

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501311

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体阻害剤耐性肺癌におけるPI3キナーゼ経路を中心とした耐性克服

研究課題名(英文) Overcoming epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) -resistance in lung cancer through PI3-kinase pathway

研究代表者

猶木 克彦 (Naoki, Katsuhiko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40265806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異陽性肺癌にはEGFR阻害剤が著効するが、多くは1年以内に増悪(耐性化)するため、その克服が重要である。細胞株を用いた検討により、これまで報告されていない繊維芽細胞増殖因子(FGF)および受容体(FGFR)が、EGFR阻害剤耐性に関与することを明らかにした。臨床検体では、FGF9高発現が肺癌患者の予後に関係することを見出した。FGFを肺上皮細胞に導入すると形質転換し、免疫不全マウスでの腫瘍形成が促進し、FGF阻害剤によりそれが抑制された。FGF/FGFR経路が肺癌の予後・腫瘍形成・耐性化に関与しており、治療標的となることを、細胞株から臨床検体レベルまでにおいて系統的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have great effect in the treatment of lung cancer patients with EGFR mutation. But many of the patients eventually get worsened (become 'resistance') within one year. It is important to overcome the 'EGFR-TKI-resistance'. Using lung cancer cell lines, we had elucidated that fibroblast growth factors (FGFs) and receptors (FGFRs) had related to the EGFR-TKI resistance. Using clinical specimens, high FGF9 expression is related to poor prognosis in lung cancer patients. Overexpression of FGF in lung epithelial cell induced transformation, and the tumor formation in immune-deficient mouse was accelerated. FGFR-inhibitor blocked that tumor formation. Using cell lines and clinical specimens, we have comprehensively revealed that FGF/FGFR pathway has an important role in prognosis, tumor formation, and resistance in lung cancer, suggesting that FGF/FGFR pathway can be possible drug target.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：耐性肺癌 上皮成長因子受容体阻害剤 繊維芽細胞増殖因子 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界の癌死亡の筆頭原因の一つであり、その克服が必要とされている。肺癌の中で80%以上を占める非小細胞肺癌において、申請者らが見出したEGFR遺伝子変異がEGFR阻害剤による治療効果と関連し、日本人と欧米人との間でその頻度に大きな差があることが明らかとなった(Paez JG, Naoki K, et al. Science 2004)。このことは大規模臨床試験でも確認され(Mok TS, et al. N Engl J Med 2009)、現実的な個別化医療として本邦ではEGFR遺伝子変異検索が保険適応となっている。EGFR遺伝子変異以外にもEGFR経路の下流にあるBRAF遺伝子変異(Naoki K, et al. Cancer Res 2002)、EML4-ALK遺伝子異常など、oncogenic addictionを起こしている遺伝子異常が知られており、特に受容体チロシンキナーゼ(RTK)であるc-MET(Ma PC, Naoki K, et al. Cancer Res 2005)やERBB3、シグナル伝達経路であるRAS、RAF、PI3K、LKB1(Koivunen JP, Naoki K, et al. Br J Cancer 2008)など精力的に研究されている。一方、EGFR感受性遺伝子変異を有する肺癌はEGFR阻害剤が著効するが、長期使用により耐性化を来す。EGFR阻害剤耐性肺癌では、EGFR exon20 mutationによるEGFR経路の活性化、他のRTK(VEGFR、IGF1R、c-Met)経路の活性化、下流のPI3K経路の活性化などが報告され、シグナル伝達経路の相互作用も存在することから、複数経路の同時阻害による治療が追求されている。一例として、ASCO2010では再発非小細胞肺癌に対するc-MET阻害剤(ARQ-197)とEGFR阻害剤(erlotinib)併用第相臨床試験が報告され、無増悪生存期間7.2週間の延長など一定の効果が示された。申請者らは、EGFR阻害剤耐性肺癌細胞において、multiple kinase阻害剤とPI3K経路(mTOR)阻害剤の同時併用により相乗効果が認められること、その背景にPI3K経路の上流にあるc-MET阻害が関与していることを示した(Nakachi I, Naoki K, et al. Mol Cancer Res 2010)。さらにIGF1-Rのリン酸化の変化も示唆され、EGFR、c-MET、IGF1-Rおよび共通するシグナル伝達経路であるPI3K経路の相互作用について、さらなる検討を予定している。近年、DNAのメチル化と癌シグナル伝達経路の関連が目玉されている。PI3K経路のPTENのメチル化がgefitinib耐性に関与(Noro et al, Int J Oncol 2007)、肺癌細胞のgefitinib耐性機構にヒストン脱メチル化酵素およびIGF1-R経路が関与(Sharma et al, Cell 2010)している事などが報告され、IGF1-R経路をはじめとするシグナル伝達経路とDNAメチル化との関連についてさらなる解明が望まれている。我々はgefitinib感受性肺癌細胞株であるHCC827、PC9に対しgefitinibを継続投与し耐性化した細胞株(EGFR阻害剤耐性肺癌

細胞株)を作成し、耐性化における癌抑制遺伝子プロモーター領域DNAメチル化の変化を報告した(寺井、池村、猶木ら、2010年日本呼吸器学会学術総会)。それら細胞株でのシグナル伝達経路とDNAメチル化との関連の検討は興味深い。協力関係にあるシカゴ大学・シカゴ癌研究センターのSalgia教授と共同し、Salgia教授の主要な研究テーマの一つであるc-MET(Ma PC, Naoki K, Salgia R et al. Cancer Res 2005など)およびEGFRに関連するc-CBL遺伝子変異などに関して人種差を含めて検討するため、当院の臨床検体を用いた遺伝子変異検索およびmicroRNA解析、臨床背景因子分析を含めた研究を行っている。c-CBLは、EGFR機能を抑制する癌抑制遺伝子と考えられ、c-CBL遺伝子変異やLOHが腫瘍増殖に影響する。EGFR阻害剤耐性でのc-CBL役割はまだ明らかになっておらず今後の課題である。

EGFR経路と血管新生の関連、EGFR経路とVEGF経路の相互関連が報告されている。VEGF阻害剤であるbevacizumabが本邦でも臨床応用されており、使用後に増悪を認める患者さんが存在する。Bevacizumabは抗ヒトVEGF抗体で、動物モデルでの検討は限界があり、ヒト臨床検体での検討のため、EGFR・VEGF阻害剤使用した後に増悪した患者さんから臨床検体を収集している。

## 2. 研究の目的

本研究では、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異を有するEGFR阻害剤感受性肺癌において、EGFR阻害剤使用により耐性化した後の治療に関して、PI3Kキナーゼ(PI3K)経路を中心としたシグナル伝達経路の相互作用を解明し、それらの同時阻害による最適な治療戦略を検討し、臨床応用の可能性を模索する。さらにVEGF阻害剤耐性肺癌との関連、c-CBL遺伝子異常との関連を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1)既知のEGFR耐性遺伝子変異を持つ肺癌細胞株(NCI-H1975)でのPI3K阻害剤とIGF1-R経路阻害での増殖抑制を検討する。
- (2)新規EGFR阻害剤耐性肺癌細胞株での、PI3K経路阻害と同時に阻害すべきシグナル伝達経路(IGF1-R経路、c-MET、EGFR経路)を検討する。特異的阻害剤やsiRNAを用いる。
- (3)上記(1)・(2)の細胞株を免疫不全マウスに移植しin vivoで検討する。
- (4)EGFR阻害剤使用後の増悪患者さんからの臨床検体におけるPI3K経路を中心としたシグナル伝達経路の活性化状態を検討する。
- (5)EGFR阻害剤およびVEGF阻害剤使用後の増悪患者さんからの臨床検体におけるシグナル伝達経路の活性化状態を検討する。肺癌

関連がん抑制遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化を(4)の検体と比較検討する。c-CBL 遺伝子異常や VEGF 関連因子(VEGF、FGF、HIF-1)も検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1)EGFR 阻害剤耐性肺癌細胞株を用いた研究

当研究室で作成した EGFR 阻害剤耐性肺癌細胞株 (HCC827、PC9 由来) を使用し、EGFR 経路とともに近年注目されている FGF/FGFR 経路に関し、特異的阻害剤や siRNA を用いて、最大の効果を及ぼす組み合わせを検討した。EGFR 阻害剤 (gefitinib) 耐性化 PC9 細胞株 (PC9GR) および HCC827 細胞株において、耐性化機序を検討した。既知の耐性遺伝子変異である EGFR T790M はどちらの細胞株においても検出されなかった。一方で、耐性に関与すると報告のある MET 増幅が耐性 HCC827 細胞株で認められたが、PC9GR 細胞株では認められなかったため、この PC9GR 細胞株での耐性機序をさらに検討することとした。cDNA microarray を用いた検討で、耐性化 PC9 細胞株 (PC9GR) では、FGF2 および FGFR1 が親株 (PC9) に比較して高発現していることが明らかとなった。そこで、FGFR 阻害剤である PD173074 を用いて、gefitinib と本薬剤を併用することでの効果を検討した。併用により、PC9GR 細胞株の gefitinib 感受性が回復することが確認され。このことは、FGF2 または FGFR1 に特異的な siRNA を用いることでも同様に確認された。これらのことから、FGF2-FGFR1 経路を介した自己分泌が、EGFR 阻害剤耐性機序の一つとなりうることを示された。以上のことを Mol Cancer Res (2013; 11(7): 759-67) へ発表するとともに、AACR2013 年次総会で報告した (Terai H, Naoki K, et al)。

この研究を発展させるため、遺伝子導入細胞株での検討、具体的には線維芽細胞増殖因子 (FGF) を導入した肺胞上皮細胞の形質転換の検討 (遊走能、コロニー形成)、免疫不全マウスでの腫瘍形成能の研究を行い、その一部を AACR2013 年次総会 (Ishioka K, Naoki K, et al)、第 17 回日本がん分子標的治療学会 (石岡、猶木ら) で報告した。特に FGF9 が肺胞上皮細胞の癌化に関わる可能性、および、非小細胞肺癌細胞株の浸潤能・腫瘍形成能を促進する可能性が示唆された。

EGFR 阻害剤耐性肺癌細胞株の肺癌関連がん抑制遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化に関して、Methyl profiler<sup>TM</sup> PCR system および Methylight の手法により定量的に評価し、シグナル伝達経路に関連した DNA メチル化の変化について検討し、その一部を 2011 年日本癌学会総会において発表した (寺井、猶木ら)。

これらの知見をもとに、今後は、肺癌領域において使用可能な FGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤などの単剤および併用による最適な治療法に関し *in vitro* および *in vivo* においてさらに検討していきたい。

##### (2)臨床検体を用いた検討

臨床検体において、治療前の肺癌患者検体における FGF/FGFR の mRNA 発現を検討し、FGF9 高発現患者は低発現患者と比較し有意に術後再発率および全生存率が不良であることを報告した (Ohgino K, Naoki K, et al. Lung Cancer 2014)。また、肺腺癌と肺扁平上皮癌の臨床検体において、異なる発現を示す microRNA を検討し、治療標的となる可能性を報告した (Hamamoto J, Naoki K, et al. Mol Med Rep 2013)。

EGFR 阻害剤耐性肺癌患者由来検体での検討では、組織型の変化という、より大きな問題を提示する症例に関し報告した (荒井、猶木、他。日本肺癌学会関東支部会 2013 年 3 月) また、EGFR 阻害剤耐性肺癌患者検体での耐性化機序を検討し、耐性肺癌では再発部位により耐性化機序が異なることを報告した (Arai D, Naoki K et al. 第 15 回世界肺癌学会総会 2013)。

EGFR 阻害剤耐性肺癌細胞株、および、EGFR 阻害剤および ALK 阻害剤耐性患者検体を用いて、次世代シーケンスによりがん遺伝子の変化を網羅的に検討した。細胞株では既知の EGFR 阻害剤耐性遺伝子変異 (T790M) 以外に耐性に関与するがん遺伝子異常は明らかでなかった。今後、臨床検体でさらに解析を行い、新たな機序を見出すことができるか検討していく。

#### 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 5 件)

Ohgino K, Soejima K, Yasuda H, Hayashi Y, Hamamoto J, Naoki K, Arai D, Ishioka K, Sato T, Terai H, Ikemura S, Yoda S, Tani T, Kuroda A, Betsuyaku T. Expression of fibroblast growth factor-9 is associated with poor prognosis in patients with resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer, 査読有、83(1)、2014、90-99. DOI:10.1016/j.lungcan.2013.10.016

Hamamoto J, Soejima K, Yoda S, Naoki K, Nakayama S, Satomi R, Terai H, Ikemura S, Sato T, Yasuda H, Hayashi Y, Sakamoto M, Takebayashi T, Betsuyaku T. Identification of microRNAs

differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 査読有、8(2)、2013、456-462. DOI:10.3892/mmr.2013.1517

Terai H, Soejima K, Yasuda H, Nakayama S, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Ikemura S, Sato T, Yoda S, Satomi R, Naoki K, Betsuyaku T. Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC Cells. *Mol Cancer Res*, 査読有、11(7)、2013、759-767.

DOI:10.1158/1541-7786.MCR-12-0652

猶木克彦。肺癌における最新の分子標的治療、*東京内科医会誌*、査読無、28巻3号、2013、248-253.

猶木克彦。肺癌治療の進歩 EGFR 阻害剤を使いこなす。*日本呼吸ケア・リハビリテーション学会誌*、査読無、23巻3号、2013、274-278.

〔学会発表〕(計 10件)

Keiko Ohgino, Kenzo Soejima, Hiroyuki Yasuda, Yuichiro Hayashi, Tetsuo Tani, Aoi Kuroda, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Takashi Sato, Hideki Terai, Shinnosuke Ikemura, Sohei Nakayama, Satoshi Yoda, Junko Hamamoto, Katsuhiko Naoki, Tomoko Betsuyaku. EXPRESSION OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR-9 IS ASSOCIATED WITH POOR PROGNOSIS OF RESECTED NON-SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS、第15回世界肺癌学会総会、2013年10月29日、オーストラリア(シドニー)。

Daisuke Arai, Kenzo Soejima, Hiroyuki Yasuda, Tetsuo Tani, Aoi Kuroda, Kota Ishioka, Keiko Ohgino, Takashi Sato, Hideki Terai, Shinnosuke Ikemura, Junko Hamamoto, Katsuhiko Naoki, Yuichiro Hayashi, Tomoko Betsuyaku. CHARACTERISTICS OF RE-BIOPSIED NSCLC PATIENTS WITH ACQUIRED RESISTANCE TO EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITORS、第15回世界肺癌学会総会、2013年10月28日、オーストラリア(シドニー)。

荒井大輔、副島研造、猶木克彦、石岡宏太、扇野圭子、佐藤崇、安田浩之、林雄一郎、別役智子、EGFR-TKI 耐性化後に再生検を行った非小細胞肺癌 17 例の検討、第11回日本臨床腫瘍学会学術総会、2013年8月31日、仙台。

石岡宏太、副島研造、猶木克彦、黒田葵、荒井大輔。FGF9 が肺胞上皮細胞株および肺癌細胞株に及ぼす影響の検討、第17回

日本がん分子標的治療学会学術集会2013年6月13日、京都。

Terai H, Soejima K, Naoki K, Yasuda H, Satomi R, Nakayama S, Yoda S, Ikemura S, Sato T, Ishioka K, Arai D, Ohgino K, Tani T, Kuroda A, Hamamoto J, Betsuyaku T. Activation of FGF2-FGFR1 pathway in EGFR-mutant lung cancer cell line with long-term gefitinib exposure. 2013 AACR Annual Meeting, 2013年4月10日、USA (Washington DC)。

Kota Ishioka, Kenzo Soejima, Hiroyuki Yasuda, Keiko Ohgino, Satoshi Yoda, Takashi Sato, Junko Hamamoto, Daisuke Arai, Tetsuo Tani, Aoi Kuroda, Katsuhiko Naoki, Tomoko Betsuyaku. FGF9 overexpression promotes tumorigenic potential of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, and is associated with poor prognosis in NSCLC patients 2013 AACR Annual Meeting, 2013年4月10日、USA (Washington DC)。

荒井大輔、黒田葵、谷哲夫、持丸貴生、扇野圭子、佐々木衛、石岡宏太、田中希宇人、安田浩之、石井誠、福永興壺、猶木克彦、田坂定智、副島研造、林雄一郎、別役智子。EGFR-TKI 耐性化後の再生検により扁平上皮癌と診断した NSCLC-NOS の2例、第166回日本肺癌学会関東支部会、2013年3月16日、東京。

寺井秀樹、副島研造、猶木克彦、安田浩之、池村辰之介、佐藤崇、荒井大輔、石岡宏太、扇野圭子、浜本純子、別役智子。長期ゲフィチニブ曝露による EGFR 変異肺癌細胞株における FGF2-FGFR1 経路の活性化、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月20日、札幌。

Keiko Ohgino, Kenzo Soejima, Daisuke Arai, Kota Ishioka, Takashi Sato, Hideki Terai, Shinnosuke Ikemura, Satoshi Yoda, Junko Hamamoto, Katsuhiko Naoki, Tomoko Betsuyaku. Expression of fibroblast growth factor-9 is associated with poor prognosis of resected non-small cell lung cancer patients. AACR Annual Meeting 2012, 2012年4月3日、USA (Chicago)

Terai H, Soejima K, Naoki K, Satomi R, Nakayama S, Yoda S, Ikemura S, Sato T, Hamamoto J, Asano K, Betsuyaku T. Aberrant DNA methylation and expression of mRNA in EGFR-mutant lung cancer cell line with long-term gefitinib exposure. 第69回日本癌学会総会、2011年10月、名古屋。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

猶木 克彦 (Naoki, Katsuhiko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：40265806

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

副島 研造 (Soejima, Kenzo)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30236145

池村 辰之助 (Ikemura, Shinnosuke)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30445291

### (4)研究協力者

浜本 純子 (Hamamoto, Junko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40570239