

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09229

研究課題名(和文)代謝経路に基づいた肺癌個別化治療の開発

研究課題名(英文)Precision medicine based on metabolic pathways in lung cancer

研究代表者

副島 研造 (Soejima, Kenzo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：30236145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌組織と非癌部組織のメタボローム解析による包括的な代謝パターンの比較により、乳酸などの解糖系の代謝産物や核酸代謝物および分岐鎖アミノ酸が癌組織で上昇していることを明らかにした。さらに2種類の標的の異なる血管新生阻害薬を用いた肺癌組織での代謝への影響をImaging mass-spectrometry法により検討し、癌組織の代謝に及ぼす影響が両者でまったく異なることを明らかにした。一方、高濃度酸素暴露がAMPK経路の活性化を介して肺癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示すことを見だし、治療への応用可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive analysis of metabolic pattern in lung cancer tissues and normal tissues using capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) and imaging MS revealed that metabolites derived from glycolysis such as lactate, nucleic acid metabolites and branched chain amino acids were increased in the cancer tissues compared to the normal counterparts. Visualization of metabolites distribution by imaging MS revealed that 2 different kind of anti-angiogenic inhibitors, namely bevacizumab and nintedanib demonstrated distinct metabolic patterns despite both showed potent anti-tumor effect. We also identified anti-tumor effect of hyperoxia in lung cancer cell lines via activation of AMPK pathway, suggesting the possibility of clinical application of exposure to hyperoxia in lung cancer patients.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：がん代謝 メタボローム解析 肺がん Imaging MS 高濃度酸素暴露 Bevacizumab Nintedanib AMPK

1. 研究開始当初の背景

今までに開発されてきた多くの殺細胞性抗癌剤は、癌細胞が正常細胞に比べて増殖が速いという細胞周期を標的とした抗癌剤が多数を占め、近年は多くの分子標的治療薬も開発されてきている。しかし、これだけ多くの抗癌剤が開発されてきたにも関わらず、依然として肺癌患者の予後は極めて不良であり、今後肺癌患者の予後を改善するためには新たな分野の治療法の創出が求められている。ここ数年間で、The Cancer Genome Atlas (TCGA) などにより癌の網羅的遺伝子変異検索が行われ、既知の EGFR や KRAS などの癌遺伝子の異常が数多く報告されたが、同時に大変興味深いことに、肺癌を含む多くの癌において代謝に関わる多くの遺伝子の変異も報告された (Kandoth, Nature, 2013)。現在盛んに癌細胞の代謝研究が行われてきており、p53 や RB など癌抑制遺伝子が癌細胞の代謝に与える影響 (Bensaad, Cell, 2006, Tanaka, PNAS, 2010) などが一部解明されてきているが、まだまだ未解明な部分が多いのが現状である。

肺癌の発生および増殖においては、いくつかの癌遺伝子と癌抑制遺伝子の異常の関与が重要であることはよく知られたことであり、p53 や RB などの癌抑制遺伝子の異常が代謝に様々な影響を及ぼしていることが明らかとなってきたように、EGFR、EML4-ALK や KRAS などの driver oncogene の変異も代謝に大きな影響を及ぼしていることが予想される。EGFR や EML4-ALK については、それらの阻害剤であるチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) により高い治療効果が得られてはいるものの、耐性化の問題が存在し、また KRAS 変異については未だ有効な薬剤は開発されていないのが現状である。一方分子標的薬を含む種々の抗腫瘍薬においては、個々の腫瘍が有する代謝パターンの違いがそれぞれの薬剤の感受性を規定している可能性があり、新たな代謝系バイオマーカー開発により個別化治療に繋がることを期待される。

2. 研究の目的

本研究においては、正常気道細胞と肺癌細胞、および癌細胞における遺伝子異常の差異による代謝の違いから、癌治療の標的となる代謝経路あるいは代謝因子を同定し、代謝を標的とする治療法を創出すること、さらに種々の薬剤の感受性に関与する代謝パターンを同定し、新たなバイオマーカーを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

代謝パターンおよび代謝因子の評価としては、基本的に①Flux Analyzer を用いた解糖系、酸化的リン酸化の活性の評価、②キャピラリー電気泳動質量分析法 (CE-MS; Capillary electrophoresis Mass Spectrometry) および③Imaging MS を用いたメタボローム解析により行った。

