

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07226

研究課題名(和文) PKCetaを分子標的とした新規肺癌治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for lung cancer targeting PKCeta

研究代表者

大場 基 (Ohba, Motoi)

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・講師

研究者番号：70297018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、遺伝子ノックダウンによって非小細胞肺癌、特に肺腺癌細胞にアポトーシスを誘導し、浸潤・転移を抑制する分子 Protein kinase C (PKCeta: PKC) を標的とした新規肺癌分子標的治療法の提案である。

具体的には、1) PKC に対する低分子mRNA発現阻害剤の発見、2) PKC 特異的核酸医薬品の開発、3) PKC ノックダウンによる増殖・細胞運動抑制機構の解明と下流因子の同定である。これらの成果は、特許権:特願2019-181792、発明の名称:ベクター、形質転換体、PKC 発現調節物質のスクリーニング方法並びにPKC 発現阻害剤として出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は癌死亡率の第1位を占め、罹患率も極めて高く、治療法の確立は喫緊の課題である。本研究は、PKC を標的とした新規肺癌分子標的治療法の提案である。PKC は肺癌細胞において、EGFR等の増殖因子受容体や接着因子の膜輸送制御に関与する。本治療戦略はPKC の機能阻害を介して、上記分子の適切な細胞内輸送を妨げることで、がん細胞の増殖阻害・浸潤・転移能抑制を誘導する新たな視点からの癌治療法である。更に、既存のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤における獲得耐性の克服にも応用可能である。また、標的分子の転写活性に着目した本研究独自の大規模薬剤探索法は、新規治療薬の発見・同定につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Here we present a novel therapeutic strategy for non-small cell lung cancer (NSCLC) targeting protein kinase C (PKCeta: PKC). It induces apoptosis and suppresses invasion and metastasis by its gene knockdown in NSCLC cells, especially lung adenocarcinoma cells. First, we discover some small molecule compounds which inhibit PKC mRNA expression by utilizing a new drug screening system detecting the transcriptional activity of PKC gene. The drug screening system and these small molecule compounds have been applied as new patent rights. Next, we developed PKC-specific si/shRNA, dramatically suppressing the PKC protein expression. These siRNA leads to growth inhibition of NSCLC in vivo. Finally, we found molecular mechanisms of the inhibition of cell proliferation and motility exerted by PKC-knockdown and identified a downstream molecule of PKC, which plays a crucial role in NSCLC.

研究分野：腫瘍学、分子細胞生物学

キーワード：肺癌 分子標的治療薬 PKC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんは我が国の癌死亡率の第1位を占め、罹患率も極めて高く、治療法の確立は喫緊の課題である。現在までに、非小細胞肺癌(NSCLC)細胞に対する分子標的治療薬として、gefitinib等の上皮増殖因子受容体阻害剤(EGFR-TKI)が開発・承認されており、EGFR活性化変異を持つ患者に対して優れた腫瘍縮小・延命効果を発揮する。しかしながら、EGFR遺伝子の変異やMET等、バイパスシグナル経路の出現で例外なく薬剤感受性を失い、再発をきたす。従って、新規の治療分子標的の発見とその治療薬の開発は医学的・社会的に強く望まれている。

PKC η は正常組織の扁平上皮組織分化層に発現するCキナーゼであり、PKC η が正常扁平上皮細胞の最終分化の誘導に関わるkey regulatorであることを我々は明らかにしてきた(Ohba M., Mol. Cell. Biol. 18, 5199, 1998, Kashiwagi M, Oncogene 19, 6334, 2000, Kamioka N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 394: 106, 2010)。

しかしながら、PKC η はNSCLC細胞株で正常気管支上皮細胞に比べて10数倍~100倍の著明な高発現が認められ、また、肺腺癌患者組織ではPKC η の発現が腫瘍の悪性度に比例して増加し、予後と強い相関関係を示すことが報告されている(Krasnitsky E, Anticancer Res. 32(4):1507-13, 2012)。

そこで、NSCLCにおけるPKC η の機能を解析するために、PKC η shRNAを正常気管支上皮細胞や複数の肺腺癌細胞株に導入し、発現抑制したところ、癌細胞特異的に、*in vitro*, *in vivo*において著しいアポトーシスを伴う抗腫瘍効果が認められた(図1)。更に、経尾静脈移植による肺転移モデルから、PKC η shRNAにより肺腺癌細胞A549の転移が抑制されることが示された(図2)。

これらの現象は、EGFRやMETの発現消失や(図3)、細胞運動の際に β 1インテグリンが仮足へと適切に輸送されないことが原因であった。これは、増殖因子や接着因子の細胞内輸送に関わる膜輸送システム、特に細胞膜へのリサイクリングがPKC η のノックダウンによって阻害されるためであった。

2. 研究の目的

以上の結果を基に、PKC η の発現や活性を抑制することでNSCLCを治癒する、新たな薬剤の探索・開発を目標として、以下の研究を行った。

(1) PKC η に対する新規低分子阻害剤の探索

既知化合物、放線菌、海洋生物由来の未知化合物をシーズとして、網羅的スクリーニングを行い、抗腫瘍活性を持つPKC η 阻害剤の発見を目指した。その際、生細胞中のPKC活性や転写活性を指標とする新規スクリーニング系を用いた(3. 研究の方法の項目)。

(2) 核酸医薬品の探索

siRNA、人工機能核酸、DNAとRNAによるヘテロ核酸等、PKC η を発現抑制する各種核酸医薬品の肺がんモデルマウスでの抗腫瘍効果を検討する。

(3) 増殖抑制メカニズムの解明と下流因子の同定

膜トラフィック関連因子に着目し、PKC η の作用点を明らかとする。この解析から、PKC η との相互作用因子やリン酸化基質を同定する。この情報を元に、その下流因子を標的分子候補として提案する。

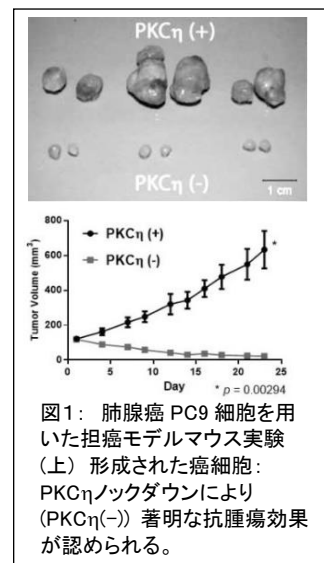


図1: 肺腺癌 PC9 細胞を用いた担癌モデルマウス実験 (上) 形成された癌細胞: PKC η ノックダウンにより (PKC η (-)) 著明な抗腫瘍効果が認められる。

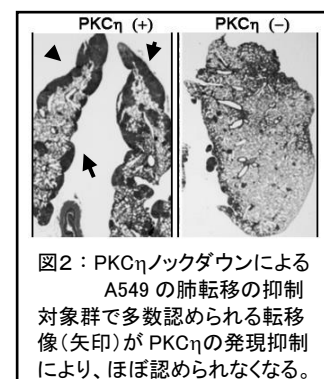


図2: PKC η ノックダウンによる A549 の肺転移の抑制対象群で多数認められる転移像(矢印)が PKC η の発現抑制により、ほぼ認められなくなる。

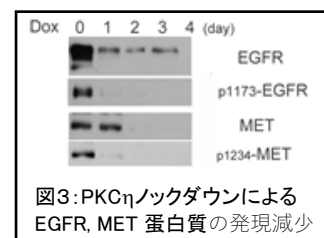


図3: PKC η ノックダウンによる EGFR, MET 蛋白質の発現減少

3. 研究の方法

(1) PKC η 阻害剤の網羅的探索

以下のスクリーニング系を用いて、PKC η 特異的な阻害物質の探索を行った。阻害剤の候補物質として、既知の化合物・承認済み医薬品、放線菌由来の天然有機化合物を用いた。

PKC η の酵素活性に着目した阻害剤の探索法

大量且つ迅速にスクリーニングを行うために、FRET 法を応用したスクリーニングシステムを用いた。PKC の5'末端側に YFP 遺伝子を、3'側に CFP 遺伝子を挿入したベクターを、Hela 細胞に導入したアッセイ系を確立している。検体をこれらの細胞の培養液中に添加し、PKC η の立体構造変化によって生じる蛍光量変化を測定し、PKC 活性の指標とする。

