

平成 2 6 年 5 月 1 6 日現在

機関番号： 8 1 3 0 3

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2012 ～ 2013

課題番号： 2 4 7 9 0 8 2 9

研究課題名（和文）非小細胞肺癌 C T O S バンクを利用した E G R F - T K I 効果予測と個別化治療

研究課題名（英文）Estimation of effects of EGFR-TKI on NSCLCs by cell-based approach including CTOS

研究代表者

綿貫 善太（WATANUKI, ZENTA）

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： 1 0 6 2 6 5 1 8

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円、（間接経費） 990,000 円

研究成果の概要（和文）：EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は、EGFR変異を有するNSCLCに著効を示すが、多くの症例では遺伝子変異（T790M）が生じて耐性を獲得する。本研究では、細胞球状培養法（CTOS）等のモデル細胞系を用いて耐性の評価解析系の確立を目指した。CTOS株の作成を行いINOGマウスに異種移植系を構築することができたが、増殖が緩徐であるため薬剤感受性の評価系については、K562細胞にEGFRを再構築した実験系を構築した。実際に、EGFR依存性に生存増殖する癌細胞は、EGFR-TKIによってアポトーシスした。細胞死には、オートファジーとBimEL誘導が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：EGFR-TKIs work effectively on NSCLCs with EGFR-mutations, however, most of the cases eventually develop drug resistance by acquiring an additional mutation T790M. In the present study, I aimed to establish a CTOS system; a spheroid culture system with patient derived cancer cells. Initial CTOS trial worked fine. Nevertheless, due to the relatively slow rate of tumors, I established another cell-based EGFR-TKI evaluation system. Forced expression of EGFR, either wild type or mutations, enabled K562 cells to grow and survive by the help of the EGFR-driven signals. EGFR-TKI killed the cells, in a dose-dependent manner. Among the genotypes tested, L858R was the most sensitive, whereas L858R/L790M showed resistance to the first generation TKIs. I found that EGFR-TKI-induced cell death was correlated with BIMEL induction and autophagy.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード： 癌 肺癌 EGFR-TKI

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の肺癌死亡者数は年 5 万人を超え、化学療法抵抗性な難治性固形腫瘍の代表である。上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は、EGFR 活性型遺伝子変異(EGFR 変異)を有する非小細胞肺癌(NSCLC)に著効を示すため、重要な分子標的薬である。申請者が連携する研究者ら(前門戸ら)は、ゲフィチニブ(EGFR-TKI)と標準化学療法との第 1 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、を確立した(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)ことや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 次的遺伝子変異(T790M)が生じていることが判明した。また、それ以外の原因については諸説あるものの確たるものは報告されていない。申請者は、EGFR-TKI 耐性を克服することを目指し、新たな治療戦略が模索されている。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、問題となっていた。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と言える。HGF/c-Met の増幅と活性化も耐性誘導の原因の一つである。HGF による変異型 EGFR 陽性肺癌のゲフィチニブ耐性は、抗 HGF 抗体及 C-Met 阻害(レセプター型チロシンキナーゼ(RTK)阻害薬)の開発が期待されている。VEGF による悪性化形質獲得も報告されており、2 次的な治療標的としての特異的治療が準備されている。しかしながら、これらの 2 次的標的療法については、標的の選択をどうするか？実際に治療効果を上げるか？という問いに答えるための足がかりは決定的に不足している。すなわち、評価系やバイオマーカーは存在せず、手探りの治療戦略が続いていた。

(3) 薬剤耐性克服という最終目的に到達するには、単に EGFR 遺伝子や c-Met 遺伝子等に限らず、実際の臨床癌を直接取り出して調べることが最も信頼性の高い情報となるはずである。実際の肺癌細胞における耐性検査はこれまで困難と考えられており、腫瘍細胞の薬物抵抗性や放射線感受性、増殖と細胞死との関連等、重要な基本事項が決定的にわからなかった。肺癌の耐性を打破するため、治療標的として他剤を選択するなどの方法論開発を進めるためには、「各治療法によっ

てどのように肺癌細胞が細胞死に至るか、実験的に解析することが必要である。また、EGFR-TKI で効果不十分な癌を、どうやって他剤で死滅させることができるのかを解明する必要がある

