次世代型“包括的がん緩和医療”への取り組み—抗がん剤による 耐性獲得及びがん増悪化の分子理解

葛巻直子,* 成田道子, 池上大悟, 成田 年

Molecular Understanding of the Acquisition of Resistance to Anti-cancer Drugs Associated with the Exacerbation of Cancer

Naoko Kuzumaki,* Michiko Narita, Daigo Ikegami, and Minoru Narita

*Department of Pharmacology, Hoshi University, School of Pharmacy and Pharmaceutical
Sciences; 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan.*

(Received September 18, 2015)

Gefitinib and erlotinib target the ATP cleft in the tyrosine kinase EGFR, which is overexpressed in 40–80 percent of non-small-cell lung cancer (NSCLC) and many other epithelial cancers. However, the application of gefitinib is ultimately limited by the emergence of mutations and other molecular mechanisms conferring drug resistance. Furthermore, it has been considered that acquired resistance to gefitinib is associated with a clinically significant risk of accelerated disease progression. We previously established a new gefitinib-resistant NSCLC cell line, HCC827GR, which harbors the T790M mutation. Using HCC827GR, we found that the inhibition of adenosine A2a receptors of NSCLC regulated cancer proliferation and exacerbation, indicating that adenosine A2a receptors may be new targets for a novel strategy in NSCLC therapy. These findings suggest that multilayered crosstalk between G-protein coupled receptors (GPCRs) and EGFR may play an important role in regulating downstream signaling molecules that are implicated in the development of gefitinib-resistant NSCLC.

Key words——non-small-cell lung cancer; gefitinib; G-protein coupled receptor

1. はじめに

現在、悪性腫瘍は日本における死因のトップであり、悪性腫瘍患者のなかでも、肺がんは死亡の第一位を占めている。肺がんの中でも、特に非小細胞肺がんでは、細胞内シグナル伝達の起点となり、細胞増殖、抗アポトーシス、細胞浸潤などを調節する上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) の発現異常がみられ、かつ予後不良因子であることが報告されている。非小細胞肺がんにおいて、EGFR キナーゼドメイン部分の遺伝子変異は EGFR シグナルの恒常的な賦活化を引き起こす。このため、EGFR を活性化方向に導く遺伝子変異を有する非小細胞肺がんでは、gefitinib などの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase in-

hibitor; TKI) により EGFR シグナルを抑制することで、高い抗腫瘍効果が認められる。しかしながら、EGFR に治療抵抗性の遺伝子変異を有する非小細胞肺がんにおいて、TKI を処置しても治療当初から効果の得られない症例も存在し、奏効例においても、ほとんどの場合、耐性を獲得する。近年、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がんの TKI 奏効例が後に耐性となった際、急激な病状悪化を来す症例が存在し、臨床で大きな問題となっている。そのような悪化は腫瘍増大再燃 (disease flare) と定義され、この disease flare が生じた際には肺内転移や中枢神経などの新たな遠隔転移病変の出現が誘導される。

近年、ヒトゲノム解析研究の急速な進展によりがんの発生や浸潤の原因として遺伝子の変異や欠失といった遺伝子配列そのものに変化をきたす異常がこれまで多く報告されているが、がん細胞が獲得する多様な性質について、ゲノミクスのみでは説明がつかないことが明らかとなってきた。一方、ゲノ

星薬科大学薬理学教室 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)

*e-mail: n-kuzumaki@hoshi.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 135 年会シンポジウム S34 で発表した内容を中心に記述したものである。

ムの塩基配列に影響を与えず、ゲノムを機能的に制御するエピゲノム異常は、ほぼすべてのがん細胞に蓄積し、がんの発生早期の段階から浸潤・転移に至るまで、個々のがんの特性に大きく影響を与えている。こうした仕組みを包括的に理解することは、がんの悪性化を導く形質転換のメカニズムを解明する手がかりとなる。

本稿では、抗がん剤によるがん細胞の耐性獲得が上皮間葉転換を惹起させ、転移・浸潤を誘導する分子機構と、こうした増悪化を制御し得るターゲット分子の可能性について概説する。

2. Gefitinib 感受性ヒト非小細胞肺癌細胞と Gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌細胞の理解

肺癌を組織型で分類した場合、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に分類され、非小細胞肺癌は腺がん、扁平上皮がん並びに大細胞がんに分類される。肺癌のうち、最も発生頻度の高いのは腺がんであり、日本人に発症する肺腺がんの約半数に EGFR 遺伝子に機能獲得性突然変異が認められる。EGFR チロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib に高感受性を示した非小細胞肺癌患者から抽出されたヒト非小細胞肺癌細胞は、EGFR のエクソン 19 のコドン 746 から 750 位の欠失変異やエクソン 21 の L858R 点変異を有しており、恒常的に活性化した EGFR signaling に依存して、生存・増殖が制御される。¹⁾ 実際に、gefitinib 感受性ヒト非小細胞肺癌細胞株である HCC827 細胞に gefitinib を処置することにより、細胞生存率の濃度依存的かつ有意な低下が認められた。^{2,3)} 一方、EGFR 活性型変異を有する非小細胞肺癌は、gefitinib 治療により一旦はがん細胞が縮小するが、大半が1年程度で獲得耐性を生じ再燃するため、EGFR 活性型変異を有する肺腺がんにおける gefitinib 耐性の克服は臨床的にも重要な検討課題となっている。⁴⁾ Gefitinib に耐性を示した非小細胞肺癌患者のバイオプシーから樹立した H1975 細胞株においては、EGFR のエクソン 20 のコドン 790 位におけるスレオニンからメチオニン (T790M) への点突然変異が確認される。そこで、われわれは、gefitinib 高感受性の患者より樹立され、株化された非小細胞肺癌である HCC827 細胞を用いて、耐性株の樹立を試みた。Gefitinib を 1 μ M から 5 μ M まで漸増処置し、全く細胞死の認められない残存する形態変化が認められ

た細胞群を株化し、gefitinib 耐性ヒト非小細胞肺癌細胞 (HCC827GR 細胞) の樹立を行った。得られた HCC827GR 細胞は上皮様紡錘形形態の HCC827 細胞とは明らかに異なり、H1975 細胞株に酷似した楕円形上の細胞形態を示した。また、HCC827GR 細胞に対する細胞生存率の変化について MTT 法に従い検討したところ、細胞生存率に変化は認められなかった (Fig. 1).²⁾ こうした、われわれの HCC827GR 細胞での検討から、gefitinib 耐性の獲得により、EGFR の T790M の二次的変異を生じること確認された (Fig. 1).^{1,2,5,6)} さらに、EGFR の下流シグナルである PI3K のグリシンからアスパラギン酸への点突然変異 (G118D) 及びがん抑制遺伝子である p53 遺伝子の DNA への結合阻害を惹起する 273 位のアルギニンからヒスチジンへの点突然変異 (R273H) も確認された。これまでの研究より、gefitinib や erlotinib などの EGFR-TKI の処置により、肺癌細胞の上皮間葉形質転換が惹起されることが明らかとなっている。^{7,8)} 上皮間葉形質転換は、上皮細胞が細胞極性や接着機能を失うことにより、遊走や浸潤能を獲得し、間葉系様細胞へと変化する過程である。がん細胞においては、転移能を獲得するための重要なプロセスである。上皮間葉形質転換が認められるがん細胞は、がん幹細胞化することも報告されている。⁹⁾ また、EGFR-TKI により引き起こされる上皮間葉形質転換は、TGF β の分泌を介した SMAD2/3 経路の活性化¹⁰⁾ や IL-6 の遊離を介した JAK/STAT 経路により助長される¹¹⁾ など、ここ数年新たな知見が報告されている。

3. Gefitinib 耐性非小細胞肺癌を制御する新規標的 G-protein coupled receptor (GPCR) の役割

GPCR はヒトにおいておよそ 800 以上の存在が確認されており、細胞応答と同様に細胞内シグナル伝達経路を活性化し、細胞の生存や成長、分化といった多くのプロセスに重要な役割を担っているこ

葛巻直子

2007 年に星薬科大学にて薬学博士を取得後、研究/教育に従事する。2011 年より慶應医学部生理学教室の疾患特異的 iPS グループにて疾患研究を行い、2014 年より星薬科大学薬理学教室講師となる。専攻は神経科学、幹細胞生物学であり、iPS 細胞を用いた病態解明研究やがん細胞形質転換に感心を持ち研究を進めている。

Fig. 1. Establishment of the Gefitinib-resistant Cell Line, HCC827GR

HCC827 cells were exposed to 1 μM of gefitinib for 48 h in medium containing 10% fetal bovine serum. They were then washed and cultured in drug-free medium until surviving cells were 80% confluent. These cells were then re-exposed to increasing concentrations of gefitinib (from 1 to 5 μM). Cells were finally able to grow in 5 μM gefitinib were obtained 1.5 months after initial exposure. The established resistant cells were maintained in medium containing 1 μM of gefitinib. For all *in vitro* studies, resistant cells were cultured in drug-free medium for at least 1 week to eliminate gefitinib. Gefitinib-resistant cells are referred to as HCC827GR. Addition of the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (0.01–1 μM) to HCC827 cells, which have been classified as the gefitinib-sensitive NSCLC cell line, for 2 d produced a concentration-dependent decrease in tumor cell growth. In contrast, the addition of gefitinib (0.01–1 μM) for 2 d did not affect the growth of HCC827GR cells (** $p < 0.001$ vs. control). These data (shown in Fig. 1) were adopted from Ref. 2).

とが知られている。また、GPCR はチロシンキナーゼ内蔵型受容体と密接にリンクしており、近年、チロシンキナーゼ内蔵型受容体の下流で、GPCR のリガンドが産生されることや GPCR の細胞内応答により栄養因子/増殖因子の下流シグナルがトランスアクチベーションなどの機構を介して、一部修飾を受けていることが報告されている。^{12,13)} こうした細胞膜表面上に存在する GPCR を標的として、がん細胞の増殖あるいは増悪化を制御することは、新たなアプローチである。これまでの報告より、がん細胞において GPCR の一種である estrogen receptors の発現増加や、浸潤性の神経膠芽腫並びに大腸がんにおける EGF-TM7 receptor のサブ

ファミリーである egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 2 (EMR2) の発現増加が報告されている。¹²⁾ また、チロシンキナーゼ内蔵型受容体の下流の Akt の活性化に伴う p53 の活性化によって、トランスアクチベーションされると考えられている brain-specific angiogenesis inhibitor-1 (BAI1) の発現が、胃がん並びに大腸がんにおいて低下しているという報告もあり、¹⁴⁾ がんの悪性化における GPCR 発現の関与は注目されている。そのため、EGFR に焦点を当てた従来のがん細胞増殖抑制機構に、GPCR を介したシグナルが新たなターゲットとなる可能性が示唆される。

実際に、われわれは、gefitinib 耐性を獲得した非

Fig. 2. Effect of Adenosine A2a Receptors on the Growth of Gefitinib-resistant HCC827GR Cells

(a) qPCR for mRNAs of adenosine receptors (A1, A2a, A2b, A3) and GAPDH, an internal standard. The values for adenosine receptors mRNA were normalized by the value for GAPDH mRNA. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs. HCC827). (b) HCC827GR cells were incubated for 7 d with the selective adenosine A2a receptor antagonist SCH-58261 (10 nM–10 μM), and then cell viability was measured (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. non-treated group). (c) Treatment with siRNA targeting adenosine A2a receptors to HCC827GR cells for 3 d significantly decreased cell viability of HCC827GR cells (*** $p < 0.001$ vs. non-treated group). These data [described in Figs. 2(b) and 2(c)] were adopted from Ref. 2).

小細胞肺癌株を用いて、GPCR 発現変動について網羅的な解析を行った。Gefitinib 高感受性細胞である HCC827 細胞並びに gefitinib 耐性細胞である HCC827GR 細胞を用いて 384 種類の GPCR の発現変化について TaqMan® Array 法に従い、網羅的に解析した。その結果、HCC827 細胞と比較して HCC827GR 細胞において、多くの GPCR の発現変動が認められた。正常肺線維芽細胞と比較して、HCC827 細胞では大きな発現変動がなく、HCC827GR 細胞で発現量が著明に変化した GPCR、すなわち、gefitinib 耐性獲得した場合にのみ発現上昇の認められる GPCR を抽出したところ、GPR87, adenosine A2a receptor, calcitonin receptor などの受容体の著明な発現増加が認められた。²⁾ 本研究において、orphan receptor として ligand が同定されていない受容体を除いた GPCR のうち、gefitinib 耐性を獲得した場合に最も著明な発現増加を示した GPCR は、adenosine A2a receptor であった。そこで、HCC827GR 細胞で発現増加が認められた adenosine A2a receptor の機能解析を行う目的で adenosine A2a receptor 拮抗薬並びに siRNA を用いて検討を行ったところ、adenosine A2a receptor 拮抗薬並びに siRNA 処置により、HCC827GR 細胞の細胞生存率の低下が認められた (Fig. 2)。²⁾ Adenosine A2a receptors の活性化は、natural killer (NK) 細胞の活性及び細胞毒性を抑制することや、マクロファージからの血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の遊離を促進す

ることであるがん細胞の生存に寄与していることが報告されている。^{15,16)} また、CD73 陽性乳がん細胞に対して adenosine A2a receptors を拮抗することで転移能を抑制することも報告されている。¹⁷⁾ 実際に、市場では、adenosine A2a receptor 拮抗薬であるイストラディフィリンがパーキンソン病治療薬として用いられている。こうしたことから、adenosine A2a receptor 拮抗薬のドラッグリポジショニングを視野においた gefitinib 耐性非小細胞肺癌増殖制御への活用も有効であると考えられる。

4. おわりに

抗がん剤による耐性獲得及びがん増悪化の分子理解を基盤として、新たな gefitinib 耐性非小細胞肺癌に対する増殖コントロールの標的として、細胞膜表面上に存在する GPCR の可能性について言及した。がんを撲滅するために使用した抗がん剤が、更なるがんの増悪化を引き起こす可能性が想定され、がん細胞の増殖・転移を適切に制御するためには、病態の分子理解とそれに伴う新たな治療法の確立が重要となる。われわれも、抗がん剤による耐性獲得及びがん増悪化の分子理解について、現在、上皮間葉形質転換の獲得にエピジェネティクス修飾が関与している可能性を想定し、詳細な研究を鋭意進めている。こうした病態の分子理解こそが、適切な治療を行うために、必要不可欠であると考えられる。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Kobayashi S., Boggon T. J., Dayaram T., Jänne P. A., Kocher O., Meyerson M., Johnson B. E., Eck M. J., Tenen D. G., Halmos B., *N. Engl. J. Med.*, **352**, 786–792 (2005).
- 2) Kuzumaki N., Suzuki A., Narita M., Hosoya T., Nagasawa A., Imai S., Yamamizu K., Morita H., Suzuki T., Okada Y., Okano H. J., Yamashita J. K., Okano H., Narita M., *PLoS One*, **7**, e44368 (2012).
- 3) Kuzumaki N., Suzuki A., Narita M., Hosoya T., Nagasawa A., Imai S., Yamamizu K., Morita H., Nagase H., Okada Y., Okano H. J., Yamashita J. K., Okano H., Suzuki T., Narita M., *Br. J. Cancer*, **106**, 1148–1152 (2012).
- 4) Chaft J. E., Oxnard G. R., Sima C. S., Kris M. G., Miller V. A., Riely G. J., *Clin. Cancer Res.*, **17**, 6298–6303 (2011).
- 5) Pao W., Miller V. A., Politi K. A., Riely G. J., Somwar R., Zakowski M. F., Kris M. G., Varmus H., *PLoS Med.*, **2**, e73 (2005).
- 6) Filardo E. J., Quinn J. A., Bland K. I., Frackelton A. R. Jr., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 1649–1660 (2000).
- 7) Sequist L. V., Waltman B. A., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke A. B., Fidias P., Bergethon K., Shaw A. T., Gettinger S., Cospers A. K., Akhavanfard S., Heist R. S., Temel J., Christensen J. G., Wain J. C., Lynch T. J., Vernovsky K., Mark E. J., Lanuti M., Iafrate A. J., Mino-Kenudson M., Engelman J. A., *Sci. Transl. Med.*, **3**, 75ra26 (2011).
- 8) Chung J. H., Rho J. K., Xu X., Lee J. S., Yoon H. I., Lee C. T., Choi Y. J., Kim H. R., Kim C. H., Lee J. C., *Lung Cancer*, **73**, 176–182 (2011).
- 9) Santisteban M., Reiman J. M., Asiedu M. K., Behrens M. D., Nassar A., Kalli K. R., Haluska P., Ingle J. N., Hartmann L. C., Manjili M. H., Radisky D. C., Ferrone S., Knutson K. L., *Cancer Res.*, **69**, 2887–2895 (2009).
- 10) Southeray M., Capelletti M., Pulido I., Kuang Y., Paweletz C. P., Becker J. H., Kikuchi E., Xu C., Patel T. B., Al-Shahrour F., Carretero J., Wong K. K., Jänne P. A., Shapiro G. I., Shimamura T., *Cancer Res.*, **75**, 4372–4383 (2015).
- 11) Li L., Han R., Xiao H., Lin C., Wang Y., Liu H., Li K., Chen H., Sun F., Yang Z., Jiang J., He Y., *Clin. Cancer Res.*, **20**, 2714–2726 (2014).
- 12) Shah B. H., Catt K. J., *Trends Neurosci.*, **27**, 48–53 (2004).
- 13) Delcourt N., Bockaert J., Marin P., *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**, 602–607 (2007).
- 14) Lin H. H., *Chang Gung Med. J.*, **35**, 15–27 (2012).
- 15) Kuldová M., Svoboda J., Kovárů F., Vannucci L., Kovárů H., Fiserová A., *Folia Microbiol.*, **54**, 364–368 (2009).
- 16) Cronstein B. N., *F1000 Biol. Rep.*, **3**, 21 (2011).
- 17) Beavis P. A., Divisekera U., Paget C., Chow M. T., John L. B., Devaud C., Dwyer K., Stagg J., Smyth M. J., Darcy P. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 14711–14716 (2013).