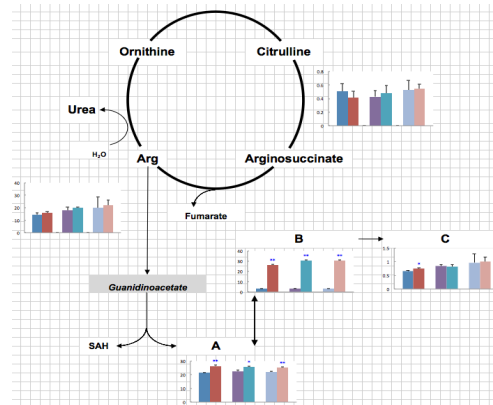
肺癌細胞株は、当研究室に保有する種々の遺伝子変異を有する細胞株を含む非小細胞肺癌株 (PC9、PC9-ER、BID007、H3122、H1975、HCC827、A549、Calu-3、SK-MES-1、SK-LU-1、H358) および小細胞肺癌株 (H146) を用いた。

肺癌組織および正常肺組織は、当院呼吸器外科で行われる肺癌手術症例で癌部組織と非癌部組織を pair で保存する慶應肺癌バイオバンク Keio Lung Cancer BioBank (KLCBB) の検体を用いた。

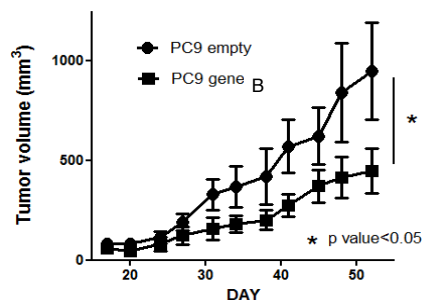
4. 研究成果

(1) 異なる遺伝子変異に基づく特異的な代謝因子の同定と機能解析

EGFR 遺伝子変異 (Exon19 Del) を有する肺癌細胞株である PC9 と PC9 に二次変異 (T790M) による耐性化を獲得した細胞株である PC9ER に対し、メタボローム解析を行った。Flux Analyzer の解析は、PC9ER 細胞においては明らかにミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が低下していた。また CE-MS を用いた検討により、尿素の産生経路に関与する代謝因子 (下図中の B, creatin) は、PC9ER では PC9 に比べて、約 10 倍の濃度で存在していた。

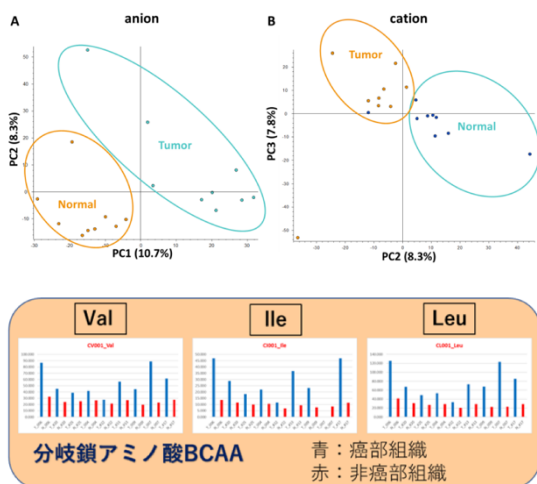


PC9ER においては PC9 と比較して明らかに腫瘍増殖速度が低いことが示されていることから、PC9 に creatin 遺伝子を導入し PC9B を作成し PC9 と PC9B をマウスの皮下に移植したところ、PC9B においては PC9 と比較して明らかに腫瘍増殖が抑制され、代謝酵素を用いた治療薬開発の可能性が示唆された。

