

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08790

研究課題名(和文) 胸部悪性腫瘍に対するmTORを標的とした治療開発

研究課題名(英文) Development of treatment targeting mTOR for chest malignancies

研究代表者

小副川 敦 (Osoegawa, Atsushi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：90432939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異陽性肺癌について、mTORシグナル伝達経路の活性化に伴う細胞増殖の指標として、治療に直結するバイオマーカーであるCDK4の発現を検討した。細胞周期関連遺伝子であるCDK4の高発現は、EGFR変異陽性肺癌において術後無再発生存、術後全生存ともに予後不良因子であったが、野生型症例では、有意差を認めなかった。EGFR変異陽性かつCDK4増幅のあるHCC827では、siRNAによるCDK4のノックダウンにより細胞増殖が抑制されたが、細胞周期への直接的影響だけでなく、mTORのリン酸化と下流のシグナル伝達を抑制していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌の半分以上を占める上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異陽性肺癌では、EGFRを標的とした治療法が開発され、進行癌においても1年以上の奏効が得られるようになっている。今回着目したmTORは、細胞増殖に重要な鍵を握っており、胸部悪性腫瘍においてもmTORの活性化が癌の悪性度と関係していることが分かっている。mTORの活性化による細胞増殖亢進のバイオマーカーとして、CDK4発現を検討した結果、臨床的にはEGFR陽性肺癌で予後不良因子であることが示された。CDK4阻害はmTOR阻害を介してEGFR変異陽性肺癌細胞の増殖を抑制することも初めて示され、今後の治療開発の礎をつくることができた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a therapeutic strategy aiming mTOR signaling pathway in thoracic malignancies, especially in EGFR mutated lung cancer. We examined the expression of CDK4 as an indicator of cell proliferation associated with activation of the mTOR signaling pathway. High expression of CDK4 was related with poor prognosis in surgically resected EGFR-mutant-positive lung cancer, but it was not significant in wild-type counterparts. HCC827, an EGFR-mutant and CDK4 amplified cell line, showed that knockdown of CDK4 suppressed cell proliferation. The mechanism of the growth inhibition was not only due to a direct effect on the cell cycle, but also due to an inhibition of mTOR phosphorylation and subsequent inhibition of its downstream signaling.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR変異陽性肺癌 cell cycle mTOR 悪性胸膜中皮腫

1. 研究開始当初の背景

ラパマイシンは 1999 年に FDA で免疫抑制剤として認可された後、その忍容性の高さから米国をはじめ、海外で広く使用されてきた。ラパマイシンが結合する mTOR (mechanical target of rapamycin) は、蛋白質や脂質、核酸の合成に関わり、また AKT をリン酸化して細胞生存、増殖にかかわっていることから、ラパマイシンの抗腫瘍効果についても期待された。実際、PI3K-AKT-mTOR 経路は、様々ながんでその活性化が報告されており、胸部悪性腫瘍 (肺がん、悪性胸膜中皮腫、乳がん) においても種々の報告がある。しかしながら、現在のところ、ラパマイシンやその誘導体単剤での悪性腫瘍に対する効果は限定的である。mTOR 複合体には、mTORC1 と mTORC2 の 2 種類があり、前者は LKB1-AMPK シグナル伝達経路に代表されるようなエネルギー代謝に関与し、後者は主に AKT の活性化に関わっている。ラパマイシンとその誘導体は、mTORC1 に選択的な allosteric 阻害剤であるため、mTORC1 阻害による負のフィードバックにより mTORC2 が活性化され、AKT が活性化されることや、mTOR の阻害がオートファジーを誘導するため、殺細胞効果が乏しいことが、単剤での効果が限られている要因であると考えられている。

我々は、胸部悪性腫瘍の患者由来がん培養細胞株の樹立を通じ、まれな EGFR 遺伝子変異 G719S を有し、EGFR-TKI 耐性でもある細胞株を用いて、EGFR-TKI 獲得耐性のメカニズムを解析した。この症例では PI3CA の変異や PTEN のコピー数低下を認め、PI3K-AKT-mTOR 経路が活性化していることを見出した。AKT の活性化は、PC-9 (EGFR-TKI 感受性変異である exon19 の欠失変異あり) においても観察されることから、EGFR 変異陽性肺癌に対する初回治療でもこの併用療法が有効である可能性もある。

ラパマイシンと異なり、次世代の mTOR 阻害剤として mTOR の ATP 競合的な阻害剤 (Torin1, PP242 など) が開発され、その有効性が期待されている。

2. 研究の目的

我々は本研究で、mTOR の多彩な機序に基づく様々な薬物併用療法を、がん細胞株や、大分大学 呼吸器・乳腺外科学で手術を行った症例の外科切除標本から樹立した、初代培養がん細胞株を用いて行い、胸部悪性腫瘍において mTOR は治療標的となりうるのか、という問いに対する答えを探索することとした。

3. 研究の方法

当初は、以下の 3 つのテーマを掲げ、それぞれに関する研究を進めた。

(1) EGFR 遺伝子変異を有する肺癌における PI3K-Akt-mTOR 経路の役割

EGFR-TKI (gefitinib, afatinib, osimertinib) と Torin1 との併用効果を、樹立した細胞株や、PC-9 を用いた細胞増殖抑制試験 (CellTiter-Glo 法) によって行った。

(2) 悪性胸膜中皮腫における mTORC1/2 阻害剤の効果

我々は、悪性胸膜中皮腫患者の胸水より、悪性胸膜中皮腫の初代培養株を樹立した。さらに、ニボルマブ投与前と獲得耐性後の液性検体より細胞株を樹立し、whole exome sequence を行い、腫瘍細胞の進化を解析した。

(3) TNBC に対する mTOR 阻害剤の有効性

我々は、低用量ラパマイシンが、DNA 二本鎖損傷修復機構に関わっており、PARP 阻害剤 olaparib

と併用することによってトリプルネガティブ乳癌に合成致死を引き起こすことを報告した。近年ホルモン陽性乳癌に対する治療で用いられる CDK4/6 阻害剤は、DNA 損傷修復のみならず、mTOR の制御にも関わっていることが報告されており、乳がん症例の初代培養細胞株樹立が困難であったことも鑑み、CDK4/6 を介したメカニズムについての検討を行う方針とした。

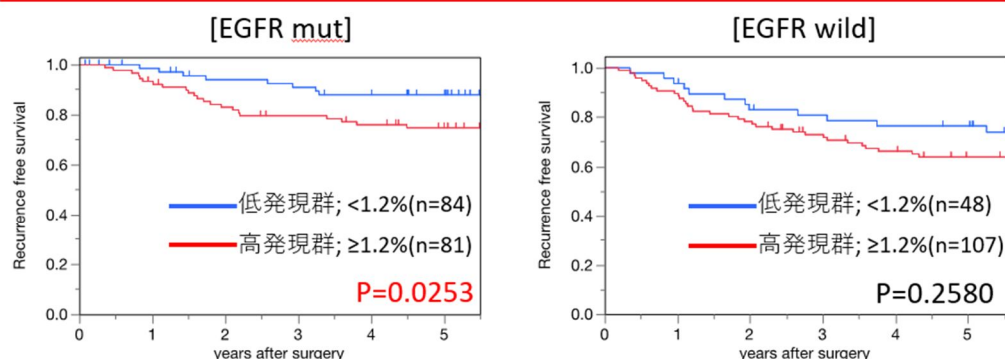
4. 研究成果

EGFR-TKI と Torin1 との併用効果を EGFR G719S 変異陽性肺癌症例から樹立した細胞株を用いた検討で明らかとし、論文化した。

また、EGFR 陽性肺癌症例において、EGFR の腫瘍内におけるコピー数の変化が CCNE1 のコピー数変化に関連していることを臨床検体において示し、論文化した。

さらに、EGFR 変異陽性肺癌切除症例において、CDK4 の発現が予後不良因子であることを明らかにした(下図)。

EGFR mut/wild肺癌におけるCDK4発現率と予後



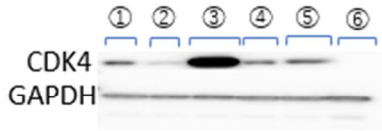
EGFR mut肺癌のRFSに対する単変量・多変量解析

| | | OR | 95% CI | p value | OR | 95% CI | p value |
|----------------------|-----------------------------|------|---------------|---------|------|-------------|---------|
| Age | ≥68 | 1.09 | 0.4488-1.7739 | 0.7452 | | | |
| Sex | Male | 1.00 | 0.4906-2.0467 | 0.9956 | | | |
| Smoking | Smoker | 0.95 | 0.4696-1.9584 | 0.9085 | | | |
| Surgical procedure | Lobectomy/ pneumonectomy | 0.42 | 0.1488-1.1946 | 0.1041 | | | |
| pT | ≥T2 | 5.73 | 2.8749-11.415 | <0.0001 | 3.50 | 1.646-7.456 | 0.0011 |
| pN | ≥N1 | 7.37 | 3.7790-14.371 | <0.0001 | 4.37 | 2.107-9.078 | <0.0001 |
| pl | Positive | 3.93 | 1.8338-8.4075 | 0.0004 | | | |
| v | Positive | 3.62 | 1.8519-7.0804 | 0.0002 | | | |
| lv | Positive | 3.90 | 1.7687-8.6216 | 0.0007 | | | |
| Histological subtype | Lepidic | 0.36 | 0.0852-1.5019 | 0.1320 | | | |
| CDK4 | Positive (≥1.2%) | 2.32 | 1.0858-4.9551 | 0.0298 | | | |

CDK4 高発現の EGFR 変異陽性肺癌細胞株である、HCC827 を用い、CDK4 の阻害による変化を検討したところ、細胞増殖能が抑制され、G1 静止を起こしていることが明らかとなった。CDK4 の阻害は、mTOR のリン酸化も抑制し、下流のシグナル伝達が抑制されたことから、EGFR 変異陽性肺癌における CDK4 の役割の一部に、mTOR シグナルの活性化による細胞増殖能の亢進が考えられた(下図)。

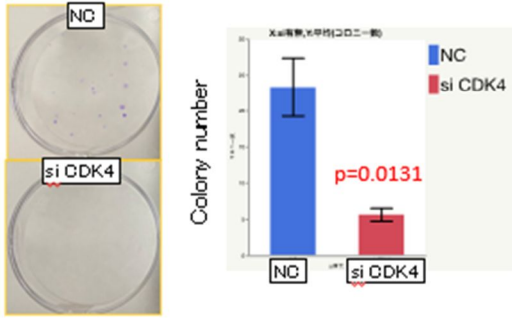
CDK4 knockdownによる増殖能の変化

【肺癌細胞株 (WB)】

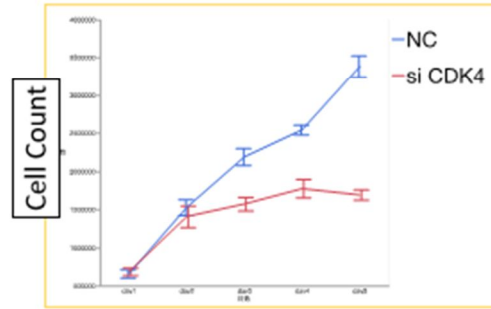


- ① A549
- ② HCC4006 (19del)
- ③ HCC827 (19del)
- ④ H1975 (L858R, T790M)
- ⑤ PC9 (19del)
- ⑥ H3255

