

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590440

研究課題名(和文)肺腺癌における遺伝子異常に因らないEGFR阻害薬抵抗性機構の解明

研究課題名(英文)Identification of molecular mechanisms other than genetic abnormalities in EGFR-TKI resistance of lung adenocarcinomas

研究代表者

佐久間 裕司(Sakuma, Yuji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR mutant肺腺癌がEGFR阻害薬抵抗性を示す際の新たな分子機構を2つ見出した。(1)3次元培養されたEGFR mutant肺腺癌細胞は浮遊状態の癌細胞と比較するとEGFR阻害薬に抵抗性であった。3次元環境ではNF- κ Bが活性化しており、NF- κ Bを抑制するとEGFR mutant肺腺癌細胞のEGFR TKI感受性が有意に回復した。(2)EGFR変異陽性でありながらEGFR非依存性に生存可能な細胞が2種類のEGFR mutant肺腺癌細胞株に内在していることを見出しGR cellと命名した。GR cellsは上皮間葉転換を起こし、autophagy依存性に生存していた。

研究成果の概要(英文)：Lung cancers harboring EGFR mutations depend on constitutive activation of the kinase for survival. We have identified two new molecular mechanisms that play a role in the EGFR-mutant cells' resistance to EGFR inhibitors. (1) EGFR-mutant cells in 3D culture resist EGFR inhibition compared with suspended cells. Degradation of I κ B and activation of NF- κ B are observed only in 3D-cultured cells. Inhibiting NF- κ B enhances the efficacy of the EGFR TKIs in 3D-cultured cells. (2) Two EGFR-mutated lung adenocarcinoma cell lines, HCC827 and HCC4006, contain a subpopulation of cells that have undergone epithelial-to-mesenchymal transition and survive independent of activated EGFR. These EGFR-independent cancer cells, herein termed gefitinib-resistant (GR) cells, demonstrate higher levels of basal autophagy than their parental cells. Depletion of the essential autophagy gene, ATG5, by siRNA markedly reduces GR cell viability, suggesting that GR cells can survive with constant autophagic flux.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：肺腺癌 EGFR遺伝子変異 薬剤抵抗性

1. 研究開始当初の背景

Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) 遺伝子変異陽性 (*EGFR* mutant) 肺腺癌の多くは、*EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs) に一旦は高感受性を示すものの最終的には薬剤耐性を獲得する。この獲得耐性には *EGFR* T790M 変異などの遺伝子異常が関与していることが広く知られていたが、そのみでは薬剤耐性のすべてを説明できない。

2. 研究の目的

我々は遺伝子異常に因らない2つの *EGFR* TKIs 抵抗性機構として (1) 癌細胞と細胞外基質との接着、(2) 癌細胞自身の上皮間葉転換に着目した。これらの薬剤抵抗性に関与する分子機構を解明し、*EGFR* mutant 肺腺癌の治療成績を向上させるための基礎データを提供することを目指した。

3. 研究の方法

「癌細胞と細胞外器質との接着に着目した研究」

対象：2つの *EGFR*-mutant 肺腺癌細胞株 HCC827, H1975 cells を使用した。

方法：上記した肺腺癌細胞を浮遊培養系あるいは Matrigel を使用した3次元培養系で培養し、それぞれの培養条件での *EGFR* TKI 感受性を検索した。両条件下での *EGFR* TKI 感受性に相違が確認された場合、どの分子が関与しているのかを western blot, Caspase 3/7 activation assay などで探索した。

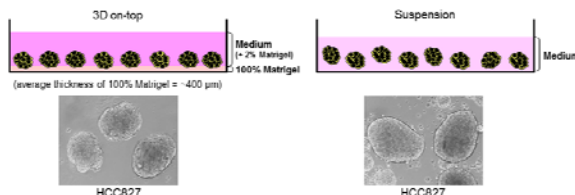


図1. 本研究で使用した3次元培養 (3D on-top) と浮遊培養 (suspension) の模式図

「癌細胞の上皮間葉転換に着目した研究」

対象：2つの *EGFR*-mutant 肺腺癌細胞株 HCC827, HCC4006 cells と20症例の原発性 *EGFR*-mutant 肺腺癌組織を使用した。

方法：上記した肺腺癌細胞から *EGFR* TKIs 抵抗性を示す亜株 subclone を樹立し、亜株と親株で異なる *EGFR* TKI 感受性の背景にある分子機構を探索した。原発性肺癌組織において autophagosome が形成されているか否か免疫組織化学的、電子顕微鏡的に検索した。

4. 研究成果

「癌細胞と細胞外器質との接着に着目した研究」

(1) 使用した HCC827, H1975 の両細胞ともに3次元培養状態における *EGFR* TKI 感受性 (= apoptosis し易さ) は浮遊状態におけるそれよりも有意に低下した。

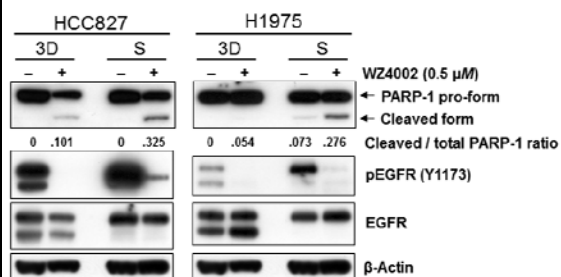


図2. 3次元培養では *EGFR* TKI である WZ4002 治療によって誘導される apoptosis (PARP-1 cleaved form) が顕著に低下している。

(2) 3次元、浮遊の両培養条件下で顕著な相違を示す分子機構を探索したところ3次元培養条件下でのみ IκB (NK-κB を抑制する) が分解され NK-κB が活性化 (リン酸化) していることが判明した。

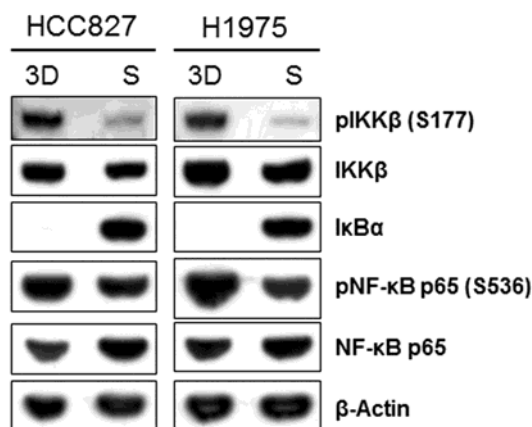


図3. 3次元培養下では、IκB を分解する IKKβ が活性化している。結果として IκB が完全に分解され、活性化型 NK-κB p65 が増加している。

(3) NK-κB の特異的阻害薬を併用すると3次元培養下における *EGFR*-mutant 肺腺癌細胞の *EGFR* TKI 感受性が有意に改善したことから、細胞外器質と接着した *EGFR*-mutant 肺腺癌細胞が示す *EGFR* TKI 抵抗性の一部は活性化した NK-κB が担っていると示唆された。

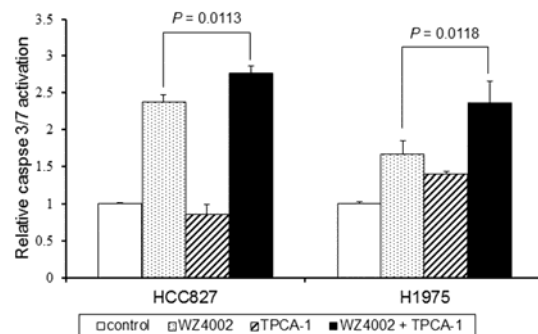


図4. TPCA-1 (NK-κB の特異的阻害薬) は WZ4002 と相乗的に Caspase 活性を上昇させる。

「癌細胞の上皮間葉転換に着目した研究」

(1) 上記した2つの肺腺癌細胞株からEGFR TKI抵抗性の亜株 (gefitinib resistant cell, GR cell と命名) を樹立したところ、両細胞由来のGR cellsとも上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition, EMT) が確認され、上皮の表現型を示す親株とは明確に異なっていた。

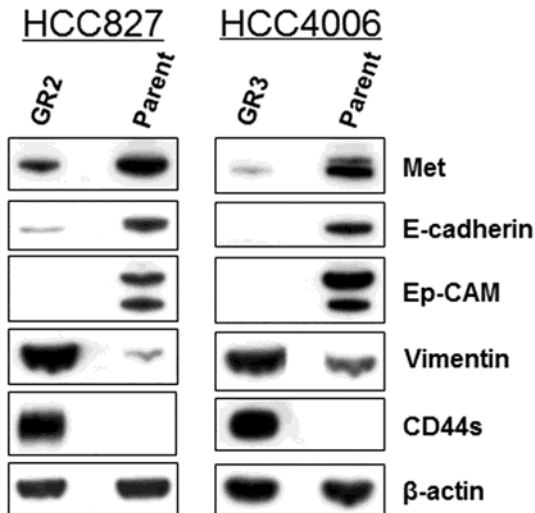


図5. GR cellsでは上皮マーカーの発現が激減し、間葉系マーカーVimentinや癌幹細胞マーカーCD44の発現が増加している。

(2) 両GR cellsは親株と同様のEGFR変異が確認されたにも関わらずEGFR依存性が著しく低下していた。それがEGFR TKIs抵抗性の根本的な原因と推察された。

(3) 親株が強く依存しているEGFR pathwayへの依存性が低下しているGR cellsでは生存や増殖を促進する何らかの活性化した分子機構があると仮定し探索を行ったところGR cellsではそれぞれの親株と比較してautophagy活発に生じていることを見出した。

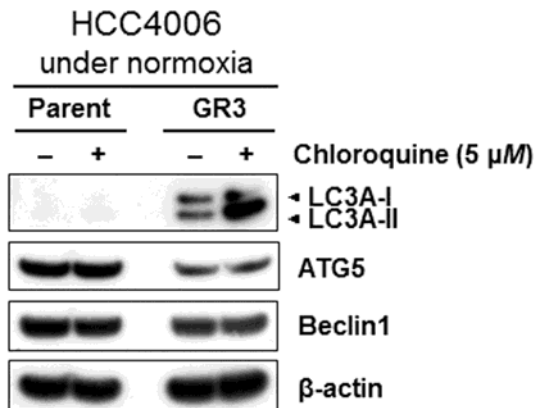


図6. GR cellsでは親株では確認できないautophagy活動マーカーLC3Aの発現が明瞭に確認される。

(4) GR cellsにおけるautophagyを薬剤あるいはsiRNAを使用し抑制するとGR cellsの生細胞数は減少し、Caspase活性が上昇した。

胞数は減少し、Caspase活性が上昇した。

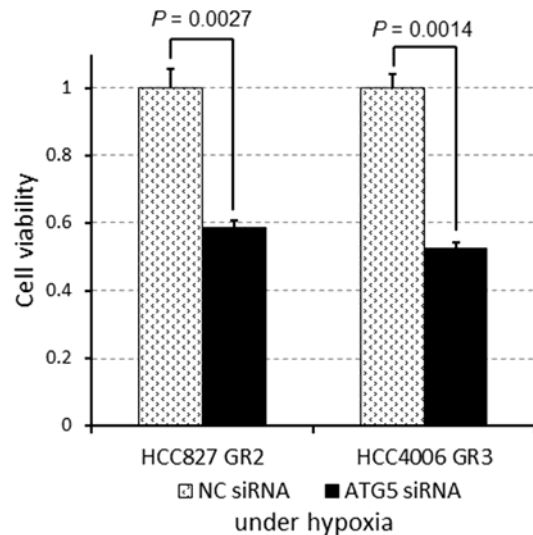


図7. Autophagy必須分子ATG5の発現をsiRNAで抑制するとGR cellの生細胞数は顕著に減少する。

(5) 原発性EGFR-mutant肺腺癌組織でもごく一部の細胞にはautophagosomeが生じていることをLC3A(代表的autophagyマーカー)の免疫組織化学的検索、および電顕的に確認した。

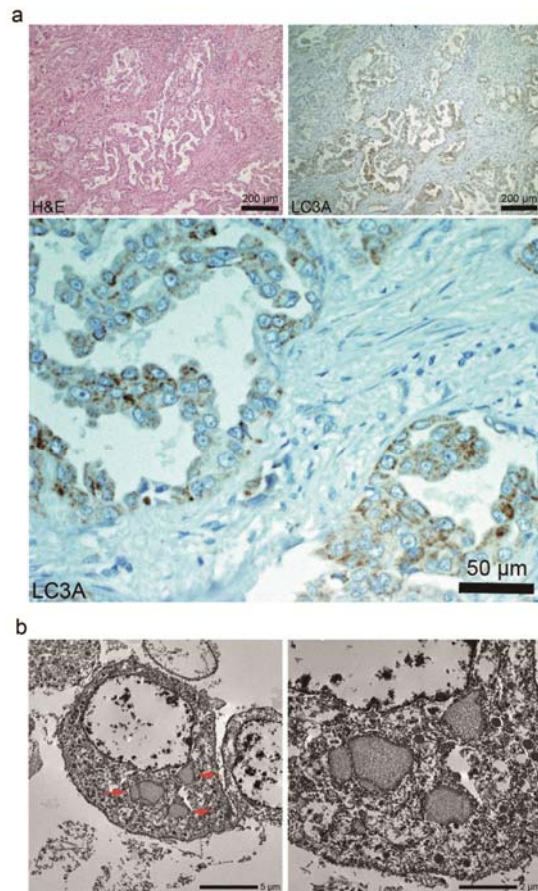


図8. 原発性EGFR-mutant肺腺癌組織内の癌細胞の一部はautophagyマーカーLC3Aをドット状に発現している(a)。その顆粒は電顕

的にも autophagosome として矛盾しない超微形態像を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Sekiguchi H, Saito H, Nakayama H, Kameda Y, Yokose T, Oguni S, Niki T, Miyagi Y. Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Lab Invest* 2013; **93**: 1137-46. [doi: 10.1038/labinvest.2013.102.] (査読有り)

(2) Sakuma Y, Yamazaki Y, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Koizume S, Miyagi Y. NF- κ B signaling is activated and confers resistance to apoptosis in three-dimensionally cultured EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **423**: 667-71. [doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.009.] (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 佐久間裕司、仁木利郎：EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に内在する ZEB1 発現細胞の研究 (第 55 回日本肺癌学会総会、演題番号 PD-071、2014 年 11 月 15 日 京都・京都国際会館)

(2) 佐久間裕司、中村圭靖、横瀬智之、亀田陽一、宮城洋平：EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における autophagy の役割の解明 (第 102 回日本病理学会総会、演題番号 3-R4-13、2013 年 6 月 8 日 札幌・ロイトン札幌)

(3) Sakuma Y, Miyagi Y. NF- κ B signaling plays a certain role in apoptosis resistance in 3D-cultured EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. (AACR 103rd Annual Meeting 2012, Abstract Number 1891, April 2nd, 2012, Chicago, USA, McCormick Place West)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/molm/>

6. 研究組織

研究代表者

佐久間 裕司 (SAKUMA, Yuji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364514