

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830118

研究課題名(和文) EGFR変異陽性肺癌のペメトレキセド耐性獲得機構の解明と克服

研究課題名(英文) Analysis of pemetrexed-resistant mechanism in EGFR mutation positive non-small cell lung cancer

研究代表者

越智 宣昭(Ochi, Nobuaki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80611615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：Pemetrexed(PEM)耐性におけるEGFRとthymidylate synthase (TS)の関連性、およびEGFR遺伝子変異別の耐性機序の違いは明らかではない。これまでに、PC-9細胞(Exon19欠失)やA549(野生型)ではTSおよびDHFRのPEM耐性への関与を報告しているが、今回、H1975細胞株(L858R+T790M)においても、PEM耐性化によるTS発現の増強と上皮間葉移行の関与も示唆された。一方で、PC-9 PEM耐性株ではEGFR-TKIへの感受性が増強していた。これらの結果をもとにさらに前臨床試験を進め、実臨床においてより効果の高い治療シーケンスを考案したい。

研究成果の概要(英文)：Pemetrexed is a key drug in the treatment for the patients with activating EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). However, the relationship between TS up-regulation and EGFR mutation status and the difference of resistant mechanisms among a variety of EGFR mutations remain unclear. We previously reported that TS and dihydrofolate reductase were involved in developing PEM resistance in PC-9 (EGFR exon19 in-frame deletion mutation) and A549 (wild-type EGFR) cells. In this study, TS is significantly up-regulated in H1975 (L858R+T790M mutation) cells. Moreover, epithelial-mesenchymal transition might be an alternative resistant mechanism in H1975 cell. Meanwhile, the sensitivity to EGFR-tyrosine kinase inhibitor was increased in EGFR-mutation positive-PEM resistant cells. These results warrant further preclinical studies and the optimal treatment sequence in EGFR mutation-positive NSCLC patients will be projected.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：非小細胞肺癌 pemetrexed EGFR-TKI 耐性

1. 研究開始当初の背景

ペメトレキセド(PEM)は、非扁平上皮非小細胞肺癌治療における新たな Key drug としての地位を確立している (Hanna, et al. *J Clin Oncol* 2004; Scagliotti, et al. *J Clin Oncol*. 2008)。しかしながら、その治療効果は持続せず、これまでの殺細胞性抗癌剤と同様にいずれ耐性を獲得する。したがって、PEM 耐性機構の解明とその克服は急務と考えられる。

後方視的な検討ではあるが、PEM で治療した非小細胞肺癌患者において、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異群は野生型 EGFR 群と比べて、高い奏効率と無増悪生存期間の延長が報告され (Wu, et al. *Lung Cancer*. 2011)、EGFR 遺伝子変異の有無が PEM による治療の効果予測因子となり得る可能性が示された。

さらに EGFR-TKI の曝露により、PEM 耐性の要因の一つとされている thymidylate synthase (TS) の発現が抑制されることが *in vitro* では報告されており、EGFR-TKI と PEM の治療効果が互いに影響を与えることが示唆されている (Okabe, et al. *Mol Cancer Ther.* 2008)。また、EGFR 変異陽性肺癌患者を対象とした前向き研究において、EGFR-TKI 治療に耐性化した症例に PEM を上乗せすることで、良好な治療効果が得られた報告もある。

以上のことから、EGFR 遺伝子変異と PEM の治療効果及び PEM 耐性による EGFR-TKI の治療への影響について検討を行った。

2. 研究の目的

PEM と EGFR 遺伝子変異の関係、そして PEM 耐性機構の解明と、その克服方法についての研究を展開し、将来的に臨床介入研究を目指す。

3. 研究の方法

(1) PEM 耐性株の樹立

我々は PEM を低濃度から段階的に高濃度へ長期間曝露することで PEM に耐性化した EGFR 遺伝子変異 (エクソン 19 欠失変異) を有する肺癌細胞株 PC-9/PEM、および野生型 EGFR 遺伝子を有する肺癌細胞株 A549/PEM を非小細胞肺癌細胞株としては世界に先駆けて樹立し、その耐性機構として TS と dihydrofolate reductase (DHFR) の発現が関与していることを報告した (Zhang D, et al. *Cancer Lett.* 2011;309:228-35)。

EGFR 遺伝子変異型と EGFR-TKI に対する感受性は変異や薬剤ごとに異なっており (Karaman MW, et al. *Nat Biotechnol.* 2008;26:127-32)、EGFR 変異による分子生物学的特徴を比較検討することは、重要と考えられた。

そこで EGFR L858R 遺伝子変異を有する肺癌細胞株である H3255 株において同様の手法で PEM 耐性を獲得させることを試みた。し

かしながら、H3255 株固有の問題か PEM 耐性獲得に至らなかった。H1975 (L858R 変異+T790M 変異) 株を用いて新たな PEM 耐性株を樹立した。H3255 株については引き続き耐性誘導を継続中である。

以後、PC-9, A549, H1975 の 3 種の異なる EGFR 遺伝子変異を有する細胞株において PEM 耐性による分子生物学的特徴を検討した。細胞増殖抑制は MTT assay により、遺伝子発現は定量 RT-PCR にて、TS 発現および epithelial-mesenchymal transition (EMT) 関連のタンパク発現については Western blotting により検出した。また、TS 特異的 siRNA を用いて PEM 耐性株の TS を knockdown し、PEM に対する感受性変化を検討した。

(2) PEM 耐性化による EGFR-TKI への感受性変化

樹立した PEM 耐性株における gefitinib への感受性変化を MTT assay にて検討した。また、EGFR の下流シグナルについて Western blotting にて検討した。

(3) 異種移植片マウスモデル

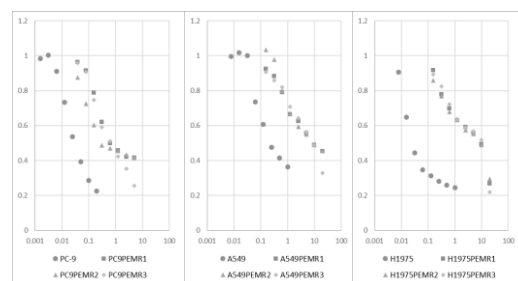
5 週齢メスの BALB/c nu/nu ノードマウスを用いて、PC-9 および PC-9/PEMR 細胞株を 2 x 10⁶ 個ずつ皮下投与し、異種移植片モデルを作製する。約 2 週間後より腫瘍が確認されたのち、それぞれを 2 群に分け、vehicle と gefitinib 2.5 mg/kg をゾンデにて経口投与し、*in vivo* での gefitinib 感受性変化を評価した。経時的に腫瘍径と体重の測定を行い、腫瘍の体積を算出した。

4. 研究成果

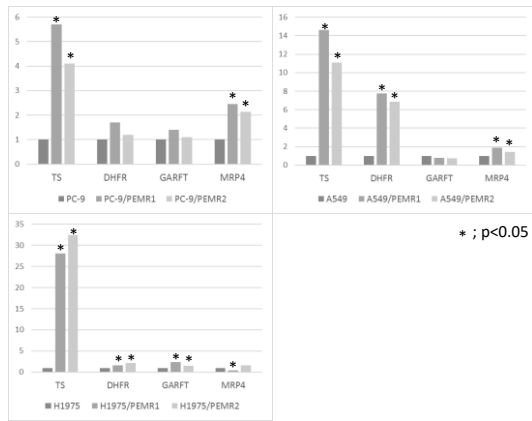
(1) PEM 耐性細胞株の分子生物学的検討

これまでの PC-9, A549 と同様の手法で、H1975 において PEM 高度耐性株が樹立された。H1975 においては親株に比べ、300 倍の PEM 耐性が得られた。

