

REVIEW ARTICLE

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性機構と克服

宗 淳一¹・豊岡伸一¹・上野 剛¹・三好新一郎¹

Mechanisms and Overcome of Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors

Junichi Soh¹; Shinichi Toyooka¹; Tsuyoshi Ueno¹; Shinichiro Miyoshi¹

¹Department of Thoracic Surgery, Okayama University Hospital, Japan.

ABSTRACT — Development of effective therapies for non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations, which account for approximately 40% of lung adenocarcinoma patients in Japan, is important to improve the clinical outcome of NSCLC. EGFR-mutant NSCLCs are sensitive to EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs), and elucidating the binding affinity of adenosine triphosphate (ATP) and EGFR-TKI to wild type or mutant EGFR helps our understanding of the mechanisms of resistance to EGFR-TKI. The mechanisms of acquired resistance to EGFR-TKIs are broadly classified into two categories: 1) secondly acquired EGFR mutations including T790M and 2) “oncogene kinase switch” such as MET gene amplification. To overcome the acquired resistance, it is essential to develop new drugs and therapeutic strategies. The heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors show anti-proliferative effect by inhibiting the stabilization of various client proteins such as mutant-EGFR, MET and AKT. The clinical trials of Hsp90 inhibitors are currently conducted, which is expected to show the efficacy on NSCLC patients with any kind of acquired resistance for EGFR-TKIs.

(JLCC. 2012;52:131-135)

KEY WORDS — Acquired resistance, EGFR-TKI, T790M mutation, ATP, Hsp90 inhibitor

Reprints: Shinichi Toyooka, Department of Thoracic Surgery, Okayama University Hospital, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama, Okayama 700-8558, Japan (e-mail: toyooka@md.okayama-u.ac.jp).

要旨 — 本邦の肺腺癌の約40%に認められる epidermal growth factor receptor (EGFR) 変異肺癌に対する有効な治療法の開発は、肺癌治療成績の向上において重要である。EGFR 変異肺癌には EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) が高い感受性を示すが、遺伝子変異がもたらす EGFR 変異蛋白に対する EGFR-TKI とアデノシン 3 リン酸 (ATP) の親和性の関係を知ることは感受性・耐性の原因を理解する上で大切である。また、薬剤に対する獲得耐性の機構としては、T790M 変異に代表される EGFR 遺伝子の 2 次変異と MET 遺伝子増幅などの

キナーゼ乗り換え耐性の 2 つに大別される。EGFR-TKI 耐性肺癌の克服には、これら耐性化機構の理解に基づいた新規薬剤および治療法の開発が不可欠である。多くの薬剤が開発されているが、heat shock protein 90 (Hsp90) 阻害剤は、変異型 EGFR・MET・AKT などの複数のクライアント蛋白の安定化を阻害することで抗腫瘍効果を示すため、様々な機構を持つ EGFR-TKI 耐性肺癌への治療効果が期待され、現在臨床試験が行われている。

索引用語 — 獲得耐性, EGFR チロシンキナーゼ阻害剤, T790M 変異, ATP, Hsp90 阻害剤

¹岡山大学病院呼吸器外科。

別刷請求先: 豊岡伸一, 岡山大学病院呼吸器外科, 〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1 (e-mail: toyooka@md.okayama-u.ac.jp).

※第 51 回日本肺癌学会総会シンポジウム「肺癌の分子標的治療—基礎から臨床へ」。

はじめに

2004年のepidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異の発見は、EGFR変異肺癌に対しゲフィチニブ、エルロチニブといったEGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)が著効することから脚光を浴びている。^{1,2} EGFR変異肺癌は、本邦の肺腺癌の約40%に認められ、EGFR-TKIの抗腫瘍効果も報告されているため、その有効な治療法の開発は肺癌治療成績の向上において重要である。³ また、EGFR変異肺癌に対し、プラチナダブレットとゲフィチニブを比較した、無増悪生存期間をエンドポイントとする2つの本邦における無作為化III相試験の結果が発表され、EGFR変異肺癌に対し、ゲフィチニブの有用性が証明された。^{4,5} しかしながら、EGFR-TKIによる耐性の問題も早くから指摘されており、^{6,7} EGFR-TKI獲得耐性肺癌に対する治療法の開発も必要である。本稿ではEGFR変異とEGFR-TKIの感受性の機構、獲得耐性の機構、獲得耐性肺癌に対する薬剤について概説する。

EGFR変異に対するアデノシン3リン酸(ATP)とEGFRチロシンキナーゼ

EGFRは細胞膜に存在する膜貫通型チロシンキナーゼ型受容体で、「増殖因子(リガンド)が結合する細胞外領域」「膜貫通領域」「チロシンキナーゼを含む細胞内領域」の3つの領域から構成される。リガンドが結合するとEGFRは細胞膜上を移動し、EGFR同士または他のEGFRファミリー受容体(HER2など)とホモ/ヘテロダイマーを形成する。これにより細胞内領域にあるチロシンキナーゼ部位はアデノシン3リン酸(ATP)と結合し、ATPを利用することで細胞内領域に存在するチロシン残基をリン酸化する。チロシン残基のリン酸化は、PI3K/Akt経路、Ras/MAPK経路、Jak/STAT経路などを活性化し、細胞増殖や抗アポトーシスのシグナルが伝達される。⁸

EGFR遺伝子は7番染色体(7p12)に存在し、エクソン1~16は細胞外領域を、エクソン17は膜貫通領域を、エクソン18~28は細胞内領域をコードしている。原発性肺癌に認められるEGFR変異は、チロシンキナーゼのATP結合部位をコードしているエクソン18~21に生じ、リガンドの刺激によりチロシン残基を野生型と比較して長期間リン酸化させ、下流の細胞増殖・抗アポトーシスのシグナルを増強させることで、細胞の悪性化に関与している。^{1,2} 特に、エクソン19の欠失変異とエクソン21のコードン858のロイシンからアルギニンへの置換を来す変異(L858R変異)を有する肺癌の約80%の症例で、ゲフィチニブ、エルロチニブなどの可逆型EGFR-TKIが奏効す

るため、非常に注目されている。⁹

EGFR-TKIは、ATP結合部位に対して、ATPと競合的・可逆的に結合することで、チロシン残基のリン酸化および下流へのシグナル伝達を抑制して、抗腫瘍効果を発揮する。¹⁰ 変異型EGFRでは、ATPへの親和性が野生型と比較して低下しており、かつ、EGFR-TKIへの親和性が野生型EGFRと比較して高くなっていることが報告されている¹¹ (Figure 1)。L858R変異型EGFRであればATPへの親和性は野生型EGFRの28分の1であり、EGFR-TKIに対する親和性は約17倍高い結果であった。¹¹ EGFR-TKIは元来変異型EGFRに特異的にデザインされたものではないが、前述のように変異型EGFRは野生型EGFRに比べてATPへの親和性が低下し、EGFR-TKIへの親和性が増加しているため、高い感受性を示すと考えられている。

EGFR-TKIへの耐性化機構

EGFR-TKIへの耐性の機構は、2つの機構に大別される。1)EGFR遺伝子2次変異による耐性化と、2)キナーゼ乗り換え耐性(oncogene kinase switch)である。¹²

1. EGFR遺伝子の2次変異獲得による耐性化

EGFR変異の中でエクソン20の挿入変異、コードン790のスレオニンからメチオニンへの点変異(T790M)、コードン761のアルギン酸からチロシンへの点変異(D761Y)などがEGFR-TKI耐性化に関与するEGFR遺伝子2次変異として知られている。³ 中でもT790M変異は、EGFR-TKIに耐性が生じたEGFR変異症例の約50%に認められ、2次変異または治療前からのマイナークローン由来の変異と考えられている。^{6,7,13} T790M変異による耐性化機構として、T790M変異によりATP結合部位が構造的変化を生じてEGFR-TKIの結合が阻害されること、さらにT790M/L858R変異型EGFRではATPへの親和性がL858R単独変異型EGFRより高くなること(Figure 1)により、T790M変異はEGFR-TKIへの耐性を示すと考えられている。これらの耐性化機構を克服するために、ATPに不可逆的に結合して下流へのシグナル伝達を阻害する新規EGFR-TKIが開発され、臨床試験が行われている(Table 1)。

2. キナーゼ乗り換え耐性(oncogene kinase switch)

EGFR-TKIに耐性が生じたEGFR変異症例の約20%に、MET遺伝子増幅が認められる。¹⁴ また、その他の耐性化機構としてインスリン様増殖因子1受容体(IGF-1R)遺伝子の活性化も報告されている。¹⁵ これらの耐性化機構は、同受容体のチロシンキナーゼが活性化されることにより、EGFR-TKIの存在下でも細胞増殖や分化のシグナル伝達が促進される、言わば、「キナーゼ乗り換え(oncogene kinase switch)」が生じることによると考えら

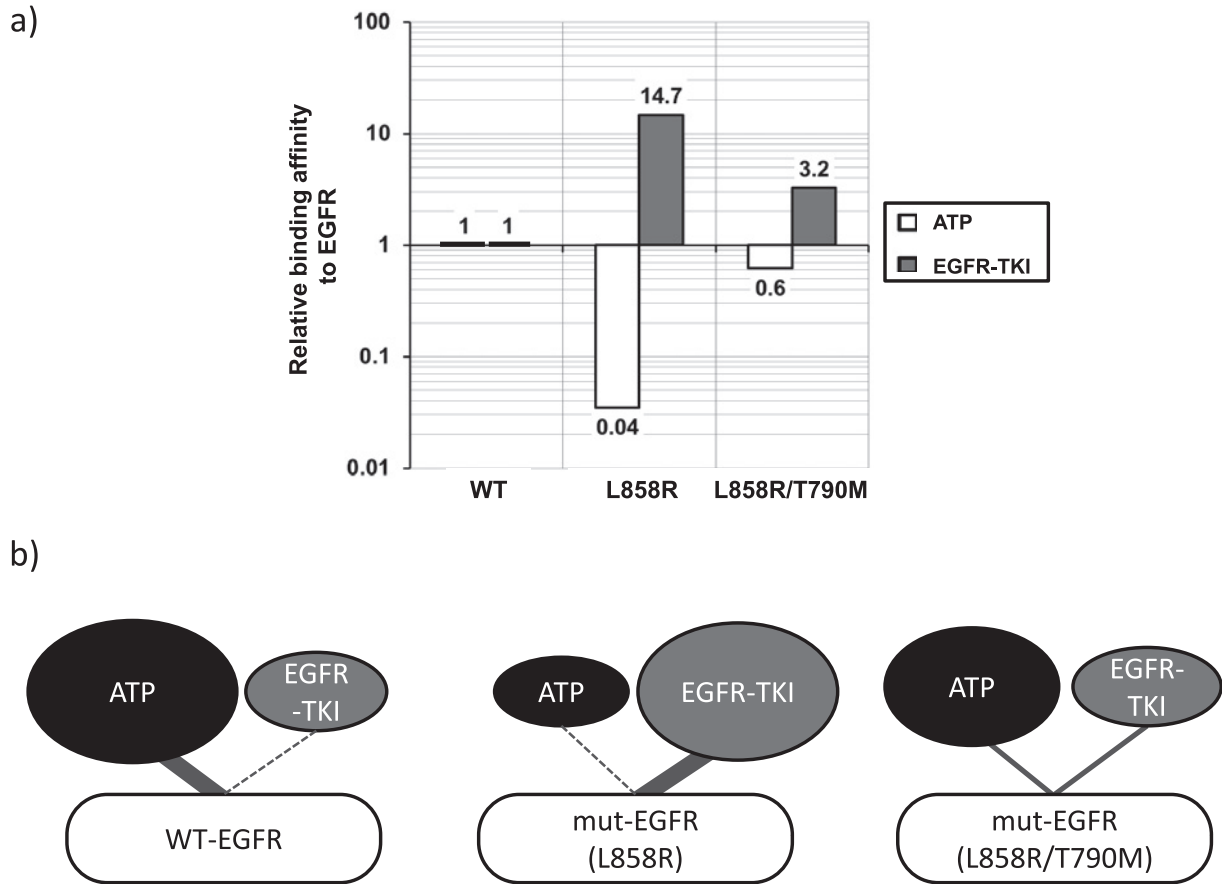


Figure 1. Binding affinity of ATP and EGFR-TKI to EGFR. **a)** Relative binding affinities of ATP and EGFR-TKI to EGFRs are shown (modified from ref 10). WT, wild type; L858R, *EGFR* exon 21 L858R mutation; T790M, *EGFR* exon 20 T790M mutation. **b)** Schema of competitive relationship between ATP and EGFR-TKI to wild type or mutant EGFR.

れる。¹² MET 阻害剤や IGF-1R 阻害剤は、これら受容体チロシンキナーゼ活性を阻害することが可能であるが、EGFR-TKI 耐性症例ではキナーゼ乗り換え後も変異 EGFR による下流のシグナル伝達は残存しているため、これら受容体阻害剤と EGFR-TKI の同時投与により抗腫瘍効果を示すことが報告されている。^{14,15} また海外では現在 MET, VEGFR2, RET の受容体キナーゼ阻害剤である XL184 と EGFR-TKI のコンビネーション治療についての臨床試験が進められている (NCT00596648) (Table 1)。なお、治療前からの MET 遺伝子増幅を持ったマイナークローンの存在が報告されている。¹⁶

その他の耐性化機構として、近年 Sequist らにより、EGFR-TKI 獲得耐性肺癌の病理組織学的検討により約 14% の症例で組織型が腺癌から小細胞肺癌となったことが報告された。¹⁷ 興味深いことに、これらの獲得耐性肺癌は小細胞肺癌の化学療法に対して感受性を示すこともわかっている。また、一部の症例では、epithelial-to-mesenchymal transition が生じていることもわかっており、EGFR-TKI 耐性化のメカニズムの 1 つとして、表現

型の変化が関連していることが示唆されている。

EGFR-TKI 耐性肺癌に対する治療

ゲフィチニブ、エルロチニブなどの EGFR-TKI に対する耐性化を克服することは肺癌治療成績向上の重要な課題である。前述の 2 つの耐性化機構を踏まえた新規治療戦略が現在検討されている。

EGFR 遺伝子 2 次変異獲得による耐性化に対する治療法として、不可逆型 EGFR-TKI が検討されている。中でも BIBW2992 は EGFR, HER2 に対する阻害剤であり、¹⁸ T790M 変異によるゲフィチニブ、エルロチニブ耐性肺癌にも効果を有することが報告されており、現在、臨床試験が行われている (Table 1)。

PF-02341066 や XL184 などの MET 阻害剤と EGFR-TKI の併用療法も現在臨床試験で検討されている (Table 1)。これらの併用療法は、キナーゼ乗り換え型の獲得耐性機構、特に MET 増幅による耐性化肺癌に対して有効であると推測される。

さらに最近では heat shock protein 90 (Hsp90) に対す

Table 1. Clinical Trials for NSCLC Patients with Acquired Resistance to EGFR-TKI

Compound	Type of TKI	ClinicalTrials.gov identifier	Population of interest	Phase	Status
BIBW2992	Irreversible EGFR/ ErbB inhibitor	NCT00711594	Advanced NSCLC with failure chemotherapy and EGFR-TKIs	II	Ongoing
PF-02341066 & PF-00299804	MET inhibitor & irreversible EGFR/ErbB2/ErbB3 inhibitor	NCT01121575	Advanced NSCLC with acquired resistance to EGFR-TKIs	I	Ongoing
XL184	VEGFR2/MET/RET inhibitor (with or without EGFR-TKI)	NCT00596648	NSCLC IIIb/IV, PD with erlotinib	I/II	Ongoing
Dasatinib	BCR/ABL, Src, c-Kit, Eph inhibitor	NCT00570401	Lung adenocarcinomas with acquired resistance to EGFR-TKIs	II	Ongoing
AUY922	Hsp90 inhibitor	NCT01259089	Lung adenocarcinomas with acquired resistance to EGFR-TKIs	I/II	Ongoing

All data were queried from ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov/>).

る阻害剤が注目されている。Hsp90は癌化に関与する蛋白質群のシャペロン蛋白である。クライアント蛋白には癌のシグナル伝達に関連する蛋白が多数含まれ、Hsp90はその安定化に寄与している。T790M変異を含むEGFR変異蛋白、MET、その下流にあるAKTなどは、Hsp90のクライアント蛋白であるため、Hsp90阻害により、これらの安定化が失われ、肺癌において抗腫瘍効果を示すことが報告されている。^{19,20} Hsp90阻害剤として、geldanamycin (GM)の誘導体である17allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)や17dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)が知られる。特に、17-DMAGは経口投与可能な薬剤であり、17-DMAGがT790M変異を含むEGFR-TKI耐性化肺癌に対して、*in vitro*, *in vivo*において抗腫瘍効果を示すことが報告されている。^{19,21} 前述のように、これらHsp90阻害剤は、EGFR遺伝子の2次変異を獲得した耐性肺癌にも、MET遺伝子増幅などキナーゼ乗り換え型耐性肺癌にも有用であるため、EGFR-TKI耐性肺癌に対する治療薬としての可能性が検討されている。しかしながら、これらのHsp90阻害剤は臨床試験でその有効性・安全性を証明できず、臨床応用には至っていない。そこで我々は治療効果と毒性を改善した新しいHsp90阻害剤NVP-AUY922について*in vitro*の検討を行い、17-DMAGより低い薬物濃度でT790M変異を含むEGFR変異細胞株およびその他の多くの肺癌細胞株に対して、高い抗腫瘍効果を示すことを見出している。²² 現在、EGFR-TKI耐性肺癌などに対して海外では臨床試験が行われており (Table 1)、新規肺癌治療薬となりうるか今後注目したい。

おわりに

EGFR-TKIへの耐性化は、2次性EGFR変異やMET遺伝子増幅などのキナーゼ乗り換えにより生じる。これら耐性化機構は、キナーゼのリン酸化のキーププレーヤー

であるATPの結合能が変化すること、または異なるキナーゼにスイッチすることにより生じている。これら耐性化機構を詳細に理解することは、EGFR-TKI耐性肺癌に対する治療戦略を考える上で非常に有用である。今後のさらなる知見の集積により、新たな治療戦略の確立を急ぐ必要がある。

本論文内容に関連する著者の利益相反：豊岡伸一〔講演料〕アストラゼネカ (株)、〔寄付金〕アストラゼネカ (株)

REFERENCES

1. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, 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, 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. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1167-1173.
4. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:121-128.
5. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362:2380-2388.
6. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2005;352:786-792.
7. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R,

- Zakowski MF, et al. 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.
8. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-137.
 9. Toyooka S, Takano T, Kosaka T, Hotta K, Matsuo K, Ichihara S, et al. Epidermal growth factor receptor mutation, but not sex and smoking, is independently associated with favorable prognosis of gefitinib-treated patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99:303-308.
 10. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res.* 2002;62:5749-5754.
 11. Eck MJ, Yun CH. Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:559-566.
 12. Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer.* 2009;10:281-289.
 13. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66:7854-7858.
 14. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316:1039-1043.
 15. Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest.* 2008;118:2609-2619.
 16. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 2010;17:77-88.
 17. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3:75ra26.
 18. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, et al. BIBW 2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene.* 2008;27:4702-4711.
 19. Shimamura T, Li D, Ji H, Haringsma HJ, Liniker E, Borgman CL, et al. Hsp90 inhibition suppresses mutant EGFR-T790M signaling and overcomes kinase inhibitor resistance. *Cancer Res.* 2008;68:5827-5838.
 20. Sawai A, Chandarlapaty S, Greulich H, Gonen M, Ye Q, Arteaga CL, et al. Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel. *Cancer Res.* 2008;68:589-596.
 21. Kobayashi N, Toyooka S, Soh J, Yamamoto H, Dote H, Kawasaki K, et al. The anti-proliferative effect of heat shock protein 90 inhibitor, 17-DMAG, on non-small-cell lung cancers being resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Lung Cancer.* 2012;75:161-166.
 22. Ueno T, Tsukuda K, Toyooka S, Ando M, Takaoka M, Soh J, et al. Strong anti-tumor effect of NVP-AUY922, a novel Hsp90 inhibitor, on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2012;76:26-31.