

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591184

研究課題名(和文) 不可逆性EGFR-TK とEGFR抗体を用いたEGFR-TK 耐性の克服

研究課題名(英文) Combining Afatinib and Cetuximab synergistically increases their cytotoxicity for EGFR T790M-harboring cells

研究代表者

前門戸 任 (MAEMODNO, MAKOTO)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：40344676

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)：本研究では不可逆的EGFR-TKI + EGFR抗体の2者併用によるEGFR-TKI耐性打破について解析した。EGFR-T790Mを発現するモデル細胞株に対して両者を併用したところ、Afatinib+Cetuximabが相乗効果を示した。シグナル伝達を解析したところ、アポトーシス関連分子であるBimが誘導されており、PARPとCaspas3の切断が起こっていた。EGFRの細胞内動態を調べたところ、Afatinib投与後によって細胞表面へのRab11依存性リサイクリングが増強していた。EGFRシグナル遮断によって細胞表面に増加したEGFRをEGFR抗体が認識し抗体依存性のEGFR分解を誘導していた。

研究成果の概要(英文)：TKIs are effective for NSCLC patients with EGFR-activating mutations. However, these patients eventually develop resistance, most frequently by T790M mutation. Combining a second-generation TKI with an anti-EGFR monoclonal antibody has been shown to improve clinical outcomes, although the mechanism remains elusive. To investigate this mechanism, we used EGFR-negative K562 cells. Double-mutant EGFRs were moderately sensitive to afatinib, but minimally affected by cetuximab. Combining afatinib and cetuximab synergistically increased cytotoxicity for K562 cells carrying double-mutant EGFRs. Apoptosis in these cells was preceded by induction of BIM and activation of Caspase-3 and PARP. Afatinib induced EGFR recycling to the cell surface, leading to the cetuximab-mediated recognition and subsequent degradation. These results suggest that the synergistic effect exerted by afatinib and cetuximab against NSCLCs has a potential in the future clinical application.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：癌 非小細胞肺癌 治療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は化学療法抵抗性な難治性固形腫瘍の代表であり、我が国の肺癌死亡者数は年5万人を超える。上皮成長因子受容体(EGFR) EGFR 活性型遺伝子変異(EGFR 変異)を有する非小細胞肺癌(NSCLC)に対して、チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は著効を示すため重要な分子標的薬である。研究代表者は、ゲフィチニブ(EGFR-TKI)と標準化学療法との第Ⅲ相比較試験において、ゲフィチニブが有意に無増悪生存期間を延長することを見出し、EGFR 遺伝子変異が EGFR-TKI の効果予測因子であること、を見出した(New England Journal of Medicine 2010)。従来、非小細胞肺癌か小細胞肺癌を鑑別する以外に肺癌患者の治療法選択に影響を与える因子はなく、この発見は画期的な成果といえる。

(2) しかしながら、EGFR 変異を有するにもかかわらず25-30%の症例ではEGFR-TKIが奏効しない(自然耐性)こと、著効例においても獲得耐性を生じ再燃する(獲得耐性)ことが臨床で大きな問題となってきた。耐性を起こした約半数では、EGFRに2次の遺伝子変異としてチロシンキナーゼドメイン中のT790Mが生じていることが判明した。このような臨床的背景をもとにEGFR-TKI耐性の克服を目標とした新たな治療戦略が模索されている。①従来のEGFR-TKIはEGFRに対するアフィニティーが十分高いとはいえず問題であった。EGFRに対する親和性を高めた不可逆性EGFR-TKIは、従前のアフィニティー問題をクリアする戦略である。さらに、EGFR-TKI耐性患者に対する併用療法を追求した臨床試験が実施された。その結果、不可逆性EGFR-TKI+EGFR抗体併用療法が耐性克服に有効であることが明らかとなった。しかしながら、この併用療法の奏功機序については、ほとんど未解明のままである。

2. 研究の目的

不可逆性EGFR-TKI+EGFR抗体併用療法によって、肺癌細胞が細胞死に至ることのより直接的な証明を行うことを目的とする。特に、単剤で効果不十分な各治療法がなぜ癌細胞を死滅させることができるのかを解明する。さらに、EGFRが抗体と非可逆性TKIが同時にEGFRに結合した際の細胞生物学的反応について、相乗的作用に焦点を絞って細胞生物学的解析を行う。具体的に以下の2点を目的と定める。

(1) EGFR-TKI耐性細胞を用いた非可逆性TKI+EGFR抗体併用効果の解析:EGFRを発現しない細胞株として同定したK562細胞をin vitroにて培養し、EGFR-TKI、EGFR抗体を加えて、細胞死、アポトーシスを調べる。さらにシグナル伝達の観点から明らかにすることで併用療法効果のパスウェイ解析の端緒を得る。