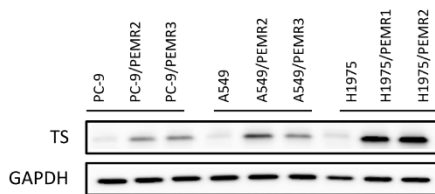
PC-9, A549 の PEM 耐性株についてはそれぞれ約 10 倍、約 40 倍程度の PEM 耐性を報告している。



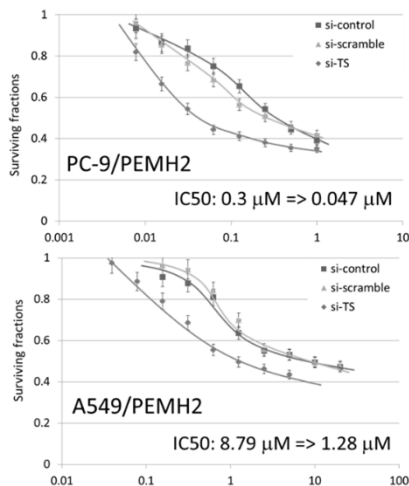
次に葉酸代謝に関わる各遺伝子 (TS, DHFR, GARFT, MRP4) 発現量について定量 RT-PCR を行った。今回樹立したすべての細胞株で TS は有意に上昇していた。PC-9/PEMR, A549/PEMR では MRP4 は有意に上昇していたが、H1975/PEMR では MRP4 は 3 株中 2 株で有意に低下していた。



また Western blotting にて TS 発現をタンパクレベルで検討したところ、mRNA 発現との相関が認められた。



次に、TS 特異的 siRNA を用いて PC-9/PEMR, A549/PEMR の TS を knockdown したところ、PEM への耐性が解除されることを確認した。

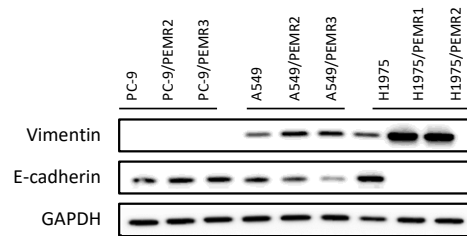


以上より、TS 高発現は EGFR 変異の種類にかかわらず PEM 耐性の中心的役割を担っている可能性が示唆された。

次に、PEM 耐性機序における EMT の関与を検討した。Western blotting により E-cadherin と vimentin の発現の変化を、また親株と PEM 耐性株における細胞形態の変化を図に示す。

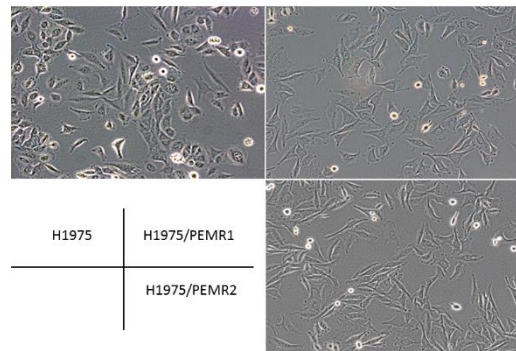
PC-9/PEMR においては親株とそれぞれの発

現量について差を認めなかったが、A549 については PEM 耐性株において E-cadherin の発現低下と、vimentin の発現上昇を認めた。さらに H1975/PEMR においては E-cadherin 発現は低下し、vimentin 発現は上昇した。以上より、PEM 耐性機序の一部に EMT の関与が示唆された。



細胞形態については大きな変化を認めなかった。

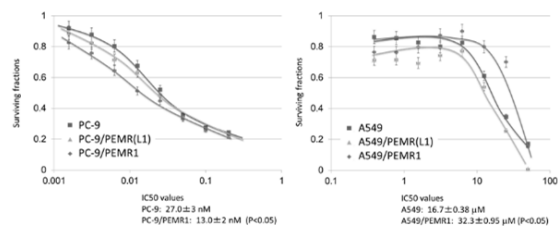
(参考:H1975 と H1975/PEMR)



(2) PEM 耐性細胞株における EGFR-TKI への感受性変化

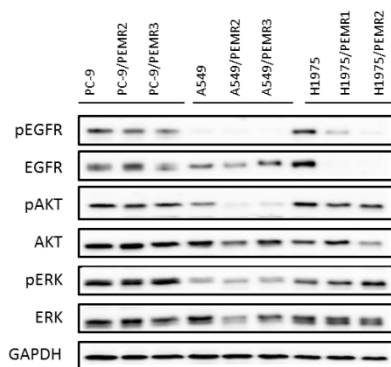
PC-9/PEMR1 と PC-9/PEMR(L1) (PEM への弱耐性株) ではないずれも gefitinib への感受性が上昇していた。A549/PEMR1 と A549/PEMR(L1) (PEM への弱耐性株) においては PC-9 と同様に gefitinib への感受性が軽度上昇したが、A549/PEMR においては逆に gefitinib への感受性が低下していた。

これらの変化が PC-9 と A549 細胞株固有の変化か、それぞれの EGFR 遺伝子変異 status によるものかは今後の検討課題と考えている。



Western blotting では、PC-9/PEMR については親株と比較したところ、図に示すようにタンパク発現の変化を認めなかったが、A549 については AKT のリン酸化が PEM 耐性株では

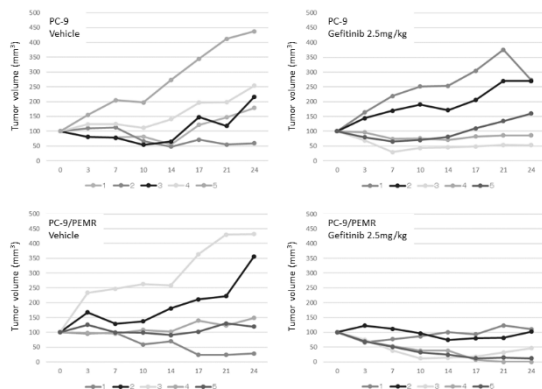
減弱しており、そもそも EGFR pathway への依存が乏しくなっており EGFR-TKI への感受性が低下しているのではないかと推察された。



また H1975 とその耐性株においては、PEM 耐性化により EGFR の発現が抑制されていた。今後、H1975/PEMR に対する EGFR-TKI への感受性変化の結果を含め、その分子生物学的機構の解明を進める。

(3) in vivo における PEM 耐性による EGFR-TKI 感受性の検討

PC-9 と PC-9/PEMR の異種移植片マウスモデルを用いて、PEM 耐性株の in vitro における gefitinib 感受性を検討した。gefitinib 2.5 mg/kg では PC-9 の増殖を抑制することはできなかったが、PC-9/PEMR では gefitinib 2.5 mg/kg で腫瘍増殖を抑制した。PEM 耐性後の EGFR-TKI 投与では、その治療効果を引き出す可能性を示唆する結果となった。



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)

Ochi N, Takigawa N. What can we learn from 3 phase III trials of ASCEND-4: ceritinib vs. platinum/pemetrexed with pemetrexed maintenance, PROFILE 1004: crizotinib vs. platinum/pemetrexed, and J-ALEX: alectinib vs. crizotinib? *Transl Cancer Res* 6(Suppl 3):S515-S518 2017

[学会発表] (計 1 件)

越智宣昭, 張丹, 本多宣裕, 山根弘路, 谷本光音, 木浦勝行, 瀧川奈義夫. EGFR 遺伝子変異を有する肺癌における pemetrexed 耐性機構と gefitinib 感受性に及ぼす影響. 第 58 回日本肺癌学会学術集会. 2016. 4. 9: 国立京都国際会館 (京都)

[図書] (計 0 件)

なし

[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:

<http://kawasaki-gim4.main.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 宣昭 (OCHI, Nobuaki)

川崎医科大学・総合内科学 4・講師

研究者番号: 80611615

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

瀧川 奈義夫 (TAKIGAWA, Nagio)

川崎医科大学・総合内科学 4・教授

研究者番号: 60325107

(4) 研究協力者

なし