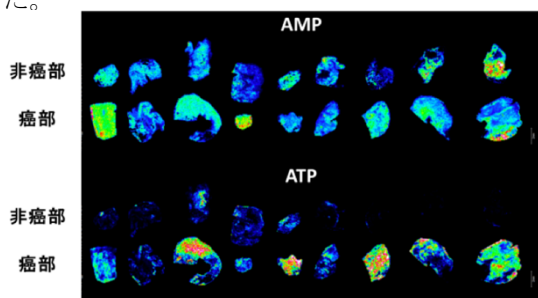


(2) 肺癌臨床検体を用いた包括的メタボローム解析

KLCBB 検体 9 症例に対して、CE-MS および Imaging MS によるメタボローム解析を行った。CE-MS で得られた代謝産物の定量データを主成分解析した所、癌部組織・非癌部組織で代謝特性が明らかに異なっていた。また癌部組織では非癌部組織と比較して解糖系、グルタミン代謝、核酸代謝が亢進し、さらに糖スクレオチド、バリン(Val)、ロイシン(Ile)、イソロイシン(Leu)などの分岐鎖アミノ酸 Branched Chain Amino Acids(BCAA)が上昇していた。

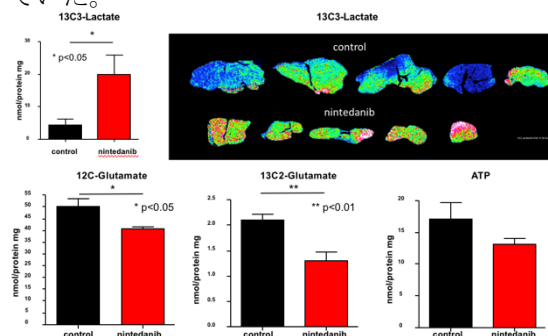


Imaging MS により、実際に癌組織において核酸代謝が不均一に上昇していることが示された。

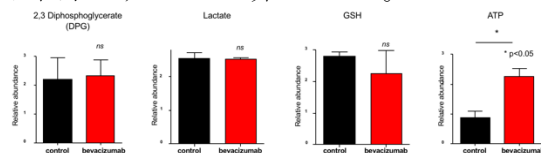


(3) 血管新生阻害剤が肺癌細胞の代謝に及ぼす影響の検討

Nintedanib、bevacizumab とともに肺癌細胞株に対して、in vivo で血管新生を抑制し抗腫瘍効果を認めた。しかし、Flux Analyzer、CE-MS および Imaging MS を用いた解析では、nintedanib においては腫瘍内の解糖系代謝が亢進し、好気性代謝が減少して ATP が低下していた。

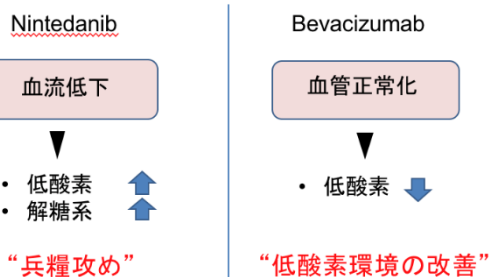


一方、bevacizumab においては腫瘍への血流は低下せず ATP が上昇していた。



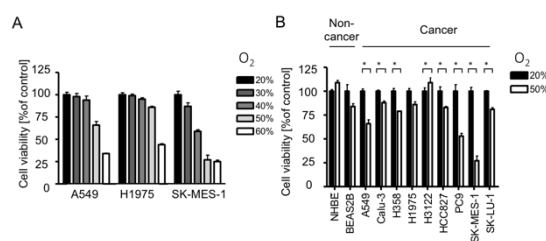
以上のことから、同じ血管新生阻害薬である nintedanib と bevacizumab においては、下図のようにそれぞれ異なる機序により抗腫瘍効果を発揮していることが明らかとなった。