【colony formation assay】

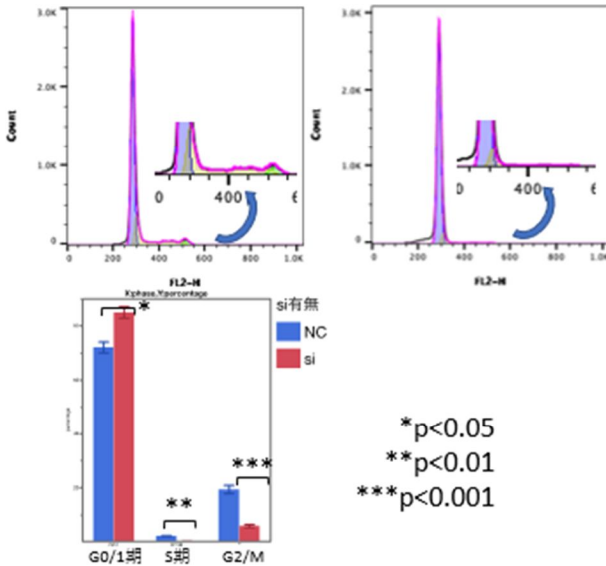


【細胞増殖曲線】



増殖能低下の原因

【①細胞周期】



【②mTORシグナル解析】



EGFR mut肺癌cell lineに対してCDK4 knockdownによってmTORシグナルが抑制される傾向を認めた。

悪性胸膜中皮腫においても、mTOR シグナルの活性化が治療抵抗性に関わっているかどうかを検討するため、術後に腹膜再発をきたした症例から、ニボルマブ治療前と、獲得耐性後のがん細胞株を樹立し、遺伝子異常の変化を次世代シーケンサーにより解析した。本症例では、POLD1 異常に伴う遺伝子変異の過剰な蓄積を認め、mTOR シグナルに関わる遺伝子の変化は明らかでなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hashimoto Takafumi, Osoegawa Atsushi, Takumi Yohei, Abe Miyuki, Kobayashi Ryoji, Miyawaki Michiyo, Takeuchi Hideya, Okamoto Tatsuro, Sugio Kenji | 4. 巻 124 |
| 2. 論文標題 Intratatumoral heterogeneity of copy number variation in lung cancer harboring L858R via immunohistochemical heterogeneous staining | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Lung Cancer | 6. 最初と最後の頁 241 ~ 247 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2018.08.013 | 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 Osoegawa Atsushi, Hashimoto Takafumi, Takumi Yohei, Abe Miyuki, Yamada Tomonori, Kobayashi Ryoji, Miyawaki Michiyo, Takeuchi Hideya, Okamoto Tatsuro, Sugio Kenji | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Acquired resistance to an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) in an uncommon G719S EGFR mutation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Investigational New Drugs | 6. 最初と最後の頁 999 ~ 1005 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10637-018-0592-y | 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 Ono Yuki, Takada Kazuki, Osoegawa Atsushi, Kinoshita Fumihiko, Oba Taro, Tsukamoto Shuichi, Tagawa Tetsuzo, Oda Yoshinao, Mori Masaki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 First-line osimertinib for leptomeningeal metastasis from lung adenocarcinoma with EGFR mutation as the initial and solitary site of postoperative recurrence | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal | 6. 最初と最後の頁 78 ~ 82 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-020-00453-z | 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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野 雄生、小副川 敦、奥 結華、田中 健祐、若洲 翔、木下 郁彦、高田 和樹、大場 太郎、田川 哲三、森 正樹 |
| 2. 発表標題 EGFR変異陽性肺癌における細胞周期関連因子の意義 |
| 3. 学会等名 日本外科学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 杉尾 賢二 (Sugio Kenji) (70235927) | 大分大学・医学部・教授 (17501) | |
| 研究分担者 | 岡本 龍郎 (Okamoto Tatsuro) (80568626) | 独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・呼吸器腫瘍科・医長 (87102) | |
| 研究分担者 | 田川 哲三 (Tagawa Tetsuzo) (90419557) | 九州大学・大学病院・講師 (17102) | |
| 研究分担者 | 波呂 祥 (Haro Akira) (90546558) | 九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102) | |
| 研究分担者 | 高田 和樹 (Takada Kazuki) (50806495) | 九州大学・大学病院・医員 (17102) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|