



Title	KRAS変異肺癌における上皮間葉移行に基づいたMEK阻害薬による受容体型チロシンキナーゼのフィードバック機構に関する研究
Author(s)	北井, 秀典
Description	配架番号 : 2347
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12933号
Issue Date	2017-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12933
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68566
Type	doctoral thesis
File Information	Hidenori_Kitai.pdf



学位論文

KRAS 変異肺癌における上皮間葉移行に基づいた MEK 阻害薬による受容体型チロシンキナーゼのフィードバック機構に関する研究
(Studies on feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition based on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in KRAS mutant lung cancer)

2017 年 12 月

北海道大学

北井 秀典

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	13 頁
実験方法	15 頁
実験結果	21 頁
考察	48 頁
総括および結論	51 頁
謝辞	52 頁
引用文献	53 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Hidenori Kitai, Hiromichi Ebi, Shuta Tomida, Hiroshi Kotani, Yuta Adachi, Konstantinos V. Floros, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura, Anthony C. Faber, Seiji Yano

Epithelial-to-mesenchymal transition defines feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer

Cancer Discovery; 6(7); 754–69.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

北井 秀典、衣斐 寛倫、小谷 浩、足立 雄太、富田 秀太、大泉 聡史、西村 正治、矢野 聖二

上皮間葉移行に基づいた **KRAS** 変異肺癌に対する **MEK** 阻害薬の新規治療戦略

第 57 回日本肺癌学会学術集会(シンポジウム 17-4) 2016 年 12 月 21 日 福岡

緒言

1. 肺癌の薬物治療の変遷

肺癌は日本の癌死亡数の第1位であり患者数は増加の一途をたどっている。1990年代の本邦における進行非小細胞肺癌の薬物療法は、プラチナ製剤(cisplatinあるいはcarboplatin)と新規抗癌剤(gemcitabine、vinorelbine、irinotecan、Paclitaxel)の2剤併用が標準治療であった。しかし、この2剤併用化学療法による生存期間中央値は約1年であり、決して予後良好とはいえなかった。その後2002年に本邦で初めてEGFR(epidermal growth factor receptor)-TKI (tyrosine-kinase inhibitor)であるgefitinibが承認され高い奏功率を示した。当初その抗腫瘍効果の機序は明らかではなかったが、2004年にgefitinibが奏功した非小細胞肺癌患者にEGFRチロシンキナーゼドメインの変異が多く認められることが報告され、in vitroでもgefitinibの感受性との関連が証明された^{1,2}。本邦でもEGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌患者を対象としたgefitinibとプラチナ製剤含む2剤併用化学療法を比較した臨床試験が行われた。その中で、NEJ002試験とWJOG3405試験において、gefitinib群で奏効率60~70%、無増悪生存期間が約10ヶ月と非常に良好な成績であり、gefitinib群の細胞障害性化学療法に対する優越性が示された^{3,4}。さらにEGFR遺伝子変異を有する肺癌患者にEGFR-TKIを使用した場合の生存期間中央値は30.9ヶ月と報告され、EGFR-TKIにより明らかな予後の改善が認められた⁵。

EGFR 遺伝子変異のように、癌に存在する遺伝子変異のうち、癌細胞の生存に大きく依存しているものはドライバー変異と呼ばれている。近年、特に肺腺癌においては様々なドライバー変異が発見されている。先述した EGFR 遺伝子変異は日本人において肺腺癌の約半数に認められ、その他にも頻度は少ないが、ALK(anaplastic lymphoma kinase) fusion、ROS-1(ROS proto-oncogene 1) fusion、RET(rearranged during transfection fusion)、BRAF(v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B)変異などの遺伝子異常が発見されている(図 1)⁶。これらのドライバー変異を有する肺癌においても、各々のドライバー変異を対象とした分子標的薬を用いた臨床試験が行われ、高い抗腫瘍効果が認められている⁷⁻¹⁰。このようにドライバー変異タンパクに対する阻害薬の開発は肺癌患者の予後改善において重要と考えられる。

肺腺癌におけるドライバー変異の中でも、KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)遺伝子変異は海外で最も頻度が多く20~30%¹¹、日本においても約10%程度認められるが、未だ有効な分子標的治療は確立されていない。

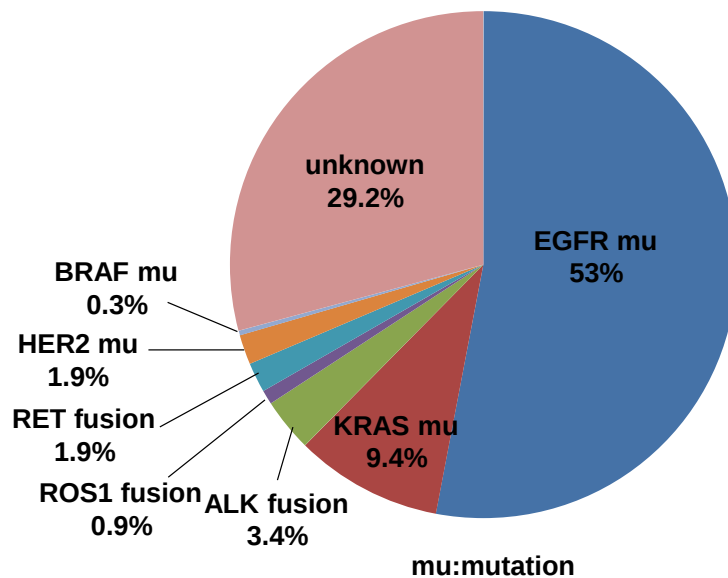


図1 肺腺癌におけるドライバー変異

肺腺癌におけるドライバー遺伝子変異の種類と頻度を示す。

2. RASの遺伝子変異について

RAS(rat sarcoma)はヒトの発癌遺伝子として1982年に発見された分子量約21000の低分子タンパクでありKRAS、NRAS、HRASの3種類のアイソフォームが存在する^{12,13}。RASはGTPまたはGDPが結合する部位を有しており、RTK (receptor tyrosine kinase) からのシグナルを受けるとGEF (guanine nucleotide exchange factor) によりGDPがGTPに変換され活性型RASとなる。活性型RASはGAP (GTPase-activating protein) と結合するとGTPの加水分解反応が促進され不活性型となる(図2)。

RASに起きる遺伝子変異の97-99%は12、13、61番目のコドンのミスセンス変異であり、いずれも活性型の変異を引き起こす。このミスセンス変異は、RASのアイソフォーム別ではKRAS 85%、NRAS 12%、HRAS 3%に生じ、ほとんどがKRASに認められる(図3)¹⁴。RASに遺伝子変異が起こると、RASのGAPへの感受性が低下し、結果的に活性型RASが優位になるため、恒常的に下流シグナルが活性化される。この過剰なシグナルが、発癌や癌の増殖に関与するとされている。COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)¹⁵のデータベースによれば、ヒトの癌全体におけるRASの遺伝子変異の割合はKRAS21%、NRAS8%、HRAS3%とされており、特に膵癌、大腸癌、肺癌で多く認められる。

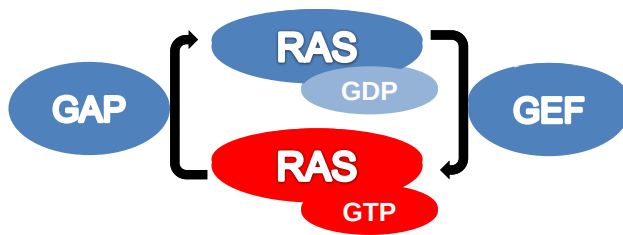


図2 RASの活性化

RASに遺伝子変異が起こるとRASのGAPへの感受性が低下し、活性型RASが優位になる。

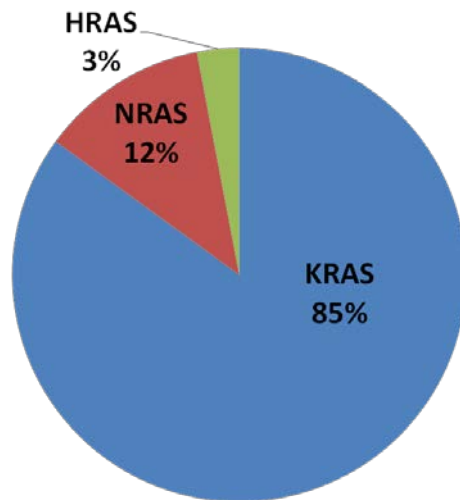


図3 RASのミスセンス変異の割合

RASのアイソフォーム別ではKRAS 85%、NRAS 12%、HRAS 3%にミスセンス変異が生じる。

3. ERK(extracellular signal-regulated kinase)経路について

MAPK(mitogen-activated protein kinase)経路は酵母から哺乳動物まで高度に保存された細胞内シグナル伝達経路である。この経路は複数の基質特異性の高いセリン・スレオニンキナーゼによりタンパク質のリン酸化が段階的に行われ、細胞の増殖、生存、分化、死などにおける細胞機能を調節している。このうちRAS-RAF(rapidly accelerated fibrosarcoma)-MEK(mitogen-activated protein kinase kinase)-ERKとシグナル伝達が行われるERK経路は、RTKやRAS, RAFなどの活性型変異または高発現により、様々な悪性腫瘍で恒常的に活性化している。活性化したRTKはGRB2(GTP-exchange complex growth factor receptor bound-2)などのアダプタータンパクを介してRASを活性化し、活性型RASはRAF (ARAF、BRAFまたはCRAF) のホモダイマーまたはヘテロダイマー形成を促進する。ダイマーを形成したRAFはMEKを直接的にリン酸化し、リン酸化したMEKはERKをリン酸化し活性化させる。活性化したERKは細胞質および細胞核内の数多くの基質タンパク質をリン酸化し、細胞周期や細胞増殖を調節している(図4)¹⁶。

癌においてこのERK経路の過剰シグナルが起きる代表的な遺伝子変異の一つにBRAFやRASの遺伝子変異が挙げられる。BRAF変異は悪性黒色腫（50-60%）、乳頭状甲状腺癌（40-60%）、大腸癌（5-10%）、非小細胞肺癌（3～5%）など多くの腫瘍で認められる¹⁷。その変異の多くはコドン600のバリリン(V)の点突然変異(V600)である。このBRAF(V600)変異を標的としたBRAFキナーゼ阻害薬(vemurafenib、dabrafenib)により、BRAF(V600)変異を有する皮膚悪性黒色腫患者において臨床試験が行われ、標準治療(dacarbazine)と比較し生命予後の改善が認められた^{18,19}。また近年、同じくBRAF(V600)変異を有する皮膚悪性黒色腫においてdabrafenibとMEK阻害薬(trametinib)の併用がdabrafenib単剤よりも生存期間を有意に延長したと報告されている²⁰。BRAF(V600)変異を有する非小細胞肺癌においてもdabrafenibとtrametinibの併用は高い奏効率が報告されている⁹。このようにERK経路をターゲットとした分子標的薬は一部のBRAF変異癌に対して有効性を認めており、KRAS変異癌に対してもこれまでに臨床試験が行われている。

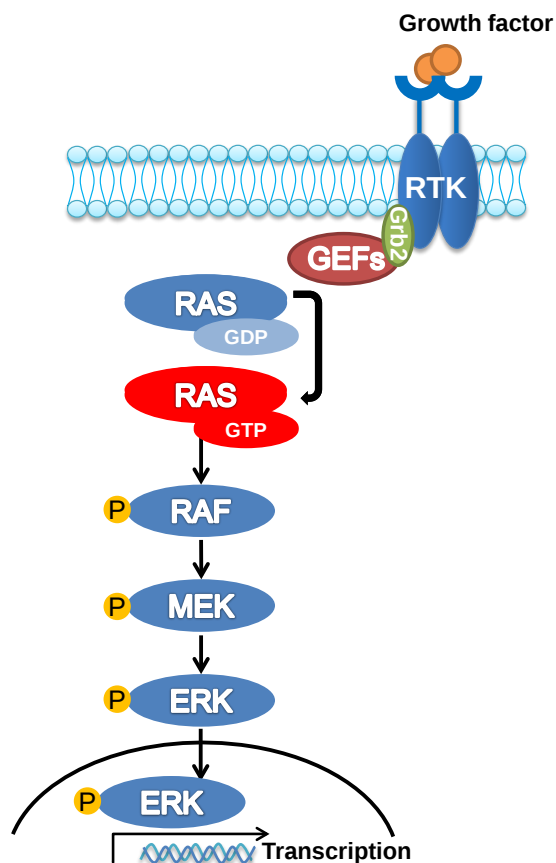


図4 ERK経路のシグナル伝達

活性化したRTKによりRASは活性型となり、段階的にRAF→MEK→ERKのリン酸化が行われる。リン酸化ERKにより細胞質および細胞核内の数多くの基質タンパク質がリン酸化される。

4. PI3K(phosphatidylinositol-3 kinase)経路について

PI3Kは、細胞膜の構成成分であるホスファチジルイノシトールのイノシトール環3位のリン酸化を媒介する脂質キナーゼであり、哺乳類ではクラスI、クラスII、クラスIIIの3つのサブクラスに分類される。触媒サブユニットp110と調節サブユニットp85で構成されるクラスI-PI3Kは、RTKなどの上流からの刺激によりPIP2(phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate)のイノシトール環3位の水酸基をリン酸化し、PIP3(phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)を産生する。PIP3はPDK1(phosphoinositide-dependent protein kinase-1)と呼ばれるプロテインキナーゼをリクルートし、これによりAKTのThr308部位がリン酸化されAKTは部分的に活性化する。その後mTORC2(mammalian target of rapamycin complex 2)によりSer473のリン酸化が行われるとAKTは完全な活性型となる(図5)²¹。

PI3K経路の過剰シグナルはERK経路と同様に様々な悪性腫瘍において認められている。PI3K経路が過剰なシグナルを産生する要因として①EGFRなどのRTKの遺伝子変異や遺伝子増幅、②PI3Kの遺伝子増幅、③p110サブユニットをコードするPIK3CA(phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)遺伝子の活性化変異、④AKTの過剰発現、⑤PIP3の脱リン酸化反応を触媒する酵素であるPTEN(phosphatase and tensin homolog)遺伝子の欠失、⑥RAS遺伝子の変異などがあげられる。これらの変化により活性化したPI3K経路は癌の増殖・生存・浸潤・転移を促進すると考えられている。

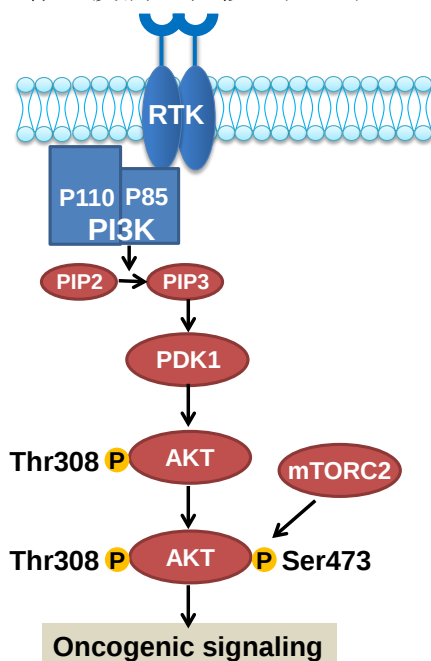


図5 PI3K経路

PI3Kは、RTKなどの上流からの刺激によりPIP2をリン酸化し、PIP3を産生する。PIP3はPDK1を介してAKTをリン酸化する。

5. ERK 経路と PI3K 経路のクロストークについて

上記で述べた ERK 経路と PI3K 経路は互いに様々なシグナルの交差(クロストーク)があることが明らかになっている^{22,23}。この中には①交差阻害、②交差活性、③経路収束が含まれる。交差阻害は一方の経路が別の経路の上流を負に調節し、それにより他方の経路のシグナル伝達を阻害することである。例えば AKT の下流シグナルである TSC(tuberous sclerosis complex)複合体に対する ERK および RSK(ribosomal protein S6 kinase)による阻害経路や、AKT による RAF の阻害経路などが存在する。次に交差活性は、一方の経路が別の経路の上流成分を正に調節し、それにより他方の経路を活性化させることである。これは RAS による PI3K の活性化などが含まれる。最後に、経路収束は 2 つ以上のシグナル伝達経路が同じ複合体またはタンパク質に直接作用することである。ある種の ERK 経路、PI3K 経路のキナーゼタンパク (RAF、MEK、および mTOR(mammalian target of rapamycin))は基質特異性が非常に高いが、他のキナーゼタンパク (ERK、RSK、AKT および S6K(small subunit ribosomal protein S6 kinase))は共通した基質をリン酸化することが知られている(図 6)²³。例えば ERK、AKT は共に TSC 複合体を阻害し、RSK と S6K は共に S6(small subunit ribosomal protein S6)のリン酸化に関与している。S6 は ERK 経路、PI3K 経路に共通する下流シグナルであり、40S リボソームサブユニットの構成成分として messenger ribonucleic acid(mRNA)の翻訳調節に関与している。肺癌細胞株において S6 のノックダウンにより in vitro、in vivo で細胞増殖、腫瘍の増大抑制が認められており、患者検体においてもリン酸化 S6 の高発現が独立した予後不良因子であると報告されている²⁴。このように ERK 経路と PI3K 経路は互いに密接した関係にある。

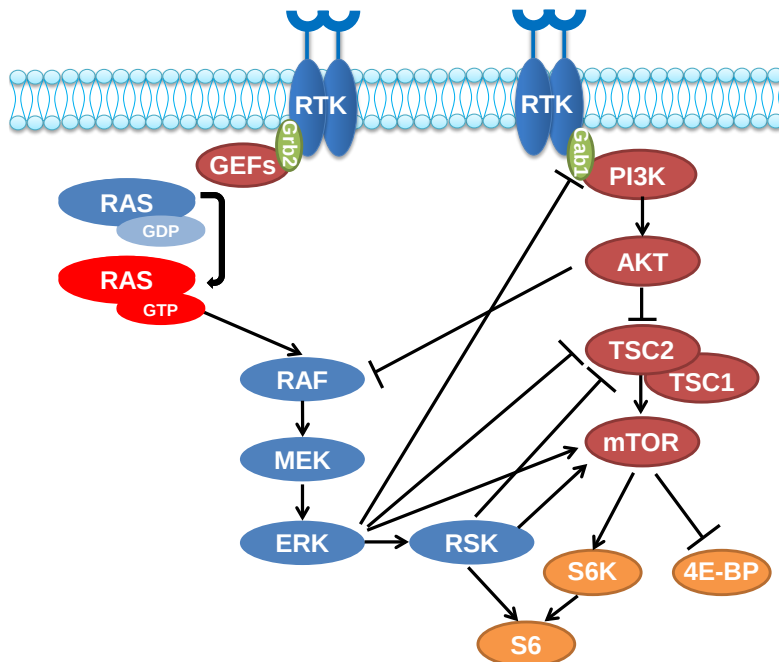


図 6 ERK 経路と PI3K 経路のクロストーク

ERK経路とPI3K経路はお互いにシグナルの交差(クロストーク)が存在し、この中には①交差阻害、②交差活性、③経路収束が含まれる。

6. FGFR(fibroblast growth factor receptor)経路について

FGFRは受RTKの一つであり、リガンドであるFGF が結合することによって活性化される。FGFRは3つの細胞外免疫グロブリン様ドメインと膜貫通ドメインおよび細胞内チロシンキナーゼドメインから構成される。

FGFの結合により活性化したFGFRは2量体を形成しアダプタータンパクであるFRS2 α (fibroblast growth factor receptor substrate 2 α)のリン酸化を介してERK経路、PI3K経路などのシグナル伝達経路を活性化する(図7)²⁵。FGFRシグナルは胎児の発生の過程では四肢形成、神経系誘導と神経発生に関与し、成熟組織においては、血管新生、創傷治癒の過程に関与することが知られている²⁶。また様々な悪性腫瘍においてFGFRの遺伝子異常が報告されている。過去の報告によれば4,853の固形癌について次世代シーケンサーを用いてFGFRの遺伝子異常を検索したところ、7.1%でFGFRの遺伝子増幅、変異、再構成が認められている²⁷。肺癌においては特に扁平上皮癌においてFGFR1の遺伝子増幅が9-22%認められており、これまでにFGFR1の遺伝子増幅を有する肺扁平上皮癌患者に対するFGFR阻害薬の治験も行われている^{28,29}。

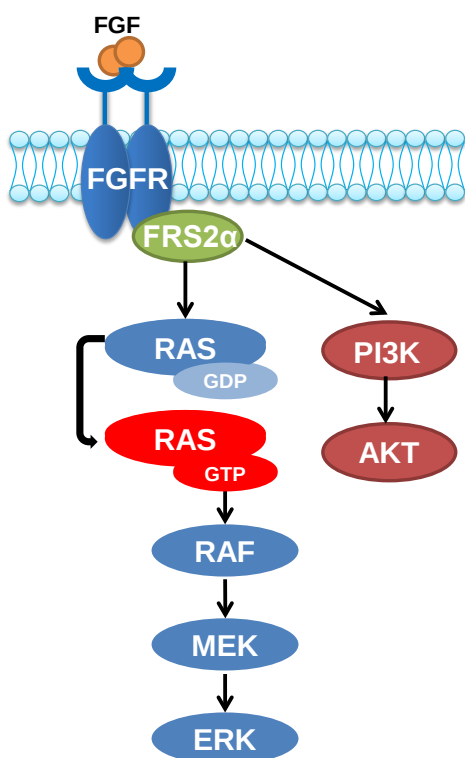


図7 FGFR経路

FGFの結合により活性化したFGFRは2量体を形成しアダプタータンパクであるFRS2αのリン酸化を介してMAPK経路、P13K-AKT経路などのシグナル伝達経路を活性化する。

7. 上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition:EMT)について

上皮間葉移行 (EMT) は、上皮細胞が一過性に間葉 (線維芽細胞様) の細胞表現型を獲得する過程のことである。EMTは、多細胞生物において形態形成に関わる基本的な過程であり、胚発生、原腸形成および神経堤、心臓および他の臓器の発達に必須とされている³⁰。またEMTは、組織修復、臓器の線維化、癌の進行、転移、治療抵抗性にも関与している。上皮の悪性腫瘍は、局所の細胞増殖にはじまり、やがて腫瘍細胞が周囲の構造を破壊しながら、血管やリンパ管に侵入し、他臓器に到着した後、血管・リンパ管外に出て組織に定着することで遠隔臓器へ転移する。癌細胞は転移する過程で上皮細胞としての性格を失い、運動能や浸潤能を獲得するよう性質が間葉系へと変化する、つまりEMTを起こすことが明らかになっている³¹。

EMTの過程には様々な制御機構、ネットワークが関与している(図9)³²。複数の転写因子(snail, twist, zeb-1(zinc finger E-box binding homeobox 1)など)が活性化すると上皮系のフェノタイプに関連する遺伝子の発現が低下し、間葉系のフェノタイプに関連する遺伝子の発現が増加するとされている³³。代表的な例細胞接着因子であるE-cadherinの発現喪失やN-cadherin、Vimentinなどの間葉系マーカーの発現増加があげられる。またEMTは癌細胞の薬剤感受性に関与しており、非小細胞肺癌においてはEGFR-TKIの感受性や獲得耐性に影響することが報告されている^{34,35}。またEGFR-TKIの感受性が低下した間葉系のEGFR遺伝子変異陽性の肺癌細胞株においては、MET(Mesenchymal-Epithelial Transition)を起こすことによりEGFR-TKIへの感受性が回復したと報告されている³⁶。

8. KRAS変異癌に対する分子標的治療について

KRAS変異癌に対する治療において、活性型KRASを直接阻害する薬剤の開発が長年に渡り行われてきたが、非常に困難であった。その理由として細胞内においてKRASと結合するGTPの親和性が非常に高いことや、KRASの分子表面上に薬剤が結合・作用しうる構造が乏しいこと、などの問題があるためである³⁷。そのため、KRAS変異を有する悪性腫瘍に対する分子標的治療としてKRASそのものをターゲットとするのではなくKRASの下流シグナルをターゲットとする治療戦略が考えられた。その一つとしてERKの上流であるMEKの阻害薬が開発され、実際にKRAS変異肺癌に対して臨床試験が行われた。その一つがKRAS変異を有する非小細胞肺癌の2nd line以降にMEK阻害薬であるselumetinibと

docetaxelの併用をdocetaxel単剤と比較したphaseⅢ試験がある。しかし、この試験において併用群は単剤群に対して主評価項目である無増悪生存期間の有意な延長を示せなかった³⁸。他にもKRAS変異非小細胞癌に対する2nd lineとして、別のMEK阻害薬であるtrametinib単剤とdocetaxel単剤を比較したphaseⅡ試験も行われた。しかし、本試験においてtrametinibはdocetaxelに対し主評価項目である無増悪生存期間の有意な延長を示せなかった³⁹。これら2つの試験結果から、KRAS変異肺癌に対するMEK阻害薬単剤の効果は限定的であると考えられた。

KRAS変異肺癌に対しMEK阻害薬の有効性が乏しい理由として、KRASはRAF以外にもPI3KやRALGDS(ral guanine nucleotide dissociation stimulator)など複数のエフェクタータンパクを介して他のシグナル伝達経路を活性化するため、ERK経路の抑制のみではKRASからの増殖・生存シグナルを十分に抑制できない可能性がある(図9)⁴⁰。第5項でも示したように、ERK経路にはPI3K経路とのクロストークが存在し、KRAS変異癌において両経路は細胞の生存、増殖に密接に関連している。実際にKRAS変異肺癌のマウスモデルにおいて、MEK阻害薬とPI3K阻害薬との併用が高い抗腫瘍効果を認めたと報告されている^{41,42}。これらの結果を基にKRAS変異癌に対するMEK阻害薬とPI3K阻害薬を併用する臨床試験が行われたが、毒性が問題となり⁴³、実臨床での適応には至っていない。そのため、KRAS変異癌の治療において、これらの両経路を抑制するためには異なるアプローチが必要と考えられる。

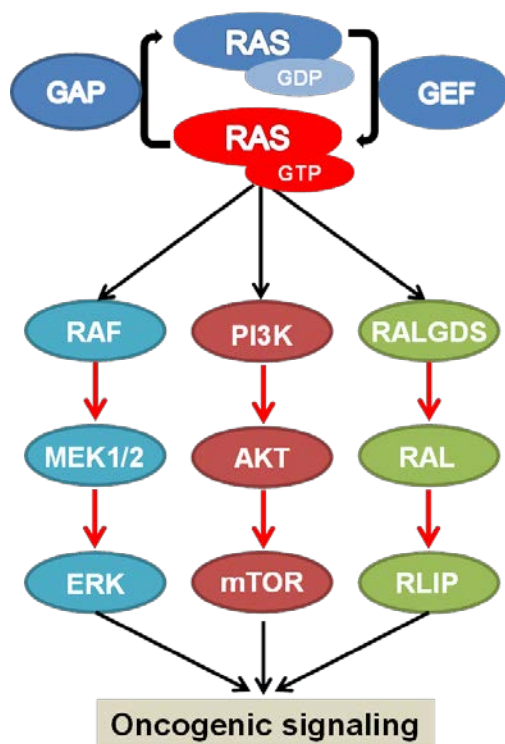


図8 KRAS変異により活性化される下流シグナル経路

KRASはRAF以外にもPI3KやRALGDSなど複数のエフェクタータンパクを介して他のシグナル伝達経路を活性化する。

9. ERK経路のフィードバック機構について

ERK経路は生体内はもちろん、癌細胞においても非常に重要なシグナル経路である。ERK経路にはその恒常性を維持するための様々な負のフィードバック機構が働くことが知られている⁴⁴。例えば、活性化したERKはBRAF-CRAFの2量体形成やMEKのリン酸化を阻害する。そのためERKの活性化が抑制されると、RAF、MEKなど上流のシグナル経路の活性化が促される⁴⁵⁻⁴⁷。また別なフィードバック機構として、Sproutys (SPRYs) や dual-specificity phosphatases (DUSPs) といったERK経路を負に制御しているタンパク質が存在する。SPRYsはGRB2/GEF複合体に結合してその機能を抑制することによりERK経路を抑制し、DUSPsは直接的にERKを脱リン酸化することでERKの抑制に関与している⁴⁸⁻⁵⁰。これらのタンパク質はERKによる転写調節を受けており、ERKの活性化抑制により転写が抑制され、結果としてERK経路の再活性化を引き起こす。

また他の重要なフィードバック機構としてはRTKの活性化がある。様々なRTKの転写調節因子がERKによって調節されており、ERKの抑制はRTKを活性化させ、ERK経路の再活性化、PI3Kの活性化を起こすと報告されている^{44,51,52}。実際にKRAS変異大腸癌、肺癌において、MEK阻害薬とRTKの阻害薬を併用することで癌細胞のアポトーシスが増加し、in vivoでの抗腫瘍効果も増強したとの報告がある^{53,54}。

10. 本研究の背景・経緯

これまでKRAS変異肺癌に対する分子標的治療としてERK経路とPI3K経路の抑制が高い抗腫瘍効果をもたらすと報告されてきた。実際にKRAS変異肺癌に対するMEK阻害薬とPI3K阻害薬の併用はin vitro、in vivoで高い抗腫瘍効果を認めたが、臨床試験においてその毒性のため十分な薬剤濃度を達成することが難しく、実臨床での適応には至っていない。そのため両経路を効果的に抑制するには異なるアプローチが必要と考えられている。またKRAS変異肺癌に対するMEK阻害薬単剤での効果が乏しいことは臨床試験の結果からも明らかであり、これは様々なフィードバック機構がERK経路に備わっているためと考えられている。

KRAS変異肺癌においてERK経路の抑制時に働くフィードバック機構として特に重要とされているのがRTKの活性化である。活性化したRTKはERK経路の再活性化とPI3K経路の活性化を引き起こすとされ、MEK阻害薬とRTK阻害薬の

併用することにより両シグナル経路を効果的に抑制することが期待できる。
しかし、KRAS変異肺癌においてMEK阻害薬投与時に、どのような因子により具体的にどのRTKが活性化してくるかについてはこれまで明らかにされていない。それらが明らかにできれば、KRAS変異肺癌においてMEK阻害薬により活性化するRTKの決定因子をバイオマーカーとして、MEK阻害薬と特定のRTK阻害薬による個別化治療が可能となる。これはKRAS変異肺癌に対する新たな分子標的治療となることが期待される。

11. 本研究の課題

上記を踏まえ、我々はKRAS変異肺癌に対しMEK阻害薬投与時にどのようなRTKが活性化しフィードバック機構として働くのか、またそのRTKがどのような因子により決定づけられるのかを検証した。更にMEK阻害薬とMEK阻害薬により活性化するRTKの阻害薬の併用効果についてin vitro、in vivoで検証した。

12. 本研究の結論

KRAS変異肺癌に対しMEK阻害薬の投与により活性化するRTKは腫瘍の上皮間葉移行状態によって異なり、上皮系のKRAS変異肺癌細胞株ではERBB3(human epidermal growth factor receptor 3)が、間葉系ではFGFR1が活性化してくることが判明した。またこれらのRTKによりERK経路の再活性化とPI3K経路の活性化が起きていることが明らかになった。間葉系のKRAS変異肺癌細胞株でMEK阻害薬投与時にFGFR1が活性化するメカニズムとしては、FGFR1-FRS2経路を負に抑制しているSPRY4の発現がERKの抑制により低下するためと考えられた。また上皮系のKRAS変異肺癌でもMEK阻害薬によりSPRY4の低下を認めたが、pFRS2の活性化は認めず、SPRY4の低下によるpFRS2の活性化は間葉系KRAS変異細胞株に特有のフィードバック機構と考えられた。実際にMEK阻害薬とMEK阻害薬投与時に活性化する各々のRTKの阻害薬を併用すると、in vitroでは細胞のアポトーシス増加を認め、in vivoでは著明な腫瘍縮小効果を認めた。このことから、KRAS変異肺癌における上皮間葉移行状態は、MEK阻害薬とRTK阻害薬の併用療法を行う際のバイオマーカーとなることが示された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

4E-BP	Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein
AKT	Protein kinase B
ALK	anaplastic lymphoma kinase
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra Large
BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BSA	Bovine Serum Albumin
CI-PARP	Cleaved-poly ADP ribose polymerase
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CtBP1/2	carboxyl-terminal binding protein 1/2
DMSO	dimethyl sulfoxide
DUSPs	dual-specificity phosphatases
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOXD3	Forkhead box D3
FRS2 α	fibroblast growth factor receptor substrate 2 α
GAB1	grb-2 associated binder 1
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GRB2	GTP-exchange complex growth factor receptor bound-2
GTP	guanosine 5'-Triphosphate
HER3(ERBB3)	human epidermal growth factor receptor 3
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase

MeOH	methanol
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
MYC	myelocytomatosis
PBS	phosphate Buffered Saline
PDK1	phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PDX	patient-derived xenograft
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PIP2	phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53-up-regulated modulator of apoptosis
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAL	RAS-like
RALGDS	ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RAS	rat sarcoma
RET	rearranged during transfection
RLIP	ral-interacting protein
ROS-1	ROS proto-oncogene 1
rpm	revolution per minute
RPMI	roswell park memorial institute medium
RSK	ribosomal protein S6 kinase
RTK	receptor tyrosine kinase
S6	small subunit ribosomal protein S6
S6K	small subunit ribosomal protein S6 kinase
siRNA	small interfering RNA
SPRYs	sproutys
TGF- β 1	transforming growth factor β 1
TKI	tyrosine kinase inhibitor
TSC	tuberous sclerosis complex
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1

実験方法

細胞株と薬剤

使用した KRAS 変異肺癌細胞株のうち A549、NCI-H358、NCI-H1792、NCI-H23、SW1573 は American Type Culture Collection(ATCC)より購入した。SK-LU-1、Calu-1、Calu-6、NCI-H460 は共同研究者である高橋 隆先生(名古屋大学)より譲渡された。LU99 は JCRB(Japanese Cell Research Bank)より購入した。HCC2108 は Korean Cell Line Bank (Seoul, South Korea)より購入した。NCI-H1573 と NCI-H2030 は共同研究施設である Massachusetts General Hospital Cancer Center より譲渡された。細胞株は 5%CO₂ 下の 37°C 湿潤環境にて 10%の BSA(Bovine Serum Albumin)を含め RPMI(Roswell Park Memorial Institute medium)(invitrogen)で培養した。全ての細胞は MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza)によりマイコプラズマ非感染であることを確認した。

OSI-906、NVP-BGJ398、GDC-0941、selumetinib、afatinib、trametinib は Active Biochem より購入した。全ての薬剤は DMSO(dimethyl sulfoxide)で 10 mmol/l に調整し、使用しない間は-20°C にて保存した。

抗体、ウェスタンブロット法

各種タンパクの発現はウェスタンブロット法を用いて検討した。まずタンパク濃度を測定し、注入タンパク量を決定した。泳動用 Buffer は 10x tris/glycine/sds buffer(BIO-RAD)を 10 倍に希釈して使用した。ゲルを泳動器にセットし、泳動バッファーをそそいだ後、各 well に lysate を apply した。また Size marker として Precision plus protein dual color standards(BIO-RAD)を使用した。電気泳動(30~35 分)終了後、Transfer-buffer を用いてメンブレンへ Transfer (60 分)を行った。Transfer-buffer は Tris-Glycine Buffer 10x Concentrate(SIGMA,T4904)、MeOH(methanol)、純水を 1:2:7 の割合で混合した。Transfer 終了後、メンブレンは TBST(Tris Buffered Saline 10 ×solution (SIGMA,T5912)と純水を 1:9 で混合し、Tween20 を 0.1%になるように混合)で 10 分洗浄し、5%BSA-TBST(TBST に BSA を 5%となるように混合)を用いて 1 時間 blocking を行い、1 次抗体を添加し 4°C over night とした。次に TBST で 10 分×3 回の洗浄後、各種 2 次抗体を室温で 60 分添加し、TBST で 10 分×3 回の洗浄を施行して撮影を行った。感光液は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を使用した。撮影機器は Vilber-Lourmat 社の FUSION SYSTEM を使用した。抗体については以下の一覧表に記載した通りである。

抗体一覧表

1次抗体	希釈倍率	2次抗体	Company	Catalogue #
FGFR1	1000倍	rabbit	Cell signaling	9740
phospho-HER3 (Tyr1289)	1000倍	rabbit	Cell signaling	4791
HER3	1000倍	rabbit	Cell signaling	12708
phospho-FRS2 α (Tyr436)	1000倍	rabbit	Cell signaling	3861
FRS2	200倍	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-8318
E-cadherin	1000倍	rabbit	Cell signaling	3195
Vimentin	1000倍	rabbit	Cell signaling	5741
phospho-AKT (Ser473)	2000倍	rabbit	Cell signaling	9271
AKT	1000倍	rabbit	Cell signaling	9272
phospho-ERK	3000倍	rabbit	R&D systems	AF1018
ERK	3000倍	rabbit	R&D systems	AF1576
phospho-S6 (Ser235/236)	10000倍	rabbit	Cell signaling	4858
S6	10000倍	rabbit	Cell signaling	2217
Cleaved PARP (Asp214)	1000倍	rabbit	Cell signaling	5625
β -actin	1000倍	rabbit	Cell signaling	4970
ZEB1	1000倍	rabbit	Cell signaling	3396
SPRY4	200倍	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-30051
SPRY2	500倍	rabbit	Abcam	Ab50317
p85	1000倍	rabbit	Merck Millipore	ABS-233
DUSP6	500倍	rabbit	Abcam	Ab76310
IGF-1R	1000倍	rabbit	Cell signaling	9750
phospho IGF-1R	1000倍	rabbit	Cell signaling	3918

Phospho-RTK array

各細胞株を DMSO または trametinib(50nM)で 72 時間処理し、それぞれの細胞からタンパクを回収し、タンパク濃度により必要なタンパク量を決定した。

Human Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array Kit(R&D Systems)を用いてリン酸化している RTK の変化について分析した。

TGF- β 1(transforming growth factor β 1)による EMT 誘導

H358 に PBS(phosphate buffered saline)もしくは Recombinant Human TGF- β 1(R&D Systems)を 4ng / mL 加えた培地でそれぞれ 14 日間培養した。培地は 3 日間毎に新鮮なものに交換した。

Small interfering RNA (siRNA)

6well プレートに各種細胞株 (いずれも $1.0\sim 2.0\times 10^5$ cells/well) を播種し、抗生剤無添加の培養液にて一晩培養を行った。培養後 3-4 割程度のコンフルエントの状態を確認後、Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) を溶媒として、20nmol/l siRNA を RNAiMAX(Invitrogen)と混合し、72~96 時間培養後に細胞・タンパク回収を行った。siRNA の導入確認はウエス

タンブロット法を使用した。Scrambled siRNA には Stealth RNAi negative control low GC Duplex#3(Invitrogen)を用いてコントロールとした。

各種 siRNA のメーカーは以下の通りである。

ERBB3 #1,#2(invitrogen)、ZEB1 #1(Santa cruz Biotechnology)、#2(Dharmacon)、FGFR1 #1,#2(Dharmacon)、SPRY4 #1(Ambion)、#2(Dharmacon)、SPRY2 #1,#2(Dharmacon)、DUSP6 #1,#2(Dharmacon)

