

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17887

研究課題名(和文)肺扁平上皮癌に対するmTORとFAKを標的とした治療戦略

研究課題名(英文)Therapeutic strategies targeting mTOR and FAK for squamous cell lung cancer

研究代表者

山口 耕介(YAMAGUCHI, Kosuke)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60529402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の30%を占める肺扁平上皮癌については使用できる分子標的治療薬は無い。先行研究でドライバー変異を持たない頭頸部扁平上皮癌細胞株とレトロウイルスshRNAライブラリーを用いた網羅的な合成細胞致死スクリーニングにより、mTORC1阻害剤とFAK(PTK2)が相乗効果を持つことが示唆された。本研究ではmTORC1阻害剤であるeverolimusとFAK阻害剤であるVS-6063の併用効果をin vitro及びnude mouseを使用した異種移植モデルで評価した。その結果、in vitroにおいては両剤の強い相乗効果が示されたが、異種移植モデルにおいては明らかな併用効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

扁平上皮癌の増殖シグナルは非常に複雑であり、分子標的治療薬による増殖シグナルの抑制のみではその進行を制御することは困難である。そのため、殺細胞性抗癌剤、近年は免疫チェックポイント阻害剤による治療が中心となっている。本研究は分子標的治療薬の併用により、肺扁平上皮癌に対して細胞死を誘導して有効な治療を探索することが目的である。本研究では先行研究のスクリーニングで同定された治療候補の一つについて検討し、動物実験ではこの有効性を証明することができなかったが、新たな候補遺伝子が同定された。本研究成果は肺扁平上皮癌に対する分子標的治療の研究の進展に貢献すると考える。

研究成果の概要(英文)：There are no molecular targeted therapies available for squamous cell lung cancer, which accounts for 30% of lung cancer. Previous studies have demonstrated that mTORC1 inhibitors interact with FAK(PTK2) by comprehensive synthetic cell-killing screens using a head and neck squamous cell carcinoma cell line without driver mutations and a retroviral shRNA library. In this study, we evaluated the combined effect of mTORC1 inhibitor everolimus and FAK inhibitor VS-6063 in vitro and in a xenograft model using nude mice. As a result, a strong synergistic effect of these drugs was shown in vitro, but no clear combination effect was observed in the xenograft model.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：FAK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年多くの臓器の癌でドライバー遺伝子が次々と同定され、それを標的とする分子標的治療薬が開発されている。肺癌においては、EGFR 変異に対する EGFR 阻害剤、ALK 融合遺伝子に対する ALK 阻害剤の登場によりこれらの遺伝子異常を持つ癌の治療成績が飛躍的に向上した。しかしこれらの遺伝子異常は肺腺癌に限定され、肺癌の 30%を占める肺扁平上皮癌については使用できる分子標的治療薬は無い。頭頸部扁平上皮癌においては、FGFR、EGFR、PI3K、PTEN、AKT や p53 等多くの経路を介して mTORC1 経路が活性化していることから、mTORC1 阻害剤が治療の有望な標的の一つであると予測される。しかし扁平上皮癌の増殖シグナルは非常に複雑であり、mTORC1 阻害剤単独での治療効果は限定的であることが予想されるため、その臨床応用のためには mTORC1 阻害剤の正確な耐性機構の解明と他剤との併用療法の開発が必要になると考えられる。我々は先行研究でドライバー変異を持たない頭頸部扁平上皮癌細胞株とレトロウイルス shRNA ライブラリーを用いた網羅的な合成細胞致死スクリーニングにより、mTORC1 阻害剤である rapamycin と相互効果をもつ候補遺伝子を検出した。本研究では、このスクリーニングで検出された候補遺伝子のうち FAK(Focal adhesion kinase)に注目する。FAK は癌細胞の浸潤、接着、増殖、アポトーシス等様々な機能に関与する非受容体型たんぱく質チロシンキナーゼであり、SRC と相互作用をもつ。FAK 阻害剤の固形癌に対する臨床試験は進行中である。本研究では、肺扁平上皮癌に対する mTORC1 阻害剤と FAK 阻害剤併用による治療効果を検証した。

2. 研究の目的

本研究は肺扁平上皮癌に対する mTORC1 と FAK を標的とした治療の効果と作用機序、安全性を実験レベルで検証することを目的とする。そのために以下を明らかにする。

- (1) in vitro において mTORC1/FAK 阻害、及び mTORC1/FAK 阻害により細胞増殖が相乗的に抑制されるかどうかを明らかにする。
- (2) ノードマウスを用いた肺扁平上皮癌異種移植モデルで mTORC1/FAK 阻害による抗腫瘍効果を確認する。

3. 研究の方法

- (1)mTORC1 阻害剤として everolimus、FAK 阻害剤として VS-6063 を使用した。阻害剤は Selleck Biotech 社より購入した。肺扁平上皮癌細胞株は RERF-LC-AI を使用した。上述の阻害剤を単剤、2 剤を使用してそれぞれの細胞株に対し、96 ウェルプレートを用いて細胞増殖試験を行った。ソフトウェア Compusyn を使用して Combination Index plot (CI plot) を作成し、併用効果を評価した。また、siRNA を用いた FAK knock down と everolimus による細胞増殖抑制効果についても検討した。siRNA は On-TARGET plus SMARTpool™ (Dharmacon) を使用した。
- (2)肺扁平上皮癌細胞株に対する mTORC1、FAK 阻害剤の併用効果を確認するために nude mouse (BALB/cAJcl-nu/nu) を使用した肺扁平上皮癌異種移植モデルにより検証した。

4. 研究成果

- (1) in vitro における mTOR 阻害剤と FAK 阻害剤の併用効果の検討：

増殖抑制効果を評価するために、day0 に 96 ウェルプレートに 1500 細胞/ウェルの RERF-LC-AI を播種し、day1 に everolimus および VS-6063 を添加した。Day4 に Cell counting kit-8 を加えてマイクロプレートリーダーを用いて OD450nm を測定し、72 時間での細胞増殖抑制効果を算出した。結果を図 1 に示す。さらに、Compusyn を用いて CI plot を作成した(図 2)。CI plot より CI at ED50 を算出した。CI < 1 を相乗効果と判定する。VS6063/everolimus 濃度比が 40/1 において CI = 0.04821、160/1 において CI = 0.0263、640/1 において CI = 0.00973 であり、何れの濃度比においても強い相乗効果を認めた(図 2)。

次に、everolimus と FAK knock down による細胞増殖抑制効果を検証した。day0 に 96 ウェルプレートに 1500 細胞/ウェルの RERF-LC-AI を播種し、day1 に siRNA を添加した。siRNA は control siRNA、FAK siRNA の他に SRC siRNA も使用して実験を行なっ

| | | everolimus (nM) | | | | | | | | |
|-----------------------|------|-----------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| | | 0 | 0.02 | 0.06 | 0.24 | 0.98 | 3.9 | 16 | 63 | 250 |
| VS-6063 (μ M) | 0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| | 0.04 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 |
| | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | 0.4 |
| | 0.6 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | 0.4 |
| | 2.5 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| | 10 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

図1. 細胞増殖抑制試験

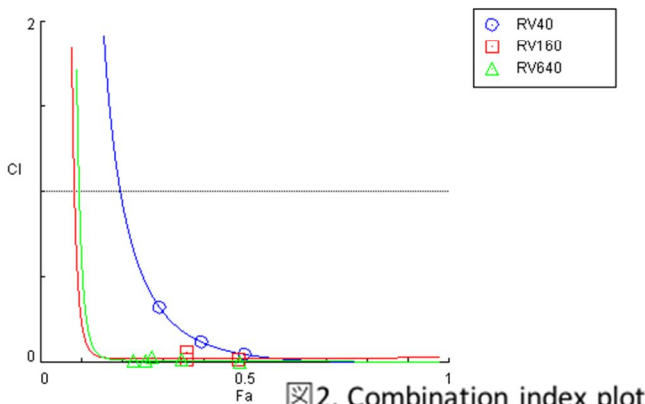


図2. Combination index plot

た。day2に everolimus 1 μ M を添加して Day5 に Cell counting kit-8 を使用して細胞増殖抑制効果を算出した。FAK knock down と everolimus の併用効果が認められた (図 3)。SRC knock down と everolimus の併用ではより強い細胞増殖抑制効果を認めた (図 3)。

RERF-LC-AI 細胞に対する everolimus の mTOR 阻害効果を確認するために、抗 phospho-ribosomal protein S6 抗体 (Ser240/244) (Cell Signaling Technology) を用いてウェスタンブロットを行い、everolimus

1nM において阻害効果が得られることを確認した。また、抗 FAK 抗体を用いたウェスタンブロットにより、RERF-LC-AI に FAK が発現していることを確認し、その阻害効果を確認するために、抗 phospho-FAK(Tyr397) 抗体 (Cell Signaling Technology) によるウェスタンブロットを行い、VS-6063 1 μ M で FAK 阻害効果が得られることを確認した。

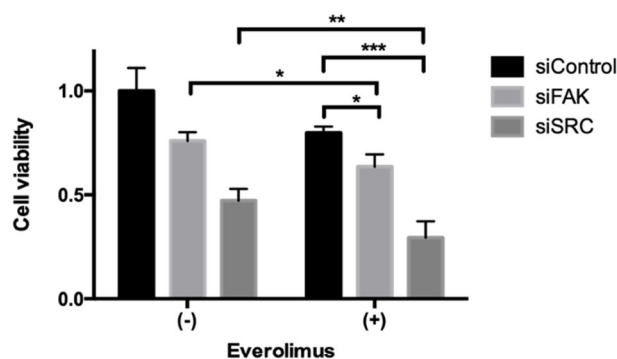


図3. siRNAを用いた細胞増殖抑制試験

(2) 異種移植モデルによる everolimus と VS-6063 の併用効果の検討：

6週令の雌の nude mouse の腋窩に RERF-LCAI 1 \times 10⁶ 細胞を皮下移植した。腫瘍が形成されて 100mm³ 程度に到達した段階で各治療群 (対照群、everolimus 単剤群、VS-6063 単剤群、everolimus+VS-6063 併用群) に腫瘍体積が均等になるように振り分けて阻害剤の投与を開始した。everolimus は 2.5mg/kg を 1日1回、VS-6063 は 25mg/kg を 1日2回、週に5日間経口投与した。everolimus 単剤群と everolimus+VS-6063 併用群は対照群と比較して有意に腫瘍体積が低値となったが、VS-6063 群においては対照群と比較して明らかな差異は認めなかった。また、everolimus 単剤群と併用群の間に治療開始 41日まで腫瘍体積に有意差を認めず、両剤の併用効果は認められなかった (図 4)。また何れの治療群においても、体重減少を含めた有害事象を認めなかった。

以上の結果より、in vitro においては、肺扁平上皮癌細胞株 RERF-LC-AI に対して、everolimus と VS-6063 の強い相乗効果が示唆されたが、動物実験においては、これを証明するに至らなかった。その原因として、VS-6063 投与量を既報と同様に設定したが生体

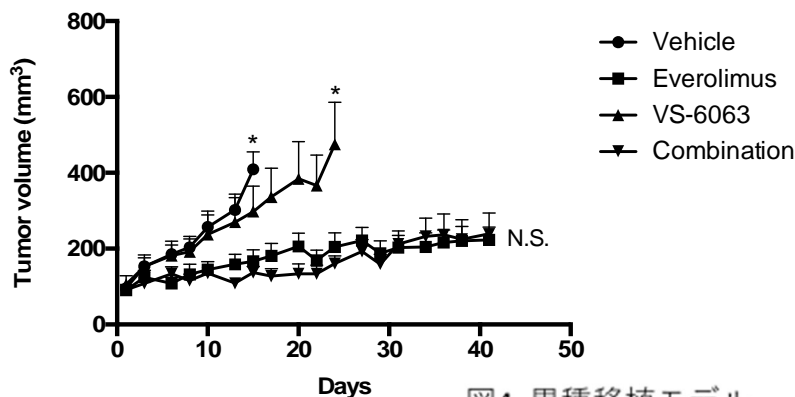


図4. 異種移植モデル

では腫瘍局所において in vitro のような濃度に到達していない可能性があることが考えられる。今回の動物実験において何れの治療群においても、体重減少を含めた有害事象が確認されなかったことから、VS-6063 の投与量をさらに増量できる可能性がある。また、今回は RERF-LCAI を使用したが、他の細胞株においても検証が必要と考える。また、本研究では、FAK シグナル経路と相互作用のある SRC について siRNA を用いて実験を行なった。In vitro の結果ではあるが、SRC siRNA は everolimus と強い併用効果を認めており、SRC 阻害剤である dasatinib と everolimus の併用効果についても今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Miyake Naomi, Chikumi Hiroki, Yamaguchi Kosuke, Takata Miyako, Takata Miki, Okada Kensaku, Kitaura Tsuyoshi, Nakamoto Masaki, Yamasaki Akira | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 Effect of Cetuximab and <i>EGFR</i> Small Interfering RNA Combination Treatment in NSCLC Cell Lines with Wild Type <i>EGFR</i> and Use of <i>KRAS</i> as a Possible Biomarker for Treatment Responsiveness | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Yonago Acta Medica | 6. 最初と最後の頁 085 - 093 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2019.03.012 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Izumi Hiroki, Yamasaki Akira, Takeda Kenichi, Kodani Masahiro, Touge Hirokazu, Tanaka Natsumi, Yanai Masaaki, Ueda Yasuto, Sakamoto Tomohiro, Nishii-Ito Shizuka, Makino Haruhiko, Yamaguchi Kosuke, Igishi Tadashi, Shimizu Eiji | 4. 巻 122 |
| 2. 論文標題 Acute-phase reaction induced by zoledronate and its effect on prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Lung Cancer | 6. 最初と最後の頁 200 - 205 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2018.06.022 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|