

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月13日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21790395

研究課題名（和文） 甲状腺がんモデルマウスを用いたチロシンキナーゼインヒビターの抗がん作用の解析

研究課題名（英文） New Tyrosine kinase inhibitor for thyroid medullary carcinoma treatment

研究代表者

川井 久美（KAWAI KUMI）

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50362231

研究成果の概要（和文）：本研究では新たなチロシンキナーゼ阻害剤による RET の阻害効果を培養細胞および甲状腺髄様がんモデルマウスで示すことを目的とした。用いた 2 種類の阻害剤は変異 RET を高発現する培養細胞株で濃度依存性に RET のリン酸化と下流のシグナル活性化を抑制した。また同時に細胞増殖・細胞運動・浸潤能も抑制することを示した。甲状腺髄様がんモデルマウスでは阻害剤投与でがん縮小効果が確認され、これら阻害剤の甲状腺髄様がん治療への臨床応用の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to demonstrate the effect of 2 new tyrosine kinase inhibitors against RET. Both drug inhibited RET phosphorylation and downstream signaling cascade in a dose-dependent manner. Furthermore, they suppressed cell growth, cell migration and invasion effectively. When medullary thyroid carcinoma model mice was treated with these drugs, significant reduction in thyroid tumor size was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000円	360,000円	1,560,000円
2010年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
2011年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：甲状腺がん、RET、遺伝子操作動物、チロシンキナーゼインヒビター

## 1. 研究開始当初の背景

2001年にBCR-ABLチロシンキナーゼ阻害薬が世界初の分子標的治療薬として慢性骨髄性白血病治療に開発され、チロシンキナーゼが分子標的治療薬の標的分子として重要な研究対象となっていた。様々なチロシンキナーゼ阻害薬が開発されて臨床試験が繰り返されており、治療対象となるがんの種類

も広がり、臨床応用されるものも増えてきていた。

(1)RETは受容体型チロシンキナーゼをコードするがん原遺伝子であり、RETの点突然変異が遺伝性腫瘍性疾患である多発性内分泌腫瘍症(MEN)2型・家族性甲状腺髄様がんの原因となることが知られていた。これらは外科的切除以外に有効な治療薬がないため、

RET の特異的阻害薬の開発は治療に大きく貢献することが期待されるが、RET を標的分子としてこれらの腫瘍性疾患の治療薬に認可されたキナーゼ阻害剤はなかった。

(2)応募者は MEN2A 型変異を導入した RET トランスジェニックマウス MoMuLV/RET-MEN2A を作製し、これらのマウスが甲状腺に全例髄様がんを発生し、血清カルシトニン値の上昇を認める甲状腺髄様がんモデルマウスであることを報告していた。阻害剤の RET に対する有効性を、適切なモデルマウスの系を用いて効率的に評価することで、臨床応用可能な薬剤を模索する事は早急に取り組むべき重要な研究課題であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、種々のキナーゼ阻害剤の RET への有効性を明らかにし、甲状腺髄様がんの分子標的治療薬としての評価をすることで臨床応用の可能性を探ることを目的とした。具体的には下記の二つを示すことに主眼をおいた。

(1) 変異 RET 発現培養細胞で、阻害剤が細胞増殖・RET タンパクのリン酸化・RET 下流のシグナル伝達系分子の活性化に与える影響を明らかにする。

(2) 甲状腺髄様がんモデルマウスで、阻害剤投与による腫瘍増殖抑制効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

変異 RET を発現する培養細胞および甲状腺髄様がんモデルマウスを用いて阻害剤効果の検討を行った。

### (1) 甲状腺髄様がん細胞株の樹立

新たに MoMuLV/RET-MEN2A マウス甲状腺髄様がん細胞株を樹立した。これまでに樹立した NIH3T3 マウス線維芽細胞に変異 RET を導入したものとともにこの新たな甲状腺髄様がん細胞を用いて以下の細胞レベルの効果検討を行った。

(2) 阻害剤投与の変異 RET を介するシグナル伝達系に与える影響を検討

これら培養細胞に阻害剤を  $0.01 \mu\text{M}$ ~ $10 \mu\text{M}$  の範囲で濃度を変えて投与し、3 時間後と 24 時間後にタンパクを抽出してウエスタンブロットティングを行い、RET の活性化、下流のシグナル伝達系因子の活性化に与える影響を検討した。

