

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 4月26日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390256

研究課題名（和文） HGFによるEGFR活性型変異陽性肺癌の分子標的薬耐性を克服する
個別化医療開発研究課題名（英文） Development of individual therapy for overcoming HGF-induced
molecular targeted drug-resistance in EGFR-mutant lung cancer

研究代表者

矢野 聖二（YANO SEIJI）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

研究成果の概要（和文）：HGFによるEGFR-TKI耐性に対する新規肺癌治療法を開発し、HGFによる耐性を予測するバイオマーカーを確立することを目的に研究を行った。

EGFR変異を有する肺癌細胞株を用いた検討より、HGF-Met阻害薬はHGFによるEGFR-TKI耐性を*in vitro*のみならず*in vivo*においても克服することを明らかにした。また、日本人EGFR変異肺癌症例から得た臨床検体を用いた検討において、HGFは、EGFR-TKIの獲得耐性のみならず自然耐性をも誘導し、少なくとも今回の日本人EGFR変異肺癌症例においては最も頻度の高い耐性因子であることを示した。さらに、治療前の血漿中HGFがEGFR-TKI治療の効果予測バイオマーカーになる可能性を示した。以上の成果から、HGFはEGFR-TKIを用いた肺癌の個別化医療において重要な標的およびバイオマーカーであることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop novel therapy for overcoming HGF-induced EGFR-TKI resistance and establish biomarkers which predict the HGF-induced resistance in lung cancer. We found that inhibitors of HGF-Met could overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Our study with clinical specimens revealed that high levels of HGF were detected in tumors with acquired and intrinsic resistance to EGFR-TKI and was the most prevalent factor for resistance, at least in Japanese patients with *EGFR*-mutant lung cancer. We further demonstrated that levels of HGF in plasma before EGFR-TKI treatment inversely correlated with clinical response in lung cancer. These finding suggest that HGF is the important target and biomarker of individual therapy with EGFR-TKI in lung cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、EGFR-TKI、薬剤耐性、HGF、Met、EGFR 遺伝子変異、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

肺癌はわが国における悪性新生物による死亡原因の第 1 位であるが、EGFR-TKI であるゲフィチニブやエルロチニブは欧米人よりも日本人に奏効例が多く、さらに腺癌、女性、非喫煙者、EGFR 変異を有する症例に高い奏効率を示すことがわが国主導で実施された国際多施設臨床第 III 相試験で示された(Fukuoka M, Yano S, et al, J Clin Oncol 21:2237, 2003)。最近、EGFR-TKI は上記の肺癌患者群に延命効果を有することが示され肺癌治療において重要な分子標的薬とされているが、著効症例においてもその大半が 1 年程度で獲得耐性を生じ再燃する（獲得耐性）ことや、EGFR 変異を有するにもかかわらず 25-30% の症例では EGFR-TKI が奏効しない（自然耐性）ことが臨床上大きな問題となっている。

EGFR 変異を有する肺腺癌の獲得耐性の機序として T790M 変異と MET 増幅がそれぞれ 50%と 20%の症例に関与している(Cancer Sci 98:1817, 2007)が、残り 30%の耐性獲得の機序や自然耐性の機序は全く不明である。応募者は、肝細胞増殖因子(HGF)がその受容体である Met をリン酸化し、EGFR や ERBB3 とは無関係に PI3K/Akt 経路を活性化することにより、EGFR 変異を有する肺腺癌株のゲフィチニブ耐性を誘導する機構を見出した。臨床検体における基礎的検討でも、既報の耐性機序(T790 変異や MET 増幅)を有しない獲得耐性症例や自然耐性症例の腫瘍において HGF 過剰発現がみられたことから、HGF による Met 活性化が EGFR 変異を有する肺腺癌のゲフィチニブ耐性の新たな機序であることを報告した(Yano S et al, Cancer Res, 2008)。これらの研究成果を踏まえ、EGFR 変異を有する肺癌症例の予後改善には EGFR-TKI 耐性機序解析に基づいた治療法の確立が必須と考え、HGF を標的とした耐性克服薬による個別化医療に展開することを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、HGF による EGFR-TKI 耐性に対する新規治療法を開発するとともに、HGF による耐性を予測するバイオマーカーを確立し、これらを用いた個別化医療に展開することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における HGF-Met 阻害薬の EGFR-TKI 耐性克服作用の検討: EGFR 変異を有するヒト肺癌細胞株 PC-9, HCC827, Ma-1 を用いた。抗 HGF 抗体、HGF と受容体 MET の結合を阻害する物質(NK4)、Met チロシンキナーゼ阻害薬 (E7050) を EGFR-TKI (ゲフィチニブあるいはエルロチニブ) とともに添加し、72 時間後の細胞生存を MTT 法で検討した。

(2) *in vivo* における HGF-Met 阻害薬の EGFR-TKI 耐性克服作用の検討: PC-9 を HGF 高産生するヒト線維芽細胞株 MRC-5 と混合し SCID マウスに皮下移植した。あるいはヒト HGF 遺伝子を導入した Ma-1 を SCID マウスに皮下移植した。皮下腫瘍が形成された後に、HGF-Met 阻害薬と EGFR-TKI を投与し、皮下腫瘍径を経時的に測定し、耐性克服作用を検討した。

(3) 日本人 EGFR 変異肺癌症例における HGF による EGFR-TKI 耐性の頻度の検討: 国内 12 施設より EGFR-TKI 治療を受けた EGFR 変異肺癌症例の腫瘍組織を集積し、HGF 発現を免疫染色で、EGFR-T790M 変異を Cycleave RT-PCR で、Met 遺伝子増幅を FISH で検討した。

(4) EGFR-TKI の治療を受けた肺癌症例の血液中 HGF の測定: EGFR-TKI 治療を受けた肺癌症例の EGFR-TKI 治療前後の血漿中 HGF を ELISA で測定し、EGFR-TKI の治療効果の予測のバイオマーカーとなりうるか否を検討した。

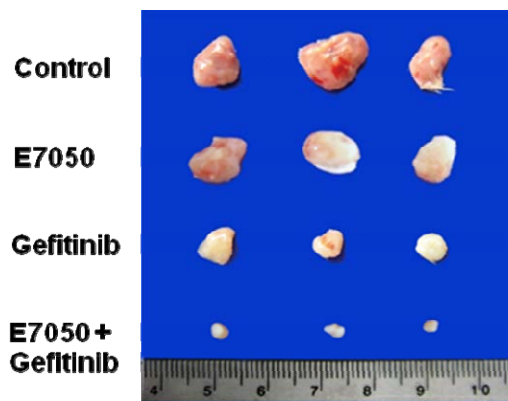
4. 研究成果

(1) *in vitro* における HGF-Met 阻害薬の

EGFR-TKI 耐性克服作用 : HGF は EGFR 変異を有する肺癌細胞株において EGFR-TKI 耐性を誘導したが、抗 HGF 抗体、NK4、E7050 はそれぞれ耐性を解除した。以上より、HGF-Met 阻害薬は HGF による EGFR-TKI 耐性を *in vitro* において克服することを明らかにした。

(2) *in vivo* における HGF-Met 阻害薬の EGFR-TKI 耐性克服作用 : HGF を高発現する線維芽細胞株(MRC-5)を混合して皮下移植された PC-9 や HGF 遺伝子導入した Ma-1 は EGFR-TKI 耐性を示したが、抗 HGF 抗体、NK4、E7050 を併用することにより腫瘍は著明に退縮した(図 1)。以上より、HGF-Met 阻害薬は *in vivo* においても EGFR-TKI 耐性を克服することが明らかとなった。

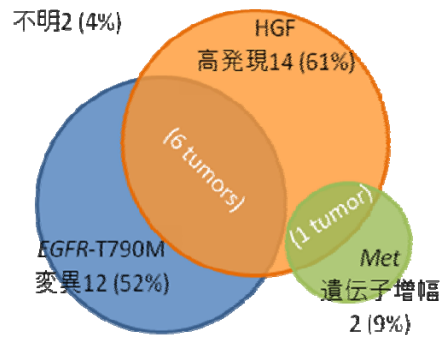
図 1



(3) 日本人 EGFR 変異肺癌症例における HGF による EGFR-TKI 耐性の頻度 : 獲得耐性を示した 23 腫瘍のうち、HGF 高発現は 14 例 (61%)、T790M は 12 例 (52%)、Met 増幅は 2 例(9%)に認められ、HGF 高発現が最も高頻度に検出された(図 2)。一方、EGFR 変異を有するにもかかわらず EGFR-TKI が奏効しなかった 45 腫瘍において、HGF 高発現は 13 例 (29%)、T790M は 0 例 (0%)、Met 増幅は 2 例(4%)に認められ、HGF 高発現が最も高頻度に検出された。よって、HGF は、EGFR-TKI の獲得耐性のみならず自然耐性をも誘導し、少なくとも今回の日本人 EGFR 変異肺癌症例においては最も頻度の高い耐性因子で

あることが示唆された。

図 2



(4) EGFR-TKI の治療を受けた肺癌症例の血液中 HGF の測定 : EGFR-TKI の治療効果 (部分奏効または安定) があつた症例(20 例)の EGFR-TKI 治療前の血漿中 HGF 濃度は、治療効果がなかった (増大) 症例(8 例)よりも有意に低かつた。以上より、治療前の血漿中 HGF が EGFR-TKI 治療の効果予測バイオマーカーになる可能性が示唆された。

(5) 特許出願 : 以上のような研究成果をもとに、「分子標的薬に対する感受性が低下している癌の治療薬および分子標的薬に対する感受性を増強する医薬組成物」という発明名称で特許出願した。

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 28 件)

1. Yano S, Takeuchi S, Nakagawa T, Yamada T. Ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer: roles of HGF and EGFR ligands. **Cancer Sci** (査読有) 2012, Mar 21. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02279.x.
2. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S. E7050, a Met kinase inhibitor, reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant lung cancer cells. **Clin Cancer Res** (査読有) 2012;18:1663-71. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1171

3. Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Yano S. Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis. **J Thorac Oncol** (査読有) 2012, in press.
4. Uramoto T, Yano S, Tanaka F. T790M is associated with a favorable prognosis in Japanese patients treated with an EGFR-TKI. **Lung Cancer** (査読有) 2012 ;76: 129-30.
DOI:10.1016/j.lungcan.2012.01.010
5. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer. **J Thorac Oncol** (査読有) 2012;7:272-80.
DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182398e69
6. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto U, Yasumoto Y, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. **J Thorac Oncol** (査読有) 2011; 6:2011-7.
DOI: 10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd
7. Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K. Reaction of plasma hepatocyte growth factor level in lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. **Int J Cancer** (査読有) 2011;126:1410-6.
DOI: 10.1002/ijc.25799
8. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** (査読有) 2011 ; 17:2260-9.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1993
9. Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Takeuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K, Yano S. The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXCR4-expressing gastric cancer. **Clin Cancer Res** (査読有) 2011;17:3619-30.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2475
10. Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung Van The, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, Sone S. E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. **Mol Cancer Ther** (査読有) 2011;10:1218-28.
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0707
11. Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yano S. Pleural mesothelioma instigates tumor associated fibroblasts to promote progression via malignant cytokine network. **Am J Pathol** (査読有) 2011;179:1483-93.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.05.060
12. Yamada T, Bando H, Takeuchi S, Kita K, Li Q, Wang W, Akinaga S, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 anti-body against multiple organ metastasis produced by GM2 expressing small cell lung cancer. **Cancer Sci** (査読有) 2011;102:2157-63.
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02093.x
13. Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y, Sone S, Yano S. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** (査読有) 2010;16:174-83.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1204

14. Sakaguchi S, Goto H, Hanibuchi M, Otsuka S, Ogino H, Kakiuchi S, Uehara H, Yano S, Nishioka Y, Sone S. Gender difference in bone metastasis of human small cell lung cancer, SBC-5 cells in natural killer-cell depleted severe combined immunodeficient mice. **Clin Exp Metastasis** (査読有) 2010;27:351-9.
DOI: 10.1007/s10585-010-9333-0
15. Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Clin Cancer Res** (査読有) 2009;15:6630-8.
DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-09-1001
16. Ikuta K, Yano S, Trung TV, Hanibuchi M, Goto H, Li Q, Wang W, Yamada T, Ogino H, Kakiuchi S, Uehara H, Sekido Y, Uenaka T, Nishioka Y, Sone S. E7080, a multi-tyrosine kinase inhibitor, suppresses the progression of malignant pleural mesothelioma with different proangio-genic cytokine production profiles. **Clin Cancer Res** (査読有) 2009;15:7229-37.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1980
17. Yamada T, Muguruma H, Yano S, Ikuta K, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S. Intensification therapy with anti-para-thyroid hormone-related protein antibody plus zoledronic acid for bone metastases of small cell lung cancer cells in SCID mice. **Mol Cancer Ther** (査読有) 2009;8:119-26.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19139120>

[学会発表] (計 92 件)

1. 矢野聖二. Receptor ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer. 第 52 回日本肺癌学会総会, 2011 年 11 月 3 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
2. 矢野聖二. EGFR ligands induce resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK lung

cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

3. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto H, Yasumoto K, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. 2011 American Society of Clinical Oncology (ASCO), Annual Meeting, 2011.6.4, McCormick Place (USA.)
4. 矢野聖二. (篠井・河合賞受賞講演) HGF による肺癌の EGFR-TKI 耐性の分子機構解明とその克服に向けた研究, 第 51 回日本肺癌学会総会, 2010 年 11 月 3 日, 広島国際会議場 (広島県)
5. 矢野聖二. E G F R 肺がんのチロシンキナーゼ阻害薬耐性と治療戦略, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22 日, 大阪国際会議場 (大阪府)
6. 矢野聖二. (特別セッション) HGF-MET 経路による EGFR-TKI 耐性誘導の分子機構とその克服に向けた戦略, 第 50 回日本肺癌学会総会, 2009 年 11 月 21 日, 京王プラザホテル (東京都)
7. Yano S. HGF induces resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer with EGFR activating mutations. The 14th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2009.11.14, Convention & Exhibition (Korea)
8. 矢野聖二. (International Sessions) Hepatocyte growth factor as an inducer of EGFR-TKI resistance in lung cancer harboring EGFR activating mutations. 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：「分子標的薬に対する感受性が低下している癌の治療薬および分子標的薬に対する感受性を増強する医薬組成物」

発明者：矢野聖二、松本邦夫

権利者：同上

種類：特許法第 30 条第 1 項の規定の適用出願

番号：PCT/JP2009/67630

出願年月日：平成 21 年 10 月 9 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 聖二 (YANO SEIJI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

(2)研究分担者

王 偉 (WANG WEI)

金沢大学・がん研究所・博士研究員

研究者番号：80467117

(H21→H22)

山田 忠明 (YAMADA TADAAKI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00507048

竹内 伸司 (TAKEUCHI SHINJI)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：90565384

(H23)

(3)連携研究者

該当なし