

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591618

研究課題名（和文）悪性神経膠腫に対する新規抗 EGFR 抗体・抗癌剤併用による治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel combined therapies with anti-EGFR monoclonal antibody and anticancer drug for malignant gliomas

研究代表者

永根 基雄（NAGANE MOTOO）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60327468

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫で高頻度に認められる EGFR 異常を標的とする新規抗 EGFR モノクローナル抗体 nimotuzumab (Nimo) 治療により、神経膠腫細胞の EGFR、特に変異型 EGFRvIII のリン酸化が抑制された。膠芽腫の標準治療薬であるテモゾロミド (TMZ) と Nimo の併用療法により、EGFRvIII 高発現神経膠腫腫瘍の増殖がマウスモデルで相乗的に抑制されたことから、Nimo は TMZ との併用療法により神経膠腫に対する抗腫瘍効果を増強する有効な治療法となることが期待され、ミスマッチ修復機構酵素が感受性因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Treatment of glioblastoma (GBM) cells overexpressing driver oncogenic wild-type EGFR or a mutant EGFRvIII with a humanized anti-EGFR monoclonal antibody nimotuzumab (Nimo) resulted in reduction in tyrosine phosphorylation of EGFRvIII preferentially, which was associated with a decrease in Akt phosphorylation. Combination treatment of nimotuzumab with temozolomide (TMZ), the standard chemotherapeutic drug for GBM, significantly suppressed growth and elongated survival of mice bearing subcutaneous or intracerebral human GBM tumors overexpressing EGFRvIII. The sensitivity to the combination treatment was affected in regrown tumor cells which had lost expression of mismatch repair (MMR) proteins MSH6 and MLH1, suggesting that the resistance to this combination treatment might involve expression changes of MMR effectors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：神経膠腫、EGFR、モノクローナル抗体、分子標的治療薬、化学療法、EGFRvIII

## 1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍、特に悪性神経膠腫（グリオーマ）は近年の画期的な医療進歩にも拘らず未だ極めて難治性の疾患であり、治療の主体となる放射線治療や化学療法への耐性の存在

がその原因のひとつと考えられており、新規の治療法の開発が急務となっている。近年、悪性腫瘍の分子生物学的特徴が飛躍的に解明されるにつれ、腫瘍の増殖・生存に必要なとされる分子が次第に明らかになり、そのよう

な分子を標的とする新規の癌治療法が開発され始めている。ヒト・グリオーマにおいては、現代においても平均生存期間が1年強にしかすぎない膠芽腫（最も悪性度の高いグリオーマの組織型、WHO grade IV）の発生にかかわる遺伝子の異常の検索が精力的に行われてきた。膠芽腫では、多数の遺伝子異常の蓄積により悪性化を生じるが、悪性度の低い低悪性度の病巣から経時的に悪性転化して発生する二次性膠芽腫と、最初から前病巣なく急速に出現してくる一次性膠芽腫では、高頻度に見られる遺伝子異常のパターンが異なる傾向が認められる。膠芽腫の大多数を占める一次性膠芽腫では、高頻度で成長因子の受容体である receptor tyrosine kinase (RTK) を代表する epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子の遺伝子増幅と遺伝子再配列による変異型 EGFR の高発現が認められ、一方二次性膠芽腫では platelet-derived growth factor (PDGF) とその受容体 (PDGFR) の遺伝子増幅・高発現が検出される。

これまでの我々の研究で、膠芽腫に高頻度で発現している変異型EGFR (EGFRvIIIあるいはΔEGFR) は成長因子であるEGFに依存せず恒常的にリン酸化・活性化しており、その高発現によりヒト・グリオーマ経路の活性化が生じており、また細胞死抑制因子であるBcl- $X_L$ の発現亢進を介し、cisplatinなどの抗癌耐性形質を獲得することが報告されている。更に、ヌードマウスでのEGFRvIII高発現グリオーマ腫瘍モデルにおいて、EGFR阻害剤であるAG1478治療によりcisplatinへの感受性が認められる。

膠芽腫では、有力な腫瘍増殖を増強する効果を持つシグナル伝達経路が恒常的に活性化しているため、シグナル経路を阻害することにより腫瘍細胞に強い細胞傷害をもたらすことになると考えられる。従って膠芽腫において、EGFRからのシグナル阻害を目的とした分子標的学治療が検討されている。

## 2. 研究の目的

今回我々は、ヒト・グリオーマにおけるnimotuzumab (Nimo)によるEGFR標的治療薬と標準治療薬TMZの併用療法の治療効果について、*in vitro*及び*in vivo*での検討を行い、またその治療感受性を規定する因子も同時に検索することを目的に本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 試薬. ヒト型抗EGFR抗体の

nimotuzumabは第一三共社より無償で供与された。Temozolomideは、LKT Laboratoriesから購入した。AG1478は和光から購入した。Western blotに使用した抗体はいずれも commercially

availableな抗体を購入した。

- (2) 細胞. 使用したヒト glioma 細胞株及び培養条件は以前に報告した通り (Nagane M et al. Cancer Res 56: 5079, 1996; Nagane M et al. J Neurosurg 106: 407, 2007)。
- (3) Western blotting. 全細胞蛋白抽出液はRIPA bufferを用いて抽出し、Western blot 解析法は以前に報告した通りに施行した (Nagane M et al. Cancer Res 56: 5079, 1996)。
- (4) 動物実験. ヒト glioma 細胞 (2 x 10<sup>6</sup> 個 / 0.1 ml PBS) を週齢 4- 5 週のメス nude mouse (BALB/CA系, 埼玉実験動物) の皮下及び脳に移植した。皮下及び脳腫瘍が形成された後、Nimo, TMZの各単独治療法ならびに併用療法を行い、腫瘍の縮小、増殖抑制、脳内モデルの場合は生存期間の延長につき検証した。全身への毒性は体重を測定し検討を行った。マウスは二酸化炭素吸入法により sacrifice した。本実験法は本大学医学部実験動物委員会により承認されている。
- (5) 治療をされた移植腫瘍を摘出し、治療による組織学的変化、増殖能及び細胞死の変化の有無をMIB1染色・TUNELアッセイで評価を行った。治療抵抗性についてもMSPによるメチル化の有無、MGMT発現やDNAミスマッチ修復機構についてWestern blot解析を行った。

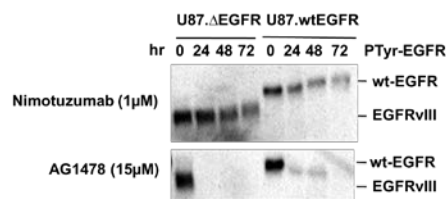
## 4. 研究成果

- (1) U87MG. ΔEGFR および U87MG. wtEGFR 細胞を用いて、Nimo 1μM で処理を行った。24 時間毎に経時的に細胞 lysate を調整し、抗リン酸化 tyrosine-EGFR 抗体を用いて blot した。

治療 24 時間後から、EGFRvIII, wtEGFR ともにそのリン酸化は減少がみられ、72 時間後に至るまで経時的にその効果は継続していた。

一方、対照として使用したEGFRのkinase inhibitorであるAG1478による治療では、Nimoと比較してより強力に24時間後からEGFRのリン酸化阻害が認められた。

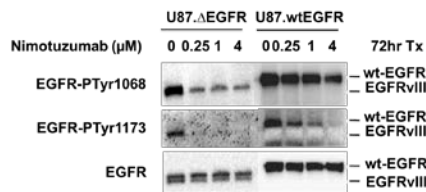
### Nimotuzumab Suppresses Tyrosine Phosphorylation of EGFRvIII and wild-type EGFR in U87MG Cells



(2) 次に、リン酸化の抑制効果が最大となる72時間治療を用いて、NimoのdoseによるEGFRのリン酸化の抑制について検討した。

Nimo 0.25, 1, 4 $\mu$ Mの各濃度で処理し、72時間後にlysateを調整した。U87.wtEGFR細胞においてもNimoによるEGFRのtyrosine脱リン酸化が誘導されていることが示されたが、主たるC-terminusのリン酸化部位であるtyrosine 1068のリン酸化は、EGFRvIIIと比べて高濃度(4 $\mu$ Mで明確化)での抑制となっており、NimoのEGFRリン酸化阻害作用はEGFRvIIIに対して高感度であることが示唆される結果となった。もう一つのtyrosine 1173の脱リン酸化作用も、EGFRvIIIにおいて低濃度でリン酸化の抑制効果を認めた。

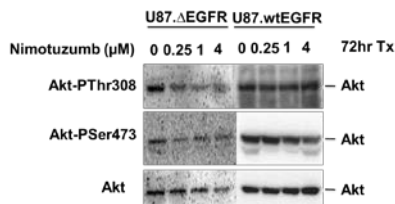
#### Preferential Suppression of EGFRvIII by Nimotuzumab



(3) EGFRのリン酸化阻害により、EGFRシグナル経路の下流の主たる因子に影響が認められることを検証するため、Aktのリン酸化について検証した。U87MG.ΔEGFR細胞において、Akt-pThr308リン酸化は0.25 $\mu$ Mより低下を認めたが、Akt-pSer473のバンドは全体に薄めであり、Ser473に対する脱リン酸化作用は不十分と考えられた。U87MG.wtEGFR細胞においては、Akt Thr308のリン酸化の抑制効果は認められず、一方、Ser473のリン酸化は高濃度(4 $\mu$ M)にて僅かな低下がみられるのみでした。

Nimotuzumabは、 $\Delta$ EGFR細胞に対してEGFR及びAktのリン酸化の抑制が明らかになり、 $\Delta$ EGFR細胞はwtEGFR細胞と比べてより強くリン酸化の抑制効果を認めた。

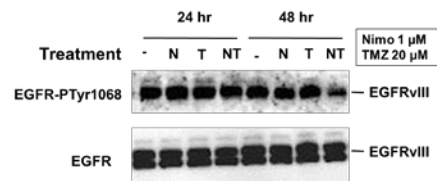
#### Nimotuzumab Suppresses Akt Phosphorylation in U87MG.ΔEGFR Cells



(4) U87MG.ΔEGFR細胞を用いて、Nimo 1 $\mu$ M及びTMZ 20 $\mu$ Mで単独及び併用処理を行った。24時間後、72時間後にlysateを調整し、抗リン酸化tyrosine-EGFR抗体を用いてblotした。NimoとTMZの併用処理では48時間後

にリン酸化の抑制を強く認めた。

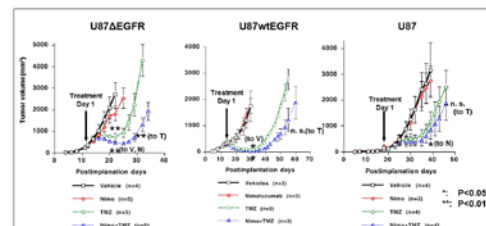
#### Inhibition of EGFRvIII Tyrosine Phosphorylation by Combination Treatment with Nimotuzumab and Temozolomide in U87MG.ΔEGFR Cells *in Vitro*



(5) U87MG.ΔEGFR細胞及びU87MG.wtEGFR細胞、U87MG.EGFR細胞を用いてマウスの皮下腫瘍モデルを作成し、それぞれの治療を行い、腫瘍サイズと体重を測定し、評価を行った。

Nimo単独治療では腫瘍増殖抑制効果は乏しかったが、TMZ単独治療及びNimoとTMZの併用治療は、一定の腫瘍抑制効果を認めた。すべての細胞において、TMZ単独治療に比べて併用治療は腫瘍の退縮効果を強く認めたが、特にU87 $\Delta$ EGFR細胞は、TMZ単独治療と比べて併用治療の腫瘍抑制効果を有意に認めた。

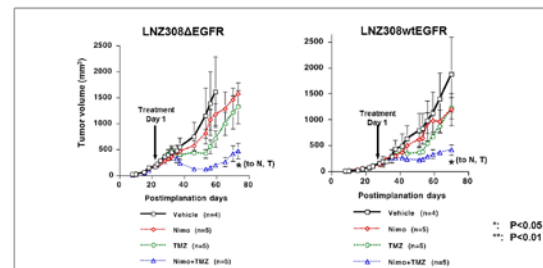
#### Synergistic Growth Suppression of U87MG.ΔEGFR/wtEGFR Subcutaneous Xenografts by Combination of Nimotuzumab and Temozolomide



(6) LN308.ΔEGFR細胞及びLN308.wtEGFR細胞を用いて、マウスの皮下腫瘍モデルを作成し、前述と同様に治療を行った。

それぞれの細胞でNimo単独治療では腫瘍増殖抑制効果は乏しかったが、TMZ単独治療及びNimoとTMZの併用治療は、一定の腫瘍抑制効果を認め、特にLN308 $\Delta$ EGFR細胞は、TMZ単独治療と比べて併用治療の腫瘍退縮効果を有意に認めた。

#### Synergistic Growth Suppression of LN308.ΔEGFR/wtEGFR Subcutaneous Xenografts by Combination of Nimotuzumab and Temozolomide



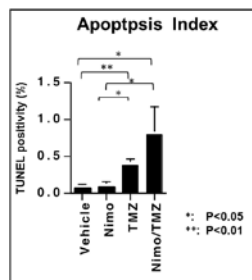
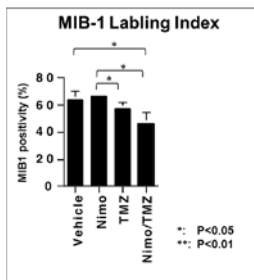
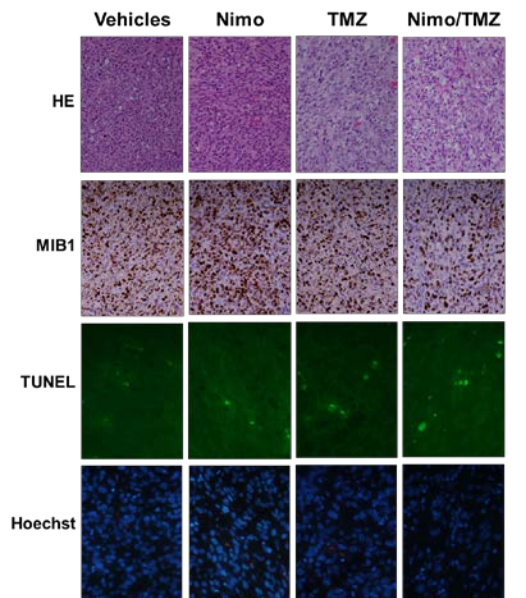


(7) 腫瘍増殖能抑制効果及びアポトーシスの誘導効果を見るために、病理所見から、MIB-1 index の計測、TUNEL assay を行った。

マウスの皮下腫瘍をホルマリン固定し、HE と MIB-1 の免疫染色を行った。MIB-1 index の計測方法は、Gunma LI で行い、t 検定で評価を行った。病理像からは、TMZ と NT 併用治療と比べて細胞増殖能の低下を認め、数値上では明らかな有意差は認めなかった。

細胞死の誘導を評価するため、TUNEL assay を行い、Apoptotic index を計測、t 検定で評価を行った。アポトーシスの細胞は全体的に少なく、その中でも NT 併用治療はアポトーシスの誘導を認めたが、TMZ と比べて有意差までには至らなかった。

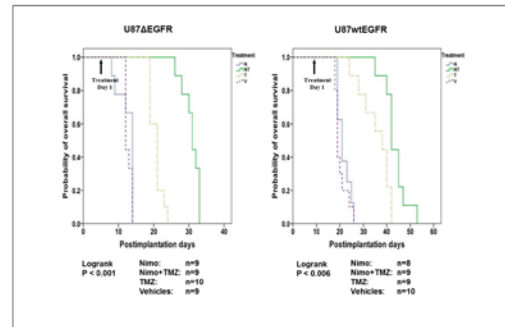
#### Nimotuzumab Enhances Suppression of Proliferation and Apoptosis Induction by Temozolomide in Subcutaneous Xenografts



(8) U87MG. ΔEGFR 細胞及び U87MG. wtEGFR 細胞を用いてマウスの脳腫瘍モデルを作成し、それぞれ治療を行った。Nimo 単独治療の腫瘍抑制効果は乏しく、TMZ 単独治療及び NT 併用治療は腫瘍抑制効果を認めた。NT 併用療法はいずれの単独治療に比べ有意な生存期間の延長を ΔEGFR 腫瘍で顕著に認められた。wtEGFR 高発現腫瘍でも同様に生存期間の延長が認

められたが、その効果は軽度であった。

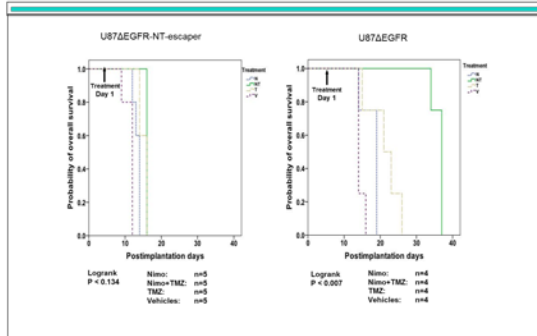
#### Significant Elongation of Life Span of Nud Mice Bearing U87MG.ΔEGFR/wtEGFR Intracerebral Xenografts by Treatment with Nimotuzumab and Temozolomide



(9) EGFRvIII 高発現するヒト glioma U87MG 細胞を使ってマウスの脳腫瘍モデルを作成し、Nimo と TMZ の併用治療 (NT 治療) を行い、腫瘍縮小後に再増大した腫瘍、並びにその腫瘍から再樹立した細胞株を NT-escaper と呼称した。

そこで、治療抵抗性を検証するため、U87MG. ΔEGFR 細胞、U87MG. ΔEGFR-NT-escaper 細胞を用いて、マウスの脳腫瘍モデルを作成し、それぞれの治療を行い、生存日数を測定し、 Kaplan-Meier 曲線で評価した。ΔEGFR 親株は相乗的腫瘍抑制効果を認めたが、NT-escaper 腫瘍は、すべての治療において、腫瘍の抑制効果は認めなかった。

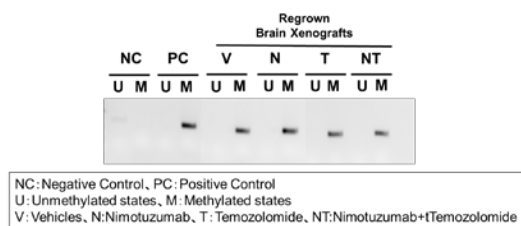
#### U87MG.ΔEGFR-NT Escaper Intracerebral Xenografts are Resistant to Combination Treatment with Nimotuzumab and Temozolomide



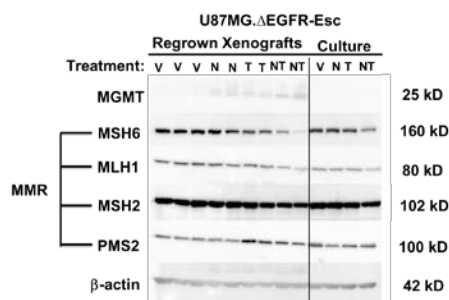
(10) 各種 NT-escaper 腫瘍・細胞で MGMT プロモーターの MSP 検査を施行したが、すべての escaper 細胞で MGMT はメチル化のまま不変であった。再増大した NT-escaper 腫瘍において Nimo と TMZ の併用治療で MGMT がわずかに発現していたが、NT-escaper 細胞では MGMT は発現されておらず、一過性の発現誘導と考えられた。

NT-escaper 腫瘍及び細胞で、Nimo と TMZ の併用治療においてミスマッチ修復機構 (MMR) 酵素の MSH6 と MLH1 の発現の低下を認め、TMZ の治療抵抗性への関与が示唆された。

**Methylation Status of MGMT Promoter is Maintained in Regrown Xenografts after Treatments of All Kinds**



**Expression of MGMT and MMR Proteins in Regrown Xenografts and Re-cultured Cells after Treatments**



結論：以上により、*in vivo* において、Nimo は変異型 EGFRvIII (及び wild-type EGFR) を高発現する glioma 細胞に対して、TMZ の抗腫瘍効果を増強した。しかし、長期的な腫瘍寛解は得られず一定期間で治療抵抗を示した。新規分子標的学治療薬である Nimo と標準的治療薬の TMZ 併用療法は、EGFR 高発現、特に EGFRvIII を高発現する膠芽腫に対して有効である可能性が示唆された。併用療法後再増大した腫瘍は MSH6 と MLH1 の減少を伴い、Nimo と TMZ の併用治療抵抗性を示したことから、耐性克服の検討が必要と考えられる。

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 26 件)

1. Nagane M (1 番目計 5 名), Nitta Y, et al. Combination treatment with the anti-EGFR monoclonal antibody, nimotuzumab, and temozolomide causes synergistic growth suppression of mutant EGFR expressing glioma xenografts. Proceedings of 104<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 54 (April). nr 5473, 2013, 査読有
2. Nagane M (1 番目計 7 名), et al. Predictive value of mean apparent diffusion coefficient value for responsiveness of

temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab. Int J Clin Oncol DOI 10.1007/s10147-013-0517-x, 2013, 査読有

3. Nitta Y, Nagane M (計 5 名 5 番目) et al. Synergistic growth suppression of mutant epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing glioma xenograft by combination of temozolomide and anti-EGFR monoclonal antibody nimotuzumab. Neuro-Oncology 14 Supplement 6: vi27, 2012, 査読有
4. Shibui S, Nagane M (計 30 名第 21 番目) et al: Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). Cancer Chemother Pharmacol 71 (2): 511-521, 2013. 2012 Dec 11. [Epub ahead of print], 査読有
5. Nagane M (計 12 名第 1 番目), Nishikawa R et al. Phase II study of single-agent bevacizumab in Japanese patients with recurrent malignant glioma. Jpn J Clin Oncol 42(10): 887-895, 2012, 査読有
6. 永根基雄: 神経膠腫の遺伝子異常とバイオマーカー. BRAIN and NERVE 64 (5): 537-548, 2012, 査読無
7. Bonavia R, Nagane M (計 10 名第 5 番目) et al. EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- $\kappa$ B, interleukin-8 pathway. Oncogene 31(36): 4054-66, 2012. 2011 Dec 5. doi: 10.1038/onc.2011.563. , 査読有
8. Feng H, Nagane M (計 18 名第 15 番目) et al. Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFR $\alpha$ -stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. J Clin Invest 121(12): 4670-84, 2011. doi: 10.1172/JCI58559. Epub 2011 Nov 14, 査読有
9. Liu K-W, Nagane M (計 11 名第 8 番目) et al. SHP-2/*PTPN11* mediates gliomagenesis driven by *PDGFRA* and *Ink4a/Arf* aberrations in mice and humans. J Clin Invest 121(3): 905-917, 2011, 査読有
10. Nagane M. Multidisciplinary progress in neuro-oncology 2010. Lancet Neurol

- 10 (1): 18-20, 2011, 査読有
11. Nagane M: Recent progress in Neuro-oncology. J Jpn S Clin Oncol 46 (3): 1344-1347, 2011, 査読無
  12. 永根基雄 (計6名第1番目), 小林啓一. テモゾロミド不応性悪性神経膠腫に対するベバシツマブ単独療法の治療効果. 脳外誌 19 (10): 758-766, 2010, 査読有
  13. Nagane M (計5名第1番目), Shimizu S et al. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. Neuro-Oncology 12: 687-700, 2010, 査読有

[学会発表] (計41件)

1. Nagane M (計5名第1番目), Nitta Y, et al. Combination treatment with the anti-EGFR monoclonal antibody, nimotuzumab, and temozolomide causes synergistic growth suppression of mutant EGFR expressing glioma xenografts. 104<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research 2013, Washington D. C., U. S. A., 2013. 4. 1
2. 永根基雄. Low grade gliomaの遺伝子異常と治療. 第30回 日本脳腫瘍病理学会, 名古屋, 2012. 5. 25
3. Nagane M. Prognostic factors and targeted therapy for malignant glioma. 24<sup>th</sup> International Cancer Research Symposium, Tokyo, Japan, 2011. 11. 24
4. 永根基雄. 神経膠腫の分子マーカー・予後因子と標的治療. 第42回 埼玉脳腫瘍病理懇話会, 大宮, 2011. 11. 16
5. 永根基雄. JSCO University 2011. -Central Nervous System Tumor- Year in Review: Japan. 第49回 日本癌治療学会, 名古屋, 2011. 10. 28
6. 永根基雄. Gliomaの分子遺伝子学の最新知見. 脳腫瘍レビュー' 11, 千代田区, 東京, 2011. 7. 2
7. 永根基雄. 悪性脳腫瘍における予後因子と標的治療. 第29回 日本脳腫瘍病理学会, 船堀, 東京, 2011. 5. 20

[図書] (計10件)

1. 永根基雄. 脳腫瘍の治療 化学療法. In 癌診療指針のための病理診断プラクティス 脳腫瘍. 青笹克之, 中里洋一 (編), 中山書店, 東京. Pp 75-85, 2012
2. 永根基雄. 中枢神経系腫瘍. In デヴィータがんの分子生物学 (Cancer Principles

- & Practice of Oncology. Primer of the Molecular Biology of Cancer.). DeVita Jr. VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (編), 宮園浩平, 石川冬木, 間野博行 (監訳), メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京. Pp421-432, 2012
3. 永根基雄. 神経膠腫に対する分子標的薬 (アバスタチン) 治療. In Annual Review 神経 2011. 鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆 (編), 中外医学社, 東京. Pp 194-203, 2011
  4. 永根基雄. 脳腫瘍とプログラム細胞死. In 新時代の脳腫瘍学-診断・治療の最新線-. 松谷雅生, 西川亮 (編), 日本臨牀社, 東京, 日本臨牀 68 (増刊号 10): pp81-87, 2010
  5. 永根基雄. 脳腫瘍 (悪性神経膠腫). In 阻害剤からひけるがん治療の分子標的ハンドブック. 第3部 各臓器癌の分子標的治療. 西尾和人, 西條長宏 (編), 羊土社, 東京. Pp 206-208, 2010

[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  
永根 基雄 (NAGANE MOTOO)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 60327468

- (2) 研究分担者  
なし

研究者番号: