

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501316

研究課題名(和文)EGFRチロシンキナーゼ阻害剤によるアポトーシスにおけるサバイビンの役割

研究課題名(英文)Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations.

研究代表者

岡本 邦男 (OKAMOTO, Kunio)

近畿大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90460865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：EGFRチロシンキナーゼ阻害剤によるアポトーシスにおいてサバイビンの発現低下が重要な役割を果たしていることをin vitro、in vivoにおいて証明した。そしてEGFR阻害剤に耐性を示すEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌株に対し、EGFR阻害剤であるエルロチニブとサバイビン阻害剤であるYM155の併用を行うことでその耐性を克服し、これらの細胞にアポトーシスを生じさせることができることをin vitro、in vivoにおいて証明した。これらの成果をもとにエルロチニブとYM155の併用療法がEGFR阻害剤の耐性を克服できる可能性を示した論文として海外雑誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism by which epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) induce apoptosis in non-small cell-lung cancer (NSCLC) cells that are positive for activating mutations of the EGFR remains unclear. In this study, we report the effects of the EGFR-TKI gefitinib on expression of the antiapoptotic protein survivin that have functional consequences in EGFR mutation-positive NSCLC cells. Immunoblot analysis revealed that gefitinib downregulated survivin expression, likely through inhibition of the PI3K-AKT signaling pathway, in NSCLC cells positive for EGFR mutation. Stable overexpression of survivin attenuated gefitinib-induced apoptosis and also inhibited the antitumor effect of gefitinib in human tumor xenografts. Our results indicate that downregulation of survivin plays a pivotal role in gefitinib-induced apoptosis in EGFR mutation-positive NSCLC cells.

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：臨床腫瘍学 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

EGFR は細胞表面に発現し癌細胞の増殖、進展に関わる細胞内シグナルを司るレセプタータイプのチロシンキナーゼである。ゲフィチニブやエルロチニブは EGFR チロシンキナーゼ阻害剤として開発され非小細胞肺癌治療に導入された分子標的治療剤である。これら EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の臨床効果が、癌細胞における EGFR 遺伝子チロシンキナーゼドメインの遺伝子変異の存在と強い相関があることが注目されている。EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者を対象にした第 Ⅲ 相臨床試験においても、ゲフィチニブによる治療はこれまでの標準的化学療法と比較して有意に優れていることが近年報告されている (New England Journal of Medicine 2010;362(25):2380-8)。

我々は、EGFR 遺伝子変異を有する症例が EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に高い感受性を示す分子メカニズムを解明すべく EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株を用いた実験を行い、EGFR 遺伝子変異により EGFR はリガンド結合非依存的に 2 量体を形成することが可能であり、これにより変異型 EGFR はリガンド結合非依存的に恒常的に活性化されその増殖シグナルを下流へ伝達していることを見出し報告した (Cancer Research; 2007, vol67, p2046-2053)。このことは EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌の増殖や進展が EGFR シグナルに大きく依存しており、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤によりこの増殖シグナルが遮断されることで顕著な抗腫瘍効果が得られることを意味している。これらの基礎的研究、臨床研究の成果から EGFR 遺伝子変異を有する進行非小細胞肺癌患者において EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は重要な治療手段として位置付けられている。我々はこれまでも EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株をゲフィチニブで暴露した際に細胞内で生じる下流シグナルの変化について研究を行っており、その下流シグナルの一つとして 5-FU 系薬剤の効果規定因子である TS の発現が低下することを見出し、5-FU 系薬剤とゲフィチニブの同時併用療法が相乗効果を示すことを見出し報告している (Clin Cancer Res. 2009;15(3):907-13, Mol Cancer Ther. 2008;7(3):599-606)。従って EGFR シグナルの下流を詳細に解明することが EGFR 遺伝子変異を有する進行非小細胞肺癌患者に対する新しい治療戦略の開発につながると考えている。これまでに、ゲフィチニブによって EGFR の主要な下流シグナルである PI3K/AKT、MEK/ERK 経路が抑制され、EGFR 遺伝子変異陽性細胞がアポトーシスを起こすことが報告されているが (Science.2004;305(5687):1163-7) そのアポトーシスの分子メカニズムは十分に解明されていない。そこでこのアポトーシスの分子メカニズムをさらに詳細に検討すること

で、新たな治療戦略の開発を目的とし、我々がこれまで得てきた知見をもとに本研究を行う。

## 2. 研究の目的

EGFR(上皮成長因子受容体)チロシンキナーゼ阻害剤は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の治療において非常に優れた抗腫瘍効果を発揮する分子標的治療薬であり、すでに臨床導入されている。一方、In vitro において EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株においてアポトーシスを引き起こすが、その分子メカニズムは十分に解明されていない。そこで本研究においてはゲフィチニブのアポトーシス関連因子への効果を検討し、その分子メカニズムに応じて新治療の基礎的検討を行い臨床へ導入を図ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

我々は現在までに EGFR 遺伝子変異を有し EGFR チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブに対して高感受性を呈する肺癌細胞株 PC9 と HCC827 に対してレトロウイルスを用いてサバイピンを高発現させた細胞株 (PC9/Survivin、HCC827/Survivin) を樹立することに成功している。また、我々の樹立したサバイピン高発現株においては、ゲフィチニブ暴露時に EGFR のリン酸化は抑制されるが、サバイピンの発現量は低下しないことを確認している。これらの細胞株を用いた in vitro 及びマウスを用いた in vivo の実験系により、ゲフィチニブ暴露時に生じるサバイピン発現量の変化がもたらす役割を解明し、ゲフィチニブの抗腫瘍効果がサバイピンの発現変化と関与していることが確認されれば、さらにその耐性の分子メカニズムに応じた耐性克服の治療開発を試みる。

## 平成 23 年度

(1) PC9/Survivin、HCC827/Survivin に対するゲフィチニブの抗腫瘍効果の in vitro、in vivo における検討

我々が樹立したサバイピン高発現株 (PC9/Survivin、HCC827/Survivin) においてゲフィチニブによって EGFR、AKT のリン酸化が抑制されてもサバイピンの発現が低下しないことを確認した。さらにアポトーシスについても Annexin 法で解析したところ、サバイピン高発現株においては、親株と比較してアポトーシスを示す細胞が減少することが確認できた。この結果をもってヌードマウスを用いた in vivo の実験として HCC827 及び HCC827/Survivin の細胞株を用いて腫瘍形成を行い、ゲフィチニブを連日投与しその抗腫瘍効果を確認した

ところ、In vitro での結果と同様に、親株と比較してゲフィチニブによる腫瘍縮小効果が抑制され、サバイピン高発現株の腫瘍はゲフィチニブに耐性を示した。

(2) PTEN 欠失を伴う EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌株におけるサバイビン特異的 siRNA による EGFR-TKI 感受性変化の検討  
上記の実験によって EGFR-TKI 暴露時のサバイビン発現量の低下が EGFR-TKI によって引き起こされるアポトーシスに重要な役割を果たしていることが確認された。そこで、EGFR-TKI のひとつであるタルセバに対して de novo 耐性である PTEN 欠失を伴う EGFR 変異陽性非小細胞肺癌株を用いて耐性克服の実験を行っている。この細胞株においてはタルセバによるサバイビンの発現低下が起こらず耐性を示すことを確認しており、サバイビンに特異的な siRNA を用いてサバイビンの発現量を低下させた状況下でタルセバを暴露させたところ、Annexin 法においてタルセバ単独では生じなかったアポトーシスの変化が著明に生じることを確認することが出来た。

平成 24 年度

今回我々が樹立したサバイビン高発現株 (PC9/Survivin, HCC827/Survivin) と、その親株である EGFR 遺伝子変異陽性細胞株 (PC9, HCC827) において、EGFR 阻害剤のひとつであるゲフィチニブにより引き起こされる EGFR の下流シグナルの変化とアポトーシスを Western blot 法及び Annexin 法にて検討したところ、サバイビン高発現株においてはゲフィチニブによるサバイビンの発現低下が抑制され、アポトーシスを生じなくなることが確認された。この変化はヌードマウスを用いた in vivo の実験においても同様であり、サバイビン高発現株でできた腫瘍はゲフィチニブに耐性を示すことが確認された。これらの結果によって EGFR 阻害剤暴露時のサバイビン発現量の低下が EGFR 阻害剤によって引き起こされるアポトーシスと関連していることが証明された。

そこで、次に EGFR 阻害剤に対して de novo 耐性である PTEN 欠失を伴う EGFR 変異陽性非小細胞肺癌株を用いた実験を行った。これらの細胞株においては EGFR 阻害剤を暴露してもサバイビンの発現低下が生じず、アポトーシスを生じないが、サバイビンに特異的な siRNA やサバイビン特異的分子標的治療薬である YM155 を用いてサバイビンの発現量を低下させた状態で EGFR 阻害剤のひとつであるエルロチニブを暴露させることで、これらの細胞株にアポトーシスを生じさせることを見出した。さらにヌードマウスを用いた in vivo の実験においてもエルロチニブ経口投与と YM155 の皮下持続投与の併用療法によって EGFR 阻害剤耐性の EGFR 遺伝子変異陽性細胞を克服することが出来た。これらの基礎的研究成果を論文として報告した (Mol Cancer Ther. 2012 Jan;11(1):204-13)。

平成 25 年度

(3) EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者組織検体のサバイビン、PTEN 発現の検出及びゲフィチニブの治療効果との関連性の解析

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の病理診断・組織型診断に用いられた手術もしくは組織生検検体から薄切標本を作成し、サバイビンの PTEN の遺伝子変異ならびに蛋白発現を DNA 解析と免疫染色にて同定し、ゲフィチニブ治療の無増悪生存期間や患者の予後などとの相関関係を検討する。本研究室ではこれまでに EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の組織検体を用いた遺伝子変異及び免疫染色での腫瘍発現蛋白の検出と、臨床における分子標的薬剤の効果、患者予後との相関に関する報告をしており (J Thorac Oncol.;5(3):399-400)、実施可能である。

#### 4. 研究成果

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤によるアポトーシスにおいてサバイビンの発現低下が重要な役割を果たしていることを in vitro、in vivo において証明した。そして EGFR 阻害剤に耐性を示す EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌株に対して、EGFR 阻害剤であるエルロチニブとサバイビン阻害剤である YM155 の併用を行うことでその耐性を克服し、これらの細胞にアポトーシスを生じさせることができることを in vitro、in vivo において証明した。

これらの成果をもとにエルロチニブと YM155 の併用療法が EGFR 阻害剤の耐性を克服できる可能性を示した論文として海外雑誌に報告した。

#### 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 4 件)

Okamoto K, Okamoto I, Hatashita E, Kuwata K, Yamaguchi H, Kita A, Yamanaka K, Ono M, Nakagawa K. Overcoming erlotinib resistance in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer cells by targeting survivin. Mol Cancer Ther. 11(1):204-213, 2012. 査読有.

Okamoto I, Arao T, Miyazaki M, Satoh T, Okamoto K, Tsunoda T, Nishio K, Nakagawa K. Clinical Phase I Study of Elpamotide, a Peptide Vaccine for VEGFR 2, in Patients with Advanced Solid Tumors. Cancer Science. 103(12):2135-2138. 2012. 査読有.

Tanizaki J, Okamoto I, Okamoto K, Takezawa K, Kuwata K, Yamaguchi H, Nakagawa K. MET Tyrosine Kinase Inhibitor Crizotinib (PF-02341066)

Shows Differential Antitumor Effects in Non-small Cell Lung Cancer According to MET Alterations. Journal of Thoracic Oncology.6(10):1624-31.2011. 査読有.

Kidera Y, Satoh T, Ueda S, Okamoto W, Okamoto I, Fumita S, Yonesaka K, Hayashi H, Makimura C, Okamoto K, Kiyota H, Tsurutani J, Miyazaki M, Yoshinaga M, Fujiwara K, Yamazoe Y, Moriyama K, Tsubaki M, Chiba Y, Nishida S, Nakagawa K. High-dose dexamethasone plus antihistamine prevents colorectal cancer patients treated with modified FOLFOX6 from hypersensitivity reactions induced by oxaliplatin. Int J Clin Oncol.16(3):244-249.2011. 査読有.

岡本 勇 (OKAMOTO, Isamu)  
九州大学・医学部・准教授  
研究者番号：10411597

〔学会発表〕(計 5 件)

岡本勇, 岡本邦男, 清水俊雄, 中川和彦, サバイピンを標的とした EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性克服, 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013.06.13, 国立京都国際会館 (京都市)

岡本 邦男, EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対するサバイピンを標的とした Erlotinib 耐性の克服, 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2012.07.26, 大阪国際会議場 (大阪市)

岡本 邦男, ベバジズマブ投与による咯血症例において気管支内視鏡検査での経時観察が出来た 1 例, 第 95 回日本肺癌学会関西支部会, 2012.02.25, 薬業年金会館 (大阪市)

岡本邦男, Role of survivin in EGFR inhibitor-induced apoptosis in non-small cell lung cancers positive for EGFR mutations. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.03, 名古屋国際会議場 (名古屋市)

岡本邦男, サバイピンが EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌において EGFR-TKI によるアポトーシスに果たす役割, 第 15 回日本がん分子標的治療学, 2011.06.22, ホテル日航東京 (東京都港区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 邦男 (OKAMOTO, Kunio)  
近畿大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40298964

### (2) 研究分担者

中川 和彦 (NAKAGAWA, Kazuhiko)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：40298964