

【要約】

博士学位論文 2023 年度

活性化変異型 EGFR/PI3K による
非小細胞肺癌細胞株のストレス応答の制御

慶應義塾大学大学院薬学研究科

高橋 瑞希

学位論文の要約

1. 背景

細胞は、外因性および内因性のストレスに対して、防御機構を利用して適応する。統合的ストレス応答 (Integrated stress response; ISR) は、アミノ酸欠乏、小胞体ストレス、鉄欠乏およびウイルス感染などのストレスに対して、general control non-derepressible 2 (GCN2), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), heme-regulated inhibitor (HRI), protein kinase R (PKR) の4つの eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) キナーゼが活性化される。例えば、アミノ酸欠乏ストレスに対しては、通常 aminoacyl tRNA synthetase を介してアミノ酸と結合している uncharged tRNA が、アミノ酸から離れた遊離状態となって GCN2 と結合することで、GCN2 の活性化が誘導される。これらのキナーゼが eIF2 α の51番目のセリンをリン酸化すると、細胞全体のタンパク質の翻訳が抑制される一方で、upstream open reading frames (uORFs) を介した転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) の翻訳の亢進が起きる。ATF4 は、アミノ酸代謝や protein folding などに関連するストレス応答遺伝子を誘導し、細胞の適応応答に寄与する。

腫瘍は低酸素や栄養飢餓などのストレス状態にあると考えられており、ISR が腫瘍の形成・進展や治療抵抗性などに関与することが示唆されている。実際に、大腸がん、肺がん、乳がんなど種々の腫瘍で、GCN2 の発現量およびリン酸化の亢進が報告されている。また、ゼノグラフトモデルにおいて、GCN2 または ATF4 のノックダウンは、腫瘍の増殖を阻害することが報告されている。また、がん遺伝子産物と ISR との関連についても研究が進んでいる。慢性骨髄性白血病細胞の BCR-ABL を阻害することにより、GCN2 経路および PERK 経路の活性化と ATF4 の発現誘導が阻害された。悪性黒色腫細胞の活性化変異型 BRAF の阻害、および非小細胞肺癌細胞の活性化変異型 KRAS の阻害は、アミノ酸欠乏により誘導される ATF4 の発現を抑制した。以上より、がんの発生・増殖に重要な BCR-ABL、BRAF、KRAS などのドライバーがん遺伝子産物は、ISR 経路と相互作用し、ATF4 の発現亢進に寄与すると考えられている。

肺がんは、本邦で死亡数が最も多いがんである。肺がんの85%は非小細胞肺癌であり、中でも肺腺がんは肺がん全体の50-60%を占める。日本人の肺腺がんでは、約50%に epidermal growth factor receptor (EGFR) の活性化変異が認められる。EGFR は、下流の RAS-RAF-MEK-MAP 経路の活性化、PI3K-AKT-mTOR 経路の活性化を介して、がん細胞の生存・増殖を制御し、腫瘍の増殖に寄与する。活性化変異型 EGFR は、日本を含む東アジアで非常に多く、がん治療の標的として重要である。

これまで、EGFR 活性化変異陽性非小細胞肺癌に対して、gefitinib、erlotinib などの EGFR の tyrosine kinase の阻害剤が用いられてきた。その後、gefitinib、erlotinib に耐性な T790M 変異を有する活性化変異型 EGFR が報告され、現在の日本では、T790M 変異型 EGFR にも有効な osimertinib が、活性化変異型 EGFR を有する非小細胞肺癌の第一選択薬となっている。上記のように、ドライバーがん遺伝子産物は、ISR 経路と相互作用し ATF4 の発現亢進に寄与すると考えられるが、活性化変異型 EGFR による ISR の制御機構については、まだ研究が進んでいない

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞膜上の phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) をリン酸化し、下流の AKT や mTOR にシグナルを伝達する。Class-1A PI3K は、制御サブユニット p85 と触媒サブユニット p110 がヘテロダイマーを形成して機能する。p110 は α 、 β 、 δ のいずれかで構成される。p110 α をエンコードする PIK3CA の活性化変異は、非小細胞肺癌の約2-5%で認められている。これまで

に、活性化変異型 PI3K の、アミノ酸欠乏ストレスで誘導される GCN2 の活性化と ATF4 の発現誘導に対する影響については検討されていない。

本研究では、このような背景のもと、非小細胞肺癌細胞における ATF4 の制御機構の解明を目的とし、EGFR に活性化変異を有する非小細胞肺癌細胞株、PI3K に活性化変異を有する非小細胞肺癌細胞株、EGFR と PI3K の両者に活性化変異を有する肺癌細胞株を用いて、これらの活性化の阻害が ISR およびがん細胞の生存と増殖に与える効果について研究を行った。

2. 結果

2-1. 活性化変異型 EGFR によるストレス応答の制御

2-1-1. EGFR 阻害剤による ATF4 発現誘導抑制効果

EGFR に exon 19 欠失の活性化変異を有するヒト非小細胞肺癌 HCC827 細胞および L858R の活性化変異と T790M の耐性変異を有するヒト非小細胞肺癌 NCI-H1975 細胞に、histidyl-tRNA synthetase を阻害してアミノ酸欠乏ストレスを誘導する histidinol を添加すると、免疫蛍光染色法により両細胞株における核内の ATF4 発現は同程度誘導された。これに EGFR 阻害剤 osimertinib を併用すると、HCC827 細胞の ATF4 発現誘導は大きく抑制された。NCI-H1975 細胞の ATF4 発現誘導も抑制されたが、その抑制レベルは HCC827 細胞より小さかった。

次に、この両細胞に、細胞外の asparagine を分解してアミノ酸欠乏ストレスを誘導する L-asparaginase を添加したところ、western blot により両細胞における ATF4 発現の誘導が認められた。これに EGFR 阻害剤 osimertinib を処理すると、HCC827 細胞の ATF4 発現誘導は大きく抑制された。NCI-H1975 細胞の ATF4 発現誘導も抑制されたが、その抑制レベルは HCC827 細胞と比較して小さかった。osimertinib は GCN2 の活性化の指標となる GCN2 および eIF2 α のリン酸化レベルをほとんど変動させなかった。GCN2 阻害剤 GCN2iB は、L-asparaginase 添加時の両細胞の GCN2 および eIF2 α のリン酸化レベルと ATF4 発現誘導を阻害した。EGFR 野生型のヒト非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞に対しては、osimertinib は、histidinol、L-asparaginase による ATF4 の発現誘導を抑制しなかった。

2-1-2. ストレス下での EGFR 阻害剤の細胞増殖抑制および細胞死誘導

ヒト非小細胞肺癌 PC-9 細胞は、EGFR に exon 19 欠失の活性化変異を有する。osimertinib は、EGFR に活性化変異を有するヒト非小細胞肺癌 HCC827 細胞、NCI-H1975 細胞および PC9 細胞の細胞増殖を同じ濃度域で抑制した。また 3 細胞において、histidinol 添加時には、osimertinib の細胞増殖阻害効果が増強された。EGFR 野生型のヒト非小細胞肺癌 NCI-H460 細胞の細胞増殖に対しては、osimertinib は増殖阻害効果を示さなかった。

osimertinib は、HCC827 細胞、NCI-H1975 細胞にアポトーシスを誘導した。histidinol、L-asparaginase の添加時には、HCC827 細胞に対する osimertinib のアポトーシス誘導が増強された。NCI-H1975 細胞に対しては、histidinol の添加時には osimertinib のアポトーシス誘導が軽度が増強されたが、L-asparaginase 添加時には osimertinib のアポトーシス誘導を増強させなかった。

以上より、histidinol、L-asparaginase の処理条件では、HCC827 細胞に対する osimertinib の効果が増強されたが、NCI-H1975 細胞に対してはその増強効果は少なかった。

2-2. 活性化変異型 PI3K によるストレス応答の制御

2-2-1. PI3K 阻害剤による ATF4 発現誘導抑制効果

EGFR に活性化変異を持つヒト非小細胞肺癌細胞株のうち、HCC827 細胞の PI3K

は野生型であるが、NCI-H1975 細胞は PI3Kp110 α に G118D の活性化変異を有する。

HCC827 細胞と NCI-H1975 細胞に、L-asparaginase と PI3K α 阻害剤 alpelisib、または histidinol と alpelisib を処理して核内の ATF4 の免疫蛍光染色を行ったところ、NCI-H1975 細胞では、L-asparaginase または histidinol による ATF4 の発現誘導を大きく低下させた。HCC827 細胞では、alpelisib は L-asparaginase による ATF4 の発現誘導を少し低下させたが、histidinol による ATF4 の発現誘導は変化させなかった。

HCC827 細胞と NCI-H1975 細胞の培養に、L-asparaginase と 3 種の PI3K 阻害剤を添加して western blot により ATF4 の発現を検討したところ、免疫蛍光染色の結果と同様に、NCI-H1975 細胞の ATF4 発現誘導が顕著に抑制され、HCC827 細胞の ATF4 発現誘導は少し抑制された。この時、osimertinib 処理時の結果と同様に、GCN2 および eIF2 α のリン酸化レベルの変動はわずかであった。

EGFR 野生型ヒト非小細胞肺癌細胞株のうち、A549 細胞の PI3K は野生型であるが、NCI-H460 細胞は PI3Kp110 α に E545K の活性化変異を有する。A549 細胞と NCI-H460 細胞に、histidinol と alpelisib を処理して、western blot により ATF4 の発現を検討したところ、NCI-H460 細胞では、alpelisib は histidinol による ATF4 の発現誘導を大きく低下させたが、A549 細胞では、alpelisib は histidinol による ATF4 の発現誘導を変化させなかった。

EGFR シグナル経路下流の代表的な経路として、MAPK 経路および AKT 経路が存在するが、MEK 阻害剤 trametinib は、L-asparaginase による NCI-H1975 細胞の ATF4 の発現誘導を抑制しなかった。一方、AKT 阻害剤 MK2206 は、L-asparaginase による NCI-H1975 細胞の ATF4 の発現誘導を抑制した。

2-2-2. *PIK3CA* ノックダウンによる ATF4 発現誘導抑制

HCC827 細胞、NCI-H1975 細胞に、*PIK3CA* siRNA を導入して PI3Kp110 α サブユニットをノックダウンすると、NCI-H1975 細胞では、L-asparaginase、histidinol による ATF4 の発現誘導が大きく抑制された。一方、HCC827 細胞では、PI3Kp110 α サブユニットのノックダウンによる ATF4 の発現誘導抑制効果は軽度であった。また、PI3Kp110 α サブユニットのノックダウンは、GCN2 および eIF2 α のリン酸化レベルを変化させなかった。これは、PI3K 阻害剤処理時の結果と一致していた。一方、PI3Kp110 β または PI3Kp110 δ サブユニットのノックダウンでは、ATF4 の発現誘導は変化しなかった。

2-2-3. mTOR 阻害剤および mTOR ノックダウンによる ATF4 発現誘導の抑制

histidinol および L-asparaginase 処理時に、複数の mTORC 阻害剤を共処理し免疫蛍光染色を行ったところ、NCI-H1975 細胞では、HCC827 細胞に比べて、ATF4 の発現誘導が顕著に抑制された。同様に、L-asparaginase 処理時に mTOR 複合体構成因子である raptor、rictor のノックダウンを行ったところ、NCI-H1975 細胞では、HCC827 細胞に比べて、ATF4 発現誘導が顕著に抑制された。

2-2-4. *PIK3CA* ノックダウンによるタンパク質翻訳の抑制

NCI-H1975 細胞において、*PIK3CA* のノックダウンは、histidinol および L-asparaginase 処理により増加した ATF4 mRNA の発現レベルを低下させた。しかし、ATF4 のタンパク質発現量と比較して、発現低下は少なかった。また、NCI-H1975 細胞における *PIK3CA* のノックダウンは、HCC827 細胞と比較して、puromycin の取り込みを指標とした新規タンパク質合成能を顕著に減弱させた。さらに翻訳開始因子 eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) の阻害剤である silvestrol の処理により、HCC827 細胞、NCI-H1975 細胞の ATF4 発現誘導が抑制されたが、NCI-H1975 細胞では silvestrol のより低い濃度から ATF4 誘導抑制効果が認められた。

2-2-5. ストレス下で PI3K 阻害剤が細胞増殖および細胞死に与える影響

NCI-H1975 細胞において、histidinol および L-asparaginase 添加時には、alpelisib の細胞増殖阻害効果が増強されなかった。また histidinol の添加時の alpelisib のアポトーシス誘導は軽度が増強された。

以上より、NCI-H1975 細胞において、histidinol、L-asparaginase の処理条件では、alpelisib による ATF4 誘導抑制効果は強く認められるものの、増殖阻害や細胞死の誘導の増強は少なかった。

2-3. 活性化変異型 EGFR および活性化変異型 PI3K によるストレス応答の制御

2-3-1. EGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤の併用による ATF4 発現誘導の抑制

histidinol 処理条件下の osimertinib と alpelisib の併用による ATF4 誘導抑制効果を検討した結果、EGFR と PI3K に活性化変異を持つ NCI-H1975 細胞では、各単独処理と比較して、併用で顕著な ATF4 誘導抑制効果が認められた。一方、EGFR に活性化変異を持つが PI3K 野生型の HCC827 細胞では、併用による効果増強は認められなかった。Histidinol に代えて、prolyl-tRNA synthetase を阻害してアミノ酸欠乏ストレスを誘導する halofuginone を用いた実験でも、NCI-H1975 細胞では、histidinol 処理条件下の osimertinib と pan-PI3K 阻害剤 copanlisib の併用時にも、各単剤処理時と比較して、顕著な ATF4 誘導抑制効果が認められた。

2-3-2. EGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤併用によるストレス応答遺伝子の抑制

NCI-H1975 細胞を用いて、cDNA microarray による遺伝子発現解析を行った結果、通常培養条件と比較して、histidinol の 24 時間処理により 2 倍以上発現が変動した遺伝子が 125 個抽出された。この遺伝子群に対して、histidinol 処理時と histidinol、osimertinib、alpelisib の 3 剤併用時を比較したクラスタリング解析を行い、3 剤併用時に遺伝子の発現が減弱する Stress-EGFR/PI3Ki signature を同定した。このシグネチャーに関して、histidinol と osimertinib の 2 剤併用時、histidinol と alpelisib の 2 剤併用時を解析したところ、弱い発現抑制効果が認められた。また、バイオインフォマティクスツールを用いて Stress-EGFR/PI3Ki signature を解析した結果、この中にストレス関連遺伝子が含まれることが明らかとなった。またその上流因子として ATF4 が予測された。

2-3-3. EGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤の併用によるストレス応答関連タンパク質の発現抑制

Stress-EGFR/PI3K signature に含まれており、既知の ATF4 の下流因子である phosphoserine aminotransferase (PSAT) のタンパク質発現を western blot で検討したところ、遺伝子の発現傾向と一致して、osimertinib および alpelisib の併用処理によって顕著な発現低下がみられた。また、ストレスの有無に関わらず、osimertinib と alpelisib の併用は、EGFR のリン酸化レベルを低下させた。

2-3-4. EGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤の併用によるストレス下の細胞増殖抑制と細胞死誘導

NCI-H1975 細胞に、histidinol を処理した条件で、osimertinib と alpelisib の併用は、osimertinib または alpelisib の単剤処理と比較して、顕著な細胞増殖阻害効果を示した。また、osimertinib と alpelisib の併用は、histidinol 処理条件下で、アポトーシス誘導を顕著に増強させた。

