

REVIEW ARTICLE

BIM 遺伝子多型に起因する EGFR-TKI 耐性の治療法開発の現状

竹内伸司¹

Development of Therapy for Overcoming EGFR-TKI Resistance due to BIM Polymorphisms

Shinji Takeuchi¹

¹Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Japan.

ABSTRACT — Apoptosis resistance has recently been reported to be a factor which induces resistance to EGFR-TKI at an early stage in EGFR mutant lung cancer. BIM is a BH3-only pro-apoptotic protein, and its upregulation is required for apoptotic induction by EGFR-TKI. Notably, a BIM deletion polymorphism occurs naturally in 13% of East Asian individuals, impairing the generation of the pro-apoptotic isoform required for EGFR-TKI, therefore conferring an inherent drug-resistant phenotype. We previously reported that an HDAC inhibitor, vorinostat, could increase the expression of functional BIM protein, which was sufficient to restore gefitinib sensitivity. An investigator-initiated Phase I trial using vorinostat and gefitinib combination therapy in a multi-institution study for EGFR mutant lung cancer patients who have a BIM polymorphism is currently under way.

(JLCC. 2015;55:941-947)

KEY WORDS — EGFR mutant lung cancer, EGFR-TKI, Apoptosis, BIM polymorphism, Histone deacetylase inhibitor

要旨 — 近年, EGFR 変異肺癌細胞のアポトーシス抵抗性が EGFR-TKI 耐性を早期に誘導する因子として報告されてきている. BH3-only 蛋白である BIM は EGFR 変異肺癌の EGFR-TKI によるアポトーシス誘導に必須である. この BIM 遺伝子において 2 番目のイントロンの 2903 塩基が欠失する多型を有すると, 活性型 BIM 蛋白の発現が低下し, EGFR-TKI によるアポトーシスに抵抗性を示す. この BIM 遺伝子多型は東アジア人特異的に約 13% に検出されており, EGFR-TKI 耐性のバイオマーカーとなり得ることが示唆されている. 我々は, ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるボリノスタットを

EGFR-TKI に併用することで, 活性型 BIM 蛋白の発現を促進し, BIM 遺伝子多型に起因するアポトーシス抵抗性を克服できることを明らかにした. 得られた知見を基に, BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌を対象としてゲフィチニブにボリノスタットを併用する第 I 相試験を, 多施設共同医師主導治験として実施している.

索引用語 — 上皮成長因子受容体(EGFR)変異肺癌, EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI), アポトーシス, BIM 遺伝子多型, ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

はじめに

上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブやエルロチニブは, EGFR 活性

型変異を有する非小細胞肺癌 (以下 EGFR 変異肺癌) に対して高い奏効率を示す. しかしながら 20~30% の症例では自然耐性を示し, 奏効例においても 1 年程度の経過で耐性を獲得する. この EGFR-TKI に対する耐性

¹金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科.

※第 55 回日本肺癌学会学術集会シンポジウム 7 「分子標的治療

の耐性克服~耐性メカニズム解明と治療の最前線~」.

