

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591147

研究課題名(和文) 肺癌の新たな個別化治療の確立を目指したNamp t 遺伝子の変異解析とその機能解析

研究課題名(英文) Analyses of Namp t gene mutation and its function to establish new target of lung cancer treatment.

研究代表者

大崎 能伸(OHSAKI, Yoshinobu)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30191935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が行った研究により、KRAS遺伝子変異を有する肺癌に対してNamp t阻害剤が高い抗腫瘍効果を有する可能性をつきとめた。これらの研究活動・成果の一部は、2015年4月に、国際学会の1つAmerican Association for Cancer Research Annual Meetingで報告している。

研究成果の概要(英文)：Namp t inhibitor showed strong inhibitory cell growth effect against lung cancer culture cell lines with KRAS gene mutation. Analyses of cell growth signaling revealed that MAPK・PI3K/AKT signaling path way was not affected by Namp t inhibitor. Thses findings were presented at AACR meeting in 2015.

研究分野：呼吸器学

キーワード：呼吸器学 肺癌 腫瘍学 分子標的薬 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

肺癌は進行期で発見される場合が多く、その治療の中心を担っているものの1つに化学療法がある。肺癌は悪性腫瘍の死因で第1位を占めており、肺癌治療成績の向上が社会へ果たす役割は大きい。肺癌は病理学的に非小細胞肺癌と小細胞肺癌に大別され、非小細胞肺癌が肺癌の約8割を占めている。近年、非小細胞肺癌における上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異やEML4-ALK融合遺伝子の存在など、肺癌増殖の鍵となる遺伝子変異の存在が証明され、各々変異を有する肺癌に対しての特異的阻害薬が有効であることが判明した1, 2)。これら遺伝子変異解析によって肺癌の個別化治療が進んだが、残り大半の遺伝子変異の獲得パターンは未解明であり、新たな遺伝子変異の発見と、その機能解析による個別化治療の発展が重要なテーマの1つである。

近年、がん治療の新たなターゲットとして、細胞内エネルギー代謝に参与するツバクが注目されている。なかでも Nicotinamide adenine phosphoryltransferase (Nampt)は、細胞内のNicotinamide adenine dinucleotide (NAD+)を合成する酵素として知られている。NAD+は細胞内ATPの生合成や抗アポトーシスに参与しているため、Namptは細胞内エネルギー産生・細胞増殖を司る重要な働きを持つ。これまでに我々は、肺癌細胞におけるNamptの機能を解析する研究を行ってきた3)。その中で、非小細胞肺癌はNamptを過剰発現しており、Nampt阻害剤によって肺癌の増殖が抑制されることを突き止めた4)。また、その抗腫瘍効果は、Nampt阻害によって細胞内ATP濃度の減少が起こった結果で生じることを報告した5)。一方で、なぜ肺癌においてNamptが過剰発現し、個々の肺癌で抗腫瘍効果に差が生じているのかは未解明のまま、今後のさらなる課題となっていた。

近年、いくつかのがん種で、Nampt遺伝子の活性部位に変異(欠失、点変異)を生じている事が報告されている6)。前立腺癌や大腸癌細胞などでの変異が報告されているが、それら変異の結果生じる細胞特性変化や薬剤反応性の変化については明らかとなっていない。以上の知見を踏まえて、我々はNampt遺伝子変異の解析

を足掛かりとし、Nampt阻害による肺癌の新たな個別化治療を確立するというテーマを設けた。これまでのところ、肺癌を対象とした網羅的なNampt遺伝子変異解析と機能分析の報告は無い。そこで、我々は次の仮説を設け、それを検証するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

我々は2年の研究期間を設け、次のことを明らかにする。

肺癌の Nampt 遺伝子の変異解析を行って、その変異獲得パターンと変異の頻度を検証する。

Nampt 遺伝子変異の獲得によって、肺癌増殖能が変化することを検証する。

Nampt 遺伝子変異を獲得した肺癌細胞株では、Nampt阻害剤の抗腫瘍効果に違いが生じることを検証する。

3. 研究の方法

2年の研究期間で本研究を遂行する。肺癌細胞株と肺癌臨床検体を用いた基礎実験を行って、Nampt遺伝子の変異解析と、変異ツバクの細胞増殖に関する機能解析を行う。初年度では、肺癌のNampt遺伝子の変異解析を行う。肺癌細胞株・臨床検体からRNAを抽出・精製し、RT-PCRを行ってNampt mRNAのcDNAを合成する。それらcDNAの配列をdirect sequenceとSNaPshot®を用いて解析する。次年度では、変異Namptツバクの機能解析を行う。Gateway®システムを用いて変異遺伝子のクローニングを行い、細胞株へ変異遺伝子を導入する。細胞増殖アッセイ、抗体アッセイ、ヌードマウス肺癌皮下移植モデル、免疫染色法を用いて、変異細胞株の増殖能と細胞内シグナル変化、Growth Factor産生能を評価する。また、変異肺癌細胞株へNampt阻害剤を投与して、その抗腫瘍効果を比較・検証する。

【平成24年度】

初年度は、「肺癌におけるNampt遺伝子の変異解析」を行う。本研究では、肺癌細胞株(表)および肺癌手術検体を用いて以下のように研究を進める。コントロールの細胞株として、肺胞上皮細胞株(NL20)・肺線維芽細胞株(WI38)を用いる。

1. 細胞株におけるNampt遺伝子変異解析

各細胞株を培養し、RNAを抽出(TurboCapture 96 mRNA Kit, QIAGEN)する。Real time RT-PCRを行ってNampt mRNAの発現量を相対定量する。次に、約

1.5kbp のNamp1 mRNAコード領域を増幅するよう設計したRT-PCR用のprimer pair(表)を用い、Long range RT-PCR (QIAGEN)を行ってNamp1 mRNAのcDNAを合成する。ExoSAP-IT(GE Healthcare)で精製したcDNAの配列をdirect sequenceで解析し、変異の有無を確認する。発見された変異リストを作成し、既知のpoint mutationに関してはSNaPshot® (Applied Biosystems)を利用して効率よく検出できるように、target DNAに対応するprimerをデザインする1)。一度確認したpoint mutationはSNaPshot®を用いて以降の解析をより迅速に進める。配列の解析・ライソメントにはVector TRI Advance® (Invitrogen)を用いる。

2. 肺癌臨床検体のNamp1遺伝子変異解析
検体には肺癌手術検体を用い、手術症例で目標200検体をretrospective, prospectiveに解析する。Namp1の免疫染色(AdipoGen)を行って正常肺組織と肺癌細胞とで発現量を比較する2)。また、検体の肺癌細胞を選別するためにマイクロアイゼクションを行い、消化クションされた肺癌組織からRNAもしくはDNAを抽出・精製する。ホルマリン固定による検体中のRNA劣化が認められた場合は、Namp1遺伝子の各コーディング領域に対応するprimer pair(計11個のExon領域)を用いて、PCRを行ってDNAフラグメントを合成・精製する。精製したDNA配列を前述のdirect sequence、SNaPshot®を用いて解析する。また、RNAの保存状態がよい検体については、Real time RT-PCRを用いてNamp1 mRNAの発現量を解析する。Namp1 mRNAの発現量はGAPDH発現量との比で相対定量する。

【平成25年度】

次年度では、「変異Namp1タンパク発現細胞の細胞増殖に関する機能解析」を行う。

1. 前年度で検証した変異Namp1遺伝子のクローニングを行い、肺癌細胞株へ変異遺伝子を導入する。コントロールとして、野生型遺伝子導入細胞株、親細胞株を用いる。クローニング/遺伝子導入にはGatewayシステム(Invitrogen)を利用し、組み換え反応用のprimerは、Vector TRI Advance®でデザインする。ベクターにはLentivirusを用い、一部にT-RexTMシステム(Invitrogen)を利用して、テトラサイクリン添加の有無によって細胞内の変異Namp1遺伝子発現のon/offを調節できる細胞株を作成する3)。

2. 変異株について、BrdU assayを行って細胞増殖能を評価する。また、変異株からタンパクを抽出し、細胞内の細胞増殖・生存シグナル変化を抗体アレイにて評価する。変異株を培養した培養上清中のGrowth factorを、抗体array/ウェスタンブロットを用いて検証する。各細胞株へNamp1阻害剤を投与し、BrdU assayで細胞増殖抑制効果を評価する。

3. In vivo実験では、ヌードマウスの肺癌皮下移植モデルを用いる。ヌードマウス(ICRnu/nu)の背部皮下へ、細胞株を移植する。次に、各移植群で経時的に腫瘍体積を測定して腫瘍増殖能を比較する。また、それらヌードマウスへ、生体適合性Namp1阻害剤を皮下注射で投与して、それぞれの株に対する阻害剤の腫瘍増殖抑制効果を比較する4)。腫瘍切片を取り出し、免疫染色を行って細胞増殖シグナル比較する。

4. 研究成果

我々が行った研究により、KRAS 遺伝子変異を有する肺癌に対して Namp1 阻害剤が高い抗腫瘍効果を有する可能性をつきとめた。まず、肺癌細胞株のパネルを用いた検討により、Namp1 阻害剤の感受性が高い肺癌細胞を検出する作業を行った。異なる遺伝子変異を持つ肺癌細胞株のパネルを用いて、Cell viability assay の1つである acid phosphatase assay を行い、Namp1 阻害剤の効果を検証した。その結果、KRAS 遺伝子変異を有する肺癌が namp1 阻害剤に対して高い感受性(抗腫瘍効果)を持つ可能性を見出した。また、KRAS 遺伝子変異を有する肺癌細胞株のなかでも、Namp1 阻害剤に高感受性の株と比較的低感受性の株に分別された。そのメカニズムを検証するため、Namp1 阻害剤に高感受性の KRAS 肺癌細胞株を用いて、ウェスタンブロットによる細胞内シグナル変化の解析を行った。その結果、増殖シグナル系列の1つである MAPK・PI3K/AKT シグナルの変化や、アポトーシスの変化は乏しいことが判明した。一方で、アポトーシス以外の細胞死メカニズムの1つであるオートファジーに関連するタンパクの発現量の変化が確認された。なかでも At7 というオートファジー関連タンパクが、Namp1 阻害剤を投与した KRAS 肺癌で抑制されていることを確かめた。

これらの研究活動・成果の一部は、2015年4月に、国際学会の1つ American

Association for Cancer Research Annual Meeting で報告している。

以上の成果・研究結果をさらに発展させるべく、本テーマに関連した新たな研究計画を設けた。今後、Namp1 阻害剤に高感受性の KRAS 肺癌を用いて、Reverse Phase Protein Array を行い、がん増殖シグナル変化とそのパスウェイ解析を実施する。In vitro 実験で、それらのシグナル変化とオートファジータンパクとの関連性を突き止め、さらには肺癌病理組織検体を用いて、Namp1 タンパク・遺伝子発現量と、同定された候補タンパク・遺伝子発現の関連を評価する予定である。

<引用文献>

1. Zinsky, R., et al. 2010. Gastroenterol Res Pract 2010:789363
2. Revollo, J. R. et al. 2007. Cell Metab 6:363-375.
3. Dobrovolsky, V. N., et al. 2007. Biotechnol Bioeng 98:719-723.
4. Okumura, S., et al. 2009. IASLC.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Masahiro Kitada, Yoshinobu Ohsaki, Yoshinari Matuda, Satoshi Hayashi and Kei Ishibashi. Photodynamic diagnosis of pleural malignant lesions with a combination of 5-aminolevulinic acid and intrinsic fluorescence observation systems. BMC Cancer, 15:174, 2015.
2. 南谷克明、宋万孝次、平田 哲、大崎能伸、中島 進、小笠原浩二、佐藤 浩、阪田 功、市川 晶. 白色LEDを用いた光線力学抗菌化学療法の抗菌効果の評価。光アライアンス, 26:1-4, 2015.
3. Yoshinori Minami, Takaaki Sasaki, Hiroki Bochimoto, Jun-ichi Kawabe, Satoshi Endo, Yoshiki Hira, Tsuyoshi Watanabe, Shunsuke Okumura, Naoyuki Hasebe, Yoshinobu Ohsaki. Prostaglandin I2 analog suppresses lung metastasis by recruiting pericytes in tumor angiogenesis. Int J Oncol, 46:548-554, 2015.
4. Tomoaki Sasaki, Koji Takahashi, Nobuhisa Takada, Yoshinobu Ohsaki. Ratios of peripheral-to-central airway lumen area and percentage wall area as predictors of severity of chronic obstructive pulmonary disease. AJR, 203:78-84, 2014.
5. Masahiro Kitada, Yoshinobu Ohsaki, Yoshinari Matsuda, Satoshi Hayashi,

Kei Ishibashi. Photodynamic diagnosis of malignant pleural diseases using the autofluorescence imaging system.

Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 20:378-382, 2014.

6. 吉田遼平、佐々木高明、牧野雄一、山本雅大、山本泰司、西川祐司、三代川齊之、大崎能伸. 全身性エリテマトーデスの経過中にびまん性肺泡出血を発症した1例. THE LUNG perspective, 122:110-114, 2014.

7. 平井理子、佐々木高明、山本泰司、大崎能伸. クリゾチニブによる薬剤性食道炎を来した EML4/ALK 融合遺伝子陽性肺癌の1例. 肺癌, 45:68-72, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大崎 能伸 (OHSAKI, Yoshinobu)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30191935

(2)連携研究者

奥村 俊介 (OKUMURA, Shunsuke)
旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号: 10516339

佐々木 高明 (SASAKI, Takaaki)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70516997

南 幸範 (MINAMI, Yoshinori)
旭川医科大学・大学病院・医員
研究者番号: 10545445

遠藤 哲史 (ENDO, Satoshi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00545444