

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19459

研究課題名(和文) Kras変異陽性肺癌に発現するsurvivinの治療標的分子としての基礎的検討

研究課題名(英文) Basic examination of survivin as therapeutic targets in KRAS-mutant lung adenocarcinoma

研究代表者

角 俊行 (SUMI, Toshiyuki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60772291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サバイピンは悪性腫瘍に高発現しているが、KRAS陽性肺腺癌においてサバイピンの役割はよく知られていない。我々は、28例のKRAS陽性肺腺癌の手術検体と、2つの細胞株でサバイピンが治療的分子として有効かどうか調べた。サバイピン高発現群は有意に予後不良であることがわかった。細胞実験ではサバイピンノックダウンにより細胞老化が誘導されることがわかった。サバイピンノックダウンにMEK阻害薬であるトラメチニブとBcl2阻害薬であるABT-263を併用することにより著明な細胞死を誘導することがわかった。この併用療法はマウス皮下移植モデルでも同様に有効だった。

研究成果の概要(英文)：Survivin is highly expressed in the majority of malignant tumors. However, little is known about the roles of survivin in KRAS-mutant lung adenocarcinomas. In the present study, we examined 28 KRAS-mutant lung adenocarcinoma tissues and two KRAS-mutant lung adenocarcinoma cell lines, H358 and H441, in order to elucidate the potential of survivin as a therapeutic target. Patients with tumors immunohistochemically positive for survivin (n=18) had poorer outcomes than those with survivin-negative tumors (n=10). In the H358 and H441 cells, survivin knockdown alone induced senescence, not apoptosis. However, the H358 cells and H441 cells in which survivin was silenced, underwent significant apoptosis following combined treatment with ABT-263, a Bcl-2 inhibitor, and trametinib, a MEK inhibitor. Importantly, the triple combination of survivin knockdown with ABT-263 and trametinib treatment, clearly induced cell death in an in vivo tumor xenograft model.

研究分野：肺癌

キーワード：KRAS survivin trametinib ABT-263

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌には EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) が有効な EGFR mutant 肺腺癌や ALK TKI が著効する ALK 融合遺伝子陽性肺腺癌など画期的な分子標的治療薬が選択可能な亜型が存在する。ところが日本人の肺腺癌の約 10%、欧米人の肺腺癌の約 30%を占める Kras mutant 肺腺癌には特異性の高い有効な治療法は存在しない。変異により恒常的に活性化した Kras 蛋白自体の活性を薬剤で抑制することは技術的に困難とされており、RAS-RAF-MEK-ERK と連なるシグナル伝達を抑制可能な MEK inhibitor, selmetinib の治療効果が注目されている程度である。

正常組織における発現量は乏しく、多くの悪性腫瘍で高い発現量が確認される分子に BIRC5 遺伝子にコードされる survivin がある。Survivin は inhibitor of apoptosis (IAP) family 分子であり、主に Caspase3/7 を抑制することが知られている。よって Kras mutant 肺腺癌においても治療標的分子となりうると推定されるが、Kras mutant 肺腺癌での survivin 発現の意義は十分に探索されていない。我々が公共データベースで検索したところ、肺腺癌においては survivin mRNA 発現量は有意に overall survival と相関しており、肺腺癌において survivin は恰好の治療標的分子となりうると推察される。

2. 研究の目的

本研究では survivin が Kras mutant 肺癌における治療標的分子となりうることを示すとともに、survivin 発現抑制と相乗的に治療効果を発揮する薬剤を探索する。

3. 研究の方法

KRAS-mutant 肺腺癌 28 症例と分化型 KRAS-mutant の肺腺癌細胞株 (H358, H441) を用いて探索した。

4. 研究成果

(1) KRAS mutant 肺腺癌組織の多くは TTF-1 と E-cadherin を発現する分化型腺癌であり、survivin 高発現群は有意に悪性度が高い survivin の mRNA 発現量が肺腺癌の outcome と相関するか否かを Kaplan Meier plotter で検索したところ、BIRC5 (which encodes survivin) mRNA 高発現群の生存は低発現群のそれに対し有意に短かった (HR 2.41, $p=3.1e-13$)。ただしこのデータは肺腺癌全体を対象とした結果であるため、次に外科的に切除された KRAS-mutant 肺腺癌 28 例を対象に免疫組織化学的にこれらの癌細胞の survivin の発現を検討した。結果として survivin 発現陽性患者 ($n=18$) は survivin 発現陰性患者 ($n=10$) に比べて有意に全生存期間が短かった (median OS; 54 months vs. 98 months, $P = 0.028$)。また、無病再発期間にも有意差があった。

肺原発の invasive mucinous adenocarcinoma の多くは KRAS-mutant かつ TTF-1 陰性であり、KRAS-mutant 肺腺癌細胞株は E-cadherin 陰性、Vimentin 陽性の間葉型が半数を占める (41/75 55%)、しかし我々の 29 例の KRAS-mutant 肺腺癌組織の検討では、TTF-1 陽性が 19/29 (66%)、全例が E-cadherin 陽性であり、切除可能な KRAS-mutant 肺腺癌の多くは TTF-1 を発現する比較的高分化な腺癌であった。TTF-1 陽性腫瘍と陰性腫瘍の代表的な組織像では、浸潤性粘液癌は TTF-1 陰性である。以上の結果から我々は TTF-1 陽性かつ E-cadherin 陽性の KRAS-mutant 肺腺癌細胞株 NCI-H358 cells と NCI-H441 cells を用いてさらなる検討を行った。

(2) survivin のノックダウンは KRAS-mutant 肺腺癌の細胞分裂を障害し、細胞老化を誘導する

survivin が KRAS-mutant 肺腺癌の増殖、生存に関わるかどうか調べるため、H358 cells, H441 cells, およびコントロールとしての NCI-H1975 cells (EGFR-mutant) に short interfering RNA (siRNA) を用いた RNA interference 法にて survivin の発現を抑制した。survivin ノックダウンにより H358, H441, H1975 全ての細胞株で増殖が抑制された。その際、KRAS の下流で主要な増殖シグナルである MAPK 経路で pERK が上昇していたが、PI3K-AKT 経路のシグナルの明らかな増強はなかった。Survivin knockdown のみでは cleaved PARP は観察されず、明らかなアポトーシスの誘導はなかった。

survivin ノックダウンによって扁平で膨化し多核化した細胞の割合が増えていた。FCM で細胞周期を測定したところ、4 倍体のピークが増加していた。G2/M 期での細胞周期の停止、2 核細胞の増加を反映していた。更には 8 倍体にピークがあり、2 核細胞は細胞周期を進めずにいることが示唆された。WB では経時的に p21 が上昇し、senescence associated galactosidase 染色では survivin ノックダウン細胞で陽性であることから、survivin ノックダウンにより腫瘍細胞は代償的に MAPK 経路が活性化しているものの、細胞分裂が障害され、かつ細胞老化したと考えられた。

(3) survivin ノックダウンに加えて BCL2 inhibitor である ABT-263 と MEK inhibitor である trametinib の併用は KRAS mutant 肺腺癌の明らかなアポトーシスを誘導する。既述のように survivin ノックダウンにより KRAS-mutant 肺腺癌細胞株には細胞老化が誘導されたが、明らかに apoptosis することはなかった。Bcl2 inhibitor, ABT-263 は細胞老化した細胞を選択的に apoptosis させるとの報告もあり本研究でも使用した。また、survivin depletion は MAPK 経路のシグナルを増強させたことや、既報で ABT-263 との併用で効果が認められていることから MEK 阻害

薬 trametinib を併用することでより相乗的な効果を期待した。survivin をノックダウンした H358, H441, H1975 に ABT-263 単剤、trametinib 単剤あるいは ABT-263 と trametinib 2 剤を投与したところ、特に両剤の併用は明瞭に生細胞を減少させた。カスパーゼ 3/7 assay では、caspase3/7 の活性が上昇し、ウエスタンブロットでは、H2AX の発現上昇と cleaved PARP の発現が認められたことから、KRAS-mutant 肺腺癌細胞はアポトーシスに陥ったと考えられる。また、trametinib と同様の MEK inhibitor である selumetinib でもほぼ同等の結果が得られた。以上の実験結果は survivin 抑制に加えて、ABT-263 と MEK 阻害薬を投与する治療法は分化型の KRAS-mutant 肺腺癌に対して有効であることを示している。

(4) survivin ノックダウンと ABT-263 と Trametinib の併用療法は、3次元培養された分化型 KRAS-mutant 肺腺癌細胞にも効果的である

上記の実験結果は平面培養(生体の環境とは程遠い)での結果であるが、次に生体内における癌細胞の環境を模倣するため 3D on-top 培養を導入した(。同培養法で 50 個の細胞からなる micro-spheroid (100µm 弱 in size) を培養することにより微小転移巣(これが大きくなるのが臨床的な再発である)を模倣した。NC siRNA で介入したスフェロイドは、経時的に増大したのに対し、BIRC5 siRNA で介入したスフェロイドの増殖は抑制され、さらに survivin knockdown と ABT-263 と Trametinib の併用療法では生細胞数は顕著に減少し、スフェロイドは崩壊しアポトーシス小体を観察した。これらの結果から、survivin ノックダウンと ABT-263 と Trametinib の併用療法は生体内の micrometastasis を治療しうると推定された。

(5) マウス皮下移植実験で survivin ノックダウンおよび AT 療法の併用は上皮型 KRAS-mutant 肺腺癌に有効だった survivin ノックダウン及び ABT-263 と trametinib の併用療法が in vivo においても有効であるか検討するため、ヌードマウスに H358 の NC siRNA または BIRC5 siRNA を transfection した細胞を皮下移植した。transfection した siRNA の効果は一過性であるため、薬剤投与を開始する際に Atelocollagen を用いて siRNA を持続的に腫瘍に投与した。NC siRNA で介入した細胞を移植したマウスの皮下腫瘍と比較すると survivin depleted 細胞を移植したマウスの皮下腫瘍は顕著に増大が抑制された。さらに ABT-263 と trametinib の併用療法を行ったところ腫瘍は顕著に縮小した。取り出した皮下腫瘍を免疫組織化学的に検討したところ、BIRC5 siRNA で介入した腫瘍では腫瘍細胞は

壊死しており、survivin の発現は低下し、Ki-67 活性は低下していた。これらの結果より、in vivo においても survivin ノックダウンおよび ABT-263 と trametinib の併用療法は有効であることが示唆された。

(6) KRAS mutant 肺腺癌の TTF-1 をノックダウンすると細胞増殖が抑制され、survivin 発現も僅かに低下する

NKX2.1 siRNA を用いて KRAS-mutant 肺腺癌細胞株 H358 cells and H441 cells の TTF-1 をノックダウンしたところ、H358, H441 の増殖は僅かながら有意に抑制された。その際、興味深いことに survivin の発現が低下する傾向にあった。これらの結果から、TTF-1 陽性の上皮型 KRAS mutant 肺腺癌においても TTF-1 は癌細胞の生存 and/or 増殖を促進していると考えられる。その生存・増殖促進効果の一部には survivin が関与していることが示唆された。

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2件)

Sumi T, Hirai S, Yamaguchi M, Tanaka Y, Tada M, Yamada G, Hasegawa T, Miyagi Y, Niki T, Watanabe A, Takahashi H, Sakuma Y. Survivin knockdown induces senescence in TTF-1-expressing, KRAS-mutant lung adenocarcinomas. International journal of Oncology. 2018; 53: 33-46. (査読あり)

Sumi T, Hirai S, Yamaguchi M, Tanaka Y, Tada M, Niki T, Takahashi H, Sakuma Y. Trametinib downregulates survivin expression in RB1-positive KRAS-mutant lung adenocarcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018; 501: 253-258. (査読あり)

[学会発表](計3件)

角俊行、田中悠祐、平井幸恵、山口美樹、山田玄、渡辺敦、高橋弘毅、佐久間裕司 KrAS 変異陽性肺腺癌における survivin knockdown による細胞老化の誘導を利用した治療戦略 2018年4月 第58回日本呼吸器学会学術集会 大阪

角俊行、田中悠祐、多田周、平井幸恵、山口美樹、山田玄、渡辺敦、高橋弘毅、佐久間裕司 KRAS 変異陽性肺腺癌における MEK 阻害薬 trametinib と survivin の関連について 2017年11月 第43回日本肺癌学会北海道支

部学術集会 札幌

角俊行、田中悠祐、平井幸恵、山口美樹、
山田玄、渡辺敦、高橋弘毅、佐久間裕司 Kras
変異陽性肺腺癌における survivin の治療標
的分子としての基礎的検討 2017 年 10 月
第 58 回日本肺癌学会学術集会 横浜

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角 俊行 (SUMI, toshiyuki)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60772291

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

平井幸恵 (HIRAI sachie)
山口美樹 (YAMAGUCHI miki)
田中悠祐 (TANAKA yusuke)
多田周 (TADA makoto)
山田玄 (YAMADA gen)
長谷川匡 (HASEGAWA tadashi)
宮城洋平 (MIYAGI yohei)
仁木利郎 (NIKI toshiro)
渡辺敦 (WATANABE atsushi)
高橋弘毅 (TAKAHASHI hiroki)
佐久間裕司 (SAKUMA yuji)