(2) 非可逆性TKI+EGFR抗体併用とEGFRの細胞内トラフィック動態の解析:EGFRは通常細胞表面に発現しているのみならず、チロシンキナーゼ活性化によって細胞内小胞に移動することが知られている。細胞内小胞では、以下の3つの運命をたどる。1)シグナル伝達の継続(シグナリングエンドソーム)、2)ユビキチン化に続いてESCRT輸送系による輸送を受けライソソーム依存性分解を受けてシグナル停止する、3)Rab11等のGTPaseによって細胞表面にリサイクルされ再利用される。TKIおよびEGFR抗体による効果について明らかにする。

本研究では、以上の解析によりEGFR陽性肺癌に対するEGFR-TKI+EGFR抗体併用効果の細胞生物学的解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型および遺伝子変異型EGFR発現細胞系の構築:EGFR発現細胞系の構築と解析:培養細胞株としてK562を用いて、EGFRの発現ベクターを作成し、EGFR発現系を構築するEGFR安定発現細胞株を樹立し、FACSによる発現量解析、ウエスタンブロット法による解析を行う。ヒトEGFR遺伝子cDNA発現ベクター(野生型)をレトロウイルスベクターに構築し、HAタグ付きのEGFRを安定発現させる。EGFR自己リン酸化、MAPキナーゼ(ERK)、Akt活性化およびBcl-2ファミリー分子発現について、EGFR刺激前後にウエスタンブロット法で調べる。

(2) EGFR-TKI+EGFR抗体によるin vitro薬剤感受性の解析:項目1で得られた細胞に対して、EGFR-TKI、EGFR抗体の効果についてin vitroで解析する。具体的なEGFR-TKIとしてはGefitinib, Erlotinibおよび非可逆性のAfatinibを用いる。増殖と細胞生存に関する影響、および細胞死とアポトーシスに着目して調べる。一方、EGFR抗体としてCetuximabを用いた検討を行う。

(3) 不可逆的EGFR-TKIによるEGFRタンパクの発現変化と時空間的制御と相乗効果の解析:AfatinibによってEGFRのシグナル伝達を遮断した際にEGFRの細胞内動態と局在が変化するか調べる。さらにEGFR抗体との関係を解析する。

4. 研究成果

(1) EGFR発現細胞系の構築と解析:EGFR陽性細胞に対する薬剤耐性解析に適切な細胞の検索をフローサイトメトリーにて行った。赤白血病細胞株K562はEGFRを発現しておらず、ErbB2、ErbB3もなかった。K562を用いてEGFR変異の有無による差異を調べるため、野生型、EGFR変異(L858R,T790M, L858R/T790M)を発現するレトロウイルスベクターを作成し、安定発現株を樹立した(図1)。

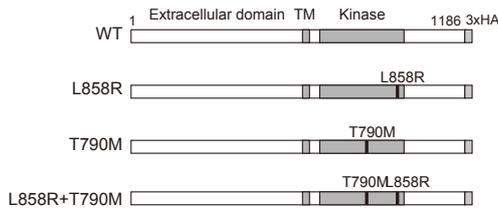


図1. 各種EGFRによる薬剤評価系を樹立した

K562 細胞はドライバー変異を Bcr-Abl を発現するため、Imatinib (TKI) 存在下で細胞生存を指標とした解析を実施した。その結果、EGFR シグナルに依存した細胞生存を示した。

(2) EGFR-TKI による薬剤感受性評価系の解析：上記にて構築した細胞に対して EGFR-TKI を処理し、細胞生存を解析した。EGFR 変異のうち、L858R 変異を有する細胞は Gefitinib に高い感受性を示し、野生型 EGFR がこれに次いだ。L858R/T790M 変異体有する細胞は Gefitinib および Erlotinib 抵抗性であったが、Afatinib は部分的奏効を示した (図 2)。

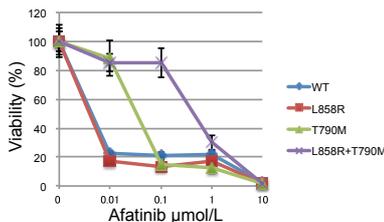


図2. 非可逆性EGFR-TKI (Afatinib)は T790M変異EGFRに部分的効果を示す

これらの結果は EGFR-TKI の臨床効果と一致するデータであり、本実験系が有用な評価系であることが証明されたものと考えられる。続いて、Afatinib+Cetuximab による併用効果を解析した。その結果、比較的濃度であっても Cetuximab が Afatinib の効果を増強することが判明した (図 3)

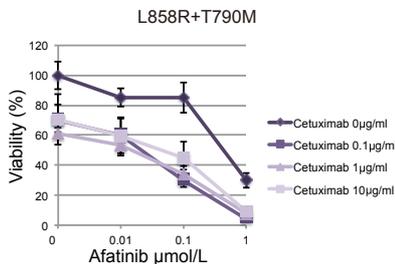


図3. AfatinibとCetuximabは相乗効果を示した

(3) EGFR-TKI によるシグナル伝達とアポトーシスの解析：Afatinib と Cetuximab によるシグナル伝達に対する効果を解析した。3 時間程度の短時間阻害では EGFR の自己リン酸化、ERK 活性化および Akt 活性化の 3 点において、Afatinib によるシグナル阻害が認められたが Afatinib+Cetuximab の併用

