

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590308

研究課題名(和文) TRAILによるErbb受容体活性化シグナルの分子機構解析と新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of trans-activation mechanism from TRAIL receptor to EGFR

研究代表者

大森 亨 (Ohmori, Tohru)

昭和大学・腫瘍分子生物学研究所・准教授

研究者番号：10276529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はEGFR-TKI耐性非小細胞肺癌株を樹立し、この細胞が親株に比してTRAILに対して約70倍の交叉感受性を獲得することを見出した。親株PC-9では、TRAILはapoptotic signalを活性化すると同時に、EGFRへのcrosstalkを介してanti-apoptotic signalを誘導するため、抗腫瘍活性は限定的となる。c-MET過剰発現をきたした耐性株においては、crosstalk signalは誘導されず、TRAIL刺激時のAKT/NFκB活性化が減弱することが明らかとなった。EGFR-TKI/TRAIL併用療法は、NSCLCに対する効果的な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We established EGFR-TKI-resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and found that these cell lines acquired collateral sensitivity to Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (about 70 times) as compared with parental cell line. In parental PC-9, anti-tumor effect of TRAIL was restricted, because TRAIL activates not only apoptotic signaling but also anti-apoptotic signaling through Akt/NFκB activation by cross talk signaling from TRAIL receptor to EGFR. In case of the resistant cell lines that overexpressed c-MET, the crosstalk signaling from TRAIL receptor to c-MET was not observed, and TRAIL-mediated Akt/NFκB activation was quite diminished. From these observations, EGFR-TKI/TRAIL combination is thought to be useful therapy for NSCLC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：EGFR TRAIL EGFR-TKI 薬剤耐性 crosstalk signal

1. 研究開始当初の背景

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は TNF superfamily に属するサイトカインであり、受容体を介して広範囲のがん細胞に apoptosis を誘導するが、正常細胞には影響しない。しかし、TRAIL には 2 つの相反する作用、即ち apoptosis の誘導作用と抑制作用があることが報告されており、実際にはがん細胞が TRAIL に対して抵抗性であることが多い。

一方、ヒト上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) は、肺がんを含む多くのがんで過剰発現が確認されている。EGFR シグナルは過剰発現ががんの増殖シグナルとなることから、EGFR 阻害剤 (EGFR-TKI) は再発進行非小細胞肺がんの標準治療の一つとなっている。しかし、EGFR-TKI による抗がん剤治療を行って奏効しても耐性化により全ての症例で再発する。EGFR はリガンド刺激に対し、ホモあるいはヘテロ 2 量体を形成することで活性化するが、直接的なリガンドではない TNF、IL-8、IL-1、IL-1 や IFN- γ などのサイトカインからトランス活性化を受けることが明らかにされている。

我々は、ヒト非小細胞肺がん株 PC-9 に対する EGFR-TKI の持続接触により耐性株 PC-9MET200、PC-9MET1000 を樹立し、EGFR-TKI 耐性の分子機構解析を行った。この結果、PC-9/MET では標的である EGFR の発現が減少する一方で、肝細胞増殖因子 HGF の受容体である MET の過剰発現をきたすことで EGFR-TKI 耐性を獲得していることを明らかにした。

興味深いことに、1) 親株に比して PC-9/MET は TNF- α 、TRAIL の細胞毒性に対して約 70 倍の交差感受性を獲得する。2) 親株において TNF- α により EGFR のトランス活

性を介して AKT 活性化をきたし、最終的に apoptosis 抑制蛋白質群 (IAPs) を活性化することにより apoptosis を阻害する。3) 耐性株では EGFR の発現低下により同シグナルが抑制されることで TNF- α 高感受性を獲得していることを明らかにした [Ando K, Ohmori T et al Clin Cancer Res, 2005]。また共同研究者の山岡は、4) TNF- α は Src のリン酸化を介して EGFR と ErbB2 を活性化していること、5) EGFR の下流の AKT 活性化が細胞の生存に関与することを証明した。

2. 研究の目的

以上より、がん細胞において TRAIL による ErbB 受容体のトランス活性化シグナルが TRAIL 誘導性の apoptosis に抑制的に働いており、このシグナル伝達において耐性株での MET 過剰発現は ErbB 受容体の発現低下を補完しないものと推察される。本研究では、培養細胞を用いて TRAIL による ErbB 受容体トランス活性化の分子機構を解明すると共に、TRAIL 誘導性 apoptosis に及ぼす影響について解析する。更に、EGFR-TKI と TRAIL シグナルを用いた新規がん治療法の開発を行うことを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

