

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390221

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを利用したEGFR遺伝子変異陽性肺癌の基礎的臨床的検討

研究課題名(英文) Basic and clinical study of EGFR gene mutation-positive lung cancer using a genetically modified mouse

研究代表者

木浦 勝行 (Kiura, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：10243502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)： EGFR遺伝子改変マウスを使用し, afatinib (非可逆性TKI), everolimus (mTOR阻害薬), AZD1480 (JAK-1/2 阻害薬)の抗腫瘍効果を明らかにした。 マウス異種移植モデルで, T790Mを有する耐性細胞に対してafatinib + cetuximab + bevacizumab併用療法は, 持続する病理学的完全奏効をもたらすことを証明した。 Ogg1ホモノックアウトマウスに高用量タバコ特異的二トロサミン(NNK)投与で9.3%に早期発癌を肺に認めたと, 低用量では発癌を認めず, 上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子異常との関連は不明である。

研究成果の概要(英文)： Using the EGFR genetically modified mice, afatinib (irreversible TKI), everolimus (mTOR inhibitor), and AZD1480 (JAK-1/2 inhibitors) revealed an anti-tumor effect. In mouse xenograft models, afatinib + cetuximab + bevacizumab combination therapy against resistant cells harbouring T790M has proved to result in lasting pathologic complete response. Although 9.3% of Ogg1 (-/-) homozygous knockout mice to a high dose of tobacco-specific nitrosamines (NNK) had adenocarcinoma of the lung, it is not recognized carcinogenesis at low doses. The relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations and NNK-induced carcinogenesis was unclear.

研究分野：呼吸器内科学(胸部腫瘍学)

キーワード：EGFR遺伝子改変マウス afatinib everolimus (mTOR阻害薬), JAK-1/2 inhibitors cetuximab bevacizumab Ogg1ホモノックアウトマウス NNK

1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌

2002 年肺癌研究を一変させる大発見, EGFR チロシンリン酸化酵素阻害薬 (TKI) gefitinib の劇的な臨床効果が報告され, その効果をもたらす機序が次々に明らかにされている。EGFR の ATP 結合部位に遺伝子変異が入り, 自己リン酸化が持続的に惹起され Weinstein の提唱する癌遺伝子依存 oncogene addiction という状態がもたらされ, 更に EGFR 細胞質内の ATP 結合部位は三次元構造の変化により gefitinib は ATP より結合しやすい状態になっていることが明らかにされている。これらにより凄まじい臨床効果をもたらされたと推定されているが, その臨床効果持続期間は 1 年程度である。 gefitinib を含めた EGFR-TKI の登場により EGFR 遺伝子変異陽性患者の生存期間を確実に延長しているが, その効果は限定的である。

EGFR 遺伝子変異陽性 (非小細胞患者の 20-30% を占める) の発癌機構, 発癌初期に起るシグナル伝達の変化の解析, 有効な分子標的薬のスクリーニング, 耐性現象の解析・打破の研究は Translational Research として臨床的意義は極めて高い状況であった。

EGFR 遺伝子改変マウス

マウスに変異型 EGFR 遺伝子導入することにより肺に癌化が起こることは申請者らを含め, 3 施設から報告されている (Ji H, et al: Cancer Cell 9(6):485, 2006; Politi K, et al: Genes Dev 20(11):1496, 2006)。前二者は CCSP プロモーター, 気道上皮のクララ細胞に指向性の強い CCSP プロモーターとは異なり, 申請者らは SP-C プロモーターを使用し, II 型肺胞上皮に特異的に変異型 EGFR を発現させている。申請者らが樹立した遺伝子改変マウスは “ヒトで起こる II 型肺胞上皮に形成されるヒト肺腺癌の癌化過程”, 異型腺腫瘍様過形成 (AAH) を経て腺癌となる組織変化の過程を, II 型肺胞上皮上で再現していた。

EGFR 遺伝子変異の入り機序

EGFR 遺伝子変異の入り原因として放射線 (ラット) が報告されているが, その変異はヒトの EGFR 遺伝子変異に相当するものでなく, その機能解析は行われていない。DNA 修復酵素欠損マウスで EGFR 遺伝子変異が報告されているが, 詳細な検討も行われていない。EGFR 遺伝子変異の入り原因は不明である。

2. 研究の目的

EGFR 遺伝子改変マウスを使用し, 各種 TKI [afatinib(irreversible TKI of EGFR and HER-2), everolimus (mTOR inhibitor), JSI-124 (JAK-1/2 inhibitor)] の抗腫瘍効

果・生存期間と各薬剤によってもたらされる下流シグナルの変化を明らかにする。

L858RT790M を有する H1975, exon19 del T790M を有する RPC-9 の Gatekeeper mutation を有する EGFR TKI 耐性細胞に対して, afatinib + cetuximab + bevacizumab 併用療法をマウス異種移植モデルで検討する。

DNA 修復酵素欠損マウスの低濃度発癌性物質曝露による発癌における EGFR 遺伝子変異の関与を検討し, 宿主側の EGFR 発癌への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

EGFR 遺伝子改変マウスを使用し, 各種 TKI [afatinib(irreversible TKI of EGFR and HER-2), everolimus (mTOR inhibitor), JSI-124 (JAK-1/2 inhibitor)] の抗腫瘍効果・生存期間と各薬剤によってもたらされる下流シグナルの変化を検討した。

L858RT790M を有する H1975, exon19 del T790M を有する RPC-9 の Gatekeeper mutation を有する EGFR TKI 耐性細胞に対して, afatinib + cetuximab + bevacizumab 併用療法をマウス異種移植モデルで検討した。

Ogg1 ヘテロノックアウトマウス (Ogg1(+/-)ヘテロマウス) 3 匹を Ogg1 野生型 C57BL6 マウス (以下, WT マウス) と交配させ, その仔 (Ogg1(+/-)ヘテロマウス) をさらに交配し, 仔を得る。得られて仔をジェノタイプピングすることで Ogg1 ホモノックアウトマウス (以下, ホモマウス), ヘテロマウス, WT マウスの 3 グループに分け, それぞれを雄雌の 2 群に分ける。それぞれに Vehicle 投与群と NNK100mg/kg 投与群を設定したため, 計 12 群を作製し NNK 投与による発癌実験を行なった。Vehicle, NNK100mg/kg は 7 週齢で腹腔内投与し, 10 週後, 20 週後, 30 週後での発癌を確認するためそれぞれの群で 3 匹程度ずつ安楽死させ解剖, 得られた左右肺からそれぞれ多切切片を作製し観察した。しかしながら 30 週までは明らかな発癌はみられず, 40 週まで観察期間を延長しそれぞれの群で少なくとも 10 匹程度ずつを解剖し確認したが NNK 投与による有意な発癌は確認されなかった。ついで併行して既報 (Igarashi M et al. J Toxicol Sci. 2009) の基礎実験データを参考に, 対象をメスのヘテロマウスのみならず, NNK500mg/kg 投与群を追加作製し, NNK500mg/kg を 7 週齢で腹腔内投与したのち, 20 週の時点で肺を摘出し多切切片を作製し, 観察を行なった。その結果, 16 匹計 32 検体中 3 検体 (9.3%) で NNK 投与による早期発癌を認めた。

4. 研究成果

-1) アファチニブはゲフィチニブを 5mg/kg

の経口投与で比較すると、アファチニブは EGFR 遺伝子改変マウスの生存期間を有意に延長した (図 1)。L858RT790M を有する H1975, exon19 del T790M を有する RPC-9 EGFR TK1 耐性細胞の異種移植腫瘍に対するアファチニブベバシツマブ併用療法は有効 (図 2) であり、臨床応用が期待される。

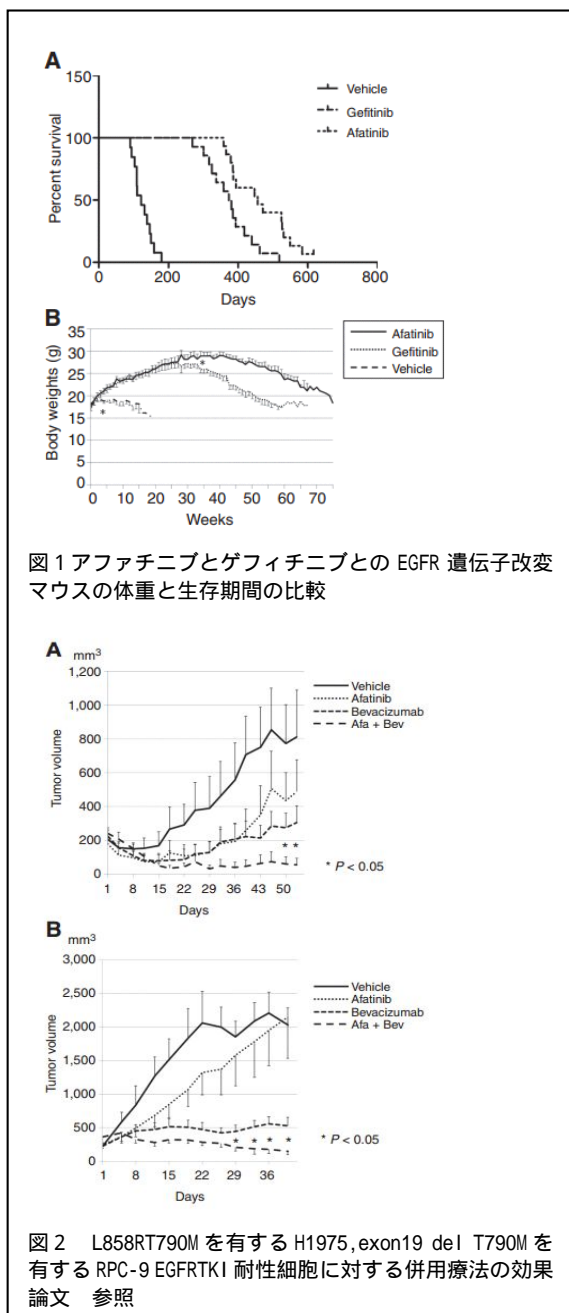


図 1 アファチニブとゲフィチニブとの EGFR 遺伝子改変マウスの体重と生存期間の比較

図 2 L858RT790M を有する H1975, exon19 del T790M を有する RPC-9 EGFR TK1 耐性細胞に対する併用療法の効果 論文 参照

-2 エベロリムスは、さまざまな EGFR 遺伝子変異を有する細胞に、in vitro で、同様に有効であった (図 3)。エベロリムスは、EGFR 遺伝子改変マウスにおける肺腫瘍を抑制し、これらのマウスの全生存期間を延長し