2. 研究の目的

(1) Spheroid 培養系の構築による臨床肺癌の解析：最近確立したがん細胞球状培養法である Spheroid culture, CTOS 法(Inoue et al. 2011)を導入した肺癌培養系を作る。NSCLC (耐性症例)検体を in vitro、in vivo において自在に培養することができる実験的評価解析系を確立することで、薬剤感受性/耐性予測を行うことで適切な薬剤/パスウェイ選択に情報を与え、肺癌克服に向けた分子生物学的意義を解析する基盤を樹立する。

(2) EGFR-TKI 作用点と薬剤耐性の解析：EGFR-TKI 耐性細胞を in vitro 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。MAP キナーゼ、Akt、および NF- κ B 等のシグナル伝達の観点から明らかにする。

(3) オートファジーの関与の解析：従前は癌細胞増殖に正に作用すると考えられてきたが、逆に癌細胞のアポトーシスに関与するとする報告があったため、EGFR-TKI 作用によりアポトーシスが惹起される可能性を解析する。

本研究では、以上の解析により、EGFR 陽性肺癌に対する EGFR-TKI 効果予測を簡便かつ高精度に行うことのできる新規解析系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肺癌検体を用いた Spheroid Culture 細胞の調整：肺癌、特に肺腺癌は、①手術・バイオプシーによって採取される細胞量が少ないこと、細胞増殖速度が遅いことなどが障壁となり、継続的な in vitro 培養が困難であることが多い。最近になって、肺癌検体から細胞間接着を維持したままで球状の Cell Cluster として取り出すという、革新的方法が開発された。幹細胞専用培地を用いたスフェア培養条件下(癌幹細胞培養と同等の培養)において、患者由来検体が継続的に培養できるという驚くべき報告である(Inoue et al. 2011)。この球状細胞クラスターは CTOS (Cancer Tissue Originated Spheroid)と命名されている。同様の球状培養は現在まで報告されてきた。そこで、本課題では患者由来肺癌組織から球状培養を作成する。方法としては、井上らの原著に従い、Liberase とセルストレイナーの組み合わせを利用する。

(2) 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、ウェ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 pcDNA4.1-3xHA に構築する。HA タグ付きの EGFR を発現する。一方、肺癌細胞株 A549 細胞株（ヒト肺癌細胞、野生型 EGFR 発現株）を用いた解析を行う。EGFR 自己リン酸化 MAP キナーゼ（ERK, JNK）PI3K, Akt 活性化および Bcl-2 ファミリー分子発現について、EGFR 刺激前後にウェスタンブロット法で調べる。

(3) in vitro 薬剤感受性試験および予後予測系の樹立: 薬剤耐性細胞に対して、EGFR-TKI、EGFR 抗体の効果について in vitro で解析する。CTOS が十分に得られない場合には、培養細胞を用いた解析を行う。増殖停止・アポトーシスを調べる。球状培養が形態的に変化するか？についても注視する。また、耐性が特に強い一部検体については、薬剤存在下におけるシグナル伝達の異常について調べる。MAPK, Akt, NF- κ B, Bcl-2 などウェスタンブロット法で確認する。以上の結果は、耐性検体（症例）に対する 2 次選択薬剤にとって、非常に有用な情報となる可能性が高い。予後予測系として利用できるかについても解析する。

4. 研究成果

(1) CTOS 球状培養の作成：

宮城県立がんセンターにてインフォームド・コンセントを得た症例から癌検体を得て超免疫不全マウス NOG に異種移植した。Adenocarcinoma 複数株について異種移植細胞塊の移植に成功した。異種移植生着細胞について、酵素処理を短時間行い、さらにストレイナーを用いて細胞塊を分取した。分取した CTOS（細胞塊）は幹細胞培地で培養可能であった。細胞塊の増殖は緩徐であり、長期間の培養はできなかった。このため、以後の薬剤感受性の評価実験は細胞株を用いて解析した。

(2) 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。HeLa や COS-7 といった上皮系の細胞株は EGFR 発現していたが、赤白血病細胞株 K562 は EGFR を発現していなかった。K562 には EGFR 類縁の受容体である ErbB2、ErbB3 も見られなかった。K562 を用いて EGFR 変異

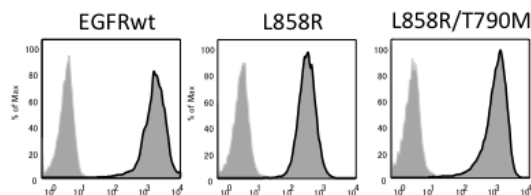


図1. 薬剤耐性評価系の構築：各種EGFR発現細胞を樹立した

の有無による差異を調べるため、野生型、EGFR 変異（L858R, 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）。K562 細胞はドライバー変異として Bcr-Abl が知られているため、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（図2）。ウェスタンブロット法による検討を行ったところ、MAPK(p42/44)、Akt のリン酸化が確認された。

