

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501360

研究課題名(和文) MET遺伝子増幅胃癌におけるMETチロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文) Antitumor Action of the MET Tyrosine Kinase Inhibitor in Gastric Cancer Positive for MET Amplification

研究代表者

岡本 渉 (Okamoto, Wataru)

独立行政法人国立がん研究センター・早期・探索臨床研究センター・医員

研究者番号：30441075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MET遺伝子増幅をもつ胃癌細胞は、METチロシンキナーゼ阻害剤(MET阻害剤)の暴露により、アポトーシスをおこすことで著明な抗腫瘍効果を示す。本研究は、MET阻害剤により引き起こされるアポトーシスの分子メカニズムを明らかにした。また、患者検体から得られた組織標本を用いて、日本人の胃癌におけるMET遺伝子増幅の頻度や予後などの疫学情報を明らかにした。さらに、MET阻害剤が臨床応用された後に問題となることが想定される、薬剤耐性のメカニズムを解析するために重要なMET阻害剤耐性の胃癌細胞株を樹立した。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that induction of apoptosis underlies the antiproliferative effect of MET tyrosine kinase inhibitors (MET-TKIs) in gastric cancer cells with MET amplification. In the present study, we showed the molecular mechanism underlying its MET-TKIs-induced apoptosis. We also determined the prevalence, clinical features and prognosis of gastric cancer with MET amplification. We further established the MET-TKIs-resistant gastric cancer cell lines, which is important to reveal the MET-TKIs-resistant mechanisms.

研究分野：消化器癌、トランスレーショナルリサーチ

キーワード：MET遺伝子増幅 胃癌 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

MET は細胞表面に発現し癌細胞の増殖、進展や浸潤などに関わる細胞内シグナルを司るレセプタータイプのチロシンキナーゼである。過去の研究において、胃癌は MET 遺伝子増幅の頻度が高いことが報告されており、MET をターゲットとした治療戦略が注目されている。

我々は、MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株において、MET チロシンキナーゼ阻害剤がアポトーシスを誘導することで著明な細胞増殖抑制効果を示すことを見出し、報告した(引用文献)。このことは、MET 遺伝子増幅を有する胃癌の増殖や進展が MET シグナルに大きく依存しており、MET チロシンキナーゼ阻害剤は、この増殖シグナルを遮断することで、著明な抗腫瘍効果が示すことを意味している。これらの基礎的研究の成果から、MET 遺伝子増幅を有する進行胃癌患者において、MET チロシンキナーゼ阻害剤は重要な治療手段になることが期待される。

EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌において、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤によって EGFR の主要な下流シグナルである PI3K/AKT、MEK/ERK 経路が抑制され、変異陽性細胞がアポトーシスを起こすことが報告されているが(引用文献)。そのアポトーシスの分子メカニズムとして、我々は EGFR - PI3K/AKT 経路の抑制による survivin 発現低下、および、EGFR - MEK/ERK 経路の抑制による BIM 発現上昇が関与していることを見出し報告している(引用文献)。

MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株を MET チロシンキナーゼ阻害剤で暴露した際に細胞内で生じる下流シグナルの変化について、我々は MEK/ERK、PI3K/AKT 経路に加え、Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が MET チロシンキナーゼ阻害剤によって誘導されるアポトーシスに関与していることを見出し(図1)報告した(引用文献)。しかし、MET チロシンキナーゼ阻害剤により抑制される MEK/ERK、PI3K/AKT、STAT3 経路がアポトーシス関連因子に与える影響は、解明されていない。

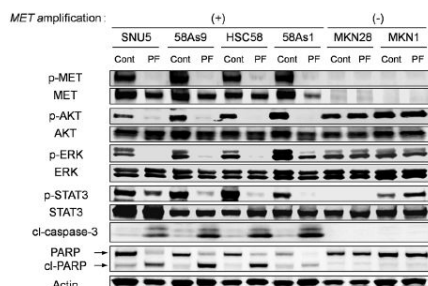


図1 MET チロシンキナーゼ阻害剤による胃癌細胞株の細胞内シグナル変化とアポトーシスの誘導
MET amplification: MET 遺伝子増幅, Cont: control, PF: MET チロシンキナーゼ阻害剤

2. 研究の目的

MET チロシンキナーゼ阻害剤による細胞内シグナルの変化やアポトーシス関連因子への効果を検討することで、MET キナーゼ阻害剤による抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにする。

また、胃癌患者の組織検体を用いて MET 遺伝子増幅の頻度を明らかにすることで、MET に対する分子標的治療の重要性についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株を MET チロシンキナーゼ阻害剤に暴露した際、MET 遺伝子増幅を有する細胞株においては、アポトーシス関連因子 BIM の発現上昇および survivin, c-IAP1, XIAP の発現低下がおり、MET 遺伝子増幅を有さない細胞株では、BIM, survivin, c-IAP1, XIAP の発現変化はおこらないということを見出している(図2)。

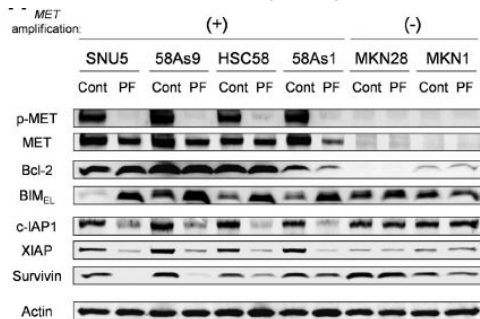


図2 胃癌細胞株における MET チロシンキナーゼ阻害剤によるアポトーシス関連因子の発現変化

これらの分子の発現変化が MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株のアポトーシスに与える影響を検証するため、MET 阻害により誘導される BIM の発現上昇を RNA 干渉で抑制したり、survivin, c-IAP1, XIAP の遺伝子を導入し強制発現させたりすることで、これらの分子がアポトーシスに与える影響を Western blot 法及び Annexin 法で検討する。

(2) 我々は、約 250 の胃癌患者の病理診断・組織型診断に用いられた手術ならびに組織生検検体、予後、治療効果などの臨床データを保管している。胃癌患者組織検体から薄切標本を作成し、DNA 抽出の上、定量的 PCR 法を用いた MET 遺伝子コピー数の同定をおこなう。また同時に、FISH アッセイによる遺伝子増幅の検討もおこなう。これらの結果から、日本人における MET 遺伝子増幅の頻度を明らかにし、MET に対する分子標的治療の必要性につき検討する。また、患者の臨床データをもとに、胃癌における MET 遺伝子コピー数および遺伝子増幅と予後や化学療法の治療効果などの相関について検討をおこなう。

(3) MET チロシンキナーゼ阻害剤に高感受性を示す MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株

を、MET チロシンキナーゼ阻害剤で低濃度から少しずつ増加させる培養条件にて長期間暴露させることにより、MET チロシンキナーゼ阻害剤に対する獲得耐性モデルを作製する。作製した MET キナーゼ阻害剤獲得耐性細胞における耐性機序の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株における BIM の発現上昇、および、survivin, c-IAP1, XIAP の発現低下が、どのような細胞内シグナル経路で制御されているかを検討するために、MEK-1/2 阻害剤の AZD6244 と PI3K/ mTOR 阻害剤の BEZ235 を用いて、これらの分子の発現変化を観察した。その結果、MEK-1/2 阻害剤により BIM の発現上昇が、PI3K/ mTOR 阻害剤により survivin の発現低下が、それぞれ認められた。以上より、MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株において、アポトーシス関連因子の BIM と survivin は、MET の下流である MEK/ERK 経路と PI3K/AKT 経路で、それぞれ制御されていることが示された(図 3)。一方、c-IAP1 と XIAP は MEK-1/2 阻害剤と PI3K/ mTOR 阻害剤のいずれで処理しても発現変化がみられず、STAT3 の RNA 干渉でも発現変化はみられなかった。

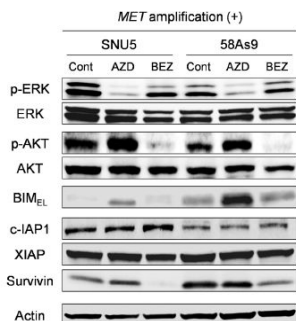


図 3 MET 遺伝子増幅陽性胃癌細胞株における MEK-ERK および PI3K-AKT 経路の阻害によるアポトーシス関連蛋白の発現変化
AZD: MEK1/2 阻害剤 (AZD6244), BEZ: PI3K/mTOR 阻害剤 (BEZ235)

アポトーシス関連因子が MET チロシンキナーゼ阻害剤の抗腫瘍効果に果たす役割を検証するため、まず、survivin, c-IAP1, XIAP の遺伝子を組み込んだベクターを作成したが、MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株へ導入が困難であった。一方、BIM の RNA 干渉により BIM の発現上昇が起こらない状況下において、MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株を MET チロシンキナーゼ阻害剤で処理すると、アポトーシスが部分的に抑制された。以上より、BIM は MET 遺伝子増幅を有する胃癌細胞株において MET チロシンキナーゼ阻害剤で誘導されるアポトーシスに関与していることが示された。(図 4)

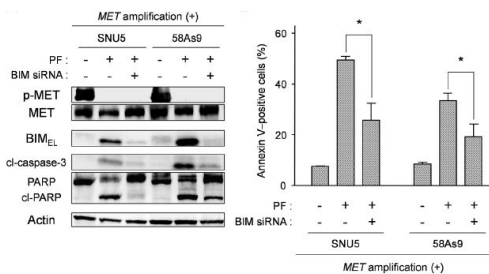


図 4 MET 遺伝子増幅陽性胃癌細胞株において MET チロシンキナーゼ阻害剤により誘導されるアポトーシスへの BIM の関与
siRNA: RNA 干渉. *: $P < 0.05$

これらの知見は、MET 遺伝子増幅陽性胃癌に対する MET キナーゼ阻害剤の開発における proof of concept として意義深いと考えている。

(2) 病理診断・組織型診断に用いられた胃癌患者の手術・生検組織 266 検体について、定量的 PCR および FISH アッセイで MET 遺伝子増幅を検討したところ、4 検体 (1.5%) が MET 遺伝子増幅を有していた(図 5)。MET 遺伝子増幅を有していた検体は、全て未分化型胃癌であった。また、MET 遺伝子増幅の有無で予後の比較をおこなったところ、検体採取後の全生存率には有意差をみとめなかった(ログランク検定, $P = 0.3$)。

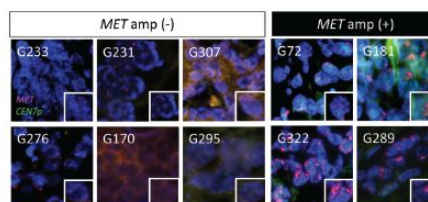
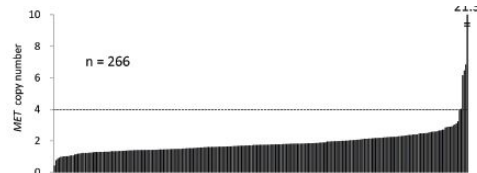


図 5 胃癌の組織検体における MET 遺伝子増幅
上図: 定量的 PCR による MET 遺伝子コピー数.
MET copy number: MET 遺伝子コピー数.
下図: MET FISH アッセイ. MET amp: MET 遺伝子増幅, 赤: MET プロブ, 緑: CEP17 プロブ

これらの結果は、本邦における MET 阻害剤の臨床開発にあたり、有益な疫学情報になるものと考えている。

(3) MET チロシンキナーゼ阻害剤に感受性の高い MET 遺伝子増幅陽性胃癌細胞株に MET チロシンキナーゼ阻害剤を長期暴露し、MET チロシンキナーゼ阻害剤に対する獲得耐性株 (7 株) を作製した。本モデルは、MET キナーゼ阻害剤が臨床応用された後に問題となることが想定される薬剤耐性のメカニズムを解析する上で大変重要であると考えられる。これらの耐性株において、耐性の原

因になりうると考えられる分子(レセプター型チロシンキナーゼなど)の発現や活性化を検討したが、現時点ではそのメカニズムを解明するには至っていない。

引用文献

Okamoto W, Okamoto I, Yoshida T, Okamoto K, Takezawa K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Arao T, Yanagihara K, Fukuoka M, Nishio K, Nakagawa K. Identification of c-Src as a potential therapeutic target for gastric cancer and of MET activation as a cause of resistance to c-Src inhibition. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(5): 1188-97. DOI: 10.1158/1535-7163.

Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science.* 2004; 305(5687):1163-7. <http://www.sciencemag.org/content/305/5687/1163.long>

Okamoto K, Okamoto I, Okamoto W, Tanaka K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K. Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations. *Cancer Res.* 2010; 70(24): 10402-10. DOI: 10.1158/0008-5472.

Okamoto W, Okamoto I, Arao T, Yanagihara K, Nishio K, Nakagawa K. Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. *Br J Cancer.* 2011; 105(3): 407-12. DOI: 10.1038/bjc.2011.246.

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3件)

Hisato Kawakami, Isamu Okamoto, Tokuzo Arao, Wataru Okamoto, Kazuko Matsumoto, Hirokazu Taniguchi, Kiyoko Kuwata, Haruka Yamaguchi, Kazuto Nishio, Kazuhiko Nakagawa, and Yasuhide Yamada, *MET* amplification as a potential therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget.* 2013; 4(1): 9-17. (査読有) <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=71>

8&path%5B%5D=1089

Wataru Okamoto, Isamu Okamoto, Tokuzo Arao, Kiyoko Kuwata, Erina Hatashita, Haruka Yamaguchi, Kazuko Sakai, Kazuyoshi Yanagihara, Kazuto Nishio, and Kazuhiko Nakagawa, Antitumor Action of the MET Tyrosine Kinase Inhibitor Crizotinib (PF-02341066) in Gastric Cancer Positive for *MET* Amplification. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(7): 1557-64. (査読有) DOI: 10.1158/1535-7163.

[学会発表](計3件)

Wataru Okamoto, Isamu Okamoto, Katsuya Tsuchihara, Kazuyoshi Yanagihara, Kazuto Nishio, Kazuhiko Nakagawa “Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells.” 25th AACR-NCI-EORTC Molecular Targets Conference. Oct, 20, 2013. San Diego (US)

Wataru Okamoto, Isamu Okamoto, Hisato Kawakami, Kazuyoshi Yanagihara, Kazuto Nishio, Kazuhiko Nakagawa “Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib in gastric cancer positive for *MET* amplification” International Symposium of Korean Society of Gastrointestinal Cancer. Jun, 28, 2013. Seoul (Korea)

岡本 渉, 岡本 勇, 荒尾 徳三, 仁科 慎一, 上田 眞也, 川上 尚人, 柳原 五吉, 倉田 宝保, 西尾 和人, 中川 和彦, 「*MET* 遺伝子増幅陽性胃癌に対する *MET* チロシンキナーゼ阻害剤クリゾチニブの抗腫瘍効果」第10回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2012年7月26日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 渉 (OKAMOTO, Wataru)
独立行政法人国立がん研究センター・早期・探索臨床研究センター・医員
研究者番号: 30441075

(2)研究分担者

中川 和彦 (NAKAGAWA, Kazuhiko)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 40298964

西尾 和人 (NISHIO, Kazuto)
近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10208134

岡本 勇 (OKAMOTO, Isamu)
九州大学・大学病院・学術研究員
研究者番号：10411597

荒尾 徳三 (ARAO, Tokuzo)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：20441074

(3)研究協力者

川上 尚人 (KAWAKAMI Hisato)