

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591165

研究課題名(和文) HER2を標的とした多剤耐性小細胞肺癌の分子標的治療

研究課題名(英文) HER2 target therapy for multidrug-resistant small cell lung cancer

研究代表者

木島 貴志 (KIJIMA, TAKASHI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90372614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌(SCLC)の難治性の原因となる多剤耐性に深く関わる分子としてHER2を同定した。HER2チロシンキナーゼ阻害剤lapatinibは薬剤排泄ポンプ(ABCB1,ABCG2)の機能を抑制することで抗癌剤感受性を回復させた。一方、抗HER2抗体trastuzumabは抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を増強させることで抗腫瘍効果を発揮した。さらに、HER2陽性抗癌剤耐性再発SCLC患者2名に対して先進医療としてtrastuzumabによる治療を実施し、その有効性と安全性を確認した。これらの知見は、HER2のSCLCにおける多剤耐性克服のための治療標的としての可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Small cell lung cancer (SCLC) is highly malignant because it easily acquires multidrug resistance. We have found that HER2 is upregulated on the cell surface of SCLC cells when they become multidrug-resistant. A HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib recovered the sensitivity of chemoresistant SCLC cells by inhibiting the function of drug-efflux pumps ABCB1 and ABCG2 which were expressed on them. On the other hand, an anti-HER2 antibody trastuzumab exerted significant antitumor activity toward HER2-upregulated chemoresistant SCLC cells mainly via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) mechanism. Moreover, we treated two patients with HER2-positive relapsed SCLC by trastuzumab plus irinotecan combination therapy and confirmed the antitumor efficacy and safety in this clinical setting. These findings indicate the possibility of HER2 as therapeutic target to overcome multidrug-resistance of SCLC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小細胞肺癌 多剤耐性 分子標的治療 HER2 ラパチニブ トラスツズマブ

1. 研究開始当初の背景

癌死亡原因の第1位である肺癌の約15%を占める小細胞肺癌(SCLC)は、最も予後不良な組織型である。その最大の原因は、初回抗癌剤治療にはよく反応するものの容易に多剤耐性(MDR)を獲得し再発するという独特の生物学的特性にある。現在、再発 SCLC に対する有効な治療法の報告は確立されていない。それ故、SCLC の予後の改善に寄与し得る新しい分子標的治療法の開発が待ち望まれる。HER2 は進展型 SCLC の予後不良因子であり、欧米人では約 10%に発現している(Int J Cancer 2001;92:474-9)が、日本人での報告はない。また、SCLC における HER2 を標的とした治療研究の報告もない。

2. 研究の目的

最近我々は受容体型チロシンキナーゼ HER2 が SCLC の MDR に関与することを見出した。本研究では SCLC における HER2 の MDR 機序における分子生物学的な役割を明らかにするとともに、HER2 を標的とした分子標的治療が MDR 克服をもたらすかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) HER2チロシンキナーゼ阻害剤lapatinibによる抗癌剤耐性克服の検討

HER2 の発現を種々の SCLC 株で検討する。

Lapatinib が HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 株の抗癌剤感受性を回復できるかどうかを検討する。

HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 株における薬剤排泄ポンプ(ABCB1, ABCG2)の発現を確認する。

Lapatinib の薬剤排泄ポンプ機能阻害効果を rhodamine(ABCB1)と Hoechst(ABCG2)の排泄を指標に解析する。

HER2 阻害を介した lapatinib のポンプ機能阻害機序の有無を siRNA による HER2 ノックダウンにより評価し、その経路に関わる分子を同定する。

Lapatinib が in vivo で HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 株の耐性を克服できるかどうかをマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討する。

(2) 抗HER2抗体trastuzumabによる抗癌剤耐性克服の検討

Trastuzumab単剤のHER2陽性抗癌剤耐性 SCLC に対する抗腫瘍効果を検討する。

Trastuzumabの抗腫瘍効果発揮にはADCCを介した免疫機序が重要である(Clynes et al. Nat Med 6:443-6,2000)。エフェクターとしてのNK細胞の存在下でtrastuzumabの抗腫瘍効果が増強するかどうかを検討する。

Trastuzumabによる効率よいADCC活性誘導に必要な分子を同定し、その阻害によるADCC活性の変化を解析して。

Trastuzumabによる薬剤耐性克服効果をマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討する。

(3) ヒトへの臨床応用

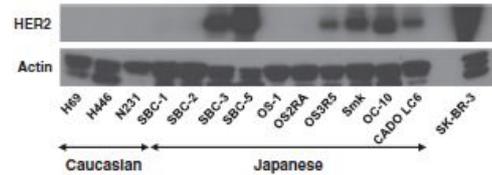
基礎実験で得られた知見をもとに、HER2 陽性

抗癌剤耐性再発 SCLC 患者を対象に、先進医療として trastuzumab を用いた治療を行い、その効果と安全性を評価する。

4. 研究成果

(1) HER2チロシンキナーゼ阻害剤lapatinibによる抗癌剤耐性克服の検討

SCLC における HER2 発現の人種差と耐性化に伴う発現増強

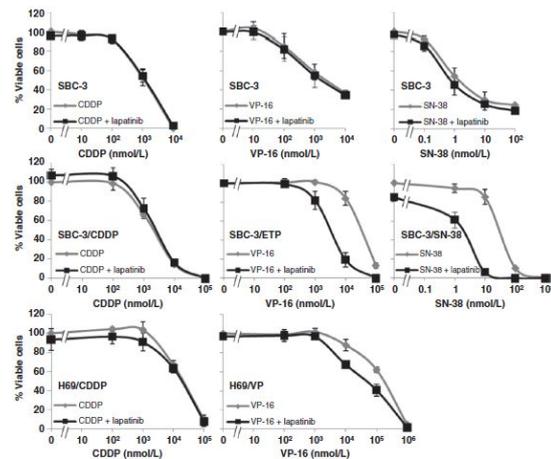


HER2 は、caucasian 由来 SCLC 株には発現を認めなかったが(0/3)、日本人由来株では高頻度に発現を認め(6/10)、人種差の可能性を示唆した。SK-BR-3 は HER2 陽性コントロールの乳癌細胞株。



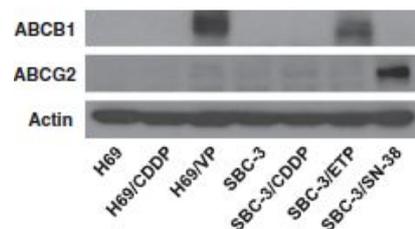
もともと HER2 陽性の SBC-3 細胞由来耐性株においてのみ発現の増強を認めた。SBC-3/SN-38 は irinotecan(CPT-11)耐性株。

Lapatinib による耐性株の感受性回復



Lapatinib 単剤ではいずれの細胞株においても増殖抑制効果を発揮しなかったが(data not shown)、HER2 陽性耐性株 SBC-3/ETP と SBC-3/SN-38 で著明に、HER2 陰性耐性株 H69/VP でも有意に薬剤感受性を回復させた。

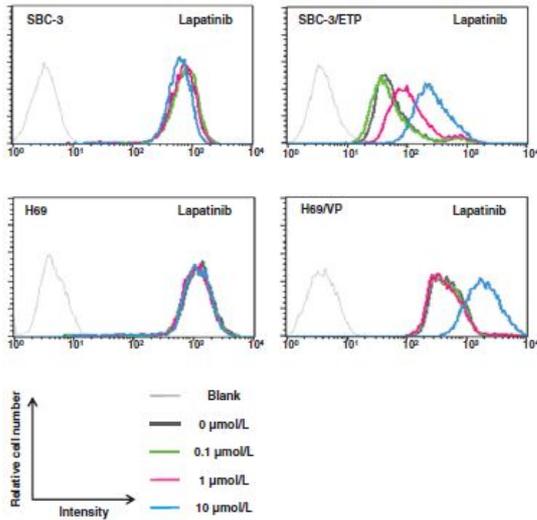
耐性株における薬剤排泄ポンプの発現



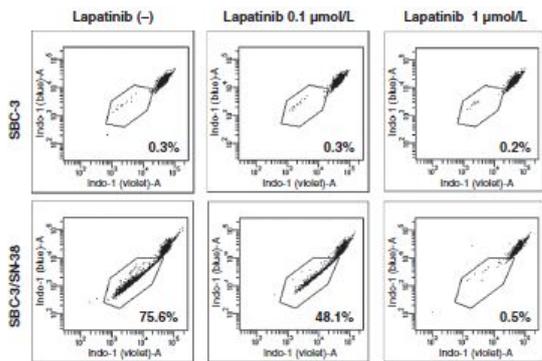
Etoposide 耐性株 (H69/VP, SBC-3/ETP) では ABCB1 が、irinotecan 耐性株 (SBC-3/SN-38) では ABCG2 が発現していた。

以上の結果から、lapatinib は薬剤排泄ポンプを発現し耐性化した SCLC 細胞株の感受性を回復させ、その効果は HER2 発現株でより著明に見られることがわかった。

### Lapatinib の薬剤排泄ポンプ機能阻害

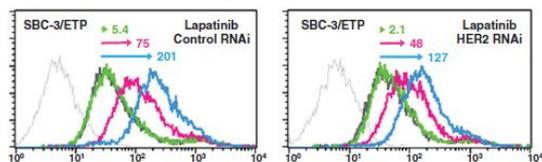


Lapatinib による ABCB1 のポンプ機能阻害効果は、HER2 陽性株 (SBC-3/ETP) では臨床的に到達可能な低濃度 (1 μM) で発現したが、HER2 陰性株 (H69/VP) では高濃度 (10 μM) でしか発現しなかった。

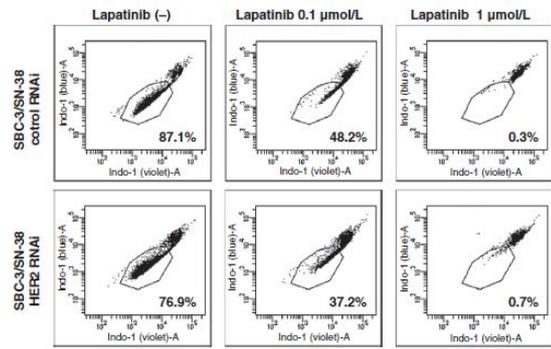


一方、lapatinib は ABCG2 のポンプ機能を低濃度 (1 μM) でほぼ完全に阻害した。

Lapatinib の薬剤排泄ポンプ機能阻害における HER2 の関与

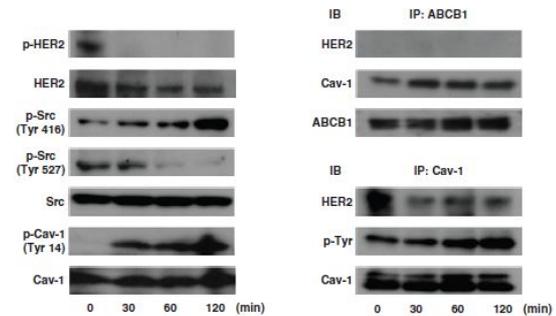


HER2 をロックダウンすることにより、SBC-3/ETP における lapatinib の ABCB1 阻害効果は減弱した。

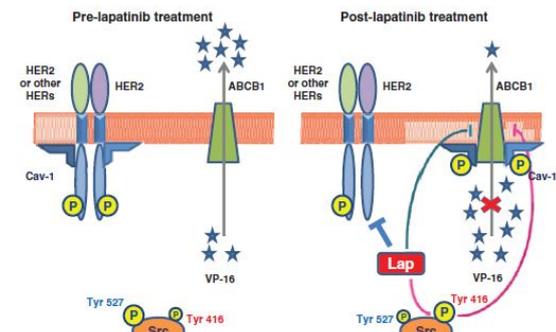


一方、SBC-3/SN-38 における ABCG2 の阻害効果は影響を受けなかった。

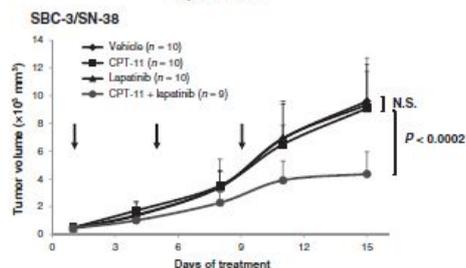
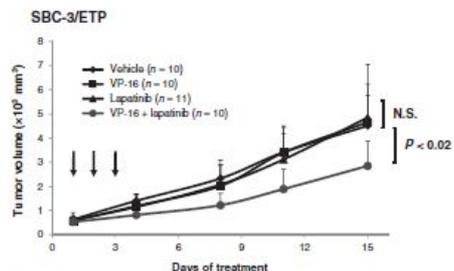
以上より、ABCB1 阻害に関しては、HER2 阻害を介した経路が存在することが示唆された。



Lapatinib による HER2 阻害は、Src の活性化 (Tyr 416 のリン酸化と Tyr 527 の脱リン酸化) および caveolin-1 (Cav-1) のリン酸化を誘導し、Cav-1 の HER2 からの解離と ABCB1 への結合増強をもたらした。シエマを下図に示す。



In vivo における lapatinib と抗癌剤の併用治療効果



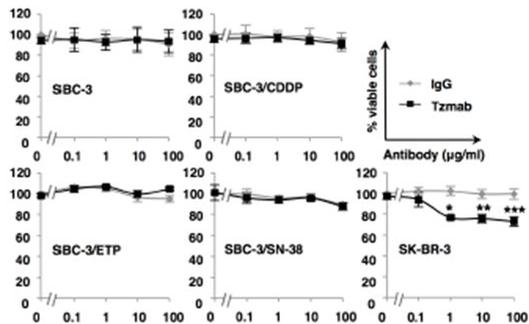
ヌードマウスの皮下に接種した耐性株の腫瘍は、抗癌剤単独治療群または lapatinib 単独治療群では増殖を続けたが、両者の併用群においてのみ有意に縮小した。

以上の結果から、HER2 は日本人の SCLC に高率に発現している可能性がある(人種差?)こと、抗癌剤耐性化に伴いその発現が増強すること、HER2 阻害剤 lapatinib はによる HER2 シグナル抑制のみでは耐性が克服できないことがわかった。しかし、lapatinib は耐性株に新たに発現する薬剤排出ポンプの機能を阻害することで、もとの抗癌剤に対する感受性を回復させること、特に ABCB1 阻害においては HER2 阻害を介した経路が存在することが今回新たにわかった。Lapatinib と抗癌剤の併用治療の SCLC における耐性克服の可能性が示唆された。

以上の成果は、英文雑誌 Mol Cancer Ther. 2012;11(4):830-41. に報告した。

## (2) 抗HER2抗体trastuzumabによる抗癌剤耐性克服の検討

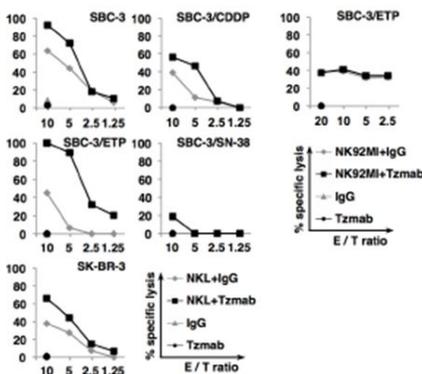
Trastuzumab 単剤の HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC に対する抗腫瘍効果



Trastuzumab (Tzmab) 単剤は HER2 陽性 SCLC に対しては全く抗腫瘍効果がなく、HER2 強陽性乳癌細胞株 (SK-BR-3) に対してもわずかに抗腫瘍効果を示すのみであった。

さらに、Tzmab による HER2 の下流シグナル阻害への影響をリン酸化抗体を用いた免疫ブロット法で検討したが、SK-BR-3 においてもその影響はごくわずかであり、抗腫瘍効果のメインの機序ではなかった (data not shown)。

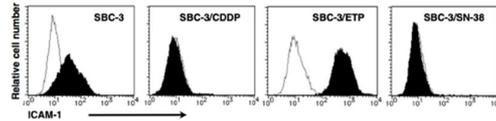
Trastuzumab の抗腫瘍効果発揮における ADCC 活性の重要性



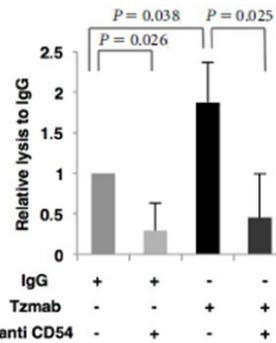
Tzmab は HER2 陽性 SCLC および乳癌 (SK-BR-3) 細胞株に対して、Fc 受容体陽性 NK 細胞株

(NLK) 存在下では種々の程度の抗腫瘍効果を発揮したが、Fc 受容体陰性 NK 細胞株 (NK92MI) 存在下では全く無効であった。以上より、Tzmab の抗腫瘍効果発現には ADCC 活性の誘導が重要であることが示唆された。

Trastuzumab による ADCC 活性増強における ICAM-1 の重要性

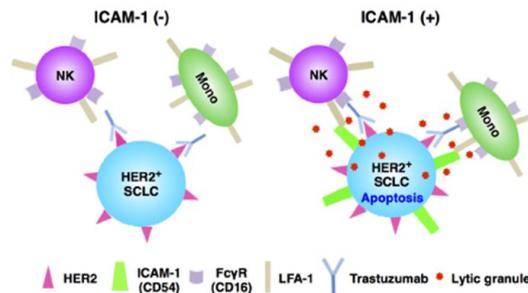


Tzmab による ADCC 活性の程度は SCLC 細胞上の ICAM-1 発現レベルと相関していた。

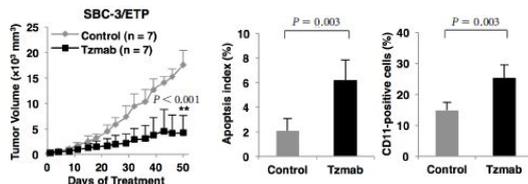


ICAM-1 (CD54) 強陽性 SBC-3/ETP 細胞では ICAM-1 抗体により Tzmab による ADCC 増強効果がキャンセルされた。

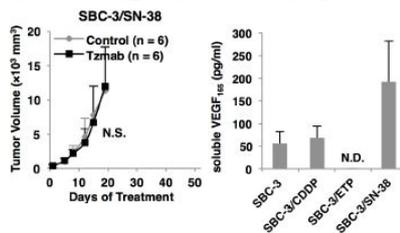
以上より、Tzmab による ADCC 活性増強には、SCLC 細胞上の ICAM-1 の発現が重要であることが明らかとなった。シエーマを下図に示す。



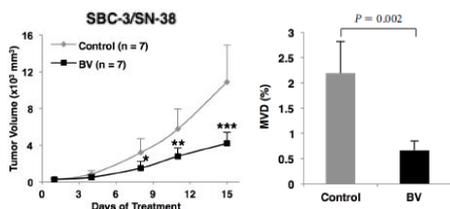
Trastuzumab のマウス皮下移植 HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 腫瘍に対する抗腫瘍効果



Tzmab 治療は SBC-3/ETP 腫瘍の増大を有意に抑制した。また、組織学的には、SCLC 細胞のアポトーシス増加と腫瘍内への CD11b 陽性免疫担当細胞の浸潤増加が見られた。

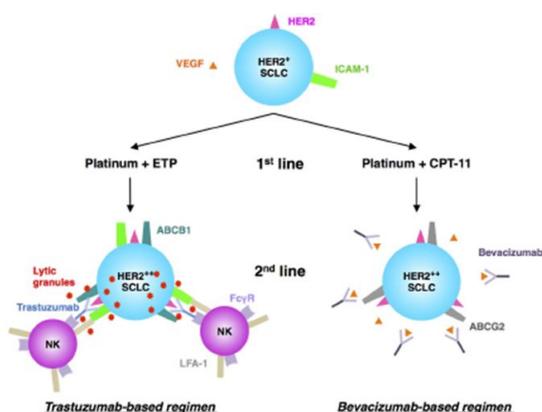


一方、SBC-3/SN-38 腫瘍に対して Tzmab は無効で、その耐性機序として VEGF 産生亢進が原因であった。



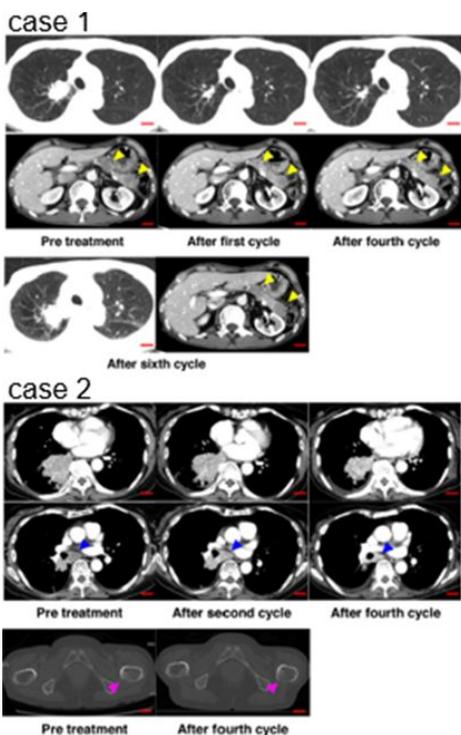
この耐性は抗 VEGF 抗体 bevacizumab (BV) 治療により克服され、腫瘍内血管密度 (MVD) は有意に低下した。

以上の結果から、HER2 陽性 SCLC が初回治療に耐性化して HER2 発現が増強した場合、Tzmab や BV による耐性克服治療が有望であることが示唆された。シエマを下図に示す。



以上の成果は、英文雑誌 Sci Rep. 2013;3:2669. に報告した。

(3) Trastuzumab のヒト SCLC への臨床応用  
再発 SCLC 患者 2 名を対象に、先進医療として trastuzumab 併用療法を実施した。



2 例とも有効で特記すべき重篤な有害事象も認めず、安全に施行できた。

この成果は、英文雑誌 Lung Cancer. 2015;87(3):321-5. に報告した。

### 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 3 件)

南 俊行, 木島貴志, 河面 聡, 長友 泉 他、HER2 as therapeutic target for overcoming ATP-binding cassette transporter-mediated chemoresistance in small cell lung cancer、Molecular Cancer Therapeutics. 査読有, Vol. 11(4), (2012), 830-841.  
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0884.

南 俊行, 木島貴志, 河面 聡, 長友 泉 他、Overcoming chemoresistance of small-cell lung cancer through stepwise HER2-targeted antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and VEGF-targeted antiangiogenesis. Scientific Reports. 査読有, Vol.3, (2013), 2669.  
doi: 10.1038/srep02669.

甲原雄平, 南 俊行, 木島貴志, 長友 泉 他、Favorable response to trastuzumab plus irinotecan combination therapy in two patients with HER2-positive relapsed small-cell lung cancer. Lung Cancer. 査読有, Vol.87(3), (2015), 321-325.  
doi: 10.1016/j.lungcan.2015.01.003.

[学会発表](計 7 件)

南 俊行, 木島貴志, 河面 聡, 長友 泉 他、HER2 as therapeutic target for overcoming ATP-binding cassette transporter-mediated chemoresistance in small cell lung cancer、第 103 回米国癌学会 (AACR) 年次総会、2012.04.01、シカゴ (米国)

南 俊行, 木島貴志, 河面 聡, 長友 泉 他、Molecular targeting therapy to overcome chemoresistance in small cell lung cancer、第 71 回日本癌学会学術総会、2012.09.19、札幌

南 俊行, 木島貴志, 河面 聡, 長友 泉 他、分子標的治療による小細胞肺癌の抗癌剤耐性の克服、第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013.06.13、京都

南 俊行, 木島貴志, 長友 泉 他、Targeting stepwise HER2 and VEGF can overcome multidrug resistance in small-cell lung cancer、第 105 回米国癌学会 (AACR) 年次総会、2014.04.08、サンディエゴ (米国)

甲原雄平,南 俊行,木島貴志,長友 泉 他、  
Trastuzumab-based chemotherapy for  
HER2-positive refractory relapsed  
small-cell lung cancer (from bench to  
bed side)、第 12 回日本臨床腫瘍学会学  
術集会、2014.07.19、福岡

森村 治,木島貴志,南 俊行 他、EphA2  
レセプター阻害はセネッセンス誘導を介  
して小細胞肺癌細胞の増殖を抑制する、  
第 73 回日本癌学会学術総会、2014.09.25、  
横浜

南 俊行,甲原雄平,木島貴志,長友 泉 他、  
HER2 陽性再発小細胞肺癌に対する  
irinotecan + trastuzumab 併用療法 (基  
礎研究から臨床応用まで)、第 55 回日本  
肺癌学会学術集会、2014.11.14、京都

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木島 貴志 (KIJIMA TAKASHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90372614

### (2) 研究分担者

長友 泉 (NAGATOMO IZUMI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10570583

河面 聡 (KOHMO SATOSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・招聘教員  
研究者番号：40625670

南 俊行 (MINAMI TOSHIYUKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00705113

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：