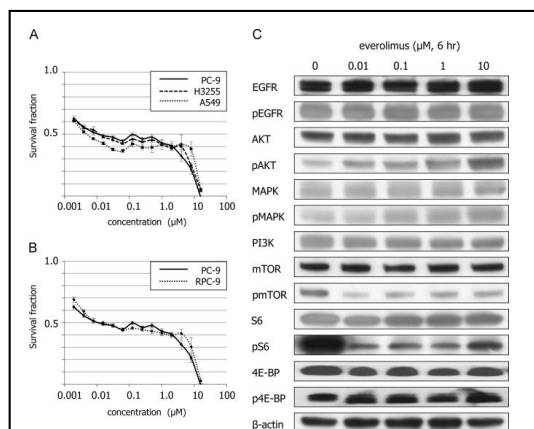


図 3 エベロリムスの試験内の効果と下流シグナル

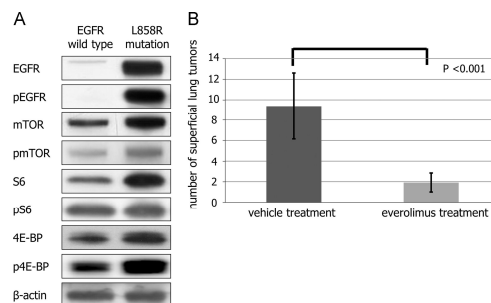


図 4 エベロリムスの EGFR 遺伝子改変マウスの腫瘍数に対する効果と下流シグナル

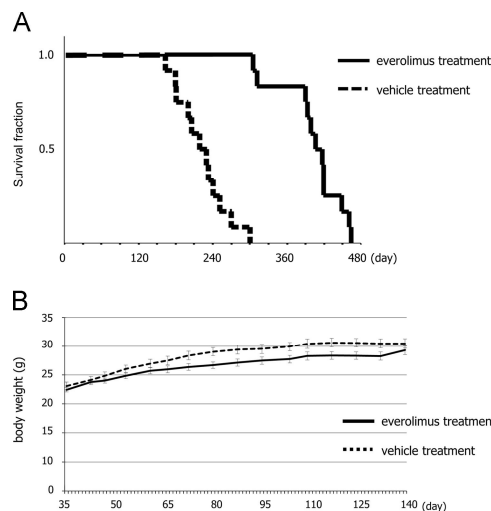


図 5 エベロリムスとの EGFR 遺伝子改変マウスの体重と生存期間に対する効果 論文 参照

た (図 4&5)。エベロリムスは、腫瘍血管新生を阻害することにより、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に有効である可能性がある。

-3 結果: AZD1480 に親細胞とその耐性細胞に感受性を残していた。AZD1480 (30 または OS ごとに 50mg / kg / 日) で血管新生を減少させ、マウスで有意な腫瘍退縮を認め

た。EGFR 遺伝子改変マウスの実験で，AZD1480 投与により，pSTAT3，pJAK1，pJAK2 および血管形成が抑制され肺腫瘍の数を有意に抑制し，生存期間も有意に延長した。AZD1480 は，活性化 EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対して有効である可能性が示唆された。

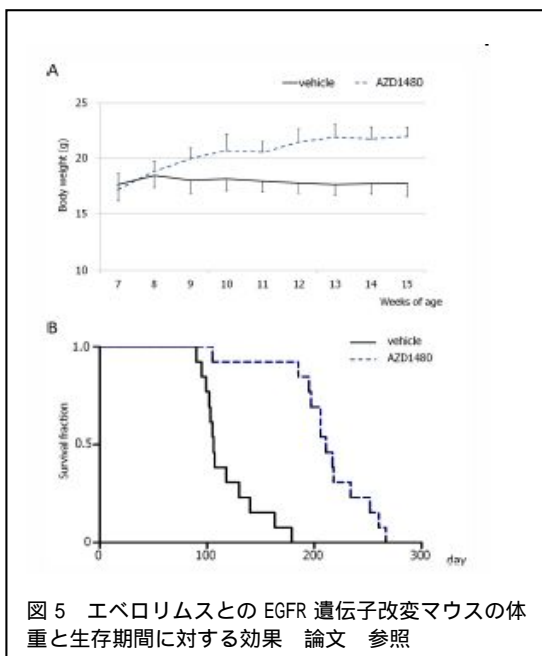


図5 エベロリムスとの EGFR 遺伝子改変マウスの体重と生存期間に対する効果 論文 参照

L858R/T790M を有する H1975, exon19 del T790M を有する RPC-9 の Gatekeeper mutation を有する EGFR TKI 耐性細胞に対して，afatinib + cetuximab + bevacizumab 併用療法をマウス異種移植モデルで検討し，腫瘍が完全に消失し，薬剤を Off にしても長期にわたり，再発しない現象を認めた。臨床への応用が期待されている。

低用量 NNK では Ogg1(-/-)マウスは早期発癌しない。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計18件)

Hotta K, Kato Y, Leigh N, Takigawa N, Gaafar RM, Kayatani H, Hirata T, Ohashi K, Kubo T, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Magnitude of the benefit of progression-free survival as a potential surrogate marker in phase 3 trials assessing targeted agents in molecularly selected patients with advanced non-small cell lung cancer: systematic review. *PLoS One*. 査読あり, 2015;10(3):e0121211. doi: 10.1371/journal.pone.0121211.

Ichihara E, Hotta K, Nogami N, Kuyama S, Kishino D, Fujii M, Kozuki T, Tabata

M, Harada D, Chikamori K, Aoe K, Ueoka H, Hosokawa S, Bessho A, Hisamoto-Sato A, Kubo T, Oze I, Takigawa N, Tanimoto M, Kiura K. Phase II trial of gefitinib in combination with bevacizumab as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR gene mutations: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. *J Thorac Oncol*. 査読あり, 2015;10(3):486-91. doi: 10.1097/JTO.0000000000000434.

Hotta K, Kiura K, Tabata M, Takigawa N, Tanimoto M, Ueoka H. A survey of Japanese thoracic oncologists' perception of diagnostic and treatment strategies for EGFR mutant or EML4-ALK fusion non-small cell lung cancer. *Chest*. 査読あり, 2014;146(6):e222-5. doi: 10.1378/chest.14-2055.

Yasugi M, Takigawa N, Ochi N, Ohashi K, Harada D, Ninomiya T, Murakami T, Honda Y, Ichihara E, Tanimoto M, Kiura K. Everolimus prolonged survival in transgenic mice with EGFR-driven lung tumors. *Exp Cell Res*. 査読あり, 2014 Aug 15;326(2):201-9. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.04.012.

Harada D, Takigawa N, Kiura K. The Role of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 査読あり, 2014;6(2):708-22. doi: 10.3390/cancers6020708.

Kato Y, Hotta K, Takigawa N, Nogami N, Kozuki T, Sato A, Ichihara E, Kudo K, Oze I, Tabata M, Shinkai T, Tanimoto M, Kiura K. Factor associated with failure to administer subsequent treatment after progression in the first-line chemotherapy in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: Okayama Lung Cancer Study Group experience. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読あり, 2014;73(5):943-50. doi: 10.1007/s00280-014-2425-9.

Ochi N, Takigawa N, Harada D, Yasugi M, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Src mediates ERK reactivation in gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Exp Cell Res*. 査読あり, 2014;322(1):168-77.

doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.007.  
Murakami T, Takigawa N, Ninomiya T, Ochi N, Yasugi M, Honda Y, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tanimoto M, Kiura K. Effect of AZD1480 in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. *Lung Cancer*. 査読あり, 2014;83(1):30-6.  
doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.011.  
Hayakawa H, Ichihara E, Ohashi K, Ninomiya T, Yasugi M, Takata S, Sakai K, Matsumoto K, Takigawa N, Tanimoto M, Kiura K. Lower gefitinib dose led to earlier resistance acquisition before emergence of T790M mutation in epidermal growth factor receptor-mutated lung cancer model. *Cancer Sci*. 査読あり, 2013 Nov;104(11):1440-6. doi: 10.1111/cas.12284. Epub 2013 Oct 25.  
Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Koboyashi K, Takeda K, Kiura K, Nishio K, Seki Y, Ebisawa R, Shahidi M, Yamamoto N. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol*. 査読あり, 2013;31(27):3335-41.  
doi: 10.1200/JCO.2012.45.0981  
Ichihara E, Hotta K, Takigawa N, Kudo K, Kato Y, Honda Y, Hayakawa H, Minami D, Sato A, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Impact of physical size on gefitinib efficacy in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Lung Cancer*. 査読あり, 2013;81(3):435-9.  
doi: 10.1016/j.lungcan.2013.05.021.  
Saito K, Takigawa N, Ohtani N, Iioka H, Tomita Y, Ueda R, Fukuoka J, Kuwahara K, Ichihara E, Kiura K, Kondo E. Antitumor impact of p14ARF on gefitinib-resistant non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther*. 査読あり, 2013;12(8):1616-28.  
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1239.  
Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, Hashida S, Maki Y, Ichihara E, Asano H, Tsukuda K, Takigawa N, Kiura K, Gazdar AF, Lam WL, Miyoshi S. Acquired resistance to

EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res*. 査読あり, 2013;73(10):3051-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4136.  
Okamoto I, Aoe K, Kato T, Hosomi Y, Yokoyama A, Imamura F, Kiura K, Hirashima T, Nishio M, Nogami N, Okamoto H, Saka H, Yamamoto N, Yoshizuka N, Sekiguchi R, Kiyosawa K, Nakagawa K, Tamura T. Pemetrexed and carboplatin followed by pemetrexed maintenance therapy in chemo-naive patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 査読あり, 2013;31(5):1275-82. doi: 10.1007/s10637-013-9941-z.  
Ninomiya T, Takigawa N, Ichihara E, Ochi N, Murakami T, Honda Y, Kubo T, Minami D, Kudo K, Tanimoto M, Kiura K. Afatinib prolongs survival compared with gefitinib in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. *Mol Cancer Ther*. 査読あり, 2013;12(5):589-97.  
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0885.  
木浦勝行, 谷本光音 【分子標的治療】肺癌と分子標的薬 岡山医学会雑誌 (ISSN0030-1558), 査読なし, 125 巻 1 号 Page57-66(2013.04)  
木浦勝行 臨床病期 III 期肺非小細胞癌に対する治療戦略 岡山医学会雑誌 (ISSN0030-1558), 査読なし, 125 巻 2 号 Page119-127(2013.08)  
近藤英生, 木浦勝行 抗 PD-1 抗体 呼吸 (ISSN0286-9314), 査読なし, 32 巻 12 号 Page1141-1147(2013.12)

〔学会発表〕(計 5 件)

Yamane H, Isozaki H, Ochi N, Kudo K, Honda Y, Yamagishi T, Kubo T, Kiura K, Takigawa N. Both programmed cell death protein 1 and programmed death-ligand 1 molecules can be expressed on the cell surface of small-cell lung cancer (Abstract #1323), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, AACR Annual Meeting 2015 April 18-22, 2015  
Kudo K, Ohashi K, Ichihara E, Minami D, Kubo T, Sato A, Kato Y, Isozaki, Kayatani H, Tamura T, Kiura K. The impact of bevacizumab on combination

low-dose afatinib and cetuximab therapy in lung cancer cells harboring activated EGFR mutations (Abstract #1368), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, AACR Annual Meeting 2015 April 18-22, 2015

Hashida S, Ohashi K, Matsubara T, Ohtsuka T, Watanabe M, SuzawaK, Maki Y, Yamamoto H, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Miyoshi S, Kiura K, Toyooka S. Non-invasive EGFR T790M detection using droplet digital PCR system (Abstract #5248), Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, AACR Annual Meeting 2015 April 18-22, 2015

Isozaki H, Ichihara E, Yasugi M, Ochi N, Hotta K, Takigawa N, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. ALK inactivation induced acquired resistance to alectinib in lung cancer harboring EML4-ALK fusion gene. (Abstract #3721) San Diego Convention Center, San Diego, California, AACR Annual Meeting 2014, April 5-9, 2014

Yamamoto H, Higasa K, Sakaguchi M, Shien K, Sohda J, Takigawa N, Matsuo K, Kiura K, Miyoshi S, Fumihiko Matsuda F, Shinichi Toyooka S. Novel germline G660D mutation in HER2 gene detected by whole-exome sequencing can predispose a patient to developing familial lung adenocarcinoma (Abstract#LB-291) San Diego Convention Center, San Diego, California, AACR Annual Meeting 2014, April 5-9, 2014

〔図書〕(計2件)

木浦勝行 治療の進歩 EGFR-TKIs 耐性肺癌に対する新しい分子標的治療 Annual Review 呼吸器 2014 中外医学社

Page196-206(2014.01)273

木浦勝行【最新肺癌学-基礎と臨床の最新研究動向-】肺癌の治療戦略 集学的治療 手術不能 III 期非小細胞肺癌 日本臨床(0047-1852)71 巻増刊6 最新肺癌学 Page604-610(2013.11)759

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)なし

取得状況(計0件)なし

〔その他〕ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

木浦 勝行 (KIURA, Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：10243502

(2)研究分担者

瀧川奈義夫 (TKIGAWA, Nagio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60325107

堀田勝幸 (HOTTA Katsuyuki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70379816

(3)連携研究者

高田 穰 (TAKATA, Minoru)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：30281728

中別府雄作 (NAKABEPPU, Yusaku)

九州大・学生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350

吉野 正 (YOSHINO, Tadashi)

岡山大学・医薬歯学総合研究科・教授

研究者番号：70183704