

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10258

研究課題名(和文) 肺癌におけるチロシンキナーゼ阻害剤耐性化後の放射線を併用した新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategy for EGFR-TKI resistant non-small cell lung cancer.

研究代表者

浅野 博昭 (Asano, Hiroaki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70534775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体遺伝子に変異を有する非小細胞肺癌において、チロシンキナーゼ阻害剤に対する獲得耐性の克服が急務である。本研究では、HCC827とHCC4006とH1299肺癌細胞株から樹立した癌幹細胞様の特徴を有する耐性株において、薬剤耐性に関与するABCB1蛋白のmRNA発現が著しく増加していることを発見した。ABCB1のノックダウンにより、化学療法薬(ドセタキセル)に対する感受性を回復させることができた。第3世代ABCB1阻害剤であるElacridaの有用性について検討し、論文発表を行った。

研究成果の概要(英文)：One of the most pressing needs for NSCLC with EGFR mutation is to overcome the acquired resistance to EGFR-TKI targeted therapy. We established EGFR-TKI resistant HCC827, HCC4006 and H1299 cells harboring stem cell-like properties. In these EGFR-TKI resistant cells, we detected overexpression of ABCB1 mRNA. Restoration of sensitivity to chemotherapeutic agent (docetaxel) was observed by knocking down of ABCB1 expression. We further observed the usefulness of 3rd generation ABCB1 inhibitor "Elacrida" to EGFR-TKI resistant lung cancer cells harboring stem cell-like properties.

研究分野：外科系臨床医学

キーワード：肺癌 EGFR-TKI耐性 ABCB1阻害剤 Elacrida

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (EGFR) に遺伝子変異を有する肺癌に対して、分子標的治療薬であるゲフィチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の有効性が報告されてから、肺癌の薬物療法は目覚ましい発展を遂げた。本邦では欧米と比較し、非小細胞肺癌において EGFR 遺伝子のエクソン 19 と 21 に変異が多いことが知られている。これらの症例の約 80% で EGFR-TKI が著効するが、そのほとんどが 2 年以内に EGFR-TKI 耐性となっている。EGFR-TKI 耐性となった後の治療法は未だに十分に確立されておらず、早急に解決すべき重要な課題となっている。

我々は、現在までに肺癌において EGFR 遺伝子変異の頻度、EGFR-TKI に対する獲得耐性としての EGFR T790M 変異や MET 遺伝子増幅、EGFR コピー数の増加などの研究を行い、その成果を発表してきた。

近年、肺癌においてもアルデヒド脱水素酵素 (ALDH1A1) や CD133 の表面マーカーを有した癌幹細胞の存在が示唆されている。これらの癌幹細胞は、自己複製能を有しており、癌の維持や増殖に重要な役割を担うだけでなく、高い薬剤排出能力、DNA 修復能力を有し、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが知られている。申請者らの検討でも、化学放射線療法後の肺癌検体において、CD133 と ALDH1A1 蛋白が発現している症例では有意に予後が不良であることが判明しており、治療後の再発にも重要な役割を果たしていると考えている。

2. 研究の目的

上皮成長因子受容体 (EGFR) に遺伝子変異を有する非小細胞肺癌において、チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) に対する獲得耐性の克服が課題となっている。

本研究では、MET 遺伝子増幅や癌幹細胞様の特徴を獲得した EGFR-TKI 耐性獲得後の治療戦略として、EGFR-TKI 耐性株を樹立して、その分子腫瘍学的な特徴を検討することで、EGFR-TKI 耐性化後の肺癌に対する新しい治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) EGFR-TKI 耐性株の樹立・維持

EGFR-TKI 耐性化の機序は多岐にわたっているため、HCC827 肺癌細胞株、HCC4006 肺癌細胞株、H1299 肺癌細胞株などの複数の肺癌細胞株にゲフィチニブを暴露させて複数の耐性株を樹立する。

(2) EGFR-TKI 耐性株の分子腫瘍学的考察

HCC827 肺癌細胞株では、我々の以前の研究において、(a) MET 遺伝子の増幅を有する HCC827-GRs と (b) 癌幹細胞様の特性を持つ

HCC827-GRh1 と HCC827-GRh2 を樹立しており、これらの耐性株は多くの薬剤や放射線に耐性を認めている (表 1、図 1)。

HCC827 以外にも HCC4006 肺癌細胞株、H1299 肺癌細胞株においても耐性株を樹立する。

表1 HCC827耐性株の各種薬剤耐の変化性

細胞株	抗癌剤		HDAC阻害剤		HSP90阻害剤		不可逆的 ErbB7系阻害剤
	DOC	PTX	TSA	SAHA	17-DMAG	AUY-922	afatinib
HCC827	0.0021	0.0032	0.082	1.85	0.027	0.0069	0.00035
HCC827-GRs	0.0020	0.0020	0.092	0.63	0.0087	0.0044	4.16*
HCC827-GRh1	0.022*	0.15*	0.097	2.05	0.44*	0.014	8.17*
HCC827-GRh2	0.51*	1.46*	0.092	2.20	2.99*	5.98*	4.57*

* IC50値が親株の10倍以上に増加

(申請者ら CancerRes2013より抜粋)

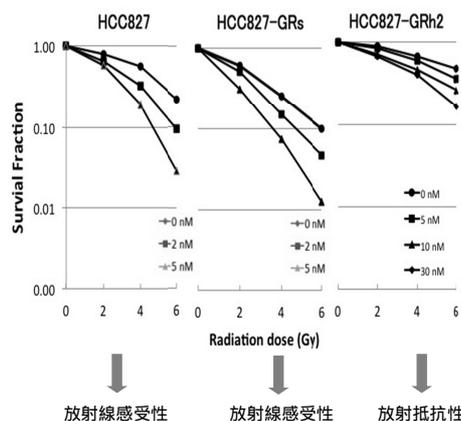
(DOC:ドセタキセル, PTX:パクリタキセル, TSA:トリコスタチンA, SAHA:ボリノスタット)

MET 増幅を伴う耐性株 (HCC827-GRs) については、新規 HSP90 阻害剤である AUY-922 と放射線の併用の有用性についてすでに報告している (図 1)、本研究では癌幹細胞様の特徴を有する HCC827 の EGFR-TKI 耐性株 (HCC822-GRh1, GRh2) と HCC4006、HCC1299 の EGFR-TKI 耐性株を分子腫瘍学的に考察し、EGFR-TKI 耐性化を克服するための新規治療法について検討する。

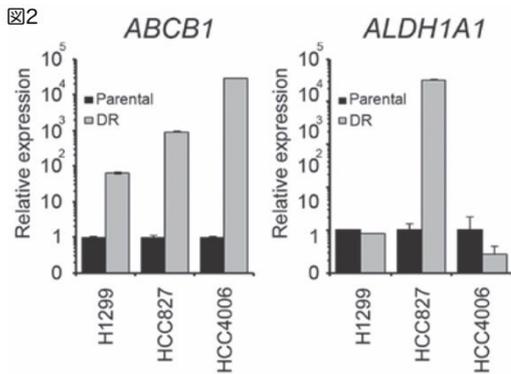
4. 研究成果

癌幹細胞様の特徴を有する HCC827、HCC4006 の EGFR-TKI 耐性株を分子腫瘍学的に考察したところ、薬剤耐性に関する ABCB1

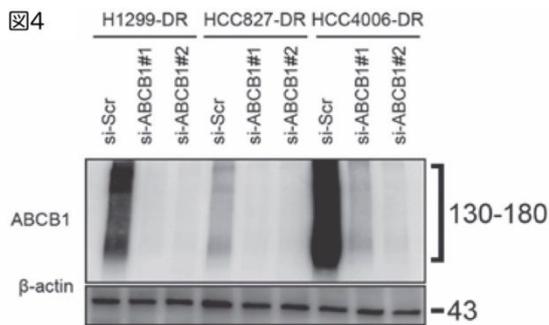
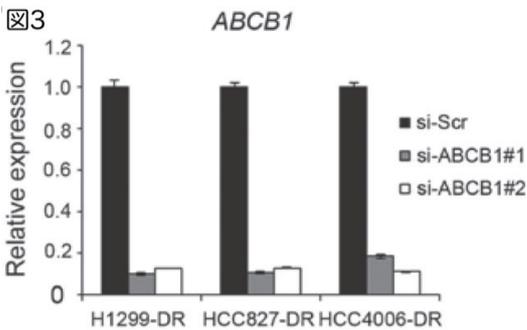
図1 AUY-922投与下のclonogenic survival assay



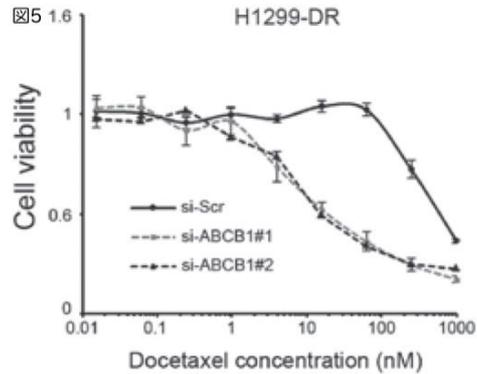
蛋白 (薬剤排出トランスポーター) の mRNA 発現がそれぞれ約 1000 倍、約 10000 倍以上に著しく増加していた (図 2)。また、HCC827 の EGFR-TKI 耐性株は癌幹細胞マーカーの 1 つである ALDH1A1 を高発現していた (図 2)。



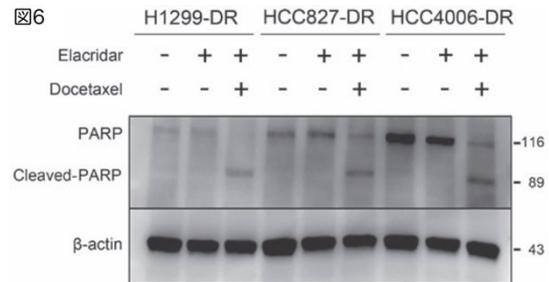
我々は薬剤排出トランスポーターである ABCB1 蛋白の高発現が薬剤耐性の一因と考えて、siRNA を用いて ABCB1 をノックダウンした。3 種類の EGFR-TKI 耐性株において ABCB1 をノックダウンすると、ABCB1 の mRNA 発現は約 1/10 に低下した(図 3)。また、Western blot にて ABCB1 蛋白の発現も低下していることを確認した(図 4)。



これらの結果をもとに、ドセタキセルへの感受性の変化を調べるために、siRNA を用いて ABCB1 をノックダウンした EGFR-TKI 耐性 H1299 肺癌細胞株にドセタキセルを投与し、MST アッセイを行った。EGFR-TKI 耐性 H1299 肺癌細胞株は、siRNA 投与前にはドセタキセルに耐性を示していたが、コントロール (si-Scr) に比較してドセタキセルへの感受性が回復していた(図 5)。



siRNA の代わりに、第 3 世代の ABCB1 阻害剤である Elacridar を投与したところ、3 種類の EGFR-TKI 耐性株とも、Elacridar とドセタキセルの併用時のみにアポトーシスを示唆する cleaved-PARP を認めた(図 6)。EGFR-TKI 耐性肺癌細胞株における第 3 世代 ABCB1 阻害剤の有用性について検討し、論文化を行った。



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 1 件)

Chen H, Shien K, Suzawa K, Tsukuda K, Tomida S, Sato H, Torigoe H, Watanabe M, Namba K, Yamamoto H, Soh J, Asano H, Miyoshi S, Toyooka S. Elacridar, a third-generation ABCB1 inhibitor, overcomes resistance to docetaxel in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*. 査読あり、14(4)、2017、4349-4354、DOI: 10.3892/ol.2017.6678

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 博昭 (ASANO, Hiroaki)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：70534775

(2) 研究分担者

佃 和憲 (TSUKUDA, Kazunori)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：20346430

(3)連携研究者

豊岡 伸一 (TOYOOKA, Shinichi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30397880

宗 淳一 (SOU, Junichi)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：90559890

山本 寛斉 (YAMAMOTO, Hiromasa)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：40467733

(4)研究協力者

諏澤 憲 (SUZAWA, Ken)

大塚 智昭 (OTSUKA, Tomoaki)

陈海洋 (CHEN, Haiyang)