SPRY4、GFP(green fluorescent protein)の遺伝子導入

SPRY4 の発現プラスミド及び GFP 発現プラスミドそれぞれ 6μg と pMD(addgene)0.6μg、psPAX2(addgene)3μg、OPTIMEM I 300μl を混合し、室温で 5 分間静置した。その後、Lipofectamin 2000 (invitrogen) 300μl をそれぞれと混合し、室温で 20 分間静置した。混合液を 10cm dish で 24 時間培養した 293T 細胞にそれぞれ添加し、24 時間培養後、培地を交換した。次の日に上清を回収し、0.45μm のフィルターに通した(Lentivirus 液)。SPRY4 と GFP の Lentivirus 液と同量の RPMI を混合し、Polybrene を 1μg/ml となるように添加した。この混合液を 6well plate で 24 時間培養した LU99(2.0×10^5 cells/well)の培地と交換した。次に 2400rpm(revolution per minute)×60 分で遠心し、37°Cで overnight し、24 時間後に抗生剤を含む RPMI にて selection を行なった。培地は 2~3 日毎に交換し、それぞれ stable な cell line を作成した。GFP の発現は蛍光顕微鏡を用いて確認した。SPRY4 の発現はウェスタンブロット法で確認した。

免疫沈降法

各 dish の細胞からタンパクを回収し、タンパク濃度により必要なタンパク量を決定した。lysis buffer にタンパクと p85 抗体 (5ug : Millipore)を入れ、混合後の buffer に Protein A sepharose beads (GE Healthcare) を 25μl 注入しロータリーミキサーにて 4°C で overnight した。ロータリー後、sample を 12000rpm, 3 分, 4°Cで遠心し、上清を除去した。その後 lysis buffer を 500ul 加え 12000rpm, 3 分, 4°Cで遠心×2 を行った。上清を再度除去し、lysis buffer で 1×に調整した Pierce™ Lane Marker Sample Buffers(Thermo Scientific)を 15μl 加え、ヒーターで 95°C, 5 分、その後 12000rpm, 3 分遠心した。作成された Sample についてウェスタンブロット法（上記参照）を用いてタンパクの発現状況を確認した。

アポトーシス解析

6well プレートで各種細胞株（いずれも $1.0 \sim 2.0 \times 10^5$ cells/well）を播種し、培養液にて一晩培養を行った。培養後 3-4 割程度のコンフルエントの状態を確認後、各種薬剤(trametinib、BGJ398)を添加した。72 時間後に各 well の培養液を

15ml チューブに回収、さらに各 well の細胞をトリプシンではがし、細胞懸濁液を 15ml チューブに回収した。11000rpm で 5 分遠心し、上清を除去後に細胞ペレットを PBS で wash し、11000rpm で 5 分遠心し、再度上清を除去した。PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) の Annexin V Binding Buffer、7-AAD、PE-AnnexinV を添加して細胞ペレットを懸濁後、5ml チューブに移し BD Accuri C6 flowcytometer(BD Biosciences)にて測定した。

細胞増殖アッセイ

96well プレートに各 KRAS 変異肺癌細胞株を 100 μ l (3000cells/well)播種し、一晚培養した。次の日に 6 つの well に 100 μ l の RPMI を添加し、その後 Cell Counting Kit-8(DOJINDO) 20 μ l+RPMI 30 μ l を混合したものを 50 μ l ずつ添加して 1 時間静置し呈色反応を行い、ベースラインの吸光度を測定した。また他の 6 つの well にはそれぞれ DMSO、selumetinib、trametinib を添加した。Selumetinib は 500nM、trametinib は 50nM とした。72 時間培養を行った後に、Cell Counting Kit-8(DOJINDO) 20 μ l+RPMI 30 μ l 混合したものを 50 μ l ずつ添加して 1 時間静置し呈色反応を行い吸光度の測定を行った。吸光度の測定は BIO RAD 社のマイクロプレートリーダー (iMark™ マイクロプレートリーダー) を使用して解析した。

コロニー形成アッセイでは 6well プレートに H1792、LU99 をそれぞれ 5.0×10^4 cells/well ずつ播種し、一晚培養した。各 well に DMSO、trametinib 50nM、afatinib 1 μ M、NVP-BGJ398 1 μ M、trametinib+afatinib、trametinib+NVP-BGJ398 を添加した。薬物は 72 時間毎に交換し、6 日間後に、細胞を 4%ホルムアルデヒドで固定し、0.5%クリスタルバイオレットで染色した。次いで、プレートを蒸留水で洗浄し、写真を撮影した。

ゼノグラフトマウスモデル

6~8 週齢の雌のヌードマウス (nu+/nu+) を異種移植モデルに使用した。H358、LU99、H23 (全て 5×10^6 cells) を 100 μ L の Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco) で希釈し、ヌードマウスの脇腹に皮下注射で移植した。LU99 は各群 8 匹、H358 と H23 は各群 5 匹のマウスに移植した。腫瘍が 230~300mm³ となった段階でマウスを各治療群に無作為に振り分けた。各種薬剤の投与量は trametinib 0.6 mg/kg、afatinib 7.5mg/kg、BGJ15mg/kg とし、同量を併用群でも使用した。腫瘍の大きさは 3~4 日おきにデジタルキャリパーで計測した。腫瘍体積は (長径) $\times$ (短径) $\times$ (短径) $\times$ 1/2 の計算式で求めた。治療の副作用の有無の確認のために体重を 3~4 日ごとに測定した。マウスの体重が 20%以上減少、または腫瘍の潰瘍化、壊死、体積が 1000 mm³ に達した場合などは安楽死とした。薬剤は全

て 1 日 1 回の経口投与とした。BGJ-398 は PEG300 と acetic acid/acetate buffer pH 4.6(蒸留水で 1×に希釈したもの)を 1:1 で混合したものを溶媒とした。

Trametinib と afatinib は 7% DMSO, 13% Tween80, 80% 5%糖液、化合物と等モル量の HCl を混合したものを溶媒とした。動物実験は金沢大学動物実験に関する規定に基づき施行した。

Patient-Derived Xenograft (PDX) Models

PDX は Jackson Laboratory から購入した。PDX は KRAS G12D 変異を有する 53 歳女性の肺癌を 6~8 週齢の雌の NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)マウスに移植したものである。PDX の実験は共同研究者である Virginia Commonwealth 大学の Anthony C. Faber の元で行われた。PDX は各群 3 匹使用し、腫瘍体積が 300mm³ となった段階でマウスを各治療群 (control、BGJ398、trametinib) に無作為に振り分けた。Trametinib 群の腫瘍体積が 1000 mm³ となった時点で BGJ398 との併用に切り替えた。薬剤の投与量、腫瘍の測定方法、マウスの安楽死の基準は細胞株のゼノグラフトモデルと同様とした。動物実験は Virginia Commonwealth 大学動物実験に関する規定に基づき施行した。

RNA 抽出

以下の処理はすべて RNA ase free の器具を使用して行った。

RNeasy Mini Kit(QUIAGEN)を使用し、そのプロトコールに従った。細胞を一晩培養後、上清を除去し PBS で洗浄し再度上清を除去した。Buffer RLT plus を添加して細胞を融解後、スクレーパーにて細胞の lysate を回収し、エッペンドルフに移した。次に lysate を 1 分間ボルテックスしてホモジナイズを行った。その後同量の 70%エタノールと混合し、ピペッティングによりよく混和した後、専用のスピнкаラムに注入し 8000g×15 秒遠心を施行した。その後 Buffer RW 及び Buffer RPE を用いてスピнкаラムを洗浄したのち RNAase free の水を添加し 8000g×1 分遠心を行いコレクションチューブ内に RNA 抽出を行った。

マイクロアレイ解析

H358 親株(H358par.)、H358 に TGF-β1(4ng/ml)を 14 日間添加した細胞 (H358TGF.)、H1792 親株(H1792par.)、H1792 を trametinib(50nM)で 48 時間処理した細胞(H1792tra.)から各々 2 つずつ、合計 8 つの RNA を抽出した。RNA の抽出は上記のように RNeasy Mini Kit(QUIAGEN)を使用して行った。これらのサンプルの遺伝子発現量を SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray Kit (Agilent Technologies) の DNA マイクロアレイチップにて測定し

た。採取した 8 サンプルのデータは解析ソフト「GeneSpring」を使用して解析した。(H358TGF.)と(H358par.)、(H1792tra.)と(H1792par.)の 2 サンプルの組み合わせ毎に 4 グループに分類し、各グループに含まれるサンプルのデータを平均化した。平均化したデータを用いて (H358TGF.)と(H358par.)、(H1792tra.)と(H1792par.) の比較における変動遺伝子を抽出した(親株(par.)のデータを基準とした)。

遺伝子発現解析

・KRAS 変異肺癌細胞株

Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)⁵⁵ のデータベースにある 39 種類の KRAS 変異肺癌細胞株から遺伝子発現データを抽出し、階層的クラスター解析を行った。階層的クラスター解析は Cluster 3.0 プログラム⁵⁶ を使用して行い、結果の視覚化は Java Treeview プログラム⁵⁷ を用いた。発現解析に用いた遺伝子は中央値で 6 以上の発現があり、かつ log2 で 5 以上の発現変動が細胞株間である 2635 遺伝子を使用した。解析データの中から ERBB3 と E-cadherin、FGFR1、Vimentin をそれぞれ含む 3 つの異なるサブクラスターを抽出した。

・ヒト KRAS 変異肺腺癌

The Cancer Genome Atlas (TCGA)⁵⁸ のデータベースから、75 種類の KRAS 変異肺腺癌切除検体の mRNA のデータを抽出し、上記と同様に階層的クラスター解析を行った。発現解析に用いた遺伝子は EMT に関連が強い 28 種類の遺伝子⁵⁹ を使用した。これに FGFR1 と ERBB3 の遺伝子発現データを追加した。

統計解析

統計解析のソフトウェアは JMP® 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。2 群間の比較では F 検定を行い等分散とみなせることを確認し、Student's t test を行った。3 群間以上の検定においては Bartlett 検定を行い、等分散とみなせる場合は、ANOVA 分散分析法で各群間に有意差があることを確認した後、多重比較検定として Tukey-Kramer 法を行い群間の差を検定した。等分散とみなせない場合は、多重比較検定として Steel-Dwass 法を行い群間の差を検定した。統計学的有意差は p value < 0.05 とした。線形回帰分析の統計学的有意差は p value < 0.01 とした。

実験結果

1) KRAS変異肺癌細胞株に対するMEK阻害薬のERK経路抑制効果と細胞増殖抑制効果

NCI-H358とNCI-H1792の2つのKRAS変異肺癌細胞株にMEK阻害薬を濃度依存的に加え、3時間でERKのリン酸化(pERK)を最大限に抑制するMEK阻害薬の最少濃度をウェスタンブロット法で検証した。その結果、両細胞株共にtrametinibでは50nM以上、selumetinibでは500nM以上加えてもpERKの抑制効果は変わらなかった(Fig.1A)。この結果からtrametinibは50nM、selumetinibは500nMで使用する事とした。次にtrametinibとselumetinibを12種類のKRAS変異肺癌細胞株に72時間加え、Cell Counting Kit-8(DOJINDO)による細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、多くの細胞株においてtrametinibのほうがselumetinibよりも強い細胞増殖抑制効果をも認めた(Fig.1B)。

Fig.1A

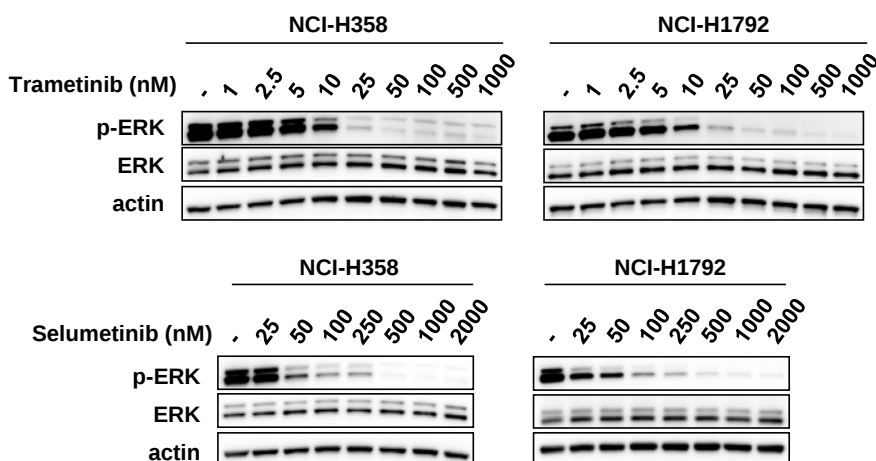


Fig.1B

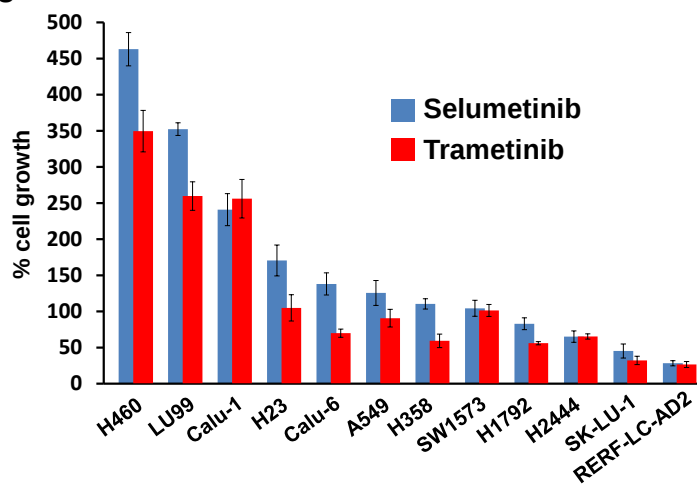


Fig.1A) MEK阻害薬を濃度依存的に3時間加えた後のpERK抑制効果

Fig.1B) MEK阻害薬による細胞増殖抑制効果

2) MEK阻害薬によるERK経路とPI3K経路への影響と、ERBB3の活性化による両経路へのフィードバック機構

NCI-H358とNCI-H1792においてMEK阻害薬を加えた後のERK、AKTのリン酸化(pERK、pAKT)の経時的変化についてウエスタンブロット法で検証した。両薬剤ともに投与3時間後は、ほぼ完全にpERKは抑制されたが、24時間後より、経時的にpERKの再活性化を認めた。また、pERKの再活性化はselumetinibのほうがtrametinibよりも強かった。また両薬剤ともに経時的にpAKTの上昇を認めた(Fig.2A)。ERK経路の抑制はRTKの活性化を促し、同経路の再活性化やPI3K経路の活性化を引き起こすことが報告されている^{44,51,52}。そこでH358においてtrametinibを加えた際にどのようなRTKが活性化するかをphospho-RTK array法を用いて検証した。その結果、trametinib投与72時間後とコントロールを比較するとERBB3とその結合相手であるERBB2のリン酸化上昇を認めた(Fig.2B)。実際、H358において、trametinibを加えた後のERBB3のリン酸化(pERBB3)と発現をウエスタンブロット法で検証したところ、経時的にpERBB3の上昇と、ERBB3の発現上昇を認めた(Fig.2C)。一方でH1792においてはpERBB3の上昇と、ERBB3の発現上昇を認めなかった(Fig.2D)。H358においてtrametinibとERBB3の阻害薬を併用すると、pERKの再活性化とpAKTの活性化が抑制されるかどうかをウエスタンブロット法で検証した。ERBB3はキナーゼドメインが存在せず、他のEGFR familyとヘテロダイマーを形成することからEGFR、ERBB2、ERBB4のTKIであるafatinibを使用した。H358においてtrametinibとafatinibを併用した際の下流シグナルの変化をウエスタンブロット法で検証した。その結果、trametinibによるpERBB3の上昇はafatinibの併用により抑制され、pERK、pAKT、pS6も抑制された。更にアポトーシス関連タンパクであるCI-PARP(Cleaved- poly ADP-ribose polymerase)がtrametinibとafatinibの併用により強く誘導された(Fig.2E)。次にERBB3がPI3K経路を直接制御しているかどうかを免疫沈降法にて検証した。H358にTrametinibを加えて72時間後にp85抗体による免疫沈降を行ったところ、コントロールと比較してpERBB3の上昇、ERBB3の発現上昇を認めた(Fig.2F)。このことからERBB3とp85が直接結合していることが明らかになった。

またH358 のゼノグラフトマウスモデルにおいてcontrol、trametinib(0.6mg/kg)、afatinib(7.5mg/kg)、併用群に分けて治療実験を行った。Trametinibとafatinibは1日1回経口投与を行った。Trametinib単剤群では腫瘍の縮小は認めなかったが、併用群においては腫瘍の縮小を認めた(Fig.2G)。また治療中体重減少や下痢を含めた重篤な副作用は示さなかった。

Fig.2A

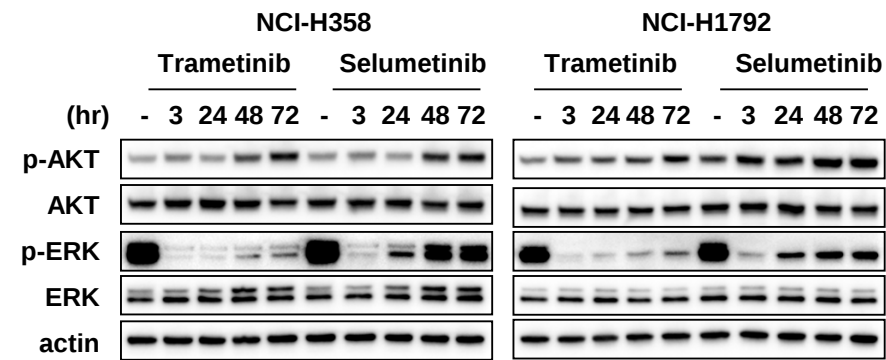


Fig.2B

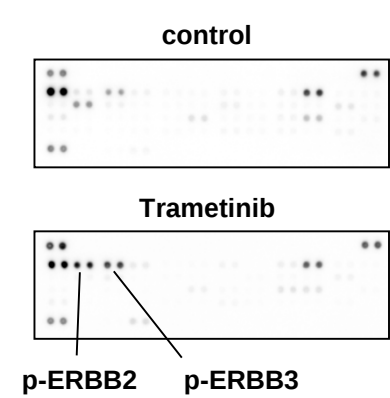


Fig.2C

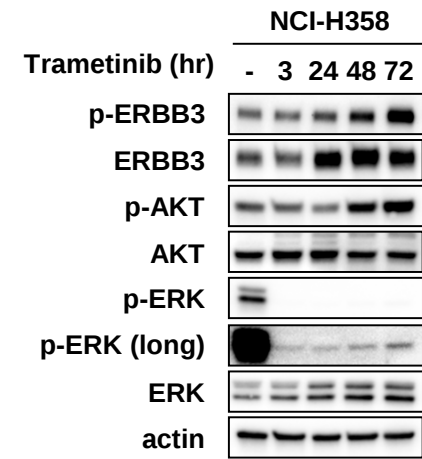


Fig.2D

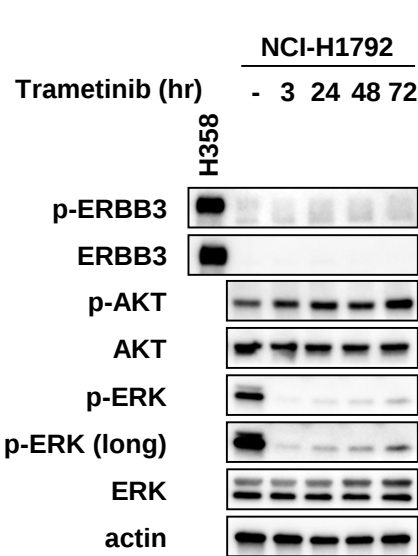


Fig.2E

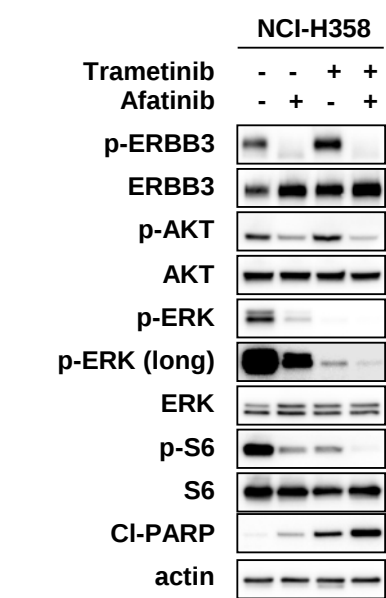


Fig.2F

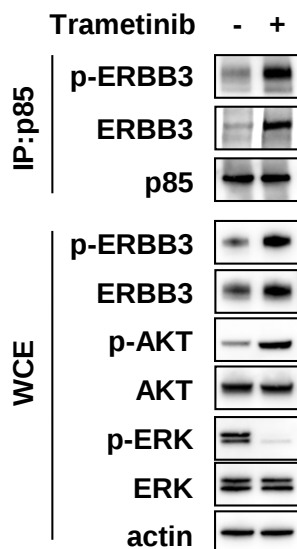


Fig.2G

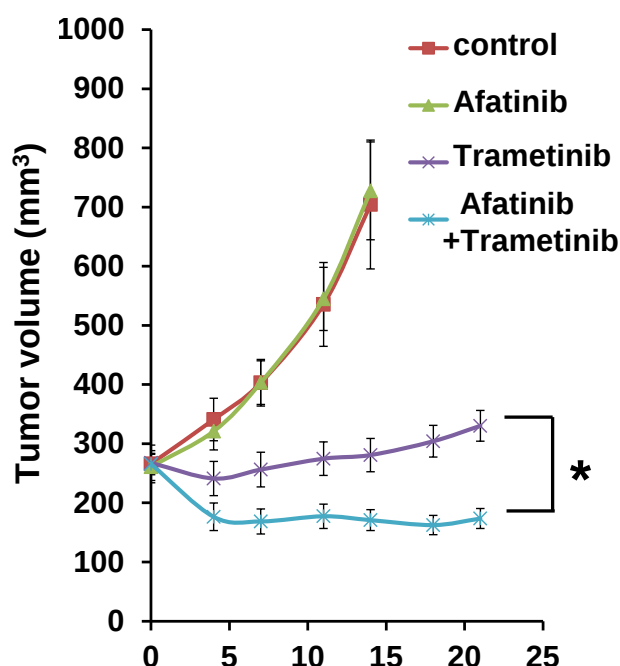


Fig.2A) H358、H1792にMEK阻害薬を加えた後のpERK、pAKTの経時的変化

Fig.2B) H358にtrametinibを72時間加えた後のリン酸化RTKの変化(phospho RTK array)

Fig.2C) H358にtrametinibを加えた後のpERBB3、ERBB3、下流シグナルの経時的変化

Fig.2D) H1792にtrametinibを加えた後のpERBB3、ERBB3、下流シグナルの経時的変化

Fig.2E) H358にtrametinibとafatinibを48時間加えた後の下流シグナルとCI-PARPの変化

Fig.2F) H358にtrametinibを72時間加えp85抗体による免疫沈降を行った際のpERBB3、ERBB3の変動

Fig.2G) H358のゼノグラフトモデルの腫瘍成長曲線(n=5±SEM) * : p<0.05 (Steel-Dwass法)

Selumetinib 500nM, Trametinib:50nM, Afatinib:1μMにて使用

WCE:whole-cell extracts, Scr: scramble siRNA, si ERBB3: ERBB3 siRNA

3) KRAS変異肺癌細胞株における上皮系、間葉系のフェノタイプとERBB3、FGFR1の関連性について

Fig.2Dで示したようにH1792についてはtrametinibを加えてもpERBB3の上昇は認めなかった。H1792はH358と比較するとERBB3の発現が極めて乏しいためと考えた。そこで、ウェスタンブロット法を用いて複数のKRAS変異肺癌細胞株においてERBB3の発現をみたところ、H358のようにERBB3の発現が高い細胞株と、H1792のようにERBB3の発現が乏しい細胞株が存在した(Fig.3A)。実際にERBB3の発現が乏しいLU99においてtrametinibを加えると、24時間後に僅かにpERBB3の上昇は認めたが、その後は低下し72時間後にはほとんど発現を認め

なかった(Fig.3B)。そのため、これらの細胞株ではtrametinibとafatinibを併用しても下流シグナルの抑制、CI-PARPの誘導は認めなかった(Fig.3C)。しかし、Fig.2Aで示したようにH1792においてもH358と同様にtrametinibを加えた後に、pERKの再活性化やpAKTの活性化を認めることから、ERBB3とは別のRTKがフィードバック機構として働いている可能性を考えた。非小細胞肺癌の細胞株において、上皮系のフェノタイプではERBB3の発現が高く、間葉系ではERBB3の発現が乏しいことが報告されている^{34,60,61}。実際にERBB3が発現しているKRAS変異肺癌細胞株と発現が乏しいKRAS変異肺癌細胞株においてウエスタンブロット法を用いて上皮間葉移行状態を検証したところ、ERBB3が発現している細胞株では上皮系のマーカーであるE-cadherinが高発現しており、間葉系のマーカーであるVimentinが低い傾向にあった。一方、ERBB3の発現が乏しい細胞株ではE-cadherinの発現が低く、Vimentinの発現が高い傾向にあった(Fig.3D)。

この結果から、間葉系のKRAS変異肺癌細胞株においてはMEK阻害薬の耐性にERBB3ではない別なRTKが関与していると考えた。まずH1792においてtrametinibを加えた際に活性化するRTKを同定するためにphospho-RTK array法を行ったが、明らかなRTKは同定できなかった(Fig.3E)。KRAS変異大腸癌の細胞株においてはIGF1R(Insulin-like growth factor 1 receptor)がPI3K経路を制御していることが報告されている⁵³。そこでH1792にTrametinibを加えて72時間後にp85抗体による免疫沈降を行い、IGF1RのアダプタータンパクであるIRS-1(Insulin receptor substrate 1)の発現を確認したところIRS1の発現を認めた(Fig.3F)。このことからH1792においてはtrametinib投与時にフィードバック機構として働くRTKがIGF1Rではないかと考えた。そこでH1792においてtrametinibとIGF1R阻害薬であるOSI-906を併用したが、pERKはtrametinib単剤と変化なく、pAKTについても併用による抑制効果は弱かった(Fig.3G)。またIGF1Rのリン酸化についても明確に認められなかった。そのためフィードバック機構として働くRTKはIGF1Rではない別なRTKではないかと考えた。

そこで、方法を変えて上皮系の細胞株であるH358にEMTを誘導し、発現が上昇してくるRTKを検討することとした。H358にTGF- β 1(4ng/ml)を14日間加え、ウエスタンブロット法を用いてE-cadherinとVimentinの発現を親株と比較した。その結果、TGF- β 1を加えたH358ではE-cadherinの低下とVimentinの上昇を認め、間葉系のフェノタイプを獲得していた(Fig.3H)。更にH358親株とEMTを誘導したH358(H358M)からそれぞれRNAを抽出し、マイクロアレイ法により網羅的に遺伝子発現の変化について比較検証した。その結果、変動の大きかった遺伝子の中にRTKであるFGFR1を認めた(Fig.3I)。実際にウエスタンブロット法で確認したところ、H358Mは親株と比較して明らかなFGFR1の発現上昇を認め、またIG1Rについてはほとんど変化を認めなかった。一方でERBB3の発現低下を認め

た(Fig.3J)。

次にH358M にMETを起こすことによりFGFR1の発現が変化するかを検証した。ZEB1はEMTに関連した転写因子であり、肺癌においてもEMTを誘導することが知られている⁶²。そこでH358MにZEB1のsiRNAを導入し、ウエスタンブロット法で検証したところ、E-cadherinの上昇とVimentinの低下を認め、METが起きていると考えられた。またその際にFGFR1の発現低下とERBB3の発現上昇を認めた(Fig.3K)。この結果からKRAS変異肺癌細胞株における上皮間葉移行状態はERBB3とFGFR1の発現に影響すると考えられた。

Fig.3A

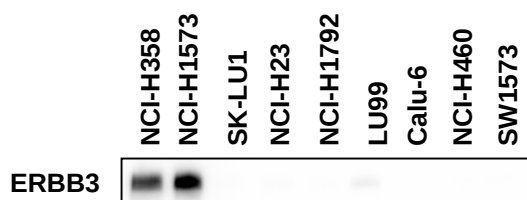


Fig.3B

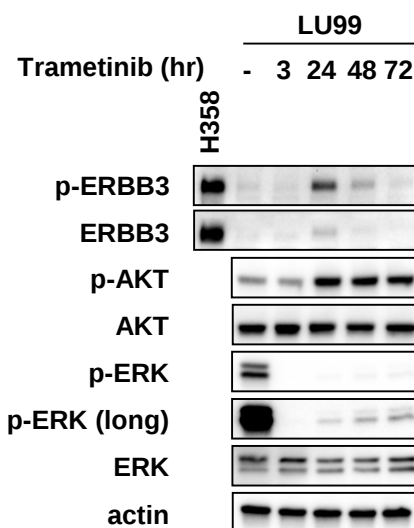


Fig.3C

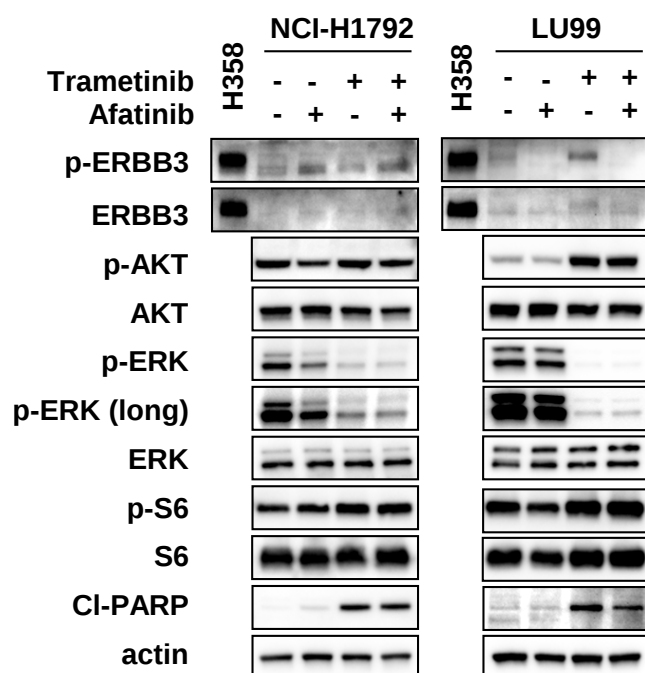


Fig.3D

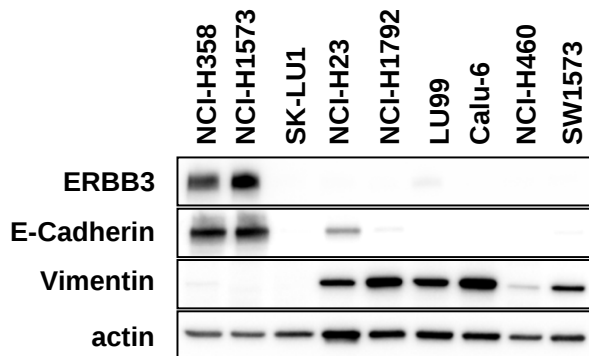


Fig.3E

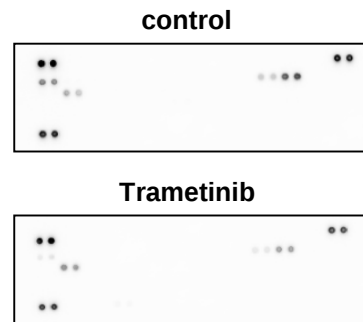


Fig.3F



Fig.3G

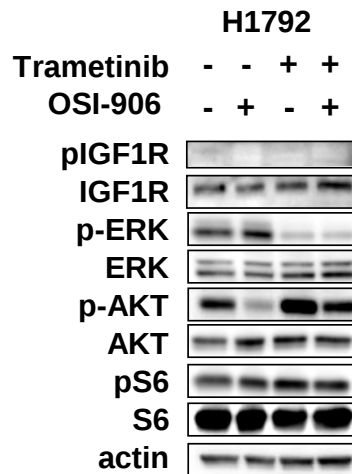


Fig.3H

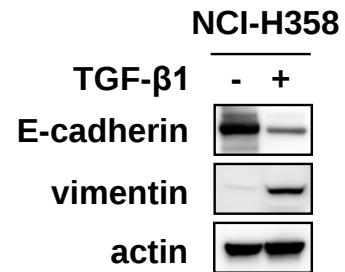


Fig.3I

Rank	UniGeneID	GeneSymbol	log(ratio)
1	Hs.516971	FOXS1	8.27
2	Hs.35125	ARHGEF40	8.11
3	Hs.744213	PODXL	7.24
4	Hs.119286	APCDD1L	6.71
5	Hs.647718	VSI68	6.33
6	Hs.111779	SPARC	6.05
7	Hs.656660	PAX8-AS1	6.04
8	Hs.590943	TMEM190	6.02
9	Hs.25391	PI16	5.97
10	Hs.65425	CALB1	5.86
11	Hs.469881	LIMS2	5.86
12	Hs.412117	ANXA6	5.58
13	Hs.280135	-	5.52
14	Hs.463412	SGCA	5.49
15	Hs.83381	GNG11	5.42
16	Hs.414795	SERPINE1	5.40
17	Hs.114948	CRLF1	5.36
18	Hs.410977	TAGLN/SIDT2	5.33
19	Hs.264887	FGFR1	5.28
20	Hs.740619	LIX1L	5.22
21	Hs.467304	IL11	5.06
22	Hs.729646	APCDD1L-AS1	4.96
23	Hs.410977	TAGLN	4.92
24	Hs.15154	SRPX	4.90
25	-	XLOC_013952	4.89
26	Hs.789	CXCL1	4.81
27	Hs.154704	LHB	4.78
28	Hs.729646	APCDD1L-AS1	4.78
29	Hs.446683	CGB	4.76
30	Hs.729493	LINC00545	4.76

Fig.3J

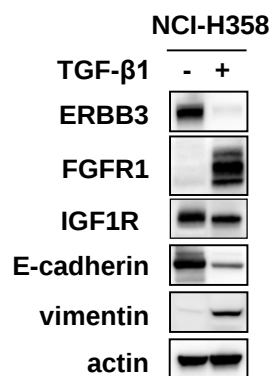


Fig.3K

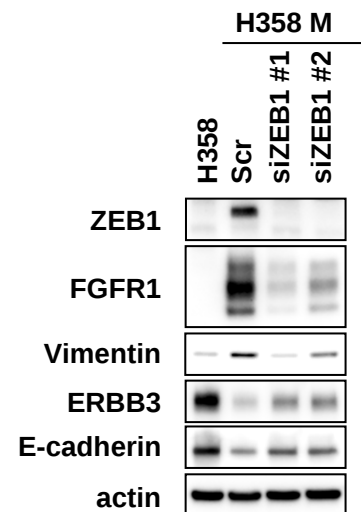


Fig.3A) KRAS変異肺癌細胞株におけるERBB3の発現

Fig.3B) LU99にtrametinibを加えた後のpERBB3、ERBB3、下流シグナルの経時的変化

Fig.3C) H1792とLU99にtrametinibとafatinibを48時間加えた後の下流シグナルとCI-PARPの変化。ERBB3のpositive controlとしてH358を用いた。

Fig.3D) KRAS変異肺癌細胞株におけるERBB3、E-cadherin、Vimentinの発現

Fig.3E) H1792にtrametinibを72時間加えた後のリン酸化RTKの変化(phospho RTK array)

Fig.3F) H1792においてp85抗体による免疫沈降を行った際のIRS-1

Fig.3G) H1792にtrametinibとOSI-906を48時間加えた後のpIGFR、IGFR、下流シグナルの変化

Fig.3H) H358とTGF β 1でEMTを誘導したH358(H358M)におけるE-cadherin、Vimentinの発現

Fig.3I) H358親株とH358Mにおけるマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現変動の比較。最も変動の大きかった上位30種類の遺伝子を記載。

Fig.3J) H358とH358MにおけるERBB3、FGFR1、IGF1R、E-cadherin、Vimentinの発現

Fig.3K) H358MにsiZEB1を導入し72時間後のERBB3、FGFR1、E-cadherin、Vimentinの発現
Trametinib:50nM, OSI-906:1 μ M, Afatinib:1 μ Mで使用

Scr: scramble siRNA, si ZEB1: ZEB1 siRNA

4) KRAS変異肺癌細胞株とヒトKRAS変異肺腺癌検体の遺伝子発現解析

次にCancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)⁵⁵から39種類のKRAS変異肺癌細胞株のmRNAの発現データを抽出し、E-cadherinとERBB3またはFGFR1、VimentinとERBB3またはFGFR1の散布図をそれぞれ作成し、線形回帰分析を行った。その結果、E-cadherinとERBB3、VimentinとFGFR1は正の相関関係を認め、E-cadherinとFGFR1、VimentinとERBB3は負の相関関係を認めた (Fig.4A,4B,4C,4D)。更に我々は、岡山大学医歯薬学総合研究科の富田 秀太先生に依頼し、同じ39種類のKRAS変異肺癌細胞株から計2,635の遺伝子情報を抽出し、階層的クラスター解析を行った。この解析の結果、KRAS変異肺癌細胞株は大きく2つのフェノタイプに大別された。一つはE-cadherin、ERBB3を発現している上皮系の細胞株、もう一つはVimentin、FGFR1を発現している間葉系の細胞株であった (Fig.4E)。この結果を基に間葉系と考えられる11種類のKRAS変異肺癌細胞株についてFGFR1、E-cadherin、Vimentinの発現をウエスタンブロット法で検証したところ、ほとんどの細胞でFGFR1、Vimentinの発現を認めE-cadherinの発現は乏しかった。一方、H358、H1573といった上皮系の細胞株ではFGFR1、Vimentinの発現は乏しく、E-cadherinの発現を認めた (Fig.4F)。

次にヒトのKRAS変異肺腺癌の遺伝子についても細胞株同様に富田先生に解析を依頼した。TCGA⁵⁸のデータベースから75種類のKRAS変異肺腺癌の遺伝子情報を抽出し、EMTに関連が強いとされている28種類の遺伝子⁵⁹を用いて、階層的クラスター解析を行い、これにFGFR1とERBB3の遺伝子発現データを追加した。その結果、ヒトのKRAS変異肺腺癌も上皮系と間葉系の2つのフェノタ

タイプに大別された。また上皮系腫瘍では比較的ERBB3が高発現しており、間葉系腫瘍ではFGFR1が高発現していた(Fig.4G)。

Fig.4A

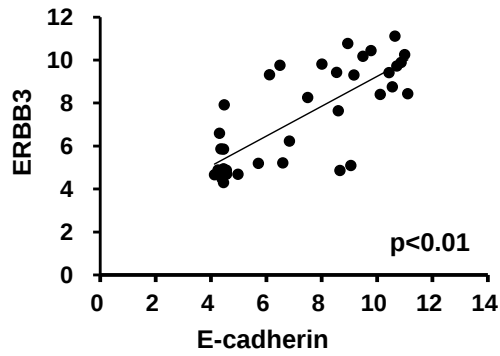


Fig.4B

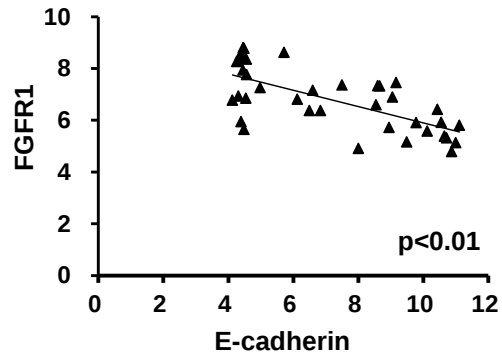


Fig.4C

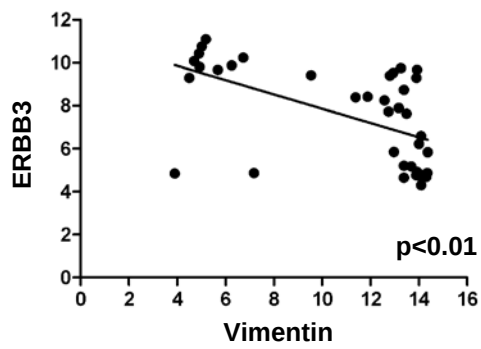


Fig.4D

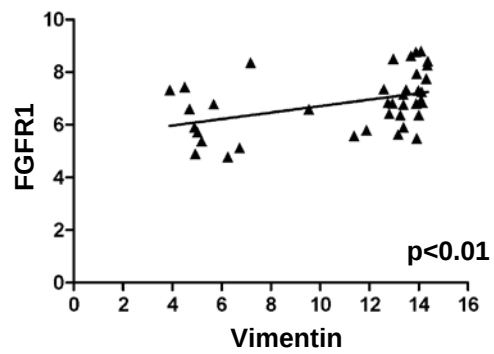


Fig.4E

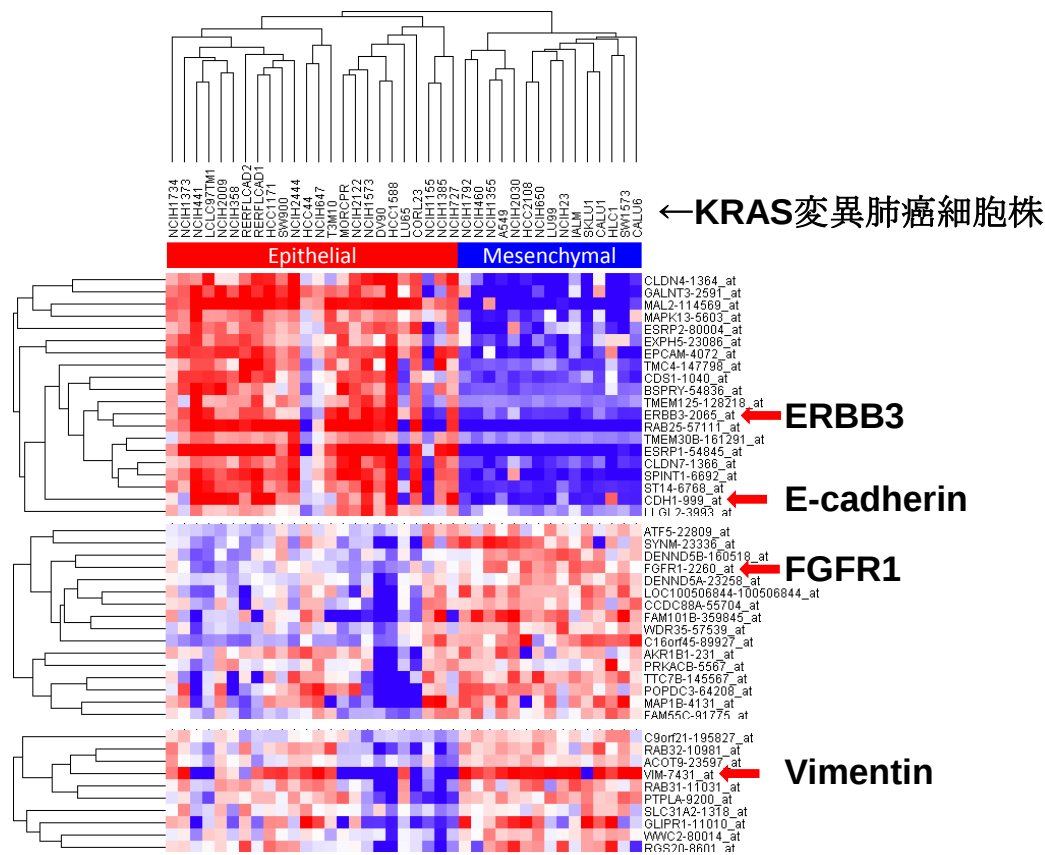


Fig.4F

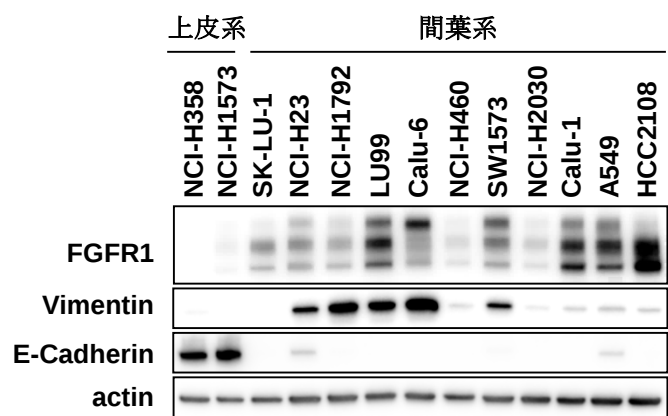


Fig.4G

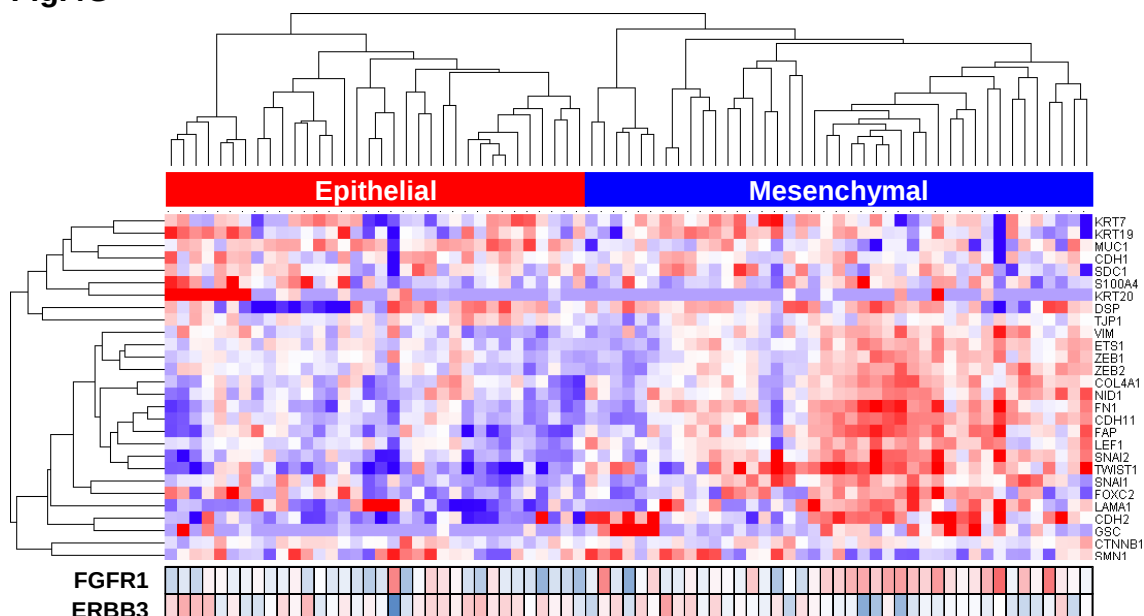


Fig.4A) 39種類のKRAS変異肺癌細胞株におけるERBB3とFGFR1の相関関係

Fig.4B) 39種類のKRAS変異肺癌細胞株におけるFGFR1とE-cadherinの相関関係

Fig.4C) 39種類のKRAS変異肺癌細胞株におけるERBB3とVimentinの相関関係

Fig.4D) 39種類のKRAS変異肺癌細胞株におけるFGFR1とVimentinの相関関係

Fig.4E) 39種類のKRAS変異肺癌細胞株における遺伝子発現解析

Fig.4F) KRAS変異肺癌細胞株におけるFGFR1、Vimentin、E-cadherinの発現

Fig.4G) ヒトKRAS変異肺腺癌75検体における28種類のEMT関連遺伝子とERBB3、FGFR1の遺伝子発現解析

5) 間葉系のKRAS変異肺癌細胞株に対するMEK阻害薬によるFGFR1-FRS2経路のフィードバック機構について

これまでの結果から、間葉系KRAS変異肺癌細胞株においてFGFR1の発現が高いことが明らかになった。そこで実際にこれらの細胞株でtrametinibを投与した際にFGFR1がフィードバック機構として働いているかどうかをウエスタンブロット法で検証した。H1792、LU99の2つの間葉系KRAS変異細胞株に対してtrametinibを加えると経時的にFGFR1の下流のアダプタータンパクであるFRS2 α のリン酸化(pFRS2)の上昇とpERKの再活性化、pAKTの活性化を認めた (Fig.5A)。次にこれら2つの細胞株においてFGFR1のsiRNAを導入し、trametinibによるFGFR1のフィードバック機構が抑制されるかどうかを検証した。FGFR1のsiRNA導入48時間後にtrametinibを48時間加えるとFGFR1とFRS2の発現は抑制され、pERKの再活性化は抑制された。またpAKTの活性化はH1792では#1のsiRNAで、LU99では#1、#2両方のsiRNAにて抑制された (Fig.5B)。

Fig.5A

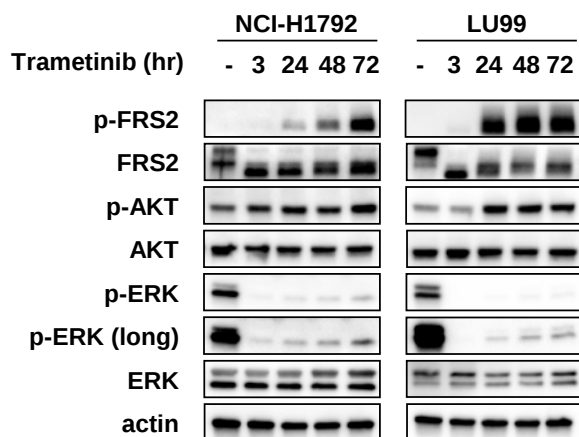


Fig.5B

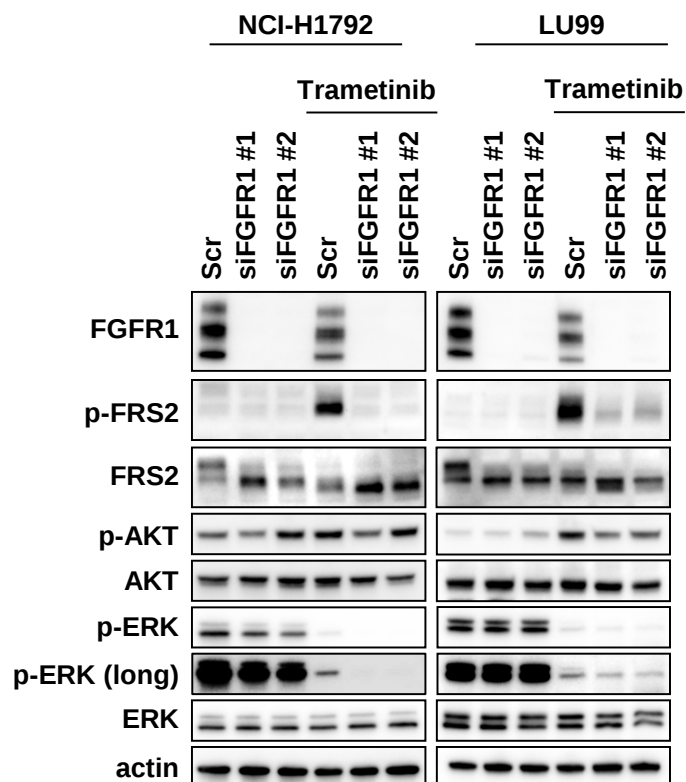


Fig.5A) 間葉系のKRAS変異肺癌細胞株にtrametinibを加えた後のpFRS2、pERK、pAKTの経時的変化。

Fig.5B) 間葉系のKRAS変異肺癌細胞株におけるsiFGFR1導入48時間後にtrametinibを48時間加えた後のFGFR1、pFRS2、pERK、pAKTの変化

Trametinib:50nMにて使用 Scr: scramble siRNA, si FGFR1: FGFR1 siRNA

6) 間葉系KRAS変異肺癌細胞株に対するMEK阻害薬とFGFR阻害薬の治療効果

次に間葉系KRAS変異肺癌細胞株においてtrametinibとFGFR阻害薬を併用することで、pERKの再活性化とpAKTの活性化が抑制されるかどうかを検証した。FGFR阻害薬はFGFR1,2,3の阻害薬であるNVP-BGJ398⁶³(以下BGJ398)を使用した。H1792とLU99においてtrametinibとBGJ398を併用した際のpERK、pAKTの変化、アポトーシスについてウェスタンブロット法で検証したところ、trametinibによるpFRS2の上昇はBGJ398により抑制され、pERK、pAKT、pS6も抑制された。またCI-PARPは2剤の併用により強く誘導された(Fig.6A)。

次にH1792とLU99についてtrametinibとBGJ398を長期間加えた際の細胞増殖抑制効果をコロニー形成アッセイにより検証した。trametinib、afatinib、BGJ398の3種類の薬剤を単剤もしくは併用にて6日間加えた後に、Crystal Violetにて細胞のコロニー染色を行った。その結果、両細胞株ともにtrametinibとafatinibの併用ではtrametinib単剤と比較して細胞増殖にほとんど差は認めなかったが、trametinibとBGJ398との併用では、trametinib単剤と比較して著明な細胞増殖抑制効果を認めた(Fig.6B)。またtrametinibとBGJ398を加えた際の細胞のアポトーシスの割合についてフローサイトメトリーで検証したところ、trametinib単剤よりもBGJ398との併用により著明にアポトーシスの増加を認めた(Fig.6C)。

Fig.4Fで示したH1792とLU99以外の間葉系のKRAS変異細胞株においてもtrametinibとBGJ398併用によるpERK、pAKTの変化をウェスタンブロット法で検証した。その結果、多くの細胞株ではtrametinibと比較してtrametinibとBGJ398の併用によりpERKの再活性化の抑制と、pAKTの抑制を認めた(Fig.6D)。またこれら11種類の間葉系KRAS変異肺癌細胞株において、trametinibとBGJ398併用による細胞のアポトーシスの割合についてフローサイトメトリーで検証した。その結果、trametinib単剤と比較してtrametinibとBGJ398の併用により11種類中7種類の細胞株でアポトーシスが増加した (Fig.6E)。これらの結果から間葉系KRAS変異肺癌細胞株に対するMEK阻害薬とFGFR阻害薬の併用は有効と考えられた。

また実際にFGFR1-FRS2経路がPI3Kを制御しているかどうかについて免疫沈降法を用いて検証した。まずLU99にtrametinibを加えて72時間後にp85抗体による免疫沈降を行った。しかし、コントロールと比較してpFRS2の上昇は認めなかった(Fig.6F)。FRS2はGRB2、GAB1(grb-2 associated binder 1)を介してPI3Kと結合するとされており、そのためFRS2とp85の直接結合が示せなかったと考えた。間接的な手段ではあるが、FRS2がPI3Kを制御していることを示すために、間葉系KRAS変異肺癌細胞株においてtrametinibとBGJ398によるアポトーシスの割合と、trametinibとpan-PI3K阻害薬(GDC-0941)の併用によるアポトーシスの割合について散布図を作成し、線形回帰分析を行った。その結果、正の相関

関係を認め(Fig.6G)、trametinibにより活性化されるFGFR1-FRS2経路は、PI3K経路に関連していることが示唆された。

また上皮系のKRAS変異細胞株においてはtrametinibとBGJ398を併用してもtrametinib単剤と比較して下流シグナルの変化は認めず、CI-PARPの誘導も認めなかった(Fig.6H)。しかし、EMTを誘導したH358MにおいてはtrametinibによりpFRS2の上昇を認め、BGJ398を併用することで、pERK、pAKTの活性化抑制を認めた(Fig.6I)。またH358とH358MでtrametinibとBGJ398を併用した際の細胞のアポトーシスの割合をフローサイトメトリーで比較したところ、H358ではtrametinib単剤と併用との比較でアポトーシスに変化を認めなかったが、H358Mでは併用により有意にアポトーシスの増加を認めた(Fig.6J)。このことから、trametinibにより活性化されるFGFR1-FRS2経路は間葉系のKRAS変異細胞株におけるフィードバック機構と考えられた。

Fig.6A

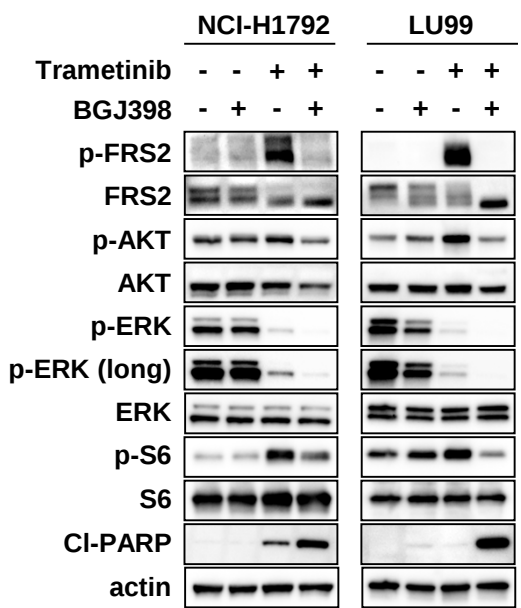


Fig.6B

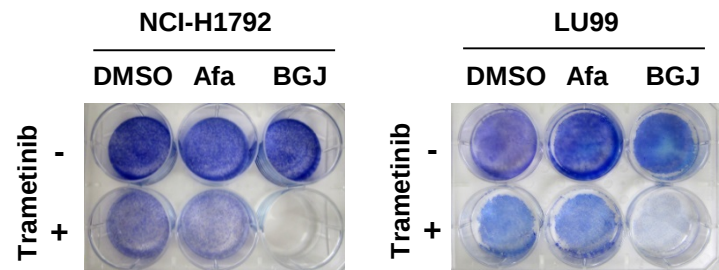


Fig.6C

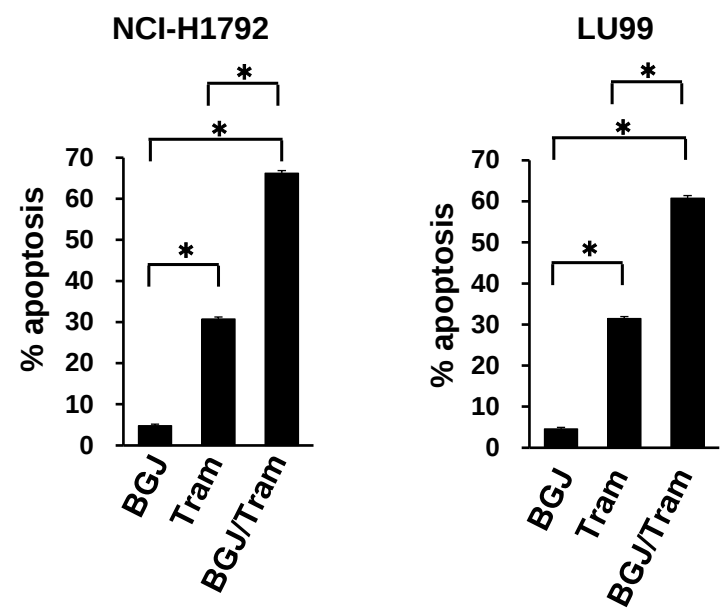


Fig.6D

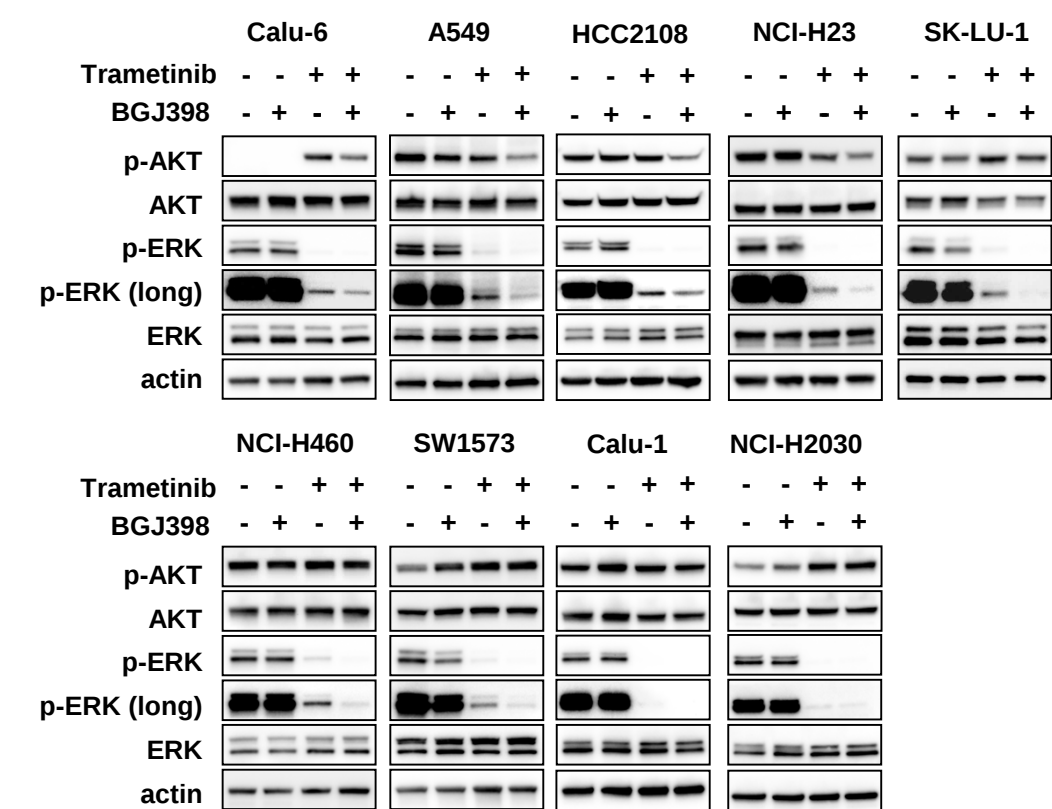


Fig.6E

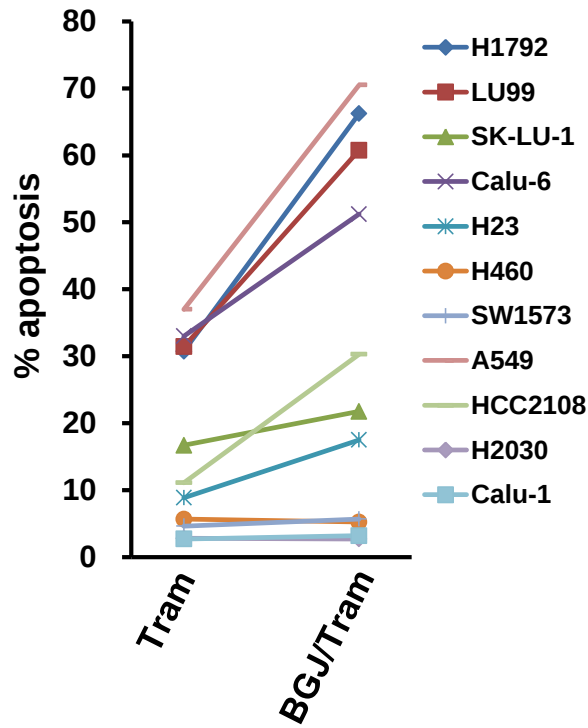


Fig.6F

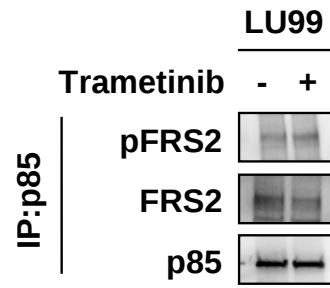


Fig.6G

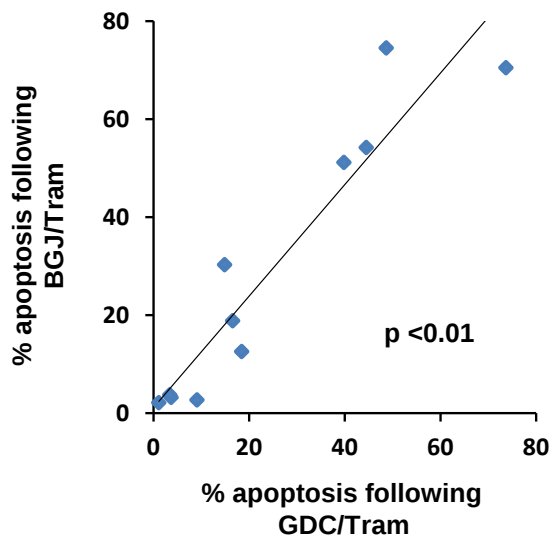


Fig.6H

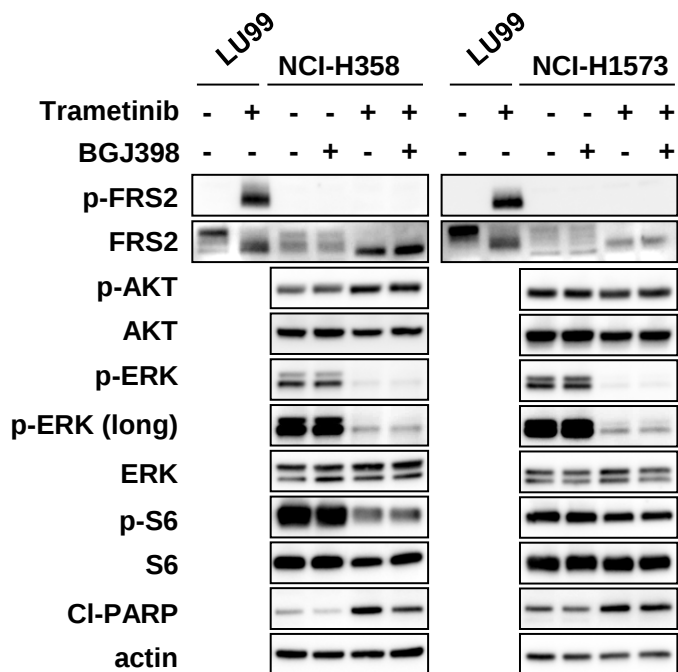


Fig.6I

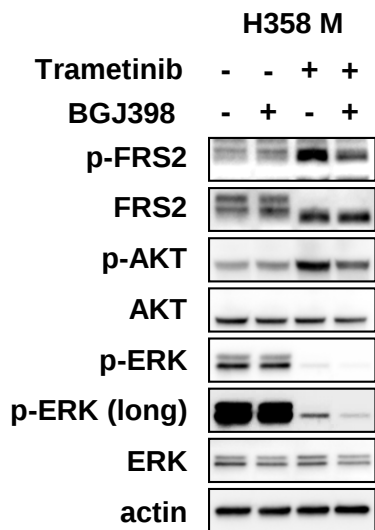


Fig.6J

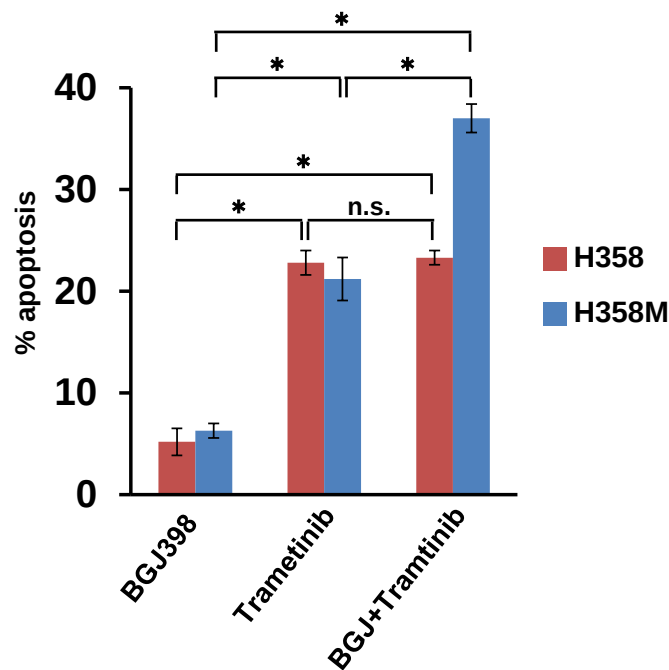


Fig.6A) H1792、LU99にtrametinibとBGJ398を48時間併用後のpFRS2、下流シグナル、CI-PARP

Fig.6B) H1792、LU99にtrametinibとBGJ398を6日間加えた後の細胞増殖抑制効果

Fig.6C) H1792、LU99にtrametinibとBGJ398を72時間加えた後のアポトーシスの割合

* : $p < 0.05$ (Tukey-Kramer法)

Fig.6D) 9種類の間葉系KRAS変異肺癌細胞株にtrametinibとBGJ398を48～72時間加えた後の下流シグナルの変化

Fig.6E) 11種類の間葉系KRAS変異肺癌細胞株にtrametinibとBGJ398を72時間併用後のアポトーシスの割合

Fig.6F) LU99にtrametinibを72時間加えp85抗体による免疫沈降を行った際のpFRS2、FRS2の変動

Fig.6G) 11種類の間葉系KRAS変異肺癌細胞株におけるtrametinibとBGJ398 もしくはpan-PI3K阻害薬(GDC-0941)を72時間併用した時のアポトーシスの割合における線形回帰分析

Fig.6H) H358、H1573にtrametinibとBGJ398を48時間併用後のpFRS2、下流シグナル、CI-PARPの変動

Fig.6I) H358MにtrametinibとBGJ398を48時間併用後のpFRS2と下流シグナルの変動

Fig.6J) H358MにtrametinibとBGJ398を72時間加えた後のアポトーシスの割合

n.s. : 有意差なし * : $p < 0.05$ (Tukey-Kramer法)

Trametinib:50nM BGJ398:1 μ M GDC-0941:250nMで使用

7) 間葉系KRAS変異肺癌細胞株におけるSPRY4によるFGFR1-FRS2経路の活性化抑制機構

次に間葉系KRAS変異肺癌細胞株におけるFGFR1-FRS2経路活性化のメカニズムについて検討した。まずFGFリガンドやFGFR遺伝子の発現に変化が起きている可能性を考えてH1792にtrametinibを48時間加えた細胞と加えなかった細胞からそれぞれRNAを抽出し、マイクロアレイ法を用いて網羅的に遺伝子発現の変化について検証した。しかし、その結果FGFリガンドやFGFR遺伝子についてはほとんど変化を認めなかった(Table1)。

ERK経路にはリガンド非依存性の負のフィードバック機構が存在し、それにはSPRYsやDUSPsといったタンパク質が関連している。SPRYsやDUSPsはERKに転写調節されているタンパク質であり、通常はERK経路を抑制しているが、ERKが抑制されるとその発現が低下し、ERK経路の再活性化を促す。具体的にはDUSPsはERKを直接脱リン酸化することによりERK経路を抑制しており、SPRYsはGRB2/GEF複合体の機能を抑制することでERK経路を抑制している⁴⁸⁻⁵⁰。H1792のマイクロアレイの結果から、SPRYsおよびDUSPsの遺伝子発現の変化について検討したところ、SPRYsではSPRY4が、DUSPsではDUSP6が最も低下していた(Fig.7A)。

次にH1792とLU99においてtrametinibを加えた後のpFRS2、SPRY4、SPRY2、DUSP6の変化をウェスタンブロット法で検証したところ、pFRS2の上昇に伴いSPRY4、SPRY2、DUSP6の発現は全て低下していた(Fig.7B)。次にLU99にSPRY4、SPRY2、DUSP6のsiRNAをそれぞれ導入し、FGFR1-FRS2経路が活性

化するかどうかをウェスタンブロット法で検証した。その結果、**siSPRY4**では明らかに**pFRS2**の上昇を認め、**siSPRY2**では僅かだが**pFRS2**の上昇を認めた。一方、**siDUSP6**では**pFRS2**の上昇は認めなかった(**Fig.7C**)。この結果から、**SPRYs**、特に**SPRY4**により**FRS2**のリン酸化は抑制されていると考えた。次に**LU99**に**SPRY4**を遺伝子導入し、過剰発現させた後に**trametinib**を加え、**pFRS2**の上昇が抑制されるかどうかを検証した。コントロールとして**GFP**を遺伝子導入した**LU99**を使用した。**SPRY4**を過剰発現させた**LU99**に**trametinib**を加えたところ、**GFP**のみを導入した細胞株と比較して**pFRS2**の上昇は抑制され、**pERK**の再活性化と**pAKT**の活性化も抑制された(**Fig.7D**)。またこの時の細胞のアポトーシスについてフローサイトメトリーで検証したところ、**SPRY4**を過剰発現させた細胞では**GFP**のみを導入した細胞株と比較して細胞のアポトーシスの増加を認めた(**Fig.7E**)。このことから間葉系**KRAS**変異肺癌において**FGFR1-FRS2**経路が活性化するメカニズムは、**ERK**の抑制により**SPRYs**(特に**SPRY4**)の発現が低下し**FRS2**の抑制が解除されるためと考えられた。

次に上皮系の**KRAS**変異肺癌細胞株において**trametinib**を加えた後の**SPRY4**、**pFRS2**の変化についてウェスタンブロット法で検証した。**H358**と**H1573**に**trametinib**を加えると経時的に**SPRY4**は低下したが、**pFRS2**の上昇は認めなかった(**Fig.7F**)。また**H358M**において**siZEB1**を導入し**MET**を誘導した後に**trametinib**を加えると、**SPRY4**は**H358M**親株と同様に低下したが、**pFRS2**の上昇は認めなかった(**Fig.7G**)。このことから**SPRY4**低下による**FGFR1-FRS2**経路のフィードバック機構は上皮系ではなく間葉系の**KRAS**変異肺癌細胞株に特有であると考えた。

Table1

ProbeName	UniGeneID	Gene Symbol	GeneName	Ref Seq Accession	Fold change (H1792 trametinib) vs. (H1792 no Trx)	Regulation (H1792 Trametinib) vs. (H1792 no Trx)
A_23_P372923	Hs.264887	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	NM_001174066	1.102	down
A_23_P301304	Hs.264887	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	NM_023110	1.077	up
A_23_P303145	Hs.533683	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2		1.430	down
A_23_P202334	Hs.533683	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	NM_022970	1.063	up
A_24_P206624	Hs.533683	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	NM_022970	1.220	down
A_23_P500501	Hs.1420	FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	NM_000142	2.178	up
A_23_P213336	Hs.483635	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	NM_000800	1.206	up
A_33_P3242136	Hs.483635	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	NM_001257206	1.035	up
A_33_P3379886	Hs.284244	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	NM_002006	1.423	up
A_33_P3419696	Hs.284244	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	NM_002006	1.427	up
A_33_P3380797	Hs.37092	FGF3	fibroblast growth factor 3	NM_005247	1.093	up
A_24_P355720	Hs.1755	FGF4	fibroblast growth factor 4	NM_002007	1.664	down
A_23_P212800	Hs.37055	FGF5	fibroblast growth factor 5	NM_004464	1.594	down
A_33_P3411907	Hs.37055	FGF5	fibroblast growth factor 5	NM_033143	1.939	down
A_32_P196021	Hs.567268	FGF7	fibroblast growth factor 7	NM_002009	1.203	down
A_33_P3257027	Hs.567268	FGF7	fibroblast growth factor 7	NM_002009	1.232	up
A_23_P46829	Hs.57710	FGF8	fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)	NM_033163	1.060	down
A_33_P3348714	Hs.111	FGF9	fibroblast growth factor 9	NM_002010	1.204	down
A_33_P3348719	Hs.111	FGF9	fibroblast growth factor 9	NM_002010	1.457	down
A_23_P377750	Hs.664499	FGF10	fibroblast growth factor 10	NM_004465	1.222	down
A_24_P334300	Hs.390250	FGF12	fibroblast growth factor 12	NM_004113	1.178	down
A_23_P217319	Hs.6540	FGF13	fibroblast growth factor 13	NM_004114	1.207	down
A_23_P88033	Hs.508616	FGF14	fibroblast growth factor 14	NM_175929	1.956	down
A_23_P429363	Hs.248192	FGF17	fibroblast growth factor 17	NM_003867	1.225	down
A_23_P427587	Hs.249200	FGF19	fibroblast growth factor 19	NM_005117	1.209	down
A_23_P395404	Hs.199905	FGF20	fibroblast growth factor 20	NM_019851	1.215	down
A_33_P3400248	Hs.199905	FGF20	fibroblast growth factor 20	NM_019851	2.047	up
A_23_P101564	Hs.283015	FGF21	fibroblast growth factor 21	NM_019113	1.117	down
A_23_P117095	Hs.287370	FGF23	fibroblast growth factor 23	NM_020638	1.207	down

Table1)H1792にtrametinibを加えた後のFGF、FGFR遺伝子発現の変化(マイクロアレイ法)

Fig.7A

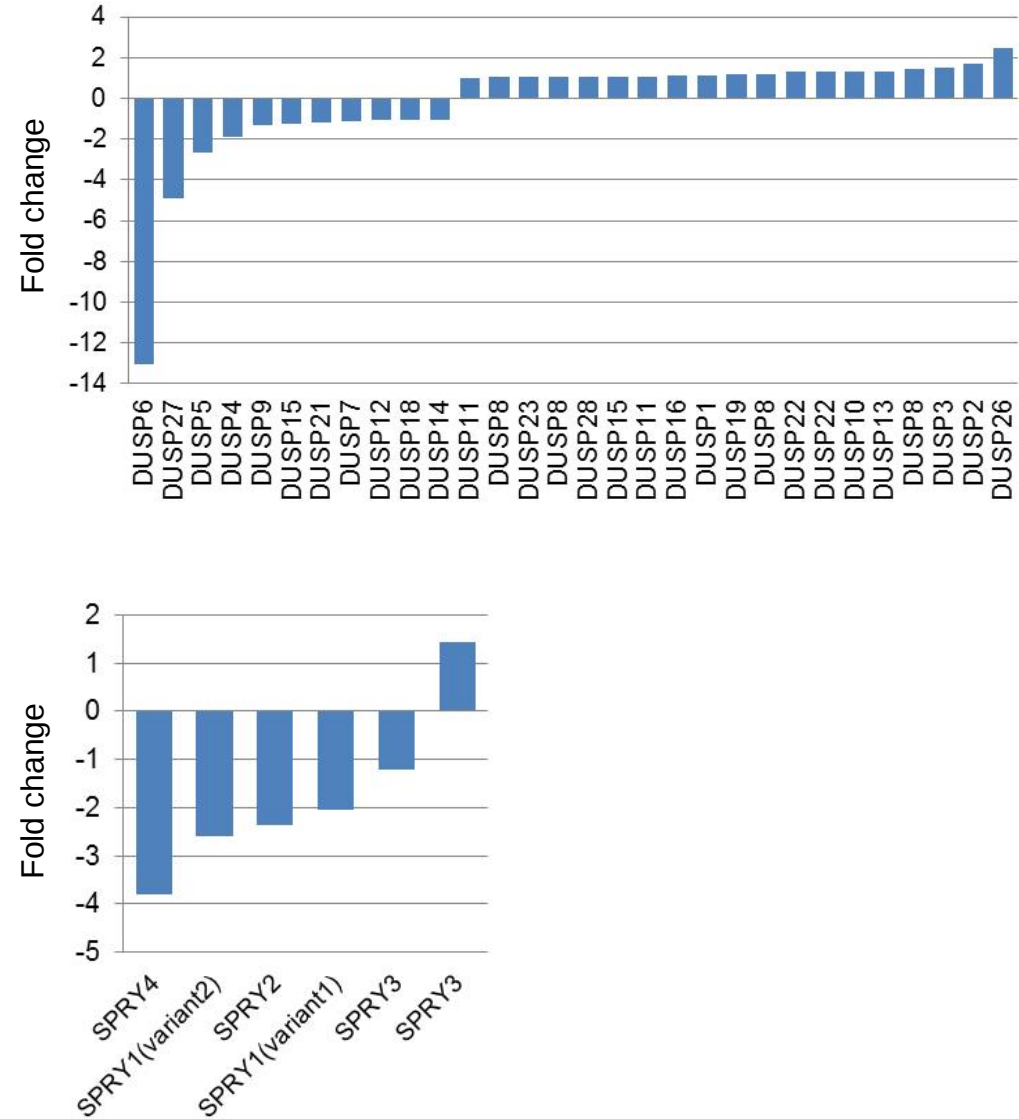


Fig.7B

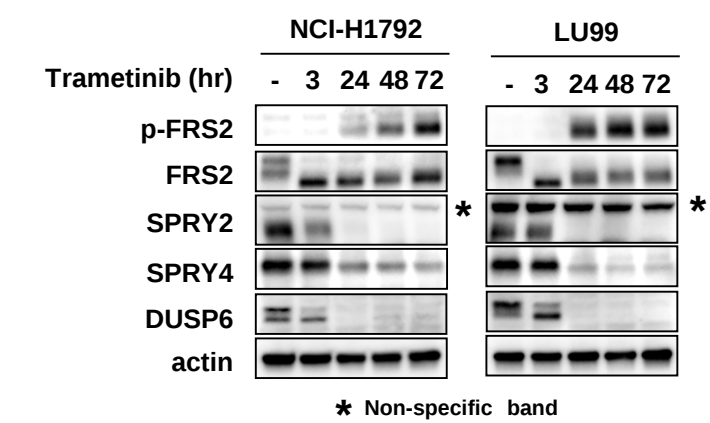


Fig.7C

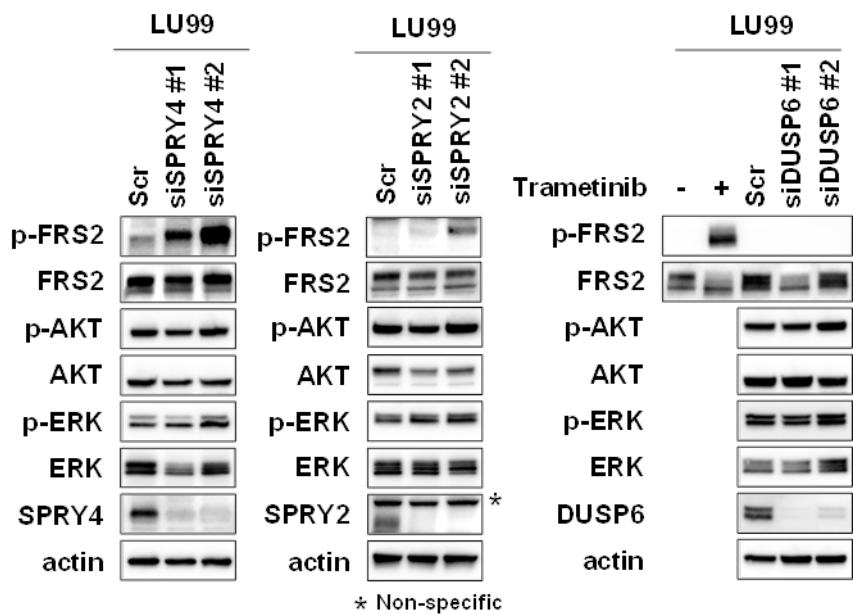


Fig.7D

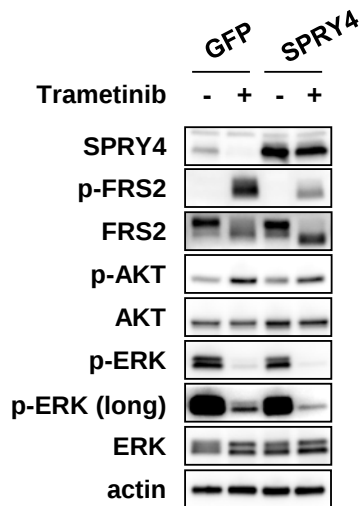


Fig.7E

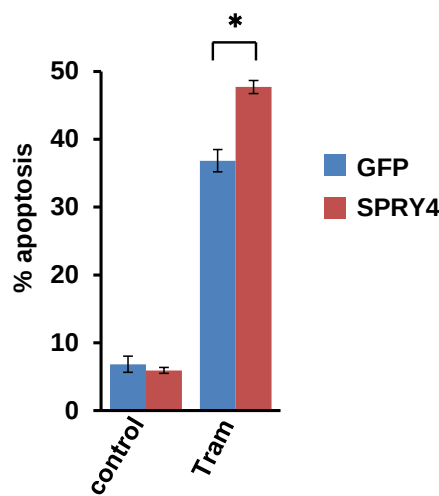


Fig.7F

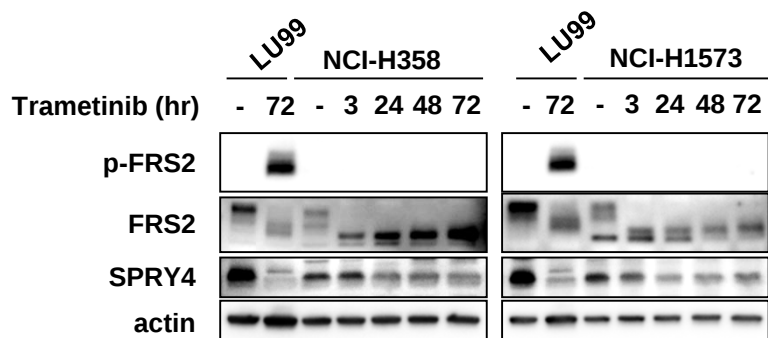


Fig.7G

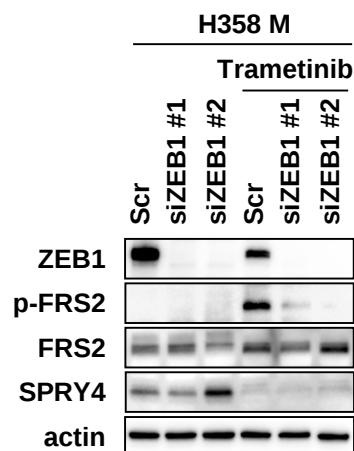


Fig.7A) H1792にtrametinibを加えた後のSPRYs、DUSPsの遺伝子発現の変化(マイクロアレイ法)

Fig.7B) H1792、LU99にtrametinibを加えた後のpFRS2、SPRY2、SPRY4、DUSP6の経時的変化

Fig.7C) LU99に対するsiSPRY4siDUSP6導入72時間後のpFRS2の変化。pFRS2のpositive controlとしてLU99をtrametinibで48時間処理したlysateを用いた。

Fig.7D) GFPまたはSPRY4を遺伝子導入したLU99にtrametinibを48時間加えた後のpFRS2と下流シグナルの変化

Fig.7E) GFPまたはSPRY4を遺伝子導入したLU99にtrametinibを72時間加えた後の細胞のアポトーシスの割合 * : $p < 0.05$ (Student's t test)

Fig.7F) H358、H1573にtrametinibを加えた後の経時的なpFRS2、SPRY4の変動
pFRS2のpositive controlとしてLU99をtrametinibで48時間処理したlysateを用いた。

Fig.7G) H358MにsiZEB1導入48時間後、trametinibを48時間加えた後のSPRY4、pFRS2の変化
Trametinib:50nMにて使用 Scr: scramble siRNA, si SPRY4: SPRY4 siRNA, si SPRY2: SPRY2 siRNA, si DUSP6: DUSP6 siRNA, si ZEB1: ZEB1 siRNA

8) 間葉系KRAS変異肺癌細胞株のゼノグラフトマウスモデルによる

TrametinibとBGJ398の抗腫瘍効果の検討

次にin vivoで間葉系KRAS変異肺癌に対するTrametinibとBGJ398の抗腫瘍効果について検討した。LU99のゼノグラフトマウスモデルにおいてcontrol群、BGJ398(15mg/kg)群、trametinib(0.6mg/kg)群、併用群に分けて(n=8)それぞれ治療を行った。各薬剤は全て1日1回の経口投与とした。その結果、trametinib群では腫瘍の縮小は認めなかったが、併用群では著明な腫瘍の縮小を認めた(Fig.8A)。また各群で治療開始時と治療終了時のそれぞれの腫瘍体積を比較したところ、併用群では全ての腫瘍において縮小を認めた(Fig.8B)。また治療中のマウスの体重減少は治療開始前の10%範囲内であり併用療法による毒性は許容範囲であっ

た(Fig.8C)。次に治療終了時(day25)の腫瘍を切除し、腫瘍組織におけるpFRS2と下流シグナルについてウェスタンブロット法で検証した。その結果、trametinib群ではpFRS2の上昇、併用群ではpFRS2の抑制を認め、pERK、pAKT、pS6についてもtrametinib群と比較して併用群で明らかな抑制を認めた(Fig.8D)。更に別の間葉系KRAS変異肺癌細胞株であるNCI-H23のゼノグラフトマウスモデルにおいても同様にcontrol群、BGJ398(15mg/kg)群、trametinib(0.6mg/kg)群、併用群でそれぞれ治療を行った。その結果、trametinib群では腫瘍の縮小は認めなかったが、併用群では腫瘍は縮小傾向であり、LU99のゼノグラフトマウスモデルと同様の傾向を認めた(Fig.8E)。また治療中体重減少や下痢を含めた重篤な副作用は示さなかった。間葉系KRAS変異肺癌に対するTrametinibとBGJ398の併用はIn vivoにおいても有効と考えられた。

Fig. 8A

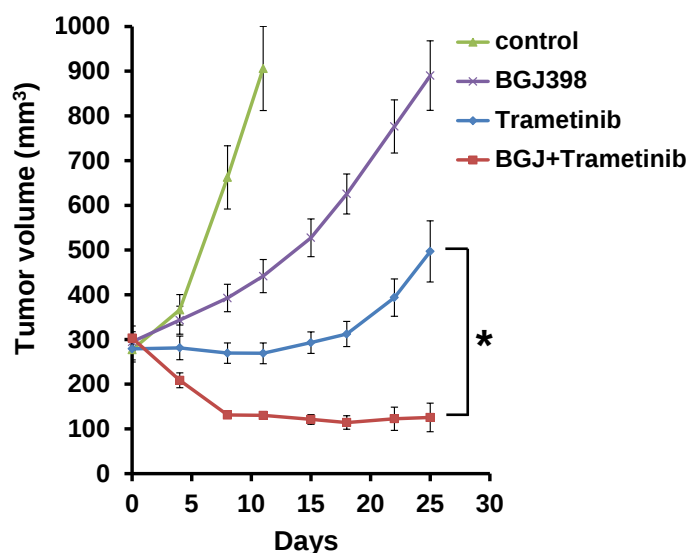


Fig. 8B

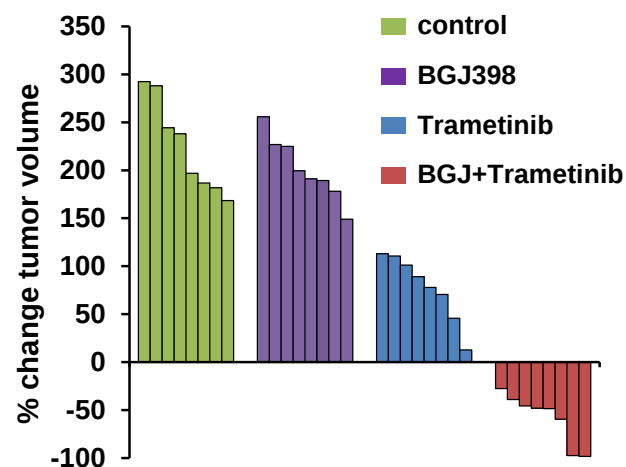


Fig.8C

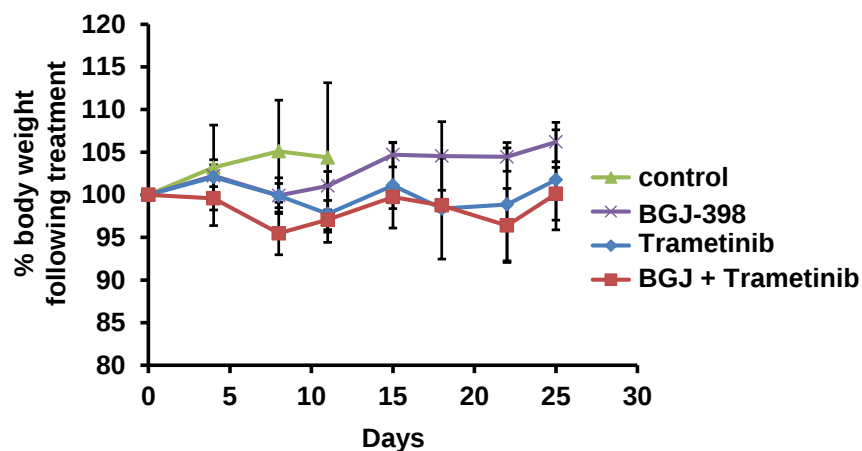


Fig.8D

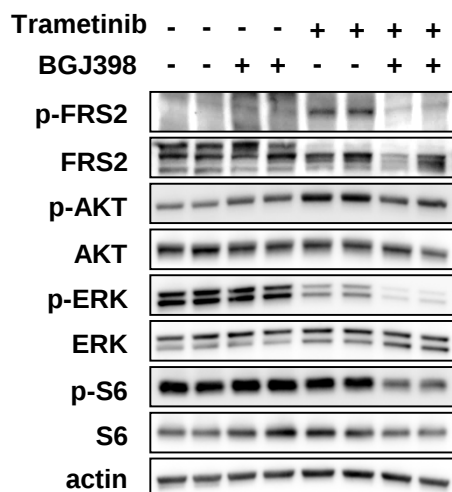


Fig.8E

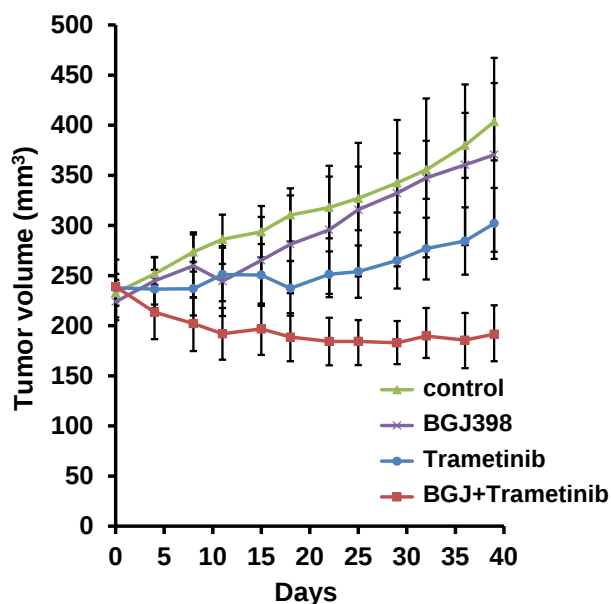


Fig.8A) LU99のゼノグラフトマウスモデルの腫瘍成長曲線(n=8±SEM)

* : p<0.05 (Tukey-Kramer法)

Fig.8B) LU99のゼノグラフトマウスモデルの腫瘍体積の変化率 (治療開始時点と比較)

Fig.8C) LU99のゼノグラフトマウスモデルの各治療群における体重変化

Fig.8D) LU99のゼノグラフトマウスモデルにおける、治療後の腫瘍内のpFRS2と下流シグナル

Fig.8E) H23のゼノグラフトマウスモデルの腫瘍成長曲線(n=5±SEM)

9) PDX(patients derived xenograft)に対するtrametinibとBGJ398の抗腫瘍効果の検討

最後によりヒトに近いマウスモデルとされているPDXモデル⁶⁴を用いて trametinibとBGJ398の併用による抗腫瘍効果を検証した。PDXモデルは

KRAS(G12D)変異のある肺腺癌患者由来のものを使用した。まずPDXの腫瘍における上皮間葉系のフェノタイプをウェスタンブロット法にて確認した。その結果、PDXの腫瘍はFGFR1とVimentinの発現が高く、E-cadherinとERBB3の発現はほとんど認めず、間葉系の腫瘍と考えられた(Fig.9A)。Virginia Commonwealth大学のAnthony C. Faber博士とKonstantinos V. Floros博士に依頼し、このPDXをcontrol群、BGJ398(15mg/kg)群、trametinib(0.6mg/kg)群に分けて治療を行ったところ、3群全てにおいて腫瘍は増大傾向を認めた。しかし、trametinib群において腫瘍体積が1000 mm³を超えた時点(day14)からBGJ398との併用に切り替えたところ、著明な腫瘍縮小を認めた(Fig.9B)。間葉系KRAS変異肺癌に対するTrametinibとBGJ398の併用はPDXモデルにおいても有効であった。

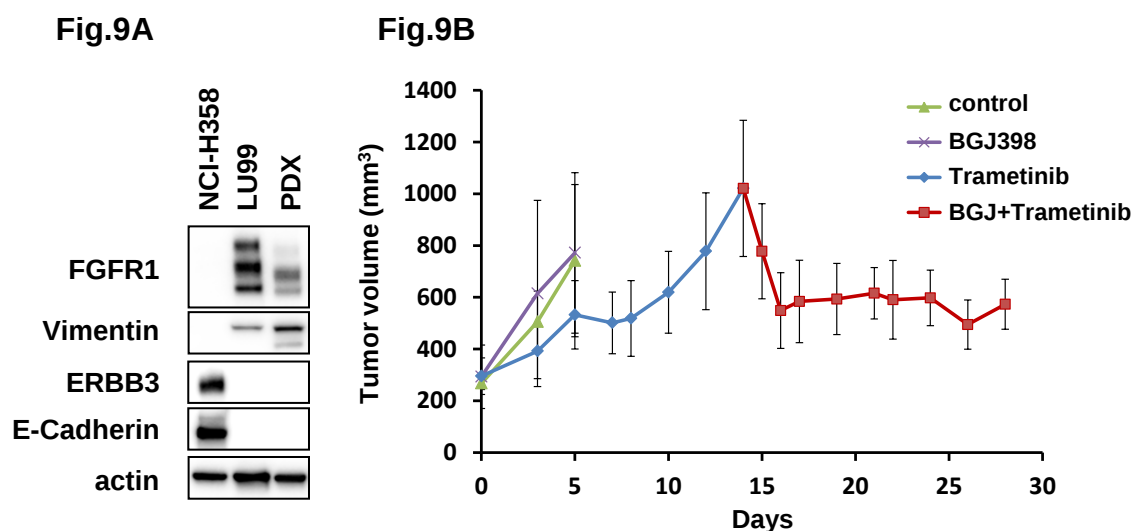


Fig.9A) PDXモデルのFGFR1、Vimentin、ERBB3、E-cadherinの発現。positive controlまたはnegative controlとしてH358とLU99のlysateを使用した。

Fig.9B) PDXモデルの腫瘍成長曲線(n=3±SEM)

Fig.10

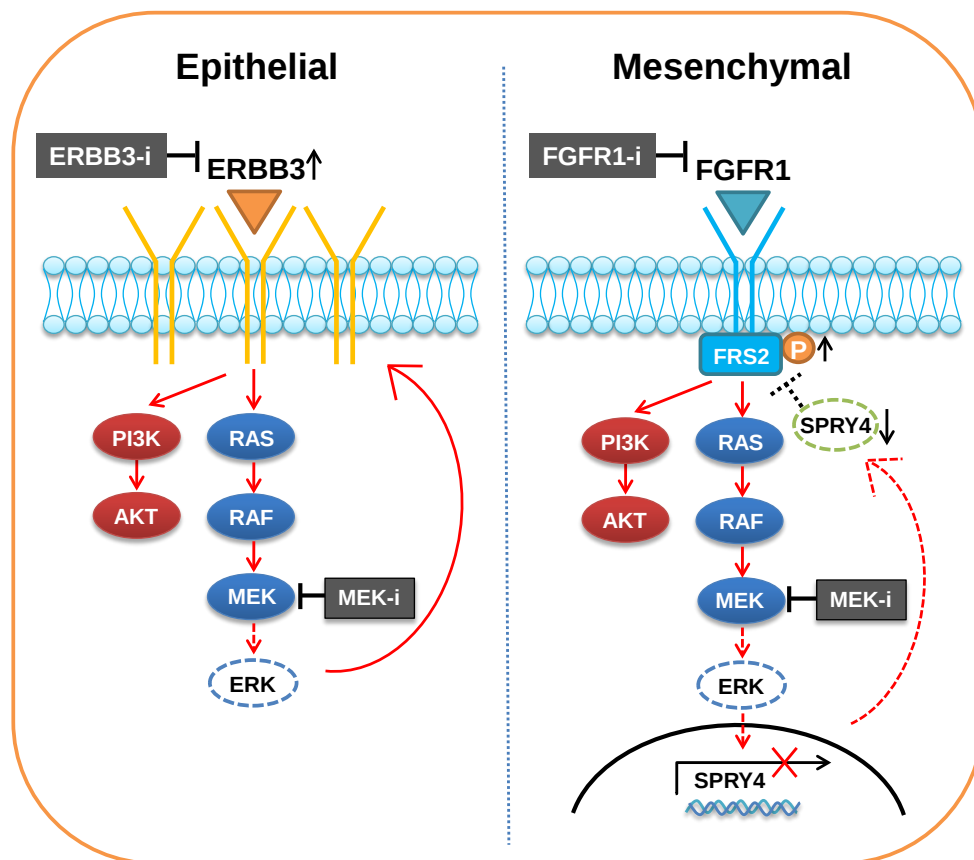


Fig.10 KRAS 変異肺癌における上皮間葉移行状態に基づく MEK 阻害薬と RTK 阻害薬の併用
MEK-i : MEK inhibitor ERBB3-i : ERBB3 inhibitor FGFR1-i : FGFR1 inhibitor

考察

1. KRAS 変異肺癌における MEK 阻害薬の耐性機構

ERK 経路は KRAS 変異癌において重要なシグナル経路とされているが、複数の臨床試験において、KRAS 変異肺癌に対する MEK 阻害薬単剤の抗腫瘍効果は、有効性に乏しかった^{38,39}。MEK 阻害薬の効果が乏しい要因の一つとしては、ERK 経路のフィードバック機構による同経路の再活性化が考えられる。ERK 経路の再活性化は KRAS 変異以外のドライバー変異を有する癌においても初期耐性や獲得耐性に関与していると報告されている⁶⁵⁻⁶⁷。本研究でも KRAS 変異肺癌において MEK 阻害薬投与後に ERK の再活性化を認めたが、selumetinib のほうが trametinib より ERK の再活性化を強く認めた。この理由としては KRAS 変異癌に selumetinib を投与すると CRAF-MEK 複合体が誘導され、早期に ERK の再活性化が起きるが、trametinib はこの CRAF-MEK の結合も阻害し、ERK の抑制効果がより強いためと考えられている⁶⁸。このことが Fig.1B で示したように trametinib が selumetinib よりも細胞増殖抑制効果が高かった要因と考えられる。

また MEK 阻害薬の効果が乏しい他の要因としては、ERK 経路以外のシグナル経路の活性化、特に PI3K 経路の活性化が考えられる。ERK 経路と PI3K 経路は互いにクロストークがあり、一方のシグナル経路の抑制はもう一方の活性化をもたらすことが報告されている^{42,69}。本研究でも一部の KRAS 変異肺癌細胞株では MEK 阻害薬投与後に PI3K-AKT 経路の活性化を認めた。さらに KRAS 変異肺癌に対して trametinib 投与の際に生じる ERK 経路の再活性化、PI3K 経路の活性化には RTK が強く関与しており、上皮系の KRAS 変異肺癌細胞株においては ERBB3、間葉系においては FGFR1 の活性を認め、実際に上皮系の細胞株では PI3K の調節サブユニットである p85 と ERBB3 の直接結合を認めた。一方で FGFR1 は GRB2、GAB1 を介して PI3K と結合するため、p85 と FGFR1 の直接結合を証明することは困難であった。しかし、間葉系の細胞株で MEK 阻害薬と PI3K の阻害薬の併用により生じる細胞のアポトーシスの割合と、MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用により起こるアポトーシスの割合は強い相関関係を認めたことから、MEK 阻害薬による PI3K 経路の活性化には FGFR1 が関係していることが示唆された。EMT と ERBB3、FGFR1 の関連においては、これまでに非小細胞肺癌の細胞株などで ERBB3 の発現低下と間葉系のフェノタイプの関連が報告されている^{60,61}。また胚の発生過程や前立腺癌モデルにおいては、FGFR1 が EMT を誘導することが報告されており^{70,71}、EMT と ERBB3、FGFR1 の関連性が認められている。

実際に細胞株もしくは腫瘍の上皮間葉移行状態に基づいて trametinib と afatinib もしくは trametinib と BGJ398 を併用することで、in vitro では細胞のアポトーシスが強く誘導され、in vivo では高い抗腫瘍効果を認めた。MEK 阻害薬

により活性化してくる RTK は MEK 阻害薬投与時のフィードバック機構として働いていると考えられた。これらの研究結果から、KRAS 変異肺癌の治療戦略として、trametinib と上皮間葉移行状態に基づく RTK(ERBB3 または FGFR1)阻害薬の併用は有効と考えられた。今回の研究結果に基づいた KRAS 変異肺癌の治療戦略について Fig.10 に示した。

2. KRAS 変異肺癌に対する MEK 阻害薬による RTK 活性化のメカニズム

間葉系 KRAS 変異肺癌において MEK 阻害薬により FGFR1-FRS2 経路が活性化するメカニズムは、SPRYs(特に SPRY4)による内在性のフィードバック機構だと考えられた。SPRY4 は ERK により転写調節を受けており、通常 FRS2 を負に制御しているが、MEK 阻害薬により ERK が抑制されるとその発現が低下し、FRS2 の抑制が解除される。興味深いことに上皮系の細胞株においても trametinib の投与により SPRY4 の発現は低下したが、pFRS2 の活性化は認めなかった。また H358M に対し ZEB1 の siRNA を導入し、MET を起こした後に trametinib を加えると、SPRY4 の低下は同様に認めたが、pFRS2 の活性化は認めなかった(Fig.7G)。これらのことから、SPRY4 の発現低下による pFRS2 の活性化は間葉系の KRAS 変異肺癌に特有なフィードバック機構と考えられた。一方、上皮系の KRAS 変異肺癌においては MEK 阻害薬投与後に ERBB3 の活性化を認め、ERBB3 による下流シグナルへのフィードバック機構を認めた。trametinib の投与により ERBB3 が上昇するメカニズムについては、本研究では検証していないが、これまでにいくつかの報告がされている。例えば乳癌や KRAS 変異肺癌・大腸癌においては、selumetinib により MYC(myelocytomatosis)のユビキチン化による分解が生じ、ERBB3 の転写抑制が解除されることが報告されている^{51,54}。また、BRAF 変異癌においては BRAF 阻害薬もしくは trametinib により ERBB3 の転写促進因子である FOXD3(Forkhead box D3)の発現増加や、ERBB3 の転写抑制因子である CtBP1/2(carboxyl-terminal binding protein 1/2)の発現低下が報告されている^{52,72}。本研究においても trametinib による ERBB3 の発現上昇にこれらの転写因子が関与している可能性はある。

3. KRAS変異肺癌とheterogeneity

本研究では、KRAS 変異肺癌の一部のサブグループにおいては腫瘍の上皮間葉移行状態に基づき MEK 阻害薬と RTK 阻害薬による個別化治療が有効であることを見出した。しかし、Fig.6E の結果からもわかるように、全ての KRAS 変異肺癌において、この個別化治療が有効なわけではない。その要因の一つとしては腫瘍の heterogeneity が考えられる。実際、TCGA のデータに基づいた遺伝子解析の結果(Fig.4G)を見ると、上皮系、間葉系の二つのサブグループにおける

ERBB3、FGFR1 の発現レベルは様々であり、腫瘍によって上皮間葉移行状態は異なる。また腫瘍実質内においても上皮間葉移行状態は heterogeneity が存在すると考えられる。

また本研究では ERK 経路と PI3K 経路にのみ着目したが、KRAS 変異癌では他のシグナル経路も細胞の生存に寄与している可能性がある。RAS は ERK 経路、PI3K 経路以外に RALGDS 経路など複数の下流シグナルを活性化するとされており、そのシグナル経路は多様である。そのため MEK 阻害薬と ERBB3 阻害薬もしくは FGFR 阻害薬によりアポトーシスが誘導されない細胞株も複数存在することから、それらは ERK 経路、PI3K 経路以外のシグナル経路に生存が依存している可能性がある。KRAS により活性化される下流シグナルは KRAS のアミノ酸変異の種類により異なるとの報告がある。具体的には G12C 変異は RALGDS 経路のシグナル活性化と PI3K シグナルの低下、G12D 変異では ERK 経路と PI3K 経路の両方のシグナル経路が活性化すると報告されている⁷³。しかし本研究で使用した間葉系の KRAS 変異細胞株において、MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用によるアポトーシスの効果と、KRAS アミノ酸変異の種類には一定の傾向を認めなかった。また RALGDS など他の経路の活性については検証していないため、ERK 経路と PI3K 経路以外の下流シグナルへの影響については更なる検証が必要である。

また trametinib と BGJ398 もしくは GDC-0941 の併用による細胞のアポトーシスの割合は個々の細胞株によって大きく異なっていた (Fig.6E)。最近の研究において、抗アポトーシス関連タンパクである Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra Large) の過剰発現や、BCL-XL とアポトーシス促進タンパクである BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death) と PUMA (p53-up-regulated modulator of apoptosis) の発現の比率などが MEK 阻害薬の耐性に関与していることが報告されている^{74,75}。MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬によりアポトーシスが誘導されない細胞株においては、これらのアポトーシス関連タンパクも影響している可能性があると思われる。

本研究で得られた新知見

- ・KRAS 変異肺癌では上皮間葉移行状態により MEK 阻害薬投与時に活性化してくる RTK が異なり、上皮系の KRAS 変異肺癌細胞株では ERBB3 が、間葉系では FGFR1 が活性化する。これらの RTK 活性化により ERK 経路の再活性化と PI3K の活性化が生じる。
- ・間葉系 KRAS 変異肺癌において MEK 阻害薬により FGFR1-FRS2 経路が活性化するメカニズムは、SPRYs(特に SPRY4)のタンパク発現低下による内在性のフィードバック機構である。また SPRY4 のタンパク発現低下による FGFR1-FRS2 経路の活性化は間葉系の KRAS 変異細胞株に特異的である。
- ・KRAS 変異肺癌細胞株において、上皮系細胞株では MEK 阻害薬と pan-ERBB 阻害薬の併用、間葉系では MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用により細胞のアポトーシスがより誘導された。
- ・KRAS 変異肺癌のゼノグラフトモデルにおいて上皮系腫瘍では MEK 阻害薬と pan-ERBB 阻害薬の併用、間葉系腫瘍では MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用により著明な腫瘍縮小効果を認めた。MEK 阻害薬と FGFR 阻害薬の併用は間葉系の KRAS 変異肺癌を有する PDX モデルにおいても抗腫瘍効果を認めた。

新知見の意義

KRAS変異肺癌における上皮間葉移行状態は、MEK阻害薬とRTK阻害薬による個別化治療を行う際のバイオマーカーとなりうる。
そして上皮間葉移行状態に基づいたMEK阻害薬とRTK阻害薬の併用は、一部のKRAS変異肺癌において有効な分子標的治療になると考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、金沢大学がん進展制御研究所／腫瘍内科 矢野 聖二教授、北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野 西村 正治教授、独立行政法人国立病院機構北海道がんセンター 大泉 聡史医師に深謝致します。ならびに、適切な助言と直接の御指導を賜りました金沢大学がん進展制御研究所／腫瘍内科 衣斐 寛倫 准教授、小谷 浩 医師、足立 雄太 医師に感謝の意を表します。また岡山大学医歯薬学総合研究科 富田 秀太 准教授には遺伝子発現解析を、Virginia Commonwealth 大学の Anthony C. Faber 博士と Konstantinos V. Floros 博士には PDX モデルの実験をご協力頂きました。名古屋大学大学院医学研究科分子腫瘍学分野 高橋 隆教授には細胞株を提供して頂きました。この場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

- 1 Lynch, T. J. *et al.* 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 (2004).
- 2 Paez, J. G. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**, 1497-1500 (2004).
- 3 Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* **362**, 2380-2388 (2010).
- 4 Mitsudomi, T. *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* **11**, 121-128 (2010).
- 5 Lin, J. J. *et al.* Five-Year Survival in EGFR-Mutant Metastatic Lung Adenocarcinoma Treated with EGFR-TKIs. *J Thorac Oncol* **11**, 556-565 (2016).
- 6 Kohno, T. *et al.* RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci* **104**, 1396-1400 (2013).
- 7 Hida, T. *et al.* Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* **390**, 29-39 (2017).
- 8 Shaw, A. T. & Solomon, B. J. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **372**, 683-684 (2015).
- 9 Planchard, D. *et al.* Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 984-993 (2016).
- 10 Yoh, K. *et al.* Vandetanib in patients with previously treated RET-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (LURET): an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Respir Med* **5**, 42-50 (2017).
- 11 Li, T., Kung, H. J., Mack, P. C. & Gandara, D. R. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol* **31**, 1039-1049 (2013).
- 12 Malumbres, M. & Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**, 459-465 (2003).
- 13 Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* **11**, 761-774 (2011).
- 14 Cox, A. D. & Der, C. J. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2-27 (2010).

- 15 Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* **45**, D777-D783 (2017).
- 16 Mason, J. M., Morrison, D. J., Basson, M. A. & Licht, J. D. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* **16**, 45-54 (2006).
- 17 Samatar, A. A. & Poulikakos, P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 928-942 (2014).
- 18 Hauschild, A. *et al.* Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 358-365 (2012).
- 19 Chapman, P. B. *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **364**, 2507-2516 (2011).
- 20 Long, G. V. *et al.* Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **386**, 444-451 (2015).
- 21 Garcia-Echeverria, C. & Sellers, W. R. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* **27**, 5511-5526 (2008).
- 22 Carracedo, A. & Pandolfi, P. P. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**, 5527-5541 (2008).
- 23 Mendoza, M. C., Er, E. E. & Blenis, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* **36**, 320-328 (2011).
- 24 Chen, B. *et al.* Downregulation of ribosomal protein S6 inhibits the growth of non-small cell lung cancer by inducing cell cycle arrest, rather than apoptosis. *Cancer Lett* **354**, 378-389 (2014).
- 25 Goetz, R. & Mohammadi, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 166-180 (2013).
- 26 Reuss, B. & von Bohlen und Halbach, O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* **313**, 139-157 (2003).
- 27 Helsten, T. *et al.* The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res* **22**, 259-267 (2016).
- 28 Nogova, L. *et al.* Evaluation of BGJ398, a Fibroblast Growth Factor Receptor 1-3 Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors Harboring Genetic Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptors: Results of a Global Phase I, Dose-Escalation and Dose-Expansion Study. *J Clin Oncol* **35**, 157-165 (2017).
- 29 Tabernero, J. *et al.* Phase I Dose-Escalation Study of JNJ-42756493, an Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* **33**, 3401-3408 (2015).

- 30 Bartis, D., Mise, N., Mahida, R. Y., Eickelberg, O. & Thickett, D. R. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax* **69**, 760-765 (2014).
- 31 Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-454 (2002).
- 32 De Craene, B. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* **13**, 97-110 (2013).
- 33 Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* **16**, 488-494 (2014).
- 34 Thomson, S. *et al.* 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 (2005).
- 35 Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* **3**, 75ra26 (2011).
- 36 Suda, K. *et al.* 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 (2011).
- 37 Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J. & Der, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov* **13**, 828-851 (2014).
- 38 Janne, P. A. *et al.* Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* **14**, 38-47 (2013).
- 39 Blumenschein, G. R., Jr. *et al.* A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)dagger. *Ann Oncol* **26**, 894-901 (2015).
- 40 Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 11-22 (2003).
- 41 Engelman, J. A. *et al.* Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* **14**, 1351-1356 (2008).
- 42 Sos, M. L. *et al.* Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18351-18356 (2009).
- 43 Bedard, P. L. *et al.* A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **21**, 730-738 (2015).

- 44 Caunt, C. J., Sale, M. J., Smith, P. D. & Cook, S. J. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat Rev Cancer* **15**, 577-592 (2015).
- 45 Ritt, D. A., Monson, D. M., Specht, S. I. & Morrison, D. K. Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Mol Cell Biol* **30**, 806-819 (2010).
- 46 Sturm, O. E. *et al.* The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier. *Sci Signal* **3**, ra90 (2010).
- 47 Eblen, S. T. *et al.* Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Mol Cell Biol* **24**, 2308-2317 (2004).
- 48 Caunt, C. J. & Keyse, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J* **280**, 489-504 (2013).
- 49 Sasaki, A., Taketomi, T., Wakioka, T., Kato, R. & Yoshimura, A. Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *J Biol Chem* **276**, 36804-36808 (2001).
- 50 Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T. & Nishida, E. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* **4**, 850-858 (2002).
- 51 Duncan, J. S. *et al.* Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer. *Cell* **149**, 307-321 (2012).
- 52 Montero-Conde, C. *et al.* Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov* **3**, 520-533 (2013).
- 53 Ebi, H. *et al.* Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. *J Clin Invest* **121**, 4311-4321 (2011).
- 54 Sun, C. *et al.* Intrinsic resistance to MEK inhibition in KRAS mutant lung and colon cancer through transcriptional induction of ERBB3. *Cell Rep* **7**, 86-93 (2014).
- 55 Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603-607 (2012).
- 56 de Hoon, M. J., Imoto, S., Nolan, J. & Miyano, S. Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**, 1453-1454 (2004).
- 57 Saldanha, A. J. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246-3248 (2004).
- 58 Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543-550 (2014).
- 59 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin*

- Invest* **119**, 1420-1428 (2009).
- 60 Fuchs, B. C. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* **68**, 2391-2399 (2008).
- 61 Salt, M. B., Bandyopadhyay, S. & McCormick, F. Epithelial-to-mesenchymal transition rewires the molecular path to PI3K-dependent proliferation. *Cancer Discov* **4**, 186-199 (2014).
- 62 Larsen, J. E. *et al.* ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest* **126**, 3219-3235 (2016).
- 63 Guagnano, V. *et al.* Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* **54**, 7066-7083 (2011).
- 64 Aparicio, S., Hidalgo, M. & Kung, A. L. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer* **15**, 311-316 (2015).
- 65 Tricker, E. M. *et al.* Combined EGFR/MEK Inhibition Prevents the Emergence of Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov* **5**, 960-971 (2015).
- 66 Lito, P. *et al.* Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell* **22**, 668-682 (2012).
- 67 Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* **483**, 100-103 (2012).
- 68 Lito, P. *et al.* Disruption of CRAF-mediated MEK activation is required for effective MEK inhibition in KRAS mutant tumors. *Cancer Cell* **25**, 697-710 (2014).
- 69 Carracedo, A. *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* **118**, 3065-3074 (2008).
- 70 Ciruna, B. & Rossant, J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* **1**, 37-49 (2001).
- 71 Acevedo, V. D. *et al.* Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell* **12**, 559-571 (2007).
- 72 Abel, E. V. *et al.* Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J Clin Invest* **123**, 2155-2168 (2013).
- 73 Ihle, N. T. *et al.* Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* **104**, 228-239 (2012).

- 74 Hata, A. N. *et al.* Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res* **74**, 3146-3156 (2014).
- 75 Lin, L. *et al.* The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat Genet* **47**, 250-256 (2015).