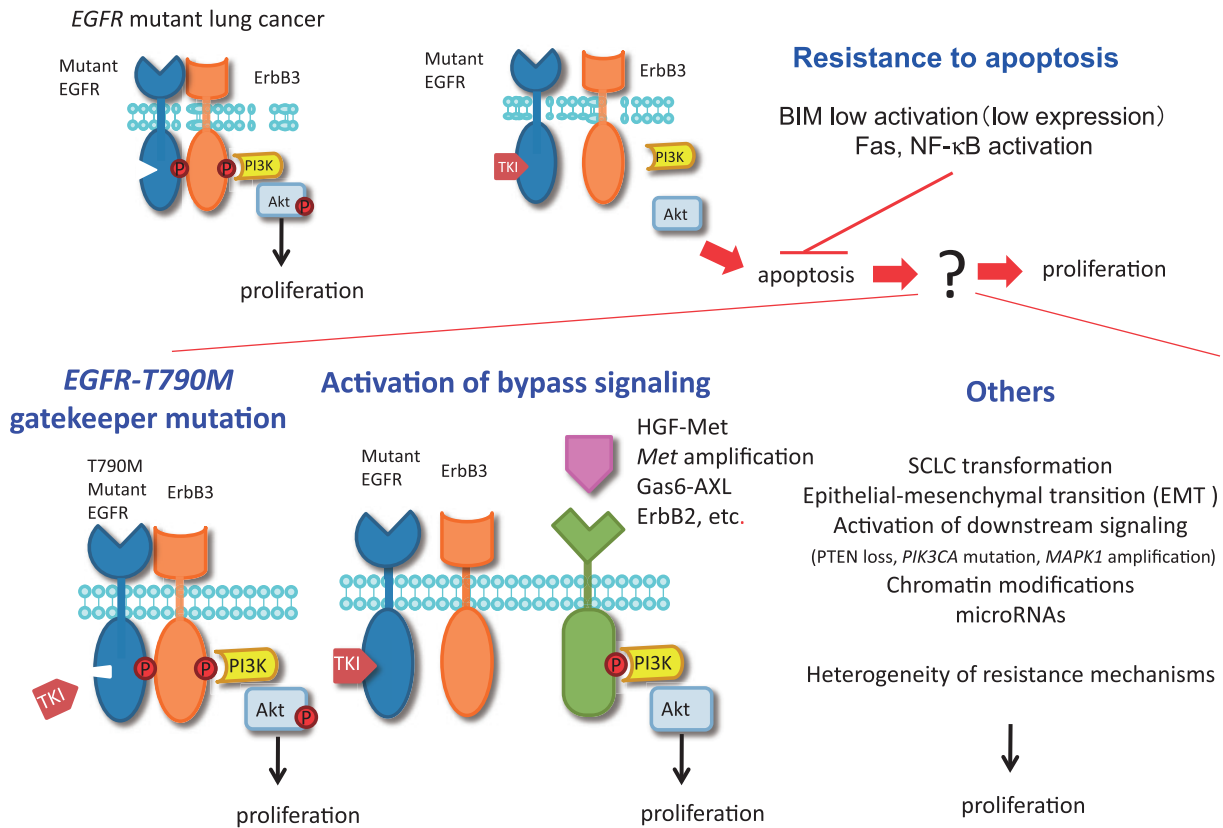


Figure 1. Mechanisms of resistance to EGFR-TKIs in *EGFR* mutant lung cancer cells.

については *EGFR-T790M* 二次的遺伝子変異,¹ *Met* 遺伝子増幅,² HGF 高発現,³ 小細胞がんへの転化, 上皮間葉転換⁴ など多くの耐性メカニズムが報告されてきたが, 最近, アポトーシス抵抗性が EGFR-TKI 耐性を誘導する因子として注目されている. *BIM* (Bcl-2-like protein 11: BCL2L11) 活性の低下, *Fas* 及び *NF-κB* シグナルの活性化などが要因として報告されているが, このうち *BIM* については臨床検体を用いた検討も進められてきた. 現在までのところ, これらアポトーシス抵抗性を有する腫瘍が増殖するために, どのようなメカニズムを獲得するかはわかっていない (Figure 1). この *BIM* 活性低下の要因として *BIM* 遺伝子の欠失多型 (以下 *BIM* 遺伝子多型) が報告され, EGFR-TKI 耐性のバイオマーカーとして有望視されている. 本稿では, この *BIM* 遺伝子多型による EGFR-TKI 耐性機構とその克服治療戦略について, 我々が得た知見を交えて概説する.