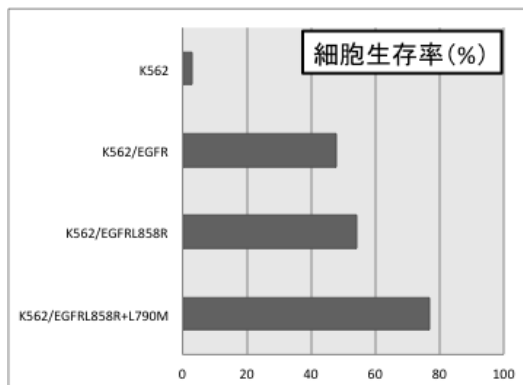


図2. EGFRによる機能的薬剤評価系を樹立した

(3) EGFR-TKI による薬剤感受性評価系としての解析：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（図3）。L858R/T790M 変異体を有する細胞は Gefitinib 抵抗性であった。これらの結果は EGFR-TKI の臨床効果と一致するデータであった。本実験系が有用な評価系であることが裏付けられた。

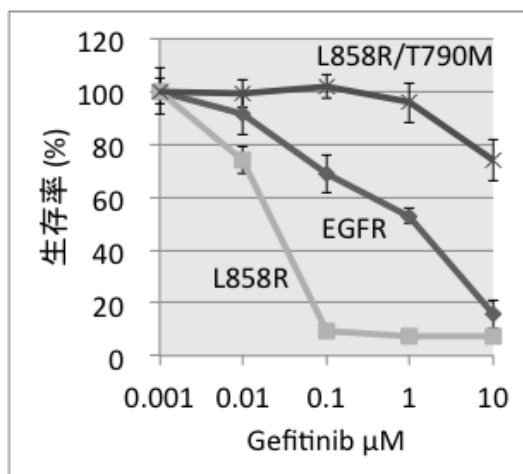


図3. EGFR変異体によるEGFR-TKIの評価

(4) EGFR-TKI による癌細胞アポトーシスの解析：細胞死を詳細に観察するため、FACS 解析を行った。AnnexinV/7AAD 染色により、EGFR-TKI 存在下でアポトーシスが観察された。このため、ウェスタンブロット法

を用いてアポトーシス関連蛋白を解析した。その結果、EGFR-TKI により Pro-apoptotic 分子である Bim_{EL} が誘導されることが判明した。実際の肺癌においても Bim の関与が報告されていることから、本評価系は臨床肺癌に類似していることが検証できた。次に、オートファジーが関与するか解析した。最近の報告によれば、肺癌細胞においては EGFR シグナルが Beclin-1 を抑制することによりオートファジーが惹起されない。本研究では、LC3 をマーカーとしてオートファジーを評価した。その結果、EGFR-TKI 感受性細胞では LC3-II が明らかに増加した。同じく、オートファジーと密接に関係する p62 の減少も同時に観察されたことから、EGFR-TKI による細胞死にはオートファジーが関連することが確かめられた。

(5)肺癌細胞の球状培養と EGFR-TKI の効果：NCI-H1975 細胞は EGFR の耐性変異 L858R/T790M を有する。H1975 細胞を Sphere 形成させると、球状の塊が作成できた。一方、第1世代 EGFR-TKI は H1975 には効果がなかった。次いで、第2世代 EGFR-TKI を用いた解析を行ったところ、部分的な感受性を示した。この条件でオートファジーを解析した。共焦点顕微鏡観察において、LC3 陽性の小胞が細胞内に多数観察された。以上の結果から、本実験系では、臨床癌と類似の応答が再現できた。EGFR-TKI の薬効評価系として有用な系であることが明らかとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Mami Morita, Tatsuro Fukuhara, Yoko Tsukita, Zenta Watanuki, Aya Suzuki, Kana Watanabe, Nobuyuki Sato, Hidetoshi Takahashi, Shigemi Ito, Ikuro Sato, and Makoto Maemondo, A Case of Small Cell Lung Cancer with Cancer-Associated Retinopathy (CAR) Accompanied by Circulating Anti-CRMP5/CV2 Antibodies, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, Yokohama(2013)
Nobuyuki Tanaka, Zenta Watanuki, Tatsuro Fukuhara, Makoto Maemondo. 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

綿貫 善太(WATANUKI, Zenta)

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：10626518

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：