

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830105

研究課題名(和文)PI3KおよびERKパスウェイを標的としたKRAS変異腫瘍に対する新規治療開発

研究課題名(英文)Development of treatment strategy against KRAS mutant cancer by targeting PI3K and ERK

研究代表者

衣斐 寛倫 (Hiromichi, Ebi)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：00645145

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)：肺がん細胞株を用いた検討から、ERKの上流タンパクであるMEKの阻害は、ERKシグナルを一時的に遮断するが、24時間後にはERKを再活性化するとともにPI3Kシグナルの活性上昇も誘導した。そのメカニズムについて検討した結果、MEK阻害薬はフィードバック機構を介し、受容体型チロシンキナーゼの活性を誘導していた。活性化される受容体キナーゼは上皮系マーカー陽性細胞ではERBB3、間葉系マーカー陽性細胞ではFGFR1であった。それぞれの阻害薬とMEK阻害薬の併用は、ERKシグナルの完全な遮断と、MEK阻害薬により誘導されるPI3Kシグナルの上昇を抑制するとともに、細胞のアポトーシスを誘導した。

研究成果の概要(英文)：KRAS is frequently mutated in a variety of cancers including lung cancer. Whereas the mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a well-known effector pathway of KRAS, blocking this pathway with clinically-available MAPK inhibitors is relatively ineffective. Treatment with MEK inhibitors in KRAS mutant lung cancers lead to feedback activation of the MAPK pathway. In epithelial-like KRAS mutant lung cancers, this feedback was attributed to ERBB3-mediated re-activation of MEK. In contrast, in mesenchymal-like KRAS mutant lung cancers, the feedback was contributed to the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) pathway. Combination of MEK inhibitor trametinib with an FGFR inhibitor induced cell death in vitro in mesenchymal-like KRAS mutant cancers. These observations indicate that feedback activation of FGFR1 signaling mitigates the effect of MEK inhibitor in mesenchymal-like KRAS mutant lung tumors, and could establish a therapeutic approach to treat these cancers.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：がん KRAS MEK阻害剤 フィードバック

1. 研究開始当初の背景

KRAS 遺伝子変異は、肺癌の 10%-15%、大腸癌の 30-40%、膵癌の 80-95%程度で認められるが、有効な分子標的治療がなくその開発が急務とされていた。変異型 KRAS は、薬剤による直接的な活性の抑制が困難なため、がん細胞の生存に必須なシグナルを同定し、そのシグナルを抑制することで細胞死を誘導する方法が試みられている。一方、癌細胞が単一の癌遺伝子に生存を依存する oncogene addiction モデルにおいては、PI3 kinase (PI3K) シグナルと ERK シグナルが主要な生存シグナルであるとされる。KRAS 遺伝子変異モデルマウスにおいても、PI3K 阻害剤および ERK の上流に位置する MEK 阻害剤の併用療法が抗腫瘍効果をきたすことが示されたが、PI3 kinase および ERK シグナルは正常細胞でも重要な役割を担うため、両者の直接阻害は毒性が強く臨床応用が困難であった。

申請者は両者の直接阻害を回避するため、KRAS 変異大腸癌における PI3K シグナルの制御機構を解析し、インスリン様増殖因子受容体 (IGF-IR) が PI3K シグナルを活性化していること、MEK 阻害剤と IGF-IR 阻害剤の併用療法がマウス xenograft において腫瘍縮小効果を来すことを示した。また、KRAS の下流に位置する BRAF に変異を有する大腸癌において、BRAF 阻害剤による BRAF 阻害がフィードバック機構を通して EGFR の活性化を誘導するため BRAF 阻害剤には耐性であり、BRAF に加え EGFR 阻害剤の併用が細胞死の誘導に必要であることを示していた。これらの結果は、同一の遺伝子変異を有する腫瘍であっても、原発巣により異なったシグナル伝達系の活性化をきたす (re-wiring) ことを示唆していた。