BIM 遺伝子多型

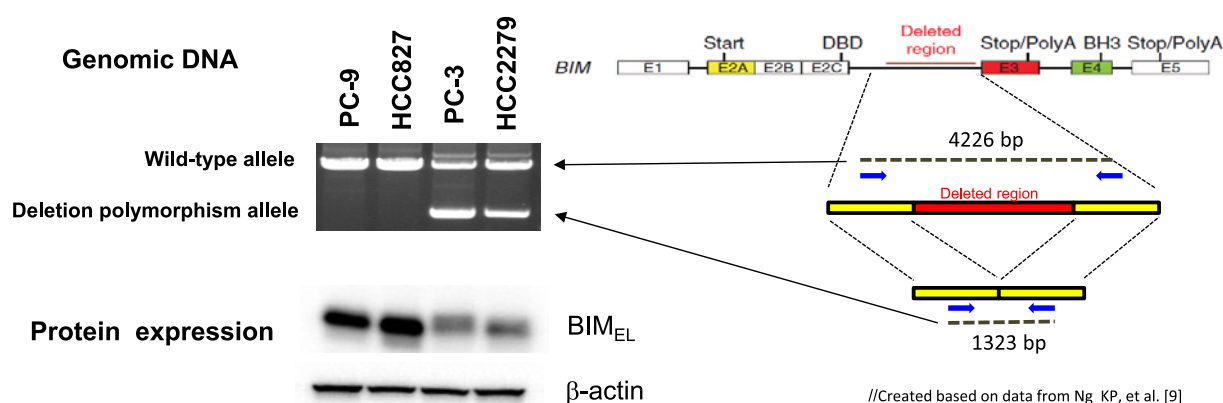
BIM は Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス促進蛋白であり, *BIM_{EL}* を主として, *BIM_L*, *BIM_S* などアポトーシスの誘導に必須な BH3 ドメインを有する遺伝子産物が, アポトーシス抑制因子である Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1

を阻害, またはアポトーシス促進因子である BAX, BAK を活性化することで, アポトーシスを誘導することが知られている.⁵ *BIM* は EGFR 変異肺がんにおいて, EGFR-TKI によるアポトーシス誘導に中心的な役割を果たしており, 腫瘍細胞における *BIM* の発現が低いと, EGFR-TKI によるアポトーシスに抵抗性をきたし, EGFR-TKI による無増悪生存期間 (以下 PFS) が短いことが報告されている.^{6,7} さらに, 最近 EURTAC 試験の検体を用いた解析で, EGFR 変異肺がんの腫瘍における *BIM* 発現が低い症例は, エルロチニブによる PFS が短く, 全生存期間 (以下 OS) も有意に短いことが報告され, 耐性因子として重要であることが明らかになった.⁸ しかし, これらの報告は腫瘍組織における *BIM* mRNA の発現量で解析されており, 臨床応用するためには, 基準をどのように設定するか, また, mRNA の定量は検体の質によって大きく影響を受けることも課題であり, より客観的に評価できるバイオマーカーが望まれる. 一方で, 2012 年に *BIM* 遺伝子に特定の多型があると, *BIM* 活性低下の原因となり得ることが報告された.⁹ *BIM* 遺伝子が野生型の場合, BH3 ドメインを有する活性型の *BIM* が転写産物として多く発現するが, *BIM* 遺伝子のイントロン 2 において 2903 塩基が欠失している多型を有する

Table 1. Summary of Previous Reports on the Correlation Between *BIM* Polymorphisms and EGFR-TKI Therapeutic Effects in *EGFR* Mutant Lung Cancer

| References | No. of patients (treatment of EGFR-TKI) | <i>BIM</i> polymorphism | No. of patients | PFS (months) | ORR* (%) | OS (months) |
|----------------------|---|----------------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Ng KP, et al. [9] | 141 | – | 115 | 11.9 | NA [‡] | NA |
| | (136: treated with gefitinib) (5: treated with erlotinib) | + | 26 | 6.6 ($p^{\dagger} = 0.0027$) | NA | NA |
| Lee JK, et al. [10] | 197 | – | 172 | 11.3 | NA | NA |
| | (179: treated with gefitinib) (18: treated with erlotinib) | + | 21 | 11.9 ($p = 0.791$) | NA | NA |
| Lee JH, et al. [11] | 101 | – | 84 | 8.1 | NA | 22.1 |
| | (101: treated with gefitinib) | + | 17 | 3.6 ($p < 0.001$) | NA | 14.1 ($p = 0.041$) |
| Isobe K, et al. [12] | 70 | – | 57 | 17.7 | 64.9 | 45.5 |
| | (65: treated with gefitinib) (5: treated with erlotinib) | + | 13 | 7.5 ($p < 0.001$) | 61.5 (NS [§]) | 39.2 ($p = 0.27$) |
| Zhao M, et al. [13] | 166 | – | 150 | 11 | 66 | NA |
| | (26: treated with gefitinib) (140: treated with erlotinib) | + | 16 | 4.7 ($p < 0.001$) | 25 ($p = 0.001$) | NA |

*ORR, the overall response rate, [‡]NA, not applicable, [§]NS, not significant.

**Figure 2.** *BIM* polymorphism in *EGFR* mutant lung cancer cell lines.

と、BH3ドメインをもたず、アポトーシスが誘導できない転写産物である *BIM* γ が主に発現し、EGFR-TKIによるアポトーシスに抵抗性を示す。この遺伝子多型は欧米人には認められず (German: 0/595人, African: 0/60人)、東アジア人に特異的に検出されている。多くの場合はヘテロ接合型であるが、まれに (0.5%) ホモ接合型で欠失多型が認められる。EGFR変異肺癌141例の検討では、*BIM* 遺伝子野生型115症例のEGFR-TKIによる無増悪生存期間中央値 (median PFS) が11.9ヶ月であるのに対して、*BIM* 遺伝子多型陽性26症例では6.6ヶ月と有意に短く、この *BIM* 遺伝子多型がEGFR-TKI耐性のバイオマーカーとなり得ることが示唆された。*BIM* 遺伝子多型とEGFR-TKI治療効果との相関に関する5つの報告⁹⁻¹³のうち、4つにおいて、*BIM* 遺伝子多型を有すると有意にPFSが短いことが示されており (Table 1)、これ

らの試験結果に基づいたメタアナリシスの結果でもEGFR変異肺癌のEGFR-TKI耐性のバイオマーカーとしての意義が示されている。¹⁴ このように *BIM* 活性低下がEGFR-TKI耐性を誘導することが強く示唆されているが、その耐性を克服する治療戦略は確立されていない。そこで、我々は *BIM* 遺伝子多型に起因するEGFR-TKI耐性を克服する治療開発を目的として検討を行った。

HDAC阻害薬：ポリノスタット

ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) は、クロマチンリモデリングに関わる酵素であり、遺伝子発現のエピジェネティックな調節に重要な役割を果たす。¹⁵ 抗悪性腫瘍薬としてHDACを標的とした化合物が数多く開発されており、その一つであるポリ

ノスタット (ゾリンザ®) は経口投与可能かつ強力な HDAC 阻害薬である。¹⁶ ポリノスタットは, クラス I (HDAC1, 2 及び 3) 及びクラス II (HDAC6) の HDAC の触媒ポケットに直接結合し, その酵素活性を低濃度

(IC₅₀ ≤ 86 nM) で阻害する. ポリノスタットは 2006 年 10 月に米国において皮膚 T 細胞性リンパ腫を適応症として承認された. 本邦においても, 2010 年 6 月に皮膚 T 細胞性リンパ腫に対する治療薬として希少疾病用医薬品の指定を受け, 2011 年 7 月に皮膚 T 細胞性リンパ腫を適応症として承認されている. 前臨床の検討では, ポリノスタットはマントル細胞リンパ腫において, *BIM* を含む遺伝子群のプロモーター領域のアセチル化を促進し, *BIM* 蛋白の発現を上昇させることが報告されている.¹⁷ そこで, 我々は *BIM* 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺癌んに対して EGFR-TKI に HDAC 阻害薬であるポリノスタットを併用することにより, BH3 ドメインを有する, すなわちアポトーシス誘導活性がある *BIM* 蛋白の発現を促進することでアポトーシス誘導能を回復させ, EGFR-TKI 耐性を克服できるか検証を行った.

