

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860640

研究課題名(和文) EGFR変異肺癌のBIM遺伝子多型に起因するEGFR-TKI耐性克服治療の開発

研究課題名(英文) Development of therapy for circumvention of EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism in EGFR mutant lung cancer.

研究代表者

竹内 伸司 (Takeuchi, Shinji)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：90565384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：BIM遺伝子多型に起因するEGFR-TKI耐性を克服する治療としてHDAC阻害薬の有効性について検証した。BIM多型を有するEGFR変異肺癌細胞株PC-3はゲフィチニブによるアポトーシス誘導に抵抗性を示した。PC-3にポリノスタットを添加すると活性型BIM蛋白の発現が上昇し、ゲフィチニブとの併用によってアポトーシスが誘導された。マウスモデルにおいて、ゲフィチニブ単剤ではPC-3皮下腫瘍は縮小しなかったが、ポリノスタット併用によってアポトーシスが誘導され著明な腫瘍縮小効果を示した。以上より、HDAC阻害薬併用治療がBIM遺伝子多型に起因するEGFR-TKI耐性克服に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether vorinostat, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, could circumvent EGFR-TKI resistance in the EGFR mutant lung cancer cell lines, which harbor the BIM polymorphism. We found that PC-3 cells with BIM polymorphism were much less sensitive to gefitinib-induced apoptosis than the EGFR mutant cell lines, which do not harbor this polymorphism. Vorinostat dose-dependently increased the expression of BIM with a pro-apoptotic BH3 domain and, together with gefitinib, induced apoptosis in cells with BIM polymorphism in vitro. In xenograft models, gefitinib did not induce regression of PC-3 subcutaneous tumors, whereas the combination of vorinostat and gefitinib induced marked regression of tumors, accompanied by tumor-cell apoptosis. These results indicate that the combination of HDAC inhibitor and EGFR-TKI may circumvent the resistance due to the BIM polymorphism in EGFR mutant lung cancer.

研究分野：呼吸器内科、腫瘍内科

キーワード：肺癌 EGFR変異 アポトーシス BIM遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

EGFR チロシンキナーゼ阻害薬（以下、EGFR-TKI）であるゲフィチニブやエルロチニブはEGFR変異肺癌に対して高い奏効率を示す。しかし、奏効例においても1~数年程度の経過でほぼ例外なく耐性を獲得し再発する。この獲得耐性の克服はEGFR変異肺癌の予後改善には不可避の課題である。これまでEGFR変異肺癌の増殖に関わる耐性メカニズムが多く報告されてきた。しかし、最近アポトーシス抵抗性が早期に耐性を誘導する因子として注目されている。BIMはBcl-2ファミリーに属するアポトーシス促進蛋白であり、EGFR変異肺癌においてEGFR-TKIによるアポトーシスの誘導に中心的な役割を果たしている(Costa DB et al. PLoS Med, 2007)。EGFR変異肺癌の腫瘍組織においてBIM発現が低いとEGFR-TKIによる無増悪生存期間が有意に短いことが報告されている(Faber AC et al. Cancer Discov, 2011)。さらに、BIM遺伝子に特定の多型を有すると活性型BIM蛋白の発現が低下し、EGFR-TKIによるアポトーシス誘導に抵抗性を示すことが2012年に報告された(Ng KP et al. Nat Med, 2012)。この遺伝子多型はイントロン2における2903塩基の欠失多型であり、詳細なメカニズムは依然として明らかになっていないが、この欠失によりBH3ドメインを持たない、すなわちアポトーシス誘導能が欠如した不活性型のBIM選択的にスプライシングが制御されることにより、活性型BIM蛋白の発現が十分に誘導されずアポトーシスに抵抗性をきたす。この遺伝子多型は東アジア人の約13%に検出され、東アジア人に特異的であることが明らかになっている。臨床検体を用いた解析では、このBIM遺伝子多型を有する症例は有意にEGFR-TKIによる奏効期間が短いことも明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、BIM遺伝子多型に起因するEGFR変異肺癌のEGFR-TKI耐性を克服する治療薬としてHDAC阻害薬であるポリノスタットに着目し、有用性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) *In vitro*においてBIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌細胞株にゲフィチニブを添加し、アポトーシス誘導効果について検討した。

(2) *In vitro*においてBIM遺伝子多型を有

するEGFR変異肺癌細胞株にポリノスタットを添加し、活性型BIMの発現上昇効果について検討した。

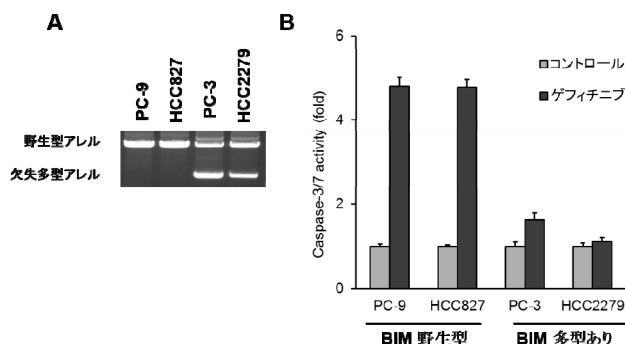
(3) *In vitro*においてBIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌細胞株に対するゲフィチニブとポリノスタットの併用効果について検討した。

(4) BIM遺伝子多型を有するPC-3細胞をマウス皮下へ移植して腫瘍を形成し、ゲフィチニブとポリノスタットの*in vivo*における効果について検討した。

4. 研究成果

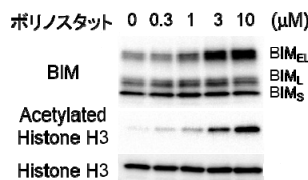
(1) EGFR変異肺癌細胞株においてBIM遺伝子多型（以下BIM多型）の有無をPCR法で確認したところ、HCC2279とPC-3がヘテロ接合型でBIM多型を有することが明

図1. BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌細胞株におけるゲフィチニブのアポトーシス誘導効果.



らかになった(図1.A)。これら細胞株にゲフィチニブを添加し、アポトーシス誘導の指標である活性化Caspase-3/7を検出し、定量したところ、BIM多型を有するPC-3とHCC2279はアポトーシス誘導に抵抗性を示すことが確認された(図1.B)。

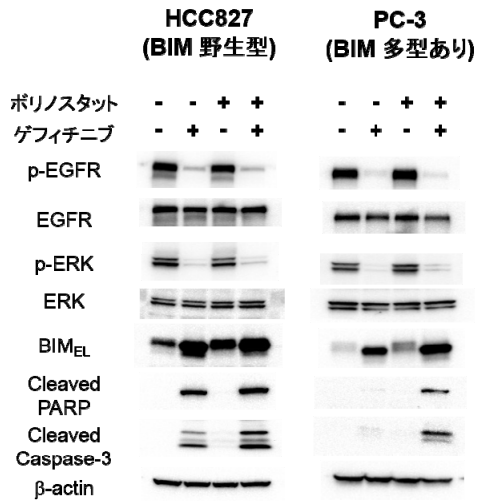
図2. PC-3細胞に対するポリノスタットの効果



(2) BIM多型に起因するアポトーシス抵抗性を克服する薬剤として、本邦で既に承認されているHDAC阻害薬であるポリノスタットに着目した。BIM多型を有するPC-3にポリノスタットを添加すると用量依存的に活性型BIM蛋白の発現上昇を認めた(図2)。

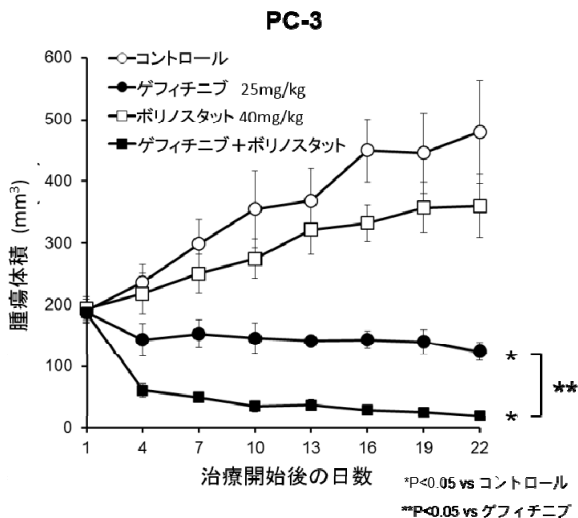
(3) ゲフィチニブとポリノスタットの併用効果について*in vitro*で検討した。BIM野生

図3. *In vitro*におけるゲフィチニブとボリノスタットの併用効果.



