

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25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22700916
 研究課題名(和文) ヒト上皮成長因子受容体変異肺癌に対するチロシンキナーゼ阻害剤の効果に関する検討
 研究課題名(英文) A study for the effect of EGFR-tyrosine kinase inhibitor in lung cancer with activating EGFR mutation
 研究代表者
 宗 淳一 (SOH JUNICHI)
 岡山大学・岡山大学病院・助教
 研究者番号：90559890

研究成果の概要(和文)：EGFR 遺伝子変異陽性肺癌は EGFR チロシンキナーゼ (TK) 阻害剤に対して高い感受性を示すが、感受性を示した症例の多くは経過により耐性化するため、耐性化機構の解明と治療法確立は重要である。本研究では、EGFR-TK 阻害剤耐性化肺癌に対し、1) 耐性化に関与する microRNA (miRNA) 発現の網羅的解析と候補 miRNA の機能解析、2) 新規分子標的薬である Focal adhesion kinase (FAK) 阻害剤 (TAE226) の効果を検討した。複数の耐性細胞株を樹立後に、網羅的発現解析などにより、miR-200 が候補 miRNA として同定された。TAE226 は、耐性株を含む EGFR 変異陽性細胞株に対して、著しい抗腫瘍効果を示すことを、in vitro, in vivo に確認した。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) shows good clinical outcome in lung adenocarcinoma patients harboring activating EGFR mutations, but most of them acquire resistance. Investigation of mechanisms of acquired resistance and establishment of new treatment strategy are extremely needed. We performed microarray of miRNAs in acquired resistant cell lines as well as parental cell lines and elucidated miR-200 as a candidate of TKI-resistance related miRNA. We also analyzed the effect of TAE226, an inhibitor for FAK, to find that TAE226 showed significant anti proliferative effect on EGFR-mutant lung cancer with or without TKI resistance in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究代表者の専門分野、科研費の分科・細目について記入すること。また、当該研究課題の研究内容の内容をよく表していると思われるキーワードを1項目以上8項目以内で記入すること。なお、化学式等の使用は極力避けること。

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：EGFR-TKI 阻害剤、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

本邦においてEGFR遺伝子変異陽性肺癌は非小細胞肺癌の約30-40%に認め、女性・非喫煙者・高分化腺癌症例に多く、肺癌の新しい疾患群として注目されている。またEGFR遺伝子変異陽性肺癌の約70%は分子標的薬であるEGFRチロシンキナーゼ (TK) 阻害剤に対して効果を示すが、TK阻害剤治療感受性を示した症例の多くは経過により耐性化を示すこともわかっており、感受性・耐性化機構の解明と耐性例の治療法確立は大変重要である。近年、癌の分子異常として遺伝子の蛋白への翻訳を調節しているmicroRNA (miRNA) が注目されており、miRNAの発現異常、が肺癌をはじめ多くの癌における癌関連蛋白質の発現異常を引き起こす一因と考えられており、EGFR-TK阻害剤感受性機構および耐性化機構に関与している蛋白質群の発現を制御していることが予想される。また、他の分子標的薬として、EGFRシグナル伝達系の下流に分子であるFocal adhesion kinase (FAK) 阻害剤(TAE226)は前臨床段階であるものの注目されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対し、EGFR-TK阻害剤の薬剤感受性・耐性機構をmiRNAに着目して解明すること、さらには他の分子標的薬の単独またはEGFR-TK阻害剤との併用効果を検討し、新しい治療戦略を探索することを目標とする。具体的には、

- (1)EGFR-TK阻害剤の効果・耐性規定因子としてmiRNA発現の網羅的解析
- (2)EGFR-TKI阻害剤の効果・耐性の機構に関係すると思われる候補miRNAの機能解析
- (3)FAK阻害剤 (TAE226) の効果を検討することで、分子標的薬剤によるEGFR変異陽性肺癌の個別化治療を目指した研究を行う。

3. 研究の方法

(1)EGFR-TK阻害剤に対する感受性株と、感受性株から作成した耐性株におけるmiRNA発現を比較する。比較により感受性・耐性に関連するmiRNAを絞り込み、miRNA、さらにはmiRNAが標的とする蛋白を解析することで感受性・耐性の機構を解明する。

(2) TAE226がEGFR変異蛋白を標的としている可能性を検証し、EGFR, FAK, IGF-1R蛋白とその下流蛋白の発現を検討することでTAE226の感受性機構を検討する。併用効果に関して併用時のcombination index (CI)を求め、相乗効果を検討する。関連蛋白発現の解析により相乗効果の機構を解明する。細胞株の検討をもとに肺癌マウスモデルにおいてもTAE226単剤、EGFR-TK阻害剤との併用による抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1)EGFR-TKI耐性株の樹立：これまでEGFR変異陽性肺癌細胞株PC-9、HCC827、HCC4006、HCC2935を親株としたTK阻害剤耐性株を計20クローン樹立した。

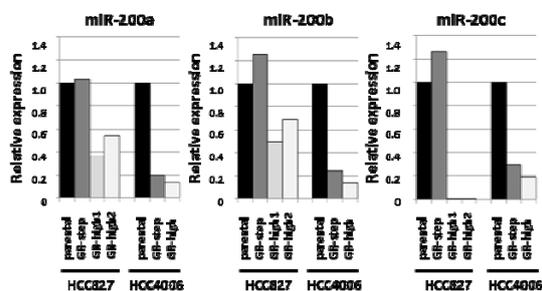
(2) 耐性株と親株のmiRNA発現を網羅的解析により比較検討と、変動のあるmiRNA群の定量的PCR法による確認とその機能解析：(1)で樹立した耐性株とその親株からmiRNAを抽出して、miRNAアレイを行い、耐性化獲得前後で変化を示したmiRNA群を抽出した (図1)。

図1) 耐性株と親株で変化の大きいmiRNA群

HCC827 (親株) vs. HCC827-GR-high1 (耐性株)			
High 1の発現が2倍以上増加		High 1の発現が2倍以上減少	
Rank	Systematic name	Rank	Systematic name
1	hsa-miR-137	1	hsa-miR-300c-3p
2	hsa-miR-42c-3p	2	hsa-miR-141-3p
3	hsa-miR-22-5p	3	hsa-miR-205-5p
4	hsa-miR-218-5p	4	hsa-miR-148a-3p
5	hsa-miR-455-3p	5	hsa-miR-145a-5p
6	hsa-miR-193a-5p	6	hsa-miR-303
7	hsa-miR-30c-2-3p	7	abov-miR-BART19-3p
8	hsa-miR-550a-3p	8	hsa-miR-463a
9	hsa-miR-424-3p	9	hsa-miR-188-5p
10	hsa-miR-574-5p	10	hsa-miR-325-5p
11	hsa-miR-431	11	hsa-miR-340-5p
12	hsa-miR-744-5p	12	hsa-miR-4270
13	hsa-miR-630	13	hsa-miR-969-3p
14	hsa-miR-30a-3p	14	hsa-miR-141-5p
15	hsa-miR-19b-1-5p	15	hsa-miR-3653
16	hsa-miR-548am-5p	16	hsa-miR-9-5p
17	hsa-miR-155-5p	17	hsa-miR-9652
18	hsa-miR-193b-3p	18	hsa-miR-3655
19	hsa-miR-140-5p	19	hsa-miR-500a-3p
20	hsa-miR-30a-3p	20	hsa-miR-532-3p

その中で、耐性化獲得後に発現が著しく低下

したmiRNA-200ファミリーに注目し、その発現の変化を定量的PCR法により確認した(図2)。(図2)定量的PCR法によるmiR-200ファミリーの発現量の検討



さらに遺伝子プロモーター領域のメチル化によりその発現が低下していることを考慮して、メチル化解析を行い、その発現がメチル化によりコントロールされている可能性が示唆された。今後はmiR-200の発現ベクターを作成し、耐性株に遺伝子導入して、EGFR-TKI感受性変化を検討して、EGFR-TKI耐性化に対するmiRNA遺伝子療法の可能性を模索する。

(3) TAE226のEGFR変異陽性細胞株に対する効果：EGFR-TKI耐性株を含むEGFR変異陽性細胞株に対して、耐性化の種類に関わらず、TAE226は高い抗腫瘍効果を示すことを、MTSアッセイで確認した。またWestern blotting法で、耐性化の有無にかかわらずEGFR変異陽性株はEGFR野生株と比較して、低濃度のTAE226でEGFR蛋白のリン酸化(活性化)が抑制された。EGFR-TKとATPの親和性に対するTAE226の阻害作用を検討したところ、野生型EGFR-TKと比較して、変異型EGFR-TKは、ATP親和性が約120倍高かった。マウス皮下腫瘍モデルの検討では、PC-9、RPC-9に対してTAE226治療群は未治療群に比べて有意な抗腫瘍効果を示して、副作用も認めなかった(図2)。

(図2) TAE226のマウス腫瘍モデルへの効果

今後はTAE226とEGFR-TKのクリスタル構造を解析し、作用機序の詳細な検討を行うとともに、今回樹立した系を用いて、他の抗腫瘍薬のEGFR-TKI耐性株への効果を検討し新たな耐性化治療法の確立を目指す。

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2件)

- ① 宗 淳一, 豊岡 伸一, 上野 剛, 三好 新一郎, EGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性機構と克服、肺癌、査読なし、52巻、2012、131-135
- ② 豊岡 伸一, 光富 徹哉, 宗 淳一, 山本 寛斉, 三好 新一郎、肺癌、査読なし、50巻、2010、329-341

[学会発表] (計6件)

- ① J Soh, K Shien, T Ueno, K Tsukuda, K Suda, T Kubo, M Furukawa, T Muraoka, Y Maki, N Tanaka, H Yamamoto, K Kiura, T Mitsudomi, S Toyooka, S Miyoshi, Knockdown of EGFR to investigate its therapeutic potential for treatment of non-small cell lung cancers、AACR2012、2012/4/1、シカゴ、アメリカ
- ② 豊岡 伸一, 宗 淳一, 上野 剛, 山根 正修, 大藤 剛宏, 三好 新一郎、肺がんの亜分類と標的治療 分子標的薬の今後の展望(Beyond EGFR/ALK/HER2)、第70回日本癌学会総会、2011/10/3-5、名古屋
- ③ 豊岡 伸一, 宗 淳一, 大谷 弘樹, 小林 成行, 久保 孝文, 上野 剛, 青景 圭樹, 山根 正修, 大藤 剛宏, 木浦 勝行, 三好 新一郎、肺癌の分子標的治療 基礎から臨床へ EGFR-TKIの耐性機構とその克服、第51回日本肺癌学会総会、2010/11/3-4、広島

- ④ 宗 淳一, 豊岡 伸一, 大谷 弘樹, 高岡 宗徳, 阪口 正清, 治田 賢, 久保 孝文, 山本 寛斉, 浅野 博昭, 佃 和憲, 木浦 勝行, 許 南浩, 猶本 良夫, 三好 新一郎、肺癌細胞株におけるTAE226の変異型EGFRチロシンキナーゼ特異的な不活化作用とその抗腫瘍効果の検討、第83回日本組織培養学会、2010/5/20-21、岡山
- ⑤ 上野 剛, 豊岡 伸一, 宗 淳一, 治田 賢, 久保 孝文, 浅野 博昭, 佃 和憲, 山根 正修, 大藤 剛宏, 三好 新一郎、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性株の樹立と分子生物学的特徴の検討、第27回日本呼吸器外科学会総会、2010/5/13-15、仙台
- ⑥ H Otani, S Toyooka, M Takaoka, M Sakaguchi, T Ueno, H Yamamoto, J Soh, T Kubo, H Asano, K Tsukuda, M Yamane, T Oto, K Kiura, N Huh, Y Naomoto, S Miyoshi、The anti-tumor effect of TAE226, dual inhibitor of FAK and IGF-IR, on non-small-cell lung cancer with EGFR mutation、AACR2010、2010/4/19、ワシントンDC、アメリカ

[その他]

ホームページ等

<http://www.nigeka-okayama-u.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗 淳一 (SOH JUNICHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：90559890