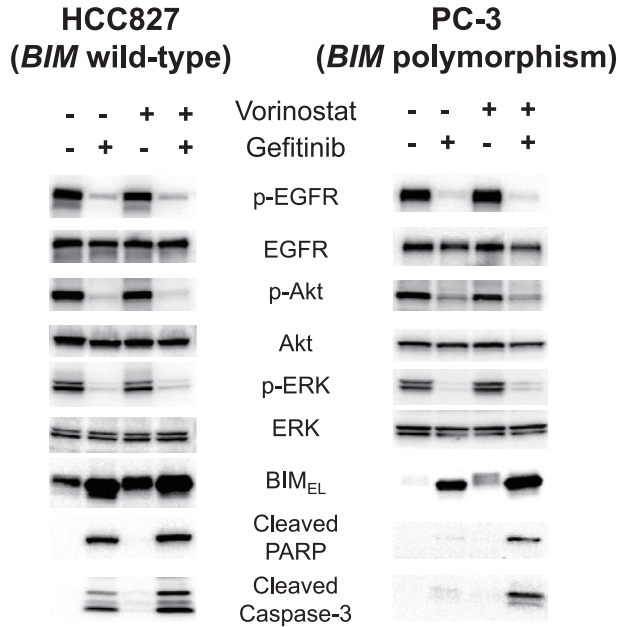


Figure 3. The apoptosis-inducing effect by combined use of gefitinib and vorinostat on EGFR mutant lung cancer cell lines with or without *BIM* polymorphism *in vitro*.

ゲフィチニブとポリノスタットの併用効果

まず, EGFR 変異肺癌ん細胞株における *BIM* 遺伝子多型の有無について PCR 法で解析した. HCC827 及び PC-9 細胞は *BIM* 遺伝子野生型を示す 4.2 kb のバンドのみ検出され, 欠失多型がないことが確認された. HCC2279 細胞は既報⁹の通り, 4.2 kb のバンドと, 欠失領域を有するアレルから増幅される 1.3 kb のバンドが増幅され, *BIM* 遺伝子多型をヘテロ接合型で有する細胞株であることが確認された (Figure 2). さらに我々は, 日本人の

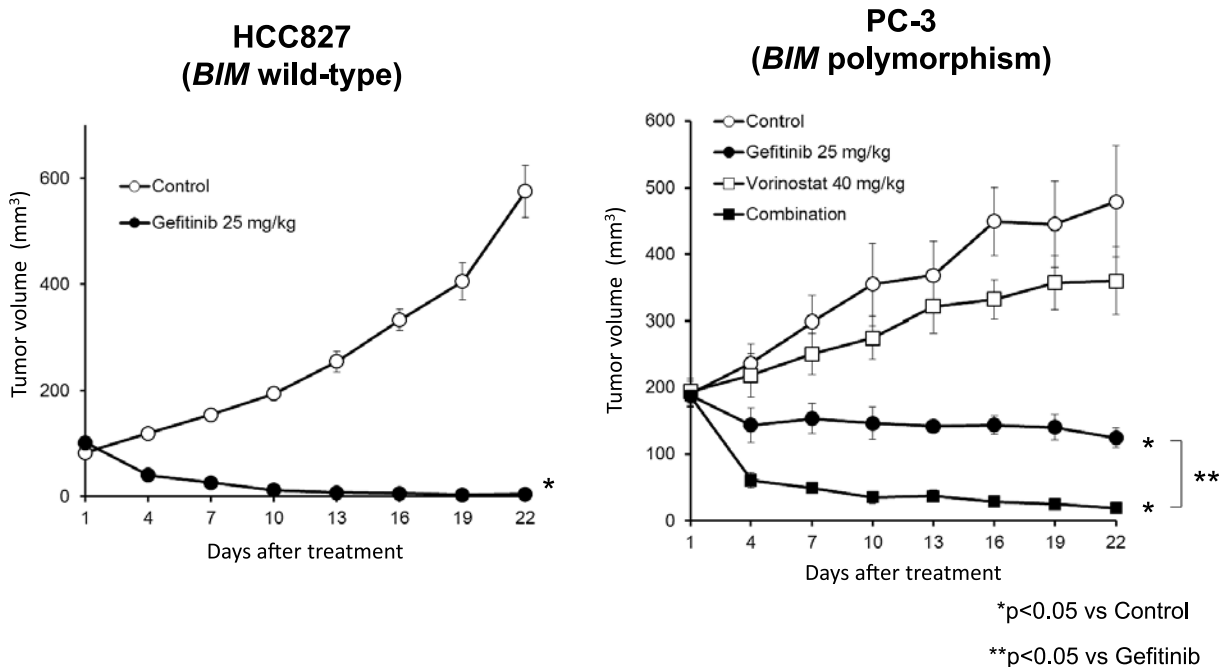


Figure 4. The anti-tumor effect of combination treatment of gefitinib and vorinostat against subcutaneous xenograft tumors in mice.

EGFR 変異肺がん症例から樹立された細胞株である PC-3 細胞も *BIM* 遺伝子多型をヘテロ接合型で有することを、新たに見出した。細胞から蛋白を抽出してウエスタンブロット法で解析したところ、*BIM* 遺伝子多型を有する PC-3 細胞、HCC2279 細胞においては活性型である *BIM_{EL}* の発現が低いことが確認された。これらの細胞株

を用いて、ゲフィチニブとポリノスタットの効果について *in vitro* で検討した。*BIM* 遺伝子が野生型である HCC827 細胞はゲフィチニブ単剤の処理によって、EGFR, Akt, ERK のリン酸化が阻害され、アポトーシス誘導の指標である cleaved-PARP, cleaved-caspase が発現した。一方、*BIM* 遺伝子多型を有する PC-3 細胞はゲフィチニブ単剤の処理によって、EGFR, Akt, ERK のリン酸化が抑制されているにもかかわらず、活性型の PARP, caspase の発現はほとんど認めず、アポトーシスに抵抗性であった (Figure 3)。一方で、HDAC 阻害薬であるポリノスタットをゲフィチニブに併用すると活性型 *BIM* 蛋白 (*BIM_{EL}*) の発現が上昇し、アポトーシスが誘導された。さらに、ポリノスタットの *in vivo* における併用効果について、マウス皮下移植モデルを用いて検討を行った。HCC827 皮下腫瘍はゲフィチニブ投与により著明な縮小効果を認めたが、一方で *BIM* 遺伝子多型を有する PC-3 皮下腫瘍ではゲフィチニブを投与してもほとんど腫瘍は縮小せず、アポトーシスに抵抗性であることが示唆された。また、ポリノスタット単剤では腫瘍は全く縮小しなかったが、ゲフィチニブとポリノスタットを併用すると PC-3 皮下腫瘍は著明に縮小した (Figure 4)。これら腫瘍

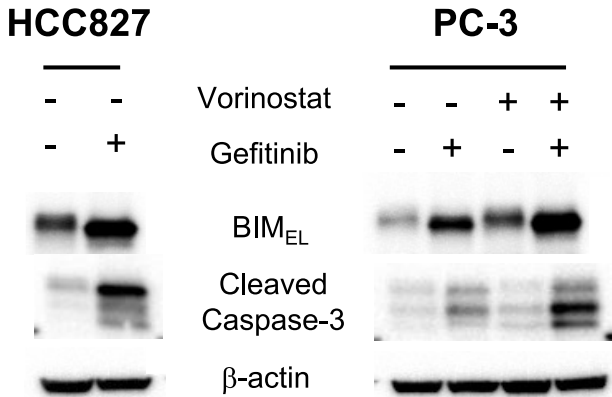


Figure 5. Induction of apoptosis in tumors by gefitinib and vorinostat treatment.

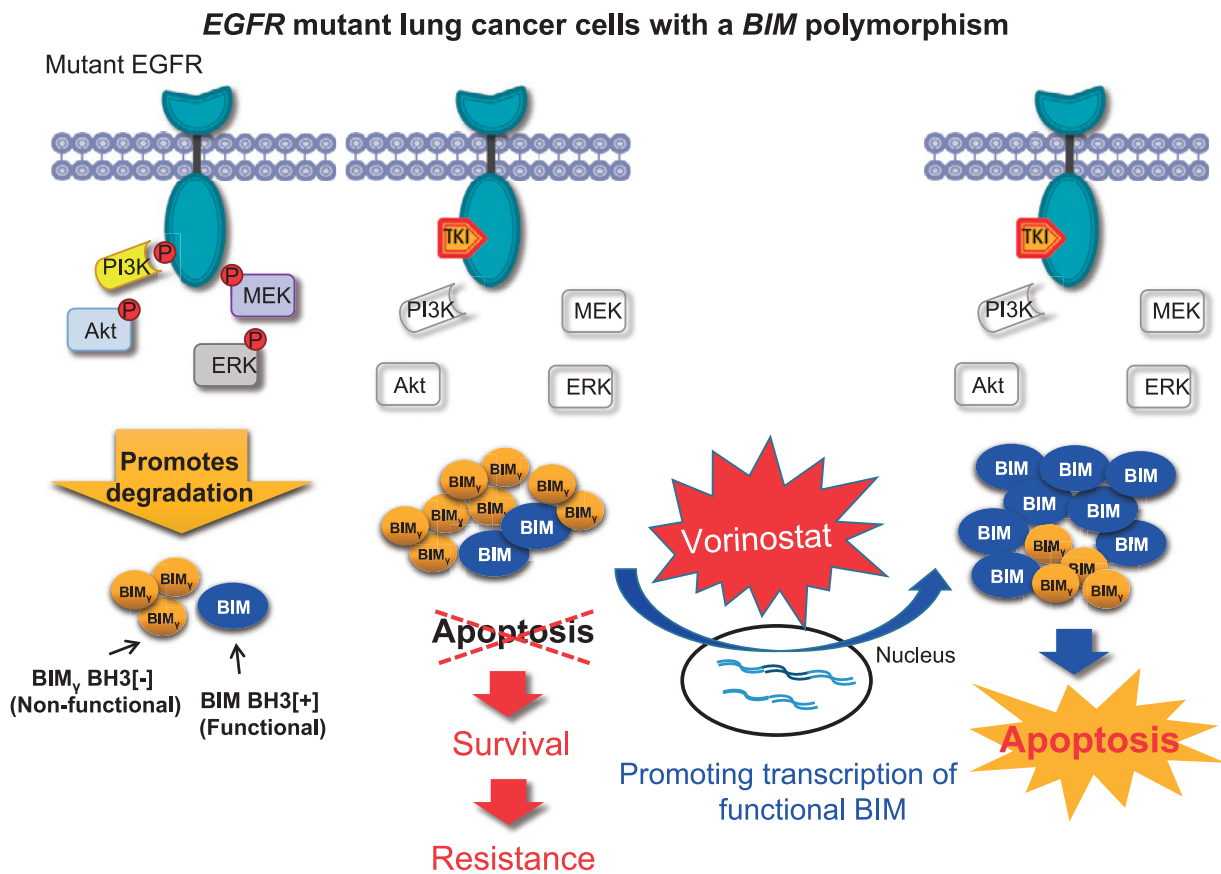


Figure 6. Strategy for overcoming resistance due to *BIM* polymorphism by HDAC inhibition.

を採取して、ウエスタンブロット法で蛋白発現を解析したところ、HCC827皮下腫瘍ではゲフィチニブ単剤でcleaved caspase-3の発現が著明に上昇しており、アポトーシスが誘導されていた。一方、PC-3皮下腫瘍はゲフィチニブ単剤ではアポトーシス誘導はわずかであり、ポリノスタットを併用することで活性型BIM蛋白とcleaved caspase-3の発現が上昇しており、アポトーシスが誘導されていることが確認された (Figure 5)。以上の結果から、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌細胞において、HDAC阻害薬であるポリノスタット併用により、活性型BIM蛋白発現上昇を介してアポトーシス誘導能を回復し、EGFR-TKI耐性を克服できることが*in vitro*, *in vivo*の検討で明らかになった¹⁸(Figure 6)。以上の知見を基に、我々は名古屋大学、東北大学、静岡県立静岡がんセンター、先端医療センターと共同で、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌を対象としてゲフィチニブとポリノスタットを併用する第I相臨床試験を医師主導治験として実施しており、2015年度に症例登録を完了する予定である (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02151721)。

おわりに

EGFR-TKI耐性について、これまでEGFRの二次的変異やHGF-METを介したバイパスシグナルなどの、増殖シグナルにおける耐性メカニズムが多く報告されてきた。それぞれの耐性機序に対する特異的な阻害薬の臨床開発が進められており、耐性時の腫瘍細胞を用いた解析の重要性が高くなってきている。一方で、最近アポトーシス抵抗性が耐性を誘導する因子として注目されてきている。本稿で既に述べた通り、特にEGFR変異肺癌細胞においてはBIMがEGFR-TKIによるアポトーシス誘導に中心的役割を果たすことが明らかとなっており、BIM活性が低下するとEGFR-TKIによるアポトーシスに抵抗性をきたす。活性低下の一因と考えられるBIM遺伝子多型は血液を用いて測定することが可能であるため、BIM活性低下のバイオマーカーとして非常に有望である。東アジア人に特異的な遺伝子多型であることから、本邦において臨床研究、耐性克服治療の開発が進むことが期待される。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

REFERENCES

1. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2070-2075.
2. 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.
3. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res*. 2008;68:9479-9487.
4. 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.
5. Akiyama T, Dass CR, Choong PF. Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:3173-3180.
6. Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggan TJ, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med*. 2007;4:1669-1679.
7. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist LV, Waltman BA, Chung E, et al. BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. *Cancer Discov*. 2011;1:352-365.
8. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Giménez-Capitán A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin Cancer Res*. 2014;20:2001-2010.
9. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 2012;18:521-528.
10. Lee JK, Shin JY, Kim S, Lee S, Park C, Kim JY, et al. Primary resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with non-small-cell lung cancer harboring TKI-sensitive EGFR mutations: an exploratory study. *Ann Oncol*. 2013; 24:2080-2087.
11. Lee JH, Lin YL, Hsu WH, Chen HY, Chang YC, Yu CJ, et al. Bcl-2-like protein 11 deletion polymorphism predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2014;9:1385-1392.
12. Isobe K, Hata Y, Tochigi N, Kaburaki K, Kobayashi H, Makino T, et al. Clinical significance of BIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation. *J Thorac Oncol*. 2014;9:483-487.
13. Zhao M, Zhang Y, Cai W, Li J, Zhou F, Cheng N, et al. The Bim deletion polymorphism clinical profile and its relation with tyrosine kinase inhibitor resistance in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2014;120:2299-2307.
14. Ying HQ, Chen J, He BS, Pan YQ, Wang F, Deng QW, et al. The effect of BIM deletion polymorphism on intrinsic resistance and clinical outcome of cancer patient with kinase inhibitor therapy. *Sci Rep*. 2015;5:11348.
15. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*.

- 2006;5:769-784.
16. 医薬品インタビューフォーム「抗悪性腫瘍剤 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 ゴリンザ[®]カプセル 100mg」. 2013年8月改訂（第4版）.
 17. Xargay-Torrent S, López-Guerra M, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Campo E, Roué G, et al. Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin Cancer Res.* 2011;17:3956-3968.
 18. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, et al. EGFR-TKI resistance due to *BIM* polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition. *Cancer Res.* 2013;73:2428-2434.