

Title	網羅的遺伝子解析手法を用いたゲフィチニブ耐性化の機序の解明
Sub Title	Investigation of the mechanism of gefitinib resistance by comprehensive genetic analysis
Author	寺井, 秀樹(Terai, Hideki)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
Abstract	<p>EGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌細胞はEGFR-TKIに対して高度感受性を示すが、長期間の同薬剤への曝露で耐性獲得が生じることが知られている。その機序の約30%程度は依然不明である。我々はEGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌細胞株(PC9)に対してEGFR-TKIの一種であるゲフィチニブを低濃度から漸増して長期間曝露することで、耐性細胞株を樹立した。次にその耐性細胞株と従来の感受性細胞株より採取したRNAを用いてcDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、肺癌細胞におけるEGFR-TKIへの耐性獲得の新たな機序としてFGF2-FGFR1経路の活性化の関与が示唆された。</p> <p>Almost all patients with non-small cell lung cancer who harbor an epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation initially respond well to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) eventually experience relapse. In this study, we have established a gefitinib-resistant cell line model by long-term exposure to gefitinib. We used originally gefitinib-sensitive lung cancer cell lines, namely PC9 and HCC827. We found that the expressions of both FGFR1 and FGF2 were increased in PC9 gefitinib-resistant (PC9 GR) cells compared to those in PC9 naïve (PC9 na) cells. We found that proliferation of the PC9 GR cells was dependent on FGF2-FGFR1 pathway. Inhibition of either FGF2 or FGFR1 by siRNA or FGFR inhibitor (PD173074) restored the gefitinib sensitivity in PC9 GR cells. We propose FGF2-FGFR1 activation through autocrine loop is a novel mechanism of acquiring resistance to EGFR-TKIs and that this loop be targeted to overcome acquired resistance to EGFR-TKIs in a subset of NSCLC patients.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2013 課題番号：24790822 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24790822seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790822

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析手法を用いたゲフィチニブ耐性化の機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of gefitinib resistance by comprehensive genetic analysis

研究代表者

寺井 秀樹 (Terai, Hideki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50445293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌細胞はEGFR-TKIに対して高度感受性を示すが、長期間の同薬剤への曝露で耐性獲得が生じることが知られている。その機序の約30%程度は依然不明である。我々はEGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌細胞株(PC9)に対してEGFR-TKIの一種であるゲフィチニブを低濃度から漸増して長期間曝露することで、耐性細胞株を樹立した。次にその耐性細胞株と従来の感受性細胞株より採取したRNAを用いてcDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、肺癌細胞におけるEGFR-TKIへの耐性獲得の新たな機序としてFGF2-FGFR1経路の活性化の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Almost all patients with non-small cell lung cancer who harbor an epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation initially respond well to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) eventually experience relapse. In this study, we have established a gefitinib-resistant cell line model by long-term exposure to gefitinib. We used originally gefitinib-sensitive lung cancer cell lines, namely PC9 and HC C827. We found that the expressions of both FGFR1 and FGF2 were increased in PC9 gefitinib-resistant (PC9 GR) cells compared to those in PC9 naïve (PC9 na) cells. We found that proliferation of the PC9 GR cells was dependent on FGF2-FGFR1 pathway. Inhibition of either FGF2 or FGFR1 by siRNA or FGFR inhibitor (PD 173074) restored the gefitinib sensitivity in PC9 GR cells. We propose FGF2-FGFR1 activation through autocrine loop is a novel mechanism of acquiring resistance to EGFR-TKIs and that this loop be targeted to overcome acquired resistance to EGFR-TKIs in a subset of NSCLC patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：EGFR-TKI 肺癌 薬剤耐性 イレッサ ゲフィチニブ

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物は日本人の死因の第1位であり、中でも肺癌は全癌死のなかで、第1位を占める。さらに肺癌は、各種の癌の中でも特に予後が不良であることが知られている。肺癌は多くの患者が外科的切除不可能な臨床病期 期以上に進んだ状況で診断されるため、効果の高い化学療法の開発やより化学療法を有効にする治療前効果予測法の開発が望まれている。そのような背景において従来の抗癌剤(殺細胞性抗癌剤)が細胞障害を狙うのに対し、近年開発されている分子標的治療薬では、多くが異常増殖に関わる分子を特異的に阻害し、正常細胞に対する副作用がより少なく効果をあげている。肺癌においてはチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)であるゲフィチニブが開発され、上皮成長因子受容体(EGFR)変異遺伝子を持つ癌細胞がゲフィチニブに高度感受性を示すことが報告された。このEGFR変異遺伝子を治療前に検索することで、化学療法の効果を予測し、有効な治療法を選択するという、オーダーメイドな治療が可能となってきている。しかし、臨床において当初有効であったゲフィチニブが、投与中に無効になる症例が経験されEGFRの耐性二次変異が生じていることが報告されたが、耐性化する症例全てにおいてこの耐性変異が認められるわけではない。これまでの報告では、ゲフィチニブ耐性化はその約7-8割が、EGFRのT790Mの2次変異やc-METのamplificationによって起こるとされ、少なくとも残りの2-3割あるいはそれ以上については明らかになっておらず、その耐性機序の解明は大きな課題である。これまでもc-METの活性化が見いだされたようにチロシンキナーゼの活性化を網羅的に解析したり、遺伝子の発現を解析したものはあるが、エピジェネティックな変化の関与を検討した報告は少ない。

先日、EGFR-TKIを多量に投与した際に生存が可能な細胞群において、エピジェネティクスの変化が認められたと報告されたが、この報告における耐性は一時的なものであり、恒久的な耐性化においてエピジェネティクスの関与があるか否かについては不明である。唯一、PTENのメチル化やヒストン修飾による発現低下と耐性化の関与が報告されているに留まっている。また、エピジェネティクスの変化と遺伝子変化を同時に比較検討することで新たな耐性化のメカニズムについても模索していく。

既に我々は、ゲフィチニブの少量長期継続投与により耐性化したHCC827、PC9(いずれも従来はゲフィチニブ感受性の肺癌細胞株)を作成した。メチル化を解除する5-AZA-dCは耐性化に影響を及ぼさなかった。しかし、耐性株から作成したクローン株(PC9gr1及びPC9gr3)はHDAC阻害薬であるTSAを加えることで耐性化が一部解除されることを確認した。筆者らが作成した耐性細胞株は、長期

少量暴露により得られたものであること、EGFR-TKIの暴露を長期間中止しても耐性化は解除されないこと、他の抗腫瘍効果のある薬剤に対しては耐性化していないこと、TSAに対する感受性がそれ程高くないことから、最近報告された耐性株とは明らかに異なっており、30nMのTSA曝露により耐性化が一部解除されること(2010年呼吸器学会で報告)から同様にエピジェネティクスの関与が示唆されるものの、耐性化機構は異なると推測される。そこで本研究においてはその耐性化機構を明らかにし、新たな治療標的を見出すことを目的として、エピジェネティクスの関与に注目して解析をすすめた。

2. 研究の目的

我々は、本研究においてEGFR-TKIの耐性化のメカニズムをエピジェネティクスを含めて解析する。EGFR-TKI継続曝露によって得られたEGFR-TKI耐性肺癌細胞株を作成し、その耐性化の前後における遺伝子発現とエピジェネティクスの変化を網羅的に解析することにより、新たな耐性化機構を明らかにするとともに新たな治療標的を探索する。

3. 研究の方法

EGFR-TKIの投与前後でのエピジェネティクスの変化を網羅的に解析するために、PC9ゲフィチニブ感受性株(PC9-naïve:PC9NA)、耐性株(PC9-Gefitinib resistance:PC9GR)、耐性株から作成したクローン株(PC9gr1及びPC9gr3)、長期継代株(PC9-LAST:PC9LA)から採取したRNA・DNAを用いてAgilent microarrayでのmRNAの網羅的解析及びInfiniumを用いたDNAメチル化の網羅的解析を行った。その結果、EGFR-TKIの耐性化に関連した2つの新たなメカニズムを推測している。1つ目は、mRNAの発現変化とDNAメチル化の変化を組み合わせた解析から得られた「DNAメチル化に伴う遺伝子発現変化のEGFR-TKIの耐性化への関与」であり、2つ目は、耐性株と感受性株でのmRNAの発現の差から推測される「FGF2-FGFR1のautocrineによるEGFR-TKI耐性化」である。

DNAメチル化に関しては、これまでの解析により得られた候補遺伝子について、それぞれをsiRNAによりknock downした際のゲフィチニブに対する感受性の変化ならびに増殖・腫瘍形成への影響を同様に評価し、耐性株と感受性株で比較を行った。

その上で、ゲフィチニブの感受性に変化を与えることが確認された遺伝子に関しては、他の肺癌細胞株での発現を評価したり、他のゲフィチニブ耐性株において遺伝子導入を行うなどしてさらにその遺伝子の影響について評価する。

FGFR1-FGF2のautocrineに関しては、FGFR1、FGF2のsiRNAによるknock downによりゲフィチニブ耐性が解除されることが確認された。FGFR3をsiRNAによりknock downした場

合には感受性に变化がみられなかった。

他の肺癌細胞株 (HCC827) を用いて耐性株を作成したのにも関わらず、同様なメカニズムが認められないか実験を行ったが、PD173074 による耐性解除が推測されたが、siRNA による FGF2、FGFR1 の knock down に関しては、一定した結果は得られなかった。また、T790M や C-MET の amplification といった既存の耐性化メカニズムを有する細胞株に対する PD173074 や FGFR1 の knock down の効果を確認したが、こちらに関しては耐性化への影響を認めなかった。

FGFR1 を knock down した際の FGFR1 下流のシグナルと EGFR との関与についてウエスタンブロットを用いた解析を施行。また、FGF2-FGFR1 の経路をおさえた際の、EGFR-TKI 添加後のシグナルに関するウエスタンブロット解析においては、ERK のリン酸化が PD173074 を加えることで抑制されることが確認された。興味深いことに AKT のリン酸化に関しては抑制されず、ERK の経路に特異的にシグナルが関与している可能性が示唆された。

また、耐性細胞株にゲフィチニブのみでなく PD173074 を同時に加えることで多くのアポトーシスが誘導されることを FACS を用いた解析及び PARP 及び CI-PARP の発現を解析することで確認した。

耐性細胞株や感受性の細胞株を用いて FGF2、FGFR1 の免疫染色を施行したが、いずれの抗体も特異性が低いこともあり、蛍光の程度で発現量の変化を確認できるほどの精度を持った実験を行うことはできなかった。

また、臨床検体においても同様に、FGF2、FGFR1 の免疫染色を施行したが、EGFR-TKI 耐性化後に腫瘍検体を再生検する症例が多くなく少数例の解析にとどまった。また、実際の検体においては肺癌細胞の周囲には線維芽細胞が含まれており、FGF2 や FGFR1 の染色結果は解釈に注意する必要があると考えられた。

4. 研究成果

EGFR-TKI の耐性化に関連した新たなメカニズムとして、FGF2-FGFR1 autocrine の関与の可能性に関して報告した。また、mRNA の発現変化と DNA メチル化の変化を組み合わせた解析により、「DNA メチル化に伴う遺伝子発現変化の EGFR-TKI の耐性化への関与」を推測している。この候補遺伝子の一つとして薬剤耐性や FGFR 経路との関与が報告されている Klotho が含まれている。その他にも過去にメチル化と CDDP 耐性が報告されている IGFBP3 や S100P も含まれていた。既に報告している FGF2-FGFR1 経路の活性化に加えて、EGFR-TKI 耐性化の過程における DNA メチル化の変化についても雑誌論文での報告に向けて準備中である。いずれの報告に関しても、EGFR-TKI への耐性解除、ひいては実際の臨床現場における薬剤開発へつながらせる可能性が考えられ

るという点で有意義であると考えた。

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hideki Terai, Kenzo Soejima, Hiroyuki Yasuda, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. Mol Cancer Res, 11, 2013, 759-67. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0652. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Hideki Terai, Kenzo Soejima, Katsuhiko Naoki et al. Activation of FGF2-FGFR1 pathway in EGFR-mutant lung cancer cell line with long-term gefitinib exposure. 103th AACR annual meeting, Washington, DC. 2013 Apr. 6-10
2. Hideki Terai, Kenzo Soejima, Katsuhiko Naoki, et al. Activation of FGF2-FGFR1 pathway in EGFR-mutant lung cancer cell line with long-term gefitinib exposure. 第71回日本癌学会総会、2012年9月19-21日、札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺井 秀樹 (Terai Hideki)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 50445293