型の細胞ではゲフィチニブ単剤の処理で、EGFR シグナルが抑制され、アポトーシス誘導の指標である活性型の PARP, Caspase が発現した。一方で BIM 多型を有する PC-3 では ゲフィチニブ 単剤で EGFR シグナルは抑制されるものの、アポトーシスはほとんど誘導されず抵抗性を示した。しかし、ゲフィチニブにボリノスタットを併用すると、活性型 BIM 蛋白の発現が上昇し、アポトーシスが著明に誘導されることが明らかになった。

図4. マウス皮下移植モデルにおけるゲフィチニブとボリノスタットの効果



(4) ゲフィチニブとボリノスタットの併用効果について *in vivo*での検討をマウス皮下移植モデルで行った。HCC827 皮下腫瘍ではゲフィチニブ投与により著明な腫瘍縮小効果認められた。一方で BIM 多型を有する PC-3 皮下腫瘍ではゲフィチニブを投与してもほとんど腫瘍は縮小せず、アポトーシスに抵抗

性であることが示唆された。また、ボリノスタット単剤では腫瘍は縮小しなかったが、ゲフィチニブとボリノスタットを併用すると著明な腫瘍縮小効果を認めた。(図4)。

以上の結果から、BIM 多型を有する EGFR 変異肺癌細胞において、HDAC 阻害薬であるボリノスタット併用により、活性型 BIM 蛋白発現上昇を介してアポトーシス誘導が促進され、EGFR-TKI 耐性を克服しうることが示された。本研究成果を基に、我々は名古屋大学、東北大学、静岡県立静岡がんセンター、先端医療センターと共同で BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌を対象としたゲフィチニブとボリノスタット併用の第 I 相臨床試験を医師主導治験として実施している (ClinicalTrials.gov:NCT02151721)。今後、臨床応用に向けた取り組みをさらに進めていきたい。

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 9 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 doi: 10.1111/cas.12600.
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 doi: 10.1097/JTO.0000000000000371.
3. Takeuchi S, Yano S. Clinical Significance of EGFR-TKI: Sensitivity and Resistance. *Respir Investig.* 2014;52:348-56. 査読有 doi: 10.1016/j.resinv.2014.10.002.
4. Tanimoto A, Yamada T, Nanjo S, 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. 5:4920-8, 2014 査読有
5. Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Zhao L, Yasumoto K, Matsumoto K, Yonekura K, Yano S. Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an EGFR mutation. J Thorac Oncol. 9:775-83, 2014. 査読有 doi: 10.1097/JTO.000000000000170.
 6. 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. 8:e84700, 2013. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0084700.
 7. 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. Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. Cancer Sci. 104:1640-6, 2013. 査読有 doi: 10.1111/cas.12301.
 8. Ishikawa D, Takeuchi S, Nakagawa T, Sano T, Nakade J, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Zhao L, Yasumoto K, Nakamura T, Matsumoto K, Kagamu H, Yoshizawa H, Yano S. mTOR Inhibitors Control the Growth of EGFR Mutant Lung Cancer Even after Acquiring Resistance by HGF. PLoS One. 8:e62104, 2013 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0062104.
 9. 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 in combination with HDAC inhibition. Cancer Res. 73:2428-34, 2013 査読有 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3479.

[学会発表] (計 4 件)

1. 第 55 回日本肺癌学会学術集会

- BIM 遺伝子多型による EGFR-TKI 耐性の治療法開発の現状 竹内伸司、矢野聖二 2015 年 11 月 15 日
2. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会
Therapeutic strategies for overcoming resistance to EGFR-TKI and ALK-TKI by inhibition of Hsp90 or HDAC 竹内伸司、矢野聖二 2014 年 7 月 18 日
 3. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会 EGFR-TKI 耐性とその克服 竹内伸司、矢野聖二 2014 年 6 月 27 日
 4. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 EGFR 変異肺がんの EGFR-TKI 耐性 竹内伸司、矢野聖二 2014 年 4 月 26 日

[図書] (計 1 件)

1. 竹内伸司, 矢野聖二, 先端医学社, 分子呼吸器病 18 巻 1 号, 2014 年, 66~69 頁
【呼吸器病学 TOPICS 2013-14】
BIM 遺伝子多型と EGFR-TKI 耐性

[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://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 伸司 (TAKEUCHI SHINJI)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：90565384

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし