼ阻害薬の治療対象となりうるが獲得耐性の出現が予測される。MET増幅胃癌細胞株を用いた研究で、MET遺伝子のコピー数の増加およびY1230H変異が獲得耐性機序となることが示唆された。また、前者は可逆的な変化であり阻害薬非存在下に減少し細胞は阻害薬感受性を取り戻すのに対し、後者は不可逆的な変化であった。将来的には獲得耐性の機序により個別化治療が行えるかもしれない。またHER2過剰発現胃癌細胞株を用いた研究で、5FUの効果を増強させるにはリン酸化型S6Kの抑制が重要であり、5FUとeverolimusの併用が有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Whereas cancers with amplified MET gene, an oncogene, are potentially good target of MET kinase inhibitors, emergence of acquired resistance is highly expected. Our current study using MET-amplified gastric cancer cell lines suggested that both increase in copy number and Y1230H mutation of MET gene could cause acquired resistance. While MET copy number decreased in the absence of MET inhibitor and cells regained sensitivity to it, Y1230H mutation was irreversible alteration. This finding suggested possibility of individualized treatment based on acquired resistance mechanism in the future. Our another study using HER2-amplified gastric cancer cell lines showed that suppression of phosphorylated S6K is important molecular event to enhance 5FU-induced apoptosis, so that 5FU/everolimus combination was suggested to be attractive treatment strategy for gastric cancer with HER2 amplification.

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：個別化治療 胃癌 MET HER2 キナーゼ阻害薬

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 所謂アジア型がんに含まれる頭頸部癌、食道扁平上皮癌、胃癌は予後不良かつキナーゼ阻害薬などの分子標的薬の導入が遅れているがん種である。

(2) PI3K 経路の異常活性化はキナーゼ阻害薬の感受性/耐性に強い影響を及ぼすため、細胞毎にその活性化機構の全貌を把握できれば、確実な個別化治療につながりうる。

(3) キナーゼ阻害薬の獲得耐性についてはほとんど研究が進んでいない。

2. 研究の目的

(1) MET 増幅胃癌細胞株における小分子 MET キナーゼ阻害薬の獲得耐性機構を明らかにすること。

(2) HER2 増幅胃癌細胞株における化学療法薬誘導アポトーシスを増強する分子機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) MET 増幅胃癌細胞株 (MKN45) を MET キナーゼ阻害薬、PHA665752、および GSK1363089 に長期間曝露し、それぞれ 0.5 μM、20 nM 存在下に増殖可能な耐性株 MKN45-PR、MKN45-GR を作成

(2) 細胞増殖の評価: MTS assay

(3) 細胞内シグナル: Western blot 法

(4) 細胞周期分布解析: FACS

(5) MET のコピー数および塩基配列決定: 定量的 PCR および direct sequence

(6) MET の knockdown: siRNA (Invitrogen)

(7) 化学療法薬と分子標的薬との相乗効果の評価: Combination Index を median-effect method (CalcuSyn software; Biosoft) を用いて算出

4. 研究成果

(1) MKN45-PR、MKN45-GR ではいずれもそれぞれの MET 阻害薬存在下で増殖できる(耐性化)一方で、阻害薬非存在下では増殖能が著しく抑制されること(“addiction”)が分かった(図1)。

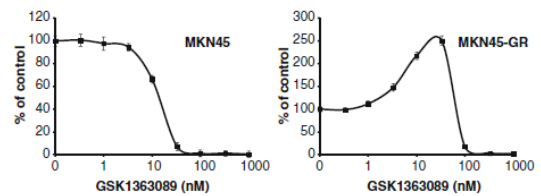
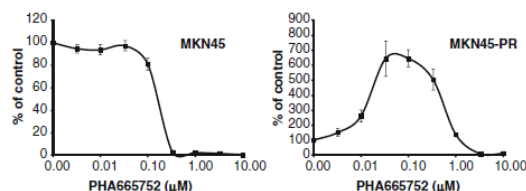