PKC η mRNA 転写活性を指標とした遺伝子発現抑制物質の網羅的探索

転写活性の測定は、PKC η プロモーターDNA とルシフェラーゼ遺伝子によるレポーターシステムを導入した Hela 細胞を用い、PKC η mRNA 発現抑制物質を検索した。

(2) 抗 PKC η 核酸医薬品の探索

これまでに、PKC η 特異的 siRNA をアトピー皮膚炎モデルマウスに適用し、炎症病態を軽快させる事に成功している。使用した siRNA の配列を示す。

1. ⁶⁹³ GGATTCAAAGATTGCAGAACA、
2. ⁸⁸⁸ GGTAAATGCGGTGGAACCTTGC
3. ¹¹⁶⁴ GGACGTGATTCTGCTGGATGA

この PKC η siRNA を *in vivo* siRNA 導入試薬を用いて投与し、皮下異所性担癌モデルマウスに対する効果を検討した。

(3) PKC η ノックダウンによる増殖抑制メカニズムの解明と下流因子の同定

膜輸送制御因子: Rab 遺伝子とそのエフェクター分子 RCP を対象とした検討
PKC η の下流シグナル分子を同定し、薬剤標的となりうるかを検討した。

EGFR やインテグリンは、エンドサイトーシスによって細胞質に取り込まれ、一部は細胞膜へとリサイクリングされ、再利用される。PKC η の発現抑制によって、リサイクリングが阻害され、EGFR は核周辺にドット状に偏在し、細胞膜での発現を失う。その結果として、アポトーシスが誘導される(図4)。

そこで、リサイクリング制御分子 RAB11 とエフェクター因子 RCP (Rab coupling protein) のリン酸化に着目した。FLAG タグを付加した両タンパク質を PC9 細胞に導入し、PKC η の発現抑制により変化するリン酸化部位を質量分析: LC-MS/MS 解析により同定した。

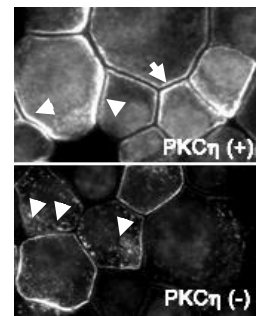


図4: PKC η ノックダウンによる EGFR の発現・局在変化
細胞膜上での発現が消失し、核周辺にドット状に偏在している(下)。

4. 研究成果

(1) PKC η に対する新規低分子阻害剤の探索

放線菌由来物質からは、PKC η の酵素活性や転写活性を抑制する化合物を見いだすことができなかった。そこで、制がん剤や各種阻害剤を体系的に収集した化合物ライブラリーを用いて、既知の化合物から PKC η mRNA 発現抑制剤及び活性阻害剤を探索した。

使用した化合物ライブラリーとしては「標準阻害剤キットI~III (文部科学省新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』化学療法基盤支援活動より供与: <http://scads.jfcr.or.jp/kit/kit.htm>)」に含まれる 291 種類の阻害剤を、また米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) 承認薬ライブラリー (Selleck Co., FDA-approved drug library) を対象として、上記スクリーニング系を用いて探索を行った。

その結果、PKC η mRNA 発現抑制を有意に抑制する薬剤として、レプトマイシンB、インジルビシン-3'

ーモノオキシム又は3-フルオロ-N-(6,7-ジメトキシ-2,4-ジヒドロインデノ[1,2-c]ピラゾール-3-イル)フェニルアラミン:PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IVを同定した(図5)

これらの成果は、スクリーニング系と共に「発明の名称:ベクター、形質転換体、PKC η 発現調節物質のスクリーニング方法並びに PKC η 発現阻害剤」として、研究代表者 大場 基を発明者、学校法人昭和大学を出願人とした特許出願を令和元年度(2019年度)に行った。

(2)核酸医薬品の探索

PKC η を標的とした種々の siRNA をコラーゲンベース核酸導入試薬 (Attelo Gene local use 及び Systemic Use, Koken)を用いて、免疫不全マウス NOD-SCID 皮下腫瘍担癌モデルに皮下局所投与及び尾静注による全身投与を行うことで、その効果を検討した。その結果、皮下投与モデル実験ではほぼ抗腫瘍効果は認められなかった(平成 30 年度報告)のに対して、全身投与モデルで有意な腫瘍抑制効果が認められた(平成 29 年度報告)。問題点として、従来指摘されているとおり、siRNA を大量に使用すること、siRNA の不安定性のために抗腫瘍効果が限定的であることがあげられる。siRNA よりも安定性や発現抑制効果に優れた各種核酸医薬品、具体的には架橋型人工核酸 locked nucleic acid や 2'-O-(2-methoxyethyl) を付加したアンチセンス DNA 医薬品や、架橋型人工核酸付加 DNA と RNA によるヘテロ核酸等の作用を見当する必要があると考えている。しかしながら、PKC η 核酸医薬品が非小細胞肺がんの治療に有効であることが示されたことは、将来実臨床に応用できる可能性を示唆するものである。

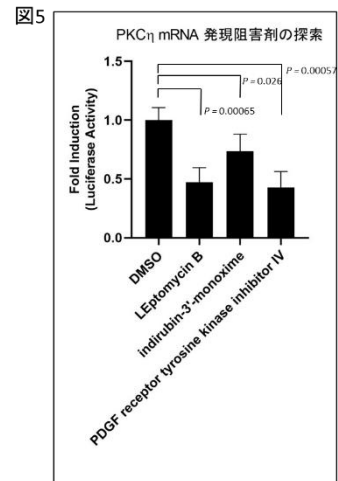
またヒト PKC η の発現を、より高効率・安定的に抑制する新規 siRNA 配列の検索・同定も行った。これらの成果も特許権として出願準備中である。

(3)PKC η ノックダウンによる増殖抑制メカニズムの解明と下流因子の同定

PKC η ノックダウンによる非小細胞肺がん株の顕著なアポトーシス誘導と細胞運動の抑制は、増殖因子受容体の分解促進や細胞接着因子の局在変化・異常が主たる原因である。その分子メカニズムとして、PKC η ノックダウン細胞内では膜トラフィッキング制御因子 RAB11 が恒常的に活性化していること、またゴルジ体に異常局在することを見いだした。更に、質量分析、特異的リン酸化抗体によるウエスタンブロッティング解析から、RAB11 の活性・局在異常は、ゴルジ体において本来行われるべき PKC η による RAB11 のリン酸化が、PKC η ノックダウン細胞内では阻害されるためであることが明らかとなった。

肺がん細胞では、この RAB11 新規リン酸化サイトが PKC η によって特異的にリン酸化されることで効率的な膜輸送、特に細胞膜へのリサイクリングが行われ、EGFR 等の増殖因子受容体や $\beta 1$ インテグリン等の接着因子がゴルジ体から細胞膜へ効率的に移行しているものと考えられる。その結果、がん細胞に特徴的な高い増殖能や運動能・浸潤能、転移能を獲得しているものと推測される。

現在、これらの成果に関する特許出願及び論文投稿を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakatani K, Yamaoka T, Ohba M, Fujita KI, Arata S, Kusumoto S, Taki-Takemoto I, Kamei D, Iwai S, Tsurutani J, Ohmori T.	4. 巻 18
2. 論文標題 67. KRAS and EGFR Amplifications Mediate Resistance to Rociletinib and Osimertinib in Acquired Afatinib-Resistant NSCLC Harboring Exon 19 Deletion/T790M in EGFR.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cancer Ther	6. 最初と最後の頁 112-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-18-0591.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M, Ohmori T.	4. 巻 19(11)
2. 論文標題 Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E3491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19113491.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka T, Ohmori T, Ohba M, Arata S, Murata Y, Kusumoto S, Ando K, Ishida H, Ohnishi T, Sasaki Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Distinct Afatinib Resistance Mechanisms Identified in Lung Adenocarcinoma Harboring an EGFR Mutation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 915-928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-16-0482.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka T, Ohba M, Arata S, Ohmori T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishing Dual Resistance to EGFR-TKI and MET-TKI in Lung Adenocarcinoma Cells In Vitro with a 2-step Dose-escalation Procedure.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/55967.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T.	4. 巻 18(11)
2. 論文標題 Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/ijms18112420.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohba Motoi	4. 巻 8
2. 論文標題 New lung cancer treatment strategy with molecular target of PKCeta	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 56-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.21820/23987073.2019.8.56	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoka T, Ohba M, Matsunaga Y, Tsurutani J, Ohmori T.	4. 巻 26(148)
2. 論文標題 Establishment and Characterization of Three Afatinib-resistant Lung Adenocarcinoma PC-9 Cell Lines Developed with Increasing Doses of Afatinib.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vis Exp.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59473.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 OHBA Motoi TOYA Etsuko ARATA Satoru YAMAOKA Toshimitsu IRIE Kazuhiro SASAKI Yasutsuna
2. 発表標題 10-methyl-aplog-1 enhances the cytotoxic effects of HDAC inhibitor in esophageal squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上善則、船木桐子、坪井裕見、松原大祐、大場基、伊東剛
2. 発表標題 Involvement of a cell adhesion molecule, CADM1, in cancer invasion and metastasis
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷友紀、伊東剛、永田政義、河合剛人、松原大祐、大場基、村上善則
2. 発表標題 Screening of metastasis-related genes by microarray analysis of lung cancer cells using experimental lung metastasis
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 YAMAOKA Toshimitsu NAKATANI Kaori OHBA Motoi FUJITA Ken-ichi ARATA Satoru IWAI Shinichi OHMORI Tohru
2. 発表標題 Mechanism of resistance to third-generation EGFR-TKI, rociletinib, in lung adenocarcinoma cells with EGFR-T790M mutation
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 NAKATANI Kaori YAMAOKA Toshimitsu OHMORI Tohru OHBA Motoi FUJITA Ken-ichi TAKI Iori KAMEI Daisuke IWAI Shinichi SASAKI Yasutsuna
2. 発表標題 Resistance mechanisms to third-generation epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in lung adenocarcinoma cells harboring the EGFR-T790M mutation
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoi Ohba, Etsuko Toya, Satoru Arata, Toshimitsu Yamaoka Kazuhiro Irie and Yasutsuna Sasaki
2. 発表標題 10-methyl-aplog-1 augments the therapeutic efficacy of HDAC inhibitor in esophageal squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第76回 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岡利光、大場基、荒田悟、大森亨
2. 発表標題 肺腺癌細胞PC-9におけるアフアチニブ獲得耐性機序
3. 学会等名 第76回 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中谷香織、山岡利光、大場基、大森亨、大場基、藤田健一、滝伊織、亀井大輔、岩井信一、佐々木康綱
2. 発表標題 EGFR790M発現肺腺癌才簿株を用いた第3世代EGFR-TKI耐性細胞の樹立とその機序の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山岡利光、大森亨、大場基、村田泰則、大木康成、楠本壮二郎、大西司、相良博典
2. 発表標題 EGFR-mutationを伴う肺腺癌細胞株におけるEGFR-TKIとMET-TKIへの獲得耐性機序
3. 学会等名 第57回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大場基、山岡利光、石川文博、戸谷衣都子、村上善則
2. 発表標題 PKC による肺がん特異的な増殖因子受容体膜輸送の亢進機構
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永有紀、大場基、中村清吾、鶴谷純司
2. 発表標題 術前化学療法有り、無し乳がん患者における予後因子としてのBRCAness検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ベクター、形質転換体、PKC 発現調節物質のスクリーニング方法並びにPKC 発現阻害剤	発明者 大場 基	権利者 学校法人 昭和 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-181792	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

昭和大文学術業績リポジトリ https://meta.lilitory.showa-u.ac.jp/profile/?user_id=fc833fdccdec30c0e08d008b7c17e832b7e3c8d0 昭和大先端がん治療研究所ホームページ http://www.showa-u.ac.jp/rsch_acad/act/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	柴沼 質子 (Shibanuma Motoko) (60245876)	昭和大学・薬学部・教授 (32622)	
連携研究者	河野 葉子 (Kohno Yohko) (40195681)	昭和大学・歯学部・准教授 (32622)	