

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790903

研究課題名（和文）Ras シグナル活性化変異を有する原発性肺癌を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel targeted therapy for lung cancer with activating Ras mutation

研究代表者

竹内 伸司（TAKEUCHI SHINJI）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：90565384

研究成果の概要（和文）：EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)に自然耐性を示す K-ras 活性化変異を有する肺癌に対しては、未だ有効な分子標的薬はない。我々は  $\beta$ -phenylthyl isothiocyanate (PEITC)による活性酸素産生を介した K-ras 変異肺癌細胞に対する抗腫瘍効果について検討を行った。PEITC を添加すると K-ras 変異肺癌細胞の生存率は低下し、アポトーシスが誘導された。マウス皮下移植モデルにおいては、PEITC 投与によって著明な腫瘍縮小効果を認め、毒性はほとんど認めなかった。また、ヒト正常肺線維芽細胞や K-ras 野生型の肺癌細胞は PEITC に対する感受性が低かった。以上の結果から、PEITC は K-ras 変異肺癌細胞に選択的な殺細胞効果を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：There are still no effective targeted therapies for patients with K-ras activating mutations which is a cause of intrinsic resistance to EGFR-TKI. Here, we assessed therapeutic effect of  $\beta$ -phenylthyl isothiocyanate (PEITC) on lung cancer cells with K-ras activating mutations through production of reactive oxygen species (ROS). Treatment with PEITC reduced cell viability and induced apoptosis in K-ras mutant lung cancer cells. In a xenograft model, PEITC dramatically reduced tumor growth with less toxicity. Moreover, normal human fibroblasts and K-ras wild lung cancer cells were significantly less sensitive to PEITC. Our findings suggest that PEITC can selectively kill lung cancer cells with K-ras activating mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、Ras、ROS

### 1. 研究開始当初の背景

わが国の肺癌死亡数は、男女とも増加し続けており、男性ではがん死亡数の第1位、女性でも第3位である。さらに、今後25年間に男女とも約3倍になると予想されており、手術不能例、再発例に対する有効な新規治療薬の開発が切望されている。

Ras タンパクは、正常細胞の成長やがん細胞の形質転換を調節するシグナル伝達経路を制御する。正常細胞においては、Ras 活性は厳密に制御され、通常不活性型で存在し、上皮成長因子受容体(EGFR)などの上流のシグナルカスケードにより活性化される。しかし、Ras 遺伝子を活性化させる点突然変異が

生じると、Ras タンパクは恒常的に活性化され下流へシグナルを送り続けることになり、発がんやがん細胞の生存、増殖に寄与すると考えられている。Ras 遺伝子のファミリーには H-ras、K-ras、及び N-ras の3種類があるが、がんで変異がみられるのは主に K-ras である。192 人の日本人肺腺がん患者における検討では K-ras の点突然変異は 13% に認められ、EGFR 遺伝子変異と排他的な関係にあることが報告されている (Cancer Res 64:8919-8923, 2004)。また、K-ras 遺伝子変異のある肺がん患者は EGFR-TKI に対して耐性を示すことも知られている (PLoS Med e17:0057-0061, 2005) (Clin Cancer Res 13:2890-2896, 2007)。2008 年に EGFR 遺伝子変異を有する東洋人の肺腺がん患者において EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 Gefitinib が有意に無増悪生存期間を延長したとの臨床試験 (IPASS 試験) の結果が報告され、その効果が改めて証明された一方、K-ras 遺伝子変異を有する肺がんに対しては、現在有効な分子標的薬はない。

最近、活性化型 Ras 遺伝子を発現させ形質転換した卵巣上皮細胞において活性酸素 (ROS) が上昇しており、このがん化した細胞に  $\beta$ -phenylthyl isothiocyanate (PEITC) を加えると細胞内の主要な抗酸化成分である glutathione を低下させることにより、さらに ROS レベルが上昇し細胞死が誘導されることが報告された (Cancer Cell 10:241-252, 2006)。この論文において活性化型 Ras を発現させていない通常の卵巣上皮細胞ではこのような現象はみられなかったことから、PEITC は Ras シグナルが活性化した細胞を選択的に細胞死へ誘導できる可能性が示唆された。そこで、PEITC が K-ras 変異を含む Ras シグナルの活性化変異を有する肺がんに対しても有効ではないかと考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、Ras シグナル活性化変異、特に K-ras 変異を有する肺がんに対してがん細胞特異的に細胞死を誘導する治療法を開発することを目的として検討を開始した。

## 3. 研究の方法

(1) *In vitro* において K-ras 変異を有する肺がん細胞株 H23 に対する PEITC の抗腫瘍効果を MTT 法で検討した。

(2) K-ras 野生型の肺がん細胞株 H520 や正常肺線維芽細胞 MRC-5 に対する PEITC の影響を MTT 法で検討した。

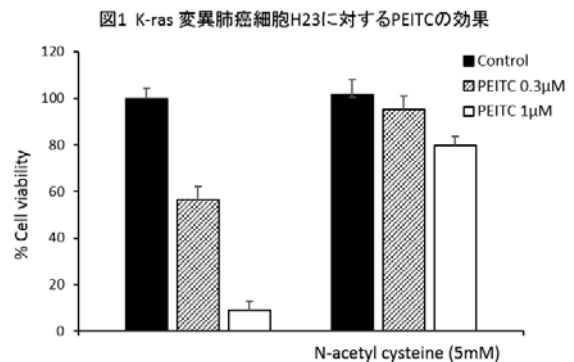
(3) *In vitro* において、PEITC による抗腫瘍効果のメカニズムを解析するため、

Western blot 法でタンパク発現の変化を解析した。

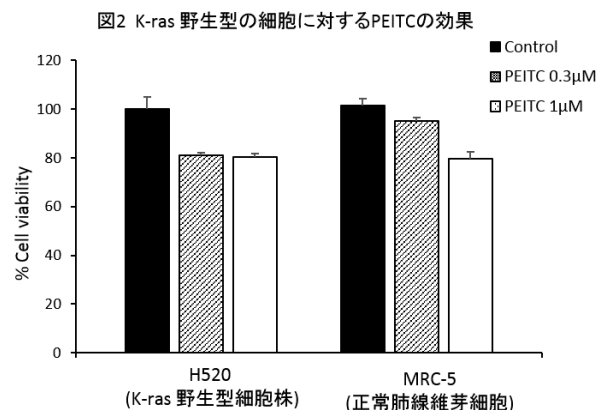
(4) PEITC の *in vivo* における抗腫瘍効果について、重度免疫不全 (SCID) マウスの皮下へ H23 細胞を移植し、移植 1 週間後から PEITC を連日腹腔内投与して検討を行った。また、PEITC 投与中のマウス体重を測定し、毒性についても評価した。

## 4. 研究成果

(1) K-ras 変異を有する肺がん細胞株 H23 に PEITC を添加すると細胞の生存率が著明に抑制された。また、抗酸化剤である N-acetyl cysteine を添加することによってその効果がほぼみられなくなったことから、活性酸素の上昇による酸化ストレスによって細胞死を誘導していることが示唆された (図 1)。

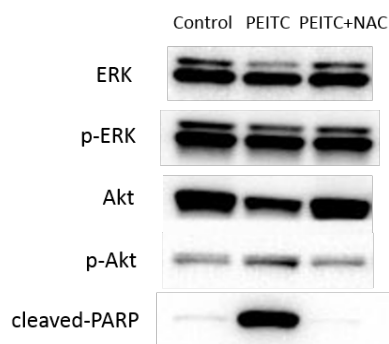


(2) K-ras 野生型の肺がん細胞株 H520 とヒト正常肺線維芽細胞 MRC-5 に対する PEITC の影響を検討したところ、いずれの細胞も PEITC による生存率低下は軽度であった。この結果から、PEITC が K-ras 変異肺がん細胞に特異的な効果を有することが示唆された (図 2)。



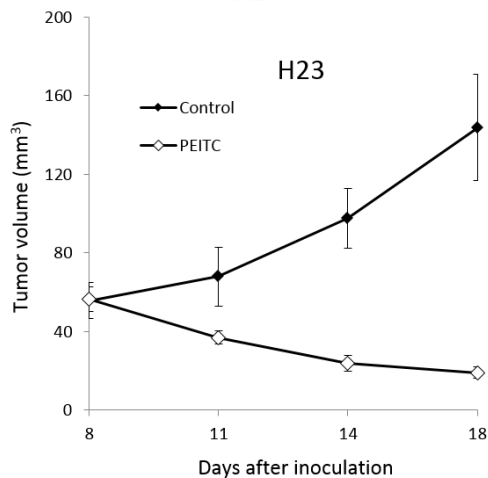
(3) H23 細胞に PEITC を添加してタンパク発現の変化を解析したところ、PEITC によって cleaved-PARP の発現が著明に上昇しており、アポトーシスが誘導されていることが確認された。また、その効果は抗酸化剤である N-acetyl cysteine を併用することによってほぼ完全に抑制され、活性酸素産生を介した効果であることが示唆された。また、主要な増殖シグナルである PI3K 経路と MAPK 経路の下流に位置する Akt と ERK を評価したところ、リン酸化は抑制されておらず、PEITC による抗腫瘍効果が増殖シグナルの阻害を介したのではないことが示唆された (図 3)。

図3 H23細胞に対するPEITCのアポトーシス誘導効果



(4) マウス皮下移植モデルにおいて、H23 細胞に対する PEITC の抗腫瘍効果を評価したところ、コントロールと比較して著明な腫瘍増殖抑制効果を確認した。また、PEITC 投与によってマウス体重の減少はみられず、毒性も軽度であることが示唆された (図 4)。

図4 マウス皮下移植モデルにおけるPEITCの効果



以上の結果から、PEITC は K-ras 変異肺癌細胞に対して活性酸素産生促進による酸化ストレスを介した殺細胞効果を有することが示唆され、正常細胞やマウスに対する影響も軽度であることから新規治療法として有望であると考えられた。

Ras 遺伝子の点突然変異は、ヒトの癌の 20% 以上で認められる。肺癌の他に、大腸癌において K-ras 変異は 32% に認められ (Nat Rev Cancer 7:295-308, 2007)、K-ras 変異を有する患者は抗 EGFR 抗体に対して耐性を示すことが知られている。また、化学療法に対して抵抗性を示すことが多く予後不良な膵臓がんにおける K-ras 変異の検出頻度はさらに高く、90% にも上る。これら化学療法に難治性の癌腫に対しても本研究成果は応用できる可能性があり、今後さらに検討を進めていきたい。

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 9 件)

1. Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. The novel phosphoinositide 3-kinase-mammalian target of rapamycin inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib resistance of epidermal growth factor receptor mutant lung cancer cells triggered by hepatocyte growth factor., *Int J Cancer*, 133:505-13, 2013. 査読有 doi: 10.1002/ijc.28034.
2. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, Yano S. Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor for overcoming erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 11:2149-57, 2012. 査読有 doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0195.
3. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. *Am J Pathol*, 181:1034-43, 2012 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2012.05.023.

4. Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Uenaka T, Yano S. Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells. Clin Cancer Res, 18:3592-602, 2012. 査読有 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2972.
5. Yano S, Takeuchi S, Nakagawa T, Yamada T. Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor receptor ligands. Cancer Sci, 103:1189-94, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02279.x.
6. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Met kinase inhibitor E7050 reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR mutant lung cancer. Clin Cancer Res, 18:1663-71, 2012. 査読有 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1171.
7. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. J Thorac Oncol, 6:2011-7, 2011. 査読有 doi: 10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd.
8. Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung VT, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, Sone S. Mol Cancer Ther, 10:1218-28, 2011. 査読有 doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0707.
9. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. Clin Cancer Res, 15:17:2260-9, 2011. 査読有 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1993.

[学会発表] (計2件)

1. 日本がん分子標的治療学会第16回学術集会 分子標的薬に対する側副経路活性化による耐性メカニズム 竹内伸司, 矢野聖二 2012年6月28日
2. 第70回日本がん学会学術総会 Met/VEGFR-2阻害剤E7050は変異型EGFR肺がんにおいてHGFによるEGFR-TKI耐性誘導を克服する 竹内伸司, Wang Wei, Li Qi, 山田 忠明, Donev Ivan, 小泉 瞳, 中村 隆弘, 松本 邦夫, 西岡 安彦, 曾根 三郎, 上仲 俊光, 矢野 聖二 2011年10月3日

[図書] (計1件)

1. 竹内伸司, 矢野聖二, がんと化学療法社, Biotherapy 25巻5号, 2011年, 834~841頁

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 伸司 (TAKEUCHI SHINJI)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 90565384

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし