

The 23rd Lung Cancer Workshop

EGFR-TKI の耐性機序

矢野聖二^{1,2}

Molecular Mechanism of EGFR-TKI Resistance

Seiji Yano^{1,2}

¹Kanazawa University Hospital Cancer Center, Japan; ²Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Japan.

ABSTRACT — Lung cancer with epidermal growth factor receptor (EGFR)-activating mutations (EGFRmu) responds favorably to the EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs), gefitinib or erlotinib. However, 25-30% of patients with EGFRmu show intrinsic resistance, and even responders invariably acquire resistance to EGFR-TKIs. Two mechanisms, second-site T790M point mutation in EGFR and MET amplification, which contribute to acquired resistance to EGFR-TKIs have been reported. T790M secondary mutation and MET amplification are found in approximately 50% and 20%, respectively, of patients acquiring resistance to EGFR-TKIs. However, the mechanisms of intrinsic resistance and the other 30% of cases of acquired resistance are still unknown. We recently reported hepatocyte growth factor (HGF) induced resistance as the third mechanism of EGFR-TKI resistance. HGF, produced by either cancer cells or host fibroblasts, induced resistance by restoring PI3K/Akt pathway via MET, independently of ErbB3. In addition, inhibitors of HGF-MET successfully overcame HGF-induced resistance to EGFR-TKIs, indicating the importance of HGF-MET signaling as a considerable target for more successful treatment with EGFR-TKIs.

(JLCC. 2009;49:939-943)

KEY WORDS — HGF, MET, EGFR-TKI, Drug resistance, Molecular targeted drugs

要旨 — EGFR 活性型変異を有する肺腺癌は EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるゲフィチニブやエルロチニブが著効する。しかし、EGFR 活性型変異を有する肺腺癌の 25~30% はゲフィチニブに自然耐性を示す。また、奏効症例においてもその大半が 1 年程度で獲得耐性を生じ再燃するため、EGFR 活性型変異を有する肺腺癌におけるゲフィチニブ耐性の克服は臨床的にも重要な検討課題である。EGFR の T790M second mutation や MET 増幅が、獲得耐性のそれぞれ 50% および 20% に関与することが知られているが、残りの 30% の症例の耐性機序および自然耐性の機序は不明である。著者らは、肝細胞増殖

因子 (HGF) による第三の耐性機序を明らかにした。癌細胞自身あるいは間質の線維芽細胞が産生する HGF は、その受容体である MET をリン酸化し、EGFR や ErbB3 とは無関係に PI3K/Akt 経路を活性化することにより、ゲフィチニブ耐性を誘導した。HGF-MET 阻害薬は HGF による EGFR-TKI 耐性を克服することも見出した。以上より、HGF-MET 経路は EGFR-TKI の治療効果をより高める上で、非常に重要な標的と考えられる。**索引用語** — HGF, MET, EGFR-TKI, 薬剤耐性, 分子標的薬

¹金沢大学附属病院がん高度先進治療センター；²金沢大学がん研究所腫瘍内科。

はじめに

非小細胞肺癌に対し認可されている上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブやエルロチニブは、女性、腺癌、非喫煙者、東洋人、活性型 EGFR 遺伝子変異を有する症例に奏効率が高く、劇的な腫瘍縮小効果を認めることもまれではない。しかし、奏効した症例もほぼ例外なく耐性を獲得し再発する。近年、EGFR-TKI に対する獲得耐性のメカニズムが次々と明らかにされている。本稿では、非小細胞肺癌における EGFR-TKI に対する耐性機構について、我々の得た知見も交えて紹介する。

感受性因子としての活性型 EGFR 遺伝子変異

2004 年に、肺癌の一部の症例において EGFR 遺伝子の突然変異が発見された。^{1,2} この変異はほぼ肺の腺癌に特異的であり、女性、東洋人、非喫煙者に高頻度に認められる。このような変異を有する症例では高い確率で EGFR-TKI の劇的な効果が期待できることが明らかになってきた。³ 遺伝子変異はチロシンキナーゼドメインに集中しており、EGFR のエクソン 19 の 15bp の in-frame 変異 (47%) とエクソン 21 の L858R 変異 (43%) で全体の 90% 以上を占める。これらの変異が生じると下流シグナルが増強する活性型変異である。Mitsudomi らは、1,170 例の成績をまとめ、EGFR に変異を有する肺癌 437 例の 314 例 (72%) に TKI が奏効する一方、変異がない肺癌では奏効するのは 10% にすぎないことを報

告している。⁴ また、EGFR 変異を有する症例でゲフィチニブ服用後の生存期間が有意に延長されることが多いことも報告している。

獲得耐性因子

EGFR のエクソン 20 の T790M 変異

活性型 EGFR 遺伝子変異を有し EGFR-TKI に著効を示した後、耐性を獲得した症例の腫瘍において、EGFR のエクソン 20 の 790 番目のスレオニンがメチオニンに変わる T790M 変異が二次的に起こっていることが 2005 年に報告された。^{5,6} これは gatekeeper mutation とも呼ばれており、Bcr/ABL の T315I, cKIT の T670I, PDGFRa の T674I に相当する変異である。T790M が生じるとゲフィチニブやエルロチニブが結合する部位に変異が生じることで立体構造に変化が生じ、ゲフィチニブやエルロチニブが結合できなくなるために耐性化が起こる⁵ (Figure 1)。また、ATP との親和性が高まるためゲフィチニブやエルロチニブが競合阻害できなくなるとする報告もある。⁷ T790M は未治療非小細胞肺癌においても 0.3~3.5% の症例に検出されている。⁸ また、T790M を有する癌細胞は少数であるが、EGFR-TKI による治療がなされることにより徐々にドミナントになり、臨床的に獲得耐性を示した症例の約半数に検出されるようになると考えられている。⁹

その他の EGFR 遺伝子変異

G796A

エクソン 20 に生じる変異で、ゲフィチニブ治療に初回

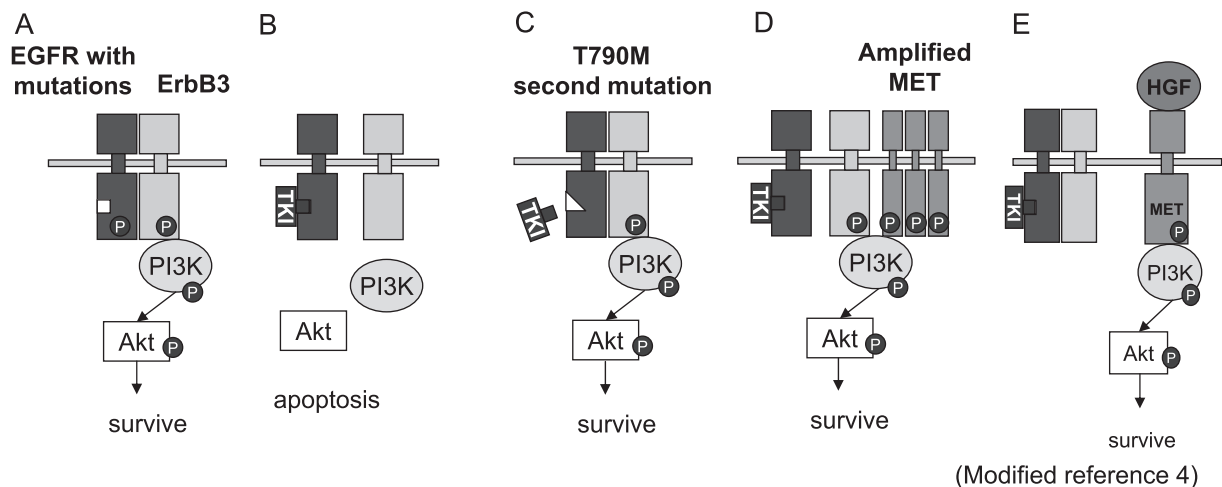


Figure 1. Mechanism of acquired resistance to EGFR-TKI. **A.** Survival signal in lung cancer cells with EGFR activating mutations. **B.** Apoptosis induced by EGFR-TKI: EGFR-TKI inhibits phosphorylation of EGFR-tyrosine kinases, ErbB3, and PI3K/Akt pathway, and hence induces apoptosis. **C.** Resistance by T790M second mutation in EGFR: T790M second mutation reduces binding of EGFR-TKI to EGFR. **D.** Resistance by MET amplification: amplified MET with autophosphorylation binds and transactivates ErbB3 and stimulates PI3K/Akt pathway. **E.** Resistance by HGF: HGF binds MET and directly stimulates PI3K/Akt pathway via MET phosphorylation.

耐性を示した肺癌症例の腫瘍においてエクソン 19 deletion とともに検出された。¹⁰ この変異が生じることで EGFR-TKI に対し 50,000 倍耐性になるとされている。

L747S

エクソン 20 に生じる変異で、ゲフィチニブに対する獲得耐性症例に L858R とともに検出された。¹¹ ゲフィチニブやエルロチニブなどの reversible EGFR-TKI に対し弱い耐性を誘導する。したがって、ゲフィチニブと比較し最大耐容量に近い量を投与できるエルロチニブを後治療として使用し有効であった症例が報告されている。

D761Y

エクソン 20 に生じる変異で、ゲフィチニブに対する獲得耐性となった 16 症例のうち 1 例において脳転移巣から検出された。¹² ゲフィチニブやエルロチニブなどの reversible EGFR-TKI に対し弱い耐性 (10 倍以下) を誘導するとされている。

また、治療前から L858R とともに検出されたことが報告されている。¹³

MET と HGF

MET 遺伝子はヒト骨肉腫細胞株より 1984 年にクローニングされた癌遺伝子で、染色体 7q31 に存在し、マクロファージ刺激因子の受容体である RON と相同性の高い受容体型チロシンキナーゼをコードしている。1989 年に肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) が同定された¹⁴ が、1991 年には MET が HGF の受容体であることが明らかになった。¹⁵ MET に HGF が結合すると、チロシンキナーゼに C 末端側のチロシン残基がリン酸化し、ここに種々のアダプター蛋白が結合し、さらに下流の RAS/MAPK 経路や PI3K/Akt 経路、PLC- γ などが活性化される。このようにして、HGF-MET 経路のシグナル伝達は細胞増殖、細胞運動、浸潤、転移、血管新生、創傷治癒、再生、形態形成などを促進すると考えられている。また、MET は EGFR を含む多くの受容体とクロストークすることが知られている。¹⁶

MET 蛋白は、遺伝子変異や遺伝子増幅、転写の亢進、低酸素状態などにより発現が亢進する。MET は発現亢進により分子密度が上昇すると、リガンド非依存性に二量体化により活性化することが報告されている。¹⁶

MET 増幅による耐性

MET 遺伝子の増幅は大腸癌、肝癌、胃癌などで報告されている。2007 年に Engelman らは、MET 増幅によりゲフィチニブ耐性が獲得されることを明らかにした。¹⁷ エクソン 19 の欠失変異を有する肺癌細胞 HCC827 を低濃度から徐々にゲフィチニブ濃度を上昇させて培養することにより、1,000 倍程度のゲフィチニブ耐性株 HCC827GR を樹立した。HCC827GR では増幅した MET

のリン酸化が亢進し、ErbB3 と会合することにより ErbB3 がリン酸化され、下流の PI3K/Akt 経路を活性化して耐性が誘導されることが示された (Figure 1)。さらに、臨床的に EGFR-TKI 耐性が生じた症例の約 20% に MET 増幅が生じていることも明らかにされた。MET 増幅は T790M 変異と同時に起こりうることも報告されている。¹⁸

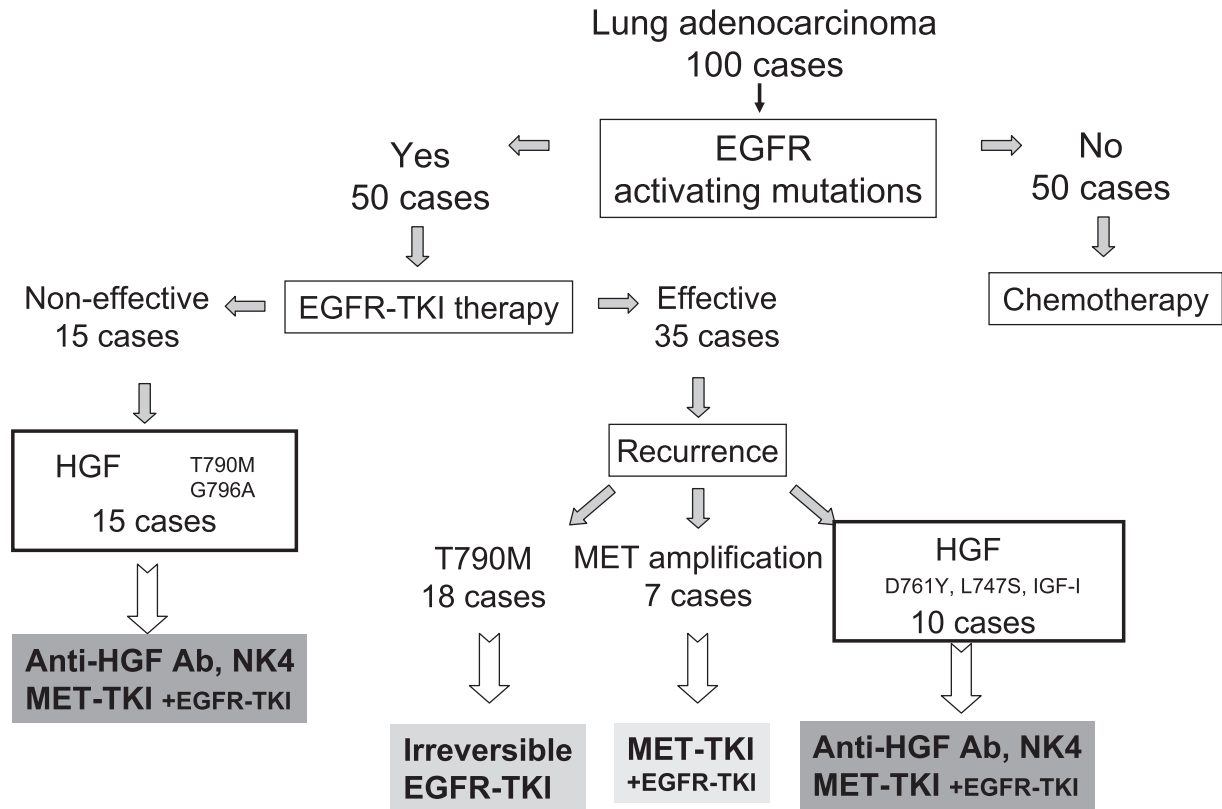
HGF による耐性

ゲフィチニブやエルロチニブが著効する場合、通常の抗癌剤の有効性があまり期待できない脳転移や骨転移にも著効することが特徴である。しかし、他の臓器の腫瘍は縮小するが肝転移が逆に増大するような症例も経験するところである。そこで、我々は肝臓に特有の耐性誘導因子が存在すると仮説を立て、肝臓から豊富に産生される因子として HGF に着目しゲフィチニブ耐性誘導活性の有無を検討した。EGFR のエクソン 19 の deletion を有しゲフィチニブに高い感受性を示すヒト肺腺癌株 PC-9 および HCC827 (T790M 変異や MET の増幅はなし) に対し、HGF は用量依存性にゲフィチニブ耐性を誘導した。しかも、HGF は受容体である MET に結合することで MET のリン酸化を増強し、EGFR や ErbB3 と会合することなく PI3K や Akt をリン酸化シヤポトースを阻害していた (Figure 1)。上述のように MET の増幅により耐性を獲得した細胞では、MET が増幅することによりリン酸化が亢進し、ErbB3 と会合することにより ErbB3 をリン酸化し、PI3K, Akt をリン酸化するのであり、PI3K/Akt 経路をリン酸化するのに ErbB3 の関与の点において全く異なる機序である。

実際に、臨床検体においてもゲフィチニブが著効したのち、T790M や MET 増幅がないにもかかわらずゲフィチニブに獲得耐性となった症例や、活性型 EGFR 遺伝子変異を有しているにもかかわらずゲフィチニブに初回耐性を示した症例のなかに HGF が高発現されている症例も確認している。今後症例を重ね、HGF が獲得耐性に関与している頻度を検討する予定である。

IGF-BP3

野生型 EGFR の増幅がみられゲフィチニブに感受性を示す類上皮癌細胞 A431 をゲフィチニブ存在下で長期培養することで樹立されたゲフィチニブ耐性株を用いた解析で、IGF-I に対する中和活性を有する IGF-BP3 の発現が低下することにより、培養液中の IGF-I が IGF-IR に結合し、PI3K, Akt を活性化シヤポトースを阻害するという機構が提唱されている。¹⁹ しかし、この機構が獲得耐性症例における IGF-I や IGF-BP3 の関与については全く検討されていない。野生型 EGFR を有する肺癌以外の細胞株から得られた知見ではあるが、活性型 EGFR 遺伝子変異が検出されないにもかかわらずゲフィ



(Modified reference 4)

Figure 2. Therapeutic strategy based on analysis of resistance mechanism.

チニブやエルロチニブが著効する症例も存在するため、そのような症例の獲得耐性に関与している可能性はあると思われる。

耐性克服療法

T790M, MET 増幅, HGF およびその他の因子による耐性のおよその頻度および耐性克服療法を Figure 2 に示した。

T790M に対して

Reversible EGFR-TKI とは EGFR における結合部位の異なる irreversible EGFR-TKI, pan-EGFR-TKI など耐性克服薬として注目されている。HKI-272 は臨床的に到達可能な濃度では耐性を克服できないことが報告されている。²⁰ 一方で, PF-00299804 は EGFR-TKI に獲得耐性となった肺癌 10 症例中 4 例に奏効したことが報告されており, 有望視される。²¹

また, セツキシマブなどの抗 EGFR 抗体も免疫細胞を介した ADCC や補体を介した CDC により細胞障害を惹起することが期待されている。²²

MET 増幅に対して

MET 増幅のためゲフィチニブ耐性を獲得した

HCC827GR 細胞に対し, ゲフィチニブと MET-TKI を併用することにより, EGFR と MET の両方のシグナルを阻害し耐性を克服できるとされている。¹⁷ 生体内で得られる MET-TKI の濃度で耐性が克服できるのか, EGFR-TKI に併用した場合の副作用は認容可能なのか, などの疑問が残るが, 現時点では *in vivo* 実験の成績は報告されていない。

おわりに

EGFR-TKI に対する獲得耐性は, 臨床上深刻な問題であるが, その耐性機序が分子レベルで明らかにされてきている。それに基づいた耐性克服候補薬も前臨床レベルでは登場している。今後, 臨床効果が実証され肺癌患者の福音になる日が一日もはやく訪れることを願ってやまない。

REFERENCES

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139.

2. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-1500.
3. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:169-181.
4. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci*. 2007;98:1817-1824.
5. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2005;352:786-792.
6. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2005;2:e73.
7. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2070-2075.
8. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2006;66:7854-7858.
9. Godin-Heymann N, Bryant I, Rivera MN, Ulkus L, Bell DW, Riese DJ 2nd, et al. Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer Res*. 2007;67:7319-7326.
10. Uramoto H, Uchiumi T, Izumi H, Kohno K, Oyama T, Sugio K, et al. A new mechanism for primary resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma: the role of a novel G796A mutation in exon 20 of EGFR. *Anticancer Res*. 2007;27:2297-2303.
11. Costa DB, Schumer ST, Tenen DG, Kobayashi S. Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations. *J Clin Oncol*. 2008;26:1182-1186.
12. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6494-6501.
13. Toyooka S, Date H, Uchida A, Kiura K, Takata M. The epidermal growth factor receptor D761Y mutation and effect of tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3431-3432.
14. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*. 1989;342:440-443.
15. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*. 1991;251:802-804.
16. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett*. 2005;225:1-26.
17. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316:1039-1043.
18. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:20932-20937.
19. Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest*. 2008;118:2609-2619.
20. Godin-Heymann N, Ulkus L, Brannigan BW, McDermott U, Lamb J, Maheswaran S, et al. The T790M “gatekeeper” mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:874-879.
21. Janne PA, Reckamp K, Koczywas M, Engelman JA, Camidge DR, Rajan A, et al. Efficacy and safety of PF-00299804 (PF299) in patients (pt) with advanced NSCLC after failure of at least one prior chemotherapy regimen and prior treatment with erlotinib (E): A two-arm, phase II trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:15s (suppl; abstr 8063).
22. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1552-1561.