

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：83802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871225

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌におけるEGFR-TKI治療耐性化後の転移に関する新規分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of novel molecular mechanisms associated with the metastasis of epidermal growth-factor receptor-tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer

研究代表者

芹澤 昌邦 (Serizawa, Masakuni)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：00569915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非小細胞肺癌におけるEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)治療耐性化後の転移に関する機序の解明を目的とする。EGFR-TKI耐性非小細胞肺癌細胞株 PC-9ERは、TGF- $\beta$ 2の発現上昇に伴うTGF- $\beta$ シグナルの活性化により、細胞遊走能の亢進を示す。そこで、この「TGF- $\beta$ シグナルの活性化」に關与する遺伝子異常の探索を行った。その結果、TGF- $\beta$ シグナルとの關連性の報告があるCRKLの遺伝子増幅を見出した。また、PC-9ER細胞特異的な19個の変異を、13の細胞遊走關連遺伝子において検出した。本研究で検出した遺伝子異常と細胞遊走能との關連について今後さらなる検討を行う。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms relevant to metastasis after the acquisition of epidermal growth-factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). We previously reported that EGFR-TKI-resistant PC-9ER cells, established from PC-9 NSCLC cells with an EGFR-activating mutation, show enhanced motility via transforming-growth factor (TGF)- $\beta$ 2-induced activation of the TGF- $\beta$  pathway. Therefore, we focused on the identification of the gene alterations associated with the activation of TGF- $\beta$  pathway in PC-9ER cells with omics-technologies. Our data indicated that amplification of the CRKL gene, which is known to associate with TGF- $\beta$  pathway, occurred in PC-9ER cells. Moreover, 19 PC-9ER-specific mutations were detected in 13 genes associated with cell motility and invasion. Further studies are required to characterize the effects of these gene alterations on metastasis in EGFR-TKI-resistant NSCLC cells.

研究分野：がん分子標的治療法の開発・評価

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR-TKI EGFR-TKI耐性 転移 細胞遊走 TGF- $\beta$ シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は、世界各国における、がん関連死の原因として最も高い割合を占めており、新たな薬剤および治療法の開発による治療成績の向上が必要不可欠である。

肺癌の約8割を占める非小細胞肺癌において、EGFR (epidermal growth factor receptor) チロシナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブやエルロチニブは、EGFR 活性化変異を有する非小細胞肺癌症例に対して、70~80%という高い奏効率を示す。しかし、治療開始から約1年で、奏功症例の大多数が耐性獲得による増悪を呈する。EGFR-TKI 耐性機序に関する近年の報告では、EGFR T790M 変異をはじめとする二次的な体細胞遺伝子異常に起因する耐性機序に加え、「上皮間葉移行」および、「肺腺癌から小細胞肺癌への転化」などの生物学的特性の変化による耐性化が報告されている。このように EGFR-TKI に対する耐性獲得機序についての解明は進んでいるが、一方で EGFR-TKI 治療耐性化後における、腫瘍の転移能やそれに関与する機序についての検討は、ほとんど行われていなかった。

EGFR 活性化変異を有する非小細胞肺癌 (肺腺癌) 細胞株 PC-9 より樹立したエルロチニブ耐性細胞株 (PC-9ER) を用いた事前の検討により、耐性細胞株は親株に比べて高い細胞遊走能を示すことが明らかになった。そして、EGFR-TKI 耐性化に伴う transforming-growth factor (TGF)- $\beta$ 2 の発現量の上昇が、TGF- $\beta$  シグナル伝達系を活性化し、それにより細胞遊走能の亢進に至るといふ、新たな分子機序を見出した。

そこで、EGFR-TKI 耐性化に伴う「転移」に関与する細胞遊走能や浸潤能といった生物学的特性の変化に注目し、その変化の原因となる機序の解明を行うことは、EGFR-TKI 治療耐性化後の転移抑制のための新規治療法の開発に向けた意義ある研究になると考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、EGFR-TKI 耐性化に伴う細胞遊走能の亢進の分子機序である「TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化」および、その主因と考えられる「EGFR-TKI 耐性化に伴う TGF- $\beta$ 2 の発現量の増加」に注目し、この原因となる分子機序を明らかにすることを目的とする。そこで、オミクス技術を用いてエルロチニブ耐性細胞株 PC-9ER 細胞特異的な遺伝子異常の探索を行い、検出した遺伝子異常が細胞遊走能の亢進へ与える影響について評価することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養および阻害剤

本研究には、EGFR 活性化変異を有する非小細胞肺癌 (肺腺癌) 細胞株 PC-9 および、PC-9 細胞株をエルロチニブに長期暴露すること

で樹立したエルロチニブ耐性細胞株 PC-9ER (Erlotinib Resistance) を用いた。培養は、RPMI1640 培地 (Life Technologies) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件において行った。

また、EGFR-TKI であるエルロチニブおよび PI3K/mTOR 阻害剤である NVP-BE235 (LC laboratories) を使用した。

### (2) 薬剤感受性試験

薬剤に対する培養細胞株の感受性評価は、MTT アッセイおよび ATP 測定法を用いた。

### (3) タンパクの発現、リン酸化レベルの評価 ウエスタンブロット法を用い検討を行った。

### (4) ゲノム DNA サンプルの調整

QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) を用いて細胞株よりゲノム DNA を抽出した。Qubit dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies) を用いて濃度測定を行った後に、各実験に適した濃度への調整を行った。

### (5) Comparative Genomic Hybridization (CGH) 解析

PC-9 および PC-9ER 細胞のゲノム DNA それぞれ 500ng を蛍光色素で標識し (PC-9: Cy3, PC-9ER: Cy5)、SurePrint G3 Human CGH 1x1M Oligo Microarray (Agilent) 上で、競合的ハイブリダイゼーションを行った。次に、Genomic Workbench software ver. 7.0.4.0 (Agilent) を用いてデータの数値化および ADM-2 フィルターを用いてコピー数異常が起きている領域の検出を行った。コピー数異常が起きている領域に含まれる遺伝子について、その機能に基づく特徴づけを行うために web 上のプログラムである The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて、Gene annotation enrichment analysis (GAE 解析) を行った。

### (6) 全エクソンシーケンス解析

PC-9 および PC-9ER 細胞の各ゲノム DNA (50ng) を用い、Nextera Rapid Capture Exome kit (illumina) を用いて全エクソンシーケンス解析用の DNA ライブラリ作成を行った。ライブラリの濃度調整後、デスクトップ型次世代シーケンサーである MiSeq (illumina) において、MiSeq Reagent Kits v3 を用い、75bp のペアエンドでの配列解析を行った。MiSeq より出力された配列情報は、CLC Genomics workbench v7.5.1 を用いてヒトゲノム参照配列 (hg19) にマッピングし、その後ミスセンス変異およびナンセンス変異のみ検出した。その検出された変異から、1000 人ゲノムプロジェクトおよび HapMap データベースに基づき生殖細胞変異を除去した。そして残った変異について、PC-9 細胞と PC-9ER 細胞間で比較を行い、PC-9ER 細胞でのみで検

出された変異を「PC-9ER 細胞特異的変異」とした。検出された遺伝子について、その機能に基づく分類、絞り込みを行うために GAE 解析を行った。

#### (5) メタボローム解析

定法に従い、細胞株から代謝物を抽出し、capillary electrophoresis time of-flight mass spectrometry (CE-TOF-MS) を用いて分析を行った。質量分析データの数値化、代謝物の同定、定量には、Agilent CE Capillary electrophoresis System、HMT Metabolomics Solution Package そして Master-Hands software を用いて行った。各細胞株の細胞内代謝物濃度の情報を用いた多変量解析には、SIMCA-P+ software v12.0.1.0 を用いた。

### 4. 研究成果

(1) PC-9ER 細胞における TGF- $\beta$  シグナル伝達系関連遺伝子の遺伝子コピー数異常の検討

EGFR-TKI 耐性化に伴う TGF- $\beta$  2 遺伝子もしくは TGF- $\beta$  シグナル伝達系関連遺伝子の遺伝子コピー数異常がある場合、直接的に「TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化」へつながる可能性が考えられる。そこで、CGH 解析により、PC-9ER 細胞と親株である PC-9 細胞間の遺伝子コピー数の比較を行うことで、耐性化に伴って生じた遺伝子コピー数異常を示す領域の探索を行った。その結果、PC-9ER 細胞の 13 箇所ゲノム領域においてコピー数異常が検出された（コピー数増加：5 領域、コピー数減少：8 領域）。しかしながら、PC-9ER 細胞において、TGF- $\beta$  2 遺伝子および主要な TGF- $\beta$  シグナル伝達系関連遺伝子領域でのコピー数異常は検出されなかった。この結果より、「TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化」は、TGF- $\beta$  シグナル伝達系関連遺伝子の遺伝子コピー数異常によるものではなく、他の遺伝子異常が関与していると結論付けた。

