

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390209

研究課題名(和文) 肺がんの転移と分子標的薬耐性を克服する統合的研究

研究課題名(英文) Study to overcome metastasis and targeted drug-resistance of lung cancer

研究代表者

矢野 聖二 (Yano, Seiji)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：転移巣における分子標的薬耐性機構を解明するために、EGFR変異肺がんおよびALK融合遺伝子陽性肺がん細胞株を用い、がん性胸水、骨病変(骨転移)、脳病変(脳転移)における分子標的薬耐性のin vivoイメージングモデルを確立した。これらのモデルを用い、一つの腫瘍においても複数の因子により耐性が惹起されること、耐性克服には併用療法の副作用に留意した戦略を立てる必要があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanism of targeted drug resistance in metastatic lesions, we established in vivo imaging models for pleural carcinomatosis and bone/brain metastases, which are resistant to targeted drugs, of EGFR mutant or ALK fusion positive lung cancer cell lines. We found that resistant tumors consist of a heterogeneous mixture of functionally distinct cancer cells with different resistant mechanisms. Moreover, our observation indicated that we should be careful for toxicity of combined therapy which overcome targeted drug resistance caused by multiple mechanisms.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：分子標的薬耐性 脳転移 骨転移 がん性胸膜炎

### 1. 研究開始当初の背景

肺がんの分子標的薬はEGFR 変異あるいは EML4-ALK 融合遺伝子を有する肺がん に劇的な効果を示すが、必ず獲得耐性により再発することが次なる問題となっている。また、再発する病巣（ほとんどは転移巣）間で耐性原因が異なることが多く、耐性がんの診断および治療を困難にする大きな要因となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)や ALK 阻害薬に高い感受性を示す肺がん細胞による転移モデルをまず作成する。つぎに、EGFR-TKI や ALK 阻害薬の長期投与による耐性モデルを作成し、分子標的薬耐性が同一個体内で同一の原因でしか生じないのか、複数原因で生じるのかを検討する。最終的には、複数の原因で耐性が生じる場合の耐性原因の診断法や耐性を克服し延命せしめる新しい治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1. EGFR-TKI やALK 阻害薬に高い感受性を示す肺がん細胞を用いた転移モデルの作成

EGFR-TKI に高感受性の肺がん細胞株およびALK 阻害薬に高感受性の肺がん細胞株にGFP およびルシフェラーゼ遺伝子導入し、蛍光/発光により検出可能な細胞を作成する。それらの細胞をSCID マウスに移植する。4~8 週後に蛍光/発光撮影装置による転移細胞の検出およびCT 撮影により原発巣および転移巣形成を評価する。

#### 2. EGFR-TKI 耐性およびALK 阻害薬耐性モデルの作製

上記のモデルを用い、EGFR-TKI あるいは ALK 阻害薬を長期(8~12 週)投与し、獲得耐性により転移巣あるいは原発巣が増大するモデルを作製する。

### 3. 転移巣の耐性原因の解析

耐性化した全ての病巣を摘出し、耐性原因を解析する。EGFR-TKI 耐性ではEGFR の T790M 変異、Met 遺伝子増幅、HGF 過剰発現、小細胞肺がんへの転化、EMT などを検討する。ALK 阻害薬耐性ではALK の C1196Y 変異、ALK 遺伝子増幅、EGFR リガンドの過剰発現などを検討する。これらの解析により、ひとつの個体において単一の原因でしか耐性化しないのか、複数の原因で耐性化するのかを明らかにする。また、既存の耐性原因が検出されない病巣については新たな耐性機構を発見するための解析を加える。

### 4. 複数の原因による耐性を克服する新規治療法の開発

分子標的薬耐性転移モデルにおいて EGFR-TKI+Met-TKI の併用療法、ALK 阻害薬+抗EGFR 抗体の併用療法、Gatekeeper 変異にも有効な新世代型EGFR-TKI やALK 阻害薬などの治療効果を検討する。

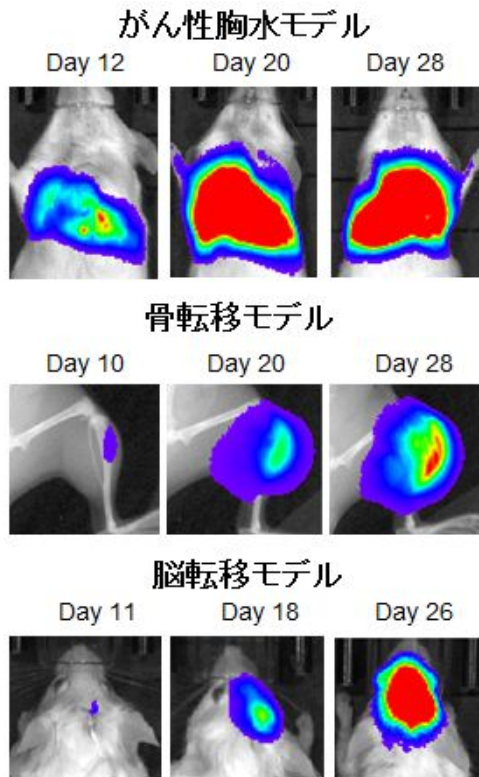
EGFR-TKI としてはゲフィチニブ、エルロチニブに加え不可逆型EGFR-TKI である BIBW2992を使用する。Met-TKI としては ALK とMet の両者の阻害活性を有するクリゾチニブやVEGFR2とMet の阻害活性を有するE7050 を使用する。ALK 阻害薬としてはクリゾチニブを使用する。Gatekeeper 変異にも有効な新世代型EGFR-TKI としては、変異EGFR 選択的阻害薬であるWZ4002を使用する。その他の入手可能な阻害薬についても、入手でき次第検討を行う。

### 4. 研究成果

#### 1. EGFR-TKI やALK 阻害薬に高い感受性を示す肺がん細胞を用いた転移モデルの作成

EGFR-TKI に高感受性の肺がん細胞株およびALK 阻害薬に高感受性の肺がん細胞株にGFP およびルシフェラーゼ遺伝子導入し、蛍光/発光により検出可能な細胞を作成

した。それらの細胞をSCID マウスに移植し、がん性胸水、骨病変（骨転移）、脳病変（脳転移）を蛍光で検出し定量できるイメージングモデルを確立した。



## 2. EGFR-TKI 耐性およびALK 阻害薬耐性モデルの作製

上記のモデルを用い、ALK 阻害薬を長期(8~12 週)投与し、獲得耐性により転移巣あるいは原発巣が増大するモデルを作製した。

## 3. 転移巣の耐性原因の解析

がん性胸水モデルにおいて ALK 阻害薬の獲得耐性となった胸水中から、ALK 阻害薬耐性 ALK 肺がん細胞株を樹立した。種々の検討の結果、側副経路の活性化や上皮間葉移行(EMT)により耐性化している細胞が混在していることが明らかとなった。

## 4. 複数の原因による耐性を克服する新規治療法の開発

Gatekeeper変異とHGFによる側副経路活性化という2つの原因によりEGFR-TKI耐性となっているEGFR変異肺癌モデルにおいて、Gatekeeper 変異にも有効な新世代型

EGFR-TKI (アファチニブやWZ4002)との併用治療を行った。アファチニブ+クリゾチニブ治療もWZ4002+クリゾチニブ治療も上記耐性腫瘍の増大を抑制し、著明な耐性克服効果を示した。ところが、アファチニブ+クリゾチニブ治療では下痢や著明な体重減少をきたした。一方、WZ4002+クリゾチニブ治療では、下痢や体重減少などの副作用は出現しなかった。

これは、アファチニブが Gatekeeper 変異に加え野生型 EGFR も抑制するため、クリゾチニブが MET を阻害した場合、宿主の EGFR と MET という生体の恒常性維持に重要な2つの経路が同時に長期阻害されたために、重篤な副作用が出現したと考えられた。一方、WZ4002 は Gatekeeper 変異は阻害するものの野生型 EGFR は阻害しないため、クリゾチニブが MET を阻害しても宿主の野生型 EGFR によるシグナルは保たれたため、重篤な副作用が出現しなかったと考えられた。