(3) 阻害剤投与の細胞増殖に与える影響を検討

これら培養細胞に阻害剤を  $0.01 \mu\text{M}$ ~ $10 \mu\text{M}$  の範囲で濃度を変えて投与し、24 時間後と 72 時間後で MTT アッセイを行い細胞増殖への影響を検討した。

(4) 阻害剤投与の細胞運動・細胞浸潤能に与

える影響を検討

これら培養細胞に  $1 \mu\text{M}$  と  $10 \mu\text{M}$  の 2 種の濃度で阻害剤を投与し、Boyden chamber assay およびスクラッチアッセイを用いて、24 時間後の細胞運動・浸潤能に与える影響を検討した。

(5) 阻害剤投与によるアポトーシス誘導効果の検討

これら培養細胞に阻害剤を  $0.01 \mu\text{M}$ ~ $10 \mu\text{M}$  の範囲で変えて投与し、24 時間後と 72 時間後にタンパクを抽出しアポトーシスの指標となる caspase 3 基質の切断産物のウエスタンブロットティングによる解析を行い、アポトーシス誘導効果を検討した。

(6) 甲状腺髄様がんモデルマウスである MoMuLV/RET-MEN2A マウスに阻害剤を経口投与し、その影響を腫瘍増殖・腫瘍組織像・腫瘍組織での RET タンパクリン酸化レベルなどの観点から検討した。阻害剤は Cremaphor/EtOH に溶解し水で希釈して最終濃度は  $10\text{mg/ml}$  とし、 $25\text{mg/kg/day}$  となるように経口ゾンデで週 5 日を 3 週間にわたり投与した。

## 4. 研究成果

(1) 甲状腺髄様がん細胞株の樹立

MoMuLV/RET-MEN2A マウス甲状腺髄様がんより新しい細胞株を樹立した。この細胞は倍加時間 15.9、変異 RET が高発現しており、RET は強くリン酸化されて下流のシグナル伝達系分子である MEK, AKT, ERK などのシグナルが活性化されていることが確認された。

(2) 阻害剤投与の変異 RET を介するシグナル伝達系に与える影響を検討

阻害剤の濃度を  $0.01 \mu\text{M}$ ~ $10 \mu\text{M}$  の範囲で変えて投与し、細胞内シグナル伝達系への影響を検討した。図 1 は MEN2A 型変異 RET を導入した NIH3T3 細胞に阻害剤 A と B を投与して 24 時間後にタンパクを抽出しウエスタンブロットティングを行ったものである。RET のリン酸化抑制が  $0.1 \mu\text{M}$  の低濃度より阻害剤の濃度依存的にみられたが、下流のシグナル伝達系分子である ERK・MEK・AKT のリン酸化抑制は阻害剤濃度が  $10 \mu\text{M}$  になってはじめて認められた。阻害剤 B でも同様の結果がえられ、また MEN2A 型変異 RET 導入細胞では MEN2B 型変異導入細胞より高い阻害効果が確認された。以上の結果よりこれらのキナーゼ阻害剤が RET リン酸化を効率的に抑制する有望な試薬であることが示された。

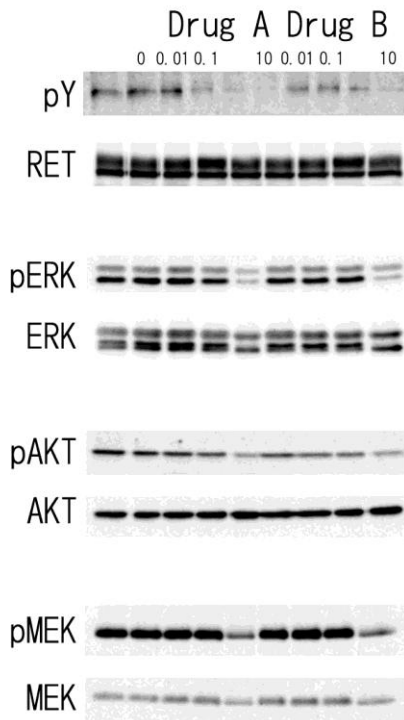


図1 MEN2A型変異RET発現NIH3T3細胞への阻害剤A・B投与後のRETと下流のシグナル分子のウェスタンブロットティング

(3) 阻害剤投与の細胞増殖に与える影響を検討

変異RET発現細胞ではコントロール細胞に比べて増殖速度が速い。しかし阻害剤投与によりMEN2B型RETを導入した細胞でもMEN2A型RETを導入した細胞でも高い増殖抑制効果が示された。コントロールを投与した細胞に比し阻害剤を投与した細胞の増殖は25%~50%に抑制された。図2はMEN2A型およびMEN2B型変異RETを導入したNIH3T3細胞に阻害剤A, Bを投与した時の細胞増殖をコントロール投与群を100としたときにこれと比較して阻害剤投与群での高い増殖抑制を示したものである。

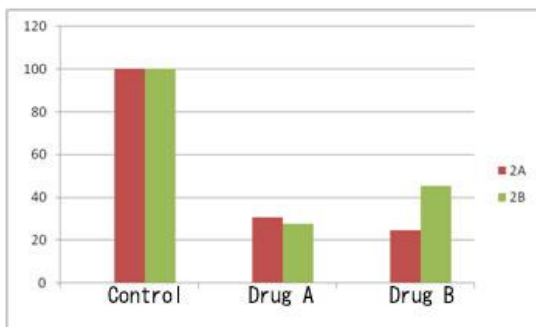


図2 阻害剤A, Bによる細胞増殖抑制

(4) 阻害剤投与の細胞運動・細胞浸潤能に与

える影響を検討

これら培養細胞に阻害剤を投与し、Boyden chamber assay およびスクラッチアッセイを用いて、細胞運動・浸潤能に与える影響を検討したところコントロールであるDMSOを投与した細胞に比べてこれらの阻害剤を投与した細胞では有意に細胞運動・浸潤能が抑制された。図3はMEN2A型およびMEN2B型変異RETを導入したNIH3T3細胞に阻害剤A, Bを投与した時の細胞運動をコントロール投与群と比較して阻害剤投与群での高い運動抑制を示したものである。

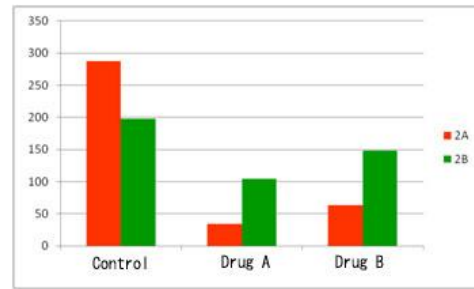


図3 阻害剤A, Bによる細胞運動抑制

(5) 阻害剤投与によるアポトーシス誘導効果の検討

これらの細胞に阻害剤を投与し、3時間後、24時間後でそれぞれアポトーシスが誘導されているかをアポトーシスの指標となるcaspase 3基質の切断産物のウェスタンブロットティングで検討した。図4のように阻害剤A, Bともに投与3時間ではアポトーシスは誘導されなかったが、24時間でアポトーシスが誘導されてcaspase3の切断産物が認められることがウェスタンブロットで確認された。

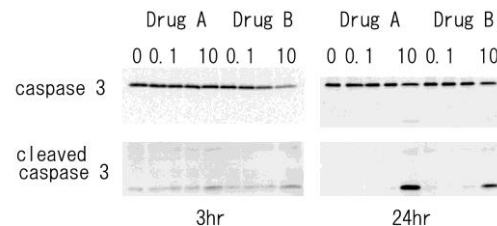


図4 阻害剤A, Bによるアポトーシス誘導

(6) MoMuLV/RET-MEN2Aマウスへの阻害剤投与  
これら阻害剤を甲状腺髄様がんモデルマウスであるMoMuLV/RET-MEN2Aマウスに週5日、3週間経口投与した後、解剖して甲状腺腫瘍サイズを検討した。阻害剤投与群ではコントロール投与群に比べ甲状腺腫瘍サイズが有意に低下し、阻害剤による甲状腺髄様がん縮小効果が個体レベルで確認された。なお正常コントロールマウスでは薬剤投与による死亡や体重減少、甲状腺サイズの変化などの明

らかな異常は認められなかった。

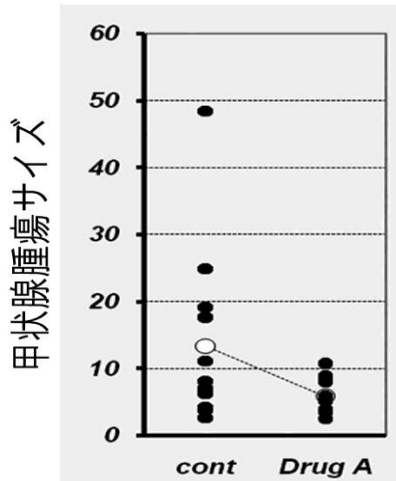


図5 阻害剤Aによる甲状腺腫瘍縮小

昨年アメリカで甲状腺髄様がんを標的としたキナーゼ阻害剤が初めてFDAによる認可を受けた。この薬剤は培養細胞および、マウスへの腫瘍細胞移植モデルではRETの活性抑制や腫瘍増殖抑制効果が示されており、RETを標的とした分子標的薬として最も期待される薬剤の一つであった。臨床治験をへて甲状腺髄様がんに対して認可がおりたことは甲状腺がん治療の発展の上で大きな進歩であったが、残念ながらその認可内容にはRETを標的とした効果は認められなかった。

昨年複数のグループより、ヒト肺がん、腺癌においてRET遺伝子の再構成がその原因となるという報告がなされてより、RETを標的とした治療薬の開発の重要性は増してきている。本研究で用いた薬剤は培養細胞でのRETの活性抑制効果に加え、甲状腺髄様がんモデルマウスでも腫瘍抑制効果を示していることから今後の臨床応用に期待が持てるものである。本研究で得られた成果はRETを標的とした薬剤研究の上で重要な基礎データを提供するものであり、将来肺がん治療への応用の可能性が期待される。

##### 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6件)

- ① José Eduardo A. R. Marian, Yukihiro Shiraki, Kumi Kawai, Sawako Kojima, Yasuhiko Suzuki and Kenzo Ono Revisiting a medical case of "stinging" in the human oral cavity caused by ingestion of raw squid (Cephalopoda: Teuthida): new data on the functioning of squid's spermatophores. Zoomorphology 査読有[in press], 2012
- ② Yukihiro Shiraki, Kumi Kawai, Sawako

Kojima, Yasuhiko Suzuki and Kenzo Ono: Stinging in the oral cavity caused by ingestion of the sperm bags of a squid: A case report. Pathol Int 査読有 61: 749-751, 2011

- ③ Hae Jin Kee, Ju-Ryoung Kim, Hosouk Joung, Nakwon Choe, Song Eun Lee, Gwang Hyeon Eom, Jeong Chul Kim, Stefan H Geyer, Mayumi Jijiwa, Takuya Kato, Kumi Kawai, Wolfgang J Weninger, Sang-Beom Seo, Kwang-Il Nam, Myung Ho Jeong, Masahide Takahashi and Hyun Kook: Ret finger protein inhibits muscle differentiation by modulating serum response factor and enhancer of polycomb1. Cell Death Differ 査読有 19: 121-131, 2011
- ④ 川井久美、今井常夫、高橋雅英 多発性内分泌腫瘍症(MEN) 病理と臨床、査読無、29巻、711-717, 2011
- ⑤ Rieko Miyamoto, Mayumi, Jijiwa, Masato Asai, Kumi Kawai, Maki Ishida-Takagishi, Shinji Mii, Naoya Asai, Atsushi Enomoto, Yoshiki Murakumo, Akihiko Yoshimura and Masahide Takahashi Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice. Developmental Biololgy 査読有 349: 160-168, 2011
- ⑥ Kumi Kawai, Takayuki Itoh, Aki Itoh, Makoto Horiuchi, Kouji Wakayama, Peter Bannerman, James Y Garbern, David Pleasure and Tullia Lindsten Maintenance of the relative proportion of oligodendrocytes to axons even in the absence of BAX and BAK. European Journal of Neuroscience 査読有 30: 2030-2031, 2009

[学会発表] (計1件)

- ① 川井久美、甲状腺髄様癌とRET遺伝子の分子生物学、第44回甲状腺外科学会学術集会、平成23年10月7日、米子BIGSHIP (鳥取)

##### 6. 研究組織

###### (1) 研究代表者

川井 久美 (KAWAI KUMI)  
愛知医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50362231

###### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

###### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：