血管新生阻害薬の作用機序の違い

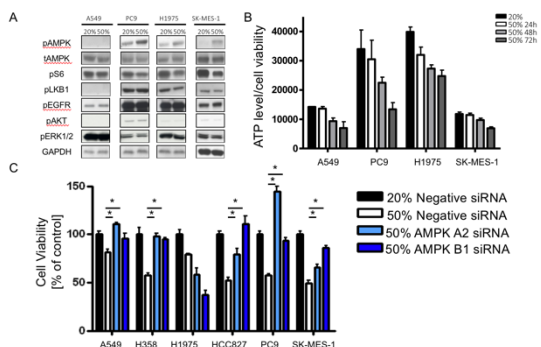


(4) 高濃度酸素曝露が肺癌の増殖に与える影響とその分子メカニズムの解明

種々の肺癌細胞株および正常気道上皮細胞に対する高濃度酸素曝露において、50%高濃度酸素曝露で癌細胞特異的に増殖抑制効果が認められた。

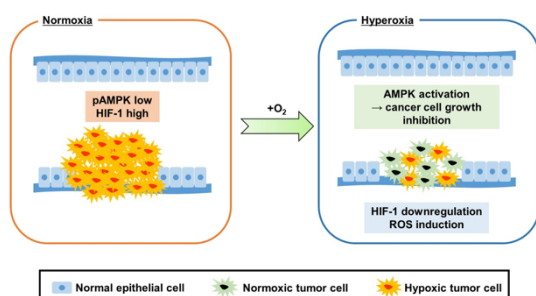


cDNA マイクロアレイを用いたパスウェイ解析により、50%酸素曝露において癌細胞特異的に AMPK 経路が活性化されていることが示唆され、実際 50%酸素曝露によりウェスタンブロットで pAMPK の上昇、ATP レベルの低下、さらに AMPK の siRNA により細胞増殖抑制が介助されることが確認された。



さらに FGF9 強制発現による肺癌マウスモデルにおいても、50%酸素曝露による pAMPK 上昇と増殖マーカーである PCNA 陽性細胞の

有意な減少を確認した。以上のことから高濃度酸素が肺癌治療に臨床応用できる可能性が示唆された。



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 23 件)

- ① Hirano T, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Niimi T, Mimasu S, Sakagami H, Soejima K, Betsuyaku T. Pharmacological and Structural Characterizations of Naquotinib, a Novel Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther.* 査読有り. 2018;17(4):740-750. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1033.
- ② Kameyama N, Chubachi S, Hegab AE, Yasuda H, Kagawa S, Tsutsumi A, Fukunaga K, Shimoda M, Kanai Y, Soejima K, Betsuyaku T. Intermittent Exposure to Cigarette Smoke Increases Lung Tumors and the Severity of Emphysema More Than Continuous Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 査読有り. 2018. doi: 10.1165/rcmb.2017-0375OC.
- ③ Kobayashi K, Nakachi I, Naoki K, Satomi R, Nakamura M, Inoue T, Tateno H, Sakamaki F, Sayama K, Terashima T, Koh H, Abe T, Nishino M, Arai D, Yasuda H, Kawada I, Soejima K, Betsuyaku T; Keio Lung Oncology Group (KLOG). Real-world Efficacy and Safety of Nivolumab for Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Retrospective Multicenter Analysis. *Clin Lung Cancer.* 査読有り. 2018;19(3):e349-e358. doi: 10.1016/j.clcc.2018.01.001.
- ④ Masuzawa K, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T. Characterization of the efficacies of osimertinib and nazartinib against cells expressing clinically relevant epidermal growth factor receptor mutations. *Oncotarget.* 査読有り. 2017;8(62):105479-105491. doi: 10.18632/oncotarget.22297.
- ⑤ Hamamoto J, Yasuda H, Aizawa K, Nishino M, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Betsuyaku T, Soejima K. Non small cell lung cancer PC9 cells exhibit increased sensitivity to gemcitabine and vinorelbine upon acquiring resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncol letters.* 査読有り. 2017;14: 3559-3565. DOI: 10.3892/ol.2017.65916.
- ⑥ Nishino M, Ozaki M, Hegab AE, Hamamoto J, Kagawa S, Arai D, Yasuda H, Naoki K, Soejima K, Saya H, Betsuyaku T. Variant CD44 expression is enriching for a cell population with cancer stem cell-like characteristics in human lung adenocarcinoma. *J Cancer.* 査読有り. 2017;8(10):1774-1785. doi: 10.7150/jca.19732.
- ⑦ Yotsukura M, Yasuda H, Shigenobu T, Kaseda K, Masai K, Hayashi Y, Hishida T, Ohtsuka T, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T, Asamura H. Clinical and pathological characteristics of EGFR mutation in operable early-stage lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 査読有り. 2017;109:45-51. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.04.014.
- ⑧ Miyawaki M, Naoki K, Yoda S, Nakayama S, Satomi R, Sato T, Ikemura S, Ohgino K, Ishioka K, Arai D, Namkoong H, Otsuka K, Miyazaki M, Tani T, Kuroda A, Nishino M, Yasuda H, Kawada I, Koh H, Nakamura M, Terashima T, Sakamaki F, Sayama K, Betsuyaku T, Soejima K. Erlotinib as second- or third-line treatment in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: Keio Lung Oncology Group Study 001 (KLOG001). *Mol Clin Oncol.* 査読有り. 2017;6(3):409-414. doi: 10.3892/mco.2017.1154.
- ⑨ Kuroda A, Hegab AE, Jingtao G, Yamashita S, Hizawa N, Sakamoto T, Yamada H, Suzuki S, Ishii M, Namkoong H, Asakura T, Ozaki M, Yasuda H, Hamamoto J, Kagawa S, Soejima K, Betsuyaku T. Effects of the common polymorphism in the human aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene on the lung. *Respir Res.* 査読有り. 2017;18(1):69. doi: 10.1186/s12931-017-0554-5.
- ⑩ Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Matsumoto S, Mimaki S, Ikemura S, Goto K, Betsuyaku T, Soejima K. Amplification of EGFR wild type alleles in non-small cell lung cancer cells confers acquired resistance to mutation-selective EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* 査読有り. 15;77(8):2078-2089, 2017. pii: canres.2359.2016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2359.
- ⑪ Soejima K, Yasuda H, Hirano T. Osimertinib for EGFR T790M Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 査読有り. 2017;10(1):31-38. doi: 10.1080/17512433.2017.1265446.
- ⑫ Miyawaki M, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Nukaga S,

