

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592078

研究課題名(和文) HSP90阻害剤を用いたKRas変異型非小細胞肺癌に対する新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapies for the treatment of KRas mutated non small lung cancer using a HSP90 inhibitor

研究代表者

森田 一郎 (MORITA, ICHIRO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30200413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：HSP90は悪性腫瘍に恒常的に発現され、癌化にかかわる多くのタンパク質と相互作用することから悪性腫瘍に対する新規治療のターゲットとして注目されている。新規HSP90阻害剤：AUY922はKRas依存型肺腺癌に対しapoptosis誘導による抗腫瘍効果を誘導した。また当該阻害剤は、EGFR変異型肺腺癌や、EML4-ALK発現型肺腺癌に細胞死を誘導した。AUY922はKRas変異型肺腺癌を含む非小細胞肺癌に対し有効な治療法となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Hsp90 inhibitors are substances that inhibit the activity of the Hsp90 heat shock protein. Since Hsp90 stabilizes a variety of proteins required for survival of cancer cells, these substances may have therapeutic benefit in the treatment of various types of malignancies. In the present study, we have evaluated the antitumor effects of a novel HSP90 inhibitor, AUY922 for the treatment of lung cancer. AUY922 suppressed cell viability and induced apoptosis in KRas addicted pulmonary adenocarcinoma cells. More, the inhibitor showed antitumor effect in EGFR-TK mutation or EML4-ALK positive lung cancer cells. These results indicate that AUY922 looks to be a promising treatment for non small cell lung cancer including pulmonary adenocarcinoma harboring KRas mutation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、呼吸器外科学

キーワード：KRas HSP90 inhibitor

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌、特に腺癌に対する分子標的治療研究が進み、EGFR-TK 変異型肺癌に対する TK inhibitor : gefitinib や elrotinib の治療効果が明らかとなってきた (Paez JG et al. Science 304: 1497-1500, 2004)。さらに近年野らによって報告された新しい肺癌標的分子 EML-4ALK 発現型肺癌に対する、ALK inhibitor: crizotinib の有効性が報告されてきている (Mano H et al. Nature 448: 561-6, 2007, Curr Treat Options Oncol. 11:36-44, 2010)。一方喫煙との関連が報告されている KRas 変異型非小細胞肺癌は、前 2 者とは排他的関係にあり、gefitinib、elrotinib 或は他の化学療法における負の効果因子であることが報告されている (Hirsch FR et al. J Clin Oncol. 24:5034-42, 2006)。このように KRas 変異型非小細胞肺癌に対する治療法が未だ確立されない中、2009 年 Sos らは遺伝子背景の異なる肺癌細胞株を用いた検討より KRas 変異型非小細胞肺癌に多く特定 HSP 阻害剤が高い感受性を示すことを報告した (Sos M et al. J Clin Invest. 119:1727-40, 2009)。

2. 研究の目的

HSP90 は主要な細胞内分子シャペロンのひとつであり、細胞ストレス状況の下でその発現量が増大する。HSP90 は正常細胞にも存在するが、悪性腫瘍には恒常的に発現され、癌化にかかわる多種のタンパク質と相互作用することが知られている。そして HSP90 阻害薬は癌における多数のシグナル伝達経路を阻害し、細胞周期、細胞分裂、apoptosis、ストレス耐性などに関わる複数のクライアント蛋白質を同時に阻害し、癌の増殖を抑制する。特に、創薬技術の発展が目覚ましい中、新規分子標的薬として開発された AUY922 はその HSP 阻害効果の高さとその特異性から、最も癌治療への臨床応用に近いと考えられている (Bergstrom et al, J Nuc Med 49:1204-10, 2008)。そこで、本研究において、新規阻害剤を用いて **HSP90** を標的とし、**KRas 変異型非小細胞肺癌** に対する新しい治療法開発のための基礎的検討を行う。

3. 研究の方法

研究初年度において 新規 HSP90 阻害剤の KRas 変異型非小細胞肺癌への *in vitro* における抗腫瘍効果及び作用機序の解析を行った。

A: 新規 HSP90 阻害剤; AUY922 の肺癌細胞株を用いた *in vitro* における抗腫瘍性の検討
AUY922 および遺伝子背景の異なる各種非小細胞肺癌細胞株を使用し検討する。

B: 阻害剤の作用機序の解析

特異的抗体および Immuno blot 法また Hoechst

染色を用い AUY922 の KRas 変異型非小細胞肺癌における抗腫瘍効果誘導機序の解析を行う。

平成 24 年度以降、AUY922 の正常細胞・組織障害の検討を行うとともに、他種抗癌剤、分子標的薬剤との併用効果の検討を行う。さらに肺癌モデルマウスを用いた *in vivo* での抗腫瘍効果の検討を行う。

C: 正常細胞・組織障害の評価

正常ヒト皮膚線維芽細胞株: HFF を用いて新規 HSP90 阻害剤: AUY922 の誘導する増殖抑制効果及び細胞死を解析し、正常細胞に対する効果を検討する。

D: 抗癌剤・分子標的薬剤と併用効果の検討
KRas 変異型肺癌細胞株を用い、新規 HSP90 阻害剤: AUY922 および他種抗癌剤・分子標的薬剤を併用することで誘導される細胞死を単独投与群、非投与群と比較することで併用効果を検討する。

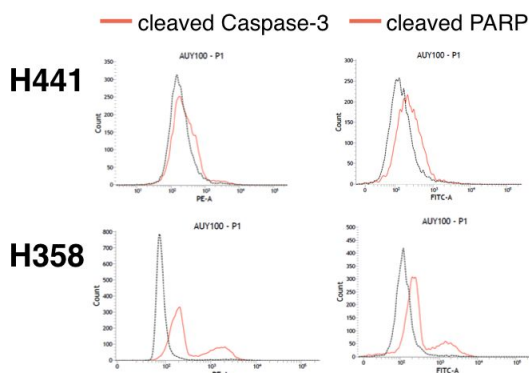
4. 研究成果

A: 新規 HSP90 阻害剤; AUY922 の肺癌細胞株を用いた *in vitro* における抗腫瘍性の検討

Trypan blue exclusion assay による cell viability 解析の結果より当該阻害剤は、Ras 変異型で Ras 依存型である肺腺癌株: H358、H441 における細胞増殖を抑制し、細胞死を誘導した。一方で Ras 変異型で Ras 非依存型の肺腺癌株 A549 に対する増殖抑制効果は微弱であった。さらに KRas 野生型である H322 株は本薬剤に対して抵抗性であった。さらに他の driver 変異を持つ肺癌に対する抗腫瘍性を解析するために、EGFR 変異型肺腺癌株 H1690、H1975 および EML4-ALK 肺腺癌株 H2228 を用いた検討を行ったところこれらのすべての株は、AUY922 に対して sensitive であった。以上より新規 HDAC 阻害剤: AUY922 は、Ras 依存型の Ras 変異型肺腺癌株に対して、さらに他の driver 変異を持つ肺癌に対しても抗腫瘍性を示す可能性があることが示唆された。加えて、当該阻害剤は胸膜中皮腫細胞株: H28、H2052 に対しても抗腫瘍性を示した。

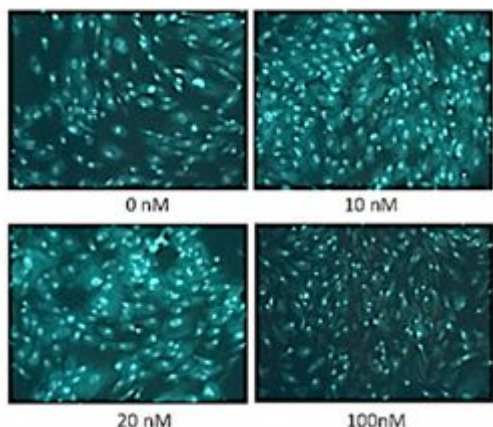
B: 阻害剤の作用機序の解析

Hoechst33342 染色による解析にて、AUY922 は Ras 変異型で Ras 依存型である肺腺癌株: H441、H358 者に対し、クロマチン凝集を伴う apoptosis を誘導したが、一方で Ras 変異型で Ras 非依存型の肺腺癌株 A549 ではこの変化は認められなかった。さらに細胞死を詳細に解析するために、抗 caspase-3 抗体および抗 PARP 抗体を用いた Flowcytometry による解析を施行した。AUY922 により H441 細胞、H358 細胞において caspase3 の活性化および PARP の cleavage を誘導された。このことより AUY922 の誘導する細胞死は caspase を介した apoptosis であることが示された。



