

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893155

研究課題名(和文) EGFR-TKIsと抗EGFR抗体の併用療法に対するベバシズマブによる修飾効果

研究課題名(英文) The impact of bevacizumab on EGFR-TKI and anti-EGFR antibody

研究代表者

大橋 圭明(Ohashi, Kadoaki)

岡山大学・大学院・助教

研究者番号：60729193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子であるEGFR変異を有する肺癌は、非喫煙者の半数を占める重要な疾患である。そのEGFRの阻害薬が有効であるが、1年前後で、2次的に耐性変異EGFR T790Mなどが出現し無効となる。本研究では、EGFR T790Mを有する肺癌を克服するためEGFR阻害薬であるアファチニブ、セツキシマブおよび血管新生阻害薬であるベバシズマブの併用の基礎的検討を行った。EGFR T790Mを有する肺腺癌細胞株H1975およびRPC-9を移植したマウスモデルで検討した。上記3薬剤の単剤療法、2剤併用療法の効果の検証を行った。いずれも中程度の効果であったが、3剤併用療法では再現性をもって腫瘍の完全寛解を得た。

研究成果の概要(英文)：EGFR mutations is major oncogenic driver mutation in non-smoking related lung cancers. EGFR-TKI is standard therapy for the lung cancers, however acquired resistance is inevitable. Secondary acquired mutation, EGFR T790M is major cause of the resistance. This pre-clinical research focused on the effect of triplet therapy with EGFR-TKI(afatinib), anti-EGFR antibody(cetuximab) and anti VEGF antibody(bevacizumab). Lung adenocarcinoma cell lines harboring EGFR T790M, H1975 and RPC-9 cell lines were transplanted in nude mice for xenograft models. The effect of each monotherapies or double therapies were moderate in the mice models. In contrast, the triplet therapy recurrently induced complete remission in the mice models.

研究分野：呼吸器腫瘍

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR T790M アファチニブ セツキシマブ ベバシズマブ

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療において発癌の直接的な原因となる癌特有の分子異常(driver mutations)が同定され、従来の病理組織分類に加えて治療方針に直結する driver mutations による分類が重要になっている。肺癌では、2004年に上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子の somatic mutations が発見され、EGFR-チロシンリン酸化阻害薬(TKIs)であるゲフィチニブやエルロチニブの劇的な臨床効果と相関することがわかった。前臨床モデルでEGFR遺伝子変異による持続的なEGFRの活性化が肺癌の発生につながるということがin vitro, in vivoで示された。申請者らも、EGFR変異遺伝子をマウス肺の2型肺胞上皮特異的に発現させる遺伝子改変マウスを作製し、EGFRシグナルに依存して発生、進展する肺癌の発生を確認し(Ohashi et al Cancer Sci 2008, Ohashi et al Cancer Res 2009)、国内特許を取得した。

EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対するEGFR-TKIsの奏効率は70~80%と著しく高く、治療戦略が根本的に変わった。EGFR遺伝子変異を有する進行肺癌患者にEGFR阻害薬を用いて治療を行った場合、予後は平均で4年程度、長い場合では数年を超える者も散見される。しかし、EGFR阻害薬が一旦奏効した肺癌の全例が再増悪をきたすこと(獲得耐性)が知られており、临床上、非常に大きな問題となっている。獲得耐性の原因として最も頻度が高いのは、二次性のEGFR遺伝子変異(exon20 T790M)の出現であり、原因の50-60%を占める。このT790M遺伝子変異による薬剤耐性を克服する有効な治療方法はまだ確立されていない。(Ohashi J Clin Oncol 2013)。耐性克服にむけて臨床開発中の治療法の1つに、EGFR T790Mに活性があるEGFR-TKIのアファチニブと抗EGFR抗体であるセツキシ

マブの併用療法がある。申請者が在籍していたPao研究室より、遺伝子改変マウスモデルを用いてEGFRを強力に抑制することでEGFR T790Mを制御できることが示され(Regales et al JCI 2009)、さらに第1/2相臨床試験で奏効率40%、腫瘍制御率90%とEGFR T790Mに対し、前例のない良好な効果が示された(図1. Janjigian ASCO 2011)。これに基づき現在第3相試験が進行中であるが、第1/2相試験において、正常組織に発現するEGFRの阻害が原因と思われる皮疹や下痢などの毒性が強く出現し、約20%の患者が治療中止されている点(図2)と、効果が5か月程度しか持続しない点から改善の余地が大いにある治療法といえる。

図1

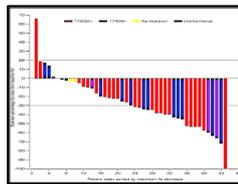


図2

Adverse event	Grade 1-2	Grade 3	All Grades
Rash/acne	79	18	97
Diarrhea	64	7	71
Fatigue	52	9	61
Nausea	50	3	53
Xerosis	49	3	52
Stomatitis	50	1	51
Nail effect	48	0	48
Discontinuations			
Disease progression	63		
Adverse events	19		
Other	5		

そこで申請者は血管内皮成長因子受容体(VEGF)に対する抗体薬であるベバシズマブに着眼した。ベバシズマブは細胞障害性抗癌剤と併用した場合、その効果を著しく増強し奏効率が約2倍となる(Niho et al Lung Cancer 2012)。これはベバシズマブの抗血管新生作用のみならず、併用薬剤の腫瘍局所への到達を補助する作用が一因と考えられている(Willet et al Nature Med 2004)。EGFR阻害薬に耐性を獲得した肺癌細胞株(RPC-9、PC-9/VanR、H1975)のマウス皮下腫瘍モデルで、EGFR-TKIのゲフィチニブやアファチニブ単独では抗腫瘍効果をほとんど認めなかったが、ベバシズマブとの併用やEGFR阻害作用と血管新生阻害作用を併せ持つパネダニブでは、抗腫瘍効果を認めることを申請者らは報告

した (Ichiara, Ohashi et al Cancer Res 2009, Ninomiya et al Mol Cancer res 2013)。さらに臨床試験で EGFR-TKIs であるエルロチニブとベバシズマブの併用療法の忍容性と有用性がすでに報告された (Seto et al Lancet Oncol 2015)。

以上から、1) EGFR を分子標的薬の併用で強力に阻害することは有効であるが、無増悪生存期間が限定的で、毒性が強い。2) ベバシズマブをさらに併用することで、EGFR 阻害薬を毒性が許容範囲なレベルまで減量し、かつ効果の維持/増強することができる可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異を伴う肺癌は、日本人の非喫煙者に発生する肺がんの半数以上を占め、非常に重要な疾患群である。EGFR-TKIs は、がんの直接的な原因である EGFR からの増殖シグナルを阻害することで劇的な効果を示すものの、約 1 年前後で獲得耐性が生じること実臨床で大きな問題となっている。EGFR-TKIs の耐性の機序として約 50% の腫瘍に、治療薬に耐性の遺伝子変異である EGFR T790M の出現を認める。この耐性克服を目的とした研究に非常に多くの研究がなされているが、まだ有効な治療法は確立していない。

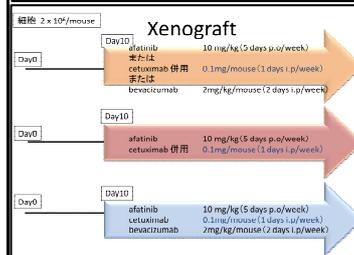
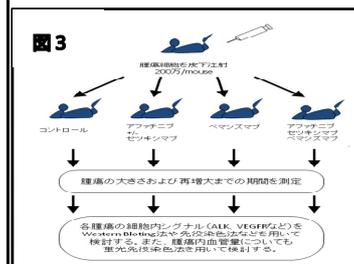
本研究では、EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞株、マウス皮下腫瘍腫瘍モデル、遺伝子改変マウスを用い、EGFR-TKIs に抗 EGFR 抗体、血管新生阻害薬などを併用し、集学的に EGFR を阻害することで耐性を克服し、長期的に肺癌のコントロールが可能かどうか検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### EGFR T790M 遺伝子陽性の肺癌細胞株を用いた皮下腫瘍マウスモデル

耐性遺伝子 EGFR T790M を有する肺腺癌

細胞株 2 つ (H1975 および RPC-9) を用いて、皮下腫瘍マウスモデルを図 3 に示すように作製した。具体的には、それぞれ細胞を 200 万/mouse で皮下注射を行い、10 日後に腫瘍形成を確認し、薬剤投与を開始した。コントロール群・アファチニブ群・



セツキシマブ群・ベバシズマブ群・アファチニブ/セツキシマブ群・アファチニブ/ベバシズマブ群・セツキシマブ/ベバシズマブ群に分けてそれぞれ単剤、2 剤併用および 3 剤併用の効果を検証した (図 4)。

アファチニブは 10 mg/kg/日経口投与、セツキシマブは 0.1mg/body を週 1 回、ベバシズマブは、2 mg/kg を週 2 回 腹腔内投与とする。アファチニブ/セツキシマブ療法を最初に報告した Regales らの報告 (JCI 2009) では、アファチニブは 25 mg/kg/日、セツキシマブは 1mg/body を 3 日に 1 回投与、アファチニブ/ベバシズマブ療法を報告した Ninomiya らの報告 (Mol Cancer res 2013) では、ベバシズマブは 5 mg/kg を週 2 回投与を採用していた。これらの既報と比べると、半分以下の量での治療となる。各群における腫瘍径の変化・再増大までの期間・体重減少について検討を行った。治療期間は 4 週間とした。4 週間の治療期間後は、さらに無治療で 4 週の間、経過を観察し、治療効果の程度を確認した。4 週間の観察後に、各群のマウスを安楽死させ、腫瘍検体を得た。そ