- Hirano T, Kawada I, Naoki K, Hayashi Y, Betsuyaku T, Soejima K. Overcoming EGFR bypass signal-induced acquired resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors in ALK-translocated lung cancer. *Mol Cancer Res*. 査読有り. 2017;15(1):106-114. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0211.
- ⑬ Tani T, Naoki K, Asakura T, Hirano T, Suzuki S, Masuzawa K, Hasegawa H, Kuroda A, Yasuda H, Ishii M, Soejima K, Betsuyaku T. Successful treatment of non-small-cell lung cancer with afatinib and a glucocorticoid following gefitinib- and erlotinib-induced interstitial lung disease: A case report. *Mol Clin Oncol*. 査読有り. 2016;5(4):488-490.
- ⑭ Tani T, Yasuda H, Hamamoto J, Kuroda A, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Miyawaki M, Kawada I, Naoki K, Hayashi Y, Betsuyaku T, Soejima K. Activation of EGFR bypass signaling by TGF α overexpression induces acquired resistance to alectinib in ALK-translocated lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 査読有り. 2016 ;15(1):162-71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0084.
- ⑮ Booka E, Imamura CK, Takeuchi H, Hamamoto Y, Gomi D, Mizukami T, Ichiyama T, Tateishi K, Takahashi T, Kawakubo H, Soejima K, Boku N, Tanigawara Y, Kitagawa Y. Development of an S-1 dosage formula based on renal function by a prospective pharmacokinetic study. *Gastric Cancer*. 査読有り. 2016;19(3):876-86. doi: 10.1007/s10120-015-0536-6.
- ⑯ Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, Arai D, Nukaga S, Miyawaki M, Kawada I, Naoki K, Costa DB, Kobayashi SS, Betsuyaku T, Soejima K. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 査読有り. 2015;6(36):38789-803. doi: 10.18632/oncotarget.5887.
- ⑰ Sato T, Soejima K, Arai E, Hamamoto J, Yasuda H, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Naoki K, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Kanai Y and Betsuyaku T. Prognostic implication of PTPRH hypomethylation in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 査読有り. 2015;34(3):1137-45. doi: 10.3892/or.2015.4082.
- ⑱ Hegab AE, Arai D, Gao J, Kuroda A, Yasuda H, Ishii M, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T. Mimicking the niche of lung epithelial stem cells and characterization of several effectors of their in vitro behavior. *Stem Cell Res*. 査読有り. 2015;15(1):109-121. doi: 10.1016/j.scr.2015.05.005.
- ⑲ Soejima K, Naoki K, Ishioka K, Nakamura M, Nakatani R, Kawada I, Watanabe H, Nakachi I, Yasuda H, Satomi R, Nakayama S, Yoda S, Ikemura S, Terai H, Sato T, Ohgino K, Arai D and Betsuyaku T. A phase II study of biweekly paclitaxel and carboplatin in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有り. 2015 ;75(3):513-9. doi: 10.1007/s00280-014-2673-8.
- ⑳ Ikemura S, Naoki K, Yasuda H, Kawada I, Yoda S, Terai H, Sato T, Ishioka K, Arai D, Ohgino K, Kamata H, Miyata J, Kabata H, Betsuyaku T and Soejima K. A phase II study of S-1 and irinotecan combination therapy in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 査読有り. 2015;45(4):356-61. doi: 10.1093/jcco/hyu226.
- 21 Hamamoto J, Soejima K, Naoki K, Yasuda H, Hayashi Y, Yoda S, Nakayama S, Satomi R, Terai H, Ikemura S, Sato T, Arai D, Ishioka K, Ohgino K and Betsuyaku T. Methylation-induced down-regulation of *TFPI-2* causes *TMPRSS4* overexpression and contributes to oncogenesis in a subset of NSCLC. *Cancer Sci*. 査読有り. 106(1): 34-42, 2015. doi: 10.1111/cas.12569.
- 22 Arai D, Hegab AE, Soejima K, Kuroda A, Ishioka K, Yasuda H, Naoki K, Kagawa S, Hamamoto J, Yin Y, Ornitz DM, Betsuyaku T. Characterization of the “cell of origin” and “propagation potential” of the FGF9-induced lung adenocarcinoma mouse model. *J Pathol*. 査読有り. 235(4): 593-605, 2015. doi: 10.1002/path.4486.
- 23 Nakayama S, Soejima K, Yasuda H, Yoda S, Satomi R, Ikemura S, Terai H, Sato T, Yamaguchi N, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Naoki K and Betsuyaku T. *FOXD1* Expression is Associated with Poor Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 査読有り. 35(1): 261-8, 2015.
- [学会発表] (計6件)
- ① 増澤啓太, 荒井大輔, 安田浩之, 額賀重成, 川田一郎, 猶木克彦, 江本桂, 杉浦悠毅, 末松誠, 副島研造, 別役智子. 肺癌における血管新生阻害剤の効果評価. 第76回日本癌学会学術総会. 2017年
- ② 浜本純子, 副島研造, 安田浩之, 仲地一郎, 長谷川華子, 増澤啓太, 小林慧悟, 眞鍋維志, 川田一郎, 猶木克彦, 別役智子. 高濃度酸素が肺癌の増殖及に与える影響とその分子メカニズム. 第58回日本肺癌学会学術集会. 2017年
- ③ 浜本純子, 安田浩之, 増澤啓太, 小林慧悟, 猶木克彦, 副島研造, 別役智子. 肺癌治療としての高濃度酸素. 第76回日本癌学会学術総会. 2017年
- ④ Daisuke Arai, Hiroyuki Yasuda, Kenzo Soejima, Shizuko Kagawa, Junko

