

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830119

研究課題名(和文) EGFR肺癌における新規キナーゼ阻害剤に対する耐性の分子機序とその克服

研究課題名(英文) Analysis of acquired resistance mechanisms to next-generation kinase inhibitors in lung cancers with EGFR mutation.

研究代表者

須田 健一 (SUDA, Kenichi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30631593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：EGFRキナーゼ阻害剤はEGFR変異肺癌治療のkey drugであるが、獲得耐性の出現は必発である。獲得耐性後の治療戦略を考える上で、獲得耐性後に殺細胞性抗癌剤の感受性は変化するか、獲得耐性の分子機序は既知のもの以外にどのような分子異常があるか、次世代のEGFRキナーゼ阻害剤に対する獲得耐性機序としてはどのような分子異常が生じ得るか、は重要な課題である。本研究ではこれらの課題について、主にin vitroの系を用いて検討をおこなった。

研究成果の概要(英文)：EGFR kinase inhibitors are the key drugs in the treatment of lung cancer patients with EGFR activating mutations. However, emergence of acquired resistance to these drugs is almost inevitable. There are several unanswered issues to establish best treatment strategies after acquisition of resistance to EGFR kinase inhibitors. These include, (1) if chemosensitivity alters after acquisition of resistance, (2) novel resistance mechanisms other than T790M mutation, MET amplification, ERBB2 amplification, etc, and (3) molecular mechanisms that confer acquired resistance to next-generation EGFR kinase inhibitors. In this work, we analyzed these points, mainly using in vitro models.

研究分野：腫瘍学

キーワード：分子標的薬 肺癌 耐性 EGFR変異 個別化治療

1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子変異を有する肺癌 (以下、EGFR 肺癌) は本邦肺腺癌の約 50% を占めるとされ、年間の罹患者数は約 2 万人以上と推計される。EGFR 肺癌に対しては、これまでの第一選択であったプラチナ併用化学療法よりも EGFR キナーゼ阻害剤の治療効果が優れることが明らかとなり、EGFR キナーゼ阻害剤は EGFR 肺癌における key drug となった。しかし、EGFR キナーゼ阻害剤治療により著明な腫瘍縮小効果が得られた患者であっても、獲得耐性の出現は約 1 年以内にほぼ必発であり、臨床上問題となっている。獲得耐性機序として最も頻度の高いものが EGFR 遺伝子の 2 次的変異 (ほぼ全例が T790M 変異) であり、EGFR キナーゼ阻害剤が EGFR と結合できにくくなることその機序と考えられている。そこで現在、T790M 変異のある EGFR とも結合し得る新規 EGFR キナーゼ阻害剤が開発され、臨床試験が開始されている。現在、EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性後の治療戦略に関しては明らかでない部分が多い。本研究では、実臨床より提起される Clinical question に対し、検討をおこなった。

2. 研究の目的

- (1) EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性後の殺細胞性抗癌剤感受性に関する検討
現在、EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性後の治療としては殺細胞性抗癌剤が用いられることが多い。しかし、EGFR キナーゼ阻害剤耐性獲得前後で殺細胞性抗癌剤の感受性が変化するかは明らかでない。これまで樹立した様々な獲得耐性株を用いて、EGFR キナーゼ阻害剤耐性獲得前後で殺細胞性抗癌剤感受性が変化するかを解析した。
- (2) エルロチニブ獲得耐性に関わる分子機序に関する検討
EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性に関わる分子機序は数多く報告されているが、これまでの報告では説明できない獲得耐性も多い。エルロチニブ獲得耐性細胞株を樹立し、新規耐性機序を探索することを目的とした。
- (3) T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤に対する獲得耐性に関する検討
現在、第 3 世代の EGFR キナーゼ阻害剤として T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤が注目されているが、T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤に対しても獲得耐性の出現はほぼ必発である。その耐性機序を探索するため、T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性株を樹立し、解析した。

3. 研究の方法

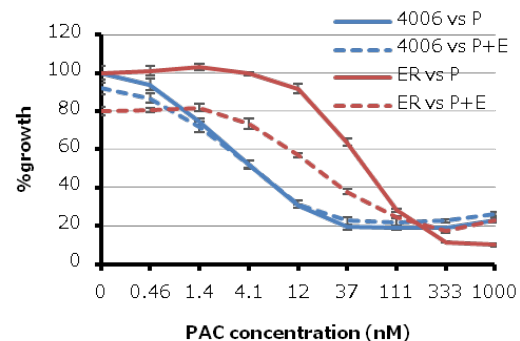
- (1) EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性後の殺細胞性抗癌剤感受性に関する検討
これまでに樹立した種々の EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性株とその親株に対し、殺細胞性

抗癌剤 (シスプラチン/ゲムシタピン/ドセタキセル/パクリタキセル/ピノレルピン) の感受性を MTT 法にて比較した。感受性に変化のあったものについて、その分子メカニズムを探索した。

- (2) エルロチニブ獲得耐性に関わる分子機序に関する検討
エルロチニブ感受性の肺癌細胞株を長期にエルロチニブ存在下で培養することにより、エルロチニブ獲得耐性株を樹立した。親株と比較・検討することにより、エルロチニブ耐性獲得に関わる分子機序を探索した。
- (3) T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤に対する獲得耐性に関する検討
T790M 変異を有する肺癌細胞株 (HCC928EPR 株) を長期に T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤存在下で培養することにより、獲得耐性株を樹立した。親株と比較・検討することにより、T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性に関わる分子機序を探索した。

4. 研究成果

- (1) EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性後の殺細胞性抗癌剤感受性に関する検討
T790M、MET 増幅、上皮間葉転換 (EMT)、IGF-1R 活性化、EGFR 変異の喪失の 5 つの機序について検討し、EMT 以外の 4 つでは EGFR キナーゼ耐性獲得前後で殺細胞性抗癌剤の感受性は変化しなかった。一方、EMT による獲得耐性では、微小管阻害剤 (ドセタキセル、パクリタキセル、ピノレルピン) の感受性が低下した (下記図)。微小管阻害剤感受性低下の分子機序として、薬剤排出ポンプとして知られる ABCB1 の過剰発現を同定した。さらに、Entinostat (E) 併用により ABCB1 発現が低下し、微小管阻害剤感受性が回復することも同定した (下記図)。



- (2) エルロチニブ獲得耐性に関わる分子機序に関する検討
EGFR キナーゼ阻害剤感受性のある H358 細胞株よりエルロチニブ獲得耐性株 (H358ER 株) を樹立した。H358ER 株では IGF-1R の活性化亢進が見られ、IGF-1R が EGFR キナーゼ阻害剤獲得耐性に関わることを同定した。

(3) T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤に対する獲得耐性に関する検討

T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤である CNX-2006 に対する獲得耐性株 (HCC827EPR/CNXR) を樹立、さらに複数のサブクローンを樹立した。サブクローンの一部では T790M 変異を MET 遺伝子増幅の両者を有することを同定した。また別のサブクローンでは、EGFR 活性化変異の大部分を喪失した上で MET 遺伝子増幅が生じていることを同定した。これらの獲得耐性株は、それぞれ、T790M 特異的 EGFR キナーゼ阻害剤と MET キナーゼ阻害剤の併用療法、MET キナーゼ阻害剤単剤療法に感受性を示した。

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 7 件)

Suda K, and Mitsudomi T. Racial differences in lung cancer genetics. *Journal of Thoracic Oncology* (査読なし), 10, 2015, 230-1.
DOI: 10.1097/JTO.0000000000000439.

Suda K, Sato K, Mizuuchi H, et al. Recent evidence, advances, and current practices in surgical treatment of lung cancer. *Respiratory Investigation* (査読あり), 52, 2014, 322-9.
DOI: 10.1016/j.resinv.2014.06.003.

Suda K, Sato K, Shimizu S, et al. Prognostic implication of predominant histologic subtypes of lymph node metastases in surgically resected lung adenocarcinoma. *BioMed Research International* (査読あり), 2014, 2014, 1-6.
DOI: 10.1155/2014/645681.

Suda K, Mizuuchi H, Murakami I, et al. CRKL amplification is rare as a mechanism for acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancers with epidermal growth factor receptor mutation. *Lung Cancer* (査読あり), 85, 2014, 147-51.
DOI: 10.1016/j.lungcan.

Suda K, Mizuuchi H, Sato K, et al. The insulin-like growth factor 1 receptor causes acquired resistance to erlotinib in lung cancer cells with the wild-type epidermal growth factor receptor. *International Journal of Cancer* (査読あり), 135, 2014, 1002-6.
DOI: 10.1002/ijc.28737.

Suda K, and Mitsudomi T. Development of

personalized treatments in lung cancer: focusing on the EGFR mutations and beyond. *Lung Cancer: Targets and Therapy* (査読あり), 4, 2013, 43-53.
<http://dx.doi.org/10.2147/LCTT.S49603>.

Suda K, and Mitsudomi T. Unintentional weakness of cancers: The MEK/ERK pathway as a double-edged sword. *Molecular Cancer Research* (査読あり), 11, 2013. 1125-8.
DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0228.

[学会発表](計 8 件)

須田健一, 他. 肺腺癌新国際分類によるリンパ節転移巣の再評価とその臨床的意義. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 (国立京都国際会館, 京都), 2014 年 11 月.

Suda K, et al. Reciprocal relationship between EGFR T790M mutation and small cell lung cancer transformation as acquired resistance molecular mechanisms to EGFR kinase inhibitor. 6th Asia Pacific Lung Cancer Conference (Shangri-La Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia), 2014 年 11 月.

須田健一, 他. 肺腺癌新国際分類からみたリンパ節転移巣の再評価とその臨床的意義. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会 (福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル&ホール, 福岡), 2014 年 10 月.

Suda K, et al. Molecular and pathological evolution in acquisition of resistance to EGFR-TKI - T790M mutation and SCLC transformation - 第 73 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜), 2014 年 9 月.

須田健一, 他. EGFR 野生型肺癌におけるエルロチニブ獲得耐性機序の探索. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 (国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都, 京都), 2014 年 4 月.

Suda K, et al. In vitro analysis of acquired resistance mechanisms to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. 2nd International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals (Grand Front Osaka Knowledge Capital Conference Room, Osaka), 2014 年 1 月.

須田健一, 他. 臨床検体より樹立したゲフィチニブ獲得耐性細胞株の解析. 第 54 回日本肺癌学会総会 (ホテルニューオータニ, 東京), 2013 年 11 月.

Suda K, et al. Several receptor tyrosine kinase is activated but orchestrated by EGFR in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma cells with EGFR mutation. 15th World Conference on Lung Cancer (Sydney Convention & Exhibition Centre, Sydney, Australia), 2013年10月.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 健一 (SUDA, Kenichi)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：30631593

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()

(4) 研究協力者

水内 寛 (MIZUUCHI, Hiroshi)
佐藤 克明 (SATO, Katsuaki)