

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860603

研究課題名(和文) EGFR変異肺癌のEMTに起因する変異型EGFR選択的TKI耐性克服治療の開発

研究課題名(英文) Development of therapies for overcoming EMT-associated irreversible tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR lung cancer

研究代表者

福田 康二 (Fukuda, Koji)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助手

研究者番号：10722548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：変異型EGFR選択的TKIは、2016年に本邦でも承認された肺癌の治療薬である。しかし、この薬にも耐性が獲得されることが予測され、これまでの研究より上皮間葉移行(EMT)がその原因であることが示唆された。まず、EMT耐性克服方法としてAXL阻害効果を検証したが、効果は得られずAXLのEMT耐性への関与は認められなかった。一方、EMT関連転写因子のZEB1を抑制した結果、耐性株の間葉系から上皮系への逆行(MET)が起こり、感受性が回復した。さらに、ZEB1を標的にできる薬剤を探索した結果、薬剤AがZEB1を低下させMETを誘導すること見出し、EMT耐性の治療薬として有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Irreversible tyrosine kinase inhibitor (ITKI) for the treatment of patients with mutant EGFR NSCLC has been approved in Japan recently. However, a lot of patients could be acquired resistance after treatment. While epithelial mesenchymal transition (EMT) was reported to be associated with the resistance, no optimal therapy has been identified. In this study, we first hypothesized that AXL plays an important role in EMT resistance and examined the effect of AXL inhibition on the EMT resistant cells. However, knock-down of AXL did not change the EMT phenotypes. Interestingly, we found that knock-down of ZEB1 induced mesenchymal-epithelial transition (MET) and restored sensitivity to EGFR-TKI. Furthermore, our drug screening revealed that Drug A strongly suppressed ZEB1 expression and induced MET, as well as restored ITKI sensitivity. These results suggest that Drug A could be a novel therapeutic strategy for overcoming EMT-associated ITKI resistance in mutant EGFR lung cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：EMT EGFR肺癌 AXL

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肺癌における EGFR-TKI 耐性出現とその克服の意義

肺がんはわが国における悪性新生物による死亡原因の第1位であり、EGFR 変異を有する肺がんに対してはEGFR-TKI が著効することが多い。しかしながら、著効例においても約1年程度の経過でほぼ全ての症例がEGFR-TKI に耐性を獲得する(獲得耐性)。この臨床上的大きな課題を克服するためには、EGFR-TKI 耐性獲得機構を明らかにし、その分子メカニズムに基づいた耐性克服治療を確立することが、肺がん患者のさらなる延命につながる。

EGFR-TKI 獲得耐性機構の約50%にEGFRのExon20に生じるT790Mゲートキーパー変異が報告される。T790M 遺伝子変異が起これば、EGFRのATP親和性が高まりEGFR-TKI 結合性が低下することにより耐性化する(Yun CH, et al. PNAS 2008:2070-5)。その耐性克服が期待された不可逆型EGFR-TKI による臨床試験が行われたが顕著な臨床効果は得られていない。他にも耐性機構として、MET 遺伝子増幅や2008年に申請者の研究室より示された肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) が報告されている。

### (2) EGFR-TKI による EMT を介した肺がんの薬剤耐性獲得

近年、遺伝的な二次変異や側副シグナルの活性化だけでなく、全く異なった耐性機序として Epithelial mesenchymal transition (EMT) が報告された(Sci Transl Med 2011:3 75ra26)。EMT は上皮系 (epithelial) 細胞が細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い遊走、浸潤能を得ることで間葉系 (mesenchymal) 細胞へと変化するプロセスであり、EGFR-TKI 獲得耐性との関連が報告されている。例えば、肺癌細胞においてE-カドヘリン高発現、ビメンチン低発現の EMT 誘導型の細胞はエルロチニブへの感受性が高いことが示されている(Cancer Res 2006:66 944-50)。また臨床では、エルロチニブと化学療法の併用治療を行った肺がん患者においてE-カドヘリンの低発現 (EMT 誘導型) は生命予後不良と関連していることが示唆された(Clin Cancer Res 2005:11 8686-98)。このような EMT によるEGFR-TKI 耐性獲得の報告が増加している一方、EMT を標的とした分子標的治療薬や有効な治療法は未だにないのが現状である。