図1

(2) MKN45-PR、MKN45-GR では親株 MKN45 に比して、G1/S 細胞周期停止の誘導に高用量の MET 阻害薬を必要とした。

(3) MKN45-PR、MKN45-GR では親株 MKN45 に比して、MET の発現量増加が観察された。MKN45-PR、MKN45-GR では親株 MKN45 に比して、リン酸化型 MET の抑制に高用量の MET 阻害薬を必要とした(図2)。

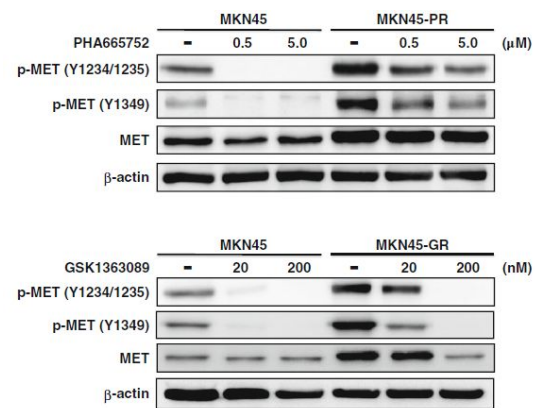


図2

(3) 各耐性株および親株の MET 遺伝子のコピー数と、exon 19 の塩基配列を決定したところ、MKN45-PR、MKN45-GR のいずれにおいてもコピー数の増加がみられたのに対し、MKN45-PR でのみ Y1230H のキナーゼ活性化型遺伝子変異が検出された(図3)。

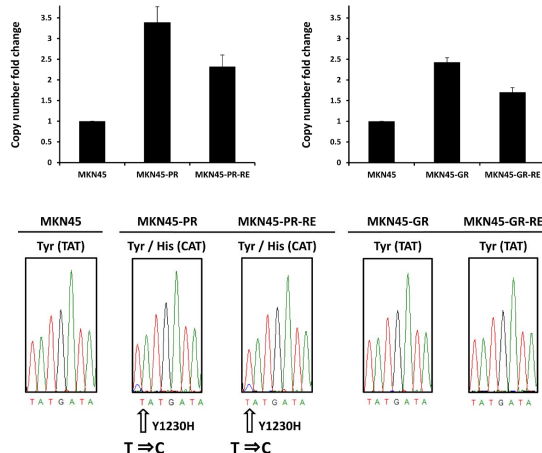


図3

(4) MKN45-PR は PHA665752 非存在下で S 期増加がみられる一方、BrdU の取り込み増加はみられず、S 期停止を起こしていることが示唆された。

(5) 各耐性株においては、MET 遺伝子の

Y1230H 遺伝子変異 and/or コピー数増加が過剰な MET シグナルから原因となり、さらには replication stress、DNA damage response を励起するため S 期停止を起こす (図 4) との仮説を基に、DNA damage response シグナル経路上のリン酸化型 ATR、Chk1、p53 および p21^{waf1/Cip1} の発現量を評価したところ、MKN45-PR ではこれらタンパクが親株 MKN45 より高発現しており、0.5 μM の PHA665752 に反応させると MKN45-PR の阻害薬非存在下のレベルまで低下することが分かった (図 5)。さらに、各耐性株に MET siRNA を様々な濃度で反応させたところ、MET が部分的に knockdown された条件で最も高い増殖能を示すことが分かった (図 6)。これらは図 4 の仮説を支持した。

