

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 9日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790902

研究課題名（和文）新規足場蛋白 Aki1 を標的とした EGFR 遺伝子変異肺癌の制御法開発

研究課題名（英文）Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations

研究代表者

山田 忠明（YAMADA TADAAKI）

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：00507048

研究成果の概要（和文）：EGFR に結合し、PI3K/PDK1/Akt の活性化を橋渡しする新規足場蛋白である Aki1 に着目し、その制御が EGFR 変異を有する肺癌における新しい治療標的になりうるかについて研究した。複数の EGFR 変異を有する肺癌細胞株で Aki1 が高発現していることを確認し、siRNA 法にて Aki1 阻害を行ったところ、細胞増殖抑制およびアポトーシス増加を示した。EGFR 変異を有する肺癌細胞株をマウスに皮下移植し作成した動物モデルでは siRNA 法を用いた Aki1 遺伝子発現抑制により著明な抗腫瘍効果を示した。さらに、EGFR 変異を有する肺癌腫瘍では EGFR 阻害薬治療の有無に関わらず、高頻度に Aki1 高発現を認めた。これらの研究成果により、Aki1 は EGFR 阻害薬の耐性 EGFR-T790M 変異を含めた EGFR 変異を有する非小細胞肺癌の新たな標的分子である可能性がある。

研究成果の概要（英文）： We focused on Akt kinase-interacting protein1 (Aki1), a scaffold protein of PI3K /PDK1/Akt, and assessed its role in EGFR mutant lung cancer. Aki1 constitutively associates with mutant EGFR in lung cancer cells. Silencing of Aki1 inhibited cell growth of EGFR mutant lung cancer cells and induced apoptosis of them. Treatment with Aki1 siRNA dramatically inhibited growth of EGFR mutant lung cancer cells in a xenograft model. Moreover, Aki1 was frequently expressed in tumor cells of EGFR mutant lung cancer patients, including those with acquired resistance to EGFR-TKI treatment. Our data suggest that Aki1 may be an ideal target for EGFR mutant lung cancer patients, especially those with acquired EGFR-TKI resistance due to EGFR T790M gatekeeper mutation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、分子標的治療、EGFR 変異

1. 研究開始当初背景

非小細胞肺癌に対する新たな分子標的薬として上皮成長因子受容体（EGFR）阻害薬が開発され、これまでに EGFR 遺伝子変異を有する肺癌において良好な治療成績が報告され

ている。その一方で、この EGFR 阻害薬に対する薬剤耐性が次の大きな課題と考えられている。このような耐性克服のためには直接的な標的である EGFR 以外の治療標的分子を明らかにすることが新たな治療法開発にと

って必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR に結合し、主要な生存・増殖シグナルである PI3K/PDK1/Akt の活性化を橋渡しする新規足場蛋白である Aki1 に着目し、Aki1 が EGFR 阻害薬耐性の肺癌において新たな治療標的分子となりうるかどうかについて解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Aki1 が発現している EGFR 変異陽性肺癌細胞において Aki1 制御の生物学的な意義を明らかにするため、Aki1 遺伝子発現の抑制を siRNA 法、細胞増殖を MTT assay 法、Aki1 発現および下流シグナル伝達を Western blot 法、細胞アポトーシスを Western blot 法および FACS 法にて評価し、Aki1 遺伝子発現抑制が EGFR 変異を有する肺癌細胞に与える影響を *in vitro* の解析にて評価した。

(2) 重症免疫不全 (SCID) マウスを用いた *in vivo* において、siRNA 法による Aki1 発現阻害が腫瘍増殖抑制に与える効果について検討した。また、*in vivo* での腫瘍を用いて、Aki1 および関連蛋白の発現について Western blot 法にて評価した。

(3) 実際の EGFR 変異陽性肺癌患者の臨床検体を用いて、EGFR 治療薬の投与前および耐性後腫瘍における Aki1 の発現強度や発現頻度を免疫染色法により評価し、その臨床的意義について検討した。

4. 研究成果

(1) EGFR 変異を有する肺癌細胞における新規足場蛋白 Aki1 の機能解析

EGFR 変異を有する複数のヒト肺癌細胞 (PC-9, HCC827, H1975) は、ヒト肺線維芽細胞と比較して、Aki1 が強発現していた (図 1)。

これらの EGFR 変異を有する肺癌細胞では、EGF や IGF-1 などのリガンド刺激の有無に関

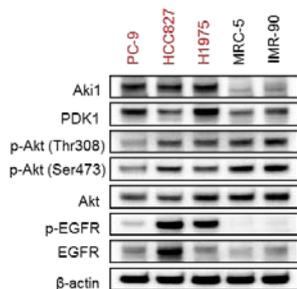


図1 EGFR変異肺癌細胞のAki1発現

わらず、Aki1 は EGFR/PDK1/Akt と複合体を形成していた。また、EGFR 変異肺癌では Aki1 遺伝子を siRNA 法にて発現抑制することにより、著明な細胞増殖抑制効果を示したが、ヒト肺線維芽細胞ではその影響はわずかであった (図 2)。さらに、EGFR 変異肺癌は Aki1 発現抑制により、Akt, S6 のリン酸化は抑制され、細胞アポトーシスの増加作用を示すことを Western blot 法および FACS 法にて確認した。

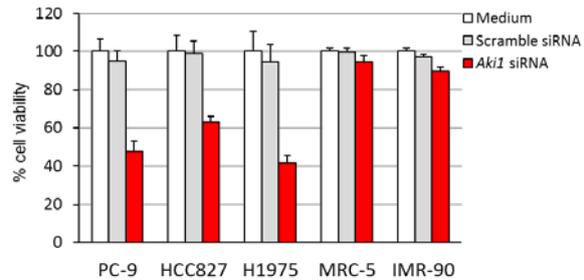


図2 Aki1発現抑制によるEGFR変異肺癌細胞の細胞増殖抑制効果

(2) EGFR 変異肺癌細胞の細胞増殖における EGFR および Aki1 阻害の比較、相加作用の検討

EGFR 変異肺癌の EGFR および Aki1 遺伝子を siRNA 法にて発現抑制したところ、Aki1 阻害は Driver oncogene である EGFR 阻害と同程度の細胞増殖抑制効果を認めた (図 3)。

さらに、EGFR 阻害薬に対する耐性 EGFR-T790M 変異を有する H1975 細胞では、耐性克服薬として期待される次世代型 EGFR 阻害薬に Aki1 抑制を加えることで、より強い細胞増殖の抑制効果を示した。

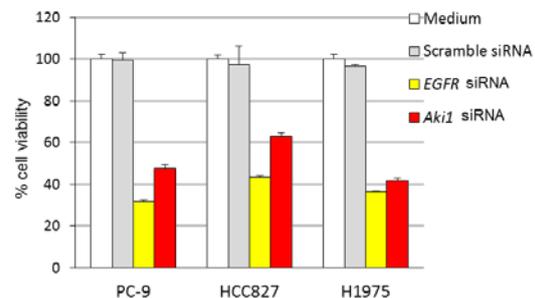


図3 EGFR、Aki1発現抑制によるEGFR変異肺癌細胞の細胞増殖抑制効果

(3) マウス異種移植モデルを用いた EGFR 変異肺癌細胞における Aki1 阻害の効果

EGFR 阻害薬に対する耐性 EGFR-T790M 変異を有する H1975 細胞を SCID マウスに皮下移植したモデルを用いて、Aki1 阻害の効果 *in vivo* で評価した。がん細胞を移植後 5、8 日目の 2 回、Aki1-siRNA を腫瘍内に投与し、腫瘍増大に与える影響を検討したところ、著明な腫瘍増殖抑制効果を確認した(図 4)。また、Aki1 発現阻害を行った腫瘍内の Aki1 およびリン酸化 S6 を Western blot 法にて検討し、それぞれの蛋白発現抑制を確認した。

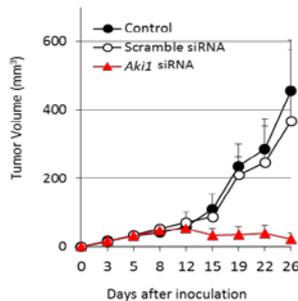


図4 EGFR変異肺癌細胞のAki1抑制による抗腫瘍効果 (in vivo)

(4) EGFR 変異を有する肺癌腫瘍における Aki1 発現の検討

EGFR 遺伝子変異を有する肺癌腫瘍 56 検体の Aki1 発現について免疫染色法にて検討した。EGFR 阻害薬投与前の感受性腫瘍では 39/42 腫瘍 (93%) で Aki1 発現を認めた。また、EGFR 阻害薬に対する自然耐性腫瘍 (7 腫瘍) および獲得耐性腫瘍 (7 腫瘍) では 14/14 腫瘍 (100%) に Aki1 発現を認めた(図 5)。

本研究は、耐性 EGFR-T790M 変異を含めた EGFR 遺伝子変異を有する複数の肺癌細胞を用いて、変異型 EGFR に恒常的かつ選択的に作用する新規足場蛋白 Aki1 の阻害が治療標的として有望であることを *in vitro* および *in vivo* で明らかにした (図 6)。

さらに興味深いことに、EGFR 遺伝子変異を有する肺癌の臨床検体において、EGFR 阻害薬投与前の感受性腫瘍のみならず、耐性後の腫瘍においても Aki1 の発現は高頻度にみられていた。今後は、この新規治療標的である Aki1 をどのように阻害し、創薬につなげていくかが課題であり、臨床応用を視野に入れた Aki1 の制御法の開発を目指した研究をさらに進めていきたい。