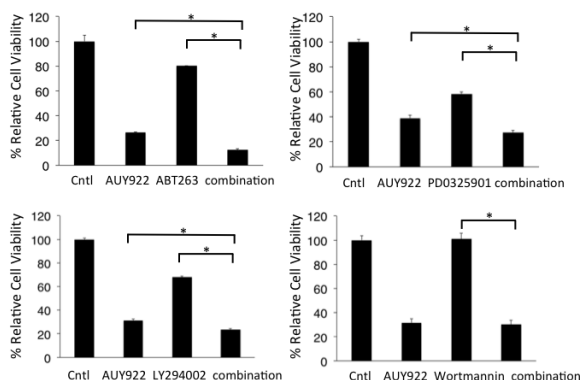
C: 正常細胞・組織障害の評価

正常ヒト皮膚線維芽細胞株: HFF に対し、AUY922 投与後 72 時間における細胞死を Hoechst33342 染色および TUNEL 法にて評価した。AUY922 10nM-100nM の範囲で Hoechst 染色において、クロマチン凝集などの programmed death を示唆する所見は認められなかった(下図参照)。また TUNEL 法にて視認された apoptotic cell 数は Ras 変異型で Ras 依存型である肺腺癌株: H358 細胞に比して低値にとどまった。このことより当該阻害剤の正常細胞に対して apoptosis を誘導しにくい特徴を有することが示唆された。



D: 抗癌剤・分子標的薬剤と併用効果の検討

HSP90 阻害剤 AUY922 の抗腫瘍効果を増強させることを目的とし、当該阻害剤に加え、Bcl-2 family 阻害剤である ABT263、MEK 阻害剤: PD032590、PI3K 阻害剤: LY294002 および Wortmannin との併用療法を検討した。AUY922 に対して感受性の低い Ras 変異型で Ras 非依存型の肺腺癌株 A549 に対し、ABT263、PD032590 および LY294002 は AUY922 の誘導する細胞増殖抑制効果を増強させた。Wortmannin にはこの combination 効果は認められなかった。AUY922 25nM に対し、ABT263 (2.5 μM)、PD032590 (1 μM)、LY294002 (10 μM) および Wortmannin (2.5 μM) を併用した際の cell viability を以下に示す。また t 検定による有意差を示す。*p < 0.01



E: *in vivo* での併用効果の検証

肺癌モデルマウスに対し、AUY922 および検討項目 D で使用した薬剤との併用効果を検討し、data 解析を行っている。

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0件)

[学会発表](計2件)

深澤拓也, 山辻知樹, 繁光薫, 高岡宗徳, 木下真一郎, 森田一郎, 前田豊, Mary Durbin, Soucek Laura, 猶本良夫. Inhibition of Myc Effectively Targets KRAS Mutation-positive Lung Cancer. 第64回日本胸部外科学会定期学術集会 2011年11月10日 於愛知県名古屋市

深澤拓也, 森田一郎, 木下真一郎, 吉田和弘, 山辻知樹, 繁光薫, 林次郎, 松岡順次, 前田豊, Durbin Mary, Soucek Laura, 猶本良夫. K-ras 及び Myc を標的とした新規非小細胞肺癌治療法の開発. 第52回日本肺癌学会総会 2011年11月4日 於大阪府大阪市

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/index.html>

6. 研究組織

(1) 森田一郎
(MORITA ICHIRO)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30200413

(2) 深澤拓也
(FUKAZAWA TAKUYA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：20379845

(3) 繁光薫
(SHIGEMITSU KAORI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50585007

(3)連携研究者 無