

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791559
 研究課題名(和文) 大腸癌細胞膜表面EGFR検出によるCetuximab感受性予測法の開発
 研究課題名(英文) Expression of epidermal growth factor receptor detected by cetuximab indicates its efficacy to inhibit in vitro and in vivo proliferation of colorectal cancer cells
 研究代表者
 茂田 浩平 (SHIGETA KOHEI)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：30528790

研究成果の概要(和文):セツキシマブは、癌細胞の表面に位置する上皮成長因子受容体(EGFR)に結合し、EGFRからのシグナル伝達を阻害して腫瘍増殖・転移に関与する細胞機能を抑制する分子標的治療薬の一つです。本研究は、セツキシマブを用いてEGFRを検出する方法を新しく開発し、この新しい手法により定量したEGFR発現量と大腸癌細胞における腫瘍増殖抑制効果の相関を示すことに成功しました。本研究の結果より、セツキシマブ治療群の中でもより感受性の高い症例の抽出が可能となり、薬剤選択に大きな指針を与える可能性があると考えられました。

研究成果の概要(英文):Cetuximab is a monoclonal antibody of the IgG1 subclass that targets the human epidermal growth factor receptor (EGFR). We hypothesized that the expression levels of EGFR which can be detected by cetuximab itself may influence the inhibition of cell proliferation. Despite further investigation is required to verify this hypothesis, our results raised the possibility that the expression levels of EGFR detected by cetuximab itself might be the predictive factor of the sensitivity of cetuximab in CRC.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌，分子標的治療薬，セツキシマブ

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬による大腸癌化学療法はこの数年で劇的な変化を迎えている。大腸癌の化学療法では従来の細胞毒性を持った抗癌剤に加えて、細胞内シグナル伝達を制御する分子標的薬が生命予後延長の重要な役割を担っている(Sobrero AF et al. J Clin Oncol 2008, Jonker DJ et al. N Engl J Med 2007)。セツキシマブは Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)を標的とし、EGFRの活性化、

二量体化を阻害する。また細胞表面にあるEGFRを細胞内へ内在化させることにより腫瘍増殖を抑制する治療薬である。

このセツキシマブはKRAS変異症例では十分な治療効果が得られないことが臨床試験の結果から証明されている。このため、KRAS変異検索は治療効果予測と化学療法選択に重要な意味を持っている。さらにBRAFやPTENなど変異による治療不応例の抽出に関する研究が進んでいる。

一方でセツキシマブに対する治療適応としては免疫染色での EGFR 症例に保険治療対象が限られているにも関わらず、免疫染色での EGFR 発現量とセツキシマブ効果に予後的相関が得られていないことが臨床試験から示されており、現時点では EGFR 発現量がセツキシマブの治療効果を反映するという報告は認められない(Hebbar M et al. Anticancer Drugs. 2006). しかし、KRAS 野生型大腸癌では EGFR 発現量が EGFR を分子標的としたセツキシマブ治療で治療効果判定の鍵となるべきである。この解離現象の背景には免疫染色ではセツキシマブが結合することのできる EGFR のみならず、細胞質や核内に存在する全ての EGFR を検出するため、セツキシマブの標的である EGFR 以外にも検出する偽陽性現象が存在していると考えられる。

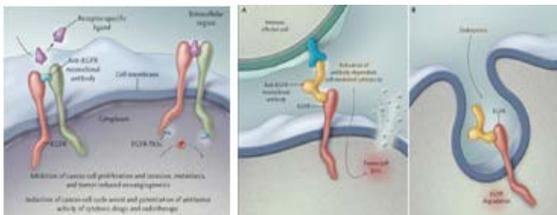
2. 研究の目的

分子標的薬は大腸癌患者の生命予後延長に大きく寄与し、その選択は大腸癌治療戦略において重大な意味を持つ。セツキシマブは細胞外 EGFR にリガンドと競合的に結合して腫瘍増殖シグナル伝達経路を抑制する製剤であり、治療効果を反映する Surrogate marker が切望されている。しかしその機序には未だ不明な部分が多く、KRAS 変異型はセツキシマブ治療の予後不良因子とされているが、治療奏功の Marker は見つけられていない。また、免疫染色で検出された EGFR 発現量とセツキシマブの治療効果に相関がないと報告されている。本研究は、セツキシマブを一次抗体として用いたフローサイトメトリー(FCM)により検出された EGFR 発現量と腫瘍増殖抑制効果の相関および臨床的意義を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株の選定および EGFR 発現量の定量

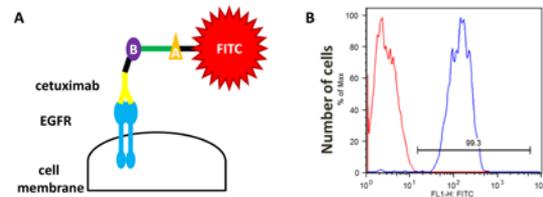
ヒト大腸癌細胞株である Caco-2, WiDR, SW480, HCT116 の 4 種と基底細胞癌細胞株 A431 を対象とすることとした。各細胞株の KRAS, BRAF, PIK3CA の変異の有無を確認し、それぞれの野



生型細胞株を対象に含まれるように調整した。

次に、ビオチン修飾セツキシマブを作成し、これを一次抗体として用いることにより FCM でセツキシマブが結合することのできる

EGFR のみを検出する方法を新しく開発した。この方法を用いて各大腸癌細胞株の EGFR 発現量を定量化し、確認した。



(2) 限界希釈法による EGFR 高発現・低発現サブクローンの作成

限界希釈法により EGFR 発現量の異なる種々のサブクローンを作成した。作成したサブクローンからビオチン修飾セツキシマブを用いて FCM により EGFR の高発現株と低発現株を抽出した。

(3) in vitro における腫瘍増殖抑制試験

作成した EGFR 高発現・低発現サブクローンを用いて腫瘍増殖抑制試験を行った。種々のセツキシマブ濃度をサブクローンに 7 日間投与し、MTT 法を用いて細胞増殖を算出し、セツキシマブの腫瘍増殖抑制効果を評価した。

(4) in vivo における腫瘍増殖抑制試験

免疫不全マウス (nude mouse) の左右の肩に限界希釈法で得られたサブクローンを皮下注射し異種移植モデルを作成した。腫瘍が生着し、腫瘍体積が 100cm³ を超えた時点でセツキシマブを 30mg/kg, 週 1 回投与で開始した。感受性試験を行った。28 日間の腫瘍計測を行った後に、腫瘍を摘出し、セツキシマブ投与による腫瘍増殖抑制効果について評価した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞株の選定および EGFR 発現量の定量

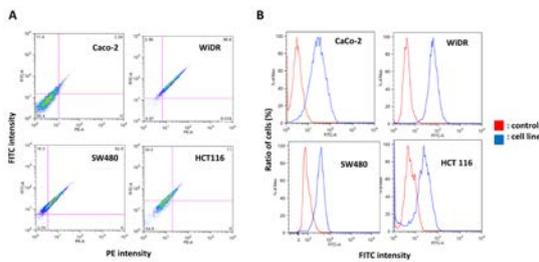
KRAS 変異は SW480(Codon 13D), HCT116(Codon 13D), BRAF 変異は WiDR, PIK3CA 変異は SW480(Exon9), HCT116(Exon20) にみられ、Caco-2 は全て野生型であった。

これまでの報告より、KRAS 変異型ではセツキシマブの効果は大きく減弱することが知られているが、Codon G13D 変異ではセツキシマブの効果がみられることがわかっている。BRAF 変異型でもセツキシマブの効果が減弱することが報告されている。PIK3CA では Exon9 と Exon20 に変異が起こることが報告されているが、Exon9 変異ではセツキシマブの効果に大きな影響を与えず、その反面 Exon20 変異ではセツキシマブの効果がほぼ見られなくなることがわかっている。さらに、EGFR の S492R 変異型ではセツキシマブが EGFR に結合することができなくなることが報告されている。

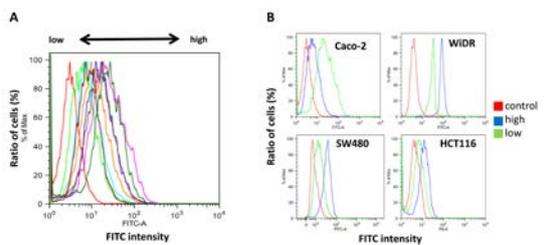
これらの報告より、本研究で選択した大腸癌細胞株では、Caco-2 は全て野生型であり、セツキシマブの効果が高いと予想される細胞株である。さらに、SW480 は KRAS および PIK3CA 変異型であるが、KRAS は Codon 13D 変異であること、PIK3CA は Exon9 変異であることからセツキシマブの効果がある細胞株と考えられる。WiDR は BRAF 変異型であるためセツキシマブ効果の減弱、そして HCT116 は PIK3CA 変異のためセツキシマブ効果が期待できないと予想し、これらの4細胞株を本研究で採用した。

| | Caco-2 | WiDR | SW480 | HCT116 |
|------------------------|-----------|-----------------|------------------|------------------|
| KRAS | Wild-type | Wild-type | Codon G13D | Codon G13D |
| BRAF | Wild-type | Exon 15 (V600E) | Wild-type | Wild-type |
| PIK3CA | Wild-type | Wild-type | Exon 9 (E545K/D) | Exon 20 (H1047R) |
| EGFR ectodomain | Wild-type | Wild-type | Wild-type | Wild-type |

各細胞株の EGFR 発現量を FCM により確認したところ、それぞれに EGFR 発現が認められた。

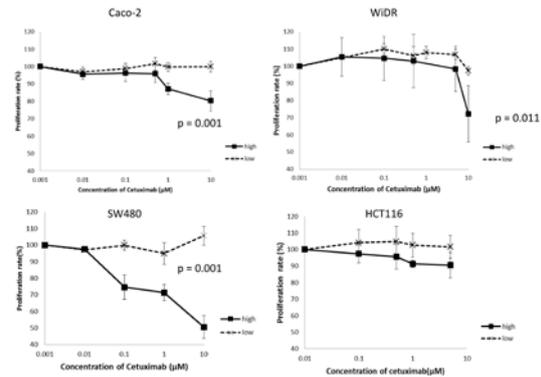


(2) 限界希釈法による EGFR 高発現・低発現サブクローンの作成
限界希釈法により作成したサブクローンの EGFR 発現量を FCM により定量すると図 A のように EGFR 発現量の異なる様々なサブクローンが得られた。これらの中で EGFR 発現量が最も高いものと低いものをそれぞれ抽出し、各細胞株の EGFR 高発現・低発現株とした。図 B が各細胞株における EGFR 発現量の異なるサブクローンの比較である。

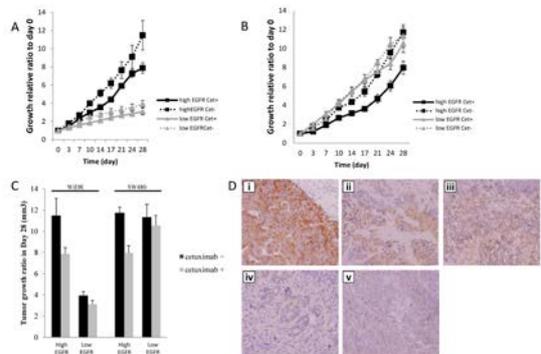


(3) in vitro での腫瘍増殖抑制試験
限界希釈法で作成した EGFR 高発現・低発現

大腸癌細胞にセツキシマブを投与し、腫瘍増殖抑制試験を行った。その結果、セツキシマブの効果が高いと予想して選択した Caco-2 および SW480 では、EGFR 低発現株は高発現株に比して有意に腫瘍増殖抑制効果がみられなかった。セツキシマブ効果の減弱が予想された WiDR でも同様の結果であった。HCT116 はセツキシマブ効果が見られないものとして選択しており、その仮定の通り EGFR 発現量にかかわらず腫瘍増殖抑制効果は乏しかった。



(4) in vivo での腫瘍増殖抑制試験
マウス異種移植モデルを用いた感受性試験では細胞の生着が見られた WiDR および SW480 の2種において行った。WiDR (図 A), SW480 (図 B) とともに EGFR 低発現の腫瘍は高発現のものに比して有意な差を持って腫瘍増殖抑制効果が認められなかった。さらに、図 C にあるように 28 日目の腫瘍体積を比較すると、EGFR 高発現腫瘍においてセツキシマブの腫瘍増殖抑制効果は明らかであった。セツキシマブ投与後の EGFR 発現を免疫染色により確認したところ、すべての腫瘍において EGFR 発現が確認された (図 D)。



(6) 本研究結果からの考察
これまで免疫染色による EGFR 発現とセツキシマブ感受性には相関がないことが報告され、乳癌に対するトラスツズマブとは異なっていた。しかし S492 変異のある EGFR ヘセツ

キシマブが結合しないことが報告され、セツキシマブが作用する EGFR 発現量を定量する必要性が示唆された。セツキシマブ治療におけるバイオマーカーはK-ras 変異の有無のみとされるが、K-ras 野生型でも奏効率が40-60%と報告されており、新たなバイオマーカーの検索が求められている。本研究ではセツキシマブにより検出された EGFR 発現量はセツキシマブ感受性と相関することが示唆され、今後臨床検体を用いた実験で同様の結果を得ることができれば、K-ras 野生型の中でもさらに super-sensitive な症例の抽出が可能となり、薬剤選択に大きな指針を与える可能性があると考えられた。

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 1 件)

Kohei Shigeta, Tetsu Hayashida, Yoshinori Hoshino, Koji Okabayashi, Takashi Endo, Yoshiyuki Ishii, Hiroto Hasegawa, Yuko Kitagawa, Expression of epidermal growth factor receptor detected by cetuximab indicates its efficacy to inhibit in vitro and in vivo proliferation of colorectal cancer cells, PLOS ONE 2013

DOI: 10.1371/journal.pone.0066302

査読あり

[学会発表] (計 3 件)

① AACR/JCA joint conference 2013

Kohei Shigeta,

Expression of EGFR on membrane surface detected by cetuximab itself contributes to the efficacy of cetuximab in colorectal cancer cell, 2013/2/24, Maui, Hawaii

② 日本癌学会総会 2012

茂田 浩平,

大腸癌細胞膜表面 EGFR の発現量と Cetuximab 感受性, 2012 年 09 月 20 日, 札幌 ポスター

③ 日本癌転移学会総会 2012

茂田 浩平,

大腸癌細胞膜表面 EGFR と Cetuximab 感受性の相関, 2012 年 07 月 13, 広島ワークショップ 6-3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂田 浩平 (KOHEI SHIGETA)

慶應義塾大学医学部 助教

研究者番号: 30528790