

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791520
 研究課題名（和文） NFκB 制御と抗 EGFR 抗体による KRAS 変異子宮内膜癌治療戦略に関する基礎研究
 研究課題名（英文） Basic research of the simultaneous therapy targeting NFκB and EGFR to treat KRAS-mutated endometrial cancer.
 研究代表者
 水本 泰成（MIZUMOTO YASUNARI）
 金沢大学・附属病院・助教
 研究者番号：00420331

研究成果の概要（和文）：子宮内膜癌における抗 EGFR 抗体療法は、KRAS 変異子宮内膜癌において無効である。KRAS 変異の下流にて活性化される主要シグナル経路として NFκB 経路をターゲットとすることで抗腫瘍効果を示す可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated in the experiment that anti-EGFR therapy against KRAS-mutated endometrial cancer does not show anti-tumor activity. To target NFκB, the dominant effector pathway activated downstream of KRAS mutation, seems to be effective strategy to treat KRAS-mutated endometrial cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜癌、KRAS 変異、NFκB、抗 EGFR 抗体

1. 研究開始当初の背景

多数の癌において epidermal growth factor receptor (EGFR) の過剰発現、遺伝子変異が報告されており、その下流で活性化される様々なシグナル伝達経路が発癌、腫瘍増殖、治療抵抗性に関与している。近年の分子標的治療の研究開発により EGFR をターゲットとした治療戦略が肺癌、大腸癌、頭頸部癌において臨床応用され、良好な成績を上げている。EGFR の下流で活性化する一つの経路として RAS signaling が知られているが、2008-2009 年にかけて KRAS 変異大腸癌は抗 EGFR 抗体療法に抵抗性を示すことが大規模臨床研究にて相次いで報告された

(Karapetis CS et al. N Engl J Med 2008;359:1757-1765)。これは数ある EGFR の effector の中で EGFR-RAS signaling が治療成績に影響するほど重要な pathway であることを示しており、大腸癌治療における KRAS 変異解析が大きくクローズアップされている。

一方、子宮内膜癌においても EGFR の過剰発現は 50-70% と高頻度に認められており、抗 EGFR 抗体の臨床応用に期待が高まっている。子宮内膜癌では約 20% に KRAS 変異を認め、in vitro 実験系にて活性型変異 KRAS を有する内膜癌細胞株において抗 EGFR 療法に抵抗性を示すことが示唆され

ている (Kato K et al. Eur J Cancer 1998;34:737)が、その活性型変異 KRAS に惹起される責任経路は明らかにされていない。

我々はこれまでに単離した子宮内膜腺上皮細胞を HPVE6, E7 および telomerase を導入することで不死化し (EM-E6/E7/TERT, Kyo S et al. Am J Pathol 2003;163:2259-2269)、さらに活性型変異 KRAS をレトロウイルス導入することで足場非依存性増殖能、腫瘍形成能を獲得した in vitro KRAS 変異子宮内膜癌モデル (EM-E6/E7/TERT/KRAS, Mizumoto Y et al. Oncogene 2006;25:5673-5682) を作成してきた。このモデルは正常核型を有しており、染色体異常による修飾を考慮せずに変異型 KRAS の下流シグナル解析をすることが可能である。本研究の準備段階として EM-E6/E7/TERT/KRAS において NFkappaB pathway が恒常的に活性化しており癌形質維持に重要な役割を示していることを証明している。また同細胞において RAS-ERK pathway の活性化が確認しているが、生存シグナルを誘導し、アポトーシス回避に関与するとされる PI3K-AKT pathway は活性化していないことを確認している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の構築した in vitro KRAS 変異子宮内膜癌モデルを用いて活性型変異 KRAS により惹起される、抗 EGFR 抗体の抗腫瘍効果に関与する候補シグナル伝達経路として NFkappaB pathway を評価し、KRAS 変異子宮内膜癌に対する新たな治療戦略を提示することである。

3. 研究の方法

in vitro KRAS 変異子宮内膜癌モデルの構築とその effector pathway の同定

臨床検体より摘出した子宮内膜組織をコラゲナーゼにて消化し、顕微鏡下に上皮細胞にて構成される腺管をピックアップし単離し、Rb/p16 と p53 の関与する premature senescence およびテロメア長短縮に起因する replicative senescence を乗り越えるために Human Pappilloma virus(HPV)16 E6/E7 および human telomerase reverse transcriptase (hTERT)をレトロウイルスベクター導入し不死化子宮内膜上皮 (EM-E6/E7/TERT) を樹立。これを背景細胞としてさらに活性型変異 KRAS をレトロウイルス導入し、足場非依存性増殖能・ヌードマウス腫瘍形成能を獲得した in vitro KRAS 変異子宮内膜癌モデルを作成する。染色体解析にて正常核型を有していることをすでに確認する。背景細胞である EM-E6/E7/TERT と比較することで活性型

変異 KRAS の下流で RAS-ERK pathway の活性化をリン酸化 Erk 発現量にて確認する。また EMSA(Electroforetic Mobility Shift Assay)にて DNA の kappaB 応答配列との結合能亢進および Luciferase assay にて NFkappaB の転写活性化を確認する。また生理的条件下で Ras の下流シグナルである PI3K-AKT 経路は活性化していないこともリン酸化 AKT 抗体を用いたウェスタンブロットにて確認する。

子宮内膜癌細胞株における KRAS 変異の有無による抗 EGFR 抗体の反応性の違いを評価

これまでに6種類の子宮内膜癌細胞株を入手済みで、さらに7種類入手予定である。すべての癌細胞株において KRAS 変異の有無を確認する。細胞株における KRAS 変異の有無による抗 EGFR 抗体 (cetuximab 使用予定) の反応性を IC50 にて算出し、一定の傾向 (KRAS 変異株で IC50 高値が予想される) を示すか評価する。また、KRAS 変異子宮内膜癌細胞株における KRAS 抑制、あるいは KRAS 野生型子宮内膜癌細胞株に活性型変異 KRAS を導入した際の IC50 の変化を観察する。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は、研究協力者がすでにシステムを確立しており、協力体制も確立済みである。

野生型 KRAS 存在下における抗 EGFR 抗体による NFkappaB 活性の低下を証明

NF-kappaB は炎症により誘導される転写因子として研究が進んできたが、近年、多くの癌において、NF-kappaB 制御の異常による活性化が、cell proliferation や cell survival signal を介して発癌や治療抵抗性へ関与するとの報告が蓄積されている。EGFR signal の下流でおこる NFkappaB 活性化を抑制しアポトーシスを誘導することで抗 EGFR 抗体 (cetuximab) の抗腫瘍作用メカニズムの一部は説明されている (Sclabas GM et al. J Gastrointest Surg 2003;7:37-43)。

WT-KRAS を有する EM-E6/E7/TERT 細胞を抗 EGFR 抗体にて処理した際に、NFkappaB 活性が低下することを、Gel shift assay および Luciferase reporter assay にて確認する。

EM-E6/E7/TERT/KRAS 細胞の NFkappaB 抑制による細胞増殖抑制効果と抗 EGFR 抗体併用時の増殖抑制効果の変化を評価

すでに EM-E6/E7/TERT/KRAS 細胞において NFkappaB が恒常的に活性化していることは準備段階にて確認済みである。NFkappaB は抑制因子である Ikb α と結合し不活化状態で細胞質に存在するが、上流からのリン酸化シグナルにて Ikb α がリン酸化するとプロテオソームにより分解され、遊離した NFkappaB が核内に移行し Target 遺伝子

のプロモーター領域に結合することで転写を制御している。NFkappaBの抑制にはリン酸化部位に変異のある Super Repressor IκBα(SR-IκBα)を用いる予定である。EM-E6/E7/TERT/KRASにSR-IκBαを導入し cetuximab による抗腫瘍効果の変化を観察する。NFkappaBが責任経路であれば抗腫瘍効果の増強が期待される。また EM-E6/E7/TERT 細胞に IκBα に対する siRNA を導入し、NFkappaB を特異的に活性化し、抗 EGFR 抗体の抗腫瘍効果の低下を確認する。

KRAS 変異子宮内膜癌細胞株における NFkappaB 抑制による抗 EGFR 抗体作用の再現実験

In vitro KRAS 変異子宮内膜癌モデルにて NFkappaB が責任経路であることが確認された場合は、さらに KRAS 変異子宮内膜癌細胞株 (HEC1A 細胞、活性型 KRAS 導入 Ishikawa 細胞) における NFkappaB 抑制実験を行い、抗 EGFR 抗体の抗腫瘍効果増強の再現性を評価する。

In vivo における NFkappaB 抑制による抗 EGFR 抗体の抗腫瘍効果増強を評価
Ishikawa 細胞および KRAS 導入 Ishikawa 細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍形成を確認したのちに cetuximab +/- NFkappaB inhibitor にて in vivo における抗腫瘍効果を評価する。Cetuximab はマウス尾静脈より投与、NFkappaB 抑制としては atherocollagen および NFkappaB の構成サブユニットである p65 に対する siRNA を用いて局所投与および全身投与による抑制方法を検討している。

NFkappaB 経路が cetuximab 感受性に影響していなかった場合

第一の候補である NFkappaB 経路が cetuximab 感受性に影響していなかった場合は、RAS-ERK 経路を第二の候補経路とし、抑制による抗 EGFR 抗体感受性変化の検討を進める。また EM-E6/E7/TERT および EM-E6/E7/TERT/KRAS の抗 EGFR 抗体処理前後に誘導される遺伝子を microarray 解析し、第三の候補分子を抽出する。

4. 研究成果

子宮内膜癌における癌遺伝子 KRAS の変異は 20%前後に認められる。EGFR を介したシグナル伝達系が各種癌の治療戦略の中心となってきており、抗 EGFR 抗体はすでに実地臨床にて使用されている。将来的に子宮内膜癌における抗 EGFR 抗体を用いた治療戦略を検討する際、KRAS 変異子宮内膜癌は抗 EGFR 抗体抵抗性を示す可能性がある。本研究は、KRAS 変異の下流の責任因子を抑制することで、KRAS 変異子宮内膜癌に対する抗 EGFR 抗体の感受性を増強する可能性を

検討する基礎的研究である。これまでの研究により我々は NFkB が責任因子であると仮説を立て、実験を計画している。

これまでに入手した子宮内膜癌細胞株における KRAS 遺伝子変異の有無を確認した。KRAS 変異の有無による抗 EGFR 抗体による増殖抑制効果を In vitro 実験系にて確認したところ、変異株において有意に増殖抑制効果が低いことが示された。

KRAS 変異により活性化するシグナル伝達系の中で NFkB 経路が責任経路であるとの仮定を証明するため、正常子宮内膜腺上皮細胞に遺伝子導入することで作成した in vitro モデル細胞 (EM-E6/E7/TERT 及び EM-E6/E7/TERT/KRAS) の比較を行った。KRAS 変異モデルにおいて有意に NFkB の kB responsive element への結合能および転写活性が高いことが示された。KRAS 変異モデルにおいて活性化している NFkB を抑制すべく、抑制因子である変異型 IκB(SR-IκB) を EM-E6/E7/TERT/KRAS にレトロウイルスベクター導入し、その表現形を評価したところ EM-E6/E7/TERT/KRAS の足場非依存性増殖能、ヌードマウス腫瘍形成能消失が確認された。

以上より NFkB は KRAS 変異の下流で活性化され、癌形質の根幹に関与する強力な effector pathway であると考えられ、これをターゲットとした治療が有効性を示す可能性が示唆された。また NFkB を抑制することで足場非依存性増殖能、腫瘍形成能などが消失しており、NFkB 抑制と抗 EGFR 抗体との併用による抗腫瘍効果の増強を評価するための in vivo 実験系が不成立となったため、中止した。

今後は野生型 KRAS 子宮内膜癌における NFkB の関与および、抗 EGFR 抗体療法との併用療法の可能性を明らかにしていきたい。

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 4 件)

- ① Mizumoto Y, Kyo S, Kiyono T, Takakura M, Nakamura M, Maida Y, Nori N, Bono Y, Sakurai H, Inoue M. Activation of NF-kappaB is a novel target of KRAS-induced endometrial carcinogenesis. (査読有)
Clin Cancer Res.2011;17(6):1341-50
DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-2291
- ② Kyo S, Sakaguchi J, Kiyono T, Shimizu Y, Maida Y, Mizumoto Y, Mori N, Nakamura M, Takakura M,

Miyake K, Sakamoto M, Inoue M.
Forkhead transcription factor
FOXO1 is a direct target of progestin
to inhibit endometrial epithelial cell
growth. (査読有)

Clin Cancer Res. 2011;17(3):525-37
DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-128
7

- ③ Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang
X, Mizumoto Y, Takakura M, Maida
Y, Mori N, Hashimoto M, Ohno S,
Inoue M. Prognostic impact of CD133
expression as a tumor-initiating cell
marker in endometrial cancer. (査読
有)

Hum Pathol. 2010;41(11):1516-29
DOI:10.1016/j.humpath.2010.05.006

- ④ Mori N, Kyo S, Nakamura M,
Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y,
Takakura M, Ohono S, Kiyono T,
Inoue M. Expression of HER-2
affects patient survival and
paclitaxel sensitivity in endometrial
cancer. (査読有)

Br J Cancer. 2010;103(6):889-98
DOI:10.1038/sj.bjc.6605805

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水本 泰成 (MIZUMOTO YASUNARI)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：00420331

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし