

生体内における *EGFR* T790M 遺伝子変異を持つ肺腺癌細胞に対するバンデタニブの効果

市原 英基*, 大橋 圭明, 瀧川 奈義夫, 大澤 昌宏, 荻野 敦子, 谷本 光音, 木浦 勝行

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 血液・腫瘍・呼吸器内科学

キーワード：バンデタニブ, VEGFR, EGFR, T790M 遺伝子変異, 肺腺癌

Effects of vandetanib on lung adenocarcinoma cells harboring epidermal growth factor receptor T790M mutation *in vivo*

Eiki Ichihara*, Kadoaki Ohashi, Nagio Takigawa, Masahiro Osawa, Atsuko Ogino, Mitsune Tanimoto, Katsuyuki Kiura

Department of Hematology, Oncology and Respiratory Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

緒 言

選択的な上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) チロシンリン酸化酵素阻害薬 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブ (gefitinib) やエルロチニブ (erlotinib) は活性化 *EGFR* 遺伝子変異 (exon19 欠失変異, exon21 L858R 点突然変異など) を持つ肺非小細胞癌に著効する¹⁻³⁾。しかし, その殆どの症例で再増悪をきたす現象 (獲得耐性) が知られており臨床問題となっている⁴⁾。獲得耐性の主な原因として, *EGFR* 遺伝子変異 (exon20 T790M 点突然変異) の獲得⁵⁻⁸⁾・*MET* 遺伝子増幅⁹⁻¹¹⁾ などがあるが, T790M 遺伝子変異による獲得耐性が最も多く, 原因の約50%を占めている。T790M 遺伝子変異が出現した

EGFR は EGFR-TKI による阻害効果が減弱することが知られており, この T790M 遺伝子変異による薬剤耐性を克服することが現在の活性化 *EGFR* 遺伝子変異陽性肺非小細胞癌診療における大きな課題である。

近年, EGFR と並び注目されている分子標的として血管内皮成長因子受容体 (vascular endothelial growth factor receptor: VEGFR) があり, VEGFR は腫瘍内血管新生に重要な役割を果たしている。進行肺非小細胞癌を対象とした無作為化比較第Ⅲ相試験において, VEGFR-2 (以下 VEGFR) のリガンドである VEGF-A (以下 VEGF) の阻害薬ベバシズマブ (bevacizumab) と EGFR-TKI であるエルロチニブと併用すると, エルロチニブ単剤に比べ有意に無増悪期間を延長することが示された¹²⁾。このことから, EGFR と VEGFR の同時阻害が治療戦略上有効であると考えられる。

今回我々は, EGFR-TKI の一種で, 同時に VEGFR 阻害作用も併せ持つ小分子化合物バンデタニブ (vandetanib) を用い, バンデタニブがゲフィチニブ, エルロチニブと同様に T790M 遺伝子変異を生じるか

平成23年1月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7226 FAX：086-232-8226

E-mail：ichih-e@md.okayama-u.ac.jp

プロフィール



市原 英基

昭和51年7月20日生

平成13年3月 岡山大学医学部卒業

平成22年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

平成13年5月 岡山大学医学部附属病院第二内科 医員 (研修医)

平成13年6月 神戸市立中央市民病院内科 研修医

平成15年6月 神戸市立西市民病院呼吸器内科 専攻医

平成17年6月 岡山大学医学部・歯学部附属病院血液腫瘍・呼吸器内科 医員

平成21年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科緩和医療学講座 助教

現在に至る

どうか、また T790M 遺伝子変異はバンデタニブに対しても薬剤耐性を示すかどうかについて検証を行った。

材料・方法

1. 検証した細胞株

PC-9 は肺腺癌より樹立された細胞株であり、EGFR の exon 19 欠失変異 del E746-A750 を有し EGFR-TKI に対し高い感受性を示す。RPC-9 は PC-9 に EGFR-TKI の一種であるゲフィチニブを長期暴露することで樹立された細胞株で、T790M 遺伝子変異を有し EGFR-TKI に対して強い耐性を示す。H1975 は、EGFR exon 21 L858R 点突然変異と T790M 遺伝子変異の両方を有し、EGFR-TKI に対して強い薬剤耐性を示す。

2. 細胞株の薬剤感受性

各薬剤における細胞増殖抑制効果を MTT アッセイ法により検証した。

3. 免疫プロット法

細胞株、あるいは腫瘍組織を粉碎後、RIPA バッファーにて溶出し、遠心分離にて蛋白を抽出した。SDS-PAGE ゲルにて泳動分離を行い、ニトロセルロース膜へ転写後に特異抗体で免疫した。total および phosphotyrosinated EGFR, HER2, HER3, VEGFR, MET, IGF-1R, Akt, MAPK などの特異抗体を使用した。

4. 定量 PCR

MET 遺伝子増幅の有無について定量 PCR を施行した。GAPDH の発現との相対比較解析を行った。

5. マウスの飼育

岡山大学動物資源部門のガイドラインを遵守し、マウス管理を行った。

6. マウス皮下腫瘍モデルの作製

生体内モデルとして皮下腫瘍モデルを使用した。8 週齢の BALB/c ノードマウスに各細胞株 2.0×10^6 を

皮下注射し、1 週間後、皮下腫瘍が形成されたことを確認した後に各薬剤の投与を行った。週に 2 回腫瘍体積を計測することで薬剤の効果判定を行った。腫瘍体積の計測は「腫瘍体積 = 長径 \times 短径² / 2」の近似式を用いた。また、治療終了後、皮下腫瘍を摘出し免疫プロット法および免疫蛍光検査にて検討した。

結果

1. *in vitro* におけるバンデタニブ耐性細胞株 PC-9/VanR の樹立

PC-9 にバンデタニブを 3 ヶ月間暴露することで細胞株 PC-9/VanR を樹立した。MTT assay によるバンデタニブの感受性は PC-9 および PC-9/VanR の IC₅₀ でそれぞれ 0.091 μ mol/L, 4.6 μ mol/L であった (表 1)。また、ゲフィチニブではそれぞれ 0.059 μ mol/L, 8.2 μ mol/L であった。PC-9/VanR はバンデタニブ及びゲフィチニブに対して *in vitro* における耐性を獲得していた (表 1)。

2. バンデタニブは PC-9/VanR における EGFR およびその下流シグナルを抑制できなかった

EGFR は ErbB family の一種であり、免疫プロット法で各種 ErbB family の発現およびリン酸化を検討したが PC-9 と PC-9/VanR において違いは認めなかった (図 1 A)。また、バンデタニブを負荷し EGFR およびその下流のシグナル (Akt, MAPK) の変化を検討したが、PC-9/VanR では EGFR および下流シグナルは抑制されなかった (図 1 B)。

3. PC-9/VanR において EGFR T790M 遺伝子変異および MET 遺伝子増幅が認められた

ダイレクトシーケンス法を用いて EGFR の遺伝子配列を調べたところ PC-9/VanR において exon 20 ACG が ATG へと変異する T790M 遺伝子変異が確認された (図 2 A)。次にゲノム DNA を用いて MET 遺

表 1 各薬剤に対する PC-9, PC-9/VanR の 50% 抑制濃度

	IC ₅₀ (μ mol/L)			
	vandetanib	gefitinib	CL387, 785	SU11274
PC-9	0.091 \pm 0.027	0.059 \pm 0.045	1.6 \pm 0.79	> 10
PC-9/VanR	4.6 \pm 0.28	8.2 \pm 2.0	0.72 \pm 0.51	> 10
RR	50	138	0.45	

IC₅₀, 50% 抑制濃度, RR, 相対耐性度
*, $P < 0.05$ (*t*-test)

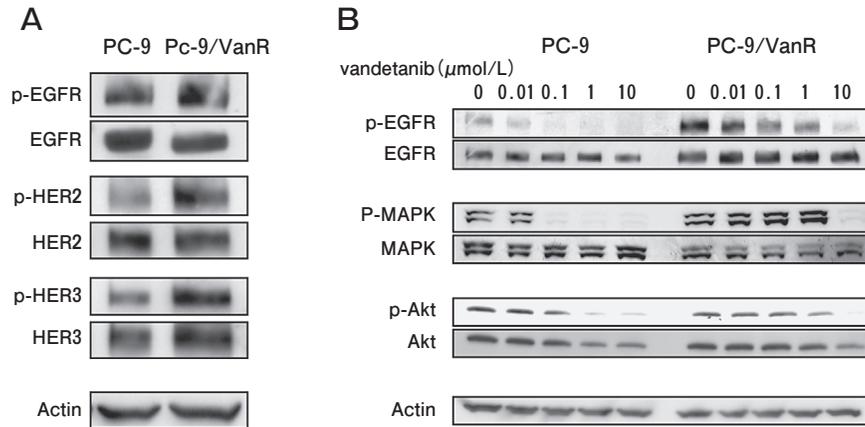


図1 PC-9, PC-9/VanR における細胞内シグナルの比較

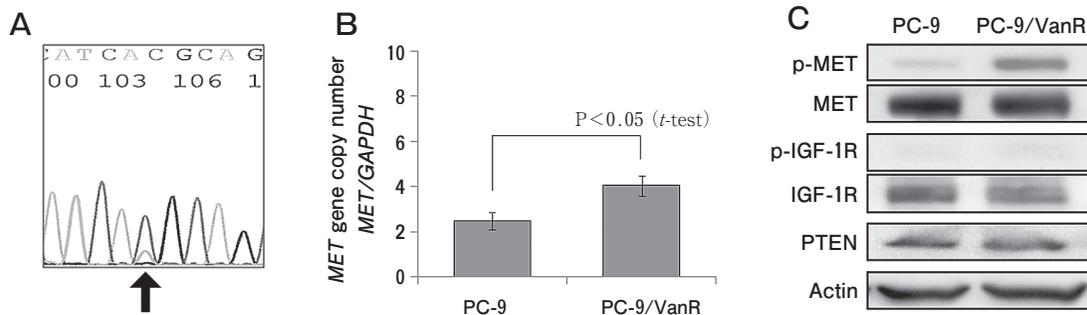


図2 バンデタニブ耐性機序の検討

伝子の定量 PCR を施行したところ、PC-9/VanR で *MET* 遺伝子増幅を認めていた (図 2 B)。また、免疫ブロット法で PC-9/VanR の *MET* 受容体の発現およびリン酸化が増加していた (図 2 C)。以上より、*EGFR* T790M 遺伝子変異、*MET* 遺伝子増幅のどちらも、PC-9/VanR のバンデタニブ耐性メカニズムになり得ると考えられた。

4. *MET* 遺伝子増幅はバンデタニブ耐性のメカニズムではなかった

次に PC-9/VanR の CL387, 785 (T790M 遺伝子変異を有する *EGFR* を抑制可能な選択的 *EGFR*-TKI) および SU11274 (*MET* 受容体阻害薬) に対する薬剤感受性を調べた。PC-9/VanR は CL387, 785 に感受性を示したが SU11274 には感受性を示さなかった (図 3 A, 表 1)。また、PC-9/VanR では *EGFR* 活性が抑制されると *MET* 受容体の活性も抑制されていた (図 3 B)。これらの結果から、PC-9/VanR はその生存・増殖を *EGFR* シグナルに依存していると考えられ、

MET 遺伝子増幅はバンデタニブ耐性メカニズムとは考えられなかった。その他の *EGFR*-TKI 耐性のメカニズムとして *IGF*-1R 活性化や *PTEN* 欠損などの報告もあるが、今回の検討ではいずれも認められなかった (図 2 C)。また、バンデタニブ負荷による PC-9 と PC-9/VanR の *VEGFR* 抑制効果に違いは認めなかった (図 3 C)。

以上より、PC-9/VanR の *in vitro* におけるバンデタニブ耐性のメカニズムは *EGFR* T790M 遺伝子変異であると考えられた。

5. *in vivo* (異種移植モデル) における T790M 遺伝子変異陽性腫瘍に対するバンデタニブの効果

続いて異種移植 (マウス皮下ヒト腫瘍移植) モデルを用いて *in vivo* におけるバンデタニブの効果を検証した。バンデタニブもしくはゲフィチニブを 25mg/kg, 週 5 回, 経口投与とした。PC-9 皮下腫瘍では、バンデタニブ、ゲフィチニブの両薬剤とも著明に腫瘍を縮小した (図 4 A 左上)。さらにバンデタニブは PC-9/

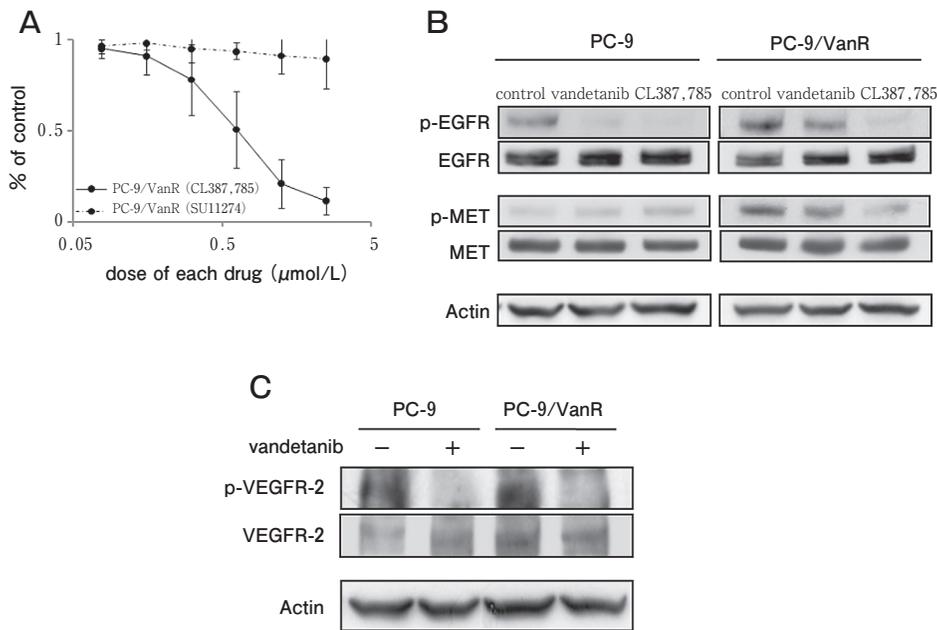


図3 T790M 遺伝子変異以外の耐性機序の可能性の検討

VanR 皮下腫瘍においても腫瘍増大を有意に抑制しており *in vitro* での結果と対照的であった (図 4 A 左下). バンデタニブは, さらに 2 種類の *EGFR* T790M 遺伝子を有する皮下腫瘍 (RPC-9, H1975) の腫瘍増大も有意に抑制していた (図 4 A 右上・右下).

次に, 薬剤投与を 4 週間行った後の PC-9/VanR 皮下腫瘍組織を用いて免疫プロット法および蛍光免疫染色法を行った. 免疫プロット法ではバンデタニブ投与群において pVEGFR が抑制されていた (図 5 B 上段). また, *in vitro* ではバンデタニブ, ゲフィチニブともに PC-9/VanR の pEGFR を抑制できなかったのに対し (図 4 B 中段), 皮下腫瘍においてバンデタニブは pEGFR を抑制していた (図 4 B 上段). 免疫蛍光染色法ではバンデタニブ治療群のみで CD31 陽性細胞が著明に少なく, 腫瘍内血管新生が阻害されていた (図 4 C). 以上より, バンデタニブが T790M 遺伝子変異を有す腫瘍に有効であったのは VEGFR 抑制による血管新生阻害作用によると推定された. これを検証するためにゲフィチニブに抗 VEGF 抗体であるベバシズマブを併用して PC-9/VanR 皮下腫瘍モデルに投与を行った. ゲフィチニブとベバシズマブ併用療法では, それぞれの単剤療法と比較し有意に腫瘍の増大を抑制することが示された (図 4 D).

考 察

EGFR, VEGFR を同時に阻害する多分子標的阻害薬であるバンデタニブは, 選択的 EGFR-TKI であるゲフィチニブやエルロチニブと同様に, *EGFR* T790M 遺伝子変異を誘導することが示された. しかしながら, 皮下腫瘍モデルにおいては *EGFR* T790M 遺伝子変異を有する腫瘍の抑制効果が認められた.

近年, 固形腫瘍の治療において抗血管新生阻害による治療効果が注目されており, 抗 VEGF 抗体であるベバシズマブは, 多くの固形腫瘍に対して既存の抗癌剤との併用で上乘せ効果が示されている¹³⁻¹⁶. そのメカニズムとして, VEGFR シグナル阻害により腫瘍内血管を正常化し腫瘍内圧が低下することで抗癌剤の腫瘍内到達度が高まると考えられている¹⁷. 今回の研究においても, バンデタニブの VEGFR 阻害作用により腫瘍内への薬剤移行性が高まり, より強力に EGFR 抑制することで, *EGFR* T790M 遺伝子変異を有する肺癌皮下腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を示したと考えられた.

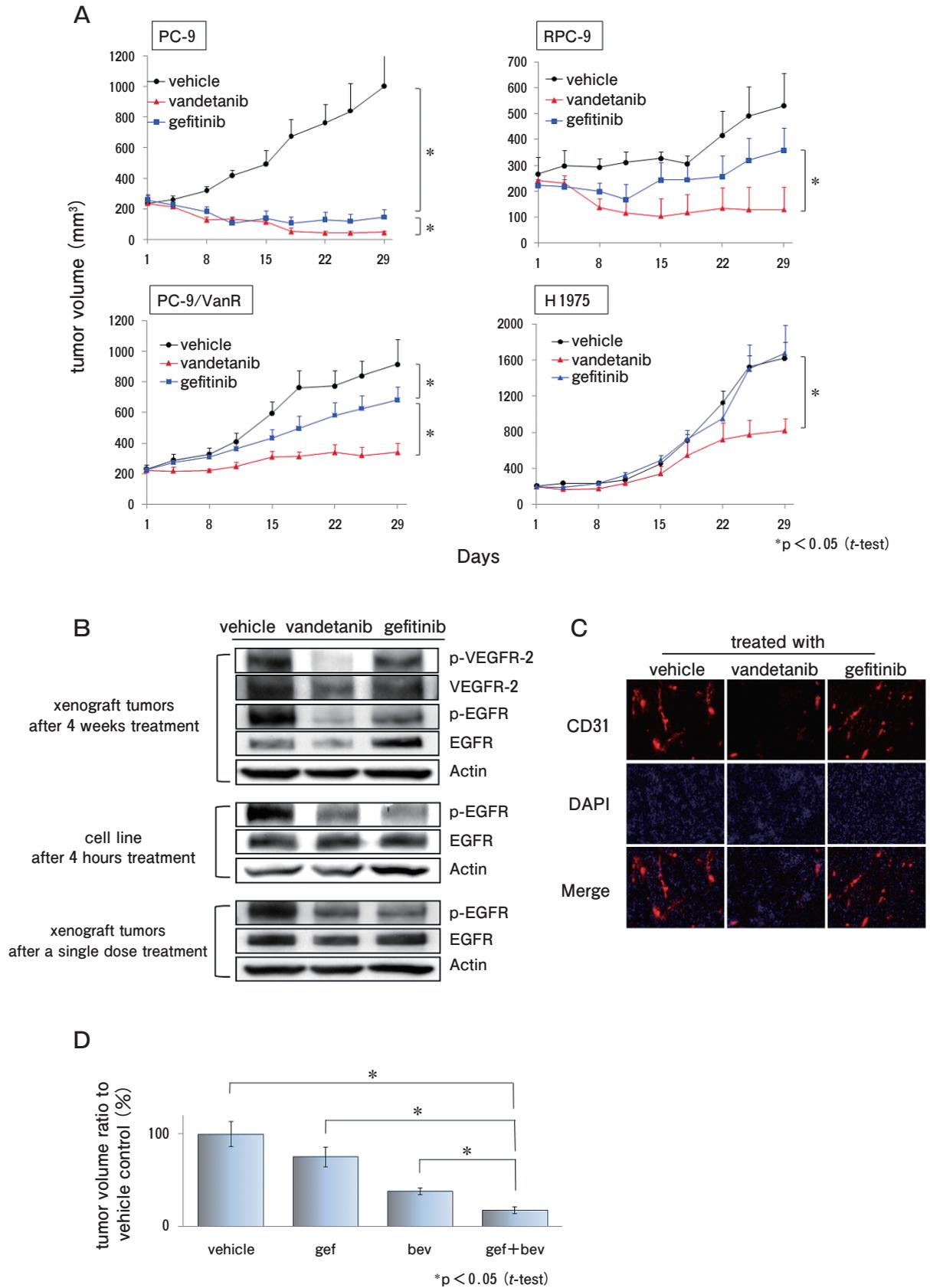


図 4 異種移植モデル

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 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 smoker and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101, 13306-13311.
- 4) Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T, Maemondo M, Kimura Y, Morikawa N, Watanabe H, Saijo Y, Nukiwa T : Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Clin Oncol* (2006) 24, 3340-3346.
- 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) Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B : EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* (2005) 352, 786-792.
- 7) 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.
- 8) Bean J, Riely GJ, Balak M, Marks JL, Ladanyi M, Miller VA, Pao W : Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* (2008) 14, 7519-7525.
- 9) 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.
- 10) Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE, Gibbs JB, Pan BS : Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on MET for growth and survival. *Cancer Res* (2007) 67, 2081-2088.
- 11) Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, et al. : MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104, 20932-20937.
- 12) Herbst RS, O'Neill VJ, Fehrenbacher L, Belani CP, Bonomi PD, Hart L, Melnyk O, Ramies D, Lin M, Sandler A : Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* (2007) 25, 4743-4750.
- 13) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, et al. : Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* (2004) 350, 2335-2342.
- 14) Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH : Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* (2006) 355, 2542-2550.
- 15) Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, et al. : Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma : a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* (2007) 370, 2103-2111.
- 16) Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE : Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* (2007) 357, 2666-2676.
- 17) Jain RK : Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* (2005) 307, 58-62.