Hamamoto, Shigenari Nukagal, Katsuhiko Naoki, Katsura Emoto, Yuki Sugiura, Makoto Suematsu, Tomoko Betsuyaku. Visualizing the distribution of metabolites and the efficacy of BIBF1120 on metabolic status of lung cancer derived tumors by imaging mass-spectrometry (MS). 106th AACR Annual Meeting, 2016.

- ⑤ Junko Hamamoto, Hiroyuki Yasuda, Ichiro Nakachi, Michael G. Edwards, Masayoshi Miyawaki, Makoto Nishino, Aoi Kuroda, Tetsuo Tani, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Ichiro Kawada, Katsuhiko Naoki, Tomoko Betsuyaku, Kenzo Soejima. Hyperoxia may be a treatment option for NSCLC. 105th AACR Annual Meeting, 2015.
- ⑥ Daisuke Arai, Kenzo Soejima, Hiroyuki Yasuda, Kota Ishioka, Shizuko Kagawa, Junko Hamamoto, Katsuhiko Naoki, Katsura Emoto, Yuki Sugiura, Makoto Suematsu, Tomoko Betsuyaku. Visualizing the effect of BIBF1120 in lung cancer cells by imaging-massspectrometry (MS). 105th AACR Annual Meeting, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

副島 研造 (SOEJIMA, Kenzo)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30236145

(2) 研究分担者

安田 浩之 (YASUDA, Hiroyuki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70365261

浜本 純子 (HAMAMOTO, Junko)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：40570239

(3) 連携研究者

菱木 貴子 (HISHIKI, Takako)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10338022