

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 5 月 31 現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590384

研究課題名（和文） 肺癌における分子標的抗腫瘍薬チロシンキナーゼ抑制剤の耐性獲得機序多様性の解明

研究課題名（英文） A study on the mechanisms underlying resistance acquisition of lung cancer for tyrosine kinase inhibitors

研究代表者

蔣 世旭 (JIANG SHI-XU)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70276153

研究成果の概要（和文）：

分子標的抗腫瘍薬 TKI (tyrosine kinase inhibitor) は EGFR 変異陽性肺癌に有効であるが、奏効例の殆どは最終的に薬剤耐性を獲得する。本研究では、一部の TKI 治療後腫瘍は主に野生型 EGFR を持つ腫瘍細胞からなり、変異型腫瘍細胞が消失或いは極端に減少し、その治療前腫瘍に野生型腫瘍細胞が混在していることを明らかにした。また、TKI 未治療の外科切除肺癌を用いた分析でも、多くの EGFR 変異陽性症例に野生型 EGFR を持つ腫瘍細胞が混在していた。そこで、EGFR の二次性 T790M 変異や Met 遺伝子の増幅の他、変異陽性症例に元々存在していた野生型 EGFR を持つ TKI 耐性クローンの選択的な生き残りも肺癌の TKI 耐性獲得に寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Tyrosine kinase inhibitor (TKI) is effective for lung cancers with EGFR mutation, but these tumors eventually acquire drug resistance. In the present study, we found that some TKI-treated tumors mainly composed of EGFR-wild tumor cells while the EGFR-mutant ones vanished or markedly decreased, and their pre-treated tumors contained EGFR-wild tumor cells. Furthermore, with surgically resected TKI-untreated cases, we showed that most EGFR-mutant tumors also contained EGFR-wild tumor cells. Thus, multiple mechanisms underline acquired TKI resistance, and besides the reported secondary EGFR T790M mutation and adaptive Met amplification, the selective survival of the preexisting TKI-resistant EGFR-wild tumor cells also contributes to the drug acquisition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺癌、EGFR、Met、分子標的抗腫瘍薬、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

イレッサを代表とするチロシンキナーゼ抑制剤 (TKI) は、EGFR (上皮成長因子受容体) 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) に対して劇的な治療効果を示すが、殆どの腫瘍は TKI 耐性能を獲得する。その分子機構として、EGFR 遺伝子の二次的変異の誘導や適応的な Met 遺伝子の増幅が関与していると報告されている。然し、EGFR の二次性 T790M 変異は、TKI 耐性を獲得した NSCLC 症例の約 1/2~1/3 にしか検出されない。また、その変異を生じた各症例においても、T790M は少数の腫瘍細胞のみに検出される (*Proc Natl Acad Sci USA* 2005)。また、Met 増幅は TKI 耐性を獲得した NSCLC 症例の約 1/5 にしか検出されない (*Science* 2007, *Proc Natl Acad Sci USA* 2007)。従って、約半数の NSCLC の TKI 耐性能の獲得は、EGFR の二次的変異や適応的 Met 増幅というメカニズムだけでは説明出来ず、依然、その機序は全く不明である。

2. 研究の目的

我々は、TKI 奏効かつ薬剤耐性を獲得した 1 症例の EGFR 変異陽性 NSCLC を分析したところ、その治療後再発腫瘍は野生型 EGFR 遺伝子を有する腫瘍細胞のみから構成され、治療前の EGFR 変異型細胞が完全に消失する事を見出した。我々は「同一腫瘍内に変異型 EGFR を持つ TKI 感受性のある腫瘍細胞と野生型 EGFR を持つ TKI 耐性細胞が混在し (EGFR genetic heterogeneity)、TKI 耐性能獲得には EGFR 野生型クローンの選択的な生き残りも重要な役割を果たす」という作業仮説を打ち立てた。本研究の目的は、既報された EGFR の二次的変異や Met 増幅以外に、EGFR 変異のヘテロジェネイティ (EGFR genetic heterogeneity) とそれと TKI 耐性獲得との関与を解明し、新たな側面をアプローチとして肺癌の TKI 耐性獲得機序多様性を証明することである。

3. 研究の方法

① 外科切除された TKI 未治療肺癌症例を無作為に抽出し、チロシンキナーゼ抑制剤 (TKI) 抗腫瘍薬の効果の規定する EGFR 遺伝子変異の hot spot である exon 19 の欠損と exon 21 の L858R の点変異を、通常 PCR と direct sequencing 法を用いて検索した。各変異陽性例より、laser microdissection にて微量の腫瘍細胞 (cell cluster) を 8 カ所以上から別々に採取し、nested PCR による DNA 増幅後 direct sequencing にて各 cell

cluster の EGFR 変異を解析した。

② TKI 耐性獲得した症例の治療前・後病変より laser capture microdissection にて腫瘍成分を採取し、EGFR 変異状況と二次性変異の有無を nested PCR と direct sequencing 法にて比較検討した。

③ TKI 治療前・後腫瘍の Met 増幅を、FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法にて比較検討した。

④ 新たに開発された EGFR 変異の特異的抗体を用いた免疫染色的検討。

4. 研究成果

① 134 症例の外科切除肺癌より、35 (26.1%) 症例に EGFR 変異が確認され、そのうち exon 19 欠損例は 17 例 (type A delE767-A750 8 例、type B delE740-A750 3 例、delL747-T751 4 例、delL747-E749, A750P 1 例、delL747-S752, P753S 1 例)、exon 21 点変異例は 18 例であった。変異例のうち 32 症例 (exon 19→15 例、exon 21→17 例) から laser microdissection にて微量腫瘍細胞 (cell cluster) を採取し、nested PCR による DNA 増幅後に遺伝子変異を分析した。Exon 19 欠損例からは 97 個 (平均 6.47 個/例) の cell cluster を分析し、そのうち 25 個は野生型、72 個は変異型、15 例のうち 11 症例は野生型と変異型の何れの cell cluster も有していた (表 1)。

表 1. EGFR Mutation Status of Microdissected Tumor Cell Clusters (Exon 19)

Case	Histology	Mutation type	Number of Cell Clusters	Wild/Mutant	Heterogeneity
1	AC	E746-A750 (A)	6	4:2	+
2	AC	E746-A750 (A)	6	2:4	+
3	AC	E746-A750 (A)	6	5:1	+
4	AC	E746-A750 (B)	7	1:6	+
5	AC	E746-A750 (A)	6	2:4	+
6	AC	E746-A750 (A)	8	2:6	+
7	AC	E746-A750 (A)	6	1:5	+
8	AC	L747-E749, A750P	8	0:8	-
9	AC	L747-T751	7	3:4	+
10	AC	E746-A750 (B)	7	2:5	+
11	AC	E746-A750 (B)	6	0:6	-
12	AC	E746-A750 (A)	8	0:8	-
13	AC	L747-S752, P753S	5	1:4	+
14	AC	L747-T751	6	2:4	+
15	AC	E746-A750 (A)	5	0:5	-
Total	15		97	25:72	11+, 4-
Ave			6.47	0.34:1	

Exon 21 点変異例から採取した 119 個 (平均 7.0 個/例) の cell cluster を分析した結果は野生型 44 個、変異型 75 個であり、17 例のうち 14 症例は野生型と変異型両方の cell cluster を有していた (表 2)。

纏めると、25/32 (78.1%) 症例の EGFR 変異にはヘテロジェネイティ性があることが明らかとなった。

表2. EGFR Mutation Status of Microdissected Tumor Cell Clusters (Exon 21)

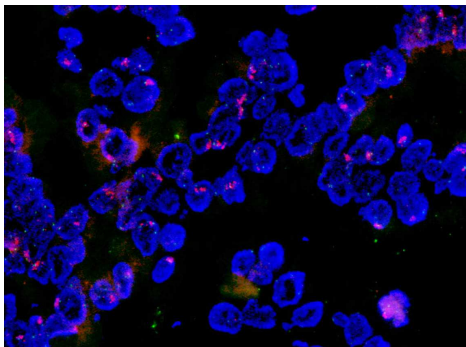
Case	Histology	Mutation type	Number of Cell Clusters	Wild/Mutant	Heterogeneity
1	AC	L858R	6	0:6	-
2	AC	L858R	6	2:4	+
3	AC	L858R	6	2:4	+
4	AC	L858R	6	2:4	+
5	AC	L858R	8	0:8	-
6	AC	L858R	8	3:5	+
7	AC	L858R	5	1:4	+
8	AC	L858R	6	5:1	+
9	AC	L858R	8	5:3	+
10	AC	L858R	8	1:7	+
11	AC	L858R	7	6:1	+
12	AC	L858R	7	2:5	+
13	AC	L858R	8	0:8	-
14	AC	L858R	6	3:3	+
15	AC	L858R	8	3:5	+
16	AC	L858R	8	4:4	+
17	ASQ	L858R	8	5:3	+
Total	17		119	44:75	14+, 3-
Avg			7.0	0.57:1	

② 活性化 EGFR 変異陽性かつ TKI 耐性を獲得した 8 症例の剖検例における EGFR 変異と Met 増幅の解析。

A. 全ての症例の TKI 投与前生検・細胞診材料からは、EGFR 活性化変異が検出された。しかし、剖検で得られた 2 症例の TKI 治療後再発・転移腫瘍には、その治療前生検材料より検出された EGFR 変異が検出されなかった。Mutant enriched peptide-nucleic-acid (PNA)-mediated PCR clump-sequencing 法による解析ではそのうち 1 症例から EGFR 変異が検出されたが、残り 1 症例はやはり野生型であった。TKI 治療前の細胞診・生検材料より微小な腫瘍細胞 cluster を microdissection し、各 cluster の EGFR 変異を分析したところ、8 症例中の 4 症例は TKI 治療前腫瘍から野生型 EGFR を持つ腫瘍成分も検出された。そこで、変異型 EGFR を持つ TKI 感受な腫瘍細胞クローンと野生型 EGFR を持つ TKI 耐性クローンとが同時に存在し、変異型クローンは TKI 治療により抑制・消滅されたが、TKI 耐性の野生型クローンが選択的に生き残った可能性があるとして推測された。

B. 8 剖検例から計 51 箇所 of TKI 治療後病変を採取・分析した。5 症例の 34 病変中の 14 病変から EGFR の T790M 二次性変異が検出された。

C. 1 症例の 5 病変中の 3 病変からは、Met 増幅が検出された。



③ EGFR exon 19 の delE746-A750 に特異性のある 6B6 抗体と exon 21 の L858R 変異に特異性のある 43B2 抗体の免疫染色を行った。6B6 抗体の免疫染色では、direct sequencing 法にて確認した 11 例の delE746-A750 症例のみが陽性であった。Direct sequencing にて確定した 18 例の L858R 症例は全て 43B2 免疫染色陽性であったが、direct sequencing にて変異が検出されなかった 4 症例にも部分的な陽性染色像を認めた。何れの抗体も、特に 6B6 抗体は相応の EGFR 変異に対する特異性と感度が極めて高かったため、TKI 投与症例のスクリーニングに有用であると考えられた。また、7/11 の 6B6 陽性症例と 22/22 の 43B2 陽性症例における発色は heterogeneous であり、明らかな陽性部分を認める一方、弱陽性や陰性の部分も混在しており、肺癌における EGFR 遺伝子変異のヘテロジェネイティが示唆された。

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 9 件)

- ① Matsumoto T, Ryuge S, Kobayashi M, Kageyama T, Hattori M, Goshima N, Jiang SX, Saegusa M, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Sato Y. Anti-HuC and -HuD autoantibodies are differential ero-diagnostic markers for small cell carcinoma from large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. Int J Oncol, 査読有, Vol.40, 2012, pp1957-1962.
- ② Kageyama T, Nagashio R, Ryuge S, Matsumoto T, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N, Jiang SX, Saegusa M, Sato Y. HADHA is a Potential Predictor of Response to Platinum-based Chemotherapy for Lung Cancer. Asian Pacific J Cancer Prev, 査読有, Vol.12, 2011, pp3457-3463.
- ③ Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Hattori M, Iyoda A, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang SX, Saegusa M. The balance between the expressions of hASH1 and HES1 differs between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma of the lung. Lung Cancer, 査読有, Vol.74, No.3, 2011, pp405-410.
- ④ Ryuge S, Sato Y, Wang GQ, Matsumoto T, Jiang SX, Katono K, Inoue H, Satoh Y, Masuda N. Prognostic Significance of

Nestin Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer. Chest, 査読有, Vol.139, No.4, 2011, pp862-869.

- ⑤ Ogawa F, Iyoda A, Amano H, Nezu K, Jiang SX, Okayasu I, Satoh Y. Thymic large cell neuroendocrine carcinoma: report of a resected case - a case report. Cardiothorac Surg, 査読有, Vol.5, 2010, pp115-119.
- ⑥ Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Shinichiro Ryuge S, Masuda N, Goshima N, Jiang SX, Okayasu I: Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. Lung Cancer, 査読有, Vol.69, No.1, 2010, pp54-59.
- ⑦ Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Ryuge S, Masuda N, Jiang SX, Okayasu I. Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. Pathol Int, 査読有, Vol.60, 2010, pp71-77.
- ⑧ Fukui T, Otani S, Hataishi R, Jiang SX, Nishii Y, Igawa S, Mitsufuji H, Kubota M, Katagiri M, Masuda N. Successful rechallenge with erlotinib in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma who developed gefitinib-related interstitial lung disease. Cancer Chemother Pharmacol. 査読有, Vol.65, No.4, 2010, pp803-806.
- ⑨ Matsumoto T, Kawashima Y, Nagashio R, Kageyama T, Koderu Y, Jiang SX, Okayasu I, Kameya T, Sato Y. A new possible lung cancer marker: VGF detection from the conditioned medium of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma-derived cells using secretome analysis. Int J Biol Markers, 査読有, Vol.24, No.4, 2009, pp282-285.

[学会発表] (計2件)

- ① 蔣 世旭、三上哲夫、梅沢敦子、山下和也、早川和重、伊豫田 明、佐藤之俊、佐藤雄一、岡安 勲、三枝 信。非小細胞肺癌における TKI 耐性獲得メカニズム多様性の検討。第52回日本肺癌学会総会、2011年11月4日、大阪国際会場。
- ② 蔣 世旭、許 伝杰、朴 春姫、梅沢敦子、早川和重、伊豫田 明、佐藤之俊、佐藤雄一、三上哲夫、岡安 勲、三枝 信。

非小細胞肺癌における EGFR 遺伝子変異の heterogeneity。第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、パシフィコ横浜。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔣 世旭 (JIANG SHI-XU)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：70276153