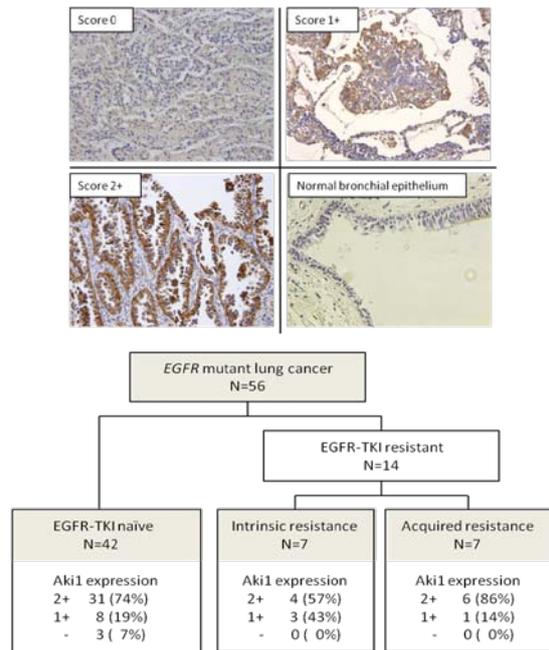


図5 EGFR変異肺癌腫瘍におけるAki1の染色性とその発現頻度

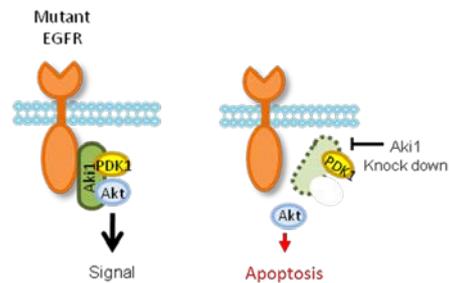


図6 EGFR変異肺癌細胞におけるAki1の役割

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 19 件)

- ① Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Yano S., Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR activating and gatekeeper mutations., *Oncogene*, 査読有, in press, 2012, DOI: 10.1038/onc.2012.446.
- ② Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Soda M, Mano H, Uenaka T, Yano S., Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and

ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells., Clin Cancer Res 18, 3592-3602, 2012, 査読有, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2972.

- ③ Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S., Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis., J Thorac Oncol 7, 1078-1085, 2012, 査読有, DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182519a2c.
- ④ Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S., Hepatocyte Growth Factor Induces Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody in Lung Cancer., J Thorac Oncol 7, 272-280, 2012, 査読有, DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182398e69.
- ⑤ Yamada T, Bando H, Takeuchi S, Kita K, Li Q, Wang W, Akinaga S, Nishioka Y, Sone S, Yano S., Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 antibody against multiple organ metastasis produced by GM2-expressing small cell lung cancer cells., Cancer Sci 102, 2157-2163, 2011, 査読有, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02093.x.
- ⑥ Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Tacheuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K, Yano S., EGFR ligands, Amphiregulin and Heparin-binding EGF-like Growth Factor Promote Peritoneal Carcinomatosis in CXCR4-expressing Gastric Cancer., Clin Cancer Res 17, 3619-3630, 2011, 査読有, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2475.

[学会発表] (計 16 件)

1. Yamada T, et al., Paracrine receptor ligands activate bypass tracts and cause ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells, 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference (oral presentation), 2012年11月27日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県)
2. 山田忠明ら, ALK 肺がんの Ligand による ALK 阻害薬耐性機構とその克服, 第 53 回日本肺癌学会総会(ワークショップ), 平成 24 年 11 月 8 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県)
3. 山田忠明ら, EGFR 遺伝子変異陽性肺がんにおける新規足場蛋白 Aki1 の制御, 第 71 回日本癌学会総会 (一般口演), 平成

24 年 9 月 20 日, ホテルロイトン札幌(北海道)

4. 山田忠明, 矢野聖二, 非小細胞肺がんにおける EGFR-TKI 耐性, 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術総会(シンポジウム), 平成 24 年 7 月 27 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
5. Yamada T, et al., Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis. 103th American Association for Cancer Research Annual Meeting (Poster), 2012. 4. 2, McCormick Place (USA)
6. Yamada T, Yano S, HGF/MET is a novel therapeutic target for EGFR-TKI resistant lung cancer, 第 70 回日本癌学会総会(International Session), 平成 23 年 10 月 5 日, 名古屋国際会議場(愛知県)
7. 山田忠明, 矢野聖二, Treatment for EGFR mutant lung cancer, 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術総会(シンポジウム), 平成 23 年 7 月 21 日, パシフィコ横浜(神奈川県)

[図書] (計 2 件)

1. 山田忠明, 矢野聖二, 羊土社, 実験医学, 2013 年, 33 頁~38 頁
2. 山田忠明, 矢野聖二, 羊土社, がん生物学 イラストレイテッド, 2011 年, 304 頁~309 頁

[その他]

ホームページ等

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 忠明 (YAMADA TADA AKI)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号: 00507048

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし