

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861125

研究課題名(和文) 肺癌におけるNTRK遺伝子発現と薬剤感受性の検討

研究課題名(英文) Investigation of NTRK family expression and the drug sensitive in lung cancer

研究代表者

立松 勉 (Tatematsu, Tsutomu)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40721874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、欧米で発見された肺癌原因遺伝子とされるNTRK1転座について日本人の肺癌268例についてその頻度を調査した所、1例も認めなかった。日本人では欧米人に比べNTRK1転座が稀である可能性を示せた。次に、NTRK1遺伝子転座やNTRK2発現を持つ細胞株に対するNTRK阻害剤AZD7451の薬剤感受性について検討した所、NTRK1転座やNTRK2発現を持つ細胞株の細胞増殖が抑制された。さらにこれらの細胞株がAZD7451で治療されたとき、細胞増殖に働くシグナルが抑制されていることを確認した。以上からAZD7451が今後肺癌に対する治療の選択肢の1つとなる可能性を示せた。

研究成果の概要(英文)：We investigated NTRK1 fusion about 268 Japanese lung cancer patients. However, we were unable to confirm the presence of NTRK fusions in this cohort. We also investigated the drug sensitive of NTRK inhibitor AZD7451 to cell lines with NTRK1 fusion or NTRK2 expression. As a result, The cell proliferation of the cell lines with NTRK1 fusion or NTRK2 expression was inhibited. Furthermore, we confirmed that the signals concerned in cell proliferation were inhibited, when these cell lines were treated by AZD7451. Therefore, targeted therapy with NTRK inhibitor AZD7451 may be of value in the treatment of lung cancer.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：NTRK AZD7451 fusion KM12

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌における分子生物学的メカニズムが解明されつつあり、最近では、EGFR 遺伝子変異をターゲットにしたゲフチニブやエルロチニブ、ALK 融合遺伝子をターゲットにしたクリゾチニブなどの分子標的治療薬が実用化され臨床で大きな成果をあげている。

その一方で、EGFR 遺伝子変異は肺腺癌の 30%程度、ALK 融合遺伝子は肺腺癌の 5%程度にしか検出されず、特異的治療薬の恩恵にあずかれる人がまだまだ少ない現状もある。こうした理由から、さらなるターゲット遺伝子の解明と新たな分子標的治療薬の開発が望まれている。こうした中で最近、肺癌における発癌原因・治療標的遺伝子として Neurotrophic tyrosine kinase receptor (以下、NTRK) 1 遺伝子の転座 (MPRIIP-NTRK1、CD74-NTRK1) が報告された。NTRK1 遺伝子は、TRKA タンパクをコードする遺伝子で、NTRK1 の転座により TRKA が活性化され、発癌に導くことが知られている。また、神経内分泌大細胞癌 Large cell neuroendocrine carcinoma (以下、LCNEC) で、TRKB タンパクをコードする NTRK2 や TRKC タンパクをコードする NTRK3 の変異を認めたとの報告もある。

2. 研究の目的

日本人における NTRK1 転座はまだまだ報告がないため、我々は以下について検討することで新たな分子標的治療薬の可能性を探求することを目的とした。

(1) 当施設で手術された日本の肺癌患者における NTRK1 遺伝子異常や NTRK の発現頻度を調査する。

(2) 新たな分子標的治療薬の可能性として新規 NTRK 阻害剤 AZD7451 の薬剤感受性について検討する。

3. 研究の方法

(1) NTRK1 転座と NTRK 発現の検索

当施設で切除された非小細胞肺癌 Non-small-cell lung cancer (以下、NSCLC)

268 例 (腺癌 198 例、扁平上皮癌 70 例) の凍結腫瘍組織から Total RNA を抽出し、RT-PCR、ダイレクトシーケンスで NTRK1 転座、NTRK 発現を検索した。

(2) 免疫染色による NTRK1/2 発現の検索

免疫染色で TRKA/B タンパク発現を検索した。

(3) 定量的 PCR による NTRK1-3 発現の評価

NTRK1 転座を持つ結腸癌細胞株である KM-12 と NTRK2 高発現が報告されている LCNEC 細胞株である H460, H810 や当施設で切除された LCNEC 4 例について、定量的 PCR を施行し、NTRK1-3 キナーゼドメインの mRNA level を測定した。

(4) AZD7451 の増殖抑制効果の評価

細胞実験で AZD7451 の細胞増殖抑制効果を検討した。KM-12, H460, H810 それぞれの細胞に AZD7451 投与後、24 時間後の細胞数を測定した。

(5) AZD7451 治療による pTRKA/B とその下流シグナルの評価

AZD7451 を投与された細胞株からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングで pTRKA/B とその下流にある pAkt, pERK1/2 のタンパク発現が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) NTRK1 転座および NTRK の発現頻度

当施設の症例では NTRK1 転座、NTRK1-3 発現例は認めなかった。

(2) 免疫染色による TRKA/B 発現の確認

TRKA では、高発現例は認めなかった。TRKB では肺癌 39 例中 7 例に高発現を認め、そのうち LCNEC 4 例中 1 例に過剰発現例が含まれていた。

(3)NTRK1-3 チロシンキナーゼドメインにおける mRNA level の評価

NTRK1 では、KM-12 で高度の、H460 で中等度の mRNA level の上昇を示した。H810 では mRNA level は低かった。NTRK2,3 では、mRNA level の増加をほとんど認めなかった。LCNEC4 例の mRNA level の腫瘍/正常組織比 (T/N 比) >1 の症例は認めなかった。

(4)AZD7451 の増殖抑制効果の評価

AZD7451 で治療した 3 細胞の細胞増殖抑制効果について検討した。KM-12 と H460 は、コントロールに比べ、1nM 以上で細胞増殖抑制効果を示した。H810 では細胞増殖は抑制されなかった。

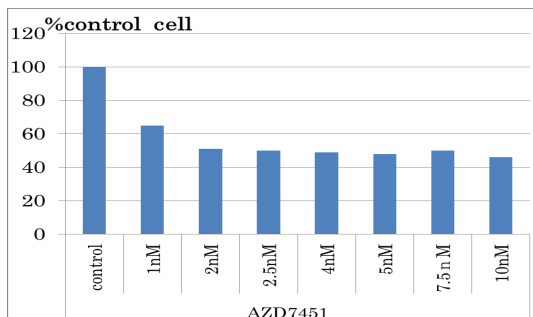


図 1 KM-12

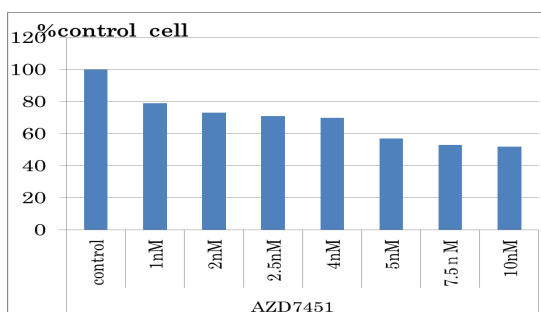


図 2 H460

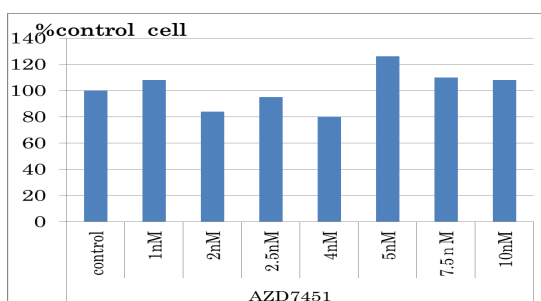


図 3 H810

(5)AZD7451 治療後の pTRKA/B とその下流シグナルの評価

AZD7451 治療後の細胞タンパクを用いてウェスタンブロッティングを施行した。KM-12 では pTRKA Tyr490 と pAkt が濃度依存性に抑制された。H460 では total TRKB の高発現を認め、NTRK2 発現があると証明した。また、pTRKB Tyr706/707 と pERK が濃度依存性に抑制された。H810 では、TRKA/B の発現を認めなかった。

(6)考察

今回、我々は当施設で手術された日本の肺癌患者におけるこれらの遺伝子異常の頻度につき検討したが、NSCLC 268 例中 1 例も NTRK1 転座や NTRK 変異を認めなかった。この理由として、これらの遺伝子異常が欧米人に比べ、日本人で極めて稀である可能性が考えられた。しかしながら、我々は、NTRK 阻害剤 AZD7451 が NTRK1 転座あるいは NTRK2 発現を持つ細胞の TRK のリン酸化とその下流シグナルを抑制し、細胞増殖を抑制することを示した。NTRK2 とそのリガンドである BDNF は、神経内分泌腫瘍、特に LCNEC で高発現を認め、腫瘍の増殖に関連していることが報告されている。LCNEC は一般的に予後不良で標準的な癌治療の他にオプションがない状況である。よって AZD7451 が今後、肺癌、特に LCNEC の治療薬として有用となる可能性があると考えられた。

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)

1. Tatematsu T, Sasaki H, Shimizu S, Okuda K, Shitara M, Hikosaka Y, Moriyama S, Yano M, Jeffrey B, Fujii Y. Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in

non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7451 *in vitro*, Molecular and Clinical Oncology, 2014;2:725-730 査読有
DOI:10.3892/mco.2014.318

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 立松 勉, 佐々木 秀文, 鈴木あゆみ, 奥田 勝裕, 羽田 裕司, 森山 悟, 矢野 智紀, 藤井 義敬、当院肺癌切除例における NTRK1 転座, NTRK 遺伝子発現と AZD7451 の薬剤感受性に関する検討、第 115 回日本外科学会学術集会、2015 年 4 月 18 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立松 勉 (TATEMATSU, Tsutomu)
名古屋市立大学・大学院医学部医学研究科
研究員
研究者番号：40721874

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐々木 秀文 (SASAKI, Hidefumi)
名古屋市立大学・大学院医学部医学研究科
研究員
研究者番号：0336695