

令和元年6月8日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09594

研究課題名(和文) EGFR-TKI耐性肺癌における特異的シグナルの同定と克服

研究課題名(英文) Identification and overcoming specific signals in EGFR-TKI resistant lung cancer

研究代表者

瀧川 奈義夫 (Takigawa, Nagio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60325107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)耐性肺癌細胞株にはerlotinibとpacritinibの併用、EGFR-TKI耐性およびALK融合遺伝子を有する肺癌細胞株にはエピガロカテキンガレートが有効であることをin vitroおよびin vivoで示した。プロテオーム解析により、EGFR遺伝子エクソン19欠失とエクソン21 L858R点突然変異をもたらすシグナルの違いはペントースリン酸経路の差であることが示唆された。また、ALK-TKI耐性にはケトン体の代謝に関する蛋白の関与が示唆された。耐性機序は多岐にわたるが、代謝経路からの解明も望ましいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌における代表的なオンコジンドライバーのEGFRとALKはそれぞれ有効な阻害薬があるが、いずれ耐性化を生じる。その耐性を克服するためには、誘導されるシグナルを同定しそれを抑制することが重要である。今回、EGFR阻害薬あるいはALK阻害薬の耐性を克服する薬剤候補をあげることができた。プロテオーム解析では、ALK阻害の耐性機序にケトン体代謝と活性酵素が関与していること、また同じEGFR遺伝子変異でもエクソン19とエクソン21の差にペントースリン酸経路が関与していることを見出した。このような解析により耐性克服が可能となり、進行肺癌患者の更なる生存期間の延長と治療に寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：The combination of pacritinib with erlotinib showed synergistic effects on JAK2-mediated EGFR-TKI-resistant cell lines in vitro and in vivo. (-)-Epigallocatechin-3-gallate was effective for EGFR-driven lung cancer cells irrespective of the presence of T790M, and for ALK fusion gene-driven lung cancer cells. Proteome analysis revealed that the difference between EGFR exon 19 deletion and exon 21 L858R point mutation might be due to pentose phosphate pathway. Ketone body metabolites on ALK-TKI sensitive lung cancer cells was different from those on ALK-TKI resistant lung cancer cells. Thus, we might perform metabolome analysis in order to elucidate a variety of EGFR- or ALK-TKI resistant mechanisms.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR ALK 薬剤耐性 プロテオーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子標的を有する肺癌の代表的な遺伝子は EGFR 遺伝子変異と ALK 融合遺伝子である。これらの遺伝子はドライバーオンコジーンとして発癌や進展に強く関与しており、それぞれ EGFR や ALK に対するチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) により劇的な効果が認められた。しかしながら、平均して約 1 年後には耐性となるため新たな治療法の開発が望まれている。私たちも、独自に作製した EGFR-TKI 耐性あるいは ALK-TKI 耐性の肺癌細胞株、および EGFR 遺伝子改変マウスを用いて、耐性機序の解明と克服の一端を担ってきたが満足できる結果は得られていない。

ゲノム解析の結果、ドライバーオンコジーンを有する肺癌においても腫瘍の不均一性が存在し、高感受性の分子標的薬により主たるシグナルが阻害されても、抵抗性のシグナルが優勢となってくる。それらの耐性を克服するためには、誘導されるシグナルを同定しそれを抑制することが重要である。また、一本鎖 DNA に特異的なシチジン脱アミノ化酵素である APOBEC3B は DNA の C → T への変異を導入できる遺伝子編集酵素であるが、肺癌においても APOBEC 変異関連のサブクローンが報告されており、発癌および薬剤耐性との関連も重要と考えた。今回、EGFR-TKI あるいは ALK-TKI 耐性を克服する薬剤の探索と、耐性シグナルをプロテオーム解析で検出したいと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

- (1) ドライバーオンコジーンを有する肺癌に効果を有する薬剤を検討する。
- (2) 活性型 EGFR 遺伝子変異により生じるシグナル伝達の差を探索する。
- (3) ALK-TKI 感受性と耐性細胞の新規耐性機序を探索する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

EGFR-TKI 耐性株は、EGFR エクソン 19 欠失 (del) ヒト肺腺癌株 PC-9 を親株として樹立された EGFR-TKI 耐性株 RPC-9、PC-9/ER3、および PC-9/GR1b を用いる。ALK-TKI 耐性株は、ヒト肺腺癌株 ABC-11 を親株として作製した ABC-11R2 を用いる。また、マウス由来の IL-3 依存性細胞株である Ba/F3 に Site-Directed Mutagenesis を用いてプライマーを設計した EGFR-TKI 耐性細胞株 (del, del+T790M, del+T790M+C797S, del+C797S, L858R, L858R+T790M, L858R+T790M+C797S, L858R+C797S) を使用する。

(2) 薬剤

エピガロカテキンガレート (EGCG) と新規分子標的薬剤 (pacritinib) を使用する。

(3) プロテオーム解析

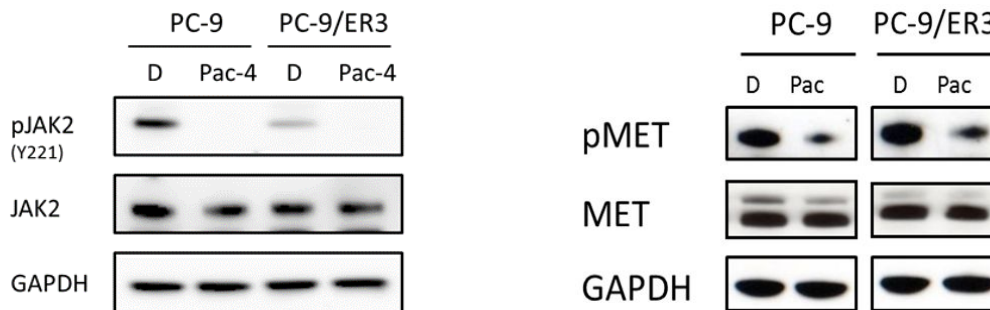
蛍光 2D differential 解析システム (Ettan DALTsix Electrophoresis unit) を用いた 2 次元ゲル電気泳動により、発現量の差を検出する。差の認められたスポットを切り出し、MALDI-TOF 型質量分析システム (Bruker ultrafleXtrem) により解析する。Mascot (Matrix Science 社) 検索システムの MS/MS Ion Search 法を用いてアミノ酸配列を同定する。

(4) APOBEC3B の発現解析

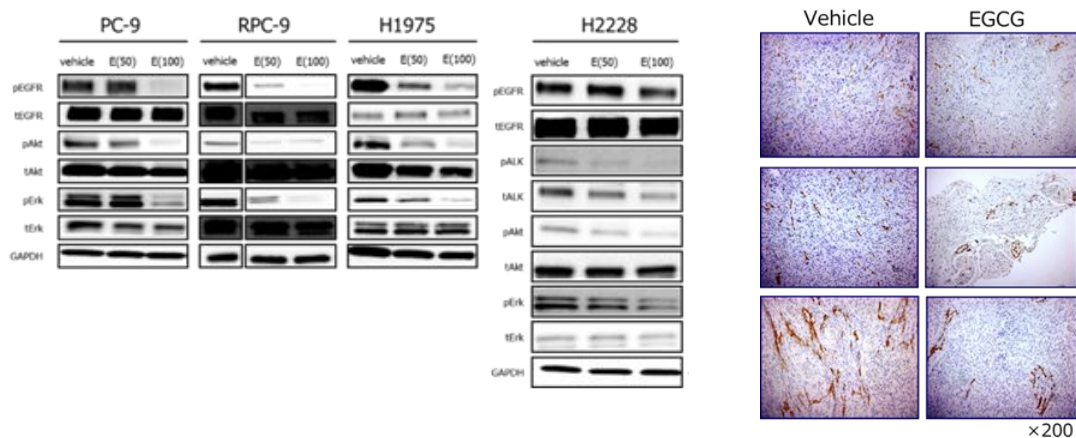
肺癌細胞株の APOBEC3B の mRNA 発現を RT-PCR で解析する。

4. 研究成果

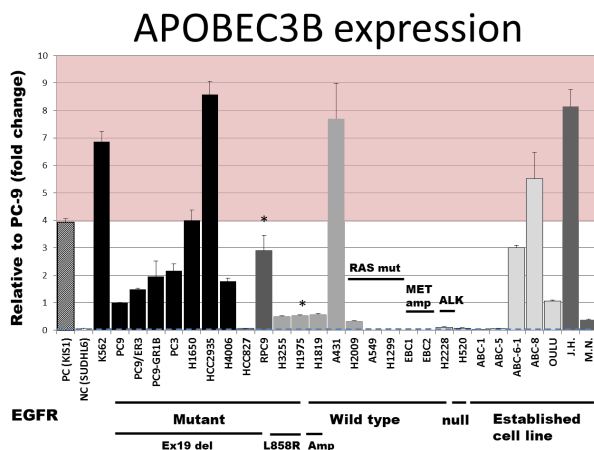
(1) JAK2 活性化を介した新たな EGFR-TKI 耐性機序を有する細胞株 (PC-9/ER3) における JAK2/FLT3 の阻害薬である pacritinib を用いて、その耐性解除を試みた。PC-9/ER3 において erlotinib 単剤と pacritinib の単剤と比較し、2 剤併用により *in vitro* および *in vivo* で有意な増殖抑制効果を認めた。リン酸化キナーゼアレイにより pacritinib による MET の抑制が示唆され、本薬剤の新たな作用機序を見出し、JAK2 および MET の両阻害 (図下) が EGFR-TKI 耐性克服に繋がることを示した。



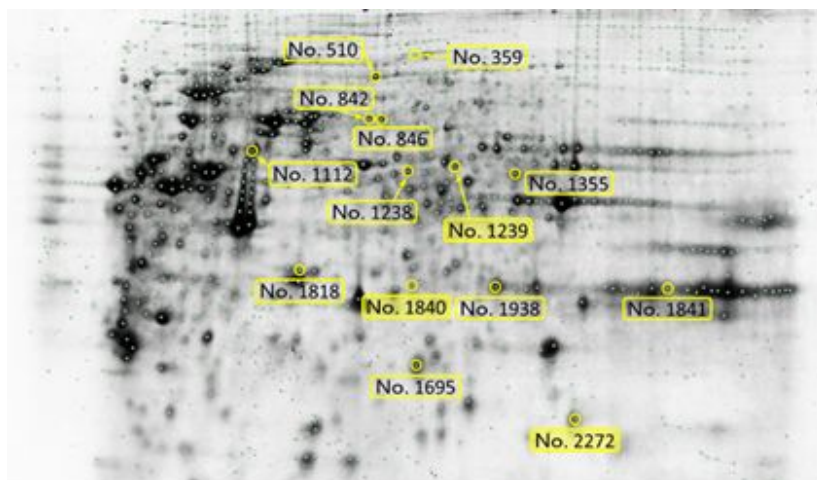
(2) EGCG は EGFR-TKI 感受性と耐性株、および ALK 融合遺伝子を有する細胞株に対して *in vitro* (図下左) および *in vivo* で抗腫瘍効果を示した。*in vivo* では EGCG が HIF-1 に起因する血管新生を抑制 (図下右) していることが、主な作用機序と考えられた。



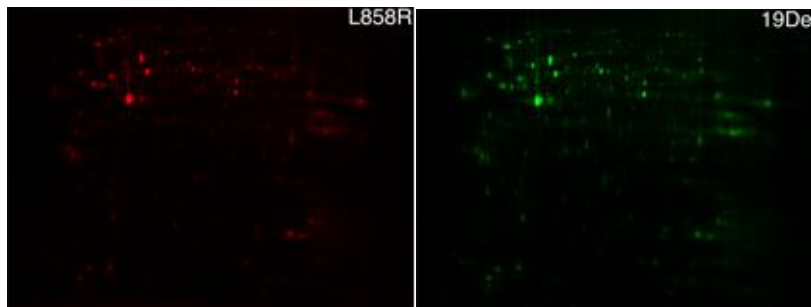
(3) PC-9 と 3 種類の EGFR-TKI 耐性株を含む計 30 種類の細胞株で APOBEC3B の mRNA 発現を RT-PCR で検討した。いずれの耐性株も親株に比べ発現が増強していた (図右)



(4) ALK 陽性細胞株のプロテオーム解析では、親株と ALK-TKI 耐性株の 2 次元ゲル電気泳動を行ったところ、約 2000 スポットの発現量の差が認められた (図右)。そのうちピークが明らかに異なるものを切り出し解析した。スポット No. 1239 のゲルから抽出したペプチドを MS 測定し、さらに 12 個のペプチド断片を MS/MS 測定し、ケトン体の代謝に関する蛋白を同定した。同様にスポット No. 2272 からは、活性酵素に関する蛋白を同定した。



(5) 2 種の EGFR-TKI 感受性株に検出された全 2517 スポットのうち、タンパク質のスポットとして検出されたものは、1155 スポットであった (図右)。発現増加は 44 スポット、発現減少は 19 スポットあり、この中でペントースリン酸経路に関する蛋白を同定した。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Honda Y, Takigawa N, Ichihara E, Ninomiya T, Kubo T, Ochi N, Yasugi M, Murakami T, Yamane H, Tanimoto M, Kiura K. Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on EGFR- or fusion gene-driven lung cancer cells. Acta Med Okayama 71 (査読有), 2017: 505-512
DOI: 10.18926/AMO/55587.

Ochi N, Isozaki H, Takeyama M, Singer JW, Yamane H, Honda Y, Kiura K, Takigawa N. Synergistic effect of pacritinib with erlotinib on JAK2-mediated resistance in epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung Cancer. Experimental Cell Research 344 (査読有), 2016: 194-200
DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.05.008.

〔学会発表〕(計2件)

本多宣裕, 瀧川奈義夫, 越智宣昭, 二宮崇, 八杉昌幸, 久保寿夫, 磯崎英子, 市原英基, 堀田勝幸, 山根弘路, 谷本光音, 木浦勝行. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会. ドライバーオンコジーンを有する肺がんに対するエピガロカテキンガレート (EGCG) の効果. 2017 年 4 月

越智宣昭, 山根弘路, 本多宣裕, 磯崎英子, 木浦勝行, 瀧川奈義夫. Pacritinib による JAK2 を介した EGFR-TKI 耐性の克服. 第 57 回日本肺癌学会学術集会. 2016 年 12 月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山根 弘路

ローマ字氏名：YAMANE, hiromichi

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：50624897

研究分担者氏名：越智 宣昭

ローマ字氏名：OCHI, nobuaki

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8桁)：80611615

研究分担者氏名：本多 宣裕

ローマ字氏名：HONDA, yoshihiro

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8桁)：80746876

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。