

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830111

研究課題名(和文)肺腺癌における新規イレッサ耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms of acquired resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma

研究代表者

中田 飛鳥 (Nakata, Asuka)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70597921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：イレッサ(ゲフィチニブ)はEGFRに変異をもつ肺腺癌の患者に対して奏効率が非常に高いが、数年以内に再発してしまうことが深刻な問題となっている。我々はイレッサ耐性のメカニズムを解明するために、肺腺癌由来PC9細胞からイレッサ耐性株PC9M2樹立した。このPC9M2細胞を解析した結果、カテニンシグナルが亢進していることが分かり、カテニンの活性阻害によってPC9M2株にイレッサ感受性が回復することを証明した。さらに肺腺癌患者の組織においても、カテニンの活性が高い患者ではイレッサの感受性が低いことが明らかになり、カテニンの活性がイレッサの感受性や獲得耐性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although Iressa (gefitinib) were greatly effective in lung adenocarcinoma patients harboring EGFR mutations, these patients ultimately have acquired resistance to gefitinib. To explore novel molecular mechanisms for gefitinib-resistance, we established the gefitinib-resistant PC9M2 cells that were spontaneously derived from gefitinib-sensitive PC9. Microarray analysis revealed that -catenin-related genes were upregulated in PC9M2 cells compared with PC9 cells. We next demonstrated that the downregulation of -catenin partially restored the sensitivity to gefitinib in PC9M2 cells. Using the tissues from lung cancer patients harbored EGFR mutation, we showed that activation of -catenin was related with gefitinib sensitivity in patient's samples, suggesting that enhanced -catenin activation is associated with primary and acquired resistance to gefitinib. Targeting -catenin pathway may be useful for overcoming the resistance to gefitinib

研究分野：腫瘍学

キーワード：肺腺癌 イレッサ

1. 研究開始当初の背景

イレッサ (gefitinib) は上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを特異的に阻害する阻害剤 (EGF receptor tyrosine kinase inhibitors 以下 EGFR-TKIs) の一種であり、非小細胞肺腺癌の治療に用いられてきた。EGFR の ATP 結合部位に競合的に結合することで、EGFR の自己リン酸化を阻害し、下流へのシグナル伝達経路を遮断することで、細胞の増殖や分化や血管新生などを抑制することが報告されている。特に EGFR の 19 番目のエクソンの欠損 (E746-A750) や、21 番目のエクソンに存在する 858 番目のロイシンがアルギニンに変異 (L858R) した患者に高い効果が見られる。EGFR に変異を持つ非小細胞肺腺癌の患者には、アジア人の女性で非喫煙者が多く、イレッサをはじめとする EGFR-TKIs はわが国において非常に重要な分子標的薬である。しかしながら、イレッサ投与後、半年から数年以内でイレッサ耐性を獲得してしまうことが大きな問題となっている。これまでの国内外の研究から、いくつかのイレッサ耐性獲得のメカニズムが報告されており、EGFR の 790 番目のスレオニンからメチオニンへの二次変異 (T790M) によるイレッサ親和性の低下、HGF 受容体である MET 遺伝子の増幅による ErbB3 依存性 PI3K/Akt シグナルの活性化による生存シグナルの亢進、IGF 受容体シグナルの亢進などが知られているが、これらのメカニズムに当てはまらないイレッサ耐性獲得症例もあり、さらに詳細な解析が必要であると考えられていた。

2. 研究の目的

新規のイレッサ耐性メカニズムを明らかにするために、肺腺癌由来細胞株である PC9 細胞にイレッサを長期暴露することでイレッサ耐性を持つ PC9 細胞 (PC9M2) をすでに樹立していた。この PC9M2 株は EGFR の変異 (T790M) や MET の増幅などの既知のイレッサ耐性獲得形質を持たず、新規の耐性メカニズムを持つイレッサ耐性株であると考えられた。そこでこの耐性株の解析により新たなイレッサ耐性メカニズムの解明を試みた。具体的には、耐性株 (PC9M2) と親株 (PC9) において、イレッサ投与後の細胞応答にどのような違いが見られるかを明らか

にするために、これらの細胞株を用いて時系列マイクロアレイ解析を行った。またマイクロアレイ解析の結果から、イレッサ耐性株 (PC9M2) で特異的に遺伝子発現が亢進しているとみられるシグナル伝達経路について、実際に細胞内で耐性株特異的に活性化していることを *in vitro*, *in vivo* の両方で検証することを目的とした。

さらにこのイレッサ耐性株で特異的に活性化しているシグナルを阻害することで、イレッサ耐性が克服されるか検討を行った。さらに、この細胞株で見られた現象が、肺腺癌の臨床検体においても観察されるか調査した。

3. 研究の方法

PC9 細胞と PC9M2 細胞にそれぞれイレッサを処理し、刺激後 24 時間にわたり 1 時間ごとに mRNA を回収し、時系列マイクロアレイ解析を行った。その結果、イレッサ耐性株 (PC9M2) において Wnt/ カテニンシグナルに関わる遺伝子が発現上昇していることが明らかになった。さらに細胞内においてこの経路が活性化していることを、ウエスタンブロットティングや qRT-PCR によって検証した。さらに、この経路の下流分子である カテニンのノックダウンまたは阻害剤によって活性を抑制することで、PC9M2 株にイレッサ感受性が回復するかどうかを細胞増殖アッセイ (MTS assay) によって検証した。

さらに、*in vitro* においてのイレッサ感受性を検討するために、PC9 細胞と PC9M2 細胞をそれぞれ免疫不全マウスへの移植し、腫瘍を形成させた後にイレッサを経口投与することで、腫瘍縮小効果を調べた。さらにマウスに生じた腫瘍のカテニンの組織免疫染色を行った。また、肺腺癌臨床検体を用いて免疫染色を行い、イレッサの感受性とカテニンの染色パターンとの比較を行った。

4. 研究成果

時系列マイクロアレイ解析の結果、イレッサ耐性株 (PC9M2) は親株 (PC9) に比べ、恒常的に Wnt/ カテニンシグナル関連遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。そこで Wnt/ カテニンシグナルが活性化の指標として、GSK3 のリン酸化、およびカテニンの核への移行を細胞分画法および上

ウエスタンブロットングによって調べたところ、どちらも PC9M2 株の方が亢進していた。さらに カテニンを介して転写活性化される代表的な標的遺伝子として Axin2 の発現を qRT-PCR で調べたところ、やはり PC9M2 の方が PC9 よりも発現が高いことがわかった。これらの結果から、PC9M2 株では Wnt/ カテニンシグナルが活性化していることが明らかになった。

次に、siRNA を用いて カテニンをノックダウンした PC9M2 細胞を用いて MTS アッセイを行ったところ、親株と同程度までイレッサ感受性を回復した。また カテニンの阻害剤 ICG-001 を用いて、PC9M2 株の カテニンの活性を阻害させても、イレッサ感受性が回復することがわかった。これらの結果から、PC9M2 細胞におけるイレッサ耐性には カテニンの活性化が関与していることが明らかになり、カテニンの活性化を阻害することでイレッサ耐性を克服できる可能性が示唆された。

PC9 細胞や PC9M2 細胞をそれぞれ免疫不全マウスに皮下移植して生じた腫瘍 (xenograft) に対するイレッサの感受性を調べた。その結果、PC9 細胞由来の xenograft はイレッサの経口投与により退縮する傾向が見られたのに対し、PC9M2 細胞由来の xenograft はイレッサの経口投与後も退縮しなかった。PC9M2 細胞はマウス個体内 (in vivo) においてもイレッサ耐性を示すことが明らかになった。今後は、カテニン阻害剤 ICG-001 の併用経口投与実験を実施し、イレッサ耐性を示した PC9M2 細胞由来のイレッサ耐性腫瘍に対する効果を検証する予定である。

さらに、これらの実験によって得られた xenograft からパラフィン切片を作成し、カテニン抗体を用いて免疫染色を行ったところ、PC9 細胞由来の xenograft では カテニンは主に細胞膜に局在し、PC9M2 細胞由来の xenograft では カテニンは核や細胞質に存在することがわかった。つまり、PC9 細胞由来の腫瘍では、カテニンは細胞膜にだけ存在できる不活性化状態であり、PC9M2 由来の腫瘍では Wnt/ カテニンシグナルが活性化することで細胞質や核の カテニンが安定化し、活性化状態であることが示唆された。さらに、EGFR に変異を持つ肺腺癌患者の腫瘍

組織切片を用いて カテニン抗体の組織免疫染色を行った。その結果、EGFR-TKIs (イレッサもしくはエルロチニブ) を用いた治療に対して部分奏功 (Partial Response :PR) に達した患者群においては カテニンが細胞膜に局在する症例が多く、EGFR-TKIs が効果のなかった患者群 (進行 (Progressive Disease :PD) もしくは安定 (Stable Disease)) においては カテニンが核や細胞質に局在している症例が多く見られた ($P < 0.05$, Barnard's test)。これはそれぞれ、イレッサ感受性の PC9 細胞由来の腫瘍とイレッサ耐性の PC9M2 細胞由来の腫瘍で見られたカテニンの染色パターンと同様の傾向であった。今回はイレッサの獲得耐性症例に関しては、十分な症例数が取得できず、獲得耐性に関しては検証できなかったが、今後、症例数を集めることができれば、検討を行う予定である。

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)

1. de Siqueira Santos S, Takahashi DY, Nakata A, Fujita A. A comparative study of statistical methods used to identify dependencies between gene expression signals. *Brief Bioinform.* 2014 15(6):906-918. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Asuka Nakata Novel molecular mechanisms of acquired resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma 4th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology, 2014年10月14日, 上海, 中国
2. 中田 飛鳥, 藤田アンドレ, Guoan Chen, 河野 隆志, 東條 有伸, David.G. Beer, 後藤 典子 早期肺癌における遺伝子発現シグネチャーによる予後予測診断システムの開発 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日-27日, 横浜
3. Nakata A, Yoshida R, Yamaguchi R, Yamauchi M, Tamada Y, Fujita A,

Shimamura T, Imoto S, Higuchi T, Nomura M, Yano S, Miyano S, Gotoh G. Novel molecular mechanisms of acquired resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma AACR IASLC Joint Conference, January 6 - 9 2014, San Diego, California, U.S.A.

4. 中田 飛鳥、藤田アンドレ、Guoan Chen、河野 隆志、東條 有伸、David.G. Beer、後藤 典子 Development of the prognostic system with gene signature in early stage lung cancer 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸
5. 中田飛鳥, 山口類, 島村徹平, 井元清哉, 野村将春, 矢野聖二, 宮野悟, 後藤典子 Novel molecular mechanisms of acquired resistance to gefitinib in Non-small lung cancer 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日-5 日, 横浜

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 飛鳥 (NAKATA ASUKA)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70597921

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし