

# EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性肺癌細胞に対する microRNA-7 発現プラスミドのリポソームを用いた導入による克服の検討

頼 冠名<sup>a\*</sup>, 瀧川奈義夫<sup>a</sup>, 伊藤佐智夫<sup>b</sup>, 柏原宏美<sup>a</sup>, 市原英基<sup>a</sup>, 保田立二<sup>c</sup>, 清水憲二<sup>b</sup>, 谷本光音<sup>a</sup>, 木浦勝行<sup>a</sup>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 <sup>a</sup>血液・腫瘍・呼吸器内科学, <sup>b</sup>分子遺伝学, <sup>c</sup>細胞化学

キーワード: microRNA7, EGFR, oncogene addiction, lung cancer, liposome

## Liposomal delivery of microRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in lung cancer cells

Kammei Rai<sup>a\*</sup>, Nagio Takigawa<sup>a</sup>, Sachio Ito<sup>b</sup>, Hiromi Kashihara<sup>a</sup>, Eiki Ichihara<sup>a</sup>, Tatsuji Yasuda<sup>c</sup>, Kenji Shimizu<sup>b</sup>, Mitsune Tanimoto<sup>a</sup>, Katsuyuki Kiura<sup>a</sup>

Departments of <sup>a</sup>Hematology, Oncology and Respiratory Medicine, <sup>b</sup>Molecular Genetics, <sup>c</sup>Cell Chemistry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

### はじめに

上皮成長因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は EGFR 活性化変異を有する肺癌に劇的な効果を認める<sup>1)</sup>。これは、EGFR-TKI が EGR 活性化変異による “oncogene addiction” をブロックすることによって考えられており<sup>2,3)</sup>、遺伝子改変マウスでもこれは証明されている<sup>4-6)</sup>。しかし、癌細胞は結局 EGFR-TKI に耐性をきたしてしまう。そのような獲得耐性の約50%に二次変異である T790M が関与している<sup>7)</sup>。こ

の耐性を克服するため、我々は EGFR mRNA の 3'-UTR の数カ所を標的とする microRNA-7 (miR-7) による EGFR の抑制に着目し、EGFR-TKI に耐性をきたした後も、EGFR 経路の抑制が可能であれば腫瘍増殖抑制効果があると仮説を立て、*in vitro* および *in vivo* における miR-7 のリポソームによる導入の治療応用可能性について検討した<sup>8)</sup>。

### microRNA-7 発現プラスミドの作製とその発現評価

現状で EGFR を抑制しうる microRNA を *in silico* で推定し<sup>9)</sup>、最も有望であった microRNA-7 を発現しうる前駆体として pre-miR-7-2 を肺癌細胞株 DNA から切り出し、これを pSilencer 4.1CMV neo に挿入した。生体に親和性の高い liposome<sup>10)</sup> によるトランスフェクションにより、EGFR oncogene addiction 下にあ

平成24年9月受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7227 FAX: 086-232-8226

E-mail: rai@okayama3.hosp.go.jp

プロフィール



頼 冠名

昭和51年生まれ

平成13年3月31日 岡山大学医学部医学科卒業

平成13年4月1日 岡山大学 血液腫瘍呼吸器内科 研修医

平成13年6月1日 高知県立中央病院 内科 研修医

平成15年6月1日 岡山大学 血液腫瘍呼吸器内科 医員 (同総合診療内科, 救急部)

平成17年10月1日 国立病院機構岡山医療センター 呼吸器科 レジデント

平成20年4月1日 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生

平成23年6月1日 カリフォルニア工科大学 研究員

る肺腺癌細胞株のうち、EGFR-TKIに耐性を来したRPC-9, H1975において、定量PCR法によって発現量を評価したところ、いずれもコントロールに比べ30倍ほどであり、効率的な発現を得られると考えられた(図1)。

### 肺癌細胞株における microRNA-7 による増殖抑制効果および蛋白解析による機能解析

EGFR-TKIが有効であり、臨床上代表的なEGFR変異を来しているPC-9 (exon 19 EGFR delE746-750) およびH3255 (exon 21 L858R), それぞれに加えて二次変異 (exon 20 T790M) を獲得しているためにEGFR-TKIに耐性を来したと確認されているH1975, RPC-9<sup>11)</sup>を選択し、これらにmicroRNA-7を高発現させたところ、増殖抑制効果を来した。また、興味深いことに、蛋白解析において予測されたEGFRの抑制のほかに、IRS-1, RAF-1の同時抑制が認められた。のちの報告においてこれらの蛋白にはmicroRNA-7の標的となる配列を所持していることが明らかになった。対照的にEGFRの下流の蛋白であるK-RASに変異を来したA549においては<sup>12)</sup>、有効性を示さず、これはEGFRとは独立したK-RAS以下のシグナル伝達活性化によるものと考えられた(図2)。

### In vivo における microRNA-7 の抗腫瘍効果および蛋白解析による機能解析

7週齢のメスのヌードマウス背部に癌細胞  $2 \times 10^6$  個を皮下注射した。1週間後長径約5mmほどの腫瘍を形成したマウスを無作為に2群に分け、プラスミドを *in vivo* 用に最適化された陽イオンリポソームで被覆し腫瘍に直接注射した。腫瘍が消失するか20日目まで腫瘍を計測した。驚くべきことに、weeklyの投与のみでRPC-9のxenograftモデルにおいては60%に腫瘍の完全消失を認め、その効果は明らかであった。また、H1975のxenograftモデルにおいても抗腫瘍効果は有意に認められた(図3)。

### おわりに

この報告はmiR-7がEGFR-TKIに耐性な肺癌xenograftモデルで劇的な効果を認めることを初めて示したものである。EGFRシグナルをT790M変異の有無にかかわらず抑制することは、EGFR-TKIの耐性の約50%を占める原因を克服する可能性があるという意味で大きな臨床的意義を持つ。miR-7の標的蛋白にはEGFR, IRS-1, RAF-1があると示されており<sup>13)</sup>、いずれも活性化EGFR経路において重要な役割を果たしており、miR-7が複数標的をもつことは、EGFRの

