

## 【総説】

## 第12回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition」

Cancer Research

73(8):2428-34. 2013年4月掲載

Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, Ishikawa D, Sato M, Hasegawa Y, Sekido Y, Yano S.

## BIM遺伝子多型に起因するEGFR-TKI耐性のHDAC阻害薬併用による克服

中川 学之 (なかがわ たかゆき)

## 背 景

肺癌は世界で年間100万人以上が死亡する難治性疾患であるが、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; EGFR) 変異や *ALK*融合遺伝子などのドライバー遺伝子の発見、さらにその遺伝子産物を標的とした分子標的薬の出現により一部の肺癌においては著明な腫瘍縮小効果や生存期間の延長も認められる。例えば、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR tyrosine kinase inhibitor; EGFR-TKI) であるゲフィチニブおよびエルロチニブは *EGFR* 変異陽性の非小細胞肺癌に高い奏効率を示す。しかしながら腫瘍縮小が殆ど認められない症例や初期耐性を示す症例も一部に存在し、その耐性の克服が喫緊の課題である。我々は過去に日本人の *EGFR* 変異肺癌症例における検討で肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor) の高発現が初期耐性の一因であることを報告しているが、初期耐性のメカニズムの大部分は依然として不明である<sup>1)</sup>。近年 *BIM* (*BCL2L1*) 遺伝子の遺伝子多型の存在が EGFR-TKI の初期耐性に関与することが報告された<sup>2)</sup>。 *EGFR* 変異肺癌141例の検討において、 *BIM* 遺伝子野生型症例における EGFR-TKI 治療による無増悪生存期間中央値が11.9ヶ月であるのに対して、 *BIM* 遺伝子多型陽性症例における EGFR-TKI 治療による無増悪生存期間中央値が6.6ヶ月と有意に短く、この *BIM* 遺伝子多型の有無が EGFR-TKI 初期耐性の効果予測バイオマーカーになり得ることが報告されている<sup>2)</sup>。

*BIM* は *Bcl-2* ファミリーに属するアポトーシス誘導タンパク質であり、その機能発揮には4番目のエクソンにコードされる BH3 ドメインが必須であることが明らかにされている。スプライシングアイソフォームとして *BIM<sub>EL</sub>*、*BIM<sub>L</sub>*、*BIM<sub>S</sub>*、*BIM<sub>γ</sub>* などが報告されており、このうち *BIM<sub>γ</sub>* は BH3 ドメインを有さないアイソフォームとして知られている。増殖期の細胞においては MEK/ERK シグナルの活性化により、*BIM* はリン酸化、ユビキチン修飾を受けプロテアソームにおいて分解される

が、MEK/ERK シグナルが遮断されると *BIM* の分解が抑制され、その発現が上昇しアポトーシスを誘導する。また *BIM* は *EGFR* 変異肺癌における EGFR-TKI によるアポトーシス誘導に中心的な役割を担っていることが報告されている<sup>3)</sup>。

*BIM* 遺伝子多型は *BIM* の2番目のイントロン領域の一部2.9kbpが欠失した多型であり、東アジア人の12.9% (88/682人) の頻度で認められ、欧米人には認められない (German: 0/595人, African: 0/60人) 東アジア人特有の遺伝子多型である。野生型アレルでは *BIM<sub>EL</sub>*、*BIM<sub>L</sub>*、*BIM<sub>S</sub>* が主な転写産物として発現するが、*BIM* 遺伝子欠失多型を有する場合、多型アレルから高頻度に *BIM<sub>γ</sub>* が転写・発現することが報告されている。*EGFR* 変異肺癌において EGFR-TKI が作用すると MEK/ERK シグナルの遮断にともない、*BIM* の発現が上昇しアポトーシスが誘導されるが、*BIM* 遺伝子多型を有する場合、EGFR-TKI が作用し MEK/ERK シグナルが遮断されてもアポトーシス誘導能を持たない *BIM<sub>γ</sub>* が主な転写産物として産生されることからアポトーシスに耐性を示す。そこで本研究では *BIM* 遺伝子多型に起因する EGFR-TKI 耐性克服を目的とした研究をおこなった。

## 結果と考察

まず我々は *EGFR* 変異を有するヒト肺癌細胞株における *BIM* 遺伝子多型の有無を PCR 法により検証した。PC-9、HCC827 は *BIM* 遺伝子多型を有さず、野生型であることが確認された。既報において *BIM* 遺伝子をヘテロ接合型に有するとされる HCC2279 は2本のバンドが認められ *BIM* ヘテロ接合型を有することが確認された。さらに我々は日本人から樹立された *EGFR* 変異陽性肺腺癌細胞株 PC-3 が *BIM* ヘテロ接合型を有していることを新たに見出した。ウェスタンブロット法により各細胞株における *BIM* タンパク質の発現量を比較したところ、*BIM* 遺伝子多型を有する HCC2279、PC-3 は *BIM* 遺伝子野生型の PC-9、HCC827 と比較して *BIM<sub>EL</sub>* などの BH3 ド

メインを有するBIMアイソフォームの発現量が低いことが確認された。さらにゲフィチニブを作用させた際のアポトーシス誘導能について検証したところ、*BIM* 遺伝子多型を有するHCC2279, PC-3は*BIM* 遺伝子野生型のHCC827, PC-9に比べてゲフィチニブによるアポトーシス誘導に抵抗性を示すことが確認された。

我々はこの*BIM* 遺伝子多型によるEGFR-TKI耐性に対してヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase; HDAC) 阻害薬であるポリノスタットとの併用が有用ではないかと考えた。ポリノスタットは本邦において皮膚T細胞性リンパ腫に承認されている薬剤であり、HDAC阻害作用によりヒストンのアセチル化を促進し、様々な遺伝子の転写を亢進させる。マントル細胞リンパ腫での検討においてはポリノスタットの作用によりBIMを含むBH3-onlyタンパク質の発現が上昇することが報告されている。HCC2279, PC-3にポリノスタットを作用させると、濃度依存的にヒストン H3 のアセチル化が促進し、同時に*BIM<sub>EL</sub>*の発現上昇が確認された。次にゲフィチニブとポリノスタットの併用によるアポトーシス誘導効果について検証した。*BIM* 遺伝子野生型のHCC827にゲフィチニブを作用させるとEGFRのリン酸化とともにERKのリン酸化が阻害され、アポトーシス誘導の指標となる切断型のcaspase-3, PARPが検出されたのに対して、*BIM*ヘテロ接合型のPC-3にゲフィチニブを作用させるとEGFRのリン酸化とともにERKのリン酸化が阻害されるものの切断型caspase-3, PARPは検出されなかった。しかしながらPC-3にゲフィチニブ, ポリノスタットの両者を作用させるとEGFR, ERKのリン酸化阻害に加えて、*BIM<sub>EL</sub>*の発現上昇さらには切断型caspase-3, PARPが検出されたことから両者の併用によりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。*In vitro*の結果から*BIM*ヘテロ接合型を有するEGFR変異肺癌細胞株はゲフィチニブによるアポトーシス誘導に耐性であるがHDAC阻害薬ポリノスタットを併用することにより、効率的にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。

次に*in vivo*におけるゲフィチニブおよびポリノ

スタット併用治療の有効性を検証した。HCC827皮下移植マウスモデルにおいてゲフィチニブ投与群では著明な腫瘍縮小効果が観察された。一方、PC-3皮下移植マウスモデルに対してゲフィチニブは腫瘍増殖抑制効果を示したものの腫瘍縮小効果は認められなかった。ポリノスタット単独の投与は僅かな増殖抑制作用しか認められなかったが、ゲフィチニブとポリノスタット併用治療は顕著な腫瘍縮小作用を示した。なお併用治療によるマウスの一般状態の異常や体重減少は認めなかった。ゲフィチニブ, ポリノスタット治療後のPC-3皮下腫瘍においてアポトーシスが誘導されているかTUNEL法にて検証した。PC-3皮下腫瘍においてゲフィチニブ, ポリノスタット単独投与ではアポトーシス細胞は僅かであったのに対して、両薬剤を併用した腫瘍ではアポトーシス細胞の顕著な増加が認められた。ウェスタンブロット法による解析においても両薬剤の併用により*BIM<sub>EL</sub>*の発現が上昇し、切断型caspase-3, PARPが検出された。すなわち*in vivo*においても*BIM* 遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌はゲフィチニブによるアポトーシス誘導に耐性であるが、ポリノスタットを併用することにより*BIM<sub>EL</sub>*の発現が誘導されることによりアポトーシスが惹起され耐性克服に繋がったと考えられる(図1)。

## 結 論

本研究によりEGFR変異を有する肺癌症例において*BIM* 遺伝子多型解析を行い、*BIM* 遺伝子多型を有する症例にHDAC阻害薬であるポリノスタットを併用する個別化治療の有用性が示唆された。将来、臨床試験を通じてヒトにおける有効性・認容性が検討され、新たな治療法として確立されることを期待したい。

## 参 考 文 献

- 1) Yano S, et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. J Thorac Oncol. 2011 Dec;6(12):2011-7.
- 2) Ng KP, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. Nat Med. 2012 Mar 18;18(4):521-8.
- 3) Costa DB, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. PLoS Med. 2007 Oct;4(10):1669-79

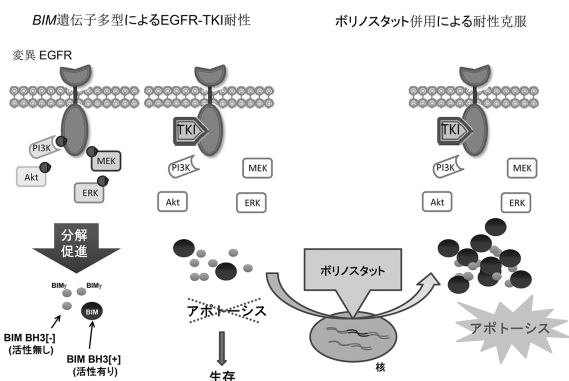


図1. *BIM* 遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌のEGFR-TKI耐性とポリノスタット併用による克服のシエーマ



## Profile

2003年3月 東北大学大学院薬学研究所  
遺伝子薬学分野 修士課程  
修了  
2014年3月 金沢大学大学院医学系研究  
科 腫瘍内科研究分野 博士  
課程修了