

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670414

研究課題名(和文) FRETバイオセンサーを用いたEGFR-TKI非感受性・耐性の解明と克服

研究課題名(英文) Study on EGFR-TKI resistance using FRET biosensor

研究代表者

秋田 弘俊 (Akita, Hirotooshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70222528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR活性測定FRETバイオセンサーとフローサイトメーターを用いて、3つの肺癌細胞株においてEGFR阻害薬耐性細胞を単離した。耐性細胞の遺伝子発現パターンをcDNAマイクロアレイで解析したところ、各細胞株由来耐性細胞において共通に発現変動する遺伝子が認められた。さらにアノテーション解析を行ったところ、耐性細胞で亢進しているシグナル経路として3経路、低下しているものとして5経路が同定された。共通して亢進している遺伝子群にABCトランスポーターが含まれていることから、これらの経路や遺伝子は耐性化に一定以上の役割を担っているものと期待される。

研究成果の概要(英文)：EGFR-TKI resistant cells were isolated in three non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines, using FRET biosensor and flow cytometer. cDNA microarray analysis showed common gene expression changes among the resistant cells. Annotation analysis revealed three up-regulated pathways and five down-regulated pathways. The ABC transporter system was included in the genes and pathways, which were found to be changed in relation to the acquired resistance, suggesting that this system could be involved in the resistance to EGFR-TKI in NSCLCs.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR-TKI 薬剤耐性 FRETバイオセンサー バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

上皮性成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) によって EGFR 遺伝子変異陽性・非小細胞肺癌の治療成績は向上した。しかし、癌細胞が完全に消失する訳ではなく、腫瘍細胞集団中の EGFR-TKI 非感受性癌細胞が残存し、その再増殖による再燃は EGFR-TKI に対する耐性化を生じる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、非感受性・耐性獲得メカニズムを解明して、非感受性・耐性克服のための戦略、とくに標的分子の同定、創薬に繋げることである。具体的には、EGFR-TKI 感受性を示す EGFR 遺伝子変異陽性・非小細胞肺癌において、1 細胞レベルで分子の活性化をモニターできる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) バイオセンサーを用いて、同一腫瘍内の EGFR-TKI 感受性細胞と非感受性細胞を分離し、遺伝子発現等両者の相違を明らかにした。

### 3. 研究の方法

FRET の原理を用いて、生きた肺癌細胞において、1 細胞レベルでの EGFR の活性および薬剤による抑制効果を定量的に検出可能なバイオセンサーを開発する。このバイオセンサーを用いて、1 細胞レベルでの EGFR-TKI 薬効評価を行う。セルソーターを用いて、EGFR-TKI 非感受性細胞を単離し、遺伝子発現パターンや細胞生物学的性質を感受性細胞と比較することによって、非感受性・耐性獲得メカニズムやその原因遺伝子を明らかにする。

### 4. 研究成果

開発した EGFR 活性測定 FRET バイオセンサーとフローサイトメーターを用いて、EGFR 阻害薬耐性細胞を単離した。耐性細胞の遺伝子発現パターンを cDNA マイクロアレイで解析したところ、2 倍以上発現亢進した遺伝子は HCC827 細胞で 3368、PC3 細胞で 3411、PC9 細胞で 1696 であった。また、発現低下したものは HCC827 細胞で 4034 遺伝子、PC3 細胞で 2960 遺伝子、PC9 細胞で 1608 遺伝子であった。単離した耐性細胞の EGFR には 2 次的変異がないことを塩基配列解析で確認しており、耐性化は EGFR 変異以外の機序によるものと考えられた。

さらに、各細胞株由来耐性細胞において共通に発現変動が認められた遺伝子を調べた。2 つ以上の細胞株で発現亢進した遺伝子は 2032 あり、その内訳は 3 細胞株で 2 倍以上発現亢進が認められたもの 8、2 細胞株で 2 倍以上かつ他の細胞株で 2 倍以下の発現亢進だったもの 83、2 細胞株でのみ 2 倍以上発現亢進したものの 150、1 細胞株で 2 倍以上かつ 2 細胞株で 2 倍以下の亢進だったもの 311、3 細胞株で 2 倍以下の発現亢進が認められたもの 1480 であった。一方、発現低下した遺伝

子は 1453 で、すべての細胞株で 2 倍以上低下したものの 18、2 細胞株で 2 倍以上かつ 1 細胞株で 2 倍以下の発現低下だったもの 77、2 細胞株のみで 2 倍以上の発現低下したものの 166、1 細胞株で 2 倍以上かつ 2 細胞株で 2 倍以下の発現低下 298、3 細胞株で 2 倍以下の発現低下が認められたもの 894 であった。

さらにアノテーション解析を行ったところ、耐性細胞で亢進しているシグナル経路として 3 経路、低下しているものとして 5 経路が同定された。共通して亢進している遺伝子群に ABC トランスポーターが含まれていることから、これらの経路や遺伝子は耐性化に一定以上の役割を担っているものと期待される。

### 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 12 件)

1. Takashina T, Kinoshita I, Kikuchi J, Shimizu Y, Sakakibara-Konishi J, Oizumi, S, Nishimura M, Dosaka-Akita H. Combined inhibition of EZH2 and HDACs as a potential epigenetic therapy for non-small cell lung cancer cells. **Cancer Sci**, in press; 査読有; 国際共著該当なし; DOI:未登録; オープンアクセス○
2. Elmansuri AZ, Tanino MA, Mahabir R, Wang L, Kimura T, Nishihara H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Tsuda M, Tanaka S. Novel signaling collaboration between TGF-β and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer. **Oncotarget**, in press; 査読有; 国際共著該当なし; DOI:10.18632/oncotarget.8314; オープンアクセス×
3. R. Okumura, T. Kurakawa, T. Nakano, H. Kayama, M. Kinoshita, D. Motooka, K. Gotoh, T. Kimura, N. Kamiyama, T. Kusu, Y. Ueda, H. Wu, H. Iijima, S. Barman, H. Osawa, H. Matsuno, J. Nishimura, Y. Ohba, S. Nakamura, T. Iida, M. Yamamoto, E. Umemoto, K. Sano and K. Takeda. Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. **Nature** 532: 117-121, 2016; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1038/nature17406; オープンアクセス×

4. T. Yamada, M. Tsuda, T. Wagatsuma, Y. Fujioka, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, Y. Totsuka, H. Haga, S. Tanaka, M. Shindoh and Y. Ohba. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand induces cell adhesion and integrin  $\alpha$ 2 expression via NF- $\kappa$ B in head and neck cancers. **Sci. Rep.** 6:23545, 2016; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1038/srep23545; オープンアクセス
5. T. Inuzuka, Y. Fujioka, M. Tsuda, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka and Y. Ohba. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. **Sci. Rep.** 6: 21613, 2016; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1038/srep21613; オープンアクセス
6. S. Yamamoto, Y. Yako, Y. Fujioka, M. Kajita, T. Kameyama, S. Kon, S. Ishikawa, Y. Ohba, Y. Ohno, A. Kihara and Y. Fujita. A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in Epithelial Defense Against Cancer (EDAC). **Mol. Biol. Cell** 27: 491-499, 2016; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1091/mbc.E15-03-0161; オープンアクセス
7. Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, and Dosaka-Akita H. Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers. **Oncology** 88:298-308, 2015; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1159/000369495; オープンアクセス ×
8. Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Ito T, Kiuchi T, Ono A, Miyajima S, Nagai K, Higashi T, Matsuno Y, Dosaka-Akita H, Nishimura M, Miwa S, Kasahara M. Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. **Lab Invest.** 95:625-34, 2015; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1038/labinvest.2015.43; オープンアクセス ×
9. Y. Makino, M. Tsuda, Y. Ohba, H. Nishihara, H. Sawa, K. Nagashima and S. Tanaka. Tyr724 phosphorylation of ELMO1 by Src is involved in cell spreading and migration via Rac1 activation. **Cell Commun. Signal.** 13: 42, 2015; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1186/s12964-015-0113-y; オープンアクセス
10. T. Tsukiyama, A. Fukui, S. Terai, Y. Fujioka, K. Shinada, H. Takahashi, T.P. Yamaguchi, Y. Ohba and S. Hatakeyama. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. **Mol. Cell. Biol.** 35: 2007-2023, 2015; 査読有; 国際共著該当; DOI: 10.1128/MCB.00159-15; オープンアクセス
11. R. Matsumoto, M. Tsuda, L. Wang, N. Maishi, T. Abe, T. Kimura, M. Tanino, H. Nishihara, K. Hida, Y. Ohba, N. Shinohara, K. Nonomura and S. Tanaka. Adaptor protein CRK induces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met feedback loop. **Cancer Sci.** 106: 709-17, 2015; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.1111/cas.12662; オープンアクセス
12. Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba. Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane. **Anal. Sci.**, 31: 267-274, 2015; 査読有; 国際共著該当なし; DOI: 10.2116/analsci.31.267; オープンアクセス

〔学会発表〕(計2件)

1. 大場雄介: 蛍光バイオイメージングによるシグナル伝達と細胞機能の評価  
CVMW2015 心血管代謝週間(招待講演)  
2015年12月10日~2015年12月12日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

2. 大場雄介: 蛍光バイオセンサーを用いた臨床診断技術開発とその応用 BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)(招待講演) 2015年12月1日~4日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔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：  
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

秋田 弘俊 (Akita Hirotoshi)  
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：70222528

### (2)研究分担者

大場 雄介 (Ohba Yusuke)  
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：30333503

### (3)研究分担者

木下 一郎 (Kinoshita Ichiro)  
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号：40343008