

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22112010

研究課題名（和文）呼吸器悪性腫瘍の微小環境の特性を標的とした新規制御法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy targeting microenvironment in respiratory malignancy

研究代表者

矢野 聖二（Yano, Seiji）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30294672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 66,200,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍微小環境の線維芽細胞が産生するHGFなどの増殖因子が、EGFR変異肺がんやALK融合遺伝子陽性肺がん細胞において、分子標的薬耐性を惹起することを明らかにした。さらに、これらの増殖因子受容体の活性化を阻害すれば、微小環境による分子標的薬耐性が解除できることを示した。

一方、胸膜中皮腫の同所移植モデルにおいて、胸膜中皮腫細胞と線維芽細胞は、悪性サイトカインネットワークを形成することで腫瘍進展を促進しており、このサイトカインネットワークの構成因子が治療標的となることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that microenvironment-derived growth factors, including HGF, induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant or ALK-fusion gene positive lung cancer. The resistance caused by microenvironment could be overcome by concomitant inhibition of growth factor receptors. In the orthotopic model of mesothelioma, we discovered that mesothelioma cells and fibroblasts formed the vicious cytokine network and promoted tumor progression, indicating that factors involved in this network would be ideal therapeutic targets for mesothelioma.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：微小環境 分子標的薬耐性 EGFR変異肺がん ALK肺がん 中皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

肺がんの分子標的薬は EGFR 変異あるいは EML4-ALK 融合遺伝子を有する肺がんに劇的な効果を示すが、必ず獲得耐性により再発することが次なる問題となっている。また、再発する病巣（ほとんどは転移巣）間で耐性原因が異なることが多く、耐性がんの診断および治療を困難にする大きな要因となっている。肺がんはわが国のがん死亡原因の第1位であり、中皮腫は発症にアスベスト暴露と強い因果関係があり今後十数年間に急激な増加が予想されている。いずれも早期発見が困難で薬剤・放射線感受性も低く、極めて予後不良な呼吸器悪性腫瘍であり、これらの死亡率減少はわが国のがん医療の急務の命題となっている。

近年、上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異を有する肺がんに着効する EGFR 阻害薬（ゲフィチニブ、エルロチニブ）が使用されているが、1~2年以内にほぼ例外なく耐性化することが臨床的に重要な問題となっている。その耐性機構として研究代表者は、肝細胞増殖因子(HGF)が Met/PI3K/Akt 経路を活性化し、EGFR 遺伝子変異を有する肺がんの EGFR 阻害薬に対する自然耐性および獲得耐性を誘導すること(*Cancer Res* 68;9479, 2008)、間質の線維芽細胞が HGF を産生し耐性を誘導すること(*Clin Cancer Res*15;6630, 2009)から、微小環境を構成する線維芽細胞が EGFR 阻害薬耐性克服の標的となりうることを明らかにしている。

一方、中皮腫において研究代表者は、血管内皮増殖因子(VEGF)を過剰発現している中皮腫には、抗 VEGF 抗体併用にてペメトレキセドの治療効果を増強できるが、VEGF 低発現性の中皮腫には無効で、新たな治療戦略が必要であることを報告している(*Clin Cancer Res* 13:5918,

2007)。さらに、VEGF 低発現性の中皮腫の間質には線維芽細胞が浸潤しており、1) 中皮腫が産生する FGF-2 や PDGF-AA がパラクライン的に線維芽細胞の HGF 産生を増強し、中皮腫の増殖や浸潤を促進していること、2) 成熟した腫瘍血管を形成し抗がん剤透過性を低下させていることを見出し、微小環境因子が治療標的として重要であることを報告している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、微小環境因子による肺がんの中皮腫の進展メカニズムを明らかにし、肺がんの EGFR 阻害薬耐性を解除するあるいは中皮腫に対する画期的な新規治療法を開発することである。研究期間内に宿主線維芽細胞が HGF を産生した場合の肺がん EGFR- TKI 耐性克服療法および中皮腫に対する新規治療法をマウスモデルにおいて確立する。

## 3. 研究の方法

### 1. 肺がんにおける微小環境が惹起する分子標的薬耐性の機構解明と克服

EGFR変異肺がん細胞株を用い、ゲフィチニブ耐性克服薬として期待されている不可逆型EGFR-TKI(アファチニブ)に対してHGFが耐性を誘導するか否かをMTT法で検討した。さらに、抗HGF抗体やMET阻害薬などでHGF-METの活性を阻害することによりHGFによる耐性が解除されるか否かをMTT法およびWestern blot法で検討した。

がん細胞からのVEGF産生をELISA法で測定した。

EML4-ALK肺がん細胞株を持ち、ALK阻害薬に対してHGFやEGFRリガンドが耐性を誘導するか否かをMTT法で検討した。また、細胞内シグナル伝達系の活性化状態をWestern blot法で検討した。

### 2. 中皮腫における同所微小環境での進展機構解明と制御法確立

同所移植モデルとして、ヒト胸膜中皮腫株をSCIDマウスの胸腔内に接種した。7日後より分子標的薬をマウスに投与し、28日目にマウスを犠牲死させ、胸腔腫瘍量および胸水量を定量した。

採取した腫瘍を用い、増殖細胞数やサイトカインあるいは受容体発現を免疫染色法で検討した。

細胞株のGanglioside GM2 (GM2)発現をFACS法で検討した。

#### 4. 研究成果

### 1. 肺がんにおける微小環境が惹起する分子標的薬耐性の機構解明と克服

EGFR変異肺がんにおいて、腫瘍微小環境の線維芽細胞が産生する肝細胞増殖因子(HGF)がその受容体であるMETを活性化することで、ゲフィチニブ耐性克服薬として期待されている不可逆型EGFR-TKIに対しても耐性を誘導することを明らかにした。さらに、抗HGF抗体やMET阻害薬などでHGF-METの活性を阻害することによりHGFによる耐性が解除されることを示した。また、MET下流のPI3Kを短時間であっても強力に阻害すれば、HGFによる耐性を解除できることを明らかにした。

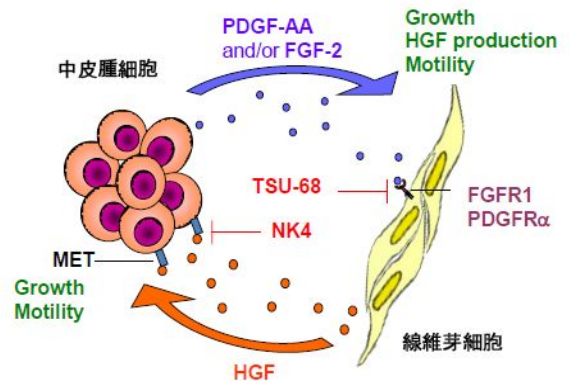
さらに、HGFはEGFR変異肺がんにおいてEGFR-TKI耐性を誘導するのみならず、MET活性化によりがん細胞からのVEGF産生を刺激し血管新生を促進することで腫瘍進展を促進しているが、EGFR-TKIにMET阻害薬に加えVEGF阻害薬を併用すると、最も強力に血管新生を阻害するのみならず、休薬後の血管新生のリバウンドも抑制し、腫瘍の再増大を抑制することを明らかにした。

また、EML4-ALK肺がんにおいては、EGFRリガンドであるEGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGFなどがEGFRをリン酸化し、下流のPI3K/Akt経路を活性化することでバイパス生存シグナルを惹起し、ALK阻害薬であるクリゾチニブに対して耐性を誘導する。近年ALK遺

伝子増幅やゲートキーパー変異を有するがん細胞にも有効な選択的ALK阻害薬の開発が進められているが、選択的ALK阻害薬に対してはEGFRリガンドのみならずHGFも耐性を誘導することを明らかにした。EGFRリガンドはおもに血管内皮細胞から、HGFは線維芽細胞から産生され、EML4-ALK肺がん細胞のALK阻害薬耐性が誘導された。

## 2. 中皮腫における同所微小環境での進展機構解明と制御法確立

胸膜中皮腫の同所移植モデルにおいて、胸膜中皮腫細胞はFGF-2やPDGF-AAなどの線維芽細胞遊走因子を産生し、遊走された線維芽細胞がHGFを産生し、中皮腫細胞の増殖を促進していることを見出した(下図)。



胸膜中皮腫は臓器微小環境と悪性サイトカインネットワークを形成することで腫瘍進展を促進しており、このサイトカインネットワークの構成因子を標的とした治療薬の開発を現在行っている。

GM2は細胞膜上に発現される糖脂質で、神経芽腫や膠芽腫、小細胞肺がんを高発現されており、正常細胞にはほとんど発現がないことから、がん治療標的の一つと考えられている。今回ヒト中皮腫細胞がGM2を高発現していることを見出した。さらに、抗GM2抗体(BIW-8962)が単核球のADCCを誘導し、GM2を発現する中皮腫の細胞死を誘

導し、SCIDマウスにおける同所移植モデルにおいても中皮腫細胞の進展を抑制することを明らかにし特許出願した(米国出願61/734087)。さらに、26例の臨床検体の解析で、58%の中皮腫がGM2を高発現していること明らかにし、抗GM2抗体が中皮腫に有望な分子標的薬であることを報告した。

以上より、EGFR変異肺癌および胸膜中皮腫において微小環境の線維芽細胞が腫瘍進展や分子標的薬感受性を制御していることが明らかになり、新しい治療標的となることが示唆された。

#### 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下線)

[雑誌論文](計 31件)

1. Tanaka M, Kuriyama S, Yoshida M, Yano S, Goto A, Minamiya Y, Aiba N, Kohno T. LPP inhibits collective cell migration during lung cancer dissemination. **Oncogene** in press. 査読有り
2. Ebi H, Oze I, Nakagawa T, Ito H, Hosono S, Matsuda F, Takahashi M, Takeuchi S, Sakao Y, Hida T, Faber, AC, Tanaka H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Yano S, Matsuo K. Lack of association between the BIM deletion polymorphism and the risk of lung cancer with and without EGFR mutations. **J Thorac Oncol**, 2015; 10: 59-66. 査読有り
3. Li Q, Wang W, Machino Y, Yamada T, Kita K, Oshima M, Sekido Y, Tsuchiya M, Suzuki Y, Nan-ya K, Iida S, Nakamura K, Iwakiri S, Itoi K, Yano S. Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibody against malignant pleural mesothelioma. **Cancer Sci** 2015; 106:102-7. 査読有り
4. Nanjo S, Nakagawa T, Takeuchi S, Kita K, Fukuda K, Nakada M, Uehara H, Nishihara H, Hara E, Uramoto H, Tanaka F, Yano S. *In vivo* imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line. **Cancer Sci** 2015; 106:244-52. 査読有り
5. Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo N, Yamada T, Ebi H, Zhao Lu, Yasumoto K, Matsumoto M, Yonekura K, Yano S. TAS-115, a novel inhibitor of VEGFR-2 and Met, combined with erlotinib prevented re-growth of HGF-triggered erlotinib resistant lung cancer harboring EGFR mutation. **J Thorac Oncol** 2014 9;775-83. 査読有り
6. Tanimoto A, Yamada T, Takeuchi S, Ebi H, Kita K, Matsumoto K, Yano S. Receptor ligand-triggered resistance to alectinib and its circumvention by Hsp90 inhibition in EML4-ALK lung cancer cells. **Oncotarget** 2014; 5:4920-8. 査読有り
7. Ebi H, Costaa C, Fabera AC, Nishtalaa M, Kotanib H, Jurica D, Pellea PD, Songa Y, Yano S, Mino-Kenudsona M, Benesa CH, Engelman JA. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. **Proc Natl Acad Sci USA** 2013; 110:21124-9. 査読有り
8. Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. **J Immunol** 2013;190:6239-49. 査読有り
9. Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Novel PI3K-mTOR inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib-resistance of EGFR mutant lung cancer cells triggering by HGF. **Int J Cancer**, 2013; 133:505-13. 査読有り
10. Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y. Surfactant protein a suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated

- macrophages. **Am J Pathol**. 2013 182: 1843-53. 査読有り
11. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, Ishikawa D, Sato M, Hasegawa Y, Sekido Y, Yano S. EGFR-TKI resistance due to *BIM* polymorphism can be circumvented by in combination with HDAC inhibition. **Cancer Res** 2013 73:2428-34. 査読有り
  12. Ishikawa D, Takeuchi S, Nakagawa T, Sano T, Nakade J, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Nakamura T, Matsumoto K, Kagamu H, Yoshizawa H, Yano S. mTOR inhibitors control erlotinib-resistance of *EGFR* mutant lung cancer cells triggered by HGF. **PLoS ONE**, 2013; 8(5):e62104. 査読有り
  13. Enkhbaatar Z, Terashima M, Oktyabri D, Tange S, Ishimura A, Yano S, Suzuki T. KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family. **Cell Cycle** 2013;12: 2100-12. 査読有り
  14. Zhao L, Yasumoto K, Kawashima A, Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Matsumoto K, Yonekura K, Yoshie O, Yano S. Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. **Cancer Sci** 2013;104:1640-6. 査読有り
  15. Nanjo S, Yamada T, Nishihara H, Takeuchi S, Sano T, Nakagawa T, Ishikawa D, Zhao L, Ebi H, Yasumoto K, Matsumoto K, Yano S. Ability of the Met kinase inhibitor crizotinib and new generation EGFR inhibitors to overcome resistance to EGFR inhibitors. **PLoS ONE** 2013; 8(12): e84700. 査読有り
  16. Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Scaffold Aki1, a novel therapeutic target for lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations. **Oncogene**, 2013;32:4427-35. 査読有り
  17. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S. E7050, a Met kinase inhibitor, reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in *EGFR* mutant lung cancer cells. **Clin Cancer Res**, 2012;18:1663-71. 査読有り
  18. Koizumi H, Yamada T, Takeuchi S, Nakagawa T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Yano S. Hsp90 inhibition overcomes HGF-triggering resistance to EGFR-TKIs in *EGFR* mutant lung cancer by decreasing client protein expression and angiogenesis. **J Thorac Oncol** 2012; 7:1078-85. 査読有り
  19. Yamada T, Takeuchi S, Nakade J, Kita K, Nakagawa T, Nanjo S, Nakamura T, Matsumoto K, Soda M, Mano H, Yano S. Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor-resistance in EML4-ALK lung cancer cells. **Clin Cancer Res**, 2012; 18:3592-602. 査読有り
  20. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Uenaka T, Yano S. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in *EGFR* mutant lung cancer. **Am J Pathol**, 2012; 181:1034-43. 査読有り
  21. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, Yano S. Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor to overcome erlotinib resistance in *EGFR* mutant lung cancer. **Mol Cancer Ther**, 2012 11:2149-57. 査読有り
- [学会発表](計 75件)
1. 15th Annual Targeted Therapies of The Treatment of Lung Cancer. Yano S.

- Therapeutic activity of glycoengineered anti-GM2 antibody BIW-8962 against malignant pleural mesothelioma. 2015.02.19 Hotel Fairmont Miramar, Santa Monica, USA.
2. Joint International Symposium on TGF-Family and Cancer. Yano S. Bone microenvironment confers Hsp90 inhibitor resistance in the metastatic small cell lung cancer. 2015.01.13 International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA, Japan.
  3. 矢野聖二. Resistance to EGFR-TKI in EGFR mutant lung cancer. 第73回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日 パシフィコ横浜
  4. 矢野聖二. 脳転移：腫瘍内科の視点から. 第52回日本癌治療学会学術集会. 2014年8月29日 パシフィコ横浜.
  5. 矢野聖二. 肺がんの骨転移のメカニズムと分子標的治療. 第23回日本がん転移学会学術集会・総会. 2014年7月10日 金沢市文化ホール.
  6. 矢野聖二. 肺がんの分子標的治療薬耐性の機構解明と耐性克服治療開発. 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2014年6月26日 ホテルメトロポリタン仙台.
  7. 矢野聖二. 日本における腫瘍内科教育の今後～分子標的薬体制の克服絵を目指した研究を通して～ 第111回日本内科学会講演会. 2014年4月11日 東京国際フォーラム.
  8. Third AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer. Yano S. Mechanisms of EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer and its therapeutic strategy. 2014 01.06 San Diego Marriott & Marina Hotel, USA.
  9. IASLC 15th World Conference on LungCancer. Yano S. Resistance to EGFR-TKIs. 2013.10.28 Sydney Exhibition & Convention Centre, Australia.
  10. American Thoracic Society 2013. (Meet the Professor) Yano S. Novel acquired

resistance mechanisms of molecular-targeted therapy for lung cancer. 2013.05.20 Pennsylvania Convention Center, USA.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1件)

名称：中皮腫の治療方法  
発明者：矢野 聖二、町野 悠介、鈴木 唯  
権利者：金沢大学  
種類：米国仮出願、協和発酵キリン  
番号：PCT/JP2013/082621  
出願年月日：平成24年12月6日  
国内外の別：米国

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
矢野 聖二 (YANO SEIJI)  
金沢大学・がん進展制御研究所・教授  
研究者番号：30294672  
  
(2)研究分担者  
鈴木 健之 (SUZUKI TAKESHI)  
金沢大学・がん進展制御研究所・教授  
研究者番号：30262075  
  
西岡 安彦 (NISHIOKA YASUHIKO)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：70274199

H25年度から  
衣斐 寛倫 (EBI HIROMICHI)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
研究者番号：00645145

(3)連携研究者  
該当なし