

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462003

研究課題名(和文) HER2, FGFR2 陽性胃癌に対する分子標的治療と手術を組み合わせた集学的治療

研究課題名(英文) Multidisciplinary therapy using molecular targeting therapy and surgery for HER2/FGFR2-positive gastric cancer

研究代表者

伊藤 友一 (Ito, Yuichi)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員

研究者番号：80397463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HER2陽性胃癌はTrastuzumab (Tmab)などを用いた分子標的治療が可能な数少ない胃癌であるが、耐性の獲得など課題が多い。本研究では各種HER2遺伝子増幅胃癌細胞株やTmab、T-DM1耐性株を独自に作成し、抗体医薬、チロシンキナーゼ(TKI)阻害剤及び抗がん剤の3者の抗腫瘍効果についてマウスを用いて検討した。その結果、Tmab耐性細胞に対して新規分子標的薬であるT-DM1、Afatinib(TKI)単剤及びTmabと抗がん剤の併用療法が効果的であること、その作用機構はそれぞれ異なることを明らかにし、これら分子標的治療と手術を組み合わせた新しい集学的治療の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Among various types of gastric cancers, HER2-positive cancer proved to be effective target by trastuzumab (Tmab), but Tmab resistance remains a major problem to be resolved. In this study, we newly developed gastric cancer cell line panel including HER2 high/low gene amplified- and Tmab resistant cell lines and examined anti-tumor effect of T-DM1, Afatinib, an irreversible TKI and Tmab plus chemotherapy in mouse xenograft models. The results showed that T-DM1 and Afatinib alone and Tmab-paclitaxel combination exhibited significant anti-tumor effect against Tmab-resistant cell lines through different molecular mechanisms. In addition, we developed FGFR2 gene-amplified gastric scirrhou cancer cells and examined the effect of a new TKI for FGFR2 (PD173074), showing significant anti-tumor effect against FGFR2-positive cells. These results suggest a new treatment modality consisting of molecular targeting therapies and surgery against HER2-positive and FGFR2-positive gastric cancers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：HER2陽性胃癌 FGFR2陽性胃癌 細胞株パネル ハーセプチン耐性株 耐性機構 T-DM1 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

胃がんでは HER2 陽性がんに対して 2013 年からヒト化モノクローナル抗体である Trastuzumab が国内外において抗体薬として承認され、HER2 陽性進行転移性胃がん患者に対する抗体医薬として臨床における生存延長効果が立証されている。しかし、HER2 陽性胃がんにはもともと Trastuzumab 抵抗性がんが存在すること、また殆どの症例で治療後に耐性が獲得されることが臨床で大きな課題となっている。一方、頻度は低いものの HER2 陽性胃がんとは対照的にスキルスがんなどの低分化型腺がんは FGFR2 遺伝子増幅が認められ、チロシンキナーゼ阻害剤の有効性が *in vitro* の実験で報告されている。しかし、その生物学的特性やシグナル伝達などは依然として不明な点が多い。

これらの理由として日本人由来の HER2 陽性胃がん細胞株や FGFR2 陽性胃がん細胞株の数が少なく、*in vitro* における薬剤の分子レベルの作用機構の解析や前臨床研究が困難であることが挙げられる。申請者らはこれまでに日本人由来の HER2 増幅、Trastuzumab 高感受性胃がん細胞株を独自に 2 株樹立し(2006)、また Trastuzumab 耐性株の分離にも成功している(2013)。さらに FGFR2 遺伝子増幅胃がん細胞株の株化も進めている。これらの分子標的薬高感受性 HER2 陽性、FGFR2 陽性胃がん細胞株は分子標的治療の作用機序を解明するための貴重な実験モデルと考えられ、これをさらに拡充した胃がん細胞パネルを作成し、それらを詳細に解析することにより日本人 HER2 陽性、FGFR2 陽性胃がん患者に対する新しい診断、治療法の開発が期待できる。

2. 研究の目的

日本人患者由来の HER2 陽性胃がん細胞株、それらの Trastuzumab 耐性株、T-DM1 耐性株など HER2 陽性胃がん細胞パネルを作成、また FGFR2 遺伝子増幅スキルス胃がん細胞株を新たに樹立する。これら独自に開発した一連の胃がん細胞株を用いて薬剤感受性機構や薬剤耐性機序を解明し、術前化学療法や術後補助療法に組み合わせた HER2 陽性/FGFR2 陽性胃がんに対する新しい個別化治療体系を構築することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)HER2 陽性、FGFR2 陽性胃がん細胞パネルの構築
既に樹立している HER2 陽性胃がん細胞株 (GLM-1, -4) 及びその Trastuzumab 耐性株から新たに *in vitro* および *in vivo* 選別法により T-DM1 耐性株を作成した。また新たに日本人胃がん患者の剖検時に採取した肝転移巣から遺伝子増幅が軽度にとどまる HER2 陽性細胞株を樹立し (GLM-2, GLM-5)、HER2 遺伝子増幅の程度や Trastuzumab 感受性が異なった種々の細胞株からなる胃がん細胞パネルを構

築した。

一方、胃がん患者腹水から FGFR2 遺伝子増幅を有する胃低分化型腺がん細胞株の初代培養細胞から幹細胞用培地などを用いて細胞の株化を試みた。

(2)HER2 陽性胃がんに対する既存および新規分子標的薬の抗腫瘍効果の検討

上記、HER2 陽性胃がん株 (GLM-1, -4)、その Trastuzumab 耐性株等を用いて Lapatinib および新規非可逆的阻害剤 (Irreversible dual TKI, Afatinib など) の単独および Trastuzumab, T-DM1 (抗体医薬)、抗がん剤 (Paclitaxel) との併用効果について *in vitro*, *in vivo* (ヌードマウス移植系) の両面から検討した。

(3)HER2 陽性胃がん細胞、FGFR2 陽性胃がん細胞に対する各種チロシンキナーゼ阻害剤及び Trastuzumab の単独並びに併用治療の抗腫瘍効果とその感受性、耐性機構の解析

HER2 陽性胃がん細胞株 (GLM-1, -4) の Gefitinib, Lapatinib 並びに Afatinib 感受性機構について PI3K/Akt 経路と MAPK シグナル経路をウエスタンブロットや Annexin V を用いたアポトーシス解析、並びに Cycle Test を用いた細胞周期解析等により解析した。また Trastuzumab 耐性機構に関しては抗体の結合性、HER 発現量及び Rb のリン酸化、p27 発現誘導などによる細胞周期停止について検討した。

また独自に作成してきた FGFR2 を過剰発現する胃がん細胞 (GPM-3) を含めて FGFR2 増幅のある胃がん細胞株とない細胞株を用いてシグナル伝達や FGFR2 阻害剤の増殖抑制効果について *in vitro* で検討した。

4. 研究成果

(1)HER2 陽性、FGFR2 陽性胃がん細胞パネルの構築

既存の HER2 陽性胃がん細胞株 (GLM-1, -4) 及び Trastuzumab 耐性株に加えて、T-DM1 耐性株並びに新規 HER2 陽性胃がん細胞株 (GLM-2, -5) を樹立した。これにより HER2 遺伝子増幅が軽度～高度まで揃い、しかも複数の耐性株を備えた多様な HER2 陽性胃がん細胞パネルの作成に成功した。

一方、胃がん患者腹水から FGFR2 遺伝子増幅を有する胃低分化型腺がんの初代培養細胞 (GPM-3) から幹細胞用培地などを用いて細胞の株化を進めたが、初代培養では無血清の幹細胞用培地下で緩徐に浮遊性増殖し、生存を維持できるものの、継代すると増殖を停止し、最終的に株化には至らなかった。

(2)HER2 陽性胃がん並びに Trastuzumab 耐性株に対する既存、新規分子標的薬および抗がん剤との併用療法の抗腫瘍効果の検討

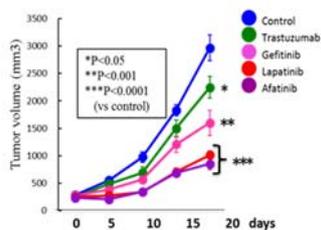
HER2 陽性胃がん細胞株 (GLM-1, -4) に対する

3種類のTKIであるGefitinib, Lapatinib並びにAfatinibの抗腫瘍効果についてヌードマウス移植モデルで検討した。その結果、Afatinib>Lapatinib>Gefitinibの順に抗腫瘍効果が強く、新しい非可逆的TKI阻害剤であるAfatinibが最も高かった。ただし、体重減少など副作用も高い傾向が見られた。またTrastuzumab耐性株に対するTrastuzumabとPaclitaxelの併用ではPaclitaxel単独に比べてTrastuzumabとの併用群では加算的以上の効果が見られ、耐性獲得後においてもTrastuzumabを抗がん剤と併用することの意義が明らかとなった。さらにTrastuzumab耐性株に対するT-DM1の単独の抗腫瘍効果を検討したところ、容量依存的な効果が見られ、T-DM1がTrastuzumabとは異なる作用機序を有することが示唆された。また上記Afatinibには単独でTrastuzumab耐性株の増殖を抑制する有意な抗腫瘍効果が認められた。