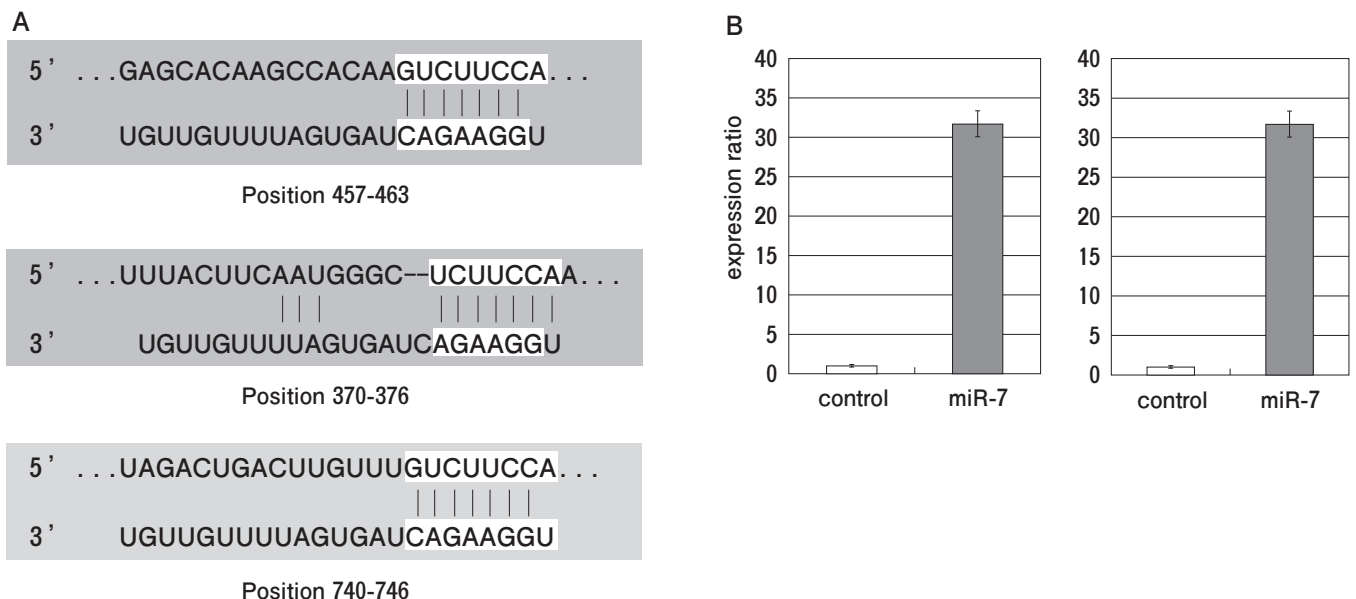


図1 miR-7の選定とLiposomal deliveryによるmiR-7発現効率の評価  
A: *In silico*でEGFR 3'-UTRに対し3カ所のseed matchの存在が示されている (<http://www.targetscan.org/>より)。B: 国産のliposomeによりmiR-7有効な発現効率を得られている。

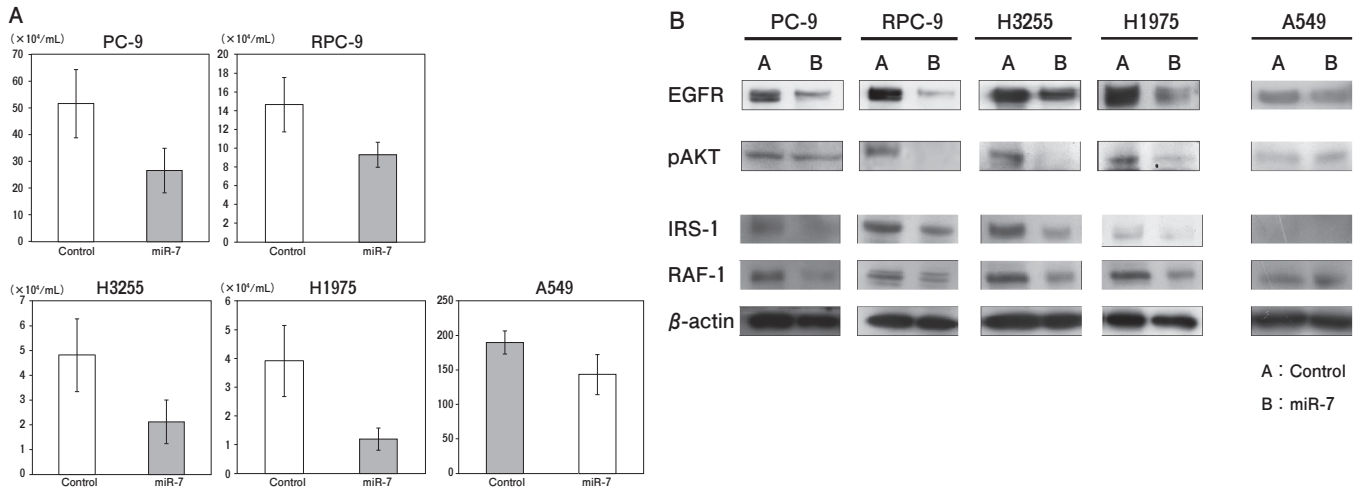


図2 *In vitro* における miR-7 の効果とその機能解析

A: Oncogene addiction 下にある PC-9, H3255, さらに T790M を来したのちの RPC-9, H1975 すべてにおいて有意に増殖抑制を認めている。それに対し下流の *K-RAS* が活性化されている A549 に対しては有意な有効性を示さなかった。B: Western blot では予測された EGFR の抑制およびその下流にある AKT のリン酸化抑制とともに、IRS-1, RAF-1 の抑制も認められた。それに対し A549 では EGFR の抑制を認めるものの、AKT のリン酸化の抑制や、RAF-1 の抑制を認めていない。

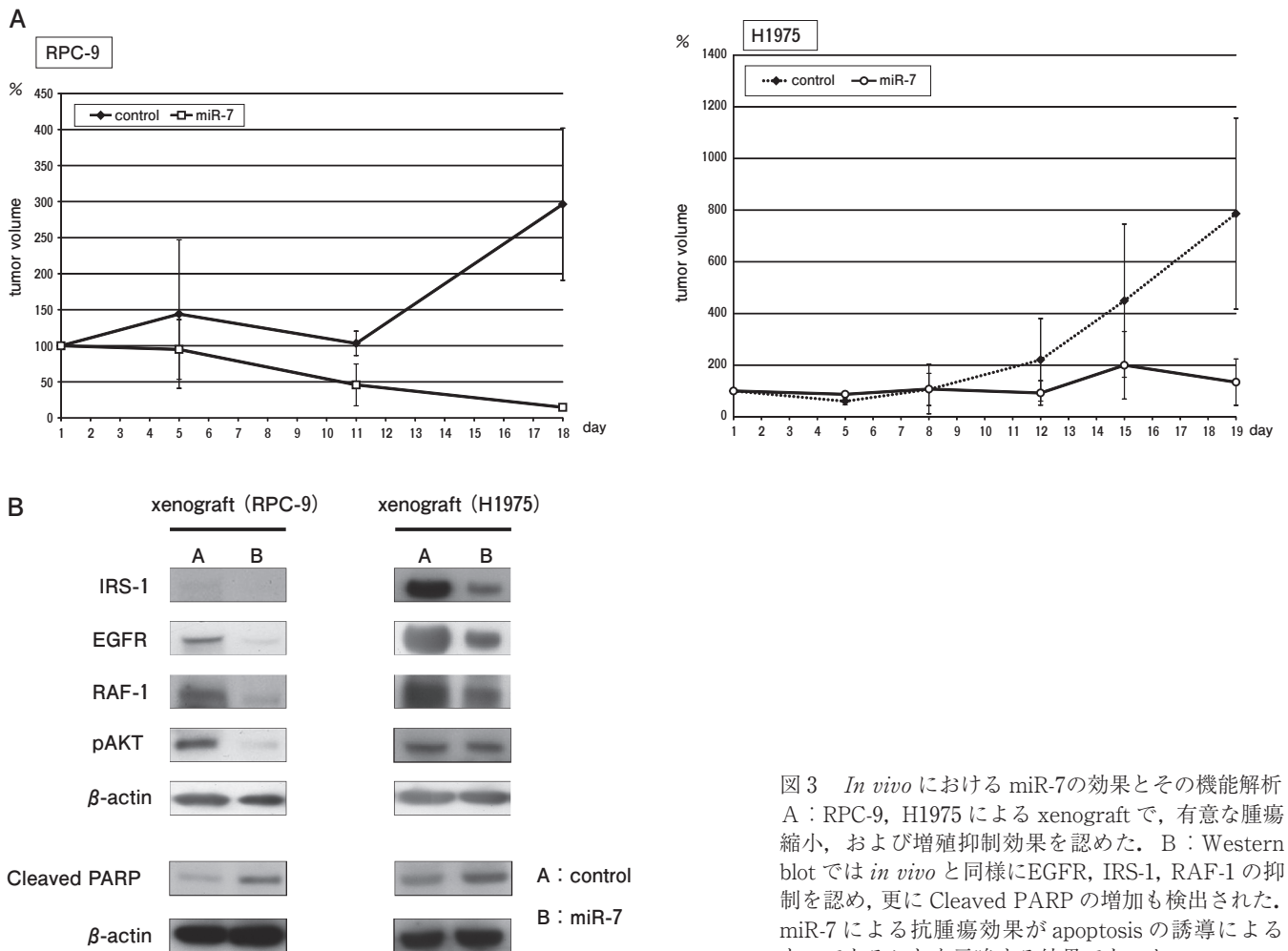


図3 *In vivo* における miR-7 の効果とその機能解析  
A: RPC-9, H1975 による xenograft で、有意な腫瘍縮小、および増殖抑制効果を認めた。B: Western blot では *in vivo* と同様に EGFR, IRS-1, RAF-1 の抑制を認め、更に Cleaved PARP の増加も検出された。miR-7 による抗腫瘍効果が apoptosis の誘導によるものであることを示唆する結果であった。

