

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860606

研究課題名(和文) 分子標的治療による小細胞肺癌に対する新規治療法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of novel molecular targeted therapy against small-cell lung cancer

研究代表者

南 俊行(MINAMI, TOSHIYUKI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00705113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HER2とEphA2の2つの分子が小細胞肺癌の治療標的分子となるかを検討した。HER2を標的とした先進医療としてtrastuzumabとirinotecanの併用療法を行い、再々発HER2陽性小細胞肺癌2症例の病勢を制御する事ができた。Trastuzumab emtansineはirinotecan耐性HER2陽性小細胞肺癌細胞のマウス皮下移植片の増殖を有意に抑制した。また、EphA2ノックダウンやdasatinibによる機能阻害は、EphA2陽性小細胞肺癌細胞にsenescenceを誘導し、その増殖を抑制した。以上から、HER2とEphA2は小細胞肺癌の新たな治療標的となり得ると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic strategy against small-cell lung cancer (SCLC) has not improved over the last two decades. We examined the potential of HER2 and EphA2 as therapeutic targets in SCLC. We first evaluated HER2 expression by immunohistochemistry. HER2 expression was detected in 28% of diagnostic biopsy SCLC specimens. Then, we performed trastuzumab plus irinotecan combination therapy in two patients with HER2-positive SCLC. This combination therapy resulted in successful disease control in both patients. We next validated the antitumor activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in SCLC. T-DM1 induced apoptosis and suppressed the growth of HER2-positive irinotecan resistant SCLC xenografts in mice. We further evaluated the biological effects of EphA2 inhibition. EphA2 knockdown and functional inhibition by dasatinib brought about senescence in EphA2-positive SCLC cells, and inhibited their proliferation. These results indicate that HER2 and EphA2 could be novel therapeutic candidates in SCLC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小細胞肺癌 抗癌剤耐性 分子標的治療 HER2 EphA2

1. 研究開始当初の背景

肺癌の約 15%を占める小細胞肺癌 (Small Cell Lung Cancer; SCLC) は、その高増殖性・高転移性・易抗癌剤耐性獲得性のため極めて予後不良である。SCLC に対しては、抗癌化学療法がその治療の中心だが、現在使用可能な抗癌剤は 4 つ程で、20 年以上治療法は変わっていない。特に再発後の治療法に関しては、有効な治療法は確立されておらず、さらに、近年種々の悪性腫瘍において効果を挙げている分子標的薬についても、SCLC において有効性が確認された薬剤は皆無である。SCLC 患者の予後の改善には、新たな治療法の確立が急務であり、速やかに日常診療へ応用するためのトランスレーショナルリサーチを推進する必要がある。

我々は、乳癌や胃癌で既に治療標的となっている HER2 が SCLC においても治療標的となりうるかについて研究を行ってきた。その結果、SCLC 細胞を用いた前臨床実験で、欧米人由来より日本人由来の SCLC 細胞株で HER2 は高頻度に発現している事、抗癌剤耐性化に伴いその発現が増強する事 (Minami et al. Mol Cancer Ther 11: 830-41, 2012)、抗 HER2 抗体である trastuzumab が、特に抗癌剤耐性化した SCLC 細胞に対し、免疫細胞を介した抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を強力に惹起する事を報告した (Minami et al. Sci Rep 3: 2669, 2013)。

また、HER2 以外の治療標的となりうる分子として、近年、SCLC において EphA2 の遺伝子変異が報告された (Peifer et al. Nat Genet 44:1104-1110, 2012)。EphA2 の癌における役割は増殖・転移浸潤・血管新生など多岐に及ぶとされているが、SCLC における機能に関しては、これまでに解析されておらず、治療標的となり得るかは不明である。

2. 研究の目的

SCLC において、HER2 を標的とした分子標的治療が実臨床へ応用可能か、また、EphA2 が新たな治療標的分子となり得るかを検討する。

3. 研究の方法

(1) HER2 陽性再発 SCLC に対する trastuzumab の臨床応用

ヒト SCLC 生検組織における HER2 の発現を免疫染色法によって検討する。再発 HER2 陽性 SCLC 症例に対する trastuzumab と CPT-11 の併用療法を先進医療として行う。

(2) HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 細胞に対する trastuzumab emtansine (T-DM1) の抗腫瘍効果の検討 (前臨床)

HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、T-DM1 を尾静脈より投与し、その抗腫瘍効果を検討する。

T-DM1 の薬剤分布について in vivo

imaging system (IVIS) を用いて検討する。

(3) EphA2 を標的とした SCLC に対する新たな分子標的治療法の開発

EphA2 の発現を種々の SCLC 細胞およびヒト SCLC 生検検体で検討する。

siRNA による EphA2 ノックダウンの SCLC 細胞に対する効果を検討

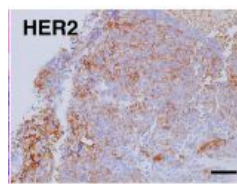
EphA2 阻害剤として Dasatinib を用い、EphA2 陽性 SCLC 細胞への抗腫瘍効果を検討する。

EphA2 阻害による SCLC 細胞への影響を分子生物学的に検討する。

4. 研究成果

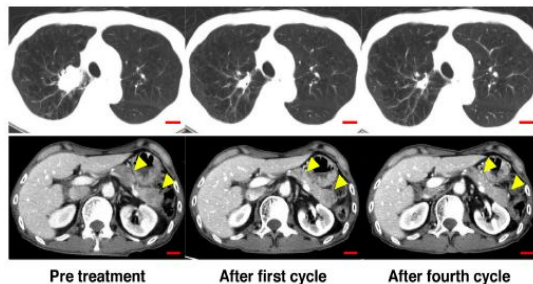
(1) HER2 陽性再発 SCLC に対する trastuzumab の臨床応用

ヒト SCLC 生検における HER2 発現



現時点で、34 例のヒト SCLC 生検検体において HER2 の発現を 14 例に確認した。

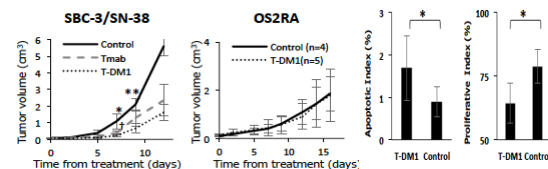
再発 HER2 陽性 SCLC 症例に対する trastuzumab と irinotecan 併用療法 (先進医療)



HER2 陽性が確認された再発 SCLC 2 症例に対し、trastuzumab と irinotecan の併用療法を先進医療として施行し、1 例で部分寛解、もう 1 例においても病勢コントロールができ、それぞれ 4.5 ヶ月と 3.5 ヶ月の無増悪生存期間を得た。特に原発巣での効果が高かった一方で、骨転移については効果が乏しかった。骨病変においては、ADCC が惹起されにくかった可能性があり、今後も留意する必要があると考えられた。

(2) HER2 陽性抗癌剤耐性 SCLC 細胞に対する T-DM1 の抗腫瘍効果 (前臨床)

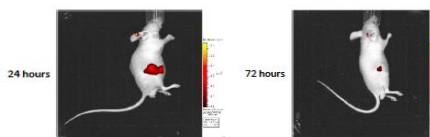
T-DM1 の抗腫瘍効果 (in vivo)



T-DM1 は HER2 陽性イリノテカン耐性 SCLC の SBC-3/SN-38 細胞にアポトーシスを誘導し、マウス皮下移植片の増大を有意に抑制した。その一方で HER2 陰性の OS2RA 細胞に対しては、抗腫瘍効果をもたらさず、

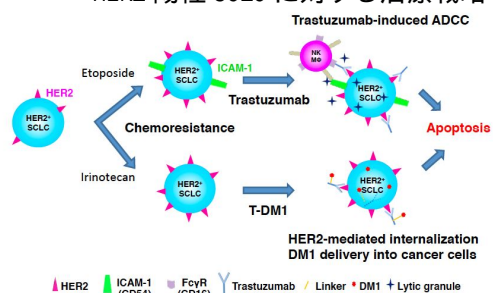
T-DM1の抗腫瘍効果はHER2の発現に依存していると考えられた。

T-DM1の薬剤分布



蛍光標識したT-DM1はマウスの尾静脈から投与後24時間以内に速やかに皮下の腫瘍に集積し、72時間後にはそのシグナルはほぼ確認できなくなった。T-DM1がその抗腫瘍効果を発揮するには、DM1の細胞内releaseのため、internalizeする事が不可欠であるが、上記の結果は、T-DM1がHER2陽性SCLC細胞において速やかに細胞内にinternalizationし、分解されている事を示唆していると考えられる。