以上より、複数の因子により惹起された耐性の克服を目指した治療においては、副作用も考慮した戦略を立てる必要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 22 件)

1. Nanjo S, Nakagawa T, Takeuchi S, Kita K, Fukuda K, Nakada M, Uehara H, Nishihara H, Hara E, Uramoto H, Tanaka F, Yano S. *In vivo* imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line. **Cancer Sci** 2015; 106:244-52. 査読有り
2. Ebi H, Oze I, Nakagawa T, Ito H, Hosono S, Matsuda F, Takahashi M, Takeuchi S, Sakao Y, Hida T, Faber AC, Tanaka H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Yano S, Matsuo K. Lack of association between the BIM deletion polymorphism and the risk of lung cancer with and without EGFR mutations. **J Thorac Oncol**, 2015; 10:

- 59-66. 査読有り
3. Li Q, Wang W, Machino Y, Yamada T, Kita K, Oshima M, Sekido Y, Tsuchiya M, Suzuki Y, Nan-ya K, Iida S, Nakamura K, Iwakiri S, Itoi K, Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibody against malignant pleural mesothelioma. **Cancer Sci** 2015; 106:102-7. 査読有り
  4. Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo N, Yamada T, Ebi H, Zhao Lu, Yasumoto K, Matsumoto M, Yonekura K, Yano S. TAS-115, a novel inhibitor of VEGFR-2 and Met, combined with erlotinib prevented re-growth of HGF-triggered erlotinib resistant lung cancer harboring EGFR mutation. **J Thorac Oncol** 2014 9;775-83. 査読有り
  5. Tanimoto A, Yamada T, Takeuchi S, Ebi H, Kita K, Matsumoto K, Yano S. Receptor ligand-triggered resistance to alectinib and its circumvention by Hsp90 inhibition in EML4-ALK lung cancer cells. **Oncotarget** 2014; 5:4920-8. 査読有り
  6. Ebi H, Costaa C, Fabera AC, Nishtalaa M, Kotanib H, Jurica D, Pellea PD, Songa Y, Yano S, Mino-Kenudsona M, Benesa CH, Engelman JA. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. **Proc Natl Acad Sci USA** 2013; 110:21124-9. 査読有り
  7. Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. **J Immunol** 2013;190:6239-49. 査読有り
  8. Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Novel PI3K-mTOR inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib-resistance of EGFR mutant lung cancer cells triggering by HGF. **Int J Cancer**, 2013; 133:505-13. 査読有り
  9. Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y. Surfactant protein a suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. **Am J Pathol.** 2013 182: 1843-53. 査読有り
  10. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, Ishikawa D, Sato M, Hasegawa Y, Sekido Y, Yano S. EGFR-TKI resistance due to *BIM* polymorphism can be circumvented by in combination with HDAC inhibition. **Cancer Res** 2013 73:2428-34. 査読有り
  11. Ishikawa D, Takeuchi S, Nakagawa T, Sano T, Nakade J, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Nakamura T, Matsumoto K, Kagamu H, Yoshizawa H, Yano S. mTOR inhibitors control erlotinib-resistance of *EGFR* mutant lung cancer cells triggered by HGF. **PLoS ONE**, 2013; 8(5):e62104. 査読有り
  12. Enkhbaatar Z, Terashima M, Oktyabri D, Tange S, Ishimura A, Yano S, Suzuki T. KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family. **Cell Cycle** 2013;12: 2100-12. 査読有り
  13. Zhao L, Yasumoto K, Kawashima A, Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Matsumoto K, Yonekura K, Yoshie O, Yano S. Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. **Cancer Sci** 2013;104:1640-6. 査読有り
  14. Nanjo S, Yamada T, Nishihara H, Takeuchi S, Sano T, Nakagawa T, Ishikawa D, Zhao L, Ebi H, Yasumoto K, Matsumoto K, Yano S. Ability of the Met kinase inhibitor crizotinib and new generation EGFR inhibitors to overcome resistance to EGFR inhibitors. **PLoS ONE** 2013; 8(12): e84700. 査読有り

15. Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Scaffold Aki1, a novel therapeutic target for lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. **Oncogene**, 2013;32:4427-35. 査読有り
  16. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S. E7050, a Met kinase inhibitor, reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in *EGFR* mutant lung cancer cells. **Clin Cancer Res**, 2012;18:1663-71. 査読有り
  17. Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Yano S. Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis. **J Thorac Oncol** 2012; 7:1078-85. 査読有り
  18. Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Yano S. Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor-resistance in EML4-ALK lung cancer cells. **Clin Cancer Res**, 2012; 18:3592-602. 査読有り
  19. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in *EGFR* mutant lung cancer. **Am J Pathol**, 2012; 181:1034-43. 査読有り
  20. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, Yano S. Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor to overcome erlotinib resistance in *EGFR* mutant lung cancer. **Mol Cancer Ther**, 2012 11:2149-57. 査読有り
  21. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Takata M, Sako T, Yamaguchi K, Kinoshita N, Watanabe M, Touge H, Makino H, Igishi T, Hamada H, Yano S, Shimizu E. Therapeutic antitumor efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody, cetuximab, against malignant pleural mesothelioma. **Int J Oncol**. 2012; 41:1610-8. 査読有り
  22. Uramoto H, Yamada T, Yano S, Kondo N, Hasegawa S, Tanaka F. Prognostic value of acquired resistance-related molecules in Japanese patients with NSCLC treated with an EGFR-TKI. **Anticancer Res**. 2012;32:3785-90. 査読有り
- [学会発表](計 42件)
1. 15th Annual Targeted Therapies of The Treatment of Lung Cancer. Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibody BIW-8962 against malignant pleural mesothelioma. 2015.02. 19 Hotel Fairmont Miramar, Santa Monica, USA.
  2. Joint International Symposium on TGF-Family and Cancer. Yano S. Bone microenvironment confers Hsp90 inhibitor resistance in the metastatic small cell lung cancer. 2015.01.13 International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA.
  3. 矢野聖二. Resistance to EGFR-TKI in EGFR mutant lung cancer. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日 パシフィコ横浜
  4. 矢野聖二. 脳転移：腫瘍内科の視点から. 第52回日本癌治療学会学術集会. 2014年8月29日 パシフィコ横浜.
  5. 矢野聖二. 肺がんの骨転移のメカニズムと分子標的治療. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会. 2014年7月10日 金沢市文化ホール.

6. 矢野聖二. 肺がんの分子標的治療薬耐性の機構解明と耐性克服治療開発. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2014年6月26日 ホテルメトロポリタン仙台.
7. 矢野聖二. 日本における腫瘍内科教育の今後～分子標的薬体制の克服絵を目指した研究を通して～ 第111回日本内科学会講演会. 2014年4月11日 東京国際フォーラム.
8. Third AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer. Yano S. Mechanisms of EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer and its therapeutic strategy. 2014 01.06 San Diego Marriott & Marina Hotel, USA.
9. IASLC 15th World Conference on Lung Cancer. Yano S. Resistance to EGFR-TKIs. 2013.10.28 Sydney Exhibition & Convention Centre, Australia.
10. American Thoracic Society 2013. (Meet the Professor) Yano S. Novel acquired resistance mechanisms of molecular-targeted therapy for lung cancer. 2013.05.20 Pennsylvania Convention Center, USA.

〔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

<http://syuyounika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

矢野 聖二 (YANO SEIJI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

### (2)研究分担者

H25年度

衣斐 寛倫 (EBI HIROMICHI)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：00645145

H26年度

大坪 公士郎 (OHTSUBO KOSHIRO)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：60361987

### (3)連携研究者

該当なし