2. 研究の目的

本研究では、変異 KRAS の下流に位置するシグナルのうち PI3K シグナル、ERK シグナルを中心にその制御機構について解析を行う。これにより両シグナルを腫瘍特異的または間接的に阻害することが可能な標的分子を同定し、標的分子に対する阻害剤を用いた前臨床モデルの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株において、免疫沈降法、western blot 法により、PI3 kinase および ERK シグナルの活性化に関与する受容体を探索した。

(2) 得られた情報をもとに、PI3 kinase 及び ERK シグナルを制御する分子に対する分子標的薬を用いて in vitro 系において阻害薬の効果検討、in vivo の系にて毒性の検討を行った。

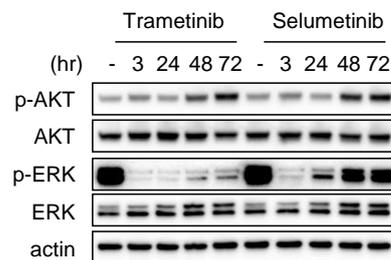
(3) 両シグナルおよび変異 KRAS の主要な下流シグナルについて siRNA による発現抑制、阻害剤を用いた活性抑制を行う。それにキナ

ーゼアレイ、western blot 法、マイクロアレイ法を組み合わせることで各シグナルの役割と標的分子の探索を行う。

4. 研究成果

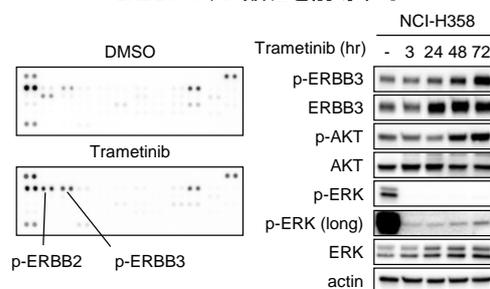
(1) 肺癌における ERK シグナルの制御機構を明らかにするため、肺癌細胞株に対し ERK の上流タンパクである MEK の阻害薬 (Trametinib, Selumetinib) を添加した。その結果、MEK 阻害薬は ERK シグナルを一時的に遮断するが、24 時間後には ERK シグナルの再活性化を認めた (図 1)。さらに、MEK 阻害薬の投与は PI3K シグナルの上昇 (AKT リン酸化の上昇) も伴っていた。

図1. MEK阻害薬の長期投与はERKシグナルの再活性化とAKTシグナルの上昇をきたす



(2) MEK 阻害薬投与後に認められる ERK シグナルの遮断が一時的なものにとどまる事、さらに MEK 阻害薬の投与が PI3K シグナルの活性化に関与していたことから、MEK 阻害後に誘導されるシグナル伝達系が存在し、これらのパスウェイの活性化に関与しているものと考えた (このような機構はフィードバック機構と呼ばれる)。MEK 阻害薬投与後に誘導されるシグナルを探索するため、受容体型チロシンキナーゼアレイを行った。その結果、MEK 阻害薬投与後に ERBB2 と ERBB3 のリン酸化が亢進していた。ウエスタンブロット法でも、ERBB3 のタンパク発現の上昇とリン酸化の亢進が確認された。

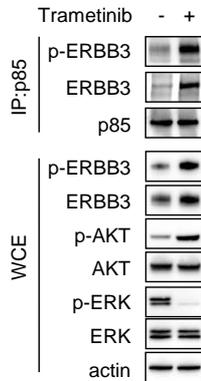
図2. MEK阻害薬の長期投与は ERBB3のリン酸化を誘導する



(3) PI3K シグナルの活性化に関与している受容体型チロシンキナーゼを同定するため、PI3K のサブユニットである p85 を免疫沈降し結合するタンパクの同定を試みた。その結果、ERBB3 が p85 と結合しており、MEK 阻害薬投

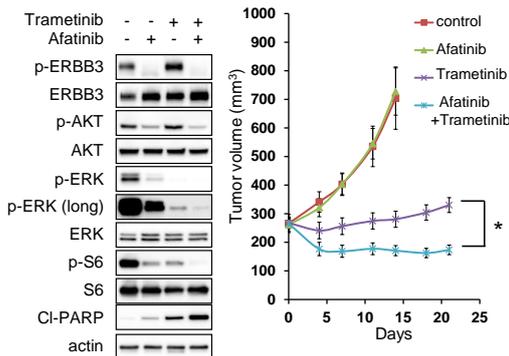
与後に ERBB3 の活性が上昇している結果と一致していた (図 3)。

図3. Trametinibの投与はERBB3によるPI3Kの活性化を促進する



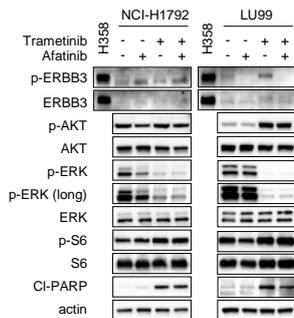
(4) 汎 EGFR 阻害薬の afatinib と MEK 阻害薬の併用によりアポトーシスの誘導と in vivo における腫瘍の縮小が認められた (図 4)。

図4. 汎EGFR阻害薬とMEK阻害薬の併用はアポトーシスを誘導しマウスゼノグラフトにおいて腫瘍を縮小する



(5) MEK 阻害薬投与による ERK シグナルの再活性化および AKT シグナルの上昇は ERBB3 の発現を認めない KRAS 変異肺がん細胞株でも同様に認められた (図 5)。

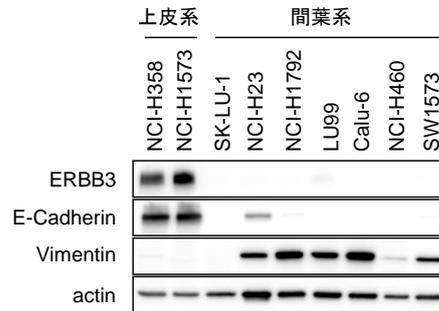
図5. ERBB3の発現のないKRAS変異細胞株でもERKシグナルの再活性化とAKTシグナルの上昇を認める



(6) ERBB の発現と関連する因子について探索したところ、上皮間葉移行 (Epithelial to

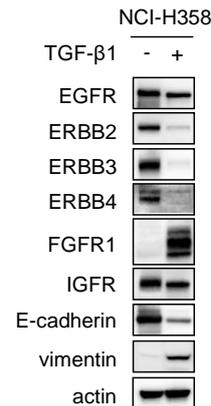
Mesenchymal transition: EMT) と ERBB3 の発現が関連しており、間葉系細胞では ERBB3 の発現を認めなかった (図 6)。

図6. ERBB3の発現は細胞の上皮間葉移行状態と関連する



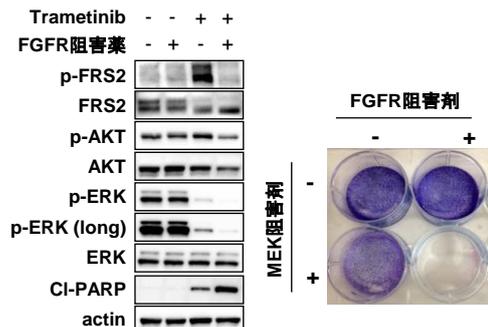
(7) 上皮系の性質を示す KRAS 変異細胞株に TGF-β を添加し EMT を誘導したところ、FGFR1 受容体が間葉系細胞で高発現することが判明した (図 7)。

図7. 上皮間葉移行によりFGFR1の発現が誘導される



(8) ERBB3 の発現を認めない間葉系マーカー陽性の KRAS 変異細胞株に FGFR 阻害薬と MEK 阻害薬を併用したところ、著明な細胞の増殖抑制とアポトーシスの誘導が認められた (図 8)。

図8. 間葉系マーカー陽性細胞におけるFGFR阻害剤とMEK阻害薬の併用効果



以上の結果により、KRAS 変異肺癌において ERK シグナルの制御には上流の MEK 阻害薬単独では不十分であり、フィードバック機構により活性化される受容体の抑制も必要であることが明らかとなった。さらに、このフィードバック機構により活性化される受容体は PI3K シグナルの活性化にも関与していることから、受容体の抑制と MEK 阻害薬の併用により、PI3K シグナルと ERK シグナルの両者の制御につながる可能性が示された。

