

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15507

研究課題名(和文) 第2、第3世代EGFR-TKI耐性獲得へのSFKの関与と新規克服治療創出研究

研究課題名(英文) The activation of SFK contributes to the resistance to second and third generation EGFR-TKIs

研究代表者

村上 雄一 (Murakami, Yuichi)

九州大学・薬学研究院・共同研究員

研究者番号：60464385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮増殖因子受容体(EGFR)に活性化変異を有する非小細胞肺癌に用いられるアファチニブ、オシメルチニブ等の第2世代、第3世代EGFR-TKIは、治療の継続により耐性癌が出現する。そこで、耐性克服のためにこれらEGFR-TKIの耐性メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。本研究ではアファチニブ及びオシメルチニブに対する耐性株を樹立し、耐性株でSrcファミリーキナーゼ(SFK)の活性化が生存に関与していることを明らかにした。またSFK阻害がEGFR-TKI耐性克服効果を示した。第2世代、第3世代EGFR-TKIの耐性克服にSFKシグナルの阻害が有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで肺癌治療には第1世代EGFR-TKIが広く使用されてきたが、現在臨床応用が広く進められてきている第2世代、第3世代EGFR-TKIに着目して新たな共通の耐性メカニズムを見出したことが本研究の大きな特徴である。今後、第2世代、第3世代EGFR-TKI治療患者の耐性克服治療の創出及び、第2世代、第3世代EGFR-TKIを使用する際の適正化治療にも大きく貢献できると期待している。

研究成果の概要(英文)：Most non-small cell lung cancer patients with EGFR mutations benefit from treatment with EGFR-TKIs, but the clinical efficacy of second and third generation EGFR-TKIs is limited by the appearance of tumor drug resistance.

We characterized two independent resistant sublines, one selected by drug resistance to a second EGFR-TKI, afatinib, and also another selected by drug resistance to a third generation EGFR-TKI, osimertinib. These resistant sublines showed decreased expression of EGFR and increased expression of SRC family kinase (SFK). Treatment with SRC siRNA or an inhibitor of SFK blocked cell growth and Akt phosphorylation in them.

Together, the study presents SFK activation could be one key mechanism responsible for acquired drug resistance to EGFR-TKIs, also that combination with SFK-targeted drug could be useful to modify drug resistance to EGFR-TKIs.

研究分野：腫瘍学、細胞生物学

キーワード：EGFR アファチニブ オシメルチニブ 肺癌 耐性

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

## 1. 研究開始当初の背景

- [1] 活性化変異をもつ上皮成長因子受容体(EGFR)を示す肺癌 (NSCLC) 患者に対して第1世代 EGFR-TKI であるゲフィチニブやエルロチニブが有効であることが2004年に発表されたが、著効後ほとんどの症例で治療抵抗性を示す“耐性癌”による再発が問題となっている。耐性のメカニズムとして最も頻度が高いのはEGFRの二次変異(T790M)であるが、その他代替経路の活性化など多様なメカニズムが我々を含む国内外の研究者によって報告されている。
- [2] 耐性変異EGFR T790Mを有する肺癌細胞の耐性克服を目的に、2014年にEGFR, HER2, HER4を不可逆的に阻害する第2世代EGFR-TKIとしてアファチニブが、そして2016年にT790M変異EGFRを特異的に不可逆的に阻害する第3世代EGFR-TKIとしてオシメルチニブが本邦で承認された。しかし、最近、アファチニブやオシメルチニブについても耐性癌が報告され始め、第2世代、第3世代TKI耐性肺癌に対する克服治療戦略を進展させることは緊急の課題である。
- [3] 我々は2004年以降第1世代TKIの治療効果や耐性獲得機序について、研究を継続させてきている。ゲフィチニブ/エルロチニブ耐性にPTEN消失、活性化EGFR遺伝子の消失、さらにインテグリン 1/Src経路の活性化が関与することを世界に先駆け我々は報告してきた。
- [4] Srcファミリーキナーゼ(SFK)はc-Src, Yes, Fyn, Fgr, Lyn, Blk, Hck, Lck, Frkの9種のファミリーメンバーからなる非受容体型チロシンキナーゼであり、EGFRやHER2、Ephなどの受容体型チロシンキナーゼ及び、IntegrinやFocal adhesion kinase (FAK)など細胞接着関連分子と相互作用することによって活性化され、下流のシグナルを活性化する。このシグナルによって細胞生存、増殖に関与している。
- [5] これまで第1世代TKI耐性にSFKが関与することを我々のグループも含め報告しているが(Kanda et al., Cancer Res., 2013)、SFKには9種のメンバーがあり、その上複数の活性化メカニズムが存在するため、どの分子がどのようなメカニズムで耐性に関与しているか詳細は解明されていない。