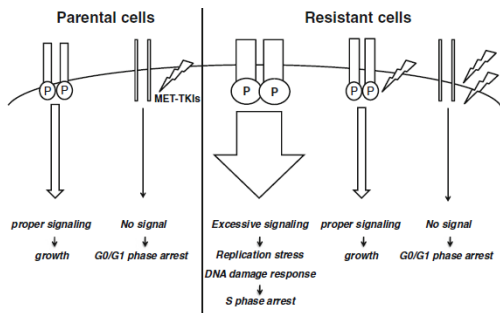


図 4

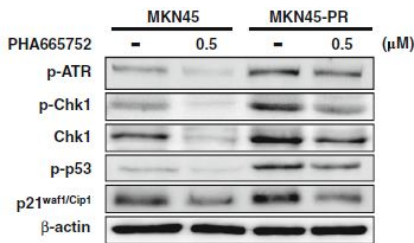


図 5

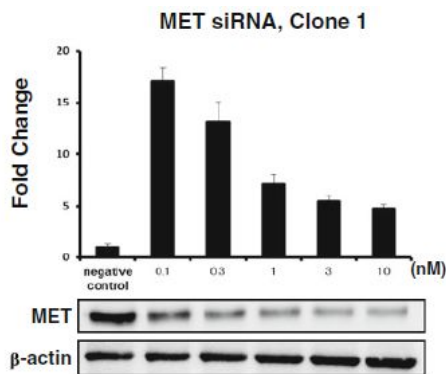


図 6

(6) MKN45-PR と MKN45-GR の維持培養液から各 MET 阻害薬を徐々に減少させ、非存在下にも増殖可能な revertant 株 MKN45-PR-RE と MKN45-GR-RE を作成したところ、両 revertant 株において阻害薬 "addiction" はほぼ解除された。一方、MKN45-GR-RE は GSK1363089 に

対する感受性を取り戻したのに対し、MKN45-PR-RE は PHA665752 に十分な耐性を保った (図 7)。また、revertant 株において、MET 遺伝子コピー数が MKN45-PR、MKN45-GR に比べ減少していたのに対し、MKN45-PR-RE では Y1230H が保持されていることが分かった (図 3)。これらから、MKN45 は適切な強度の MET シグナルを維持するために、MET 遺伝子のコピー数を変動させること、また Y1230H は単独で MET 阻害薬耐性の成因となることが示唆された。

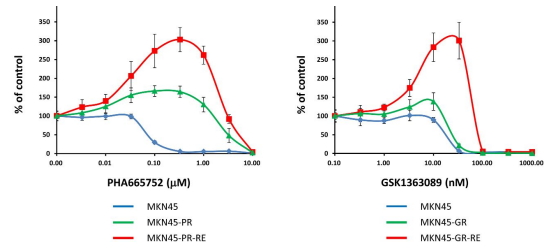


図 7

(7) 7 種類の胃癌細胞株を用いて、抗 HER2 抗体である trastuzumab への感受性をスクリーニングしたところ、高感受性を示したのは HER2 遺伝子増幅 NCI-N87 のみであった。MKN7 は同じく HER2 増幅があるにも関わらず耐性であった (図 8)。

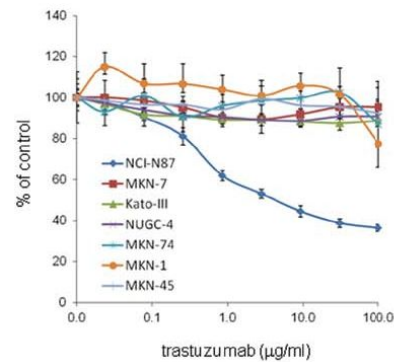


図 8

(8) NCI-N87 と MKN 7 の trastuzumab 反応下の細胞内シグナルの変化を調べたところ、感受性のある前者でのみ、リン酸化型 S6K が抑制された。

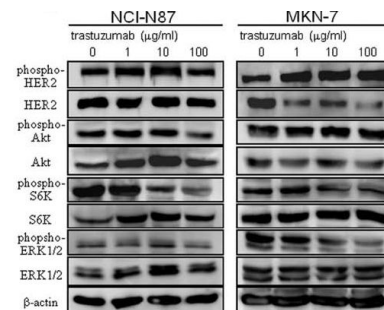


図 9

(9) trastuzumab 感受性株 NCI-N87 は doxorubicin および fluorouracil と

trastuzumab との間相乗効果 (CI<1) がみられ (図 10, 11)。一方、MKN7 ではいずれの化学療法薬とも相乗効果がなかった。NCI-N87 における fluorouracil と trastuzumab の相乗効果は、前者が誘導するアポトーシスを後者が促進するためと考えられた (図 12)。

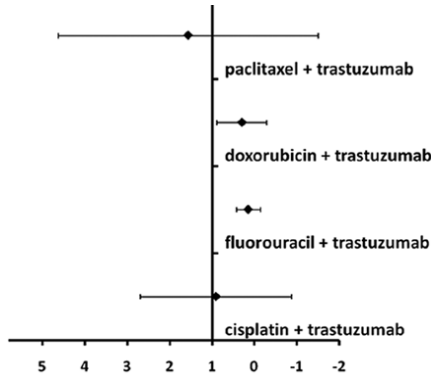


図 10

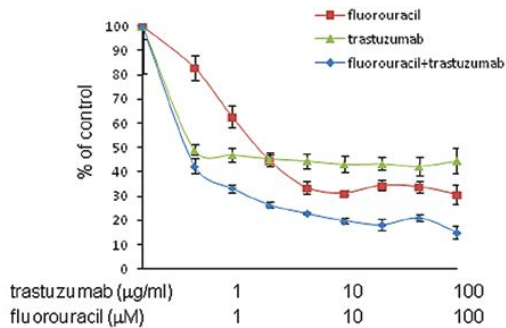


図 11

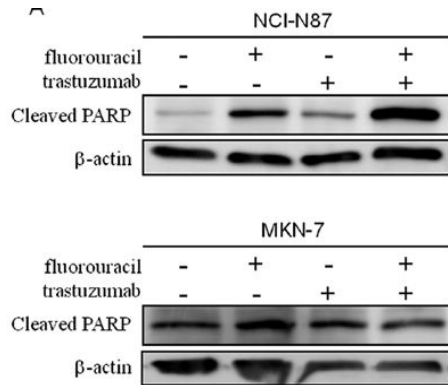


図 12

(10) HER2 増幅胃癌細胞において、fluorouracil によるアポトーシス誘導には、S6K のリン酸化抑制が必要である、との仮説の基、fluorouracil と everolimus の相乗効果を、NCI-N87 と MKN7 において評価したところ、両細胞株においても、everolimus 単独ではアポトーシスを誘導しないのに対し (図 13a) fluorouracil と併用するとリン酸化型 S6K の抑制と並行してアポトーシスが增強された (図 13b)。

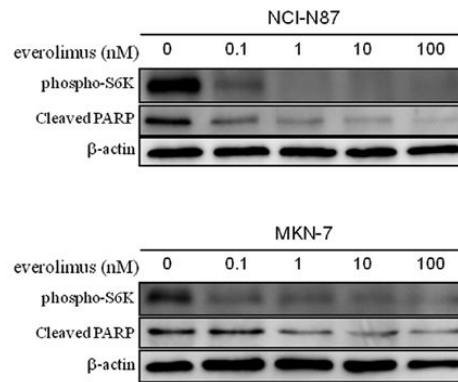


図 13a

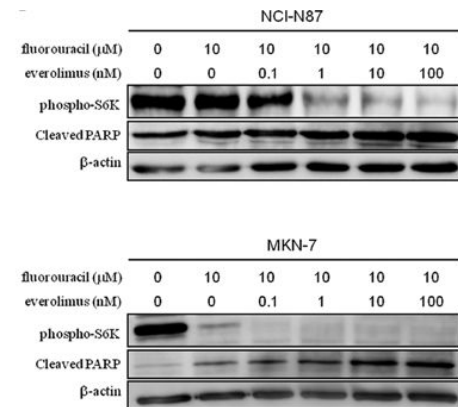


図 13b

(11) その他の胃癌細胞株について、fluorouracil と everolimus の併用効果を検討したところ、HER2 増幅細胞でみられたような、アポトーシス誘導に関して相乗効果はみられなかった (図 14)。このことから、リン酸化型 S6K の抑制が fluorouracil 誘導アポトーシスに重要であるのは HER2 増幅胃癌の特徴である可能性が示唆された。

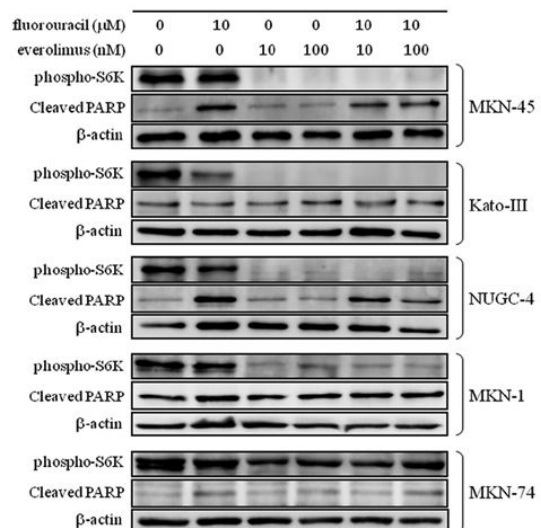


図 14

(12) 結論

MET キナーゼ阻害薬の獲得耐性には、MET 遺伝子のコピー数の増加および Y1230H 突然変異が関わっていることが示唆された。

MET 遺伝子のコピー数の増加および Y1230H 突然変異は MET 阻害薬非存在下では過剰な MET シグナルの原因となり、DNA damage response を励起し、結果として S 期停止となることが示唆された。一定用量の MET 阻害薬が増殖に必須となることから、MET 阻害薬 "addiction" の状態と考えられた。

MET 遺伝子のコピー数は細胞にとって最適な強度の MET シグナルをトリガーするために変動するのに対して、Y1230H は不可逆的な遺伝子変化であることが示唆された。

HER2 増幅胃癌細胞株においては、リン酸化型 S6K の抑制が fluorouracil 誘導アポトーシスの増強に重要であり、fluorouracil と everolimus の併用療法の有効性が示唆された。

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4件)

Funakoshi Y, Mukohara T, Ekyalongo RC, Tomioka H, Kataoka Y, Yohei Shimono, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Regulation of MET kinase inhibitor resistance by copy number of MET in gastric carcinoma cells. *Oncol Res* 2014; In press. (査読あり)

Funakoshi Y, Mukohara T, Tomioka H, Ekyalongo RC, Kataoka Y, Inui Y, Kawamori Y, Toyoda M, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Excessive MET signaling causes acquired resistance to and addiction to MET inhibitors in MKN45 gastric cancer cell line. *Investigational New Drugs* 2013;31:1158-1168. (査読あり)

Tomioka H, Mukohara T, Kataoka Y, Ekyalongo RC, Funakoshi Y, Imai Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Inhibition of mTOR-S6K signal is necessary to enhance fluorouracil-induced apoptosis in HER2-amplified gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2012;41:551-558. (査読あり)

Kataoka Y, Mukohara T, Tomioka H, Kiyota N, Fujiwara Y, Yashiro M, Hirakawa K, Hirai M, and Minami H. Foretinib (GSK1363089), a multi-kinase inhibitor of MET and VEGFRs, inhibits growth of gastric cancer cell lines by blocking inter-receptor tyrosine kinase networks.

Invest New Drugs 2012;30:1352-60. (査読あり)

[学会発表](計2件)

Funakoshi Y, Mukohara T, Ekyalongo RC, Tomioka H, Kataoka Y, Yohei Shimono, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Reversibility of acquired resistance and "addiction" to MET inhibitors. AACR-NCI-EORTC International Conference on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics" 2013年10月20日、ボストン

Funakoshi Y, Mukohara T, Tomioka H, Ekyalongo RC, Kataoka Y, Inui Y, Kawamori Y, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H. Excessive MET signaling causes acquired resistance to and addiction to MET inhibitors in MKN45 gastric cancer cell line. EORTC-NCI-AACR symposium on "Molecular Targets and Cancer Therapeutics" 2012年11月7日、ダブリン

[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

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: 88435718

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者