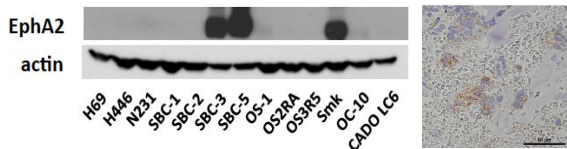
HER2陽性SCLCに対する治療戦略



進展型SCLCにおいては標準治療として1st lineでetoposideまたはirinotecanを用いた治療が行われる。これまでの研究から、耐性獲得時にHER2の発現と共に接着因子Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1の増強が予想されるetoposide耐性SCLC症例には、trastuzumabによるADCCが強力に惹起される事が期待されるため、trastuzumabとirinotecanの併用療法を行い、一方、ICAM-1の発現増強が期待できないirinotecan耐性SCLC症例にはT-DM1による治療が有望ではないかと考えられた(上図)。

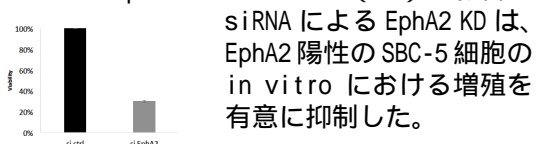
(3) EphA2を標的としたSCLCに対する新たな分指標的治療法

SCLCにおけるEhA2の発現

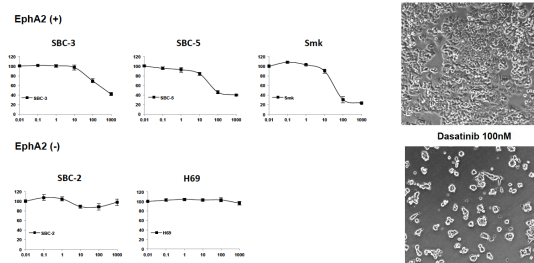


我々は、まずヒトSCLC細胞およびヒト生検検体におけるEphA2の発現をそれぞれwestern blot法および免疫染色法によって確認した。その結果、13種類のSCLC細胞株の内3種で、ヒト生検検体でも約15%の頻度でEphA2の発現を確認した。

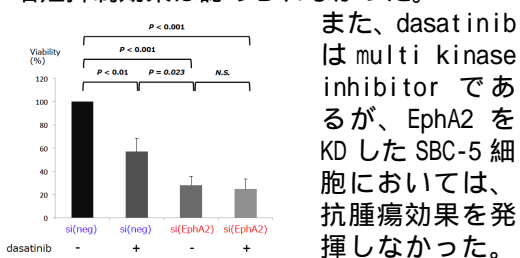
EphA2ノックダウン(KD)の影響



EphA2阻害剤としてのdasatinibの抗腫瘍効果

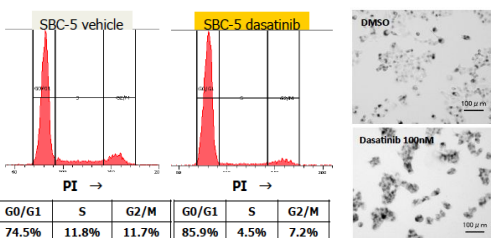


dasatinibは臨床応用可能な薬剤濃度(100nM)でEphA2陽性SCLC細胞(SBC-3, SBC-5, Smk)の増殖を抑制したが、EphA2陰性SCLC細胞(H69, SBC-2)においては、増殖抑制効果は認められなかった。



また、dasatinibはmulti kinase inhibitorであるが、EphA2をKDしたSBC-5細胞においては、抗腫瘍効果を発揮しなかった。この結果、dasatinibはEphA2陽性SCLC細胞において確かにEphA2の活性を阻害する事で、抗腫瘍効果を発揮している事を確認する事ができた。

EphA2阻害の抗腫瘍効果のメカニズムの検討



当初、dasatinibやsiRNAによるEphA2阻害のメカニズムとしては、ErkやAktシグナルへの阻害効果を想定し、western blot法で評価したが、これらのシグナルに関してdasatinibおよびsiRNAは明らかな阻害効果を及ぼしていなかった。次に細胞周期をFlow cytometryで解析した所、dasatinibはSBC-5細胞に対し、G0/G1 arrestを誘導していた(上図左)。さらに、dasatinibに曝露したSBC-5細胞においてSA-gal陽性細胞が著明に増加しており(上図右)EphA2阻害は、senescenceを誘導している事が明らかとなった。

以上の結果、HER2を標的としたtrastuzumabおよびT-DM1を用いた分子標的治療は再発SCLCに対して実臨床においても有望であると考えられた。また、EphA2はSCLCにおいて、その発現頻度は低いものの、dasatinibやsiRNAによるEphA2の阻害作用がもたらすsenescenceは、高増殖性が生物学的特徴であるSCLCの制御について、非常に合理的に抗腫瘍効果をもたらす得ると考えられる。

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 2 件)

1. Yuhei Kinehara*, Toshiyuki Minami*, Takashi Kijima, Shigenori Hoshino, Osamu Morimura, Tomoyuki Otsuka, Yoshitomo Hayama, Kiyoharu Fukushima, Yoshiko Takeuchi, Masayoshi Higashiguchi, Kotaro Miyake, Haruhiko Hirata, Izumi Nagatomo, Koji Inoue, Yoshito Takeda, Hiroshi Kida, Atsushi Kumanogoh. Favorable response to trastuzumab plus irinotecan combination therapy in two patients with HER2-positive relapsed small-cell lung cancer. Lung Cancer.2015;87(3):321-5 (*Equal contributor) 査読有
2. Kayoko Morio, Toshiyuki Minami, Takashi Sozu, Kazuyuki Niki, Takashi Kijima, Etsuko Uejima. Weight Loss Associated with Platinum-Based Chemotherapy in Patients with Advanced Lung Cancer. Chemotherapy. 2016;61(5):256-61 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Toshiyuki Minami, Takashi Kijima, Osamu Morimura, Yuhei Kinehara, Masayoshi Higashiguchi, Kotaro Miyake, Haruhiko Hirata, Yoshiko Takeuchi, Kiyoharu Fukushima, Yoshitomo Hayama, Koji Inoue, Izumi Nagatomo, Yoshito Takeda, Hiroshi Kida, Atsushi Kumanogoh. Targeting stepwise HER2 and VEGF can overcome multidrug resistance in small cell lung cancer. AACR (American Association for Cancer Research) 105th Annual Meeting. (Apr.5,2016-Apr.9,2016) San Diego, CA, USA.
2. 甲原雄平, 南 俊行, 木島貴志, 福島清春, 葉山善友, 平田晴彦, 井上幸治, 熊ノ郷 淳、Trastuzumab-based Chemotherapy for HER2-positive Refractory Relapsed Small-Cell Lung Cancer (from Bench to Bed Side)、第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2014 年 7 月 17 日~2014 年 7 月 19 日、福岡
3. 森村 治, 南 俊行, 木島貴志, 武田吉人, 長友 泉, 熊ノ郷 淳、EphA2 receptor inhibition suppresses proliferation of small cell lung cancer (SCLC) cells via cell senescence、第 73 回日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 25 日~2014 年 9 月 27 日、横浜
4. 南 俊行, 甲原雄平, 木島貴志, 星野茂

則, 森村 治, 東口将佳, 三宅浩太郎, 竹内美子, 葉山善友, 福島清春, 長 彰翁, 石島里佳子, 仲谷健史, 松木孝典, 大塚倫之, 平田晴彦, 井上幸治, 長友 泉, 武田吉人, 木田 博, 熊ノ郷 淳、HER2 陽性再発小細胞肺癌に対する irinotecan + trastuzumab 併用療法(基礎研究から臨床応用まで)、第 55 回日本肺癌学会学術集会、2014 年 11 月 14 日~2014 年 11 月 16 日、京都

5. 森村 治, 木島貴志, 南 俊行, 小山正平, 甲原雄平, 長 彰翁, 大塚倫之, 熊ノ郷 淳、トラスツズマブ-エムタンシン(T-DM1)は抗癌剤およびトラスツズマブ耐性 HER2 陽性小細胞肺癌の増殖を抑制する、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 8 日~2016 年 4 月 10 日、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 俊行 (MINAMI TOSHIYUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号: 00705113

(2)研究分担者

森村 治 (MORIMURA OSAMU)
大阪大学・大学院医学系研究科・院生
研究者番号: 80743765

(3)連携研究者 なし