

論文内容の要旨

Ankyrin Repeat Domain 1 Overexpression is Associated with Common Resistance to Afatinib and Osimertinib in EGFR-mutant Lung Cancer

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌のアファチニブ・オシメルチニブ耐性に
関与する Ankyrin Repeat Domain 1 過剰発現

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野

大学院生 吉川（高橋） 明子

Scientific Reports Vol.8, No. 1 (2018) 掲載

【背景】

EGFR (epidermal growth factor receptor) 遺伝子変異は、非小細胞肺癌の約 40-50%に認められる。EGFR チロシンキナーゼ阻害 (EGFR-TKIs) は劇的な治療効果を示すが、約 1 年程度で耐性が生じるため、耐性克服が大きな課題である。EGFR-TKIs 耐性機序として EGFR 2 次変異 (Exon 20 T790M、C797S) やバイパス経路活性化がこれまでに報告されているが、治癒に向けた新規治療戦略が求められている。

【目的】

第 2・3 世代 EGFR-TKIs 新規耐性メカニズムを明らかにし、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の治癒に向けた新規治療戦略を構築することを目的とした。

【方法】

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株 PC-9、HCC827 を用いて、ステップワイズ法にて、第 2・3 世代 EGFR-TKIs (アファチニブ、オシメルチニブ) に対する 4 種類の耐性株(PC-9-AR、PC-9-OR、HCC827-AR、HCC827-OR)を樹立した。元株と耐性株を用いて、cDNA アレイによる網羅的遺伝子発現解析、マイクロ RNA アレイ解析およびタンパク質発現解析等にて、第 2・3 世代 EGFR-TKIs 耐性因子の同定を行った。耐性因子に対して、*in vitro* における機能解析を行い、耐性克服を試みた。さらに EGFR-TKIs を投与した EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者の組織検体を用いて、免疫染色にて EGFR-TKIs 使用前と耐性後の耐性因子発現を評価した。

【結果】

PC-9-AR、PC-9-OR、HCC827-AR、HCC827-OR は、次世代シーケンサーを用いた解析にて 2 次変異 (T790M、C797S) は認めなかったが、細胞形態が上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の形態を示した。4 種類の耐性株は、ウェスタンブロット解析における E-cadherin 発現低下と vimentin/ZEB1 発現上昇およびマイクロ RNA 解析における EMT 抑制因子 miR-200 family 発現低下を認め、EMT が耐性に共通して関与していることを認めた。さらに、4 種類の耐性株は、ウェスタンブロット解析にて、抗アポトーシス関連因子 BCL2 発現上昇を認め、アポトーシス抵抗性であった。

cDNA アレイ解析では、4 種類の耐性株にて ZEB1 下流経路に位置する Ankyrin Repeat Domain 1 (ANKRD1) 過剰発現を認め、ウェスタンブロット解析、定量的 RT-PCR においても過剰発現を認めた。4 種類の耐性株に対し、ANKRD1 発現を siRNA およびマルチキナーゼ阻害剤 (イマチニブ) にて抑制したところ、抗アポトーシス因子の抑制およびアファチニブ、オシメルチニブ感受性の改善を認めた。

臨床検体を用いた検討では、EGFR-TKIs を使用した EGFR 遺伝子変異陽性患者 10 名の治療前および耐性後の組織検体を用いて、ANKRD1 発現を免疫染色法にて評価した。

EGFR-TKIs が早期に無効になった患者においては、治療前より ANKRD1 高発現を認め、EGFR-TKIs 有効例においても、耐性時には治療前と比較して ANKRD1 高発現が認められた。

以上より、第 2・3 世代 EGFR-TKIs 耐性に EMT および抗アポトーシスに関連する ANKRD1 過剰発現が共通に関与していることを明らかにし、EGFR-TKIs とイマチニブの併用が耐性克服において有効であることが示唆された。

【考察】

本研究にて、EMT や抗アポトーシスに関連する ANKRD1 過剰発現が第 2・3 世代 EGFR-TKIs の初期耐性および獲得耐性に関与する共通のメカニズムであることを明らかにした。ANKRD1 は、EMT 関連因子である ZEB1 の下流に位置し、卵巣癌においてシスプラチン耐性や抗アポトーシスに関与することなどが報告されているが、肺癌での薬剤耐性における意義は明らかでなかった。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する EGFR-TKIs 耐性機序は多岐に渡るが、第 2・3 世代 EGFR-TKIs の初期耐性および獲得耐性に関与する共通の因子である ANKRD1 の同定およびイマチニブによる制御は、治療に向けた新規治療戦略でになり得ると考えられる。

【結論】

EMT 及び抗アポトーシスに関連する ANKRD1 は、第 2・3 世代 EGFR-TKIs 耐性の根幹であり、EGFR-TKIs とイマチニブの併用は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の治療に向けての新規治療戦略になり得る。