

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501363

研究課題名(和文) 網羅的キナーゼ活性プロファイリングによるがん治療標的の探索研究

研究課題名(英文) Cancer therapeutic target identification by comprehensive kinase profiling

研究代表者

洪 泰浩 (Koh, Yasuhiro)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80426519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：前臨床モデルとして、スキルス胃癌細胞株と非スキルス胃癌細胞株におけるチロシンキナーゼ活性の違いについて解析を行い、スキルス胃癌に特異的なキナーゼ活性プロファイルを同定した。肺癌におけるモデル試験として、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの3剤でのキナーゼ活性プロファイリング差異を観察し、阻害プロファイルに大きな違いがあることが明らかになった。臨床検体を用いた検討については、小細胞肺癌の腫瘍組織と正常組織から抽出したタンパク質を用いて、ペプチドマイクロアレイによるチロシンキナーゼ活性測定プロファイリングを行い、新規の治療標的候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we incorporated peptide microarray system to evaluate the kinase activities of cancer cells and tissues for novel therapeutic targets and predictive biomarker identification.

Kinase activity signature specific to scirrhous-type gastric cancer were successfully identified using non-scirrhous and scirrhous gastric cancer cell lines according to basal kinase activities of tyrosine kinases. Moreover scirrhous gastric cancer cells were sensitive to multikinase inhibitors. Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors, gefitinib, erlotinib and afatinib were compared using EGFR-mutant and negative cell lines and inhibition profiles turned out to be very different among three inhibitors. In clinical study using tumor and normal tissues from small-cell lung cancer patients, novel therapeutic targets were successfully identified. Src inhibition was suggested to be novel therapeutic strategy for small-cell lung cancer.

研究分野：分子標的治療

キーワード：分子標的治療

### 1. 研究開始当初の背景

(1) スキルス胃がん及び非小細胞肺がんは進行病期においては薬物治療が選択されるが、その効果は十分ではない。またその生物学的特性も未解明である部分が多い。しかし近年、胃がんにおける HER2 や一部の肺腺がんにおける EGFR 等を標的とした分子標的治療の有効性が確立されたことより、これらチロシンキナーゼを標的とした分子標的薬剤開発に大きな期待が持たれている。

(2) 新規分子標的薬剤開発のための治療標的の探索においては、がんにおいて活性化しているシグナル伝達経路および分子の解明が急務となっている。治療標的となる分子の多くはチロシンキナーゼおよびセリン・スレオニンキナーゼであり、これらの活性をタンパクレベルで正確に測定することが非常に重要である。

### 2. 研究の目的

(1) 難治性がんであるスキルス胃がん及び非小細胞肺がん細胞株において、チロシンキナーゼ活性プロファイルの網羅的解析を可能とする peptide micro-array を用いて、網羅的チロシンキナーゼおよびセリン・スレオニンキナーゼ活性プロファイリングに基づいた分子標的薬剤効果予測モデルを構築する。

(2) 細胞株を用いた前臨床での検討を踏まえ、臨床検体を用いて網羅的にチロシンキナーゼおよびセリン・スレオニンキナーゼの活性プロファイルを明らかにする。腫瘍において恒常的な活性を認めるキナーゼ分子を明らかにすることで、新規の治療標的の同定を行い、薬剤開発への橋渡しとなる基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) 胃がん細胞株を用いた検討を行う。スキルス胃がん及び非スキルス胃がん 25 種の細胞株を用いて、チロシンキナーゼおよびセリン・スレオニン活性プロファイルの比較を行い、特異的に活性化されているシグナル伝達経路を同定するとともに、キナーゼを標的とする分子標的薬剤における効果予測モデルの構築を行う。

(2) EGFR 変異及び野生型の非小細胞肺がん細胞株を用いて、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの 3 剤によるチロシンキナーゼ活性阻害プロファイルの違いを検討するとともに、それぞれの阻害剤に特異的な効果予測バイオマーカーの同定を目指す。

(3) 胃癌患者と肺癌患者より採取した検体を用いて、チロシンキナーゼおよびセリン・スレオニン活性を測定し、生物学的特性を明

らかにする。腫瘍組織と正常組織をペアで採取し、活性プロファイルにおける差異を検出する。アッセイ手法は細胞株と同様に peptide micro-array システムを用いる。臨床情報との統合的な解析を行い、診断、予後、薬剤感受性との関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) スキルス胃がんの特異的なキナーゼ活性を同定するために、11 種類のスキルス胃がん細胞株及び 14 種類の非スキルス胃がん細胞株からなる 25 種の胃がん細胞株を用いて、ペプチドマイクロアレイシステム(図 1)にてチロシンキナーゼおよびセリン・スレオニンキナーゼ活性プロファイルの比較を行った。その結果を orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA)法にて統計解析を行い、スキルス胃がん、特に signet ring cell タイプにおいては、EGFR, ERBB2, 3, 4, EPHAs, FAK, IGF1R, INSR, MAP2Ks, RET および SRC 等におけるキナーゼ活性が、非スキルス胃がんと比較した場合に有意に異なるというデータを得た。これらキナーゼの活性を測定することで、スキルス胃がんの診断につながる可能性があるとともに、スキルス胃がんの薬物治療における標的となる可能性があると考えられる。

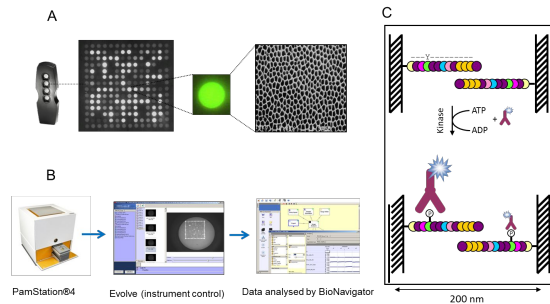


図 1 . ペプチドマイクロアレイシステム

加えて、チロシンキナーゼを標的とした分子標的治療における効果予測モデルを構築するため、EGFR、HER2、VEGFR、FGFR、c-Kit、Ret、Raf 等に対するマルチ・チロシンキナーゼ阻害剤 (MTKI) の効果予測バイオマーカーの検討を実施した。MTKI としてスニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブの 3 剤を用いて、11 種類のスキルス胃がん細胞株及び 14 種類の非スキルス胃がん細胞株のそれらマルチキナーゼ阻害剤に対する感受性 (増殖抑制効果) の評価を行い、増殖抑制効果において各阻害剤の差異を認めた (図 2)。具体的にはパゾパニブが増殖抑制効果において最も選択性が高い結果を示した。次に、ソラフェニブ、スニチニブ及びパゾパニブについて、ペプチドマイクロアレイを用いての各阻害剤の有無による各種キナーゼの阻害レベルの評価を行い、heatmap 解析を実施した (図 3)。その結果、高感受性細胞株においては FGFR2 のキナーゼ活性の亢進が認められ、ウエスタ

ンプロット法にても FGFR2 の高発現およびリン酸化が亢進していることを確認した。これらの結果より、FGFR2 の高発現および活性化状態が上記のマルチキナーゼ阻害剤での治療における効果予測バイオマーカーとなり得ることが示唆された。

	Inhibitors		
	Sunitinib (uM)	Sorafenib (uM)	Pazopanib (uM)
HSC-39	0.43 ± 0.05	0.60 ± 0.12	0.23 ± 0.02
HSC-40A	0.46 ± 0.14	0.61 ± 0.09	0.23 ± 0.06
HSC-43	0.69 ± 0.02	0.84 ± 0.07	0.41 ± 0.05
HSC-44PE	2.27 ± 0.37	8.14 ± 1.83	55.86 ± 24.93
HSC-45	3.87 ± 0.22	6.29 ± 0.82	47.45 ± 3.86
HSC-58	5.67 ± 0.35	6.89 ± 0.72	43.63 ± 20.69
HSC-59	4.17 ± 0.10	7.34 ± 0.65	85.43 ± NA
HSC-60	3.09 ± 0.08	8.59 ± 2.39	32.09 ± 15.78
44As3	4.33 ± 0.51	6.12 ± 0.73	27.93 ± 5.15
58As1	4.84 ± 1.47	5.80 ± 0.61	16.28 ± 3.05
KATO-III	0.63 ± 0.08	0.62 ± 0.02	0.42 ± 0.19
OCUM-1	1.83 ± 0.38	6.36 ± 0.52	23.70 ± 9.57
JR-st	5.41 ± 0.41	7.15 ± 0.09	19.01 ± 4.87
NUGC-3	5.66 ± 0.33	7.50 ± 0.59	27.13 ± 5.14
NUGC-4	5.41 ± 0.22	7.44 ± 0.81	36.72 ± 4.90
SNU-1	1.17 ± 0.26	4.12 ± 0.44	7.33 ± 2.22
SNU-16	0.60 ± 0.02	1.12 ± 0.30	0.38 ± 0.15
MKN45	6.21 ± 0.68	9.13 ± 3.78	20.31 ± 7.93
OKAJIMA	4.97 ± 0.71	9.26 ± 1.28	15.39 ± 5.05
IM95	2.44 ± 0.15	5.93 ± 0.59	13.89 ± 2.44
MKN74	7.87 ± 0.89	7.27 ± 0.34	21.31 ± 3.89
MKN28	6.40 ± 0.62	5.73 ± 0.16	22.98 ± 13.07
NCI-N87	5.50 ± 0.38	7.01 ± 0.92	33.68 ± 23.77
MKN7	5.48 ± 0.72	7.91 ± 0.37	27.82 ± 0.19
MKN1	11.76 ± 4.18	10.84 ± 1.19	56.66 ± 24.97

図2 . MTKI に対する感受性試験の結果

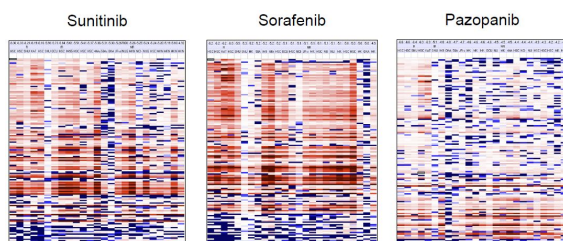


図3 . MTKI に対するキナーゼ活性の変化

(2) EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの3剤に対する非小細胞肺癌細胞株の感受性試験を、変異型 EGFR を持つ肺癌細胞株と野生型 EGFR 持つ肺癌細胞株を用いて行った (図4)。

Cell line	Gefitinib IC50 (μM) ±SD	Erlotinib IC50 (μM) ±SD	Afatinib IC50 (μM) ±SD
A549	16.08±1.06	13.28±7.80	2.08±0.21
NCI-H1650	47.95±0.13	12.37±4.17	3.49±0.71
NCI-H441	19.09±2.21	3.31±1.18	3.56±0.23
HCC4006	0.03±0.001	0.03±0.003	0.002±0.00006
HCC827	0.03±0.002	0.03±0.004	0.002±0.0001
PC-9	0.03±0.005	0.03±0.004	0.0023±0.0001

図5 . EGFR TKI に対する肺癌細胞株の感受性

これまでの報告通り、感受性においては EGFR 活性化変異を有する肺癌細胞は各種 EGFR TKI に対する感受性が高く、EGFR 野生型を有する

肺癌細胞株においては感受性が低いことを確認した。ただし、第二世代 EGFR TKI であるアファチニブは EGFR 野生型細胞株においても比較的細胞増殖抑制効果を示した。これらの細胞株について、チロシンキナーゼ活性の測定を実施した。高感受性株と低感受性株において、薬剤未処理時のキナーゼ活性プロファイルの比較を行った (図5)

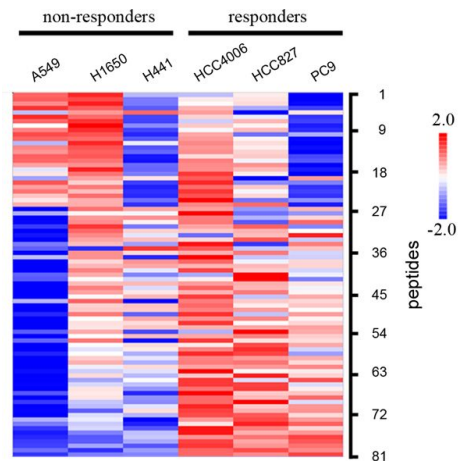


図5 . チロシンキナーゼ活性の評価

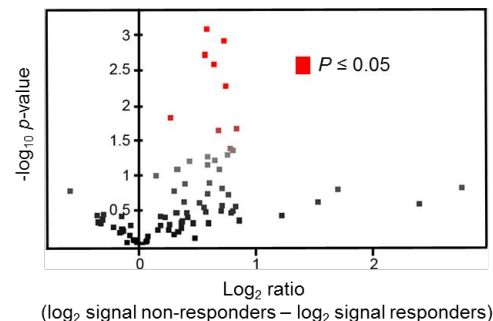


図6 . Volcano plot による比較

その結果を volcano plot 法にて解析を行い (図6) EGFR-TKI の高感受性細胞株においては RAF, ERK1/2 and MAK7P7 といったキナーゼの活性上昇が認められ、これらのキナーゼ活性が EGFR-TKI の感受性予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

(3) 臨床検体を用いての検討については、小細胞肺癌における評価を実施した。腫瘍組織と正常組織から抽出したタンパク質を用いて、ペプチドマイクロアレイによるチロシンキナーゼ活性測定プロファイリングを行った。またこれらの検体からは、ゲノム DNA の抽出も行き、次世代シーケンサーを用いての体細胞変異解析を行った。これらのデータを用いての統合的解析より、小細胞肺癌において、腫瘍特異的なキナーゼ活性に加えて、Src 阻害剤添加時に腫瘍におけるキナーゼ活性が大きく阻害されることを発見した。小細胞肺癌における新規の治療標的とな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 12件)

- Kenmotsu H, Koh Y (他 14 名、3 番目): Prospective genetic profiling of squamous cell lung cancer and adenosquamous carcinoma in Japanese patients by multitarget assays. *BMC Cancer* 2014 Oct 28;14:786. (査読あり)
- Shukuya T, Koh Y (他 16 名、18 番目): Identification of actionable mutations in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2014 Oct;86(1):35-40. (査読あり)
- Ono A, Koh Y (他 13 名、14 番目): Mutant allele frequency predicts the efficacy of EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma harboring the L858R mutation. *Ann Oncol*. 2014 Oct;25(10):1948-53. (査読あり)
- Akamatsu H, Koh Y (他 15 名、2 番目): Multiplexed molecular profiling of lung cancer using pleural effusion. *J Thorac Oncol*. 2014 Jul;9(7):1048-52. (査読あり)
- Serizawa M, Koh Y (他 7 名、9 番目): Identification of metabolic signatures associated with erlotinib resistance of non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res*. 2014 Jun;34(6):2779-87. (査読あり)
- Serizawa M, Koh Y (他 14 名、2 番目): Assessment of Mutational Profile of Japanese Lung Adenocarcinoma Patients by Multitarget Assays: A Prospective Single-institute Study. *Cancer*. 2014 May 15;120(10):1471-81. (査読あり)
- Serizawa M, Koh Y (他 4 名、6 番目): The PPAR agonist efatutazone impairs TGF- $\beta$ 2-induced motility of EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2014 Jun;105(6):683-9. (査読あり)
- Wakuda K, Koh Y (他 14 名、4 番目): Molecular Profiling of Small Cell Lung Cancer in a Japanese Cohort. *Lung Cancer*. 2014 May;84(2):139-44. (査読あり)
- Serizawa M, Koh Y (他 2 名、4 番目): Genomic Aberrations Associated with Erlotinib-resistance in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Anticancer Res*. 2013 Dec;33(12):5223-33. (査読あり)
- Yamamoto N, Koh Y (他 10 名、11 番目): The effect of CYP2C19 polymorphism on the safety, tolerability, and

pharmacokinetics of tivantinib (ARQ 197): results from a phase I trial in advanced solid tumors. *Ann Oncol*. 2013 Jun;24(6):1653-9. (査読あり)

Serizawa M, Koh Y (他 2 名、4 番目): Combined treatment with erlotinib and a transforming growth factor- $\alpha$  type I receptor inhibitor effectively suppresses the enhanced motility of erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells. *J Thorac Oncol*. Mar;8(3):259-69 (査読あり)

Akamatsu H, Koh Y (他 14 名、5 番目): The Impact of Clinical Outcomes According to EGFR Mutation Status in Patients with Locally Advanced Lung Adenocarcinoma Who Received Concurrent Chemoradiotherapy. *Am J Clin Oncol*. 2012 Dec 1. [Epub ahead of print] (査読あり)

[学会発表](計 11件)

芹澤 昌邦、肺腺癌における個別化医療の推進を目的とした体細胞変異プロファイリング、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、神奈川県・横浜市

劔持 広知、肺扁平上皮癌における遺伝子プロファイリング、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、神奈川県・横浜市

Yasuhiro Koh、Identification of actionable mutations in surgically resected tumor specimens from Japanese patients with non-small cell lung cancer by ultra-deep targeted sequencing、49th American Society of Clinical Oncology、2013 年 5 月 31 日~2013 年 6 月 4 日、シカゴ(米国)

Kazushige Wakuda、Molecular profiling of small cell lung cancers in Japanese patients、49th American Society of Clinical Oncology、2013 年 5 月 31 日~2013 年 6 月 4 日、シカゴ(米国)

Yasuhiro Koh、In vitro tyrosine kinase activity profiling to identify molecular targets and predictive biomarkers in gastric cancer cell lines、AACR 104th Annual Meeting 2013、2013 年 4 月 6 日~2013 年 4 月 10 日、ワシントン DC(米国)

Masakuni Serizawa、Multiplexed mutational profiling of Japanese lung adenocarcinoma patients for personalized cancer therapy、AACR 104th Annual Meeting 2013、2013 年 4 月 6 日~2013 年 4 月 10 日、ワシントン DC(米国)

芹澤 昌邦、Implementation of multiplexed mutational profiling into

the lung cancer clinic at Shizuoka Cancer Center、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日～2012年9月21日、北海道・札幌市  
劔持 広知、Biomarker analysis of lung cancer by formalin-fixed paraffin-embedded samples、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日～2012年9月21日、北海道・札幌市  
内藤 立暁、Biomarker analysis of lung cancer by pleural or pericardial effusion samples、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日～2012年9月21日、北海道・札幌市  
井坂 光宏、Biomarker analysis of lung cancer by surgically resected samples、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日～2012年9月21日、北海道・札幌市  
Masakuni Serizawa、Multiplexed mutational profiling in Japanese patients with thoracic malignancies for personalized cancer therapy、EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics、2012年11月6日～2012年11月9日、アイルランド(ダブリン)

〔図書〕(計 2件)

洪 泰浩、メディカルレビュー社、バイオマーカーとしての薬剤投与後のキナーゼ活性の変化、2015  
洪 泰浩、メディカルレビュー社、がん分子腫瘍の遺伝子情報の臨床への応用、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 1件)

名称: Diagnosis, prognosis and treatment of scirrhous gastric cancer  
発明者: Narikazu BOKU, Wijn Richard De, Maria Helena Hilhorst, Yasuhiro Koh, Takako Nakajima, Masakuni SERIZAWA, Kazuyoshi Yanagihara  
権利者: PamGene B.V.、Shizuoka Prefecture  
種類: PCT/EP2012/055864  
番号: W02012131065 A1  
出願年月日: 2012年3月30日  
取得年月日: 2012年10月4日  
国内外の別: 国外

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

洪 泰浩(KOH, Yasuhiro)

和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 80426519

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山本 信之(YAMAMOTO, Nobuyuki)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60298966

安井 博史(YASUI, Hirofumi)  
静岡県立静岡がんセンター・副院長

中島 孝(NAKAJIMA, Takashi)  
静岡県立静岡がんセンター・病理診断科・部長  
研究者番号: 20124422

近藤 晴彦(KONDO, Haruhiko)  
杏林大学・呼吸器・甲状腺外科・教授  
研究者番号: 60399590

遠藤 正浩(ENDO, Masahiro)  
静岡県立静岡がんセンター・画像診断科・部長

朴 成和(BOKU, Narikazu)  
国立がん研究センター中央病院・副院長  
研究者番号: 50505948