による顕著な阻害効果上昇は認められなかった。一方、長期効果として 48 時間後を解析した。ウエスタンブロッティング法を用いてアポトーシス関連蛋白を解析したところ、Pro-apoptotic 分子である BimEL が誘導された。Cetuximab を併用すると誘導はさらに高まること判明した。

(5) 非可逆性 EGFR-TKI による L858R+T790M 変異体のリサイクル増強：Afatinib による細胞内 EGFR の局在変化を解析した。その結果、細胞表面の EGFR が Afatinib 存在下で増強した (図 4)。

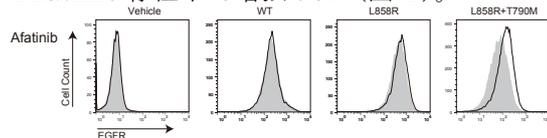


図4. AfatinibはL858R+T790M変異体の発現を上昇させた

この増強はリサイクル関連分子 Rab11 変異体によって阻害されることが明らかとなった。

以上の結果から、非可逆性 EGFR-TKI と EGFR 抗体は相乗的に細胞死を誘導すること、相乗作用による細胞死は BIM が関与する可能性が高いこと、非可逆性 EGFR-TKI はシグナル阻害を強力に行うのみならず、細胞表面への EGFR リサイクルを亢進させることが明らかとなった。以上の結果より、非可逆性 EGFR-TKI と EGFR 抗体の併用効果には、EGFR のリサイクルと、それに伴う EGFR 抗体認識効率の増加、およびそれらに続く受容体分解の亢進が関与するものと考えられた。

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 5 件)

- Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H, Yamamoto M. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 査読有り 2012:760-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x
- Watanuki, Z., Kosai, H., Osanai, N., Ogama, N., Mochizuki, M., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Fukuhara, T., Maemondo, M., Ichinose, M., Nukiwa, T., Tanaka, N. Synergistic cytotoxicity of afatinib and cetuximab against EGFR T790M involves Rab11-dependent EGFR recycling. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有り 455, 2014:269-276. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.003

3. Maemondo M, Inoue A, Sugawara S, Harada T, Minegishi Y, Usui K, Miwa K, Morikawa N, Kanbe M, Ube K, Watanabe K, Ishimoto O, sakakibara T, Gemma A, Nukiwa T. Randomized Phase II Trial Comparing Carboplatin Plus Weekly Paclitaxel and Docetaxel Alone in Elderly Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: North Japan Lung Cancer Group Trial 0801. *Oncologist*. 査読有り 19, 2014:352-353. doi:10.1634/theoncologist.2013-0411
4. Nihira K, Miki Y, Iida S, Narumi S, Ono K, Iwabuchi E, Ise K, Mori K, Saito M, Ebina M, Sato I, Maemondo M, Yamada-Okabe H, Kondo T, Sasano H. An activation of LC3A-mediated autophagy contributes to de novo and acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung adenocarcinoma. *J. Pathol.* 査読有り 234, 2014:277-288 doi: 10.1002/path.4354
5. Seki T, Nishio Y, Tanji F, Maemondo M, Takahashi S, Sato I, Kawai m, Minami Y. Cigarette smoking and lung cancer risk according to histologic type in Japanese men and women. *Cancer Sci.* 査読有り 2013 Aug 30

[学会発表] (計 3件)

- ① Maemondo M, Sugawara S, Harada T, Fukumoto S, Inoue A, Ishimoto O, Matsubara N, Harada M, Kobayashi K, Nukiwa T. Phase II study of combination therapy with S-1 and irinotecan in EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) resistant to both platinum-based chemotherapy and EGFR-TKI: NJLCO0804 The European Cancer Congress 2013 Amsterdam.
- ② Maemondo, M. Nishio, M. Yamamoto, N. Chikamori, K. Katakami, N. Hida, T. Seto, T. Yoshioka, H. Kozuki, T. Ohishi, N. Tamura, T. Variability of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in serum during erlotinib therapy and its clinical implications: exploratory analysis of a phase II study of erlotinib in patients with advanced

non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring EGFR Mutations. 15th World Conference on Lung Cancer October 27-30 Sydney Australia

- ③ Tanaka, N. Watanuki, Z. Fukuhara, T. Maemondo, M. Combining Afatinib and Cetuximab synergistically increases their cytotoxicity for EGFR T790M-harboring cells. AACR2014, San Diego, USA (2014)

[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：
 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

前門戸 任 (MAEMONDO, Makoto)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：40344676

(2) 研究分担者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号：60280872