(2) PC-9ER 細胞特異的な細胞遊走関連遺伝子上の変異の探索

TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化、そして細胞遊走および浸潤に関与する他の遺伝子異常の探索を目的に、次世代シーケンサーを用いて PC-9ER 細胞と親株である PC-9 細胞の全エクソシーケンス解析を行い、PC-9ER 細胞特異的変異の探索を行った。その結果、509 遺伝子の 1,007 箇所において PC-9ER 細胞特異的な変異（ミスセンスおよびナンセンス変異）が検出された。GAE 解析により情報生物学的に絞り込みを行った結果、19 個の変異を、13 の細胞遊走関連遺伝子において検出した。これら遺伝子上の変異と PC-9ER 細胞の示す細胞遊走能の亢進との関連性について、今後分子生物学的評価が必要である。

(3) EGFR-TKI 耐性機序の「TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化」への関与についての検討

EGFR の下流シグナル経路と TGF- $\beta$  シグナル伝達系との間には、相互作用があることが知られており、PC-9ER 細胞においても両シグナル経路間の相互作用があることが確認されている<sup>①</sup>。そこで、PC-9ER 細胞における「TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化」の機序の解明において、EGFR-TKI 耐性機序の関与についての検討は必要不可欠であると考えた。しかしながら、研究開始当初、PC-9ER 細胞の EGFR-TKI 耐性機序については、「既知の二次的な体細胞遺伝子異常は関係しておらず、機序が不明な恒常的な PI3K/Akt/mTOR シグナルの活性化が関与している」という情報のみにとどまり、耐性の主因となる分子機序については不明であった<sup>①</sup>。そこで、上記の CGH 解析、全エクソシーケンス解析に加えて新たにメタボローム解析を行うことで表現型レベルでの検討も加えて PC-9ER 細胞の EGFR-TKI 耐性機序の解明を行い、その結果に基づき TGF- $\beta$  シグナル経路との関連性について検討を行うことにした。

①CGH 解析結果に基づく EGFR-TKI 耐性機序の解明

CGH 解析において検出された、PC-9ER 細胞において遺伝子コピー数増加が起きている 5 領域には 167 遺伝子が含まれていた。それら遺伝子について、GAE 解析による情報生物学的絞り込みを行うことで、がん関連シグナルに含まれる遺伝子の抽出を行った。その結果、慢性骨髄性白血病の原因となる BCR-ABL キナーゼの主要な基質分子であり、アダプタータンパクとして PI3K/Akt/mTOR シグナルの上流に位置している CRKL に注目した<sup>②, ③, ④</sup>。PC-9ER 細胞における CRKL 遺伝子のコピー数は、定量 PCR による評価の結果約 6 倍に増加しており、それに伴う CRKL タンパクの発現上昇もウエスタンブロッティングにより確認された。また、PC-9ER 細胞において恒常的な活性化を示し、EGFR-TKI 耐性にも関与すると考えられる PI3K/Akt/mTOR シグナルの上流に CRKL は位置していることから、PI3K/mTOR 阻害剤を用いた結果、PC-9ER の細胞増殖は顕著に抑制された。以上の結果は、CRKL のコピー数の増加が、PC-9ER 細胞の EGFR-TKI 耐性に関与している可能性を示唆しているものと考えられる。

CRKL は細胞遊走および TGF- $\beta$  シグナル伝達系との関連性が報告されている。CRKL の遺伝子増幅を有する非小細胞肺癌細胞株において、CRKL のノックダウンは細胞遊走および浸潤能を顕著に低下させることが報告されている<sup>⑤</sup>。また、神経膠芽腫においては、CRKL の過剰発現が、TGF- $\beta$  1 により誘導される細胞遊走・浸潤を活性化させることが示されている<sup>⑥</sup>。よって、PC-9ER 細胞における CRKL のコピー数増加も同様に、TGF- $\beta$  シグナルの活性化に起因する細胞遊走能の亢進に何らかの影響を与えている可能性があると考えられる。

## ②マルチオミクス解析を用いた EGFR-TKI 耐性機序の解明

エルロチニブは、標的分子である EGFR の活性阻害に加えて、酸化ストレスの誘導による薬理効果を示すことが報告されている<sup>⑦</sup>。そこで、PC-9ER 細胞が酸化ストレスへの耐性機序を有するか検討するために、CGH 解析による遺伝子コピー数解析結果と、メタボローム解析による細胞内代謝物濃度測定結果を併せたマルチオミクス解析を行った。PC-9ER 細胞では、グルタミン代謝関連遺伝子の発現亢進に関わる MYC およびグルタチオンからグルタミン酸の再合成に関わる 3 遺伝子のコピー数の増加が CGH 解析により検出された<sup>⑧</sup>、<sup>④</sup>。また、メタボローム解析において、PC-9ER 細胞を特徴づけているのは「グルタミン代謝経路全体の活性化」であることが明らかになった。これらの結果より、グルタミン代謝関連遺伝子のコピー数増加というゲノムレベルでの変化によりグルタミン代謝経路全体の活性化が起き、その結果としてグルタミンより合成されるグルタチオンによる抗酸化能が亢進しているものと考えられる。また、全エキソシーケンス解析においても、グルタチオン代謝に関連する 6 遺伝子上の変異が、PC-9ER 細胞特異的に検出されており、これら変異が上記のグルタミン代謝関連遺伝子のコピー数増加と併せて PC-9ER 細胞の抗酸化能の亢進に関連している可能性があると考えられる。EGFR-TKI 耐性化に伴う、グルタミン代謝経路の活性化と、細胞遊走能の亢進との間の関連性については不明である。しかしながら、EGFR-TKI 耐性化または耐性化後の転移能の予測に、グルタミン代謝の亢進を代理マーカーとして利用することができる可能性が考えられる。

### (4)まとめ

本研究により、EGFR-TKI 耐性化に伴う細胞遊走能の亢進に関係する可能性のある遺伝子異常を複数明らかにすることができた。しかしながら、それら新たに見出した遺伝子異常と細胞遊走能、もしくは TGF- $\beta$  シグナル伝達系との関連性について、本質的な結論を得るには至っていない。さらなる検討を継続して進めることで、「EGFR-TKI 耐性化に伴う細胞遊走能の亢進の分子機序」を解明する必要があると考える。

また、本研究を進めていくなかで、新たな EGFR-TKI 耐性化に伴う分子生物学的特性の変化として、耐性化に伴いグルタミン代謝が亢進することを見出すことができた。代謝物は、低侵襲的に採取可能な血液、尿、体腔液などからも検出可能である。そのため、グルタミン代謝物の測定は、EGFR-TKI 耐性化または耐性化後の転移能の予測の代理マーカーとして、低い侵襲で検出可能な検査法の開発への展開も考えられる。この点についても、引き続き研究を進めていきたい。

## <引用文献>

- ① *J Thorac Oncol.* 2013, 8:259-69.
- ② *Cell Commun Signal.* 2009, 7:13-35.
- ③ *Oncogene.* 2001, 20:6348-6371.
- ④ KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>
- ⑤ *Oncogene.* 2010, 29:1421-1430.
- ⑥ *J Mol Neurosci.* 2013, 51:1046-1051.
- ⑦ *Cancer Res.* 2011, 71:3932-3940.
- ⑧ *Clin Cancer Res.* 2009, 15:6479-6483.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Serizawa, M., Kusuvara, M., Zangiaco, V., Urakami, K., Watanabe, M., Takahashi, T., Yamaguchi, K., Yamamoto, N., Koh, Y. Identification of metabolic signatures associated with erlotinib resistance of non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res.* 2014, 34:2779-2787. <http://ar.iarjournals.org/content/34/6/2779> (査読有り)
- (2) Serizawa, M., Murakami, H., Watanabe, M., Takahashi, T., Yamamoto, N., Koh, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist efatutazone impairs transforming growth factor  $\beta$  2-induced motility of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2014, 105:683-689. DOI: 10.1111/cas.12411 (査読有り)
- (3) Serizawa, M., Takahashi, T., Yamamoto, N., Koh, Y. Genomic aberrations associated with erlotinib resistance in non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res.* 2013, 33:5223-5233. <http://ar.iarjournals.org/content/33/12/5223> (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 芹澤昌邦、楠原正俊、ヴァンソン ザンジャコミ、浦上研一、渡辺 勝、高橋利明、山口 建、山本信之、洪 泰浩、「エルロチニブ耐性非小細胞肺癌細胞株におけるメタボローム解析を用いた耐性予測バイオマーカーの探索」、第 73 回日本癌学会学術総会、J-1062、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
芹澤昌邦 (SERIZAWA MASKUNI)  
静岡県立静岡がんセンター (研究所)・主任研究員  
研究者番号: 00569915