

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790768

研究課題名（和文） 宿主由来 HGF による変異型 EGFR 陽性肺癌のゲフィチニブ耐性機構解析とその克服

研究課題名（英文） Crosstalk to Stromal Fibroblasts Induces Resistance of Lung Cancer to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors

研究代表者

ワン ウェイ (WANG WEI)

金沢大学・がん研究所・博士研究員

研究者番号：80467117

研究成果の概要（和文）：上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブおよびエルロチニブは、EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) に奏効性が高い。しかし、奏効例もほぼ例外なく 1～数年以内に耐性を獲得し再燃することが次なる問題となっている。

宿主の間質細胞は癌細胞の機能を修飾することが知られているが、癌細胞の分子標的薬感受性に及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞の EGFR-TKI 感受性における間質細胞が果たす役割を検討した。

EGFR 遺伝子変異 (Exon 19 の欠失) を有する肺癌細胞株 (PC-9、HCC827) と線維芽細胞を共培養し、*in vitro* におけるゲフィチニブ感受性を MTT 法で検討した。また *in vivo* における検討として、PC-9 と線維芽細胞をあらかじめ混ぜた後に SCID マウスの皮下に移植し、4 日後からゲフィチニブを連日経口投与し治療効果を評価した。HGF 産生は ELISA 法で測定した。線維芽細胞の遊走能はダブルチャンバー法で検討した。

線維芽細胞株および肺癌患者の腫瘍組織から樹立した初代培養線維芽細胞は種々の濃度の HGF (hepatocyte growth factor) を産生した。肺癌細胞株は線維芽細胞の遊走を著明に誘導した。肺癌細胞株 PC-9 と HCC827 はゲフィチニブに高い感受性を示したが、線維芽細胞と共培養することで耐性となった。線維芽細胞によるゲフィチニブ耐性は、抗 HGF 中和抗体や NK4 (HGF の受容体結合阻害物質) により解除された。さらに、PC-9 の皮下腫瘍はゲフィチニブ治療に高い感受性を示したが、線維芽細胞をあらかじめ混ぜて接種するとゲフィチニブ治療によっても縮小せず、耐性化がみられた。しかし、抗 HGF 中和抗体や NK4 を併用することで耐性は解除され、腫瘍は著明に縮小した。

以上より、線維芽細胞は肺癌細胞により腫瘍局所にリクルートされ種々の濃度の HGF を産生するが、HGF を高産生する場合には EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞の EGFR-TKI 耐性を誘導することが明らかとなった。宿主間質細胞との相互作用は癌細胞の EGFR-TKI 感受性において非常に重要な役割を果たしており、耐性克服の治療標的となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

**Purpose:** Lung cancers with *EGFR* activating mutations show good clinical response to gefitinib and erlotinib, selective TKIs to epidermal growth factor receptor (EGFR), but these tumors invariably develop drug resistance. Host stromal cells have been found to have a considerable effect on the behavior of cancer cells. Little is known, however, about the role of host cells on the sensitivity of cancer cells to receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs). We have therefore assessed the effect of crosstalk between stromal cells and lung cancer cells harboring *EGFR* mutations on susceptibility to EGFR-TKIs.

**Experimental design:** We evaluated the gefitinib sensitivity of lung cancer cells with *EGFR* activating mutations, PC-9 and HCC827, when co-cultured with fibroblasts and co-injected into SCID mice. We also examined the effect of lung cancer cells to fibroblasts recruitment.

**Results:** Both human fibroblast cell lines and primary cultured fibroblasts produced various level of HGF. Lung cancer cells markedly recruited fibroblasts. The lung cancer cells became resistant to EGFR-TKIs when co-cultured *in vitro* with HGF-producing fibroblasts and co-injected into SCID mice. Importantly, combined use of gefitinib plus anti-HGF antibody or the HGF antagonist, NK4 successfully overcame the fibroblast-induced EGFR-TKI resistance both *in vitro* and *in vivo*. Co-localization of fibroblasts and HGF was detected in both xenograft tumors in mouse model and lung cancer patient specimens.

**Conclusions:** These findings indicate that crosstalk to stromal fibroblasts plays a critical role in lung cancer resistance to EGFR-TKIs and may be an ideal therapeutic target in lung cancer with *EGFR* activating mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、分子標的治療、薬剤耐性、肝細胞増殖因子、線維芽細胞、ゲフィチニブ

1. 研究開始当初の背景

肺癌はわが国における悪性新生物による死亡原因の第1位であるが、上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)であるゲフィチニブやエルロチニブは欧米人よりも日本人に奏効例が多く、さらに腺癌、女性、非喫煙者に高い奏効率を示すことがわが国主導で実施された国際多施設臨床第III相試験で明らかにされた(Fukuoka M, Yano S, et al, J Clin Oncol 2003)。最近、EGFR-TKIは上記の肺癌患者群に延命効果を有することが示され肺癌治療において重要な分子標的薬であるが、著効症例においてもその大半が1年程度で獲得耐性を生じ再燃する(獲得耐性)ことや、EGFR活性型変異を有するにもかかわらず25-30%の症例ではEGFR-TKIが奏効しない(自然耐性)ことが臨床で大きな問題となっている。

2004年にEGFR活性型変異を有する肺腺癌にEGFR-TKIが著効することが、2005年にEGFRのExon20に生じるT790M変異がEGFR-TKI耐性を誘導することが、さらに2007年にMET遺伝子の増幅がEGFR-TKI耐性を誘導することが報告された。しかしこれらの報告はいずれも米国の研究施設からなされたものである。わが国からは、臨床検体を用いた臨床研究としてこれらの因子の臨床的重要性を確認する報告が数多くな

され本領域研究の発展に大きく貢献しているが、EGFR-TKIの新規感受性・耐性規定因子の発見というオリジナリティという面からは、わが国の研究は海外に遅れをとっているといわざるを得ない現状である。

最近われわれは、肝細胞増殖因子(HGF)がその受容体であるMETチロシンキナーゼの活性化を介して、EGFRやERBB3とは独立にPI3K/Akt経路を活性化することにより、EGFR活性型変異を有する肺腺癌株のゲフィチニブ耐性を誘導する新たな機構を明らかにした。臨床検体における検討でも、既報の耐性機序(T790M second mutationやMET増幅)を有しない獲得耐性症例や自然耐性症例の腫瘍においてHGF過剰発現がみられることを見出し、HGFによるMET活性化がEGFR活性型変異を有する肺腺癌のゲフィチニブ耐性の機序の一つであることを明らかにした。

一方、宿主の間質細胞は癌細胞の機能を修飾することが知られているが、癌細胞の分子標的薬感受性に及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究ではEGFR遺伝子変異を有する肺癌細胞のEGFR-TKI感受性における間質細胞が果たす役割を検討した。

### 3. 研究の方法

EGFR 遺伝子変異 (Exon 19 の欠失) を有する肺癌細胞株 (PC-9、HCC827) と線維芽細胞を共培養し、*in vitro* におけるゲフィチニブ感受性を MTT 法で検討した。また *in vivo* における検討として、PC-9 と線維芽細胞をあらかじめ混ぜた後に SCID マウスの皮下に移植し、4 日後からゲフィチニブを連日経口投与し治療効果を評価した。HGF 産生は ELISA 法で測定した。線維芽細胞の遊走能はダブルチャンバー法で検討した。

### 4. 研究成果

線維芽細胞株および肺癌患者の腫瘍組織から樹立した初代培養線維芽細胞は種々の濃度の HGF (hepatocyte growth factor) を産生した (図 1)。肺癌細胞株は線維芽細胞の遊走を著明に誘導した。肺癌細胞株 PC-9 と HCC827 はゲフィチニブに高い感受性を示したが、線維芽細胞と共培養することで耐性となった。線維芽細胞によるゲフィチニブ耐性は、抗 HGF 中和抗体や NK4 (HGF の受容体結合阻害物質) により解除された。さらに、PC-9 の皮下腫瘍はゲフィチニブ治療に高い感受性を示したが、線維芽細胞をあらかじめ混ぜて接種するとゲフィチニブ治療によっても縮小せず、耐性化がみられた (図 2)。しかし、抗 HGF 中和抗体や NK4 を併用することで耐性は解除され、腫瘍は著明に縮小した (図 3)。

図 1

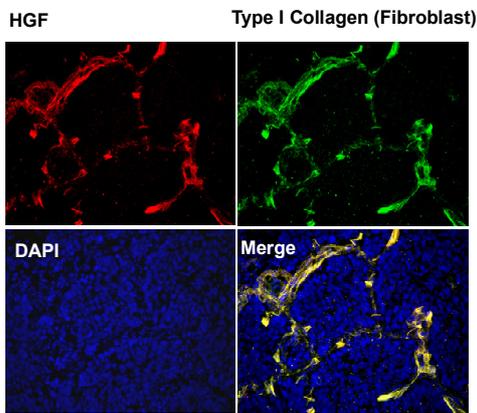
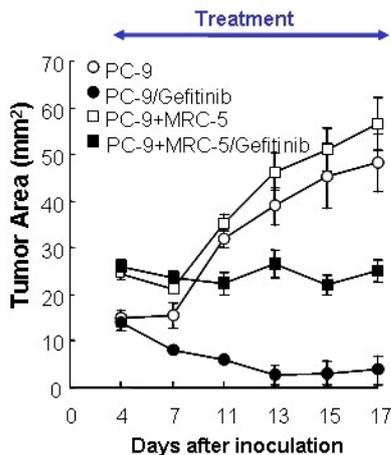
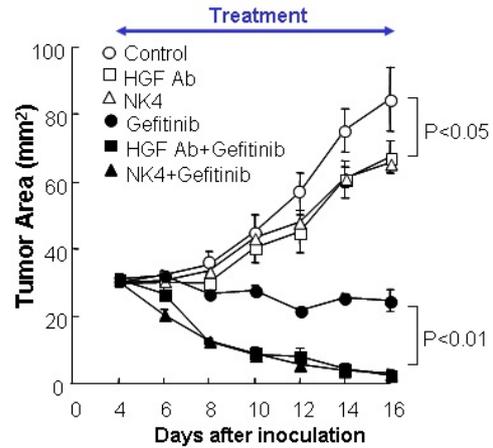


図 2



これらの結果から、線維芽細胞は肺癌細胞により腫瘍局所にリクルートされ種々の濃度の HGF を産生するが、HGF を高産生する場合には EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞の EGFR-TKI 耐性を誘導することが明らかとなった。宿主間質細胞との相互作用は癌細胞の EGFR-TKI 感受性において非常に重要な役割を果たしており、耐性克服の治療標的となることが示唆された。

図 3



### 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 3 件)

1. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011 Jan 10. [Epub ahead of print] 査読有
2. Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:174-83. 査読有
3. Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 1;15(21):6630-8. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. (発表標題) Novel gefitinib resistance mechanism and its therapeutic strategy for lung adenocarcinoma with EGF receptor activating mutations. 第19回日本がん転移学会. July 16-17, 2010. 金沢市文化ホール(石川県)
- (2) Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. (発表標題) Stromal Fibroblasts Induce Resistance of Lung Cancer to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. April 23-25, 2010. 国立京都国際会館(京都府)
- (3) Seiji Yano, Wei Wang, Qi Li, Ivan S. Donev, Shinji Takeuchi, Tadaaki Yamada, Kunio Matsumoto, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone. (発表標題) Therapeutic effect of HGF inhibitors against HGF-induced EGFR-TKI resistance in lung cancer harboring *EGFR* mutations. AACR 101st Annual Meeting 2010. April 17-21, 2010. WalterE. Washington Convention Center (USA)
- (4) Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. (発表標題) Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *2009 Asia-Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine and Fourth Forum of Chinese Young and Middle-aged Oncologists*. Oct 24-27, 2009. Xi' An, Xian jianGuo Hotel (CHINA).
- (5) Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. (発表標題) Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 第18回日本がん転移学会. July 23-24, 2009. 旭川グランドホテル(北海道)
- (6) Wei Wang, Qi Li, Tadaaki Yamada, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, Seiji Yano. (発表標題) Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 13<sup>th</sup> Japanese Association for Molecular Target Therapy of Cancer. 第13回日本がん分子標的治療学会. June 24-26, 2009. ホテルクレメント徳島(徳島県)

[その他]

ホームページ

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

ワン ウエイ (WANG WEI)

金沢大学・がん研究所・博士研究員

研究者番号：80467117

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし