

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	奥村 俊介
<b>学位論文題目</b>			
Nicotinamide Phosphoribosyltransferase is a Potent Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor-Gene T790M Mutation (ニコチンアミド・フォスホリボシルトランスフェラーゼは T790M 上皮成長因子受容体遺伝子変異を有する非小細胞肺癌の有力な治療ターゲットである)			
<b>共著者名</b>			
佐々木高明、南幸範、大崎能伸			
未公表			
<b>研究目的</b>			
<p>肺癌は悪性腫瘍の死因で第 1 位を占めている。肺癌は非小細胞肺癌と小細胞肺癌に大別されるが、非小細胞肺癌が肺癌の約 80~85%を占めている。非小細胞肺癌のうち、60~70%で上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) タンパクを高発現している。それら肺癌の腫瘍増殖は大きく EGFR シグナルへ依存しており、その活性化には細胞内 ATP が必須である。<sup>1)</sup> EGFR シグナルに依存する非小細胞肺癌の代表例として、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌が挙げられる。近年、これら変異を有する肺癌に対し、EGFR チンキナーゼ阻害剤である Gefitinib が大変有効であることが示された。<sup>2)</sup></p> <p>一方、これら肺癌における Gefitinib の耐性化が近年問題となっている。耐性化の機序として、EGFR 遺伝子の exon 20 における 2 次変異の獲得 (T790M 遺伝子変異) や、c-MET シグナルの増幅などが報告されている。一旦 Gefitinib の耐性化を獲得すると他の抗癌剤治療にも耐性になってしまうため、Gefitinib 耐性肺癌に対する新たな治療戦略が必要とされている。</p> <p>Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt)は細胞内の NAD の生合成を司る酵素であり、細胞内の細胞内エネルギー代謝・細胞生存・抗アポトーシスに関与している。近年、Nampt の阻害剤で腫瘍増殖が抑制されることが報告されているが、その抗腫瘍効果の機序は未だ十分に解明されていない。<sup>3)</sup></p> <p>そこで我々は、Nampt が非小細胞肺癌の腫瘍増殖に強く関与しており、Nampt の阻害により抗腫瘍効果が発揮されるという仮説を設けた。また、Nampt の阻害によって細胞内の ATP 生合成が抑制されるという予想を立て、細胞生存に細胞内 ATP をより多く必要とする EGFR 遺伝子変異非肺癌細胞肺癌で高い抗腫</p>			

瘍効果が発揮されることを予想した。

本研究では、①非小細胞肺癌の増殖に Nampt が関与していること、②Gefitinib に耐性である T790M 遺伝子変異獲得非小細胞肺癌において Nampt 阻害剤が有効であること、および③腫瘍増殖抑制効果のメカニズムが細胞内 ATP 濃度の低下と EGFR シグナルの抑制であること、を示す。

#### 材料・方法

4つのヒト非小細胞肺癌細胞株を用いた。EGFR 遺伝子変異を有さない H358、EGFR 遺伝子変異を有する PC9 (EGFR 遺伝子の Exon 19 欠失、Gefitinib 感受性)、EGFR 遺伝子変異を有する LC2 (EGFR 遺伝子の Exon 21 の点突然変異 L858R、Gefitinib 感受性)、EGFR 遺伝子変異を有して Gefitinib 耐性である H1975 (L858R に加えて、Exon 20 の点突然変異 T790M を有する) を用いた。また、ヒト肺線維芽細胞株である WI38 細胞をコントロールに用いた。Nampt 阻害剤として FK866(Axon Medchem)を用いた。

Nampt の mRNA の発現は real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)で評価した。GAPDH housekeeping 遺伝子で標準化して相対定量を行った。

siRNA の導入は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いた。Nampt siRNA および negative control の RNA は invitrogen より購入した。BrdU assay を行って細胞増殖能を評価した。BrdU cell proliferation assay kit (Roche, Switzerland)を用い、microplate luminometer (Thermo scientific)で測定した。

Western blot を行い、EGFR シグナルタンパク発現量の評価した。タンパクの回収には Cell Lysis Buffer (CST Japan)を用いた。回収されたタンパクを SDS-PAGE で泳動・分離し、各タンパクの発現量を評価した。HRP 標識の 2 次抗体と ECL 検出試薬を用い、LAS-3000 (FUJIFILM) および MultiGauge Ver.2.2 (FUJIFILM) でタンパク発現量を解析した。

細胞内 ATP 濃度は、ATP bioluminescence assay kit (Roche, Mannheim, Germany)を用いて評価した。FK866 を添加した培地で培養された H1975 細胞を lysis solution で回収・溶解し、Luciferase assay を行った。測定には chemiluminometer (LAS-3000, FUJIFILM)を用いた。

アポトーシスの検出は、Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Bioscience)を用い、フローサイトメトリーを行って評価した。フローサイトメトリーには BD FACSAria II (BD Bioscience)を用い、解析には BD FACSDiva software ver 6.1 (BD Bioscience)を使用した。

*In vivo* 実験では、7~10 週齢のヌードマウス (CD-1Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice, Charles River)の皮下へ、H1975 細胞を移植した。移植 14 日後に FK866 (10mg/kg, 1 日 2 回腹腔内注射)もしくは Gefitinib (12.5mg/kg, 1 日 1 回経口投与)を投与し、腫瘍体積を観察・比較した。移植腫瘍切片における phospho-ERK1/2 のタンパク発現を免疫染色法で評価した。

## 成績

4つの非小細胞肺癌細胞株における Nampt mRNA の発現レベルは様々であった。特に PC9 細胞株で発現量が低く、LC2 および H1975 細胞で高かった。それら肺癌細胞へ Nampt siRNA を投与すると、細胞増殖が抑制された。また、Nampt の阻害剤である FK866 を投与すると同様に細胞増殖が抑制された。PC9 細胞株は比較的低濃度の FK866 で増殖能が阻害されたが、H1975 株は高濃度の FK866 で増殖が阻害された。

ATP assay の結果、FK866(10 nM)を投与した H1975 細胞株で細胞内の ATP 濃度が減少した。投与 24 時間後より、細胞内 ATP 濃度の低下が認められた。72 時間後では 10 倍以上も細胞内 ATP 濃度が低下した。

Western blot では、FK866 (50 nM)を投与した H1975 細胞株でリン酸化 EGFR シグナルタンパクの発現レベル(phospho-EGFR, phospho-Akt, phospho-MEK1/2, phospho-ERK1/2)が低下していた。一方、Gefitinib (10  $\mu$ M)を投与した H1975 細胞では EGFR シグナルタンパク発現レベルの低下は不完全であった。LC2, PC9 細胞においても、FK866 の投与(50 nM)で EGFR シグナルタンパク(phospho-MEK1/2)の発現レベルが低下した。

フローサイトメトリーでは、FK866 (50 nM)の添加により H1975 細胞のアポトーシスが誘導された(Annexin-V FITC, Propidium Iodide)。一方、Gefitinib (10  $\mu$ M)ではアポトーシスの誘導は弱かった。

マウス肺癌皮下移植モデルでは、FK866 (10mg/kg x 2)を投与した群で腫瘍体積の増大が抑制されていた。Gefitinib 投与群では腫瘍増殖抑制効果が認められなかった。コントロール群・Gefitinib 投与群と比べ、FK866 投与群では有意差を持って腫瘍増殖が抑制されていた。また、移植腫瘍における免疫染色では、FK866 投与群で phospho-ERK1/2 タンパクの発現が抑制されていた。

## 考案

我々は、Gefitinib 耐性の *EGFR<sup>T790M</sup>* 遺伝子変異獲得非小細胞肺癌に対する新たな治療ターゲットとして Nampt に着目した。Nampt は細胞内エネルギー代謝に関与する酵素であるため、Nampt の阻害により細胞内 ATP 合成が阻害されて、肺癌に対し抗腫瘍効果を発揮すると考えた。

まず、我々は RT-PCR にて肺癌細胞における Nampt の mRNA 発現を確認した。また、Nampt siRNA による細胞増殖の抑制を確認した。このことから、肺癌の細胞増殖に Nampt が関与していることが推察された。さらに、Nampt の阻害剤である FK866 でも同様に増殖抑制効果が認められた。

FK866 は Gefitinib 耐性である H1975 細胞にも増殖抑制効果を示したため、その機序を検討すべく ATP assay を行った。その結果、FK866 を投与した H1975 細胞では細胞内の ATP 濃度が低下していた。さらに、細胞内 ATP レベルの低下による EGFR シグナル抑制効果を確認するために、ウエスタンブロットで EGFR シグナルタンパクの解析を行った。その結果、FK866 により EGFR シグナル活性が抑制されていた。

さらに、アポトーシス誘導の有無についてフローサイトメトリーにて解析を行った結果、FK866 は H1975 細胞のアポトーシスを誘導する事が明らかとなった。

*in vivo*において FK866 の H1975 細胞に対する抗腫瘍効果を確認すべく、マウス腫瘍皮下移植モデルを利用した。その結果、FK866 はコントロール群・Gefitinib 治療群と比較して腫瘍増殖を抑制する事がわかった。さらに、免疫染色では EGFR 下流シグナルの 1 つである phospho-ERK1/2 の発現が抑制されていた。

以上をまとめると、本研究では、*EGFR*<sup>T790M</sup>遺伝子変異獲得非小細胞肺癌に対して Nampt 阻害剤が①細胞内 ATP 濃度を減少させ、②EGFR シグナルを抑制し、③アポトーシスを引き起こす事で抗腫瘍効果を発揮することを示した。さらに④*in vivo*実験でもその効果が再現されることを確認した。

#### 結論

Nampt は *EGFR*<sup>T790M</sup>遺伝子変異獲得非小細胞肺癌の新たな治療ターゲットとなりうる。




#### 引用文献

- 1) Yun CH, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:2070-5.
- 2) Paez JG, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. 2004;304:1497-500.
- 3) Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. Cancer Res. 2003;63:7436-42.

#### 参考論文

- 1) 奥村俊介、他. 後期高齢者非小細胞肺癌に対するパクリタキセルとカルボプラチン併用化学療法の第 I 相試験. 肺癌. 2009;49:146-150

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	奥村 俊介
審査委員長 西川 祐司  審査委員 飯塚 一  審査委員 大崎 能伸 			
学 位 論 文 題 目  Nicotinamide Phosphoribosyltransferase is a Potent Therapeutic Target in Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor-Gene T790M Mutation (ニコチンアミドフォスホリボシルトランスフェラーゼはT790M上皮成長因子受容体遺伝子変異を有する非小細胞肺癌の有力な治療ターゲットである)			
<p>肺癌の中で大部分を占める非小細胞癌の多くは、上皮成長因子受容体 (EGFR) を高度に発現している。特に、腫瘍細胞が EGFR 遺伝子に変異を持つ場合には、腫瘍増殖が EGF シグナリングに強く依存しており、EGFR 阻害剤である Gefitinib が治療に有効である。しかし最近、二次変異 (T790M) により腫瘍の Gefitinib 耐性が誘導されることが明らかになり、肺癌治療において解決すべき新たな課題となっている。本研究は、Gefitinib 耐性腫瘍にも効果的な治療を開発する目的で、NAD 生合成に関わる酵素であり、細胞内 ATP 産生に重要な役割を担っている nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) の阻害が、肺癌細胞の増殖や細胞死に与える影響を調べたものである。この研究は EGFR シグナリングに依存する腫瘍細胞はその生存に、より多くの ATP を必要とするという申請者らの仮説に基づいている。</p> <p>申請者らは、種々のヒト肺癌細胞株を用い、①siRNA および Nampt 阻害剤 FK866 を用いた Nampt の阻害が、実際に細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導すること、② Nampt の阻害は T790M 変異を持つ腫瘍細胞でも有効であること、③ATP の枯渇および</p>			

これによる EGFR および下流のシグナリング分子の脱リン酸化がメカニズムの 1 つである可能性があること、④FK866 がヌードマウス皮下への腫瘍細胞移植モデルでも T790M 変異腫瘍の増殖を抑制することを示した。

本研究は、細胞エネルギー代謝を抑制することで EGFR シグナリング依存性肺非小細胞癌の増殖が抑制されることを実証しており、申請者らの仮説が正しいことを示唆している。In vitro, in vivo の多くの実験を駆使して得られた興味深い結果であり、Gefitinib 耐性腫瘍の治療にも応用できる可能性を示している点で重要である。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者が積み重ねた努力の結果であり、当該分野において学術的にも十分に貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。