## 2. 研究の目的

第2世代、第3世代EGFR-TKIに対する耐性の克服のために、耐性機序を明らかにし機序に基づく治療戦略を進展させることが重要である。本研究ではEGFR-TKI感受性細胞にTKIを長期暴露することにより樹立した耐性細胞を用いて、耐性機序を明らかにすることを目的とした。今回樹立した耐性細胞はEGFR-TKI耐性機序としてこれまでに知られているT790M、C797S等のEGFR自身の耐性変異は検出されなかったため、耐性獲得のメカニズムとしてEGFRへのTKI結合能の変化ではなく、代替経路の活性化に着目して検討を行った。

## 3. 研究の方法

第2、第3世代EGFR-TKI耐性肺癌のSFKによる活性化代替経路を対象に、どのメンバーが耐性に関与しているかを検討し、耐性の分子メカニズムを解明するとともに耐性原因分子に特異性の高い新規耐性克服治療薬の創出を進める。その結果国内外で臨床応用が進められている新規TKIの耐性癌克服治療と適正化治療に大きく貢献できる。

### 第2世代及び第3世代EGFR-TKIによるバイパス経路活性化メカニズム解析

EGFR-TKIに対する耐性を獲得することによってどのような変化が誘導されるかについて代替経路を中心に検討した。樹立したEGFR-TKI耐性株では分子標的薬ダサチニブに対して親株と比較して強い感受性を示していることから、EGFR-TKI耐性株においてはダサチニブの標的分子の活性化が予測された。

そこでダサチニブの標的であるSFKの各ファミリーメンバーや他のシグナル分子の活性化について、EGFR-TKI耐性株と親株よりRNAを抽出しDNAマイクロアレイで網羅的解析を行った。そして、発現に変動のあった因子に関してウエスタンブロットティングによるタンパク質発現解析を行った。

### 標的蛋白質のノックダウンによる活性化代替経路の薬剤感受性への関与

親株とEGFR-TKI耐性株で発現もしくは活性化に変化が観察されたSFKファミリーメンバーやシグナル制御分子について耐性株へsiRNA処理によって発現のノックダウンを行った。ノックダウン細胞はEGFR-TKIを処理後、ウエスタンブロットティングによるタンパク質発現解析及び細胞数の計測を行った。

## 標的蛋白質阻害剤と EGFR-TKI 併用効果の検討

EGFR-TKI 感受性の細胞が代替経路の活性化により耐性化した場合には代替経路と EGFR 経路の両方の阻害により効果的に増殖を抑制することができると考えられる。耐性株において活性化が観察された因子の阻害剤及び EGFR-TKI を併用処理後、ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現解析および細胞数測定を行い、薬剤による生存シグナルの変化と耐性克服効果について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) EGFR-TKI 耐性肺癌細胞株の細胞内シグナルと薬剤感受性

第2世代 EGFR-TKI アファチニブもしくは第3世代 EGFR-TKI オシメルチニブを暴露することにより独自に樹立した EGFR-TKI 耐性肺癌細胞株は第1世代、第2世代、第3世代 EGFR-TKI にそれぞれに対して同様に耐性を示した。また、耐性株では親株と比較して EGFR の発現が顕著に低下していた。また他の受容体チロシンキナーゼの発現低下も観察された。さらにアファチニブ耐性株において EGFR の遺伝子増幅を検討したところ、親株で EGFR 遺伝子の増幅が見られたが、耐性株はその遺伝子増幅が消失していた。

親株と第2世代、第3世代 EGFR-TKI 耐性株の細胞内シグナルを比較したところ、耐性株では EGFR-TKI による AKT のリン酸化阻害効果が低下していることが示された。これらの結果から、耐性株では EGFR-TKI の標的である EGFR の遺伝子増幅の消失による発現低下および EGFR-TKI による AKT 活性阻害効果の低下が耐性に関与していることが示された。

### (2) EGFR-TKI 耐性に対する Src ファミリーキナーゼの関与

耐性株では EGFR 阻害による AKT リン酸化抑制効果が低下していることが示された。よって他のシグナル活性化により AKT のリン酸化が制御されていることが示唆された。そこで次に耐性株での AKT リン酸化制御機序を検討した。分子標的薬を用いた感受性試験により第2世代、第3世代 EGFR-TKI 耐性株は共に Src ファミリーキナーゼ阻害剤であるダサチニブに感受性であることが明らかになった。さらに SFK の活性化及び SRC の発現増加が観察されたことから、SRC シグナルが耐性細胞の生存に関与していることが示唆された。

SRC シグナルと AKT シグナルとの関連を検討するためにダサチニブによる AKT シグナルへの影響を検討した結果、ダサチニブは耐性株の AKT のリン酸化を阻害した。またアファチニブ耐性株においてアファチニブとダサチニブの併用によって耐性克服効果を示した。さらにアファチニブ耐性株へ SRC siRNA によるノックダウンを行ったところ、AKT のリン酸化の抑制と細胞増殖抑制効果が示された。これらの結果より、SFK/AKT シグナルの活性化が第2世代、第3世代 EGFR-TKI 耐性に関与していることが示唆された。

### (3) EGFR-TKI 耐性株における FAK の遊走制御

転移において細胞遊走能は非常に重要な要因である。EGFR-TKI 耐性株の細胞遊走能を親株と比較したところ、アファチニブ耐性株で細胞遊走の亢進が観察された。また、SRC と相互作用することが知られている細胞遊走関連タンパク質である FAK のリン酸化がアファチニブ耐性株において亢進していた。さらに、ダサチニブによって耐性株の細胞遊走および FAK のリン酸化が抑制されことから、アファチニブ耐性株の遊走亢進に Src の活性化が関与していることが示唆された。

本研究により第2世代、第3世代 EGFR-TKI 耐性肺癌における腫瘍の生存と転移に SRC シグナルが重要であることが示唆された。さらにアファチニブ耐性克服に SFK 阻害剤ダサチニブとアファチニブとの併用が有効である可能性を示した。今後、EGFR-TKI 耐性肺癌患者組織における SFK、FAK の検討を行うことによって、EGFR-TKI 耐性肺癌に有効な克服治療の開発へつながることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. [Murakami Y](#), Sonoda K, Abe H, Watari K, Kusakabe D, Azuma K, Kawahara A, Akiba J, Oneyama C, Pachter JA, Sakai K, Nishio K, Kuwano M, Ono M. The activation of SRC family kinases and focal adhesion kinase with the loss of the amplified, mutated EGFR gene contributes to the resistance to afatinib, erlotinib and osimertinib in human lung cancer cells. *Oncotarget*. 2017, 8(41):70736-70751. (査読有) doi: 10.18632/oncotarget.19982

[学会発表](計 1 件)

1. 村上雄一、渡公佑、柴田智博、桑野信彦、小野眞弓. 肺癌のオシメルチニブ耐性に Src ファミリーキナーゼの活性化が関与する. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。