の得られた検体を用いて、viable な細胞の残存の確認のため in vitro で再度細胞株の樹立へ戻すことを試みた。EGFR を含む細胞シグナルの変化、腫瘍内血管の量、アポトーシスの有無などにつき、Western Blotting 法や免疫染色などを用いて検討した。

#### 4 . 研究成果

上記に記載したとおり EGFR T790M を有する肺癌細胞株である H1975 および RPC-9 細胞のマウス皮下腫瘍モデルを作成し、アファチニブ、セツキシマブおよび

図 4 - 1 単剤の効果

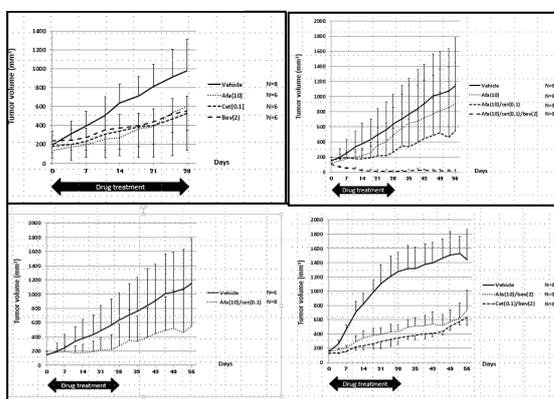


図 4 - 2 2 剤併用の効果

ベバシズマブの単剤、2 剤併用、および 3 剤併用の効果を比較検証した。アファチニブ、セツキシマブおよびベバシズマブの単剤 (図 4 - 1) および 2 剤併用では (図 4 - 2)、その効果が一過性であり十分な寛解状態を得られなかった。一方で 3 剤併用療法では、腫瘍はほぼ完全に消失し、さらに興味深いことに治療後の 4 週間の無治療観察を行っても腫瘍の再燃を認めなかった (図 4 - 3)。

病理学的にも効果を検証したが、3 剤併用においてのみ組織学的に残存腫瘍細胞を認めなかった (図 5)。また残存結節を摘出培養するも、3 剤併用した腫瘍のみ再度増殖してくる viable な細胞を認めなかった。毒性に関しては、体重減少などに差を認め

図 4 - 3 3 剤併用の効果

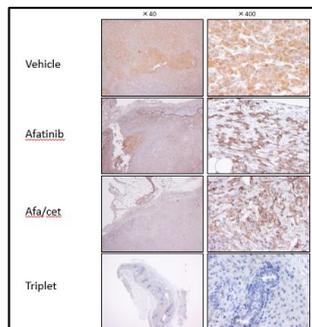


図 5  
3 剤併用による  
病理学的な完全奏効

なかつた。最後に 3 剤併用によりなぜこのような強い抗腫瘍効果が得られるのかの機序を検討した。まず、アファチニブの腫瘍内の濃度を比較したが、明らかな差を認めなかつた。そのほか、血管新生阻害効果を検討したが、3 剤併用において最も強い血管新生阻害効果を認めた。またアポトーシス誘導効果を検討したが、単剤療法、2 剤併用療法より、有意に 3 剤併用療法において cleaved caspase3 の発現を多く認めた。そのため、集学的に EGFR 阻害、血管新生阻害をすることでより強いアポトーシスを誘導することがより高い抗腫瘍効果をもたらす機序の一つであることが示唆された。以上の結果を踏まえ、現在当施設を中心に進行中のアファチニブ、ベバシズマブ併用療法の臨床第 1/2 試験 (UMIN000015944) の次のステップとしてアファチニブ、セツキシマブ、ベバシズマブ 3 剤併用療法の臨床開発の折衝を企業と行う。

#### 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)

Galvani E, Sun J, Leon LG, Sciarillo R, Narayan RS, Tjin Tham Sjin R, Lee K, **Ohashi K**, Heideman DA, Alfieri RR, Heynen GJ, Bernards R, Smit EF, Pao W, Peters GJ, Giovannetti E. NF-κB drives acquired resistance to a novel mutant-selective EGFR inhibitor. *Oncotarget*. 6(40):42717-32. 2015. doi: 10.18632/oncotarget.3956.

査読あり。

[ 学会発表 ] (計 2 件)

The impact of bevacizumab on

combination low-dose afatinib and cetuximab therapy in lung cancer cells harboring activated EGFR mutations. Kudo K, **Ohashi K**, et al.

第 55 回日本呼吸器学会学術講演会  
2015 年 4 月 18 日 東京

Abstract 1368: The impact of bevacizumab on combination low-dose afatinib and cetuximab therapy in lung cancer cells harboring activated EGFR mutations. Kudo K, **Ohashi K**, et al. Proceedings: AACR 106th Annual Meeting 2015; April 18-22, 2015; Philadelphia, PA

〔図書〕(計 件)

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大橋 圭明 (OHASHI Kadoaki)  
岡山大学病院・呼吸器・アレルギー内科・  
助教  
研究者番号：60729193

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：