

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591182

研究課題名(和文)非喫煙者肺癌モデルを用いた有効な分子標的薬剤の選択と作用機序の解明

研究課題名(英文)Effects of molecular-targeted drugs on nonsmoking-related lung cancer models

研究代表者

瀧川 奈義夫(Takigawa, Nagio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60325107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)耐性肺癌細胞株およびマウスモデルを用いて各種分子標的薬剤(mTOR阻害剤、JAK2/STAT3阻害剤、EGFRと血管新生の両阻害剤)の有効性を示した。また、第2世代EGFR-TKIであるアファチニブは、EGFR遺伝子改変マウスにおいてゲフィチニブよりも生存期間を延長した。T790Mを有する肺癌に対してもアファチニブと血管新生阻害剤の併用が有効性が示唆された。さらには、SRCを介したERKへのバイパスシグナルを有する新規EGFR-TKI耐性機序を発見し、その耐性株ではSRC阻害薬の併用によりゲフィチニブ感受性が回復することを証明した。

研究成果の概要(英文)：EGFR mutations are more frequently observed in non-smokers and adenocarcinoma patients. The majority of EGFR mutant lung cancers initially sensitive to EGFR-TKI become resistant to these agents within 1 year. To overcome EGFR-TKI resistance mechanisms, we have studied using EGFR-TKI resistant lung cancer cell lines, xenograft models, and EGFR-transgenic mice. mTOR inhibitor, JAK2/STAT3 inhibitor, and EGFR/VEGFR dual inhibitor were all effective. Next, second-generation EGFR-TKI, afatinib, was more potent than gefitinib and the combination of afatinib with bevacizumab efficiently suppressed resistant tumors. Furthermore, we established a novel gefitinib-resistant lung cancer cell line and found that gefitinib substantially suppressed the EGFR signaling pathway, whereas ERK was reactivated, dual inhibition of EGFR and SRC restored gefitinib sensitivity. In conclusion, our results indicate that the molecular target drugs may be a potent strategy to overcome the EGFR-TKI resistance.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR mTOR JAK2 STAT3 肺癌 薬剤耐性 遺伝子改変マウス 血管新生

1. 研究開始当初の背景

肺癌は喫煙が主たる原因とされるが、日本の肺癌患者は男性の約40%、女性の約80%が非喫煙者となっている。非喫煙者肺腺癌の50-60%に上皮性成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異が認められている。この遺伝子は発癌とその進展に関与しており、それらに対してゲフィチニブなどのEGFRチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の有用性が示されてきた。しかしながら、その奏効期間は平均約1年で耐性となるため新たな治療法の開発が望まれている。我々は、EGFR遺伝子改変マウスを開発し、その進展にはEGFR下流のJAK2/STAT3やAKT/mTOR経路の活性化、および血管新生が関与していることを報告してきた。

2. 研究の目的

活性型EGFR遺伝子変異肺癌細胞株、異種移植モデル、およびEGFR遺伝子改変マウスにおける、各種分子標的薬剤とシグナル伝達機構を解析し、EGFR-TKI耐性解除を試みる。

3. 研究の方法

1) EGFR遺伝子変異細胞株

EGFR-TKIの耐性株は、PC- α EGFR変異 exon 19欠失)を親株として当科で樹立された4つの耐性株RPC-9 (T790M)、PC-9/Van-R (T790M + MET増幅 + HGF増幅)、PC-9/ER α (JAK2/STAT3発現増強) および PC-9/GR (SRC発現増強) を用いる。薬剤はJAK2/STAT3阻害剤 (JSI-124, AZD1480)、EGFRとVEGFRの両阻害剤 (バンドタニブ)、第2世代EGFR-TKI (アファチニブ)、SRC阻害剤 (ダサチニブ)、mTOR阻害剤 (エベロリムス)を使用する。細胞増殖抑制はMTTアッセイで評価する。EGFRシグナル関連蛋白はWestern blottingで検出する。

2) 異種移植モデル

BALB/cAJcl-nu雄5週齢のヌードマウスを2週間予備飼育した後、各腫瘍細胞株を2x10⁶個ずつ皮下投与し、異種移植モデルを作製する。約2週間後より腫瘍が確認されるので、腫瘍が0.05cm³になったところで、3群に分け、プラセボ、各種薬剤 (低用量と高用量) を投与する。飼育中、腫瘍径の測定を行い、6週間観察する。2週毎に各群2匹ずつsacrificeを行う。組織をホルマリン固定しパラフィン包埋を行い、検体の連続切片を作成しHE染色および免疫組織染色とWestern blottingで蛋白発現を確認する。