3. 考察・展望

「2-1」において、EGFR に活性化変異を有するヒト非小細胞肺癌細胞で、osimertinib がアミノ酸欠乏ストレス条件下の ATF4 発現誘導を抑制したことから、活性化変異型 EGFR はアミノ酸欠乏ストレス条件下の ATF4 発現誘導の制御に関与していると考えられた。しかし、GCN2 の活性化の指標である GCN2 のリン酸化および

eIF2 α のリン酸化の変動はわずかであったため、GCN2 経路とは異なる経路で ATF4 が制御される可能性が考えられた。さらに、PI3K に活性化変異を有する NCI-H1975 細胞では、PI3K 野生型の HCC827 細胞と比較して、osimertinib による ATF4 発現誘導抑制効果および細胞増殖抑制効果が弱かったことから、活性化変異型 PI3K が ATF4 発現誘導の制御に寄与している可能性が考えられた。

「2-2」において、活性化変異型 PI3K は、主に mTOR を介して、ATF4 の翻訳を制御している可能性が考えられた。特に、PI3Kp110 α サブユニットは、ATF4 の発現誘導に関与することが示された。また、NCI-H1975 細胞の ATF4 発現誘導の制御においては、MAPK 経路は関与しないと考えられた。さらに、PI3K に活性化変異を有する NCI-H1975 細胞では、alpelisib による強い ATF4 発現誘導抑制効果が認められたにもかかわらず、細胞増殖抑制効果が弱かったことから、PI3K のみを阻害しても細胞の増殖・生存に与える影響は不十分である可能性が考えられた。

「2-3」において、NCI-H1975 細胞では、活性化変異型 EGFR に加えて、活性化変異型 PI3K も ATF4 発現誘導の制御およびストレス下の細胞生存に寄与することが明らかとなった。Stress-EGFR/PI3Ki signature には、*PSAT1*、*phosphoserine phosphatase*、*branched chain amino acid transaminase 1* など、肺がんの進行や悪性化に関与する複数のアミノ酸代謝関連遺伝子が含まれている。EGFR 阻害剤耐性細胞やゼノグラフトモデルにおいて、アミノ酸代謝を含む代謝の亢進が報告されており、EGFR および PI3K は、アミノ酸代謝を調節して腫瘍の適応応答に寄与している可能性が考えられた。

EGFR に変異を有する肺腺がんの約 10% で PI3K の活性化変異が認められている。さらに、EGFR と PI3K の共変異が、肺がんの悪性化や EGFR 阻害剤抵抗性に関連することが報告されている。本研究で、EGFR と PI3K の両者に活性化変異を有する NCI-H1975 細胞で、EGFR 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用により、アミノ酸欠乏ストレス下の ATF4 の発現誘導を抑制し、細胞の生存と増殖を阻害できるということが示された。以上から、アミノ酸欠乏ストレスを標的とする EGFR 阻害剤および PI3K 阻害剤の併用は、EGFR と PI3K の両者に活性化変異を有する非小細胞肺がんにも有効であると考えられる。

また、KRAS と PI3K の両者に活性化変異を有する非小細胞肺がんも一定数存在する。

「2-2」で、KRAS と PI3K の両者に活性化変異を有する NCI-H460 細胞では、KRAS 単独に変異を持つ A549 と比較して、PI3K 阻害により、ATF4 発現を顕著に抑制できることが示された。今後、KRAS 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果や ATF4 発現誘導に対する効果などを検討することが必要であると考えている。

本研究では、がん遺伝子産物による新たな ATF4 発現制御機構として、活性化変異型 EGFR と活性化変異型 PI3K による mTOR を介した翻訳制御を提唱した。また、活性化変異型 EGFR および活性化変異型 PI3K が、アミノ酸欠乏ストレスに対する適応応答の制御に寄与していることを示した。さらに、EGFR と PI3K の両者に活性化変異を有する非小細胞肺がん細胞に対して、EGFR 阻害剤と PI3K 阻害剤の併用が有効であり、この併用効果にストレス応答が大きく関与していることを示した。本研究は、非小細胞肺がんに対する新たな薬物療法の開発に基礎的なバックグラウンドを与えるものになると考えている。

【主論文に関する原著論文】

Takahashi, M., Okamoto, Y., Kato, Y., Shirahama, H., Tsukahara, S., Sugimoto, Y., Tomida, A., Activating mutations in EGFR and PI3K promote ATF4 induction for NSCLC cell survival during amino acid deprivation, *Heliyon*, 9(4), e14799, 2023.