様式Ｃ－１９

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２１日現在

機関番号：１７２０１
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：22700922
研究課題名（和文）上皮成長因子受容体リガンドを標的としたゲフィチニブ耐性化機構の解明
研究課題名（英文）Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors involving HER-family ligands
研究代表者
岩永　健太郎　（IWANAGA KENTARO）
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号：60380755

研究成果の概要（和文）：
肺がんにおけるチロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）の耐性獲得機序を解明するためにEGFR-TKI初期耐性および獲得耐性肺がん細胞株を用いてHERファミリーリガンドの発現とHERファミリーレセプターのリン酸化状態を検討した。EGFR-TKI初期耐性肺がん細胞株ではHER3およびHER4に結合するリガンドの高発現を認めた。EGFR-TKI獲得耐性肺がん細胞株ではHER4およびその下流であるSTAT5のリン酸化亢進がみられた。

研究成果の概要（英文）：
To investigate novel mechanisms of resistance to EGFR-TKI in lung cancer, we examined expression levels of HER-family ligands and phosphorylation status of HER-family receptors in EGFR-TKI primary and acquired resistant NSCLC cell lines. HER3 and HER4 binding ligands were highly expressed in primary resistant cell lines. Phosphorylation status of HER4 and its downstream STAT5 were increased in acquired resistant cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学
キーワード：肺がん

１．研究開始当初の背景

肺がんの新しい治療戦略として上皮成長因子受容体（EGFR）を標的としたチロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）やモノクローナル抗体（EGFR-mAb）が臨床応用されている。

特にゲフィチニブは我が国ではじめて肺がんに対して臨床導入されたが、当初は奏効した症例でも、ほぼ全例で治療経過中にゲフィチニブ耐性となることが知られており、大きな問題となっている。これまでにゲフィチニブ治療後の耐性獲得の機序として *EGFR*

T790M 遺伝子変異（約５０%）や *MET* 遺伝子増幅（＜１０%）、HGF 過剰発現（約２０%）が報告されている。しかし残りの耐性獲得機序については明らかではない。これまでに肺がんを含む様々な腫瘍で EGFR の過剰発現とその下流のシグナル伝達経路の異常が認知され、その機序として HER ファミリーリガンドのオートクライン機構を介した発現異常が報告されている。(Volante M, et al: Cancer, 2007)。

私たちは *in vitro* で EGFR リガンドの一つである Epiregulin が EGFR 遺伝子変異のある肺がん細胞株で高発現し、Epiregulin が高発現している HCC827 細胞を Epiregulin 中和抗体で処理すると EGFR のリン酸化が減少し、Matrigel を用いた Invasion Assay で HCC827 細胞の浸潤能が抑制されることを見い出した(Zhang J, Iwanaga K, et al: Cancer Prev Res, 2008)。

さらにゲフィチニブ感受性の HCC827 細胞をゲフィチニブで 24 時間処理すると Epiregulin mRNA の発現は速やかに抑制された。しかし Rapamycin（mTOR 阻害薬）、A8384503（AKT 阻害薬）、SP600125（JNK 阻害薬）で EGFR 下流のシグナルを抑制しても Epiregulin mRNA の発現量に変化はみられなかった。Epiregulin の発現は EGFR に依存している可能性が高く、ゲフィチニブによる治療前後の Epiregulin の発現変化をモニタリングすることは早期の効果判定に有用と考えられた。

また肺がんのゲフィチニブ感受性と EGFR リガンドの関連については、これまでにも低感受性を既定する因子として末梢血液中の TGF αや Amphiregulin といった EGFR リガンドの高発現が報告されている(Ishikawa N, et al: Cancer Res,2005)。

以上のことから HER ファミリーリガンドの発現制御機構を解析することで肺がんにおけるゲフィチニブ耐性化機序を明らかにできる可能性がある。

現在ゲフィチニブなど EGFR-TKI の感受性予測や耐性化機構の解析は EGFR 遺伝子変異や遺伝子増幅を中心に進められ一定の成果を挙げているが、HER ファミリーリガンドを標的としたゲフィチニブ耐性化機構の解明を行うことで、新規の EGFR-TKI、EGFR-mAb、MET 阻害薬の開発や臨床応用における耐性克服に寄与できると考えられる。また EGFR リガンドは細胞表面から切り離された可溶性部分がレセプターの細胞外ドメインに結合することで下流のシグナルを活性化させるが、可溶性であるため末梢血や気管支肺胞洗浄を用いた検索が比較的容易である。末梢血を用いたバイオマーカーの発現プロファイルの解析は、他の検査法と比較して低侵襲であることから、進行肺がん症例など、EGFR を標的とした分子標的薬剤の対象となるような患者集団についても検討可能であり、肺がんの治療戦略において重要な役割を果たすことが期待される。

２．研究の目的

肺がん分子標的薬ゲフィチニブの耐性化機構を EGFR リガンドの側面より検討し、ゲフィチニブ耐性獲得の新規マーカーを血清診断にて行うことを目的とする。

１）肺がん細胞株を用いてゲフィチニブ耐性化に関与する EGFR リガンドの同定および耐性獲得に重要なシグナル伝達経路を明らかにする。

２）臨床検体を用いた EGFR リガンドの ELISA による測定系を確立し、ゲフィチニブを投与された肺がん患者の臨床検体を用いて、その治療効果や再増悪と EGFR リガンドの発現変化についてレトロスペクティブに解析を行い、ゲフィチニブ耐性獲得のマーカーを明らかにする。

３．研究の方法

１）肺がん細胞株におけるゲフィチニブおよびエルロチニブの感受性：肺がん細胞株 20 種についてゲフィチニブとエルロチニブの細胞増殖抑制効果、EGFR 遺伝子変異(L858R, exon 19 欠失)の有無と比較検討した。

２）肺がん細胞株の HER ファミリーリガンドおよびレセプターの発現：発現解析をおこなう HER ファミリーリガンドは HER ファミリーレセプターに対する結合特異性を元に３つのグループに分けて検討した。①EGFR 特異的に結合するリガンド（EGF、TGF-α、Amphiregulin)、②EGFR と HER4 に結合するリガンド（β-cellulin、HB-EGF、Epiregulin、Epigen)、③HER3 や HER4 に結合するリガンド（Neuregulin1-4)。それぞれの肺がん細胞株より RNA を抽出し High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems)を用いて cDNA とした。定量的リアルタイム PCR は StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems)を使用し、18s rRNA 遺伝子を内在性コントロールとして用いて各種リガンドの発現量を測定した。細胞間のリガンド発現量の比較は HCC827 でのリガンド発現量を１とした場合の発現量を Comparative Ct 法を用いた ABI StepOne Software で解析した。肺がん細胞株における HER ファミリーレセプターのタンパク発現量とリン酸化状態はウエスタンブロット法を用いて解析した。

３）EGFR-TKI 耐性獲得に関与する HER ファミリーリガンドおよびシグナル伝達経路：EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞（HCC827）にゲフィチニブあるいはエルロチニブを IC30 から IC60 と徐々に接触させゲフィチニブ耐性肺がん細胞株（HCC827GR）とエルロチニブ耐性肺がん細胞株（HCC827ER）を作成した。樹立した細胞株を用いて HER ファミリーリガンドとレセプターの発現および下流のシグナルについて定量的リアルタイム PCR とウエスタンブロット法により検討した。

４．研究成果

１）肺がん細胞株におけるゲフィチニブおよびエルロチニブの感受性

非小細胞肺がん細胞株 20 種について検討した。そのうち、8 種（H1395、H596、H1437、A549、H226B、H1299、H460、H1792）は EGFR 遺伝子変異がなくゲフィチニブおよびエルロチニブ初期耐性、4 種（HCC2395、HCC4006、HCC827、PC-9）は EGFR 遺伝子変異がありゲフィチニブおよびエルロチニブに感受性がみられたため、この 12 種の細胞株で以後の解析を行った。

２）肺がん細胞株の HER ファミリーリガンドおよびレセプターの発現

前述した 12 種類の細胞株について、HER ファミリーリガンドの発現量をリアルタイム定量 PCR で比較した。EGFR-TKI 初期耐性の肺がん細胞株では感受性株と比較して Neuregulin 2（29.7 倍）、Neuregulin 4（18.1 倍）、Epiregulin（8.72 倍）、Neuregulin 1（6.19 倍）epigen（5.18 倍）と HER3 および HER4 に結合するリガンドの高発現を認めた（図１）。

HER ファミリーレセプターの解析では EGFR-TKI 感受性株で EGFR のリン酸化亢進を認めたが、他の HER ファミリーレセプターでは同様の傾向はみられなかった。

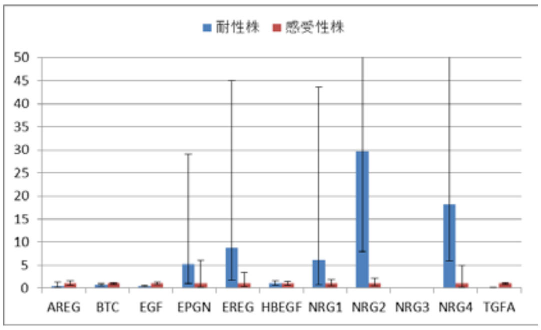

図１　初期耐性株におけるリガンド発現

３）EGFR-TKI 耐性獲得に関与する HER ファミリーリガンドおよびシグナル伝達経路

EGFR-TKI 感受性株（HCC827）を用いてゲフィチニブ耐性株（HCC827GR）およびエルロチニブ耐性株（HCC827ER）を作成した。樹立した耐性株では既知の耐性化機構である EGFR-T790M 変異、HGF 過剰発現は認めなかった。MET は２−50 倍の増幅を認めた（表１）。HER ファミリーリガンドの発現量は 2 倍以上を発現亢進、0.5 倍以下を発現低下とすると親株と比較して、ゲフィチニブ耐性株（HCC827GR）では Amphiregulin、Epigen、Epiregulin、HB-EGF、Neuregulin 1、TGF-α といった EGFR に結合するリガンドの発現亢進をみとめたが、エルロチニブ耐性株（HCC827ER）では Amphiregulin、Epigen、EGF、Neuregulin 4 の発現は低下していた（図２）。HER4 および下流のシグナルである STAT5 のリン酸化は HCC827GR、HCC287ER で共に亢進していた（図３、図４）。

	IC50 (uM)	T790M	HGF (ng/ml)	MET (倍)
HCC827	0.015	no	<0.1	0.87
GR1	>10	no	<0.1	16.78
GR2	>10	no	<0.1	48.97
ER1	>10	no	<0.1	13.24
ER2	>10	no	<0.1	1.89

表１　既知の耐性化機構の検討

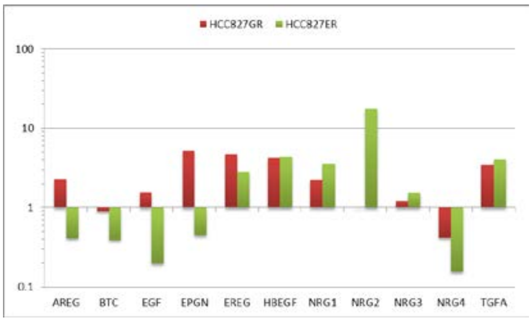

図２　獲得耐性株におけるリガンド発現

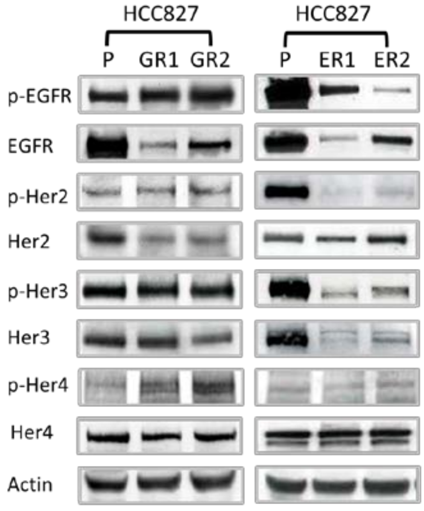

図３　HER レセプターのリン酸化状態

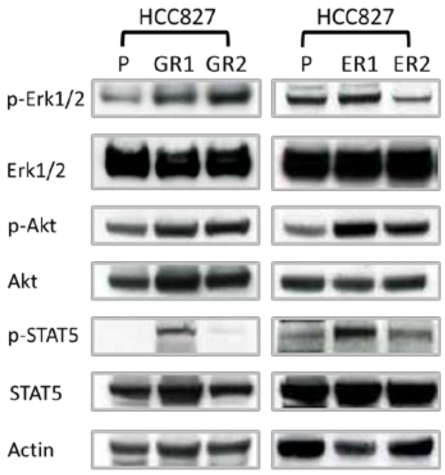

図４　HER レセプター下流のシグナル発現

以上の結果よりゲフィチニブの耐性化機構に複数の ERBB ファミリーレセプターリガンドが関与していると推定された。現在ゲフィチニブ獲得耐性株の ERBB ファミリーレセプターのリン酸化、下流のシグナル伝達系について解析を行い、耐性化の主要メカニズムを解析中である。

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０件）

〔学会発表〕（計１件）

① Iwanaga K, Sueoka-Aragane N, Sato A, Nakamura T, Kobayashi N, Sueoka E, Kimura S. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors involving HER-family ligands and receptors. AACR 103nd Annual Meeting 2012, March 31-April 4, 2012 (Chicago, IL)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
岩永　健太郎（IWANAGA KENTARO）
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号：60380755

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：