(3)HER2陽性胃がん細胞、FGFR2陽性胃がん細胞に対する各種チロシンキナーゼ阻害剤及びTrastuzumabの単独並びに併用治療の抗腫瘍効果とその感受性、耐性機構の解析

HER2陽性胃がん細胞株(GLM-1,-4)の各種TKI(Gefitinib, Lapatinib並びにAfatinib)に対する感受性機構について検討した。その結果、可逆的TKIであるGefitinib, Lapatinibの抗腫瘍効果がG1期停止とアポトーシスが拮抗して作用するのに対し、非可逆的TKIであるAfatinibでは抗腫瘍効果は主としてHER2/HER3により恒常的に活性化されたPI3K/AktおよびMAPKシグナルのブロックによるアポトーシスに起因することが明らかとなった(図1)。

A チロシンキナーゼ阻害剤による増殖抑制



B シグナル伝達阻害

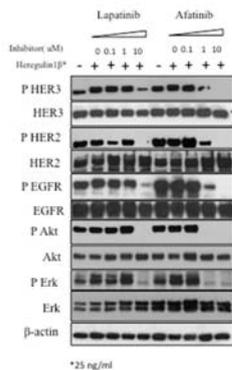


図1 HER2増幅胃がんに対する分子標的治療とシグナル伝達阻害

一方、Trastuzumab耐性機構に関してはGLM-1耐性株を用いた解析から、耐性株ではTrastuzumabによるHER2シグナル経路であるPI3K/Aktシグナルの抑制、Rbリン酸化の抑制及びp27発現誘導など細胞周期のG1期停止作用が低下していること、すなわち耐性株には詳細は不明であるが、TrastuzumabによるG1期停止を回避する機構が存在する可能性が示唆された。

またT-DM1は単独でTrastuzumab耐性株に対して有効であったことから、T-DM1の抗腫瘍効果の作用機序はHER2シグナルのブロックとは全く異なることを確認した。

次にFGFR2を過剰発現する胃がん細胞GPM-3は安定して増殖する株化には至っていないが、*in vitro*での一部の解析は可能であった。GPM-3を含めてFGFR2増幅のある胃がん細胞株とない胃がん細胞株を用いてシグナル伝達やFGFR2阻害剤の増殖抑制効果について検討した。その結果、FGFR2増幅のある株は増幅のない株に比べてSTAT3のリン酸化が亢進し、一部では核内局在を示し、恒常的に活性化されていた。FGFR2に対するキナーゼ阻害剤(PD173074)の増殖抑制効果を*in vitro*で検討したところ、遺伝子増幅のある細胞株では増幅のない細胞に比べて強い抑制が認められた。この増殖抑制は下流のSTAT-3及びMAPKシグナル経路のブロックによるものと考えられた。

以上の結果をまとめるとHER2陽性胃がん及びそのTrastuzumab耐性株に対しては1) T-DM1などの新規抗体医薬、2) Trastuzumabとパクリタキセルなどの抗がん剤との併用療法、さらに3) 新しい治療法としてのLapatinib、Afatinibなどのチロシンキナーゼ阻害薬、など複数の治療薬が期待できることが判明した。

またHER2陽性だが遺伝子増幅が軽度にとどまり、Trastuzumab抵抗性を示す胃がんのモデルが今回作成できたことにより、これらのTrastuzumab自然耐性症例に対するT-DM1などを用いた新しい分子標的治療の試みも今後期待できる。

一方、手術との関連では肝臓や遠隔リンパ節などに転移しているHER2陽性患者に対しては上述の治療法の中から最適の治療法を選択して術前化学療法を行い、遠隔転移の消失が得られれば、その後手術を施行するConversion therapyが期待できる。またHER2陽性患者の術後補助化学療法として、副作用が比較的軽微であることが期待できるT-DM1などの抗体療法は医療経済的な課題はあるものの、医学的には今後期待できる治療法と考えられる。

いずれにせよ、HER2陽性胃がんやFGFR2陽性胃がんは胃がんの中では分子標的薬が適応となる数少ないサブタイプであり、今回の基礎的並びに前臨床試験の結果をもとに今後さらに新しい集学的治療法の構築が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kodera Y, Takahashi N, Yoshikawa T, Takiguchi N, Fujitani K, Ito Y, et al. (6), Feasibility of weekly intraperitoneal versus intravenous paclitaxel therapy delivered from the day of radical surgery for gastric cancer : a preliminary safety analysis of the INPACT study, a randomized controlled trial, *Gastric Cancer*, 査読有, 20(2017)190-199 DOI:10. 1007/s10120-016-0598-0
- ② Ito Y, Yoshikawa T, Fujiwara M, et al. (14), Quality of life and nutritional consequences after aboralpouch reconstruction following total gastrectomy for gastric cancer: randomized controlled trial CCG1101, *Gastric Cancer*, 査読有, 19-3(2016)977-85, DOI:10. 1007/s10120-015-0529-5
- ③ Saito T, Nakanishi H, Mochizuki Y, Ito S, Ito Y, et al. (4), Preferential HER2 expression in liver metastases and EGFR expression in peritoneal metastases in patients with advanced gastric cancer, *Gastric Cancer*, 査読有, 18-4(2015)711-9, DOI:10. 1007/s10120-014-0417-4
- ④ Saito T, Kondo C, Shitara K, Ito Y, Saito N, Ikehara Y, Yatabe Y, Yamamichi K, Tanaka T, Nakanishi H. Comparison of intratumoral heterogeneity of HER2 expression between primary tumor and multiple organ metastases in gastric cancer : Clinicopathological study of three autopsy cases and one resected case, *Pathol Int*, 査読有, 65-6(2015)309-17, DOI:10. 1111/pin. 12290
- ⑤ Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H. New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice, *Gastric cancer*, 査読有, 17-3(2014)497-507, DOI:10. 1007/s10120-013-0316-0
- ⑥ Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi

H. Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines, *Gastric cancer*, 査読有, 17-3(2014)450-62, DOI:10. 1007/s10120-013-0290-6

[学会発表] (計 10 件)

- ① 伊藤友一, 腹腔鏡下胃切除術の治療成績, 第 29 回日本内視鏡外科学会総会, 2017/12/09, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- ② Ito Y, Evaluation of PGA-reinforced tri-staple in gastrectomy by comparison D2 and D1+, 第 89 回日本胃癌学会総会, 2017/3/9, 広島国際会議場(広島県・広島市)
- ③ 伊藤友一, 胃がん内視鏡治療非治癒切除後の外科切除症例に関する検討, 第 78 回日本臨床外科学会総会, 2016/11/25, グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
- ④ 周 正, 山下依子, 柳沢美恵子, 守屋陽一郎, 中西速夫, 原田直樹. HER2 陽性胃がん細胞株における trastuzumab 耐性機序の解明と T-DM1 の効果, Clarification of trastuzumab resistance and potency of T-DM1 in gastric cancer models, 第 53 回日本癌治療学会, 2015/10/29, グランドプリンスホテル(京都府・京都市)
- ⑤ 伊藤友一, 当院における conversion surgery の治療成績, 第 70 回日本消化器外科学会, 2015/7/15, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)
- ⑥ 伊藤友一, 新規血液中がん細胞(CTC)分離デバイスと担がん CTC マウスモデルを用いた消化器がんに対する分子標的治療のモニタリング, 第 115 回日本外科学会, 2015/4/17 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
- ⑦ Ito Y, Evaluation of aboral pouch reconstruction after total gastrectomy in patients with gastric cancer, 第 87 回日本胃癌学会総会, 2015/3/6, 広島県立総合体育館武道場(広島県・広島市)
- ⑧ 中西速夫, HER2 陽性胃がんの原発巣ならびに転移巣における HER2 発現不均一性の検討, 第 87 回日本胃癌学会総会, 2015/3/6, 広島県立総合体育館 武道場(広島県・広島市)

- ⑨ 齊藤卓也, 中西速夫, 望月能成, 伊藤誠二, 三澤一成, 伊藤友一, 胃癌の原発巣ならびに転移巣 (肝転移および腹膜転移) におけるHER2とEGFRの差別的発現について, 第87回日本胃癌学会総会, 2015/3/5, 広島県立総合体育館 武道場 (広島県・広島市)
- ⑩ 伊藤友一, 高度進行胃癌に対する審査腹腔鏡の意義, 第114回日本外科学会定期学術集会, 2014/4/5, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 友一 (Yuichi Ito)
愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員
研究者番号: 80397463

(2) 研究分担者

中西 速夫 (Hayao Nakanishi)
愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・研究員
研究者番号: 20207830