また、フィードバックにより活性化される受容体は上皮間葉移行状態により異なっており、上皮間葉移行状態に応じた新たな標的治療の可能性が示された。

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 6 件)

1. Nanjo S, Ebi H et al. (10 人中 2 番目) High efficacy of third generation EGFR inhibitor AZD9291 in a leptomeningeal carcinomatosis model with EGFR-mutant lung cancer cells. **Oncotarget**. 査読有 2016 7:3847-56
2. Kotani H, Ebi H et al. (15 人中 2 番目、**Corresponding Author**) Co-active receptor tyrosine kinases mitigate the effect of FGFR inhibitors in FGFR1-amplified lung cancers with low FGFR1 protein expression. **Oncogene** 査読有 doi: 10.1038/onc.2015.426.
3. Costa C, Ebi H et al. (15 人中 2 番目) Measurement of PIP3 levels reveals an unexpected role for p110 β in early adaptive responses to p110 α -specific inhibitors in luminal breast cancer. **Cancer Cell** 査読有 27:97-108, 2015.
4. Ebi H et al (16 人中 1 番目) Lack of association between the BIM deletion polymorphism and the risk of lung cancer with and without EGFR mutations. **J Thorac Oncol**. 査読有 10:59-66, 2015.
5. Faber AC, Ebi H et al. (30 人中 12 番目) Assessment of ABT-263 activity across a cancer cell line collection leads to a potent combination therapy for small-cell lung cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. 査読有 112:E1288-96, 2015.
6. Taniguchi H, Ebi H et al. (10 人中 7 番目) Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS

(KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients. **Cancer Science**. 査読有 106:324-7, 2015.

[学会発表] (計 2 件)

1. Hironmichi Ebi, Translational Research for targeting BRAF and KRAS mutant cancers. 日本臨床腫瘍学会 (招待講演) 2014 年 7 月 17 日~7 月 19 日、福岡県福岡市
2. Hironmichi Ebi, Combinatorial approach targeting KRAS mutant cancers. The 20th JFCR-ISCC (招待講演) (国際学会) 2015 年 12 月 9 日~12 月 10 日、東京都港区

[図書] (計 6 件)

1. 衣斐寛倫, 矢野聖二 68 抗悪性腫瘍薬 (分子標的薬) Pocket Drugs 2015, 福井次矢監修 p570-587 医学書院
2. 衣斐寛倫 EGFR 変異肺癌における EGFR-TKI 耐性機序と治療戦略 医学のあゆみ 252:783-787, 2015.
3. 衣斐寛倫 BRAF, KRAS 変異腫瘍に対する戦略、特集: 非小細胞肺癌に対する新規薬剤の開発・導入の現場から 日本胸部臨床 74:638-347, 2015
4. 衣斐寛倫 肺癌における血管新生阻害療法、がん微小環境と標的治療実験、がん幹細胞ニッチ、間質、血管・リンパ管新生の理解に基づく 21 世紀の新たながん治療 実験医学増刊 Vol.33 No.5 168-173, 2015
5. 衣斐寛倫 ゲノム解析技術を用いた薬物療法の最適化へのアプローチ 腫瘍内科 14:62-68, 2014
6. 衣斐寛倫, 矢野聖二 III. がん薬物療法薬の作用機序 3 分子標的治療薬 (1) 低分子化合物 1) 低分子化合物の現状と展望: 概論、日本臨床, 72 巻 増刊号 2, 165-169, 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 間葉系 KRAS 変異型がん治療剤
発明者: 衣斐寛倫、矢野聖二、北井秀典
権利者: 国立大学法人金沢大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-227015
出願年月日: 平成 27 年 11 月 19 日
国内外の別: 国内

○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

衣斐 寛倫 (HIROMICHI EBI)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：00645145

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし