

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591134

研究課題名(和文)非小細胞肺癌にてKRAS変異及びEGFR変異により誘導されるEREG発現の意義

研究課題名(英文)Significance of epiregulin expression induced by KRAS or EGFR mutation in non-small-cell lung cancer

研究代表者

砂長 則明(SUNAGA, NORIAKI)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70400778

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)：EREG過剰発現は、NSCLCにおいてKRAS, BRAF, EGFR変異によるMEK-ERKシグナル伝達経路活性化や、KRASコピー数増加により誘導され、EREG活性阻害によりKRAS変異NSCLCの腫瘍抑制効果を認めた。NSCLC腫瘍検体を用いた解析では、胸膜浸潤、リンパ管侵襲、血管侵襲陽性の高悪性度のNSCLCでEGFR発現が高く、EREG高発現はNSCLCの独立した予後不良因子であり、特にKRAS変異かつEREG高発現NSCLCの予後は特に不良であった。本研究の結果から、EREGの過剰発現はKRAS変異陽性NSCLCの悪性形質に関与し、EREGを標的とした分子標的治療の有効性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：EREG is overexpressed in non-small-cell lung cancers (NSCLCs) harboring KRAS, BRAF or EGFR mutations compared with small-cell lung cancers (SCLCs) or NSCLCs with wild-type KRAS/BRAF/EGFR. EREG expression was reduced by knockdown of mutant KRAS, BRAF or EGFR or by MEK or ERK inhibition in NSCLC cells. EREG expression positively correlated with KRAS copy number in KRAS-mutant NSCLCs. EREG was predominantly expressed in NSCLC tumors with pleural involvement, lymphatic permeation or vascular invasion and in KRAS-mutant adenocarcinomas. EREG expression is an independent prognostic marker and EREG overexpression along with KRAS mutations correlated with an unfavorable prognosis for lung adenocarcinoma patients. In KRAS-mutant and EREG overexpressing NSCLCs, EREG attenuation suppressed tumor growth and induced apoptosis. These results suggest that oncogenic KRAS-induced EREG overexpression contributes to an aggressive phenotype and could be a therapeutic target in oncogenic KRAS-driven NSCLC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学&#8226;呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌 KRAS遺伝子変異 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌(NSCLC)において、KRAS および EGFR 遺伝子変異は高頻度に認められる遺伝子異常である。EGFR 変異 NSCLC 患者に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)治療の有効性が明らかとなる一方で、治療経過中に EGFR-TKI に対して耐性を獲得する問題があり、EGFR-TKI によらないEGFR変異NSCLC治療法の開発が望まれる。また、KRAS 変異 NSCLC 患者に対しての治療法は未だ確立されておらず、KRAS 変異 NSCLC 患者は予後不良であることや、EGFR-TKI に抵抗性でもあり、その治療開発が急務である。我々は、これまでの KRAS 変異関連遺伝子を探索する研究により、KRAS 変異により正に発現制御される遺伝子として epiregulin(EGF)を同定した。そこで、NSCLC における EGF 発現の臨床病理学的及び分子生物学的意義や、KRAS 変異、EGFR 変異との関連について調べ、KRAS 変異やEGFR変異を有するNSCLCに対するEGF 分子標的治療の可能性を探索するため、本研究を実施した。

2. 研究の目的

(1) KRAS 変異、EGFR 変異による EGF 発現制御の検証とそのメカニズム: KRAS 変異または EGFR 変異陽性で EGF 高発現 NSCLC 細胞株に対して、KRAS や EGFR に対する RNA 干渉法や EGFR-TKI 処理により EGF 発現が抑制されるか検証する。EGF 高発現 NSCLC 細胞において EGFR-RAS シグナル伝達下流分子である MEK や ERK の阻害剤が EGF 発現に与える影響や、EGF 発現と、KRAS コピー数、EGFR コピー数との相関について検討する。

(2) NSCLC 患者における EGF 発現の臨床病理学的意義: NSCLC 手術検体における EGF 発現解析を行い、EGF 発現と、臨床病理学的因子、KRAS 変異または EGFR 変異との関連性について検討する。また、EGF 発現と、術後無増悪期間、全生存期間との関連性について検討する。

(3) KRAS 変異陽性 NSCLC に対する抗 EGF 治療の有効性の検討: EGF 高発現かつ KRAS 変異陽性 NSCLC 細胞において、EGF 活性の阻害が腫瘍増殖を抑制するか検討する。

3. 研究の方法

肺癌細胞株や NSCLC 手術検体における EGF 発現解析は、Taqman probe 法 (Applied Biosystems) によるリアルタイム RT-PCR 法や、抗 EGF 抗体 (R&D systems) による免疫組織染色法により行った。手術検体における KRAS 変異と EGFR 変異の解析は、Smart Amplification Process Version 2 assay (DNAFORM) により行った。変異型 KRAS と野生型 KRAS の発現比較は、BstNI 制限酵素を用いた RT-PCR/RFLP 解析により行った。RNA 干渉法は、Lipofectamine RNAiMAX トランスフェクション試薬

(Invitrogen) を用いて細胞内に siRNA (Dharmacon) を導入し、リアルタイム RT-PCR 法や蛍光免疫染色法により、標的遺伝子の発現ノックダウンを評価した。MEK 阻害剤として U0126 (Promega)、ERK 阻害剤として FR180204 (Calbiochem) を用いた。細胞増殖能の評価は、MTT アッセイ、コロニー形成アッセイ、ソフトアガーアッセイにより行った。アポトーシスの評価は、Cell Death detection ELISA Plus Kit (Roche Diagnostics) による DNA フラグメンテーションアッセイ、Annexin V-FLUOS Kit (Roche Diagnostics) によるアネキシン V 染色により行った。

4. 研究成果

肺癌細胞株における EGF mRNA 発現解析の結果、小細胞肺癌では殆ど EGF 発現を認めない一方で、NSCLC で EGF 高発現を認めた。NSCLC 細胞株の中で、EGFR 変異、KRAS 変異 NSCLC だけでなく、BRAF 変異 NSCLC や EGFR/BRAF/KRAS 野生型 NSCLC の一部においても EGF 高発現を認めた。KRAS 変異かつ EGF 高発現 NSCLC 細胞株において、siRNA による変異型 KRAS 特異的ノックダウンにより EGF の発現低下を認め、siRNA による野生型 KRAS 特異的ノックダウンでは EGF 発現低下を認めなかった。さらに、EGFR 変異 NSCLC に対する EGFR siRNA による EGFR ノックダウン、BRAF 変異 NSCLC に対する BRAF siRNA による BRAF ノックダウンにより、EGF の発現低下を認めた。以上の結果から、EGF は NSCLC にて高発現しており、特に、EGFR、BRAF、KRAS の遺伝子変異により EGF 発現が upregulation されると考えられた。

NSCLC における EGF 発現制御のメカニズムを探るため、EGF 高発現 NSCLC 細胞株を MEK 阻害剤や ERK 阻害剤により処理し、EGF 発現が低下するか調べた。EGFR、BRAF、KRAS 変異陽性 NSCLC だけでなく、EGFR/BRAF/KRAS 野生型の NSCLC においても、MEK 阻害剤や ERK 阻害剤により EGF の発現低下を認めた。以上より、NSCLC における EGF upregulation は MEK-ERK シグナル伝達経路の活性化を介することや、EGFR、BRAF、KRAS の遺伝子変異以外に MEK-ERK シグナル伝達経路活性化を介した EGF upregulation のメカニズムが存在することが示唆された。

変異型 KRAS 活性上昇は KRAS 遺伝子コピー数増加と正相関することが過去に報告されている (Soh J, PLoS One, 4:e7464, 2009)。本研究では、KRAS 変異 NSCLC 細胞株群において、EGF 発現と KRAS 発現との有意な正相関を認めた。そこで、KRAS 変異 NSCLC 細胞株群における EGF 発現と KRAS コピー数との相関を調べたところ、EGF 発現は KRAS コピー数と有意な正相関を認めた。さらに、EGF 発現は EGFR

活性に依存するとの過去の報告から (Zhang J, Cancer Prev Res, 1:201-7, 2008), NSCLC 細胞株群における EREG 発現と EGFR コピー数との相関を調べたところ、EREG 発現は EGFR/BRAF/KRAS 野生型 NSCLC 群においてのみ EGFR コピー数と有意な正相関を認めた。以上より、KRAS 変異 NSCLC における EREG 発現の upregulation は KRAS コピー数増加を伴うことや、EGFR/BRAF/KRAS 野生型 NSCLC では EGFR コピー数増加が、EREG 発現の upregulation のメカニズムの一つであることが示唆された。

次に、NSCLC における EREG 発現の臨床病理学的意義や KRAS 変異、EGFR 変異との関連を調べるために、NSCLC 手術検体を用いて EREG 発現解析を行った。はじめに、NSCLC 腫瘍検体において、EREG 免疫組織染色法により評価された EREG 蛋白発現レベルが、リアルタイム RT-PCR 法により評価された EREG mRNA 発現レベルと有意に正相関することを検証した。NSCLC 腫瘍検体での EREG mRNA 発現解析の結果、EREG 高発現は肺腺癌において認められる一方で、殆どの肺扁平上皮癌では EREG 発現が認められなかった。136 例の肺腺癌腫瘍検体を用いた EREG mRNA 発現解析では、70 歳未満よりも 70 歳以上の高齢者、女性よりも男性、非喫煙者よりも喫煙者において EREG 発現が有意に高かった。一方で、病期による EREG 発現の有意差は認めなかった。さらに、EREG 発現は、胸膜浸潤 (PI) 陽性例、リンパ管侵襲 (LP) 陽性例、血管侵襲 (VI) 陽性例において有意に高かった。KRAS 変異陽性例、EGFR 変異陽性例、EGFR/KRAS 野生型陽性例の 3 群間の比較で EREG 発現の有意差を認め、EREG 発現は KRAS 変異陽性例で最も高かった。一方、これら 3 群間の中で、EREG 発現は EGFR 変異陽性例で最も低かったが、EGFR 変異群における解析では、EREG 発現は、PI/LP/VI 全陰性群と比較して、PI, LP, VI いずれか陽性群において有意に高かった。

EGFR-TKI 治療歴のない 119 例の肺腺癌症例における術後の無病生存期間 (DFS) と全生存期間 (OS) を Kaplan-Meier 法により解析した。DFS と OS を、EREG 高発現群と EREG 低発現群で比較したところ、EREG 高発現群で DFS, OS とともに有意に短かった。さらに、EREG 発現状態と KRAS 変異状態による 4 群間比較では、EREG 高発現/KRAS 変異陽性群の DFS と OS は、EREG 低発現/KRAS 野生型群と比較して有意に短かった。DFS の単変量解析では、喫煙歴、進行病期、PI 陽性、LP 陽性、VI 陽性、KRAS 変異陽性、EGFR 変異陰性、EREG 発現上昇が DFS の予後不良因子であり、病期因子により調整した多変量解析では、EREG 発現上昇は DFS の独立した予後不良因子であった。また、OS の単変量解析では、喫煙歴、進行病期、PI

陽性、LP 陽性、VI 陽性、KRAS 変異陽性、EREG 発現上昇が予後不良因子であり、病期因子により調整した多変量解析では、EREG 発現上昇は OS の独立した予後不良因子であった。

最後に、EREG の阻害が KRAS 変異陽性肺腺癌に対する抗腫瘍効果を示すか検討した。EREG を標的とした siRNA を KRAS 変異陽性肺腺癌細胞株に導入し、リアルタイム RT-PCR 法及び抗 EREG 抗体による蛍光免疫染色により、EREG siRNA により EREG 発現が効率的にノックダウンされることを確認した。その上で、MTT アッセイ、コロニー形成アッセイ、ソフトアガーアッセイにより、siRNA による EREG 発現ノックダウンが細胞増殖に与える影響を調べたところ、EREG ノックダウンにより、KRAS 変異陽性肺腺癌細胞の足場依存性および足場非依存性細胞増殖能が抑制された。さらに、DNA フラグメンテーションアッセイや、アネキシン V アッセイにより、EREG ノックダウンが KRAS 変異陽性肺腺癌細胞のアポトーシスを誘導することが示された。

以上の結果から、EREG は NSCLC において過剰発現しており、そのメカニズムとして KRAS 変異や EGFR 変異だけでなく、BRAF 変異や KRAS コピー数増加、EGFR コピー数増加などにより、MEK-ERK シグナル伝達経路の活性化を介して、EREG 発現が upregulation されることが示唆された。また、NSCLC 手術検体を用いた解析の結果から、EREG は高悪性度の NSCLC で発現が高く、EREG 高発現が予後不良因子であることや、KRAS 変異に EREG 高発現を伴うとさらに悪性度が高まり、予後不良となることが示唆された。また、EREG が、KRAS 変異陽性 NSCLC に対する治療標的分子の候補であることが示唆された。

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1件)

Noriaki Sunaga, Kyoichi Kaira, Hisao Imai, Kimihiro Shimizu, Tetsuhiro Nakano, David S Shames, Luc Girard, Junichi Soh, Mitsuo Sato, Yasuki Iwasaki, Tamotsu Ishizuka, Adi F. Gazdar, John D Minna, Masatomo Mori. Oncogenic KRAS-induced epiregulin overexpression contributes to aggressive phenotype and is a promising therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 査読有, 32, 2013, 4034-4042. DOI:10.1038/onc.2012.402.

[学会発表](計5件)

砂長則明, Clinicopathological and biological significance of epiregulin

expression in non-small cell lung cancer.
15th World Conference on Lung Cancer,
2013 年 10 月 28 日, Sydney, Australia.

砂長則明、非小細胞肺癌におけるエピレグリンの臨床的及び分子生物学的意義、
第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、2013
年 4 月 20 日、東京

砂長則明、非小細胞肺癌において KRAS
変異により誘導される epiregulin 過剰発
現の予後因子及び治療標的としての可能
性、第 53 回日本肺癌学会総会、2012 年
11 月 8 日、岡山

砂長則明、非小細胞肺癌において KRAS
変異により誘導される epiregulin 過剰発
現の意義、第 71 回日本癌学会学術総会、
2012 年 9 月 19 日、札幌

砂長則明、非小細胞肺癌における
epiregulin 過剰発現の意義、第 52 回日本
呼吸器学会学術講演会、2012 年 4 月 22
日、神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

砂長 則明 (SUNAGA NORIAKI)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70400778