

ゲフィチニブ感受性株と耐性株における上皮間葉移行 (EMT) の検討

文田 壮一 岡本 勇 岡本 邦男 岡本 渉 中川 和彦

近畿大学医学部内科学教室 (腫瘍内科部門)

抄 録

ゲフィチニブは選択的 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) であり, 非小細胞肺癌において EGFR 遺伝子変異を有する症例では非常に高い奏効率を示すと報告されている。しかし, EGFR-TKI の耐性化が問題となっており, この耐性機序として EGFR 遺伝子の二次変異 (T790M) や c-MET の増幅, HGF 刺激など, 細胞質内シグナルの賦活化によるものが報告されている。一方, 非小細胞肺癌細胞株において, 間葉型を示す細胞は上皮型のものに比べ EGFR-TKI 感受性が低いことが報告され, EGFR-TKI 感受性と上皮間葉移行 (EMT) の関連が示唆されている。本研究では, EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌細胞株でゲフィチニブ感受性である HCC827 と, c-MET の遺伝子増幅によりゲフィチニブ耐性となった HCC827GR5, HCC827GR6 と HGF 産生によりゲフィチニブ耐性となった HCC827HGF1, HCC827HGF2 を比較し, 細胞形態を検討した。この結果, HCC827 と HCC827GR5, HCC827GR6 では上皮型の細胞形態を示したのに対し, HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 では間葉型の細胞形態を示した。次に, HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 は HCC827 及び HCC827GR5, HCC827GR6 と比較し, E-cadherin の低発現と vimentin の高発現を認めた。さらに, EMT PCR array で HCC827HGF1 は HCC827 と比べ ZEB1, ZEB2 の mRNA レベルの高発現を認めた。加えて, がん浸潤アッセイで HCC827HGF1 は HCC827 及び HCC827GR5 と比較し, 遊走能及び浸潤能ともに機能亢進を認めた。この結果から, EGFR-TKI に対し HGF 産生によりゲフィチニブ耐性となった HCC827HGF 株は EMT を起こしていることが示された。このことから, 耐性獲得における c-MET の遺伝子増幅と HGF 産生では EMT 変化に違いがあることが示唆された。

Key words: ゲフィチニブ, epidermal growth factor receptor (EGFR), c-MET, hepatocyte growth factor (HGF), epithelial to mesenchymal transition (EMT)

緒 言

非小細胞肺癌において, 上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor ; 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が起こる。このため, EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌では, ゲフィチニブなどの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor ; TKI) により EGFR シグナルを抑制することで高い抗腫瘍効果を示す¹⁻³。しかし, EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌においても, EGFR-TKI 治療当初から効果の得られない症例も存在し, また EGFR-TKI 奏効例においてもそのほとんどは耐性を獲得する。EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌株における EGFR-TKI 耐性の

機序としては, T790M などの EGFR の二次変異や c-MET の遺伝子増幅が報告されている⁴⁻⁷。加えて, c-MET のリガンドである HGF (hepatocyte growth factor/scatter factor)^{8,9} が c-MET の細胞質内シグナルを賦活化し EGFR-TKI 耐性となることが報告されている^{10,11}。

HGF は肝細胞の細胞分裂促進タンパク質で同定されたもの¹¹である。HGF 及び c-MET は, ヒトの肺癌, 中皮腫, 脳腫瘍などで発現することが報告されている¹²⁻¹⁶。HGF は腫瘍細胞もしくは周囲の間質細胞より分泌され, 腫瘍細胞もしくは間質細胞の成長因子として作用する^{17,18}。また, MDCK (イヌ正常腎) 細胞株¹⁹ やヒト肝細胞癌細胞株²⁰, 非小細胞肺癌細胞株²¹, 乳癌細胞株²², 前立腺癌細胞株²³ などへ HGF が暴露されると, 細胞間接着が疎となり (scat-

tering), 上皮様の紡錘形の形態から楕円形状の細胞 (round cell) へと細胞形態学的変化, すなわち上皮間葉移行 (epithelial to mesenchymal transition; EMT) を起こすと報告されている¹²⁻²⁴. 細胞形態以外に, 上皮型の細胞に多く発現する E-cadherin や, 間葉型の細胞に多く発現する vimentin などの細胞間接着因子の変化でも EMT を確認した報告がある¹⁹⁻²⁴.

一方, EGFR-TKI 感受性と EMT について, E-cadherin の低発現と vimentin の高発現である間葉型の細胞株は, E-cadherin の高発現と vimentin の低発現である上皮型の細胞株と比較し, EGFR-TKI の感受性が低いことが示されている²⁵⁻²⁸.

今回我々はこの EGFR-TKI 感受性の変化と EMT の関連について, ゲフィチニブ感受性株である HCC827 と, c-MET 遺伝子増幅によりゲフィチニブ耐性となった HCC827GR5 及び HCC827GR6, HGF 産生によりゲフィチニブ耐性となった HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 を用いて, 細胞形態, ウェスタンブロット法による細胞間接着因子の蛋白発現, RT-PCR による mRNA 発現状況, がん浸潤アッセイを用いて EMT を評価した.

方 法

細胞株

EGFR 遺伝子変異 (exon19 欠失; E746_A750) を有する非小細胞肺癌細胞株でゲフィチニブ感受性が報告⁶されている HCC827 は, ATCC (America Type Culture Collection) より購入した. HCC827GR5 及び HCC827GR6 は, 既知の報告⁶で樹立された株を Janne PA のご厚意により提供を受けた. HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 は我々が樹立した細胞株である²⁹. HCC827 は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した RPMI-1640 (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, USA) 培養液中で, HCC827GR5 及び HCC827GR6 は 10% FBS 添加 RPMI-1640 にゲフィチニブ 1 $\mu\text{mol/L}$ を添加した培養液中で, HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 は 10% FBS 添加 RPMI-1640 に hygromycin 500 $\mu\text{g/ml}$ を添加した培養液中で, 5% CO_2 インキュベーターにて 37°C の条件下にて培養した.

薬品

gefitinib 及び hygromycin は和光純薬工業 (Tokyo, Japan) より購入した. 細胞増殖抑制試験 (MTT assay)

96ウェルマイクロプレートの各ウェルに 2.0×10^2 個の細胞を播種し, 5% CO_2 インキュベーターにて

37°C で 24 時間培養後, ゲフィチニブを 0.001-10 $\mu\text{mol/L}$ で接触させた. 接触後 72 時間培養し, Tetra color ONE (生化学工業, Tokyo, Japan) を添付し, 3 時間呈色反応させ, Multiscan spectrum 比色計 (Termo Labosystem, Boston, USA) を用いて, 630 nm 波長を対照波長とし 490 nm の吸光度を測定し細胞生存割合を評価した. 生存曲線及び 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50} 値) は, Graph Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego, USA) により求めた.

ウェスタンブロット法

培養細胞 5.0×10^5 - 1.0×10^6 個を 6 ウェルプレートに播種し 5% CO_2 インキュベーターにて 37°C で 1 日培養した後, 培養液を取り除き PBS で洗浄し各薬剤を含む培養液に入れ替え, 既定の期間薬剤接触させ培養した. 薬剤接触後, PBS で洗浄し HEPES Lysate buffer (30 mM HEPES, 1% tritonX-100, 10% glycerol, 5 mM MgCl, 25 mM NaF, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) を 40-60 μL /ウェルを添加後, 12,000 rpm, 5 分間遠心し, 上清を回収した. 蛋白抽出液は BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, USA) を用いて濃度測定し, 各細胞間同一量の蛋白を SDS-PAGE した後, SDS-ポリアクリルアミドゲル (7.5% もしくは 12%) を用いて 100 V, 60 分で電気泳動した. その後ニトロセルロース膜へ 80 V, 90 分で転写した. ニトロセルロース膜は Blocking One 及び Blocking One-P (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) でブロッキング後, 各一次抗体と反応させた.

一次抗体試薬は, 1000 倍希釈抗リン酸化 (Tyr 1068) EGFR 抗体, 1000 倍希釈抗 EGFR 抗体, 1000 倍希釈リン酸化 (Tyr 1349) c-MET 抗体, 1000 倍希釈抗リン酸化 (P1068) AKT 抗体, 1000 倍希釈抗 AKT 抗体, 1000 倍希釈リン酸化 (Thr 202/Tyr 204) ERK 1/2 (; extracellular signal regulated kinase) 抗体, 1000 倍希釈 ERK1/2 抗体, 1000 倍希釈抗 E-cadherin 抗体, 10000 倍希釈抗 Actin 抗体, これらは全て Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) を用いた. 他の一次抗体試薬として, 1000 倍希釈抗 c-MET 抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, USA), 1000 倍希釈抗 vimentin 抗体 (BD biosciences, San Jose, CA, USA) を使用した. 一次抗体の反応時間は, リン酸化 EGFR 抗体及び EGFR 抗体は室温にて一晩反応させ, 他の抗体試薬はすべて 5°C 冷温下にて一晩反応させた. Tween-PBS (0.3% Tween20 含有) で 5 分ずつ 3 回洗浄後, 各二次抗体薬として 5,000 倍希釈ヒツジ抗マウス IgG 抗体, 10,000 倍希釈ヒツジ抗ラビット IgG 抗体

(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)を用いて、室温下にて90分間反応させた。その後 Tween-PBS で5分ずつ3回洗浄後、Chemiluminescence detection system (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA)により検出し、LAS4000mini (FUJI Film, Tokyo, Japan)で撮影した。

細胞形態観察

1.0×10^6 個の各培養細胞を6cmシャーレにFBSのないRPMI-1640で、5% CO₂インキュベーターにて37°Cで24時間培養し、顕微鏡にて形態を観察し、200倍の拡大像を撮影した。

RT-PCR 反応

培養細胞 1.0×10^7 個を10cmシャーレに播種し、5% CO₂インキュベーターにて37°Cで1日培養した後、トリプシン処理後に回収し、RNA Miniprep (SA Biosciences, Valencia, USA)を用い抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, USA)を用いcDNAに変換した。そのcDNAを用いてKOD-plus-(TOYOBO, Tokyo, Japan)及びSYBR Green (Cambrex, Charles City, USA)を用い、ABI7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて、熱変性として94°C 2分間処理の後、94°C15秒、58°C30秒72°C25秒の増幅反応を30サイクル起こし、最終伸長を72°C 7分行った。この時のmRNA発現量についてGAPDHを対照として比較した。

プライマー配列

E-cadherin forward TACGCCTGGGACTC-CACCTA

E-cadherin reverse CCAGAAACGGAGGCCT-GAT

Vimentin forward AAGGGGACCAACGAGT-CTCT

Vimentin reverse TGACATTCAGCAGGT-CTTGG

Snail forward CACTATGCCGCGCTCTTTC

Snail reverse GCTGGAAGGTAAACTCTG-GATTAGA

Slug forward AATATGTGAGAGCCTGGGC-GC

Slug reverse CTCTGTTGCAGTGAGGGCAAG

ZEB1 forward AGCAGTGAAAGAGAAGG-GAATGC

ZEB1 reverse GGTCCCTCTTCAGGTGCCT-CAG

ZEB2 forward CGGTCCAGAAGAAATGAAGG

ZEB2 reverse TCCTCAAAGTCTGATGTG-

CAA

GAPDH forward AGGGCGGTG-CTAAGAAAGTCA

GAPDH reverse TCTGGCTTGTATTCCTT-CTCATT

Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) PCR array

EMT関連蛋白及び転写因子を検討したKumar Aらの報告³⁰を参考に、同様のEMT PCR array (SA Biosciences, Valencia, USA)で検討を行った。

培養細胞 1.0×10^7 個を10cmシャーレに播種し、5% CO₂インキュベーターにて37°Cで1日培養した後、トリプシン処理後に回収し、RNA Miniprep (SA Biosciences, Valencia, USA)を用い抽出し、RT2-First Strand Kit (SA Biosciences, Valencia, USA)を用いcDNAに変換した。そのcDNAをRT2 qPCR Master Mix (SA Biosciences, Valencia, USA)とともにEMT PCR arrayへアプライし、ABI7000 (Applied Biosystems, USA)にて、熱変性として95°C10分間処理の後、95°C15秒、60°C 1分の増幅反応を40サイクル起こした。この結果を、QIAGEN ホームページにあるPCR Array Data Analysis Softwareを用いて解析した。

がん浸潤アッセイ；遊走能アッセイと浸潤能アッセイ

浸潤能アッセイは、24ウェルシャーレにFBSを含まないRPMI1640にて5% CO₂インキュベーター2時間37°Cで水和させたマトリゲル付きチャンバーを用い、10% FBSを含む培養液の入った24ウェルシャーレに挿入した。次に、FBSを含まない 3.0×10^5 個/mlの細胞溶液0.5mlをチャンバー内に添加し、5% CO₂インキュベーターにて37°Cで22時間培養した。チャンバー内の浸潤していない細胞は綿棒で除去し、チャンバー下面に浸潤した細胞をDef quik 染色液で染色し、顕微鏡50倍拡大像を撮影し細胞数を数えた。これを3回繰り返し評価した。

遊走能アッセイはマトリゲルのないチャンバーで、浸潤能アッセイと同様に評価した。

結 果

HCC827 関連細胞株のゲフィチニブ感受性と細胞内シグナル

HCC827, HCC827GR5, HCC827GR6, HCC827HGF1, HCC827HGF2の5細胞株に対し、ゲフィチニブの効果をMTT法で評価した。HCC827は低濃度のゲフィチニブで増殖抑制を認めた。これに対して、HCC827GR5, HCC827GR6, HCC827HGF1, HCC827HGF2はゲフィチニブ抵抗

性を示した (表 1)。

これらの細胞株で、ゲフィチニブ投与時における細胞質内シグナルを確認するために、ウエスタンブロット法にて EGFR, c-MET, AKT, ERK のリン

表 1 HCC827 関連株におけるゲフィチニブ感受性確認

	gefitinib IC50 (μmol/L)
HCC827	0.04
HCC827GR5	10.96
HCC827GR6	7.81
HCC827HGF1	4.12
HCC827HGF2	6.18

HCC827, HCC827GR5, HCC827GR6, HCC827HGF1, HCC827HGF2 を 10%FBS 含有培養液で培養し、そこへゲフィチニブを段階的に暴露し、72時間後の細胞生存割合をみた。この時の50%増殖抑制濃度 (IC₅₀ 値) を求めた。それぞれ独立に 3 回実施し、その結果の平均を示す。

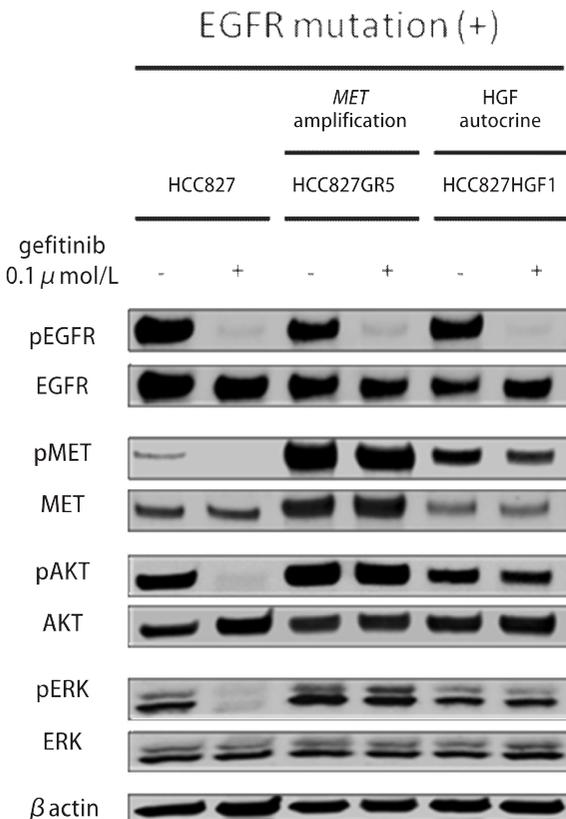


図 1 HCC827 関連株のゲフィチニブにおける細胞質内シグナルの変化
HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 を 10% FBS 含有培養液で培養し、ゲフィチニブ 0.1 μmol/L を 1 時間暴露するものとし、分け、これらの細胞溶解液を回収し、ウエスタンブロット法にて EGFR, c-MET, AKT, ERK のリン酸化及び全形態の発現を評価した。ローディングコントロールは β アクチンで評価した。

酸化状態を確認した (図 1)。定常状態において、HCC827 では c-MET リン酸化はごくわずかであるのに対し、HCC827GR5 では c-MET 増幅により、また HCC827HGF1 では HGF により c-MET のリン酸化が強く起こっていた。次に、HCC827 に対しゲフィチニブを暴露すると、EGFR, AKT, ERK のリン酸化が著明に抑制された。これに対し、HCC827GR5 及び HCC827HGF1 に対しゲフィチニブを暴露したものでは、EGFR リン酸化の抑制があるものの、AKT, ERK のリン酸化に影響を及ぼさなかった (図 1)。この結果から、HCC827GR5 及び HCC827HGF1 においては、ゲフィチニブ存在下でも c-MET のリン酸化により AKT, ERK のリン酸化が保持されており、ゲフィチニブ耐性であることが確認された。

HCC827 関連細胞の細胞形態と EMT 関連蛋白

次に、これらの細胞株の細胞形態を観察した。HCC827 及び HCC827GR5, HCC827GR6 は、細胞間接着が密で島状の細胞塊を形成 (epithelial island) し上皮型の細胞形態を示した (図 2 A)。これに対し、HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 は細胞接着が疎で (scattering), 各細胞が円形の細胞形態 (round cell) を示した (図 2 A)。

次に、ウエスタンブロット法にて上皮型細胞に多く発現する E-cadherin と間葉型細胞に発現する vimentin の蛋白発現を確認した (図 2 B)。HCC827 及び HCC827GR5, HCC827GR6 は E-cadherin の発現が強く vimentin の発現は検出できなかった。これに対し HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 は、HCC827 と比べ E-cadherin の発現が低く vimentin の発現を認めた。この結果から、HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 は HCC827 と比較し細胞形態と同様に、細胞間接着因子の蛋白発現でも EMT を起こしていることが示された。

HCC827 関連株における EMT 関連因子の検索

次に、HCC827 から HCC827HGF1 への EMT について、どの EMT 関連遺伝子に相対的な差があるかを網羅的に検索すべく、EMT PCR array を用いて検索を行った (図 3 A)。HCC827HGF1 では HCC827 と比較し、蛋白発現と同様に mRNA レベルにおいても E-cadherin の低発現及び vimentin の強発現が確認された。加えて、HCC827HGF1 では HCC827 と比較し EMT 関連転写因子と報告されている ZEB1, ZEB2³¹ が強く発現していた。

EMT array とは別に RT-PCR 法で EMT 関連転写因子³¹ の Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 を検討したところ、HCC827HGF1 は HCC827 と比較し、ZEB1 では約 12 倍、ZEB2 では約 150 倍もの mRNA

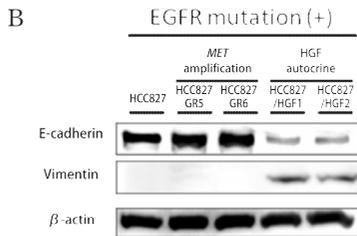
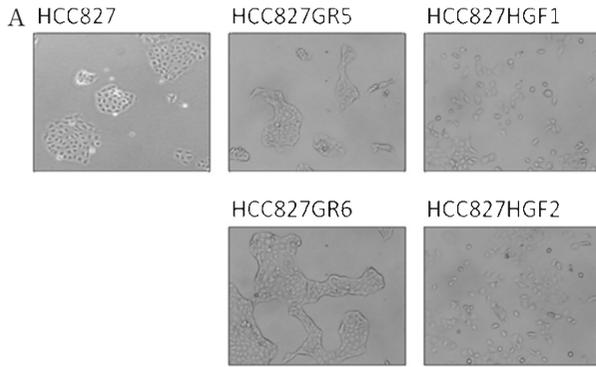


図 2 HCC827 関連株における細胞形態観察及び EMT 関連蛋白発現の確認
 A : HCC827, HCC827GR5, HCC827GR6, HCC827HGF1, HCC827HGF2 を FBS のない培養液で24時間培養し, 細胞形態について顕微鏡200倍拡大像を撮影した。
 B : HCC827, HCC827GR5, HCC827GR6, HCC827HGF1, HCC827HGF2 を FBS のない培養液で24時間培養し, その細胞溶解液を回収し, ウェスタンブロット法にて E-cadherin, vimentin の発現を評価した。ローディングコントロールは β アクチンで評価した。

レベルが高いことが示された。これに対し, Snail 及び Slug の mRNA レベルの変化は乏しかった。この結果から HCC827HGF1 は HCC827 と比較し HGF により ZEB1, ZEB2 を介し EMT を起こしていることが考えられた。

HCC827 関連株における転移浸潤アッセイ

これまで EMT により転移浸潤が促進されることが報告³²されていることから, HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 について遊走能アッセイ及び浸潤能アッセイで評価した。

遊走能アッセイでは, HCC827HGF1 では HCC827 と比較し遊走細胞がより多く観察されたが, HCC827GR5 では遊走細胞が観察されなかった(図 4 A, B)。浸潤能アッセイでも遊走能アッセイと同様に, HCC827HGF1 は HCC827 と比較し浸潤細胞がより多く観察されたのに対し, HCC827GR5 は浸潤細胞も観察されなかった(図 4 C, D)。この結果から, HCC827HGF1 は HCC827 及び HCC827GR5 と比較し遊走能及び浸潤能ともに機能亢進していることが示された。

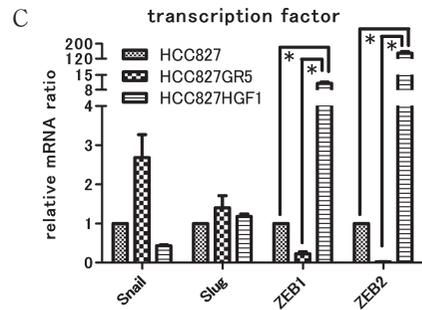
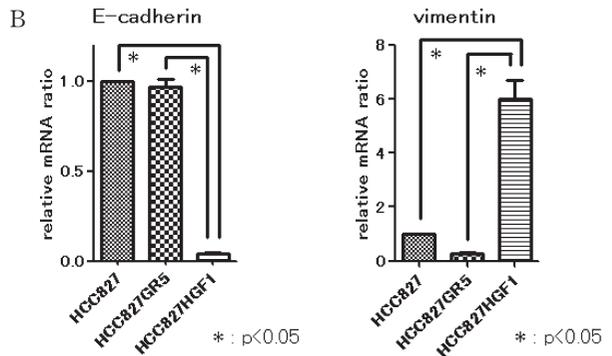
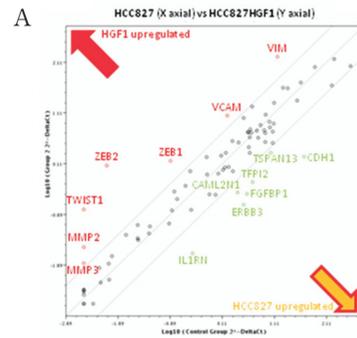


図 3 EMT array, 及び array にて差を認めた因子についての RT-PCR

A : HCC827 (上皮型) と HCC827HGF1 (間葉型) について, RT-PCR 法を用いた EMT PCR array で相対的に変化のある EMT 関連遺伝子の発現強度を検討した。GAPDH 及び β アクチン, 18S リボソームの 3 遺伝子を発現強度の標準化コントロールとした。X 軸方向は HCC827 における EMT 関連遺伝子の発現強度, Y 軸方向は HCC827HGF1 における発現強度を示す。発現強度が $\pm 2SD$ 以上の EMT 関連遺伝子について, 図中に遺伝子名を示す。
 B : HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 から抽出した cDNA について, E-cadherin, vimentin について, RT-PCR 法で発現強度を評価した。GAPDH を発現強度の標準化コントロールとした。
 C : HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 から抽出した cDNA について, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 について, RT-PCR 法で発現強度を評価した。GAPDH を発現強度の標準化コントロールとした。

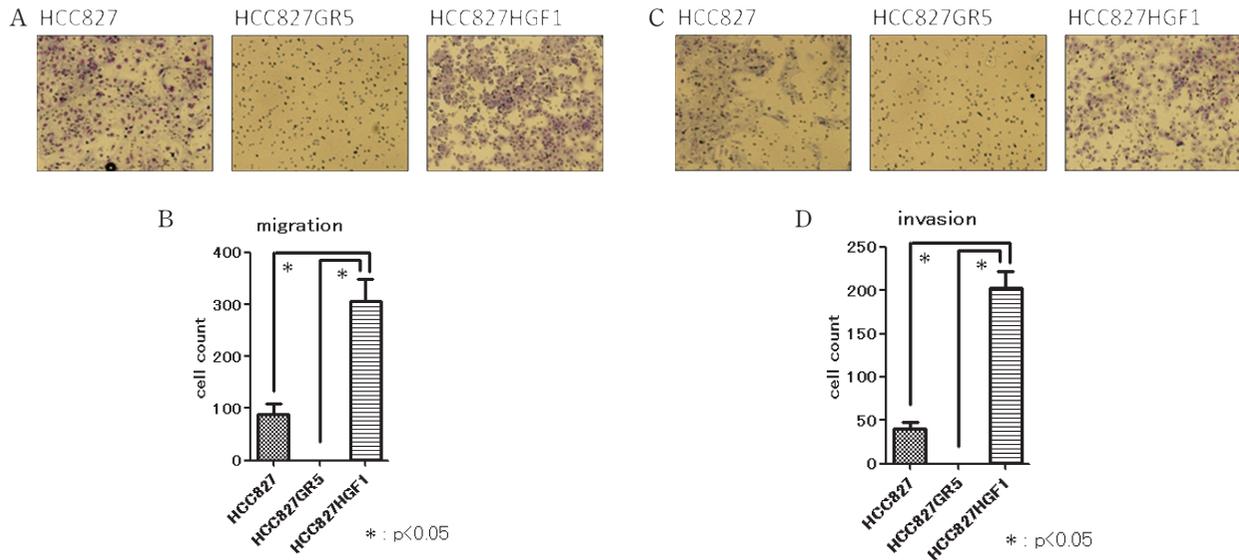
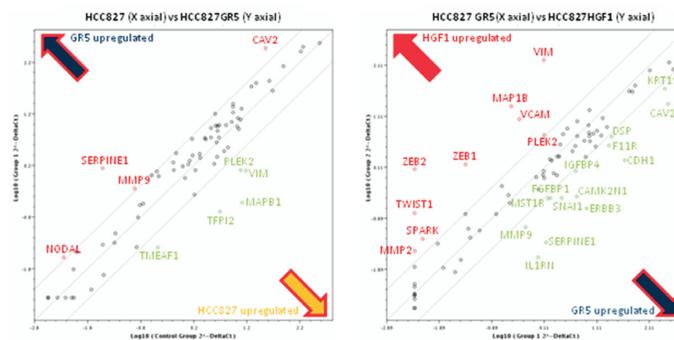


図4 HCC827 関連株におけるがん浸潤アッセイ

- A : HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 について、それぞれ FBS のない 3.0×10^5 個/ml の細胞溶液を作成し、水和させたマトリゲルのないチャンパーに添加した。下面の FBS を含む培養液面へ遊走した細胞について、チャンパー下面を切り取り Def quick 染色液で染色し、顕微鏡50倍拡大像を撮影した。
- B : HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 について、遊走能アッセイを3回繰り返し、その遊走した細胞数をカウントし細胞株間で比較した。
- C : HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 について、それぞれ FBS のない 3.0×10^5 個/ml の細胞溶液を作成し、水和させたマトリゲルのあるチャンパーに添加した。下面の FBS を含む培養液面へ浸潤した細胞について、チャンパー下面を切り取り Def quick 染色液で染色し、顕微鏡50倍拡大像を撮影した。
- D : HCC827, HCC827GR5, HCC827HGF1 について、浸潤能アッセイを3回繰り返し、その浸潤した細胞数をカウントし細胞株間で比較した。



補助図A, B : EMT array, 及び array にて差を認めた因子についての RT-PCR
HCC827 と HCC827GR5 (A), HCC827GR5 と HCC827HGF1 (B) について、RT-PCR 法を用いた EMT PCR array で相対的に変化のある EMT 関連遺伝子の発現強度を検討した。GAPDH 及び β アクチン、18S リボソームの3遺伝子を発現強度の標準化コントロールとした。

補助図AではX軸方向は HCC827 における EMT 関連遺伝子の発現強度、Y軸は HCC827GR5 における発現強度を示す。補助図BではX軸方向は HCC827GR5 における EMT 関連遺伝子の発現強度、Y軸は HCC827HGF1 における発現強度を示す。

考 察

HCC827 関連株におけるゲフィチニブ感受性株及びゲフィチニブ耐性株との比較で、HGF 産生によりゲフィチニブ耐性となった HCC827HGF1 及び HCC827HGF2 では細胞間接着が疎となり (scat-

tering), 上皮様の紡錘形の形態から間葉型の楕円形状の細胞 (round cell) へと細胞形態学的変化を起こしていることを確認した。また HCC827HGF1 では、細胞間接着因子である E-cadherin の低発現、vimentin の高発現がウエスタンブロット法で、EMT 関連転写因子である ZEB1, ZEB2 の高発現が

RT-PCR法で確認された。さらにHCC827HGF1ではHCC827と比べ癌浸潤アッセイで有意な遊走能及び浸潤能の亢進を認めた。このことからHCC827HGF1及びHCC827HGF2ではHCC827と比較しEMTを起こしていることが確認された。これに対しc-MET増幅によりゲフィチニブ耐性となったHCC827GR5及びHCC827GR6ではEMTは認められなかった。

これまでにEGFR-TKIの感受性とEMTの関連も報告され、Thomson Sら^{25,26}は、EGFR遺伝子変異のない非小細胞肺癌細胞株において、E-cadherinの低発現もしくはvimentinの高発現である間葉型の細胞株は、E-cadherinの高発現もしくはvimentinの低発現である上皮型の細胞株と比較しEGFR-TKI感受性が低いことを報告している。Suda Kら²⁷はEGFR遺伝子変異(exon19欠失; L747_E749, A750P)を有し非小細胞肺癌細胞株でエルロチニブ感受性であるHCC4006のエルロチニブ(EGFR-TKI)耐性株; HCC4006ER5を作成した際、HCC4006と比較しTGF- β 刺激及びその下流のSMAD2活性化によりE-cadherinの低発現及びvimentinの高発現を認めたと報告している。また、Chang THら²⁸は、EGFR遺伝子変異(exon19欠失; E746_A750)を有し非小細胞肺癌細胞株でゲフィチニブ感受性であるPC9においてゲフィチニブ耐性株; PC9/gefを作成した際、PC9と比較しSlugの過剰発現によりE-cadherinの低発現及びvimentinの高発現を認めたと報告している。これまでにEGFR-TKIの感受性とEMTとの関連についての報告はあるが、EGFR-TKI獲得耐性機序の異なる細胞株間でのEMTの変化を検討した報告はない。今回我々は、EGFR-TKI獲得耐性機序において、c-MET増幅とHGF産生の間EMTの明らかかな変化を認めこれを報告した。Engelmannら⁶は、c-MET増幅でのゲフィチニブ耐性機序について、HER3(human epidermal receptor 3)経路を介した細胞内シグナル活性化を示し、これはc-MET/HER3のhetero-dimerによるものであることを示した。これとは別に、Yanoら¹⁰は、HGF刺激でのゲフィチニブ耐性機序について、HER3を介さないc-MET活性によるゲフィチニブ耐性を示した。これらの違いからc-METの増幅とHGF刺激においてはc-METのdimer形成が異なり、その下流の細胞内シグナル伝達も異なる可能性が考えられる。今回我々が発見したc-MET増幅とHGF産生におけるEMTの違いは、このようなc-METのdimer形成の差異が影響している可能性が示唆される。

臨床的な問題点としては、EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌のEGFR-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一部存在する。近年、そのような悪化をdisease flareと定義した報告があり、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一因となっていると報告されている³³。一般的に、がんが転移浸潤を来す際にはEMTの獲得が報告²²⁻²⁴されており、この非小細胞肺癌におけるdisease flareもEMTと関連している可能性が考えられる。今回我々が見出したHGFによるゲフィチニブ獲得耐性機序では、EMTとそれに伴う転移浸潤能の亢進が生じることを示した。これらからEGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌のEGFR-TKI耐性症例でdisease flareとなった際、HGFによるEMTからdisease flareに至る可能性が考えられるため、今後EGFR-TKI耐性症例の臨床検体を用いて、disease flareにおけるHGFの関与を検討することが望まれる。

まとめとして、ゲフィチニブの耐性機序の差異でEMTに変化がある可能性があり、HCC827でのゲフィチニブ耐性機序において、c-MET増幅ではEMTを起こさず、HGF産生ではEMTを起こしていることが示された。またEMT自体がEGFR-TKI耐性となるかの検討はなく、これについて詳細な検討をする必要があると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご協力いただきました医局員の皆様、及び実験助手の畑下恵理奈様、山口永様、桑田季代子様には心から感謝申し上げます。

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, Settleman J, Haber DA (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 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, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 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, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) 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* 101: 13306-13311
4. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352: 786-792
 5. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H (2005) Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 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, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316: 1039-1043
 7. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang WC, Yu CJ, Gazdar A, Pass H, Rusch V, Gerald W, Huang SF, Yang PC, Miller V, Ladanyi M, Yang CH, Pao W (2007) MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20932-20937
 8. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251: 802-804
 9. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991) Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6: 501-504
 10. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Nishioka Y, Uehara H, Mitsudomi T, Yatabe Y, Nakamura T, Sone S (2008) Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 68: 9479-9487
 11. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443
 12. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R (2002) Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 41-59
 13. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF (2003) MET, metastasis, mortality, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 915-925 Review
 14. Harvey P, Warn A, Newman P, Perry LJ, Ball RY, Warn RM (1996) Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 180: 389-394
 15. Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE (1996) Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148: 225-232
 16. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997) Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 57: 5391-5398
 17. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B (2002) Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest* 109: 863-867 Review
 18. Tsao MS, Zhu H, Giaid A, Viallet J, Nakamura T, Park M (1993) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 4: 571-579
 19. Lau KM, McGlade CJ (2011) Numb is a negative regulator of HGF dependent cell scattering and Rac1 activation. *Exp Cell Res* 317: 539-551
 20. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lhembre F (2006) Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 25: 3534-3545
 21. Uramoto H, Shimokawa H, Hanagiri T, Kuwano M, Ono M (2011) Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 73: 361-365
 22. Hung CM, Kuo DH, Chou CH, Su YC, Ho CT, Way TD (2011) Osthole Suppresses Hepatocyte Growth Factor (HGF)-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Repression of the c-Met/Akt/mTOR Pathway in Human Breast Cancer Cells. *J Agric Food Chem* 59: 9683-9690
 23. Chang HY, Kao MC, Way TD, Ho CT, Fu E (2011) Diosgenin suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition by down-regulation of Mdm2 and vimentin. *J Agric Food Chem* 59: 5357-5363
 24. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454 Review
 25. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, Iwata KK, Gibson N, Haley JD (2005) Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity of Non-Small-Cell Lung Carcinoma Cell Lines and Xenografts to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Cancer Res* 65: 9455-9462
 26. Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Epstein D, Haley JD (2008) Kinase switching in mesenchymal-like non-small cell lung cancer lines contributes to EGFR inhibitor resistance through pathway redundancy. *Clin Exp Metastasis* 25: 843-854

27. Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T (2011) Epithelial to Mesenchymal Transition in an Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Cancer Cell Line with Acquired Resistance to Erlotinib. *J Thorac Oncol* 6 : 1152-1161
28. Chang TH, Tsai MF, Su KY, Wu SG, Huang CP, Yu SL, Yu YL, Lan CC, Yang CH, Lin SB, Wu CP, Shih JY, Yang PC (2011) Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 183 : 1071-1079
29. Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arai T, Nishio K, Fukuoka M, J?nne PA, Nakagawa K (2010) TAK-701, a humanized monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. *Mol Cancer Ther* 9 : 2785-2792
30. Kumar A, Xu J, Brady S, Gao H, Yu D, Reuben J, Mehta K (2010) Tissue transglutaminase promotes drug resistance and invasion by inducing mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *PLoS One* 5 : e13390
31. Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7 : 415-428 Review
32. Kim HJ, Litzenburger BC, Cui X, Delgado DA, Grabiner BC, Lin X, Lewis MT, Gottardis MM, Wong TW, Attar RM, Carboni JM, Lee AV (2007) Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Mol Cell Biol* 27 : 3165-3175
33. Chaff JE, Oxnard GR, Sima CS, Miller VA, Kris MG, Riely GJ (2011) Disease flare after tyrosine kinase inhibitor discontinuation in patients with EGFR-mutant lung cancer and acquired resistance to erlotinib or gefitinib. *Clin Cancer Res* 17 : 6298-6303