EGFR active mutation (exon 19, 15 bp del) を発現する EGFR-TKI 感受性ヒト非小細胞肺がん株 PC-9 を用いて、EGFR-TKI の持続接触により耐性株 PC-9MET200、PC-9MET1000 を樹立した。また、HEK293 細胞に、それぞれ wild type EGFR 及び active mutation EGFR 遺伝子を導入した、293_pEGFR、293_p Δ 15 細胞を作製した。感受性試験は MTT assay を用い、併用効果については isobologram 法で評価を行った。EGFR-TKI 並びに TRAIL の、細胞内シグナル伝達機構の解析は Western blot 法で解析した。EGFR の homo-, hetero-dimer 形成については、BS3 を用いた dimerization assay で解析した。

4. 研究成果

I) TRAIL による EGFR trans-activation の分子機構

PC-9 細胞において TRAIL 接触後 30 分以内に EGFR の自己リン酸化が誘導され、下流の Erk、Akt シグナル経路が活性化された。PC-9MET200、PC-9MET1000 細胞においては、PC-9 に比して EGFR 発現が低下しており、TRAIL 刺激時の下流シグナル活性化は限定的であった。PC-9 細胞において、TRAIL 受容体下流の FADD を siRNA により低下させた場合、TRAIL による EGFR 活性化は著明に減弱することから、TRAIL 刺激による EGFR 活性化は TRAIL 受容体から FADD を介した trans-activation であることを確認した。一方、PC-9 細胞と耐性細胞で、TRAIL 受容体 DR4、DR5 並びに decoy receptor である DcR1、DcR2 の発現に大きな差は認めなかった。

TRAIL による EGFR の homo-、hetero-dimer 形成を、dimerization assay により検討した。PC-9 細胞に TNF α 、TRAIL を接触させた場合、濃度依存的に EGFR の dimerization が亢進した。培養液中に EGFR ligand の中和抗体 (anti-EGF ab, anti-TGF α ab) を添加した場合、TRAIL による EGFR 活性化、dimerization が抑制されることから、TRAIL が EGFR ligand の分泌を促進することにより EGFR を活性化すると考えられた。

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 10 件)

1. Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Phase II trial of amrubicin and carboplatin in patients with sensitive or refractory relapsed small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
2. Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Are levels of pro-gastrin-releasing peptide or neuron-specific enolase at relapse prognostic factors after relapse in patients with small-cell

lung cancer? Lung Cancer. 2011 Feb;71(2):224-8.

3. Oki Y, Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Phase II study of S-1, a novel oral fluoropyrimidine, and biweekly administration of docetaxel for previously treated advanced non-small-cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2011;67(4):791-7.
4. Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Phase II trial of amrubicin and carboplatin in patients with sensitive or refractory relapsed small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2011;73(3):345-50.
5. Murata Y, Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Phase II trial of the combination of carboplatin and irinotecan in elderly patients with small-cell lung cancer. Eur J Cancer. 2011 Jun;47(9):1336-42.
6. Sugiyama T, Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Evaluation of the efficacy and safety of the combination of gemcitabine and nedaplatin for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. Oncology. 2011;81(3-4):273-80.
7. Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. Oncol Res. 2012;20(2-3):131-7.
8. Okuda K, Hirose T, Yamaoka T, Ohmori T, et al Evaluation of the safety and efficacy of combination chemotherapy with vinorelbine and platinum agents for patients with non-small cell lung cancer with interstitial lung disease. Anticancer Res. 2012 32(12):5475-80.
9. Sakai A, Ohmori T, et al Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. J Thorac Oncol. 2012 9:1337-44.
10. Hiroaki Ito, Tohru Ohmori, et al Prognostic impact of the number of viable circulating cells

with high telomerase activity in gastric cancer patients: A prospective study. *Int J Oncol* 45: 227-234, 2014

〔学会発表〕(計 39 件)

1. 山岡利光, 大森 亨, 廣瀬敬, 他. 気道上皮細胞と肺癌細胞における TNF による EGFR トランス活性化に寄与するリガンドの同定とアポトーシス制御機構. *日本呼吸器学会雑誌* 49 巻増刊 Page159 (2011.03) 東京
2. 杉山智英, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 発熱性好中球減少症におけるプロカルシトニンの有用性の検討. *日本呼吸器学会雑誌* 49 巻増刊 Page162 (2011.03) 東京
3. 奥田健太郎, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 超高齢者進行非小細胞肺癌の治療の有用性と安全性について. *日本呼吸器学会雑誌* 49 巻増刊 Page294 (2011.03) 東京
4. 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 再発あるいは前治療無効小細胞肺癌(SCLC)に対する amrubicin, carboplatin 併用第 II 相試験. *日本呼吸器学会雑誌* 49 巻増刊 Page295 (2011.03) 東京
5. Tsuyoki Kadofuku, Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, Tohru Ohmori et al: HSP70 specifically binds to 15 bp deletion mutant EGFR and modulates sensitivity to EGFR-TKI. *Proceedings of American Association for Cancer Research*, Vol. 52 699, 2011 Orland FL, USA
6. 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬, 他: EGFR-TKI 耐性細胞に対する ARQ197 の Met 阻害機構第 15 回がん分子標的治療研究会総会(ワークショップ W6-4) 2011 東京
7. Tohru Ohmori, Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, et al: HSP70 may cause EGFR-TKIs-resistance due to inhibit drug binding to EGFR in the cell that expressed mutant EGFR 第 70 回日本癌学会総会 (English oral session E-1017), 2011 名古屋
8. Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, Tohru Ohmori, et al: TNF transactivates phospho-tyrosine 1068 of EGFR through TACE/EGFR-ligand dependent mechanism. 第 70 回日本癌学会総会 (P-2051), 2011 名古屋
9. Ai Irisawa, Tohru Ohmori, T et al: Expression study of micro RNA in Gefitinib resistant cell lines. 第 70 回日本癌学会総会 (P-2095), 2011 名古屋
10. 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. IV 期非小細胞肺癌における末梢血中がん細胞数(CTC)と抗がん剤治療の効果と予後との関連性. *肺癌* 51 巻 5 号 Page421(2011.10) 大阪
11. 中島賢尚, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 高齢者進行非小細胞肺癌に対する nedaplatin +gemcitabine 併用療法の有効性と安全性の検討. *肺癌* 51 巻 5 号 Page486(2011.10) 大阪
12. 楠本壮二郎, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 糖尿病合併肺癌の現状について. *肺癌* 51 巻 5 号 Page495(2011.10) 大阪
13. 杉山智英, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 当院における COPD 合併肺癌手術例に関する検討. *肺癌* 51 巻 5 号 Page516(2011.10) 大阪
14. 山岡 利光, 村廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 気道上皮細胞と非小細胞肺癌細胞における TACE を介した TNF による EGFR のトランス活性化機序の検討. *日本呼吸器学会誌* 1 巻増刊 Page323 (2012.03) 神戸
15. 中島 賢尚, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 高齢者進行非小細胞肺癌の nedaplatin+gemcitabine 併用療法の有効性と安全性のレトロスペクティブ検討. *日本呼吸器学会誌* 1 巻増刊 Page264(2012.03). 神戸
16. 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 切除不能局所進行非小細胞肺癌に対する胸部放射線療法と vinorelbine, carboplatin 同時併用第 II 相試験. *日本呼吸器学会誌* 1 巻増刊 Page326 (2012.03) 神戸
17. 杉山 智英, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他. 当院における COPD 合併肺癌手術例に関する検討. *日本呼吸器学会誌* 1 巻増刊 Page326

- (2012.03). 神戸
18. 楠本 壮二郎, 廣瀬敬, 山岡利光, 大森 亨, 他糖尿病合併肺癌の現状について 日本呼吸器学会誌 1 巻増刊 Page319(2012.03) 神戸
 19. Tohru Ohmori, Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, et al: HSP 70 may cause EGFR-TKIs-resistance due to inhibit drug binding to EGFR in the cells that expressed mutant EGFR. Proceedings of American Association for Cancer Research, #1900, (2012, 04, Chicago)
 20. Tohru Ohmori, Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, et al. Specific epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites promote epithelial cell chemotaxis and restitution. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research (2012, 04, Chicago)
 21. Tohru Ohmori, Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, et al Cancer Vaccination trial with novel multiple peptides in previously treated advanced non-small cell lung cancer. Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (2012, 06, Chicago)
 22. 鈴木俊宏, 大森 亨、他 : Micro RNA によるゲフィチニブ耐性関連因子の調節 第 16 回 日本がん分子標的治療学会 S2-4, 2012 福岡
 23. 白井 崇生, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他 Carboplatin+Paclitaxel+ Bevacizumab による化学療法中に III 度房室ブロックをきたした肺腺癌症例 肺癌 52 巻 3 号 Page359-360(2012.06) 岡山
 24. 石田 博雄, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他 進展型小細胞肺癌の生存期間に対するアムルピシンの影響に関する検討. 日本癌治療学会誌 47 巻 3 号 Page2134 (2012.10) 横浜
 25. 杉山 智英, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他当院における COPD 合併切除不能非小細胞肺癌に関する検討. 肺癌 52 巻 5 号 Page775 (2012.10) 岡山
 26. 村田 泰規, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他高齢者小細胞肺癌に対する治療成績の検討. 肺癌 52 巻 5 号 Page637 (2012.10) 岡山
 27. 大木 康成, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他 EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌患者に対するゲフィチニブとゾレドロン酸併用療法の有用性に関する後方視的解析. 肺癌 52 巻 5 号 Page625 (2012.10) 岡山
 28. 中島 賢尚, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他. FGFR-TKI の再投与の有効性と安全性の検討. 肺癌 52 巻 5 号 Page621(2012.10) 岡山
 29. 石田 博雄, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他進行肺大細胞神経内分泌癌と進展型小細胞肺癌に対する化学療法の有効性の比較. 肺癌 52 巻 5 号 Page598 (2012.10) 岡山
 30. 石田 博雄, 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他進展型小細胞肺癌の生存期間に対するアムルピシンの影響に関する検討. 肺癌 52 巻 5 号 Page586 (2012.10) 岡山
 31. 大森 亨, 山岡利光, 廣瀬 敬、他切除不能局所進行非小細胞肺癌に対する胸部放射線療法と vinorelbine, carboplatin 同時併用第 II 相試験. 肺癌 52 巻 5 号 Page579 (2012.10) 岡山
 32. Tohru Ohmori, Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, et al: A novel c-MET inhibitor, tivantinib, shows an additive growth-inhibitory effect with erlotinib through enhanced degradation of c-MET protein via its recycling pathway 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research P-04, 2013 鹿児島
 33. 伊藤 寛晃, 大森 亨, 他 循環癌細胞の個別採取と増幅抽出ゲノム DNA の次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析. 第 113 回 日本外科学会(福岡), ポスターセッション(375) 新規治療法開発 遺伝子解析, 2013.4.1 京都
 34. Toshimitsu Yamaoka, Takashi Hirose, Tohru Ohmori et al The characteristics of an acquired dual resistance to EGFR & MET inhibitors in non-small cell lung cancer, harboring active mutation of EGFR. #5648 Annual Meeting 2013, American Association for Cancer Research

Washington

35. Masanao Nakashima, Takashi Hirose, Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, et al Clinical benefit of 2nd EGFR-TKI retreatment on overall survival in patients with advanced non-small cell lung cancer 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 P-1413 2013 仙台
36. 山岡 利光, 大森 亨, 他 MET 高感受性を示す EGFR-TKI 耐性 PC-9 細胞における MET 阻害剤耐性細胞株の樹立 / The characteristics of dual resistance to EGFR & MET inhibitors in pulmonary adenocarcinoma, PC-9 cells 第 72 回日本癌学会学術総会 E-2030, 2013 横浜
37. 伊藤 寛晃, 大森 亨, 他 表面増強ラマン散乱 (SERS) を用いた新しいオミックス解析技術の開発 / Novel methodology of integrated omics analysis by using Surface Enhanced Raman Scattering (SERS): A Preliminary Study 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 横浜
38. Toshihiro Suzuki, Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, et al Contribution of miR-205 in gefitinib-resistant lung cancer cell lines. Annual Meeting 2014, American Association for Cancer Research SanDiego
39. Toshimitsu Yamaoka, Tohru Ohmori, et al TNF transactivation of EGFR protects EGFR-TKI, gefitinib induced pulmonary epithelial cell apoptosis and injury in TNF transgenic mice. #2277 Annual Meeting 2014, American Association for Cancer Research SanDiego

〔図書〕(計3件)

1. 大森 亨: 薬剤耐性とその克服: 新臨床腫瘍学 (改訂第3版): 231 - 234, 2012
2. 山岡利光, 大森 亨: EGFR 阻害剤の耐性とその克服 (The mechanisms of resistance to EGFR-TKIs and challenges to overcome resistance in EGFR mutant Non-small cell lung cancer) 癌と化学療法 39 巻 6 号 Page857-862 (2012.6)

3. 大森 亨: 薬剤耐性研究 - 次世代シークエンサーを用いた抗がん剤感受性予測 - 日本医師会雑誌 142:52, 2013

〔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:
大森 亨 (OHMORI, Tohru)
昭和大学腫瘍分子生物学研究所・准教授
研究者番号: 10276529

(2) 研究分担者
山岡利光 (YAMAOKA, Toshimitsu)
昭和大学腫瘍分子生物学研究所・講師
研究者番号: 40384359

廣瀬 敬 (HIROSE, Takashi)
昭和大学内科学講座呼吸器内科学分野・准教授
研究者番号: 40387038

(3) 連携研究者
()

研究者番号: