

令和元年6月7日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07164

研究課題名(和文) 上皮間葉移行状態に基づいたKRAS変異肺癌に対する治療開発

研究課題名(英文) Development of target therapy against KRAS mutant lung cancer stratified by EMT status.

研究代表者

衣斐 寛倫 (EBI, Hiromichi)

愛知県がんセンター(研究所)・がん標的治療TR分野・分野長

研究者番号：00645145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：KRASの下流タンパクであるMEKの阻害薬は、上流の受容体を活性化するため治療効果を発揮できない。KRAS変異肺癌を上皮間葉移行状態(EMT)に基づき2種類に分類し、活性化される受容体が、上皮系の性質を示す腫瘍ではERBB3、間葉系の性質を示す腫瘍ではFGFR1であることを明らかにした。それぞれの受容体に対する阻害薬とMEK阻害薬の併用について検討し、マウスゼノグラフトモデルおよび患者検体由来ゼノグラフトモデルにおいて有効性を示した。さらにEMTの状態に関わらずMEK阻害薬と併用効果を示す治療標的を探索し、受容体とKRASの間に位置するアダプタータンパクであるSHP2を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題を通し、KRAS変異肺癌が上皮間葉移行状態により2種類に分類されることを初めて示した。さらに、それぞれのKRAS変異肺癌に優位に発現している受容体をMEKとともに阻害することにより、KRAS変異肺癌を治療できる可能性を示した。MEK阻害薬単剤では治療効果が不十分であることがこれまでの臨床試験の結果明らかとなっており、本研究は今後の臨床開発の方向性を示すとともに、KRAS変異肺癌に対し個別化医療を行える可能性を示している。本研究の成果は米国癌学会雑誌(Cancer Discovery)に掲載された。

研究成果の概要(英文)：Whereas the mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a well-known effector pathway of KRAS, blocking this pathway with clinically-available MAPK inhibitors is relatively ineffective. We identified that epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) rewires the expression of receptor tyrosine kinases, leading to differential feedback activation of the MAPK pathway following MEK inhibition. In epithelial-like KRAS mutant lung cancers, this feedback was attributed to ERBB3. In contrast, in mesenchymal-like KRAS mutant lung cancers, FGFR1 was dominantly expressed but suppressed by the negative regulator sprouty proteins; MEK inhibition led to de-repression of SPRY4 and subsequent FGFR1-mediated re-activation of MEK. Therapeutically, the combination of MEK inhibitor and FGFR inhibitor induced cell death in vitro and tumor regressions in vivo. We established the rationale and a therapeutic approach to treat KRAS mutant lung cancers effectively.

研究分野：腫瘍内科学、標的治療開発

キーワード：KRAS EMT feedback MEK

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肺がんは年間7万人の死亡者数を認め、部位別がん死亡の第一位である。本邦においては、組織型では腺がんが50%を占め、このうちKRAS 遺伝子変異を10%で認める。KRAS 遺伝子変異は肺がんのみならず、大腸がん、膵臓がんにも高頻度に認められ、がんにおいて最も多い遺伝子変異である。しかしながらKRAS タンパクの活性を直接阻害する薬剤の開発は困難とされ、現在のところ有効な治療法が同定されていないことから、KRAS 変異腫瘍において生存に重要なタンパクを阻害し治療に結びつける試みがなされている。

MAPK シグナルは変異KRASの主要下流シグナルの一つである。このためMAPKを抑制するMEK阻害薬の臨床試験が行われたが、奏効率は10%前後であり十分な効果を示すことができなかった。一方、2014年にオランダのグループは、MEK阻害剤と細胞表面受容体であるERBB3の阻害がKRAS変異肺がんにおいて有効であることを示し(Sun C et al. Cell Reports 2014)、臨床試験を開始した。このように、MEK阻害薬と併用効果を示す標的を同定することにより、KRAS変異腫瘍に対する新たな治療法を提示することができる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、KRAS変異肺がんにおいて、MEK阻害薬と併用効果を示す薬剤の同定、有効性の確認、有効性予測に必要なバイオマーカーの同定を行うことが目的である。

MEK阻害薬とERBB3の阻害がKRAS変異肺がんにおいて有効であることが示されているが、KRAS変異腫瘍の中にはERBB3を発現していない腫瘍も存在する。従って、ERBB3を発現していないKRAS変異肺がんにおいてMEK阻害薬と最も併用効果を示す薬剤を同定することが必要である。また、KRAS変異肺がんの分子生物学的背景を解析することにより、MEK阻害薬と併用する薬剤を適切に選択する方法（バイオマーカー）を同定することを目指す。

3. 研究の方法

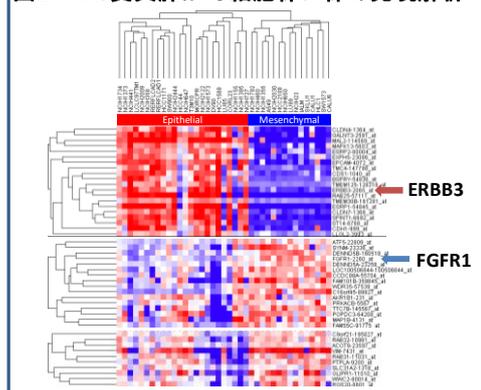
- (1) KRAS変異肺がんにおいてMEK阻害薬と併用効果を示す薬剤について、ウエスタンブロット法、MTTアッセイ法、shRNAスクリーニング法を用い同定する。
- (2) 併用効果のメカニズムについて、マイクロアレイ法、RNAi法を用いて検討する。
- (3) in vitroで同定されたKRAS変異肺がんに対する治療法について、がん細胞由来xenograftおよび患者由来xenograftを用いて検討する。
- (4) 効果を予測するバイオマーカーについて、バイオインフォマティクス的手法と、免疫染色を用いて同定、検証する。

4. 研究成果

- (1) KRAS変異肺がんは上皮間葉移行状態により2種類に分類される

KRAS変異肺がんの分子生物学的多様性を検討するため、37種類のKRAS変異肺がん細胞株についてバイオインフォマティクス的手法を用い発現解析を行った。この結果、ERBB3の発現は上皮間葉移行状態と関係しており、ERBB3が上皮系腫瘍で発現している結果を得た(図1)。間葉系腫瘍は一般に抗がん薬抵抗性であることが知られているが、発現解析により間葉系腫瘍ではERBB3の発現が消失しているのに対しFGFR1が高発現している結果を得た。上皮系マーカーであるE-Cadherin発現陽性の肺がん細胞株に上皮間葉移行を誘導させたところ、間葉系マーカーであるvimentinの発現誘導に加え、ERBB3の発現低下とFGFR1の発現誘導が認められ発現解析の結果と一致していた(図2)

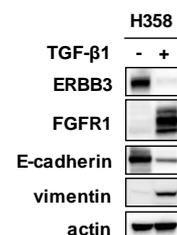
図1. KRAS変異肺がん細胞株37株の発現解析



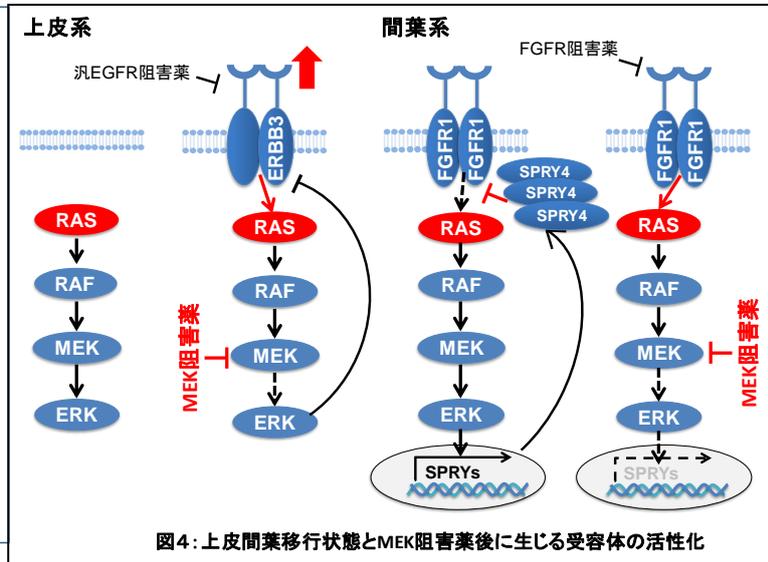
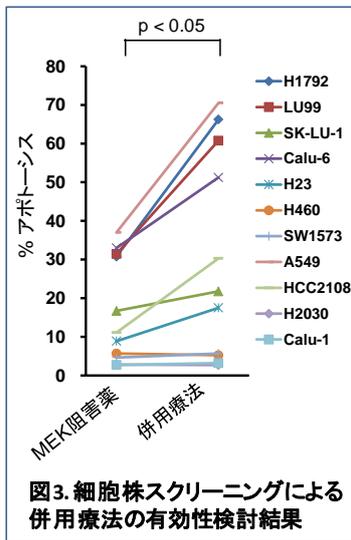
- (2) 間葉系の性質を示すKRAS変異肺がん細胞株に対し、FGFR阻害薬とMEK阻害薬の併用療法が有効である

間葉系腫瘍ではFGFR1が重要な働きを担っていることが考えられたため、FGFR1阻害薬の有効性を見た。間葉系の性質を有するKRAS変異細胞株を用い検討を行ったが、FGFR1の阻害のみでは細胞増殖に影響を与えなかったのに対し、MEK阻害薬とFGFR阻害薬の併用は、11細胞株中7細胞株において、アポトーシスの誘導を認めた(図3)。

図2. 上皮間葉移行によりFGFR1の発現が誘導される

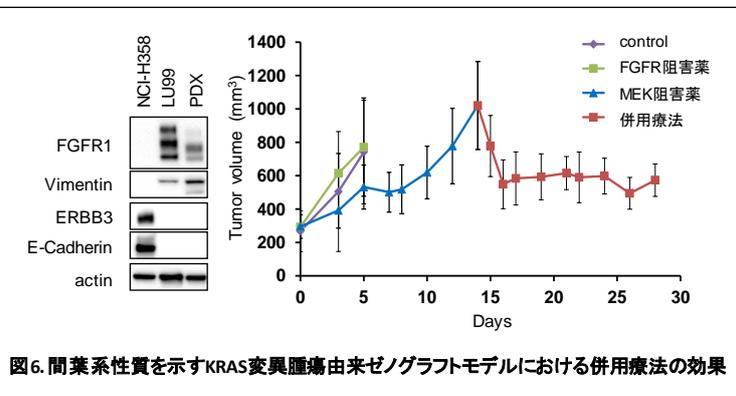
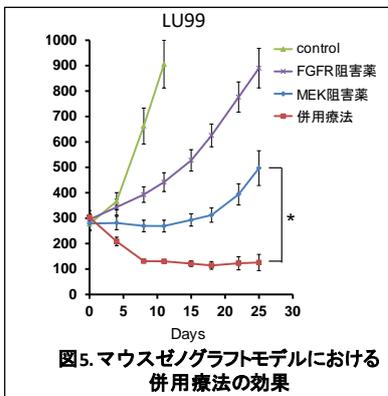


- (3) ERBB3およびFGFR1の阻害はMEK阻害薬投与後に誘導される受容体のフィードバック活性化を抑制する。



MEK 阻害薬と汎 EGFR 阻害薬や FGFR 阻害薬が併用効果を認めるメカニズムについて検討を行った。MEK 阻害薬投与後の MAPK シグナルの活性化状態を、MEK の下流に位置する ERK タンパクのリン酸化状態をウエスタンブロット法により経時的に観察すると、MAPK シグナルは一時的に遮断されるが 24 時間後には再活性化していることが分かった。ERBB3 および FGFR1 は MAPK シグナルの再活性化に関与しており、MEK に加えそれぞれの受容体を抑制することで、MAPK シグナルの完全な遮断が維持されることが判明した。間葉系腫瘍において、FGFR シグナルは定常状態では抑制されているが、MEK 阻害により FGFR シグナルの活性を抑制する SPRY 4 タンパクの発現が減少し、FGFR1 からのシグナルが下流に伝達されるようになることで、MAPK シグナルの再活性化を行うことが、SPRY4 の発現抑制および過剰発現を用いた解析により明らかとなった (図 4)。

(4) 上皮間葉移行状態に基づく MEK 阻害薬と汎 EGFR 阻害薬・FGFR 阻害薬の併用療法はマウスゼノグラフトモデルおよび患者検体由来ゼノグラフトモデルにおいても有効である。



in vitro で得られた結果を *in vivo* で評価するため、間葉系 KRAS 変異細胞株 LU99 を用いマウスゼノグラフトモデルを作成した。このゼノグラフトモデルにおいて MEK 阻害薬は腫瘍の増殖を抑制するのみであったが、FGFR 阻害薬との併用により腫瘍の縮小を認めた (図 5)。一方、細胞株が単クローン性であるのに対し、患者腫瘍は複数のクローンの集合体であり、不均一性が存在する。特に本研究は上皮間葉移行を指標に治療選択を行うことを目標とすることから、実際上皮型と間葉型細胞の混在するモデルにおいて本研究課題が提唱する治療戦略の妥当性を評価することが必須であると考えられた。そこで、間葉系マーカー陽性の KRAS 変異肺癌患者由来ゼノグラフトモデルを用い、FGFR 阻害薬と MEK 阻害薬の併用療法について評価を行ったところ、MEK 阻害薬単剤では腫瘍の縮小を認めなかったのに対し MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用療法では腫瘍の縮小を認めることが確認された (図 6)。

(5) アダプタータンパク SHP2 の阻害は上皮間葉移行状態に関わらず MEK 阻害薬との併用効果を示す

腫瘍の不均一性を考慮すると、上皮間葉移行状態に関わらず MEK 阻害薬と併用効果のある薬剤を探索することも重要と考えられた。このため、受容体から変異 KRAS に伝達されるシグナルを遮断することで、活性化される受容体に関わらず MAPK シグナルの再活性化を回避することのできる標的分子を探索し、アダプタータンパクである SHP2 を同定した。Knockdown またはアロ

ステリック阻害薬による SHP2 の抑制は MEK 阻害薬により誘導される MAPK シグナルのフィードバック機構を抑制し、細胞増殖についても抑制した。上皮型、間葉型の KRAS 変異肺がん細胞株をマウスに移植しゼノグラフト腫瘍を SHP2 阻害薬と MEK 阻害薬の併用療法により治療したところ腫瘍の縮小を認め、薬力学的検討においても、ERK リン酸化の抑制が確認された。これらから、MEK 阻害薬投与後に活性化される受容体からのシグナルを伝達する SHP2 を抑制することで、活性化される受容体の種類に関わらずフィードバック機構を制御できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Saad MI, [Ebi H](#) et al. (25 人中 19 番目) ADAM17 selectively activates the IL - 6 trans - signaling/ERK MAPK axis in KRAS - addicted lung cancer. *EMBO Molecular Medicine* 2019 4:pii: e9976. doi: 10.15252/emmm.201809976 査読あり
- ② Song KA, [Ebi H](#) et al. (22 人中 21 番目、corresponding author) Increased Synthesis of MCL-1 Protein Underlies Initial Survival of EGFR-Mutant Lung Cancer to EGFR Inhibitors and Provides a Novel Drug Target. *Clinical Cancer Research* 2018 24:5658-5672. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0304. 査読あり
- ③ Kotani H, [Ebi H](#) et al. (10 人中 10 番目) Distinct dependencies on receptor tyrosine kinases in the regulation of MAPK signaling between BRAF V600E and non-V600E mutant lung cancers. *Oncogene* 2018 37:1775-87. doi: 10.1038/s41388-017-0035-9. 査読あり
- ④ Yamazaki K, [Ebi H](#) et al. (11 人中 6 番目). Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: Molecular Testing for Colorectal Cancer Treatment, Third Edition. *Cancer Science* 2018 109:2074-2079. doi: 10.1111/cas.13617. 査読あり
- ⑤ [衣斐寛倫](#) RAS/MAPK 系に対する治療開発と課題 *実験医学* 36:2530-2534, 2018. 査読無
- ⑥ [衣斐寛倫](#) KRAS 遺伝子変異肺がんに対する分子標的治療 *最新医学* 73:983-988, 2018 査読無
- ⑦ Adachi Y, [Ebi H](#) et al (9 人中 9 番目). Resistance mediated by alternative receptor tyrosine kinases in FGFR1-amplified lung cancer. *Carcinogenesis*. 2017 38:1063-1072. doi: 10.1093/carcin/bgx091 査読あり
- ⑧ Yoshino T, [Ebi H](#) et al (26 人中 19 番目) Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer; A JSMO - ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Annals of Oncology* 2017 29:44-70. doi: 10.1093/annonc/mdx738. 査読あり
- ⑨ Song KA, [Ebi H](#), et al (30 人中 28 番目). Epithelial-to-mesenchymal transition antagonizes response to targeted therapies in lung cancer by suppressing BIM. *Clin Cancer Res*. 2017 24:197-208. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1577. 査読あり
- ⑩ Soh SX, [Ebi H](#), et al (29 人中 11 人目). A systematic review and meta-analysis of individual patient data on the impact of the BIM deletion polymorphism on treatment outcomes in epidermal growth factor receptor mutant lung cancer. *Oncotarget* 2017 8:41474-41486. doi: 10.18632/oncotarget.17102. 査読あり
- ⑪ Kitai H, [Ebi H](#). Key roles of EMT for adaptive resistance to MEK inhibitor in KRAS mutant lung cancer. *Small GTPases*. 2017 8:172-176. doi: 10.1080/21541248.2016.1210369. 査読あり
- ⑫ Kitai H*, [Ebi H*](#) et al. (10 人中 1 番目) Epithelial-to-mesenchymal transition defines feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. *Cancer Discov*. 2016, 6:754-69. (Corresponding Author) 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

1. [Hiromichi Ebi](#), Overcome Resistance by Regulating Feedback Signaling Pathway、口頭、名古屋国際癌治療シンポジウム、2019/2/10、国内
2. [衣斐寛倫](#)、MEK 阻害薬に対する耐性機序、口頭、日本肺癌学会学術総会、2018/11/30、国内
3. [Hiromichi Ebi](#)、Intrinsic and acquired resistance to tumors aberrant MAPK signaling、口頭、第 77 回日本癌学会学術総会、2018/9/29、国内
4. [Hiromichi Ebi](#)、Combination Therapies Targeting KRAS Mutant Lung Cancer. 口頭 The 6th JCA-AACR Special Joint Conference 2018/7/11、国内
5. [衣斐寛倫](#) 小谷浩、足立雄太、矢野聖二 BRAF 変異腫瘍におけるシグナル伝達系の違いを利用した新規治療戦略。第 76 回日本癌学会学術総会 English Oral Session (E16-1) 2017 年 9 月 横浜
6. [衣斐寛倫](#)、MAPK 変異腫瘍における分子標的治療薬耐性の解明と新規治療開発、第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会 シンポジウム 2 分子標的治療薬および分子標的療法耐性の克服への挑戦 2017 年 6 月、国内
7. [衣斐寛倫](#)、Feedback mechanism as a cause of resistance and therapeutic targets in

- molecular targeted therapy). 口頭、第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 インターナショナルシンポジウム 10 Resistance of cancer molecular targeted drug and new insights of overcoming therapy 2016 年 7 月、国内
8. 衣斐寛倫、Targeting RAS/RAF mutant cancers: Regulation of MAPK signaling is the key 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 口頭、インターナショナルシンポジウム 18 Future direction of treatment for RAS/RAF-driven cancers 2016 年 7 月、国内
 9. 衣斐寛倫、EMT defines feedback activation of RTK signaling included by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. 口頭、第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月、国内
 10. 北井秀典、衣斐寛倫、小谷浩、足立雄太、富田秀太、大泉聡史、西村正治、矢野聖二. 上皮間葉移行に基づいた KRAS 変異肺癌に対する MEK 阻害薬の新規治療戦略, 口頭, 第 57 回日本肺癌学会学術集会シンポジウム 2016 年 12 月, 国内
 11. Hiromichi Ebi、Combinatorial Approach Targeting KRAS Mutant Lung Cancers、口頭、Kanazawa University /Duke-NUS Joint Cancer Symposium 2016 年 2 月、国外

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

①名称：間葉系 K R A S 変異型がん治療剤
発明者：衣斐寛倫、矢野聖二、北井秀典
権利者：国立大学法人金沢大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/083921
出願年：2016 年
国内外の別： 国外

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。