

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791462

研究課題名(和文) Hsp90阻害剤と放射線照射による新しい肺癌治療戦略

研究課題名(英文) The new strategy for lung cancer treatment by Hsp90 inhibitors and radiation therapy

研究代表者

山本 寛斉 (Yamamoto, Hiromasa)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40467733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hsp90阻害剤であるNVP-AUY922の肺癌細胞株に対する放射線増感作用および抗腫瘍効果を検討した。特に、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブに対し耐性化した肺癌細胞株に対して検討した結果、MET増幅またはT790M変異を耐性化の機構として持つ細胞株ではNVP-AUY922の放射線増感作用および抗腫瘍効果を認めた。一方、癌幹細胞様の特質により耐性化した細胞株ではNVP-AUY922の放射線増感作用および抗腫瘍効果は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the radiosensitizing effect of Hsp90 inhibitor, NVP-AUY922 (AUY), on NSCLC cell lines harboring EGFR activating mutations and showing acquired resistance to EGFR-TKIs via any of several mechanisms. AUY was more effective against the gefitinib-resistant sublines with T790M mutation and MET amplification than against the parental cell lines, although the subline with stem cell-like properties showed more than a 10-fold higher resistance to AUY than the parental cell line. AUY exerted a significant radiosensitizing effect on the parental cell line and the MET-amplified subline through inducing G2/M arrest and inhibition of non-homologous end joining (NHEJ). In contrast, the radiosensitizing effect of AUY was limited on the subline with stem cell-like properties, in which it did not induce G2/M arrest or inhibition of NHEJ.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：原発性肺癌 Hsp90阻害剤 放射線治療 EGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦の癌死の第1位であり、予後不良の疾患である。そのため新規治療法の開発が大きな課題である。近年、肺癌におけるEGFRと関連遺伝子異常の存在が明らかとなり、これらの異常は下流の分子であるAKTの活性化に強く関与することが判明した(Yamamoto et al. Cancer Res. 2008)。EGFR変異を有する肺癌は、本邦肺腺癌の約40%を占める。ゲフィチニブなどのEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)はEGFR変異肺癌の約80%に有効であるが、最終的に耐性となることが多く、肺癌治療上の問題となっている。

Heat shock protein 90 (以下、「Hsp90」という)は、AKTなど癌で鍵となる多くのシグナル伝達蛋白の安定化に関与しており、Hsp90阻害剤は癌治療薬として開発が進んでいる。さらに、Hsp90阻害剤は放射線の増感作用が報告されている。Hsp90のクライアント蛋白であるhypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は放射線抵抗性因子でありHsp90の存在を必要とする。また放射線照射後のHIF-1の合成にはAKTの活性化が関与しており、HIF-1、AKT、変異EGFRを全てHsp90阻害剤が抑制する。以上を踏まえると、Hsp90阻害剤はEGFR/AKT活性型肺癌に対する放射線治療の際、強力な増感剤となる可能性が考えられるため、放射線治療への応用が期待できる。

一方、EGFR遺伝子変異陽性肺癌ではEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の効果が顕著であるが、やがて耐性化を引き起こすため、耐性化後の治療法は大きな課題である。体制化のメカニズムについては、EGFR T790M変異が約半数を占め、その他にMET遺伝子増幅や、癌幹細胞様の特徴の獲得などが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は肺癌におけるHsp90阻害剤と放射線の併用時の抗腫瘍効果の機序について検討し、肺癌における新しい治療法を確立することを目的とする。特に、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性化後の肺癌に対する治療として、Hsp90阻害剤と放射線治療の併用療法が応用出来るかどうかの可能性を検討する。