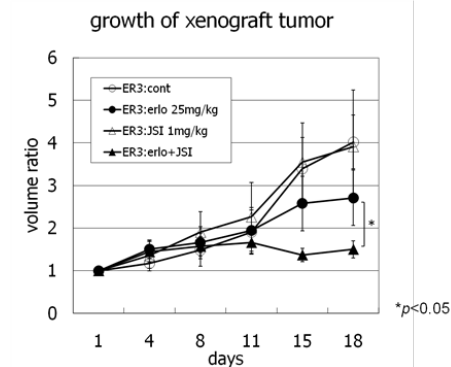
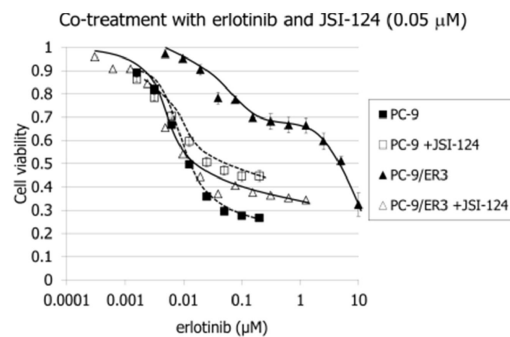
3) 遺伝子改変マウス

exon 19欠失とexon 21 L858Rの2系統のEGFR遺伝子改変マウスを用いて、各種薬剤を投与し発癌抑制効果を検討する。マウス3週齢各系統をコントロール群と薬剤投与群とする。1週毎に各群のマウスの体重測定を行い、全身状態を観察する。10週後 (15週齢) にsacrificeし、表面から肺腫瘍数と腫瘍サ

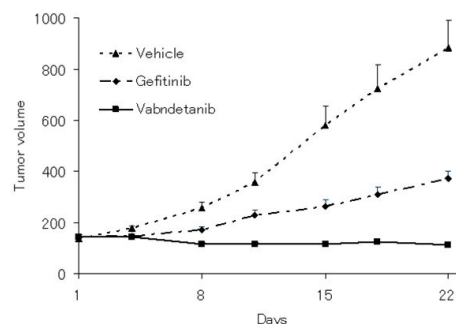
イズを測定する。腫瘍組織はホルマリン固定パラフィン包埋として保存し、EGFR関連蛋白および新生血管の解析を行う。

4. 研究成果

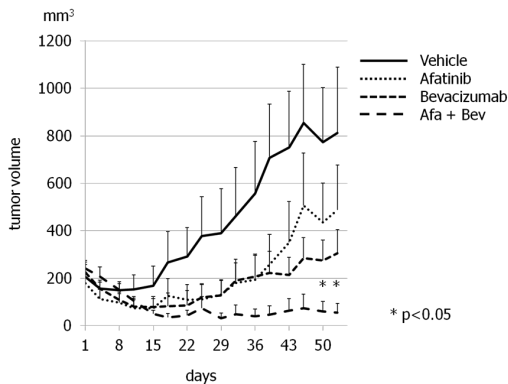
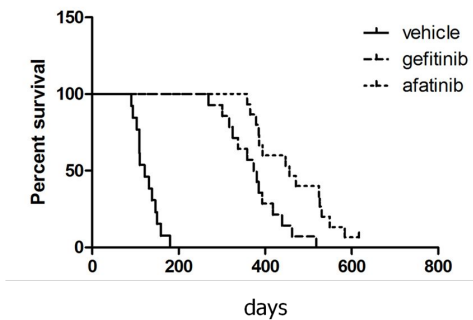
1) PC-9/ER3では、非受容型チロシンリン酸化酵素であるJAK2の活性化が認められ、エルロチニブによりリン酸化EGFRは抑制されたものの、EGFR下流シグナルのAKTは不活化されなかった。JAK2阻害剤であるJSI-124とエルロチニブの併用によりPC-9/ER3のJAK2並びにAKTの活性化が抑制され、エルロチニブに対する感受性の回復が得られた (図上)。siRNAでJAK2を抑制することでも同様の知見を得た。また、マウスの異種移植モデルを用いてJSI-124とエルロチニブ併用によりPC-9/ER3の有意な腫瘍縮小効果も示した (図下)。これらの結果は、JAK2の活性化がエルロチニブの獲得耐性に部分的に関与していることが示唆された。



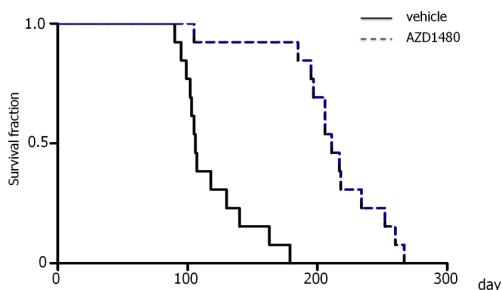
2) PTEN欠失のEGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞株を用いた異種移植モデルではゲフィチニブと比較してバンドタニブで明らかな腫瘍抑制効果を認めた (図)。EGFR遺伝子変異を有するPTEN欠失肺癌細胞株においてバンドタニブは有用であることが示唆された。



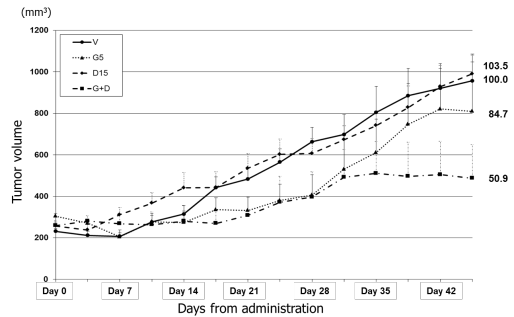
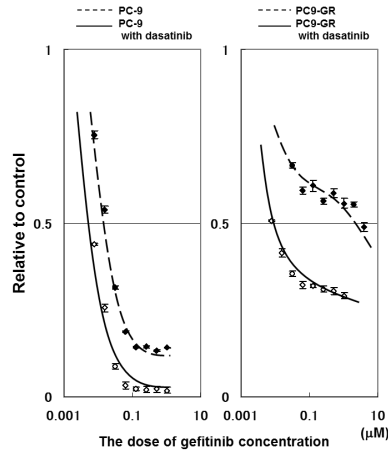
3) exon 19 欠失 EGFR 遺伝子改変マウスに対して、アファチニブとゲフィチニブをそれぞれ4週間投与したところ、アファチニブ投与群において腫瘍は少ない傾向にあった。病理組織像ではゲフィチニブ投与群で明らかな結節腫瘍の残存が認められた。生存期間を比較したところ、アファチニブはゲフィチニブよりも生存期間を有意に延長した(図上)。EGFR-TKI 耐性細胞株の異種移植モデルでは、アファチニブとベバシズマブの併用投与は、各単剤投与よりも強い抗腫瘍効果を示した(図下)。アファチニブはゲフィチニブよりも有用であり、耐性に対してもベバシズマブとの併用が有用であることが示唆された。



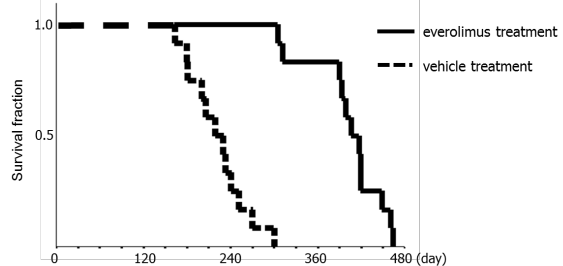
4) AZD1480 はゲフィチニブ感受性および耐性細胞株に同等の効果を示した。ゼノグラフトモデルにおいて AZD1480 は、血管新生を抑制し腫瘍縮小効果を示した。遺伝子改変マウスに AZD1480 を投与したところ、1 mm 以上の肺の腫瘍数 (0.37 ± 0.18) は、対照群 (2.25 ± 0.53) に比し有意に減少した。さらに、マウスの生存期間中央値も、投与群 (217 日) が対照群 (106 日) に比し有意に延長した(図)。AZD1480 は、活性型 EGFR 遺伝子変異を有する肺癌に対して効果が期待できることが示唆された。



5) PC9-GR ではゲフィチニブにより EGFR シグナル経路が一旦は抑制されたが、SRC による ERK 再活性化が誘導された。ダサチニブとの併用により、PC9-GR は *in vitro* (図上) でも *in vivo* (図下) でもゲフィチニブへの感受性が回復した。以上より、SRC を介した ERK 再活性化が新たなゲフィチニブ獲得耐性機序に関与している可能性が示唆され、ゲフィチニブと SRC 阻害剤の併用がこの耐性克服に有効であると考えられた。



6) エベロリムスに対する感受性は、EGFR 遺伝子変異の有無に関わらずほぼ同等であった。L858R 変異を有する EGFR 遺伝子改変マウスに 5 週齢から 20 週齢までエベロリムスを投与したところ、肺表面の腫瘍数は有意に抑制された。さらにエベロリムスを長期継続投与することにより、有意な生存期間の延長が認められた(図)。エベロリムスは *in vitro* ではアポトーシスとオートファジーを誘導していた。しかしながら、EGFR 遺伝子改変マウスにおいてはアポトーシスおよびオートファジーは確認されず、血管新生が抑制されていた。エベロリムスは血管新生を抑制することにより、活性型 EGFR 遺伝子変異を有する肺癌への有効性が示唆された。



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7件)

1. Toshi Murakami, Nagio Takigawa, Nobuaki Ochi, Katsuyuki Kiura, et al. Effect of AZD1480 in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. Lung Cancer 83: 30-36, 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.10.011.

2. Masayuki Yasugi, Nagio Takigawa, Nobuaki Ochi, Katsuyuki Kiura, et al. Everolimus prolonged survival in transgenic mice with EGFR-driven lung tumors. Exp Cell Res 326: 201-209, 2014 査読有 DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.04.012.

3. Nobuaki Ochi, Nagio Takigawa, Katsuyuki Kiura, et al. Src mediates ERK reactivation in gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. Exp Cell Res 322: 168-177, 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.01.007.

4. Daijiro Harada, Nagio Takigawa, Katsuyuki Kiura, et al. The role of STAT3 in non-small cell lung cancer. Cancers (Basel) 6: 708-722, 2014 査読有
DOI: 10.3390/cancers6020708.

5. Hiromasa Takeda, Nagio Takigawa, Nobuaki Ochi, Katsuyuki Kiura, et al. Vandetanib is effective in EGFR-mutant lung cancer cells with PTEN deficiency. Experimental Cell Research 319, 417-423, 2013 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.12.018.

6. Takashi Ninomiya, Nagio Takigawa, Nobuaki Ochi, Katsuyuki Kiura, et al. Afatinib prolongs survival compared with gefitinib in an epidermal growth factor receptor-driven lung cancer model. Mol Cancer Ther 12:589-597, 2013 査読有
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0885.

7. Daijiro Harada, Nagio Takigawa, Nobuaki Ochi, Katsuyuki Kiura, et al. JAK2-related pathway induces acquired erlotinib resistance in lung cancer cells harboring an epidermal growth factor receptor activating mutation. Cancer Science 103, 1795-1802, 2012 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02363.x.

[学会発表](計4件)

1. Yuka Kato, Nagio Takigawa, Katsuyuki Kiura, et al. Epidermal growth factor receptor signaling conferred acquired crizotinib resistance to a non-small cell lung cancer cell line harboring the SLC34A2-ROS1 fusion gene. 欧州臨床腫瘍学会 2014年9月28日, Feria de Madrid, Madrid, Spain

2. Hideko Isozaki, Ochi Nobuaki, Nagio Takigawa, Katsuyuki Kiura, et al. ALK

inactivation induced acquired resistance to alectinib in lung cancer harboring EML4-ALK fusion gene. 米国癌学会 2014年4月6日, San Diego Convention Center, San Diego, USA

3. Daisuke Minami, Nagio Takigawa, Nobuaki Ochi, Katsuyuki Kiura et al. PTEN deficient lung cancer cells are sensitive to the combination of olaparib with cisplatin through suppressing DNA damage signaling. 米国癌学会 2013年4月8日, Washington Convention Center, Washington DC, USA

4. 村上 斗司、瀧川奈義夫、越智宣昭、木浦勝行他. EGFR 遺伝子改変マウスに対する JAK1/2 阻害剤 (AZD1480) の検討. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年09月20日、札幌市教育文化会館、北海道札幌市

[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:

出願年月日:

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

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA NAGIO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60325107

(2)研究分担者

木浦 勝行 (KIURA KATSUYUKI)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号: 10243502

山根 弘路 (YAMANE HIROMICHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50624897

多林 孝之 (TABAYASHI TAKAYUKI)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60624898

越智 宣昭 (OCHI NOBUAKI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80611615

(3)連携研究者なし