

枝 園 和 彦

Kazuhiko Shien



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

臨床遺伝子医療学，呼吸器・乳腺内分泌外科学

Departments of Clinical Genomic Medicine / Thoracic, Breast and Endocrinological Surgery,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

プロフィール

昭和53年生まれ

平成18年3月 香川大学医学部医学科卒業

平成18年4月 三豊総合病院 初期臨床研修医

平成20年4月 岡山大学病院 腫瘍・胸部外科 医員

平成20年7月 四国がんセンター 外科 レジデント

平成22年4月 岡山大学病院 呼吸器・乳腺内分泌外科 医員

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科入学

平成22年10月 水島中央病院 外科（～平成23年3月）

平成25年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科早期修了

平成25年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床遺伝子医療学 助教

平成26年4月 日本学術振興会海外特別研究員（米国テキサス大学 MD アンダーソンがんセンター）

現在に至る

受賞対象論文

Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, Hashida S, Maki Y, Ichihara E, Asano H, Tsukuda K, Takigawa N, Kiura K, Gazdar AF, Lam WL, Miyoshi S: Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res* (2013) 73, 3051-3061.

研究の背景と経緯

肺癌は，先進国の癌死の第一位を占める予後不良の疾患である。治療切除不能な進行期に発見された肺癌に対しては，化学療法や放射線療法を含む集学的治療が行われる。しかし，多くの肺癌は従来の抗癌化学療法では根治が困難で，遺伝子異常をはじめとする分子生物学的病因に基づく新しい治療法の開発が求められてきた。2004年，一部の肺癌にヒト上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子の活性型変異が生じていることが報告され，この遺伝子変異を有する肺癌に対してEGFR チロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）であるゲフィチニブあるいはエルロチニブが極めて高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった¹⁻³⁾。同様の現象は，微小管会合タンパク質の一種であるEML4と未分化リンパ腫リン酸化酵素（ALK）の融合型癌遺伝子EML4-ALK陽性肺癌においてもみられ，これらにはALK阻害剤が高い効果を示すことが明らかとなっている⁴⁾。しかし，これらEGFR-TKIやALK阻害剤などの分子標的薬は，投与中に薬剤の効果がなくなる薬剤耐性化をほぼ全例できたことが大きな問題となっ

ている。したがって，この薬剤耐性化機序の解明と，それに基づく新しい治療法の確立が急がれてきた。

EGFR-TKI耐性化機序としては，EGFR遺伝子の二次変異であるT790M変異による薬剤感受性低下（約50%）や，MET遺伝子増幅の獲得によるバイパス経路の活性化（5～10%）が報告されているが，その他不明な点も多く，完全には解明されていない^{5,6)}。筆者を含むグループはこれまで，肺癌における薬剤耐性化機序の解明およびその克服に関する基礎研究，および臨床検体を用いた研究を行ってきた。その過程で，肺癌に対する殺細胞性抗癌剤および放射線治療に対する抵抗性の原因として，他の癌種で癌幹細胞関連マーカーとされているいくつかの分子が関連していることを報告した⁷⁾。癌幹細胞は，自己複製能・多分化能を備え，臨床的には薬剤および放射線治療に耐性を示すことが知られており，癌の治療における治療抵抗性の原因となっている可能性が考えられている。一方で，分子標的薬，特にEGFR-TKI耐性化と癌幹細胞の関連については不明な点が多かった。これらの現状および過去の自らの知見を踏まえ，われわれはEGFR-TKI耐性獲得モデルの確立とその機序解明に関する研究を行った。

研究成果の内容

1. EGFR-TKI 獲得耐性株の樹立と耐性化機序の解明

はじめに、肺癌細胞株を用いて EGFR-TKI 耐性獲得モデルを確立した(図)。まず、EGFR 遺伝子に活性型変異を持つ肺腺癌細胞株 (HCC827, HCC4006, HCC4011および PC-9) に対して、EGFR-TKI である Gefitinib を超低濃度から曝露し、徐々に高濃度に順応させて薬剤耐性細胞株を作成した (step-wise 法)。この方法により、従来の報告通り EGFR T790M 変異耐性株や MET 遺伝子増幅耐性株が樹立できた。一方で、より生体内に近い条件を再現するため、薬剤曝露開始時から生体内に近い濃度の Gefitinib を投与して 6~15 か月間培養する方法 (high-dose 法) でも耐性細胞株作成に成功した。これらの耐性細胞株を比較したところ、同一の親株から作成された耐性細胞株においても、薬剤投与条件の違いによって耐性化の機序が異なることが分かった。例えば、肺腺癌細胞株である PC-9 では、step-wise 法により EGFR T790M 変異を

もつ薬剤耐性細胞が出現したが、high-dose 法で樹立された耐性細胞株にはこの変異は認められなかった。また、HCC827 では、step-wise 法により MET 遺伝子増幅を持つ薬剤耐性細胞が出現したが、high-dose 法では認めず、さらに high-dose 法で樹立された耐性細胞の一部において、親株で見られた EGFR 活性型変異および EGFR 遺伝子増幅が消失していた。これらは新しい知見であり、細胞培養の条件が耐性化の機序に影響を及ぼす可能性を強く示唆していた。

2. 薬剤耐性における癌幹細胞様細胞の関与の解明

次に、申請者らが樹立した EGFR-TKI 耐性細胞株を詳細に検討した。特に肺腺癌細胞株 HCC827 から high-dose 法で樹立した耐性細胞株の分子生物学的特徴を、遺伝子変化、蛋白発現およびシグナル活性化経路変化等の観点から網羅的に解析した。耐性化前の親株との比較においては、messenger RNA (mRNA) 発現アレイで *E-cadherin* をはじめとした上皮系マーカーの発現低下と、*Vimentin*, *ZEB1* および *ZEB2* 等の間葉系マーカーの発現上昇といった上皮間葉移行 (EMT) 様

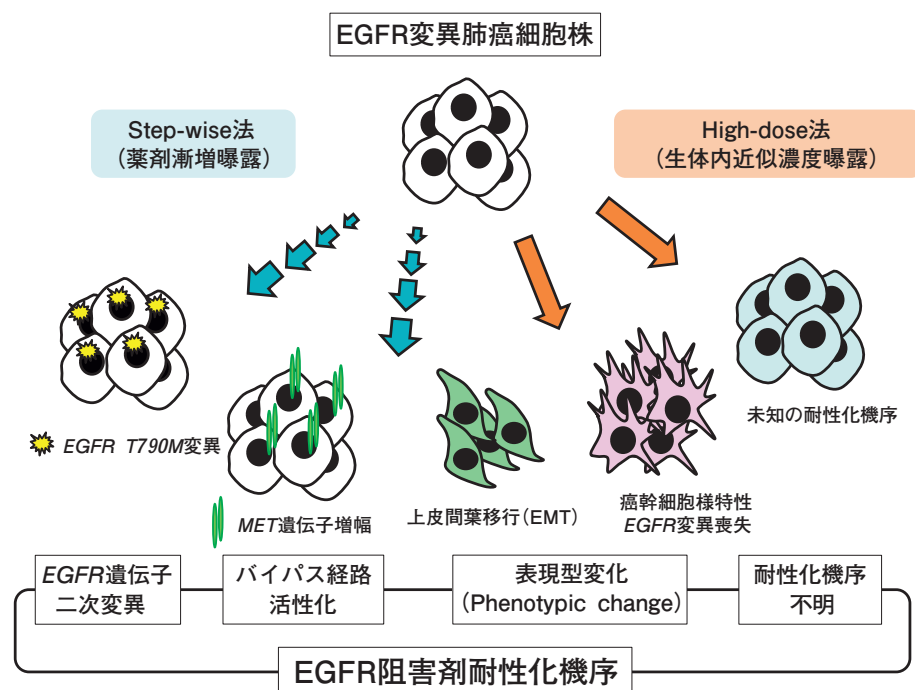


図 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤耐性獲得モデル

EGFR 活性型変異を有する肺癌細胞株に異なる条件で EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を曝露し、薬剤耐性細胞株を樹立した後、耐性化機序を解析した。薬剤を超低濃度から徐々に増加して耐性株を樹立する step-wise 法では、EGFR T790M 二次変異や MET 遺伝子増幅によるバイパス経路の活性化、上皮間葉移行 (EMT) の特徴を有する耐性細胞株を認めた。一方で、薬剤をはじめから生体内近似濃度で曝露する high-dose 法では、これらの変異を有するものの他に、癌幹細胞様特性を示す耐性細胞や EGFR 活性型変異遺伝子を喪失し EGFR 遺伝子野生型となった耐性細胞が出現した。また、上記の耐性化機序をいずれも認めない耐性化機序不明の耐性細胞も出現しており、薬剤曝露条件の違いによって薬剤耐性化機序が変化することが明らかになった。

の変化を認めた。同時に、申請者らが以前から肺癌における幹細胞マーカー候補として注目していた *ALDH1A1* や *CD44* の発現上昇を認めた。さらに、多剤耐性薬剤排出ポンプ (ABC transporter) の一種である *ABCB1* や *ABCG2* の過剰発現を認めた。エピジェネティクス異常の観点からの解析では、EMT および癌幹細胞特性に関与する micro RNA-200 family (miR-200s) のメチル化による発現低下を認めた。耐性細胞株の癌幹細胞様特性をさらに確認する為、side-population (SP) アッセイおよび sphere-formation アッセイを行い、耐性化後の SP 分画の増加および sphere 形成能の獲得を認めた。また、マウスへの異種移植モデルにおいても、耐性化後の腫瘍形成能の上昇を確認した。

以上の知見より、細胞実験レベルにおける EGFR-TKI 耐性獲得過程での癌幹細胞様細胞の関与が明らかとなった。次に、実際の臨床検体におけるこれらの関与を証明する為、*EGFR* 遺伝子変異を持つ肺癌患者のうち、EGFR-TKI による治療を受けた後に薬剤耐性となった臨床検体16例を収集し検討した。その結果、これまでに報告がある *MET* 遺伝子増幅 (3 例) や *EGFR T790M* 変異 (2 例) の他に、EMT の関与が考えられる症例を認め、さらにこれらの症例のうち2例において、耐性化後に *ALDH1A1* の発現増加を認め、臨床検体でも EGFR-TKI 耐性獲得と癌幹細胞様特性の関係が示唆された。

3. EGFR-TKI 耐性化後に有効な治療薬剤の検索

以上の検討により、薬剤曝露条件の操作による EGFR-TKI 耐性化細胞モデルを確立し、癌幹細胞様特性を持つ細胞株を樹立した。これらの耐性化細胞株に対して、様々な薬剤の感受性検査を行った。Step-wise 法で樹立した *EGFR T790M* 変異株や *MET* 遺伝子増幅株では、親株と同様に殺細胞性の抗癌剤であるタキサン系薬剤が有効であったが、high-dose 法で樹立した細胞株の多くはこれらが無効であった。その理由として、これらの抗癌剤が ABC transporter により排出されている可能性が考えられた。一方で、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤やプロテアソーム阻害剤等の一部の薬剤は、high-dose 法による耐性化後も耐性化前と同等の抗腫瘍効果を示した。

研究成果の意義および今後の展開

本研究により、非小細胞肺癌に対する分子標的薬耐性において、癌幹細胞様特性が関与している可能性が示唆された。また、既に臨床でも使用可能な一部の薬剤が、これらの癌幹細胞様特性を示す耐性化細胞に対しても有効であることが明らかとなり、臨床的に EGFR-TKI 耐性となった症例への使用の可能性を示した。一方で、EGFR-TKI 耐性に miR-200s の変化が関与していることも明らかにしており、今後の治療標的としての可能性を示唆する所見と考えられた。

肺癌が予後不良であることの大きな原因となっている薬剤耐性に関して、耐性化機序の解明および耐性を克服する新しい治療法の開発は、われわれが早急に取り組むべき課題と考えている。今後われわれの確立した薬剤耐性獲得モデルをさらに応用することが、EGFR-TKI に限らず多くの薬剤の耐性化機序の解明に役立つと考えている。癌はその病態が極めて多様で、明確なエビデンスに基づく個別の治療戦略を迅速に決定することが臨床的に不可欠である。本研究から得られる薬剤耐性化機序の解明と耐性克服を通した臨床に応用可能な成果は、肺癌の個別化治療のさらなる発展をもたらすことが期待される。

文 献

- 1) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, et al. : Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* (2004) 350, 2129-2139.
- 2) Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, et al. : EGFR mutations in lung cancer : correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* (2004) 304, 1497-1500.
- 3) Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, et al. : EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101, 13306-13311.
- 4) Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, et al. : Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell

- lung cancer. *Nature* (2007) 448, 561-566.
- 5) Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H : Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* (2005) 2, e73.
- 6) Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, et al. : MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* (2007) 316, 1039-1043.
- 7) Shien K, Toyooka S, Ichimura K, Soh J, Furukawa M, Maki Y, Muraoka T, Tanaka N, Ueno T, Asano H, Tsukuda K, Yamane M, et al. : Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Lung Cancer* (2012) 77, 162-167.

平成26年 8 月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1
電話 : 086-235-7436 FAX : 086-235-7437
E-mail : kshien@mdanderson.org