3. 研究の方法

肺癌細胞株において、2種類のHsp90阻害剤単独、放射線単独および併用療法による抗腫瘍効果を放射線照射後コロニー形成生存アッセイ、MTSアッセイなどで検証し、

放射線増感細胞株と非増感細胞株を決定する。

EGFR遺伝子変異を持つ肺癌細胞株HCC827及びPC-9と、それらから樹立したEGFR-TKI (gefitinib) に対する耐性を示す細胞株 HCC827-GRmet (MET増幅)、HCC827-GRstem (癌幹細胞様の特徴)、PC-9-GRt790m (T790M変異) を使用し、Hsp90阻害剤単独及び放射線治療との併用療法の効果を評価する。

腫瘍細胞におけるDNA修復能を評価するために、ヒストン蛋白によるリン酸化を免疫染色により評価する。

各々の細胞群でAKT、HIF-1とDNA修復蛋白群の活性化の程度を評価する。また免疫沈降法を用いてHsp90との直接的な関連性を検証して放射線増感作用機序を解明する。また*in vitro*と*in vivo*で併用療法治療スケジュールを検討し、肺癌、特にAKT活性型肺癌に対するHsp90阻害剤と放射線併用療法の確立を目指す。

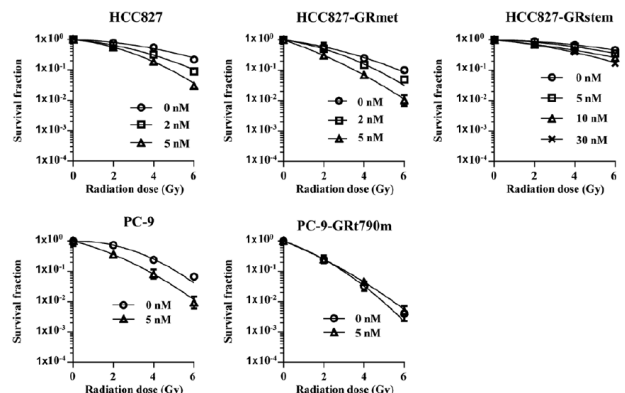


図1. EGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株(親株とその耐性株)における放射線治療とHsp90阻害剤(NVP-AUY922)の併用による効果

4. 研究成果

本研究は肺癌におけるHsp90阻害剤と放射線の併用時の抗腫瘍効果の機序について検討し、肺癌における新しい治療法を確立することを目的として行った。

平成24年度は、EGFR変異肺癌細胞株PC9, H1975, H3255, KRAS変異肺癌細胞株H358, A549, PIK3CA変異肺癌細胞株H460, AKT活性化を示さない肺癌細胞株H1299, H838の8株を使用して、2種類のHsp90阻害剤(17-DMAG, NVP-AUY922)に対してHsp90阻害剤単独・放射線単独・両者の併用による抗腫瘍効果をMTSアッセイ・コロニー形成アッセイで評価し、放射線増感作用および非増感作用を示す細胞株群の同定を行った。

平成 25 年度は、EGFR 変異肺癌細胞株 HCC827, PC-9 と、それぞれより作成した EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (gefitinib) に対する耐性株 (HCC827-GRmet, HCC827-GRstem, PC-9-GRt790m) を用いて Hsp90 阻害剤 NVP-AUY922 の抗腫瘍効果を、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤耐性株とその親株との差に注目して評価し、さらに放射線療法との併用による抗腫瘍効果も検討した。Hsp90 阻害剤は耐性株 (HCC827-GRmet, PC-9-GRt790m) においても抗腫瘍効果を示し放射線増感作用も認めたが、癌幹細胞様の性質を持った耐性株 (HCC827-GRstem) においては抗腫瘍効果・放射線増感作用ともに乏しかった。(図 1、表 1)

表1. Hsp90阻害剤であるNVP-AUY922のEGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株(親株とその耐性株)に対する増殖抑制効果

Cell lines	Resistant mechanism	IC <sub>10</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)
HCC827	-	2.5	21.0
HCC827-GRmet	<i>MET</i> amplification	2.7	7.0
HCC827-GRstem	Stem cell-like features	14.0	402.0
PC-9	-	2.8	9.1
PC-9-GRt790m	T790M mutation	2.9	6.7

IC<sub>10</sub> and IC<sub>50</sub>, 10% and 50% inhibitory concentration values.

最終年度では、Hsp90 阻害剤単独治療群・放射線単独治療群・併用療法群について、腫瘍細胞における DNA 修復能を評価した。具体的には、ヒストン蛋白 gamma-H2AX のリン酸化を免疫染色により評価した。HCC827 および HCC827-GRmet では併用療法群で腫瘍細胞における DNA 修復能の低下を認めたが、HCC-827-GRstem では DNA 修復能の低下を認めなかった。また、Hsp90 阻害剤の抗腫瘍効果を、細胞周期にも注目して検討した。HCC827 および HCC827-GRmet では併用療法群で G2/M arrest を認めたが、HCC-827-GRstem では認めなかった(図 2、図 3)。

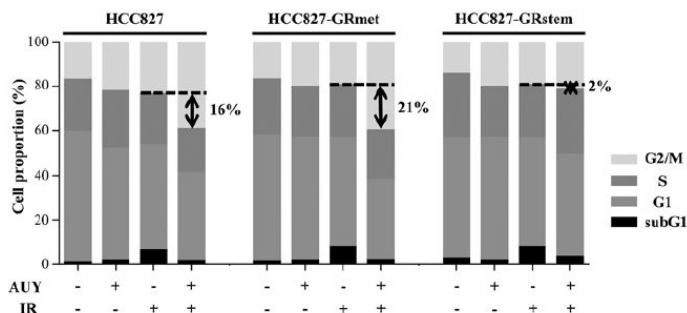


図2. 放射線治療とHsp90阻害剤(NVP-AUY922)の併用によるEGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株(親株とその耐性株)の細胞周期への影響

以上の結果を踏まえ、研究成果を Oncology Reports 誌に投稿し、掲載された (Hashida and Yamamoto et al. Oncol Rep 2015 33:1499-1504)。

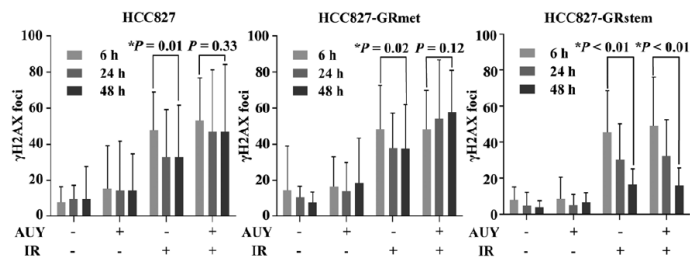


図3. EGFR遺伝子変異陽性肺癌細胞株(親株とその耐性株)における放射線照射後のDNA二本鎖切断の回復

### 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. Hashida S, Yamamoto H, Shien K, Ohtsuka T, Suzawa K, Maki Y, Furukawa M, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Miyoshi S, Kanazawa S, Toyooka S. Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances the radiation sensitivity of lung cancer cell lines with acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. Oncol Rep 2015, 33:1499-1504. (査読有り) DOI: 10.3892/or.2015.3735

[学会発表](計 1件)

1. Yuho Maki, Shinsuke Hashida, Hiromasa Yamamoto, Kazuhiko Shien, Tomoaki Ohtsuka, Ken Suzawa, Masashi Furukawa, Junichi Soh, Hiroaki Asano, Kazunori Tsukuda, Shinichiro Miyoshi, Susumu Kanazawa, Shinichi Toyooka. Effect of Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 with radiation on lung adenocarcinoma cell lines with acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. AACR Annual Meeting 2015 (Apr 19, 2015, Philadelphia, PA, USA)

[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：  
出願年月日：  
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

山本 寛斉 (YAMAMOTO, Hiromasa)  
岡山大学・大学病院・助教  
研究者番号：40467733

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし