

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830121

研究課題名(和文)RET融合遺伝子陽性肺腺がんに対するバンデタニブの作用機序解明と耐性細胞株の樹立

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism how Vandetanib kills RET-positive lung cancer cells

研究代表者

牧野嶋 秀樹(Makinoshima, Hideki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：30510573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：国立がん研究センターでは、チロシンキナーゼRET融合遺伝子陽性肺癌の大規模スクリーニングと新規分子標的薬バンデタニブの医師主導治験を世界に先駆けて実施している。この臨床試験と連動し、RET融合遺伝子陽性肺腺癌に対するバンデタニブの作用機序とRET融合遺伝子陽性肺腺癌LC2/ad細胞株を用いてバンデタニブ耐性細胞株の樹立を本研究の目的とした。その結果、RET融合遺伝子陽性肺腺癌のEGFR分子に対するバンデタニブの一部作用機序解明とバンデタニブ耐性細胞株の樹立に成功した。これらの研究は、バンデタニブに耐性となる臨床例との比較解析により、今後薬剤耐性機構の詳細な分子機構解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Rearrangements of the proto-oncogene RET were newly identified potential driver mutations in lung adenocarcinoma. We had found the cell line LC2/ad harboring RET fusion gene and Vandetanib was the most effective compound to inhibit LC2/ad cells by down-regulating RET fusion protein. To elucidate the mechanism how Vandetanib efficiently kills RET-positive lung cancer cells, we have identified Vandetanib-target molecules in addition to RET and established Vandetanib-resistant cell lines.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

日本国内で2011年に約7万人が肺がんにより死亡し、肺腺がんは50%を超える最も症例数の多いがんである。近年、次世代シーケンサー等の普及により、ヒト肺腺がん組織に、*ALK*、*RET*、*ROS1*のチロシンキナーゼ融合遺伝子が発見されてきた。肺腺がんにおける*ALK*および*RET*融合遺伝子は、日本の研究グループにより発見され、肺がんの融合遺伝子研究をリードしている。融合遺伝子を保持する肺腺がん患者の臨床背景は、非喫煙者、若年、女性に多い傾向があり、新規治療法の開発が要望されている。融合遺伝子の肺腺がんにおける検出頻度はそれほど高くないが、明らかに分子標的薬のターゲットとなりえる。

我々は、チロシンキナーゼ*RET*融合遺伝子*CCDC6-RET*を保持する日本人由来の肺腺がんLC2/ad細胞株を、研究開始前に発見した。LC2/ad株に*siRET*を導入し、*CCDC6-RET*の発現を特異的に抑制した場合、*AKT*経路の抑制は*ERK*経路に比較して少なく、細胞増殖のみが抑制された。それに対し、バンデタニブ(AZD6474)処理により、細胞増殖抑制およびアポトーシスが薬剤濃度に依存して誘導された。この時、*CCDC6-RET*、*ERK*、*AKT*のリン酸化は減少するが、*siRET*導入時に比べ、*AKT*の活性化は顕著に抑制された。これらの結果は、*CCDC6-RET*を介さないが、バンデタニブ処理により阻害される*AKT*制御因子の存在が示唆された。これらの実験結果は、複数のチロシンキナーゼを同時に標的とした分子標的薬マルチチロシンキナーゼ阻害剤を検証する良いモデルになると考えられた。*RET*融合遺伝子陽性肺がんにおけるバンデタニブの特異的なターゲットが明らかとなれば、投与する患者の選択、特異的な阻害剤の組み合わせにより、副作用を低減した効率の良い治療法開発に発展すると発想した。*CCDC6-RET*を保持した肺腺がん細胞株LC2/ad細胞に対する*in vitro*培養系における薬剤感受性試験を行った結果、スニチニブやソラフェニブに比較して、バンデタニブが*RET*阻害剤の中で最も効果的であった。また、ヌードマウスゼノグラフモデルを利用した*in vivo*実験において、LC2/ad細胞株は皮下に肺腺がんの病理像を示す腫瘍を形成した。さらに、LC2/ad腫瘍に対しバンデタニブが最も良好な結果を示し、バンデタニブによるLC2/ad腫瘍への明らかな縮小効果を認めた。

これらの実験結果より、*RET*融合遺伝子陽性肺腺がんに特異的なバンデタニブターゲット分子を明らかにし、バンデタニブ耐性細胞株を樹立・解析し、副作用の少ないより効用の高い治療法開発を目指すことを計画した。

2. 研究の目的

国立がん研究センターでは、チロシンキナーゼ*RET*融合遺伝子陽性肺癌の大規模スクリーニングと新規分子標的薬バンデタニブ

の医師主導治験を世界に先駆けて実施している。この臨床試験と連動し、*RET*融合遺伝子陽性肺腺癌に対するバンデタニブの作用機序と*RET*融合遺伝子陽性肺腺癌LC2/ad細胞株を用いてバンデタニブ耐性細胞株の樹立を本研究の目的とした。

*RET*融合遺伝子*CCDC6-RET*が肺腺がんのドライバーがん遺伝子であり、マルチターゲット阻害剤バンデタニブが*RET*融合遺伝子陽性肺腺がんの有望な分子標的薬となることを前臨床試験で実証してきた。特異性の高い*CCDC6-RET*遺伝子ノックダウンとバンデタニブ処理には*AKT*経路抑制に相違が見出され、*RET*阻害に加え未知チロシンキナーゼを同時に阻害することが、バンデタニブによる高い抗腫瘍効果の原因であると示唆された。そこで、*RET*融合遺伝子陽性肺腺がんに特異的なバンデタニブターゲット分子を明らかにし、バンデタニブ耐性細胞株を樹立・解析し、副作用の少ないより効用の高い治療法開発を目指した。そこで、1.バンデタニブの*RET*以外のターゲットを同定、LC2/ad細胞株のバンデタニブ処理に対する分子応答を解析し、候補キナーゼの絞り込みを行った。2.LC2/ad細胞株および臨床検体を用いてバンデタニブターゲット候補を検証、絞り込まれた候補チロシンキナーゼを*siRNA*およびチロシンキナーゼ阻害剤で抑制し、*siRET*と共存時に*AKT*のリン酸化が低下するか検証した。3.バンデタニブ耐性細胞株の樹立と分子プロフィールの作製、*RET*融合遺伝子陽性肺腺がんLC2/ad細胞株を用いた*in vitro*および*in vivo*培養系におけるバンデタニブ耐性細胞株を樹立し、分子基盤を構築し、バンデタニブ耐性機構解明を目指した。

3. 研究の方法

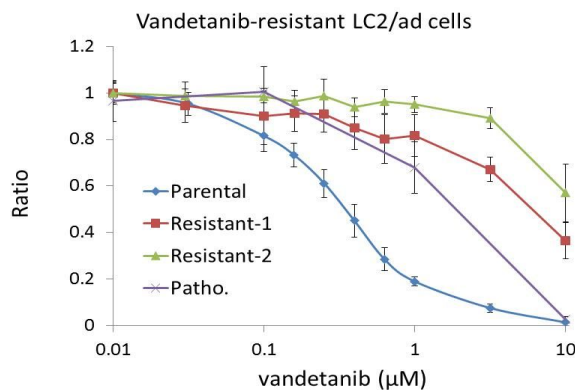
平成26年度は、*RET*以外のバンデタニブターゲット同定に主眼を置いた。バンデタニブ(-/+)の実験条件で、直接的にタンパク質のチロシン残基リン酸化をプロテインアレーおよびウェスタンブロット法を主に使用した。さらに、LC2/ad細胞を用いて、バンデタニブターゲット候補チロシンキナーゼを*siRNA*あるいは特異的な阻害剤で抑制し、同時に*siRET*を導入し、*AKT*のリン酸化が低下するかどうか検証した。

平成27年度には、*RET*陽性肺腺がん細胞LC2/ad株を用いた*in vitro*培養系におけるバンデタニブ耐性細胞株の樹立を試みた。LC2/ad細胞株のバンデタニブに対する IC_{50} は0.5 μM であり、このバンデタニブ濃度で耐性細胞株樹立を開始し、細胞の増殖を確認しながら、1 μM 、5 μM 、10 μM と徐々にバンデタニブ濃度を3か月間で高めていき、バンデタニブ耐性細胞のプールを作製した。その後、耐性細胞のクローニングを行い、複数ラインのバンデタニブ耐性細胞株を樹立した。

4. 研究成果

(1) RET 融合遺伝子肺腺癌 LC2/ad 細胞における RET 以外のバンデタニブの標的キナーゼは、少なくとも上皮成長因子受容体 EGFR が含まれることが明らかとなった。まず、プロテインアレイを使用した実験で、LC2/ad 細胞にバンデタニブ処理を行うと、EGFR 分子のリン酸化が低下した。さらに、ウェスタンブロット法により、バンデタニブ処理が EGFR 分子のリン酸化を低下させることを確認した。さらに、LC2/ad 細胞を用いて、EGFR を特異的な阻害剤であるゲフィチニブで抑制し、同時に siRET を導入し、AKT のリン酸化が低下することを確認した。さらに、ゲフィチニブ処理+ siRET を導入した LC2/ad 細胞では、増殖能が低下し、一部の細胞ではアポトーシスが誘導された。これらの結果より、バンデタニブは、RET 融合遺伝子肺腺癌 LC2/ad 細胞において、RET 融合遺伝子と EGFR 分子を同時に阻害することにより、細胞増殖の抑制および殺細胞効果が有効に示されることが明らかになった。今後、臨床検体を用いた実験により、肺腺癌細胞において RET と EGFR が同時に活性化されているかどうか、検証を進める。

(2) LC2/ad 細胞株のバンデタニブに対する IC₅₀ は 0.5 μM であり、このバンデタニブ濃度で耐性細胞株樹立を開始し、細胞の増殖を確認しながら、1 μM、5 μM、10 μM と徐々にバンデタニブ濃度を 3 か月間で高めていき、バンデタニブ耐性細胞のプールを作製した。この実験で、少なくとも 2 つのバンデタニブ耐性細胞株の樹立に成功した。この 2 つの細胞株を用いて細胞増殖試験を行ったところ、下記のような結果であった。



LC2/ad 親株細胞 (青ライン) は 0.5 μM の濃度で 50 % (Ratio 0.5) の細胞増殖抑制効果があった (上図)。培養過程で自然発生的にバンデタニブに耐性になった細胞株の取得にも成功し、その細胞株 (紫ライン) は、親株とバンデタニブ耐性株の中間の性質を示した (上図)。それに対して、バンデタニブ耐性細胞株 # 1 (赤ライン) とバンデタニブ耐性細胞株 # 2 (緑ライン) では、バンデタ

ニブに対する IC₅₀ は、およそ 5 μM、>10 μM であり、10 倍以上のバンデタニブ濃度に耐性であった (左下図)。これらのプール細胞をさらにクローニングして、バンデタニブに対する薬剤耐性を現在も引き続き検証している。これまで得られた結果は、現在論文を投稿準備中である。

(3) 分子標的薬の効果や薬剤耐性機構を解明するためには、腫瘍組織内や培養細胞集団の不均一性を考慮する必要がある。今回、LC2/ad 細胞を使用して、シングルセルレベルで遺伝子発現を解析し、細胞集団における *CCDC6-RET* 遺伝子を含む遺伝子の発現量に不均一性を確認した。RET を含むがん関連遺伝子の発現パターンは、通常の培養下、細胞間での多様性は潜在しているが、一度薬剤処理を行うと、すぐに明確な細胞間における多様性を観察した。この結果は、細胞集団の平均値を測定する実験系だけではなく、単一細胞レベルで遺伝子発現を解析することにより、これまでと異なる薬剤反応性および耐性化機構の存在を示唆している。得られた研究結果は、論文として発表した。

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 1件)

Single-cell analysis of lung adenocarcinoma cell lines reveals diverse expression patterns of individual cells invoked by a molecular target drug treatment.

Suzuki A, Matsushima K, Makinoshima H, Sugano S, Kohno T, Tsuchihara K, Suzuki Y. *Genome Biol.* 2015 Apr 3;16:66. doi: 10.1186/s13059-015-0636-y.

[学会発表](計 0件)

[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
特に記載事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野嶋 秀樹 (MAKINOSHIMA, Hideki)
国立がん研究センター・先端医療開発セン
ター・研究員
研究者番号：30510573

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：