シグナル経路とのクロストークを抑制するうえで有利であると考えられる。A549はmiR-7により増殖抑制がかかることが報告されているが、*K-RAS*経路の活性化によりシグナル伝達が維持されることが考えられ、事実本研究ではEGFRの抑制が認められるにもかかわらずA549に対するmiR-7の増殖抑制効果は有意なものとはならなかった。対照的に、EGFR addiction下にある細胞株ではT790M変異の有無にかかわらずmiR-7は増殖を抑制した。EGFR addictionを来している細胞のmiR-7の発現量は来していないA549よりも多いため、miR-7はEGFRによってpositive feedbackを受けている可能性はある<sup>8)</sup>。しかし、miR-7を外側から導入し過剰発現させた状況下では、*in vitro*および*in vivo*共にEGFR addictionを来している細胞の増殖を抑制し、アポトーシスがmiR-7の複数の標的蛋白の抑制によって回復していることを示した。miR-7と腫瘍との関連を調べる際には、miR-7が複数のEGFR関連の標的蛋白を持つため、EGFR addictionの評価は非常に重要であると考えられる。T790M変異を生じていてもEGFR addictionは保持されており、そのためEGFR-TKIに耐性を来してもmiR-7の抗腫瘍効果は明瞭に現れたといえる。

miR-7発現プラスミドの陽イオンリポソームによる導入は、EGFR-TKIへの耐性を克服する治療法として可能性があり、またEGFR addictionを来した腫瘍において二次変異により耐性を来した場合、RNAからの新しいアプローチ法として有望である。

## 文 献

- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, et al. : West Japan Oncology Group : Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405) : an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2010) 11, 121-128.
- Haber DA, Bell DW, Sordella R, Kwak EL, Godin-Heymann N, Sharma SV, Lynch TJ, Settleman J : Molecular targeted therapy of lung cancer : EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2005) 70, 419-426.
- Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J : Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* (2004) 305, 1163-1167.
- Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE : Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* (2006) 20, 1496-1510.
- Ohashi K, Rai K, Fujiwara Y, Osawa M, Hirano S, Takata K, Kondo E, Yoshino T, Takata M, Tanimoto M, Kiura K : Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated EGFR driven by the SP-C promoter. *Cancer Sci* (2008) 99, 1747-1753.
- Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, Mahmood U, Mitchell A, Sun Y, Al-Hashem R, Chirieac LR, Padera R, et al. : The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and *in vivo* sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* (2006) 9, 485-495.
- Toyooka S, Kiura K, Mitsudomi T : EGFR mutation and response of lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* (2005) 352, 2136 ; author reply 2136.
- Rai K, Takigawa N, Ito S, Kashiwara H, Ichihara E, Yasuda T, Shimizu K, Tanimoto M, Kiura K : Liposomal Delivery of MicroRNA-7-Expressing Plasmid Overcomes Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistance in Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* (2011) 10, 1720-1727.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP : Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* (2005) 120, 15-20.
- Kikuchi A, Aoki Y, Sugaya S, Serikawa T, Takakuwa K, Tanaka K, Suzuki N, Kikuchi H : Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. *Hum Gene Ther* (1999) 10, 947-955.
- Ogino A, Kitao H, Hirano S, Uchida A, Ishiai M, Kozuki T, Takigawa N, Takata M, Kiura K, Tanimoto M : Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* (2007) 67, 7807-7814.
- Valenzuela DM, Groffen J : Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. *Nucleic Acids Res* (1986) 14, 843-852.
- Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ : Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem* (2009) 284, 5731-5741.