## 2. 研究の目的

変異型 EGFR 選択的チロシンキナーゼ (TKI) は EGFR 変異肺癌に対する次世代型EGFR-TKI として期待される分子標的薬である。しかし、この薬剤に対しても耐性が獲得されることが予想される。申請者の研究から、肺癌の変異型EGFR 選択的TKI に対する耐性獲得機構として Epithelial mesenchymal transition (EMT) が示唆された。近年、肺癌だけでなく他癌種においても EMT と薬剤耐性との関連が多数報告されているが、その克服治療は確立されていない。本研究では EMT による耐性誘導の標的分子として AXL に着目し、EMT 誘導機序の解明および EMT による獲得耐性を克服する新規治療法開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) WZ4002 耐性株の AXL 阻害による薬剤耐性克服効果の検証

変異型 EGFR 選択的チロシンキナーゼ (TKI) である WZ4002 耐性株の AXL の発現を Si-RNA によりノックダウンさせ、WZ4002 への感受性回復の効果を MTT 法で検討した。さらに、AXL 阻害薬と WZ4002 との併用効果についても同様に検討を行った。

### (2) AXL 発現と EMT 誘導との関連性の検証

AXL をノックダウンさせた耐性株での EMT マーカー発現の変化を Western blot 法や免疫蛍光染色法により確認した。具体的には、上皮系マーカーである E-カドヘリンや ZO-1 発現の上昇、間葉系マーカーである N-カドヘリン、ビメンチン発現の低下により耐性株の上皮系への移行を評価した。

### (3) AXL 以外の EMT, 薬剤耐性克服効果の検証

AXL 以外の EMT を誘導するシグナル経路として、TGFβ-GSK-3 経路、TGFβ-Smad 経路、Integrin-ILK 経路、Wnt/β-catenine 経路などが報告されており、これらのシグナルは癌細胞の核内において EMT 関連遺伝子の転写因子である Snail, Twist, ZEB1 などの発現を調節する(Int J Clin Exp Pathol 2013: 6 1747-58)。まず、Western blot 法によりこれらシグナル経路のタンパクの発現とリン酸化を親株と WZ4002 耐性株と比較し、EMT の誘導が予測される標的分子の探索を行った。

### (4) EML4-ALK 肺癌における EMT 耐性株の検証

EMT が誘導されたクリゾチニブ耐性の ALK 肺癌株においても同様の効果が得られるかについて確認を行った。マウスの胸腔内に肺癌株を移植しクリゾチニブで治療を行った後、in vivo で耐性化した腫瘍からクリゾチニブ耐性株を樹立した。さらに limiting

dilution 法によりシングルクローンを樹立し、Western blot 法で EMT マーカーを検出し EMT により耐性が誘導されていると考えられる 3 クローンを選抜した (図 a)。

#### 4. 研究成果

##### (1) AXL 阻害による薬剤耐性克服効果の検証

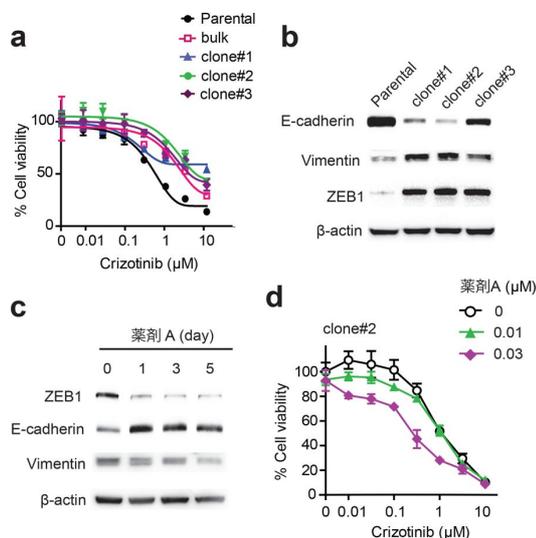
まず、EGFR 肺癌株を第三世代 EGFR-TKI のひとつである W4002 へ長期間曝露し、EMT と AXL の高発現を認めた細胞株 (WZ 耐性株) を樹立した。次に、薬剤耐性に AXL 発現が関連しているか否かを明らかにするため Si-RNA により WZ 耐性株の AXL 発現をノックダウンさせた後、W4002 の効果を検証した。しかしながら、耐性株の W4002 感受性の回復は認められず、EMT マーカーの発現にも変化は認められなかった。別の 4 クローンをを用いて検証しても同様の結果であったことから、耐性獲得機序と AXL のバイパスシグナルには関連性がない AXL が EMT を調節していないことが示唆され、EMT 耐性株では AXL 以外の有望な標的分子の探索が必要であると考えられた。

##### (2) AXL 以外の有用分子の探索

研究当初は AXL が EMT 耐性と関連していることを予測していたが、予想に反する結果が得られた。そこで、我々は EMT に関わる他の有用分子の探索を行った。親株と耐性株の発現タンパクを比較したところ耐性株において転写因子である ZEB1 の高発現が認められた。そこで、Si-RNA により耐性株の ZEB1 をノックダウンした結果、間葉系から上皮系へ mesenchymal-epithelial transition (MET) が誘導され、第三世代 EGF-TKI への感受性回復が認められた。次に、ZEB1 を標的にできる薬剤を探索した結果、薬剤 A が ZEB1 を低下させ MET を誘導することを明らかにした。

##### (3) EML4-ALK 肺癌における薬剤 A の効果の検討

薬剤の効果の普遍性を示すために、EMT が誘導されたクリゾチニブ耐性の ALK 肺癌株においても検証を行った。最初に EMT の誘導が認められた 3 クローン全てにおいて ZEB1 の発現を調べた結果、全てのクローンで ZEB1 上昇が確認された (図 b)。次に、クローン#2 を薬剤 A で処理した結果、ZEB1 の低下、E カドヘリンの上昇、ビメンチンの低下を認めたことから、MET の誘導が示唆された (図 c)。薬剤 A で 3 日間前処理を行った後、クリゾチニブでさらに 3 日間治療した結果、コントロールに比べ有意にクリゾチニブ感受性の回復が認められた (図 d)。



##### (4) 今後の展望

これまでの研究から EGFR 変異肺癌だけでなく、ALK 肺癌の耐性獲得機構としても EMT が起こることを確認した。また、乳癌など他癌種においても EMT と薬剤耐性との関連が多く報告されている。それにも関わらず、TKI 耐性における EMT 誘導機序は未だに不明な点が多く、特にその克服治療法は確立されていない。

本研究では、臨床で肺癌患者に対して使用されている EGFR-TKI や ALK-TKI の耐性獲得と克服法に着目し、その耐性機構として EMT を見出した。当初予測していた AXL は治療標的として不適であったが、別の治療法として ZEB1 をターゲットとすることで MET を誘導できる可能性を提示した。また、ZEB1 を標的にできる薬剤を本研究で新たに見出した。これまで治療のなかった EMT による薬剤耐性において耐性克服治療が可能となれば、肺癌だけでなく他癌種に対しても広く応用できる可能性がある。今後は、*in vivo* における薬剤 A の効果について検証を行う。また、MET を誘導可能な薬剤のスクリーニングを行い臨床応用可能な治療薬の絞り込みを行う。

#### 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)

[学会発表](計1件)

Tenth AACR-JCA Joint Conference (国際学会)  
2016年2月16日~20日  
Maui, Hawaii, USA

Koji Fukuda, Shigeki Nanjo, Shinji Takeuchi,  
Tadaaki Yamada, Ryohei Katayama, Kengo  
Takeuchi, Hiroshi Nishihara, Seiji Yano.

HDAC inhibition overcomes crizotinib-resistance by inducing mesenchymal-epithelial reverting transition (MERT) via mR-200c up-regulation in EML4-ALK lung cancer cells.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

福田 康二 (Koji, Fukuda)  
金沢大学・がん進展制御研究所・腫瘍内科・  
特任助手  
研究者番号：10722548

### (2)研究分担者

竹内 伸司 (Shinji, Takeuchi)  
金沢大学・がん進展制御研究所・腫瘍内科・  
助教  
研究者番号：90565384

矢野 聖二 (Seiji Yano)  
金沢大学・がん進展制御研究所・腫瘍内科・  
教授  
研究者番号：30294672